

**Der Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* als  
nutritiv-beeinflussbares Fettmodellssystem**

**Dissertation**

zur Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

an der Fakultät der Mathematik und Naturwissenschaften

der Bergischen Universität Wuppertal

vorgelegt von  
Ton Nu Tra My Tran  
aus Berlin  
- 2022 -

**Erstgutachterin:** Prof.‘in Dr. Julia Bornhorst

**Zweitgutachter:** PD Dr. Ralph Menzel



Für meine Familie



## Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Eidesstattliche Erklärung.....	V
Danksagung.....	VII
Abkürzungsverzeichnis.....	IX
Abbildungsverzeichnis.....	XV
Diagrammverzeichnis.....	XVI
Tabellenverzeichnis.....	XIX
1 Einleitung.....	1
1.1 Hintergrund der Arbeit.....	1
1.2 <i>Caenorhabditis elegans</i> .....	3
1.2.1 Körperbau und Lebenszyklus von <i>C. elegans</i> .....	3
1.2.2 <i>C. elegans</i> als Modellorganismus.....	7
1.2.3 Fettmetabolismus in <i>C. elegans</i> .....	9
1.2.3.1 Fettsynthese und -speicherung.....	9
1.2.3.2 Fettabbau.....	12
1.2.3.3 Regulation des Fettmetabolismus.....	13
1.2.3.4 Fettsäuren und ihre funktionellen Rollen.....	15
1.2.3.5 <i>Lipid droplets</i> .....	18
1.3 Vererbung von mehrgenerationalen Effekten.....	20
2 Zielsetzung.....	23
3 Material und Methoden.....	25
3.1 Material.....	25
3.1.1 Organismen.....	25
3.1.2 Verbrauchsmaterialien.....	26
3.1.3 Geräte.....	27
3.1.4 Softwares.....	28
3.1.5 Chemikalien.....	29
3.1.6 Puffer und Lösungen.....	30
3.1.7 Farbstoffe.....	32
3.1.8 Kits.....	32
3.2 Methoden.....	33
3.2.1 Allgemeine Kultivierungsmethoden.....	33
3.2.1.1 OP50-Futterbakterien-Aufzucht.....	33
3.2.1.2 Kultivierung von <i>C. elegans</i> .....	33
3.2.1.2.1 Haltung auf NGM-Agarplatten.....	33
3.2.1.2.2 Haltung in Flüssigkultur.....	34

3.2.1.2.3	<i>Egg preparation</i> und Alterssynchronisation .....	34
3.2.2	Methodenetablierung .....	35
3.2.2.1	Nile Red-Färbung - Testung von Konzentrationen und Inkubationszeiten	35
3.2.2.2	Testung von Positivkontrollen .....	36
3.2.2.2.1	Deletionsmutanten .....	37
3.2.2.2.2	Glucose und <i>starvation</i> .....	37
3.2.2.2.3	Futtermenge .....	37
3.2.3	Triglycerid-Assay .....	38
3.2.4	Körpergrößen- und Eizahlbestimmung .....	39
3.3	Charakterisierung von <i>C. elegans</i> -Fettphänotypen .....	41
3.3.1	Analyse intestinaler <i>lipid droplets</i> mittels hochauflösender Mikroskopie .....	41
3.3.2	Fettsäure-Analyse mittels GC-MS .....	42
3.4	Orlistatbehandlung .....	44
3.5	Mehrgenerationale Studien .....	45
3.6	Statistische Analysen .....	46
4	Ergebnisse .....	47
4.1	Fettfärbung in <i>C. elegans</i> mit Nile Red .....	47
4.1.1	Optimierung der Konzentration und Inkubationsdauer des Fixierungsmediums und der Nile Red-Färbelösung .....	47
4.1.2	Etablierung von Positivkontrollen für die Fettbestimmung in <i>C. elegans</i> .....	49
4.1.2.1	Unspezifischer Fettphänotyp der Deletionsmutanten <i>daf-2</i> und <i>eat-2</i> in der Flüssigkulturhaltung .....	49
4.1.2.2	Glucose-induzierte Fettgehaltserhöhung und Retardierung in <i>C. elegans</i>	51
4.1.2.3	Hunger-induzierte Veränderung des Fettgehalts in <i>C. elegans</i> .....	61
4.1.2.4	Einfluss unterschiedlicher Futtermengen auf den Fettgehalt von <i>C. elegans</i> .....	67
4.2	Charakterisierung verschiedener <i>C. elegans</i> -Fettphänotypen im Testsystem .....	78
4.2.1	Einfluss der Futtermenge auf die Körpergröße, Anzahl der Eier <i>in utero</i> und den Triglyceridgehalt .....	78
4.2.2	Einfluss der Futtermenge auf intestinale <i>lipid droplets</i> .....	80
4.2.3	Einfluss der Futtermenge auf Fettsäuregehalt und -muster von adulten <i>C. elegans</i> und der Eier .....	83
4.3	Einfluss von Orlistat auf den Fettgehalt von <i>C. elegans</i> .....	88
4.3.1	Einfluss von Orlistat auf die Körpergröße und die Anzahl der Eier <i>in utero</i> .....	91
4.3.2	Einfluss von Orlistat auf den Fett- bzw. Triglyceridgehalt .....	93
4.3.3	Einfluss von Orlistat auf intestinale <i>lipid droplets</i> .....	94
4.3.4	Einfluss von Orlistat auf Fettsäuregehalt und -muster von adulten <i>C. elegans</i> und der Eier .....	96

4.4	Einfluss der Futtermengen-induzierten Fettgehalte von <i>C. elegans</i> auf den Fettgehalt der Folgegenerationen .....	101
4.4.1	Einfluss der kontinuierlichen, vermehrten Futtergabe auf den Fettgehalt der Folgegenerationen (multigenerationale Exposition).....	101
4.4.2	Einfluss der erhöhten Futtermenge in der parentalen Generation auf den Fettgehalt der Folgegeneration (intergenerationale Exposition).....	103
5	Diskussion.....	106
5.1	Entwicklung eines optimierten Nile Red-Färbeprotokolls zur semiquantitativen Fettbestimmung in <i>C. elegans</i> .....	106
5.2	Eignung der Deletionsmutanten <i>daf-2</i> und <i>eat-2</i> als Positivkontrollen für die Fettuntersuchungen in <i>C. elegans</i> .....	109
5.3	Eignung von Glucose zur Generierung eines <i>C. elegans</i> -Phänotyps mit hohem Fettprofil.....	112
5.4	Eignung der Hunger-Induktion zur Generierung eines <i>C. elegans</i> -Phänotyps mit geringem Fettprofil .....	116
5.5	Eignung der Futtermenge zur Modulation des Fettgehalts von <i>C. elegans</i> .....	121
5.5.1	Einfluss der Futtermenge auf die adulte Körpergröße und Anzahl der Eier <i>in utero</i> .....	121
5.5.2	Erhöhung der Triglyceridgehalte durch vermehrte Futtergabe .....	122
5.5.3	Veränderung der Größe und Anzahl der <i>lipid droplets</i> adulter <i>C. elegans</i> durch die Futtermenge .....	123
5.5.4	Veränderung des Fettsäuregehalts und -musters in adulten <i>C. elegans</i> durch Modellierung des Nahrungsangebotes .....	125
5.6	Fett-reduzierende Wirkung von Orlistat in <i>C. elegans</i> .....	129
5.7	Untersuchung der mehrgenerationalen Weitergabe Futtermengen-induzierter Fettgehalte in <i>C. elegans</i> (multi- und intergenerationale Effektweitergabe).....	133
6	Ausblick.....	136
7	Zusammenfassung.....	138
8	Abstract .....	139
	Literaturverzeichnis.....	XXI
	Anhang .....	LXIII





## Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich eidesstattlich, die vorliegende Dissertation selbstständig verfasst und keine anderen als die genannten Hilfsmittel benutzt zu haben. Alle inhaltlich übernommenen Stellen wurden als solche gekennzeichnet.

Ferner versichere ich, dass die vorliegende Dissertation in der gegenwärtigen Fassung noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat.

Ich habe keine Doktorprüfung an einer anderen Hochschule abgelegt oder endgültig nicht bestanden.

Berlin, den 30.07.2022

Ton Nu Tra My Tran



### Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Verantwortlichen bedanken, ohne die mir die Anfertigung der Dissertation nicht möglich gewesen wäre.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Gilbert Schönfelder, als Abteilungsleiter der „Experimentellen Toxikologie und Zentralstelle zur Erfassung und Bewertung von Ersatz- und Ergänzungsmethoden zum Tierversuch (ZEBET)“ des Bundesinstituts für Risikobewertung, für die Möglichkeit zur Anfertigung der Dissertation, zur Nutzung jeglicher Ressourcen des Instituts und für seine wohlwollende Förderung meiner Arbeit und für seine Unterstützung.

Die Arbeit und meine Erfahrungen am Institut haben nicht nur meine wissenschaftliche Expertise erweitert, sondern mich auch auf persönlichem Niveau sehr geprägt und bereichert.

Ein ganz besonderer Dank gilt vor allem Frau Dr. Silvia Vogl und Professorin Dr. Julia Bornhorst, die mir eine wunderbare Betreuung während meiner Arbeit waren, mir stets mit Hilfestellungen, aber auch konstruktiver Kritik, zur Seite standen und immer ein offenes Ohr für mich hatten. Ebenfalls möchte ich mich beim Fachgruppenleiter Herrn Dr. Michael Oelgeschläger bedanken, der mir ebenso eine große Stütze war und mir zu jeder Zeit mit Rat und Tat zur Verfügung stand.

Ich bedanke mich außerdem bei Herrn PD Dr. Ralph Menzel für die angenehme gemeinsame Zeit im Labor während unserer Kooperation sowie für seine hilfsbereite und wissenschaftliche Unterstützung als Zweitgutachter.

Ein großer Dank gilt meinen Kolleginnen und Kollegen des „Wurmlabors“, die mich im Labor tatkräftig unterstützt und mir den Alltag erleichtert haben. Außerdem bedanke ich mich bei allen Kolleginnen und Kollegen der gesamten Abteilung für die herzliche Aufnahme in die Abteilung, für den intellektuellen Austausch und regen Diskussionen während der vielen Gespräche und Kaffeepausen, aber auch für den enormen Ausgleich abseits des Labors und der Wissenschaft in den letzten Jahren. Ich werde meine Zeit am BfR mit euch immer in guter Erinnerung behalten.

Zuletzt möchte ich meiner Familie und meinen Freunden für die enorme emotionale Unterstützung danken, für die Kraft und den Mut zur Anfertigung und Vollendung meiner Dissertation. Ich danke euch für eure Liebe und vor allem eure Geduld und euer Verständnis, auch an meinen schlechten Tagen.



## Abkürzungsverzeichnis

®	engl.: <i>registered</i>
™	engl.: <i>trade mark</i>
%	Prozent
% v/v	Volumenprozent
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	Mikromolar
µm <sup>2</sup>	Quadratmikrometer
µm <sup>3</sup>	Kubikmikrometer
5-HT	5-Hydroxytryptamin, Serotonin
A	Fläche
A	Absorption
A <sub>570</sub>	Absorption bei 570 nm
a. u.	engl.: <i>arbitrary units</i> , willkürliche Einheit
ACC	Acetyl-CoA-Carboxylase
ACS	Acyl-CoA-Synthasen
ad.	latein.: <i>adde</i> , fülle auf
AGEs	engl.: <i>advanced glycation end products</i>
AGE-1	engl.: <i>ageing alteration-1</i>
AKT-1	engl.: <i>AKT kinase 1</i> , Proteinkinase B
AMPK	engl.: <i>AMP-activated protein kinase</i>
ATGL-1	Adipozyten-Triglyceridlipase 1
ATP	Adenosintriphosphat
BfR	Bundesinstitut für Risikobewertung
BMI	Body Mass Index
BOW	engl.: <i>bag of worms</i>
bspw.	beispielsweise
bzw.	beziehungsweise
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
ca.	circa
CaCl <sub>2</sub>	Calciumchlorid
CARS	Kohärente Anti-Stokes-Raman-Spektroskopie
Cas9	Caspase-9

CD36	engl.: <i>cluster of differentiation 36</i>
CGC	<i>Caenorhabditis Genetics Center</i>
ChIp-Seq	<i>Chromatin ImmunoPrecipitation</i> DNA-Sequenzierung
cm	Zentimeter
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
CoA	Coenzym A
CPT	Carnitin-Palmitoyltransferase-Transporter
CRISPR	engl.: <i>clustered regularly interspaced short palindromic repeats</i>
Cu(II)SO <sub>4</sub>	Kupfersulfat
D	Durchmesser
D	Tag
d. h.	das heißt
ddH <sub>2</sub> O	doppelt destilliertes Wasser
DGAT	Diacylglycerolacyltransferase
DHS	engl.: <i>short-chain dehydrogenase</i>
DIC	Differentialinterferenzkontrast
DMSO	Dimethylsulfoxid
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>egg prep.</i>	engl.: <i>egg preparation</i>
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
ELO	Elongase
ex/em	engl.: <i>excitation/emission</i> , Anregung/Emission
EPG	Elektropharyngeogramm
F-Generation	Filialgeneration
FA	engl.: <i>fatty acid</i> , Fettsäure
FAS	Fettsäure-Synthase
FATP	Fettsäuretransportprotein
<i>f-bottom</i>	engl.: <i>flat bottom</i>
Fe(II)SO <sub>4</sub>	Eisen(II)-sulfat
FIL	engl.: <i>fasting induced lipase</i>
FS	Fettsäure(n)
g	Gramm
<i>g</i>	engl.: <i>gravity of earth</i> , Erdbeschleunigung
GC-MS	Gaschromatographie-gekoppelte Massenspektrometrie
GLUT	Glucose-Transporter
GTPase	Guaninnukleotid-bindendes Protein

h	engl.: <i>hour</i> , Stunde(n)
HUB	Humboldt Universität zu Berlin
IGF	engl.: <i>insulin growth factor</i> , Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor
INS	Insulin
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Dikaliumhydrogenphosphat
KbE	Kolonie-bildende Einheit
KCl	Kaliumchlorid
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumdihydrogenphosphat
KLF	Krüppel-ähnlicher Transkriptionsfaktor
KPO <sub>4</sub>	Kaliumphosphat
L	Liter
l	Länge
LB	engl.: <i>lysogeny broth</i>
LBP	Lipidbindeprotein
LC-MS	engl.: <i>liquid chromatogaphy mass spectrometry</i>
LD	engl.: <i>lipid droplets</i> , Lipidtröpfchen
LED	Leuchtdiode
LIPL	engl.: <i>lipase-like</i>
LET	engl.: <i>lethal</i>
LRO	Lysosomen-ähnliche Organellen
M	Molar
<i>maoc-1</i>	engl.: <i>monoamine oxidase type C-like dehydratase domain 1</i>
MDT-15	Mediator-Protein 15
MDT-28	engl.: <i>mediator complex subunit 28</i>
mg	Milligramm
MgSO <sub>4</sub>	Magnesiumsulfat
min	Minuten
miRNA	mikroRNA
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
Mn(II)Cl <sub>2</sub>	Mangan(II)-chlorid
MOD-1	engl.: <i>modulation of locomotion defective</i>
MRWB	<i>Modified Ruvkun's Witches Brew</i>
ms	Millisekunde(n)
mTOR	engl.: <i>molecular target of rapamycin</i>

MUFA	engl.: <i>monounsaturated fatty acid</i> , einfach ungesättigte Fettsäure
n	Anzahl unabhängiger Versuche
N	Anzahl (hier: von Nematoden oder Proben)
N	Normalität
NA	numerische Apertur
Na <sub>2</sub> EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure-Dinatriumsalz-Dihydrat
NaCl	Natriumchlorid
NADH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Hydrat
NaN <sub>3</sub>	Natriumazid
NaOCl	Natriumhypochlorit
NaOH	Natriumlauge
Na-PIPES	engl.: <i>Natrium-1,4-Piperazinediethanesulfonic acid sodium salt</i>
ng	Nanogramm
NGM	engl.: <i>Nematode growth medium</i>
NHR	Nukleärer Hormonrezeptor
nm	Nanometer
NR	Nile Red
ns	nicht signifikant
OD	optische Dichte
OD <sub>600</sub>	optische Dichte bei der Wellenlänge 600 nm
ORO	Oil-Red-O
p	P-Wert, statistischer Begriff
P0	Parentalgeneration
PC	Phosphatidylcholin
PDK-1	engl.: <i>phosphoinositol-dependent kinase-1</i>
PE	Phosphatidylethanolamin
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinasen
piRNAs	PIWI-interagierende RNAs
PIWI	engl.: <i>P-element induced wimpy testis</i>
PLIN	Perilipin
pmol	Picomol
<i>prx-10</i>	engl.: <i>putative peroxisomal biogenesis factor 10</i>
PUFA	engl.: <i>polyunsaturated fatty acid</i> , mehrfach ungesättigte Fettsäure
RAPTOR	engl.: <i>regulatory associated protein of mTOR</i>



rcf	engl.: <i>relative centrifugal force</i> , relative Zentrifugalbeschleunigung
RICT-1/RICTOR	<i>rapamycin-insensitive companion of TOR</i>
RNA	engl.: <i>ribonucleic acid</i> , Ribonukleinsäure
RNA-Seq	Gesamt-Transkriptom-Shotgun-Sequenzierung
rpm	engl.: <i>rounds per minute</i>
RT	Raumtemperatur
SBP-1	Sterol-regulierendes Bindeprotein-1
sec	Sekunden
SEIP	Seipin
Ser-6/GPCR	engl.: <i>serotonin receptor 6/G-protein coupled receptor</i>
SFA	engl.: <i>saturated fatty acid</i> , gesättigte Fettsäure
SGK-1	engl.: <i>serum and glucocorticoid-inducible kinase 1</i>
SMAD	engl.: <i>suppressor of mothers against decapentaplegic</i>
SRS	Stimulierten Raman Streuung
TAG(s)	Triacylglycerid(e), Triglycerid(e)
TGF- $\beta$	engl.: <i>transforming growth factor <math>\beta</math></i>
TMS	engl.: <i>Trace metals solution</i>
u. a.	unter anderem
UV	Ultraviolett
V	Volumen
v.	Version
<i>var.</i>	engl.: <i>variant</i>
vs.	versus
WHO	World Health Organization
x	-fach
z. B.	zum Beispiel
ZKF	Zellkulturflasche(n)
ZnSO <sub>4</sub>	Zinksulfat
$\epsilon$	mathematisches Symbol für eine technische Störung
$\lambda$	Wellenlänge
$\pi$	Kreiszahl Pi, mathematische Konstante

In dieser Arbeit sind englische und lateinische Begriffe klein und kursiv gesetzt.

Gene sind ebenfalls klein und kursiv gesetzt, während entsprechende Proteine in Großbuchstaben geschrieben sind.



## Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1:</b> Anatomie eines adulten <i>C. elegans</i> -Hermaphroditen.....	3
<b>Abbildung 2:</b> Durchlicht-Aufnahmen von <i>C. elegans</i> -Geschlechtern. ....	4
<b>Abbildung 3:</b> Lebenszyklus eines <i>C. elegans</i> -Hermaphroditen bei 20 °C. ....	5
<b>Abbildung 4:</b> Schematische Darstellung wesentlicher Stoffwechselwege der Fettsynthese in <i>C. elegans</i> . ....	11
<b>Abbildung 5:</b> Schematische Darstellung des Fettabbaus in <i>C. elegans</i> . ....	13
<b>Abbildung 6:</b> Schematische Darstellung der Hauptsignalwege der Fettsynthese in <i>C. elegans</i> .....	14
<b>Abbildung 7:</b> Fettsäuresynthesewege in <i>C. elegans</i> . ....	17
<b>Abbildung 8:</b> Schematischer Aufbau eines Lipidtröpfchens ( <i>lipid droplet</i> ) in <i>C. elegans</i> . ....	18
<b>Abbildung 9:</b> Schematische Darstellung der Unterschiede zwischen inter-, trans- und multi-generationalen Effekten.....	21
<b>Abbildung 10:</b> Schematische Darstellung der Körpergrößenberechnung von <i>C. elegans</i> .....	40
<b>Abbildung 11:</b> Schematische Darstellung der multi- und intergenerationalen Expositionsszenarien. ....	45
<b>Abbildung 12:</b> Variable Färbung der Eier in einem Nile Red-gefärbten adulten <i>C. elegans</i> -Wildtypen (N2).....	49
<b>Abbildung 13:</b> Durchlicht-Aufnahmen von drei Tage alten <i>C. elegans</i> -Wildtypen (N2), <i>daf-2 (e1370)</i> - und <i>eat-2 (ad465)</i> -Deletionsmutanten. ....	50
<b>Abbildung 14:</b> Durchlicht-Aufnahmen von <i>C. elegans</i> -Wildtypen (N2) nach zweitägiger Glucose-Fütterung.....	52
<b>Abbildung 15:</b> Durchlicht-Aufnahmen von <i>C. elegans</i> -Wildtypen (N2) nach dreitägiger Glucose-Fütterung.....	55
<b>Abbildung 16:</b> Durchlicht-Aufnahmen von <i>C. elegans</i> -Wildtypen (N2) mit BOW nach viertägiger Glucose-Fütterung. ....	57
<b>Abbildung 17:</b> Durchlicht-Aufnahmen von 24-gehungerten adulten <i>C. elegans</i> -Wildtypen (N2)...	66
<b>Abbildung 18:</b> Durchlicht-Aufnahmen von zwei Tage alten <i>C. elegans</i> -Wildtypen (N2) mit unterschiedlich gefütterten OP50-Mengen. ....	68
<b>Abbildung 19:</b> Durchlicht-Aufnahmen von drei Tage alten <i>C. elegans</i> -Wildtypen (N2) mit unterschiedlichen Futtermengen gefüttert. ....	74
<b>Abbildung 20:</b> Durchlicht- und Fluoreszenz-Aufnahmen eines gefärbten, transgenen LIU1-Nematoden. ....	81
<b>Abbildung 21:</b> <i>Lipid droplets</i> in adulten mageren und fetten LIU1-Nematoden.....	82
<b>Abbildung 22:</b> Durchlicht-Aufnahmen von adulten DMSO-behandelten <i>C. elegans</i> -Wildtypen (N2).....	90
<b>Abbildung 23:</b> Durchlicht-Aufnahmen von Orlistat-behandelten <i>C. elegans</i> -Wildtypen (N2) nach dreitägiger Kultivierung. ....	91
<b>Abbildung 24:</b> Effekte von Orlistat auf die intestinalen <i>lipid droplets</i> von unterschiedlich gefütterten LIU1-Nematoden nach dreitägiger Kultivierung.....	96

## Diagrammverzeichnis

<b>Diagramm 1:</b> Fluoreszenzintensitäten fixierter, adulter <i>C. elegans</i> -Wildtypen (N2) abhängig von der Nile Red-Konzentration und -Inkubationsdauer.....	48
<b>Diagramm 2:</b> Körperflächen und Fettgehalte von zwei und drei Tage alten <i>C. elegans</i> -Wildtypen (N2), <i>daf-2 (e1370)</i> - und <i>eat-2 (ad465)</i> -Deletionsmutanten. ....	51
<b>Diagramm 3:</b> Effekte von Glucose auf die Körperfläche und den Fettgehalt von <i>C. elegans</i> -Wildtypen (N2) nach zweitägiger Kultivierung.....	53
<b>Diagramm 4:</b> Effekte von Glucose auf die Körperfläche und den Fettgehalt von <i>C. elegans</i> -Wildtypen (N2) nach dreitägiger Kultivierung. ....	54
<b>Diagramm 5:</b> Effekte von Glucose auf die Körperfläche und den Fettgehalt von <i>C. elegans</i> -Wildtypen (N2) nach viertägiger Kultivierung.....	56
<b>Diagramm 6:</b> Hochdosis-Effekte von Glucose auf die Körperfläche und den Fettgehalt von <i>C. elegans</i> -Wildtypen (N2) nach zweitägiger Kultivierung.....	58
<b>Diagramm 7:</b> Hochdosis-Effekte von Glucose auf die Körperfläche und den Fettgehalt von <i>C. elegans</i> -Wildtypen (N2) nach dreitägiger Kultivierung (selektierte Adulte). ....	59
<b>Diagramm 8:</b> Hochdosis-Effekte von Glucose auf die Körperfläche und den Fettgehalt von <i>C. elegans</i> -Wildtypen (N2) nach dreitägiger Kultivierung (selektierte Adulte).....	60
<b>Diagramm 9:</b> Effekte einer 24 h-Hungerphase auf die Körperfläche und den Fettgehalt von <i>C. elegans</i> -Wildtypen (N2) im L4 Stadium.....	62
<b>Diagramm 10:</b> Effekte einer 6 h- bzw. 24 h-Hungerphase auf die Körperfläche und den Fettgehalt von <i>C. elegans</i> -Wildtypen (N2) im Adultstadium.....	63
<b>Diagramm 11:</b> Effekte einer 24 h-Hungerphase auf die Körperfläche und den Fettgehalt unterschiedlich gefütterter <i>C. elegans</i> -Wildtypen (N2) im Adultstadium. ....	65
<b>Diagramm 12:</b> Effekte einer 24 h-Hungerphase auf die Körperfläche und den Fettgehalt unterschiedlich gefütterter <i>C. elegans</i> -Wildtypen (N2) im L4-Stadium.....	67
<b>Diagramm 13:</b> Einfluss der Futtermenge auf die Körpergröße von <i>C. elegans</i> -Wildtypen (N2) nach zweitägiger Kultivierung.....	69
<b>Diagramm 14:</b> Einfluss der Futtermenge auf den Triglyceridgehalt von <i>C. elegans</i> -Wildtypen (N2) nach zweitägiger Kultivierung. ....	69
<b>Diagramm 15:</b> Einfluss der Futtermenge auf die Körpergröße und die Anzahl der Eier ( <i>in utero</i> ) von <i>C. elegans</i> -Wildtypen (N2) nach dreitägiger Kultivierung.....	70
<b>Diagramm 16:</b> Einfluss der Futtermenge auf den Triglyceridgehalt von <i>C. elegans</i> -Wildtypen (N2) nach dreitägiger Kultivierung. ....	71
<b>Diagramm 17:</b> Effekte der Futtermenge auf die Körperfläche und den Fettgehalt von <i>C. elegans</i> -Wildtypen (N2) nach zwei- und dreitägiger Kultivierung.....	73
<b>Diagramm 18:</b> Effekte der Futtermenge auf den Triglyceridgehalt von <i>C. elegans</i> -Wildtypen (N2) nach zwei- und dreitägiger Kultivierung. ....	74
<b>Diagramm 19:</b> Einfluss der Futtermenge auf die Körpergröße und die Anzahl der Eier ( <i>in utero</i> ) von <i>C. elegans</i> -Wildtypen (N2) nach dreitägiger Kultivierung.....	76
<b>Diagramm 20:</b> Effekte der Futtermenge auf den Triglyceridgehalt von <i>C. elegans</i> -Wildtypen (N2) nach dreitägiger Kultivierung. ....	77
<b>Diagramm 21:</b> Die Körpergröße und die Anzahl der Eier ( <i>in utero</i> ) von mageren und fetten <i>C. elegans</i> -Wildtypen (N2) nach zwei- und dreitägiger Kultivierung.....	79

<b>Diagramm 22:</b> Triglyceridgehalte von mageren und fetten <i>C. elegans</i> -Wildtypen (N2) nach zwei- und dreitägiger Kultivierung. ....	80
<b>Diagramm 23:</b> Anzahl, Volumina und Dichten intestinaler <i>lipid droplets</i> (LD) in mageren und fetten LIU1-Nematoden nach dreitägiger Kultivierung. ....	82
<b>Diagramm 24:</b> Einfluss der Futtermenge auf den Gesamtfettsäuregehalt von adulten <i>C. elegans</i> -Wildtypen (N2) und der zugehörigen Eier nach dreitägiger Kultivierung. ....	84
<b>Diagramm 25:</b> Einfluss der Futtermenge auf die absoluten Gehalte einzelner Fettsäuren von adulten <i>C. elegans</i> -Wildtypen (N2) und der zugehörigen Eier nach dreitägiger Kultivierung. ....	85
<b>Diagramm 26:</b> Einfluss der Futtermenge auf das Fettsäuremuster von adulten <i>C. elegans</i> -Wildtypen (N2) und der zugehörigen Eier nach dreitägiger Kultivierung. ....	86
<b>Diagramm 27:</b> Fettsäurezusammensetzung des <i>E. coli</i> -Stammes OP50. ....	87
<b>Diagramm 28:</b> Effekte von DMSO auf die Körpergröße und die Anzahl der Eier ( <i>in utero</i> ) von <i>C. elegans</i> -Wildtypen (N2) nach dreitägiger Kultivierung. ....	89
<b>Diagramm 29:</b> Effekte von DMSO auf den Triglyceridgehalt von mageren und fetten <i>C. elegans</i> -Wildtypen (N2) nach dreitägiger Kultivierung. ....	90
<b>Diagramm 30:</b> Effekt von Orlistat auf die Körpergröße und die Anzahl der Eier ( <i>in utero</i> ) von <i>C. elegans</i> -Wildtypen (N2) nach dreitägiger Kultivierung. ....	92
<b>Diagramm 31:</b> Effekte von Orlistat auf die Körperfläche und den Fettgehalt von <i>C. elegans</i> -Wildtypen (N2) nach dreitägiger Kultivierung. ....	93
<b>Diagramm 32:</b> Effekte von Orlistat auf die Triglyceridgehalte von <i>C. elegans</i> -Wildtypen (N2) nach dreitägiger Kultivierung. ....	94
<b>Diagramm 33:</b> Effekte von Orlistat auf die intestinalen <i>lipid droplets</i> von LIU1-Nematoden nach dreitägiger Kultivierung. ....	95
<b>Diagramm 34:</b> Einfluss von Orlistat auf den Gesamtfettsäuregehalt von <i>C. elegans</i> -Wildtypen (N2) und der zugehörigen Eier nach dreitägiger Kultivierung. ....	97
<b>Diagramm 35:</b> Einfluss von Orlistat auf die absoluten Fettsäuregehalte einzelner Fettsäuregruppen von <i>C. elegans</i> -Wildtypen (N2) und zugehörigen Eier nach dreitägiger Kultivierung. ....	98
<b>Diagramm 36:</b> Einfluss von Orlistat auf das Fettsäuremuster von <i>C. elegans</i> -Wildtypen (N2) und der zugehörigen Eier nach dreitägiger Kultivierung. ....	99
<b>Diagramm 37:</b> Multigenerationale Effekte einer erhöhten Futtermenge auf die Körpergröße und Anzahl der Eier von adulten <i>C. elegans</i> -Wildtypen (N2). ....	102
<b>Diagramm 38:</b> Multigenerationale Effekte einer erhöhten Futtermenge auf die Triglyceridgehalte von adulten <i>C. elegans</i> -Wildtypen (N2). ....	103
<b>Diagramm 39:</b> Intergenerationale Effekte einer erhöhten Futtermenge auf die Körpergröße und Anzahl der Eier von <i>C. elegans</i> -Wildtypen (N2). ....	104
<b>Diagramm 40:</b> Intergenerationale Effekte einer erhöhten Futtermenge auf die Triglyceridgehalte von adulten <i>C. elegans</i> -Wildtypen (N2). ....	105
<b>Diagramm 41:</b> Effekte von Glucose auf die Körperfläche und den Fettgehalt von <i>C. elegans</i> -Wildtypen (N2) nach viertägiger Kultivierung. ....	LXIII
<b>Diagramm 42:</b> Hochdosis-Effekte von Glucose auf die Körperfläche und den Fettgehalt von <i>C. elegans</i> -Wildtypen (N2) nach dreitägiger Kultivierung. ....	LXIV
<b>Diagramm 43:</b> Effekte der Futtermenge auf den Triglyceridgehalt von <i>C. elegans</i> -Wildtypen (N2) nach zwei- und dreitägiger Kultivierung. ....	LXV

**Diagramm 44:** Effekte der Futtermenge auf den Triglyceridgehalt von *C. elegans*-Wildtypen (N2) nach dreitägiger Kultivierung. .... LXV

**Diagramm 45:** Triglyceridgehalte von mageren und fetten *C. elegans*-Wildtypen (N2) nach zwei- und dreitägiger Kultivierung..... LXVI

**Diagramm 46:** Effekte von DMSO auf den Triglyceridgehalt (pro Nematode und pro Proteinmenge) von mageren und fetten *C. elegans*-Wildtypen (N2) nach dreitägiger Kultivierung. .... LXVIII

**Diagramm 47:** Effekte von Orlistat auf die Triglyceridgehalte von *C. elegans*-Wildtypen (N2) nach dreitägiger Kultivierung..... LXIX

**Diagramm 48:** Multigenerationale Effekte einer erhöhten Futtermenge auf die Triglyceridgehalte von adulten *C. elegans*-Wildtypen (N2) (alle Daten)..... LXX

**Diagramm 49:** Multigenerationale Effekte einer erhöhten Futtermenge auf die Triglyceridgehalte (pro Nematode) von adulten *C. elegans*-Wildtypen (N2). .... LXXI

**Diagramm 50:** Multigenerationale Effekte einer erhöhten Futtermenge auf die Triglyceridgehalte (pro Proteinmenge) von adulten *C. elegans*-Wildtypen (N2). .... LXXII

**Diagramm 51:** Intergenerationale Effekte einer erhöhten Futtermenge auf die Triglyceridgehalte von adulten *C. elegans*-Wildtypen (N2) (alle Daten)..... LXXIII

**Diagramm 52:** Intergenerationale Effekte einer erhöhten Futtermenge auf die Triglyceridgehalte (pro Nematode) von adulten *C. elegans*-Wildtypen (N2). .... LXXIV

**Diagramm 53:** Intergenerationale Effekte einer erhöhten Futtermenge auf die Triglyceridgehalte (pro Proteinmenge) von adulten *C. elegans*-Wildtypen (N2). .... LXXV

## Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1:</b> Fettsäureklassen in <i>C. elegans</i> . Beispiele und funktionelle Rollen von Fettsäuren in <i>C. elegans</i> .....	16
<b>Tabelle 2:</b> Fettsäureverhältnisse in drei Tage alten, unterschiedlich gefütterten <i>C. elegans</i> -Wildtypen (Adult - Eier) und in den zugehörigen Eiern .....	86
<b>Tabelle 3:</b> Fettsäureverhältnisse in drei Tage alten, unterschiedlich gefütterten und Orlistat-behandelten <i>C. elegans</i> (Adult – Eier) und in den zugehörigen Eiern .....	100
<b>Tabelle 4:</b> Methoden zur Bestimmung des Fettes in <i>C. elegans</i> .....	106
<b>Tabelle 5:</b> Gruppeneinteilung der nachgewiesenen Fettsäuren der GC-MS-Analyse .....	LXVII





## 1 Einleitung

### 1.1 Hintergrund der Arbeit

Die Prävalenz von Übergewicht und Fettleibigkeit (Adipositas) in Menschen nimmt weltweit stetig zu und erregt zunehmend Besorgnis über die öffentliche Gesundheit. Laut der *World Health Organization* (WHO) werden Menschen als übergewichtig bzw. fettleibig/adipös bezeichnet, wenn ihr *Body Mass Index* (BMI), welcher das Verhältnis von Körpergewicht zu Körpergröße wiedergibt, gleich oder über  $25 \text{ kg/m}^2$  bzw.  $\geq 30 \text{ kg/m}^2$  beträgt (World Health Organization, 2021). Seit 1975 hat sich die Anzahl adipöser Menschen nahezu verdreifacht (World Health Organization, 2021). 2016 erreichte die Anzahl übergewichtiger Erwachsener einen Wert von 1,9 Milliarden, von denen 650 Millionen Menschen als fettleibig eingestuft wurden (World Health Organization, 2021). Darüber hinaus wurden 2020 39 Millionen Kinder unter 5 Jahren bereits als übergewichtig oder adipös eingeschätzt (World Health Organization, 2021). Mit dem Übergewicht und der Fettleibigkeit geht eine Vielzahl von Begleiterkrankungen einher, wie beispielsweise *Diabetes mellitus*, psychische Erkrankungen, Herz-Kreislauf-Störungen oder sogar Tumorerkrankungen, die wiederum zu einer Übersterblichkeit dieser Bevölkerungsgruppen führen können (Abdelaal *et al.*, 2017, Piché *et al.*, 2020, Scully *et al.*, 2021). Wesentliche Ursachen des erhöhten Gewichts und der Fettleibigkeit liegen dabei oftmals in einer überproportionalen Nahrungsaufnahme, einem zunehmenden Konsum „ungesunder“ Lebensmittel (fett- und zuckerreich) und einer mangelnden körperlichen Aktivität, vor allem in modernen Industriegesellschaften (Carrera-Bastos *et al.*, 2011, Kopp, 2019, Rakhra *et al.*, 2020). Die Auswirkung einer unausgeglichene Ernährung der Menschen und die Korrelation mit diversen gesundheitlichen Einschränkungen sowie dem Auftreten metabolischer Krankheiten sind anhand zahlreicher epidemiologischer Daten bereits belegt worden (Johnson *et al.*, 2007, Brumbaugh *et al.*, 2013, Dearden und Ozanne, 2015, Boyle *et al.*, 2016, Reichetzeder, 2021). Dabei können diese nicht nur in den Betroffenen auftreten, sondern auch Effekte dieser Ernährungsweise in deren Nachkommen zeigen, die unter anderem mit einer verringerten Lebenserwartung verbunden sind (Johnson *et al.*, 2007, Brumbaugh *et al.*, 2013, Dearden und Ozanne, 2015, Boyle *et al.*, 2016, Reichetzeder, 2021). Laut dieser Studien weisen Kinder adipöser Mütter oftmals bereits bei der Geburt ein erhöhtes Gewicht auf und entwickeln im späteren Alter, ebenso wie ihre Mütter, metabolische Störungen, die zu Adipositas, *Diabetes mellitus* oder sogar Krebs führen können (Kaati *et al.*, 2002, Brumbaugh *et al.*, 2013, Dearden und Ozanne, 2015, Boyle *et al.*, 2016, Reichetzeder, 2021). Bei der Entstehung der Fettleibigkeit und damit verbundenen Krankheitsbilder kann neben der Fehlernährung jedoch auch die Unterernährung eine Rolle spielen (zusammengefasst in Lumey *et al.* 2011). Daten über mangelernährter Mütter während der Schwangerschaft, beispielsweise bedingt durch vorherrschende Nahrungsmittelknappheit in ärmlichen Ländern oder als Kriegsfolge, zeigen die Beeinträchtigung des fetalen Wachstums sowie

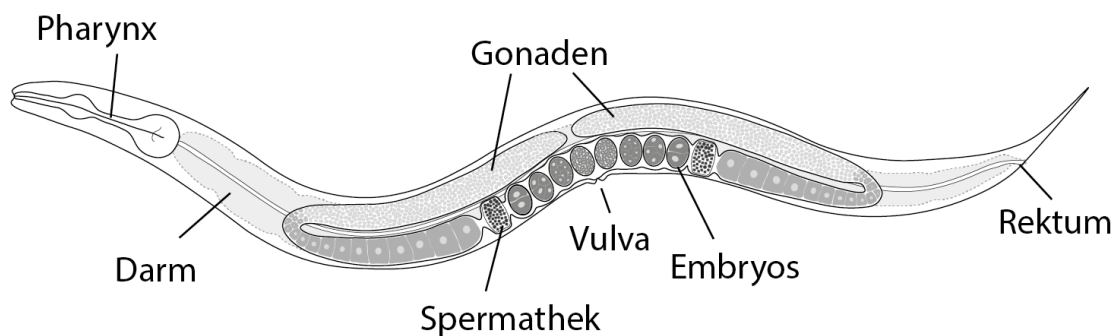
das daraus resultierende geringere Geburtsgewicht der Nachkommen, welche jedoch in ihrer späteren Entwicklung eine erhöhte Prädisposition für die Fettleibigkeit und damit assoziierten Erkrankungen aufweisen (Naeye *et al.*, 1973, Barker *et al.*, 1997, Ravelli *et al.*, 1998, Roseboom *et al.*, 2000, Hales und Barker, 2001, Roseboom *et al.*, 2001, de Rooij *et al.*, 2006, Painter *et al.*, 2006, Roseboom *et al.*, 2006, Painter *et al.*, 2008, de Rooij *et al.*, 2010). Bekannte Beispiele für die Folgen der Mangelernährung und den Zusammenhang zum Gesundheitsstatus der Population und deren Nachkommen stellen der holländische Hungerwinter (1944 – 1945) sowie die Hungersnöte in China (1959 – 1961) oder in Gambia (1949 – 1994) dar (Moore *et al.*, 1997, Smil, 1999, Lumey *et al.*, 2009, de Rooij *et al.*, 2010, Schulz, 2010, van Abeelen *et al.*, 2012, Lumey *et al.*, 2021). In den Studien wurde ferner nachgewiesen, dass bestimmte Effekte geschlechtsspezifisch an die Nachkommen weitervererbt wurden, wobei interessanterweise die Unterernährung von Großvätern eine schützende Wirkung vor der Entstehung von *Diabetes mellitus* und kardiovaskulären Erkrankungen in männlichen Enkeln hervorrief (Kaati *et al.*, 2002). Weitere Ursachen von Übergewicht und Adipositas können jedoch auch in der genetischen Disposition liegen, die Entstehung der metabolischen Störung kann jedoch auch durch Umweltkontaminanten, denen der Mensch tagtäglich exponiert ist, oder bestimmte Pharmaka (u. a. Antidepressiva) verursacht werden (Yang *et al.*, 2007, Lubrano *et al.*, 2013, Berthon *et al.*, 2014, Qi *et al.*, 2014, Musil *et al.*, 2015, Justice *et al.*, 2019, Singh *et al.*, 2021). Beispielsweise rücken sogenannte endokrine Disruptoren, also Substanzen, die auf Hormonsysteme wirken und gesundheitliche Schäden auslösen können, immer mehr in den Fokus von Untersuchungen, da sie unter anderem unter Verdacht stehen, auf den Fettmetabolismus einzuwirken und an der Entstehung von Adipositas im Menschen beizutragen (Darbre, 2017, Petrakis *et al.*, 2017, Gupta *et al.*, 2020, Ren *et al.*, 2020). Aufgrund der hohen Inzidenz in der weltweiten Bevölkerung besteht ein zunehmendes Interesse an der Erforschung der Ursachen der Fettleibigkeit und den damit verbundenen Gesundheitsproblemen, die im Zusammenhang mit der Ernährung und den zuvor genannten Faktoren stehen. Darüber hinaus ist das Verständnis der zugrundeliegenden Mechanismen der Heritabilität der Fettleibigkeit und der damit assoziierten Effekte von zentraler Bedeutung, um eine bessere Vorsorge und die Risikobewertung von involvierten Faktoren, insbesondere von Umweltkontaminanten, für den Menschen und die Umwelt zu ermöglichen und somit letztlich die Gesundheit und Lebensqualität zu verbessern.

## 1.2 *Caenorhabditis elegans*

### 1.2.1 Körperbau und Lebenszyklus von *C. elegans*

*Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) sind in der Natur vorkommende, freilebende, nicht-parasitäre Vertreter des Stammes Nematoda (Rund- und Fadenwürmer) und der Familie der Rhabditen zuzuordnen (Brenner, 1974, Kenyon, 1988). Die Nematoden leben im fest-flüssigen Milieu des Bodens überwiegend gemäßigter Klimazonen und ernähren sich von destruierenden Bakterien (Blaxter, 1998, Félix und Braendle, 2010, Frézal und Félix, 2015).

*C. elegans* weisen eine zylindrische Körperform auf, die zu den Enden hin spitz zuläuft und im adulten Entwicklungsstadium eine Länge von bis zu 1,2 mm und einen Durchmesser von bis zu 80 µm erreichen kann (Brenner, 1974, Maguire *et al.*, 2011, Palikaras und Tavernarakis, 2013). Der unsegmentierte Körper der Nematoden ist relativ simpel aufgebaut und setzt sich aus zwei tubulären Systemen zusammen, die räumlich durch einen Zwischenraum, dem Pseudocoel, getrennt sind (Riddle und Albert, 1997a, 1997b, Corsi *et al.*, 2015). Der äußere Tubulus stellt die Körperwand dar, welche von der Kutikula und der Hypodermis ausgekleidet ist und den im Inneren befindlichen Tubulus umschließt, der aus dem Verdauungsorgan sowie dem Fortpflanzungssystem besteht (Altun und Hall, 2009b). Zudem weisen *C. elegans* auch muskuläre sowie neuronale Systeme auf (White, 1988). Das Verdauungsorgan, beginnend mit der anterior liegenden Mundhöhle, besteht aus dem muskulären Pharynx<sup>1</sup> und dem daran anschließenden Darm, der posterior mit dem Rektum über den Anus nach Außen mündet (Altun und Hall, 2009b). *C. elegans* sind größtenteils Hermaphroditen, deren vollentwickelter Reproduktionsapparat aus zwei U-förmigen Gonaden (Geschlechtsdrüsen) gebildet werden, die jeweils über eine Spermathek mit dem zentral liegenden Uterus verbunden sind und ventral eine Ausstülpung nach außen besitzt, die Vulva (siehe Abbildung 1) (Riddle und Albert, 1997a, 1997b, Corsi *et al.*, 2015).

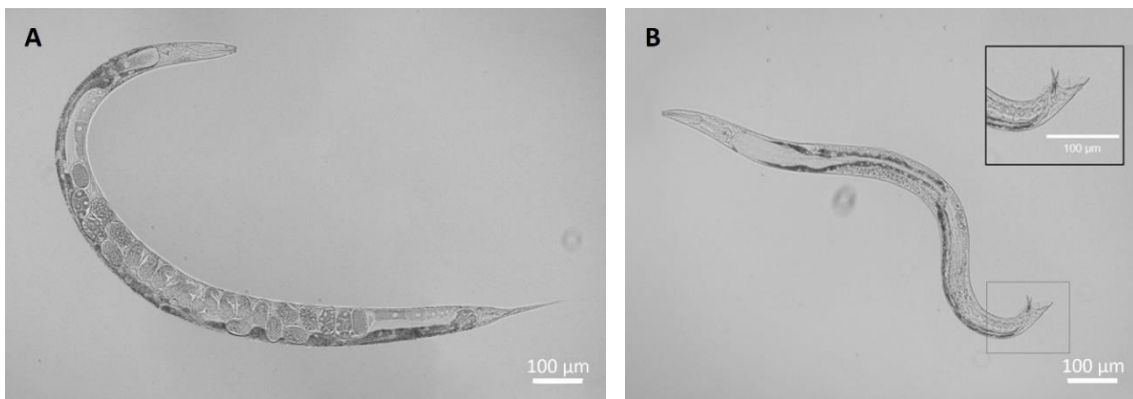


**Abbildung 1: Anatomie eines adulten *C. elegans*-Hermaphroditen.**

Vereinfachte Darstellung des Körperbaus eines *C. elegans*-Hermaphroditen mit Verdauungsorgan (Pharynx und Darm) und Reproduktionsapparat (Gonaden, Spermatheken, Uterus). Abbildung modifiziert nach Hansen und Pilgrim (1999) und Herndon *et al.* (2018).

<sup>1</sup> Schlund, Rachenraum

*C. elegans* können sich entweder zu Hermaphroditen oder Männchen entwickeln (Riddle und Albert, 1997a, Corsi *et al.*, 2015). Hermaphroditen besitzen männliche, als auch weibliche Geschlechtsorgane und können aufgrund dieser Zwitterigkeit sowohl Spermien, als auch Eier produzieren und sich somit über Selbstbefruchtung fortpflanzen (Riddle und Albert, 1997a, Corsi *et al.*, 2015). Männchen können ca. 0,05 – 0,2 % der Nematodenpopulation ausmachen und entstehen nur selten durch spontane Non-Disjunction, also die Fehlsegregation von homologen Chromosomen während der Meiose (Hodgkin *et al.*, 1979, Chasnov und Chow, 2002, Corsi *et al.*, 2015). Sie grenzen sich morphologisch von Hermaphroditen ab und sind an kleineren, dünneren Körpern sowie dem ausschließlich in Männchen vorhandenem Kopulationsorgan zu erkennen, das sich charakteristisch am gefächert erscheinenden Schwanzende befindet (Zhao *et al.*, 2002, Altun und Hall, 2009a). In Abbildung 2 sind repräsentative Durchlicht-Aufnahmen der *C. elegans*-Geschlechter gezeigt.



**Abbildung 2: Durchlicht-Aufnahmen von *C. elegans*-Geschlechtern.**

Abgebildet sind ein Hermaphrodit (A) sowie ein Männchen mit vergrößertem Kopulationsorgan (B). Die Aufnahmen erfolgten am ZOE™ Fluorescent Imager (20x/0,4-Objektiv, 175x-Vergrößerung) (Bio-Rad).

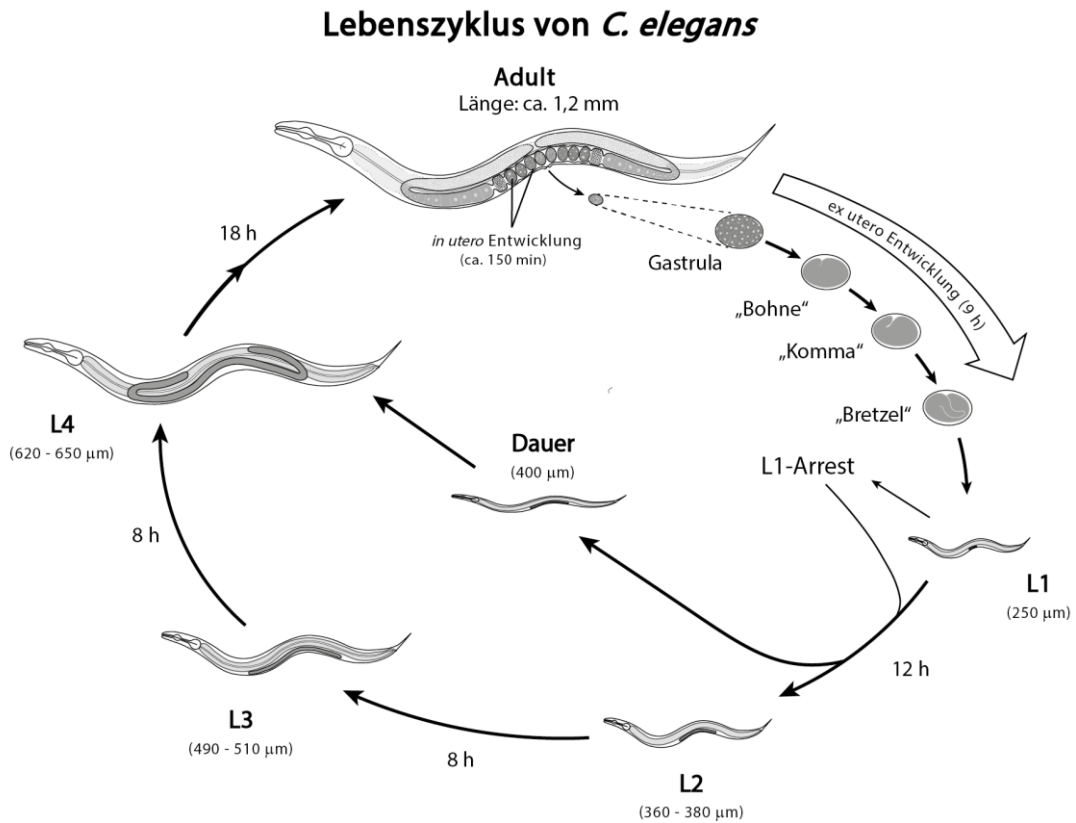
Ein weiterer Unterschied zwischen den Geschlechtern besteht in der Anzahl der somatischen Zellen, die bei adulten Hermaphroditen stetig 959 Zellen (Zelleutellie<sup>2</sup>) beträgt, bei männlichen Nematoden hingegen 1033 Zellen (Sulston *et al.*, 1983, White, 1988, Sammut *et al.*, 2015).

Die Fortpflanzung der Nematoden beginnt in den Gonaden der Hermaphroditen mit dem Heranreifen der Keimzellen zu Oozyten, die mit dem Durchgang durch die Spermathek befruchtet werden (Altun und Hall, 2009a). Nach der Befruchtung der Eier durchlaufen diese mitotische Teilungen und wandern während der Entwicklung zum mehrzelligen Stadium (ca. 30-Zell-Stadium) entlang des Uterus, wo anschließend die Eiablage (Laiche) über die Vulva erfolgt (Altun und Hall, 2009a). Der Prozess, beginnend von der Befruchtung bis hin zur Laiche, dauert ca. 150 min, an dem sich die Gastrulation und die weitere embryonale Entwicklung zur Larve außerhalb der Nematoden anschließen. Nach dem Schlüpfen der Eier durchlaufen die Nematoden vier Larvenstadien (L1 – L4)

---

<sup>2</sup> Zellkonstanz

und erreichen mit der sexuellen Reife das Jungadult- und schließlich das Adultstadium (Palikaras und Tavernarakis, 2013). In diesen Stadien beginnt die Produktion von Oozyten, womit der Entwicklungszyklus der nächsten Generation von neuem beginnt. Zur Übersicht ist der Lebenszyklus von *C. elegans* zusammenfassend in Abbildung 3 dargestellt.



**Abbildung 3: Lebenszyklus eines *C. elegans*-Hermaphroditen bei 20 °C.**

Nach der Reifung der Oozyten zum Embryo durchlaufen die Nematoden vier Larvenstadien (L1 – L4) und erreichen schließlich mit der sexuellen Reife das Adultstadium. Bei ungünstigen Umweltbedingungen können Nematoden in den L1-Arrest oder das Dauer-Stadium übergehen, in denen sie wochen- bis monatelang ohne Nahrung überdauern können. (Längenangaben der einzelnen Larvenstadien beziehen sich auf Agarplatten-kultivierte Nematoden.) Die Abbildung ist modifiziert nach Herndon *et al.* (2018).

Während des Lebenszyklus ist die Entwicklung der Nematoden durch äußere Umweltfaktoren und -kontaminanten stark beeinflussbar (Riddle *et al.*, 1981, Albert und Riddle, 1988, Hu, 2007, Baugh, 2013). Beim Auftreten von ungünstigen Umweltbedingungen, wie erhöhter Temperatur, limitierter Nahrungsverfügbarkeit, hohe Populationsdichten oder Expositionen gegenüber unterschiedlichen Noxen<sup>3</sup>, können die Nematoden in eine sogenannte Diapause<sup>4</sup> übergehen (Riddle *et al.*, 1981, Albert und Riddle, 1988, Hu, 2007, Baugh, 2013). In dieser Phase kommt es zu einer Remodellierung des Stoffwechsels, bei der die Fettakkumulation initiiert und energiereiche Prozesse in den Nematoden herunterreguliert werden, um vorrangig das Überleben zu

<sup>3</sup> Substanzen, biologischen (z. B. Viren, Pilze, Bakterien), physikalischen (z. B. Strahlung) oder chemischen (z. B. Gifte, Toxine) Ursprungs, die schädigend auf den Organismus oder auf Körperorgane wirken

<sup>4</sup> Entwicklungsruhe

gewährleisten, bis wieder günstigere Lebensbedingungen vorherrschen (Riddle *et al.*, 1981, Albert und Riddle, 1988, Hu, 2007, Baugh, 2013). Ist nach dem Schlüpfen der L1-Larven keine Futterquelle vorhanden, verharren die Nematoden im sogenannten L1-Arrest und entwickeln sich erst bei einer verfügbaren Nahrungsquelle weiter (Klass und Hirsh, 1976, Johnson und Wood, 1982, Baugh, 2013). Kommt es zwischen dem L1- und L2-Stadium zu den zuvor genannten nachteiligen Umweltbedingungen, gehen die Nematoden alternativ in das sogenannte Dauerlarven-Stadium über, in dem sie monatelang ohne Nahrung überdauern können (Cassada und Russell, 1975, Klass und Hirsh, 1976, Johnson und Wood, 1982, Vowels und Thomas, 1992, Hu, 2007, Frézal und Félix, 2015). Dauerlarven besitzen charakteristisch eine deutlich dickere Kutikula und einen Pfropfen, der die Mundhöhle verschließt und sie vor Umwelteinflüssen, Austrocknung und passivem Verlust von Stoffwechselprodukten schützt, und generieren ihre überlebensnotwendige Energie aus ihren angelegten Fettreserven (Cassada und Russell, 1975, Riddle *et al.*, 1981, Vowels und Thomas, 1992). Bei günstigeren Umweltbedingungen entwickeln sich Dauerlarven direkt zu L4-Larven und schließlich zu Adulten weiter (Cassada und Russell, 1975, Riddle *et al.*, 1981, Vowels und Thomas, 1992). Wildtypische *C. elegans* tolerieren eine Umgebungstemperatur zwischen 15 °C – 25 °C, wobei große Schwankungen in der Temperatur zur Beeinträchtigung der Entwicklung, des Wachstums und der Fertilität und hohe Temperaturen (ab 27 °C) in Sterilität oder sogar dem Tod der Nematoden führen können (Harvey und Viney, 2007, Aprison und Ruvinsky, 2014, Petrella, 2014, Zevian und Yanowitz, 2014, Gouvêa *et al.*, 2015, Nett *et al.*, 2019). Unter optimalen Nahrungs- und Temperaturbedingungen, die für wildtypische *C. elegans* bei durchschnittlich 20 °C liegt, beträgt die Generationszeit der Nematoden ca. drei Tage (Brenner, 1974, Klass und Hirsh, 1976, Zhang *et al.*, 2015, Gómez-Orte *et al.*, 2018, Stegeman *et al.*, 2019). Einige genetisch modifizierte *C. elegans*-Stämme hingegen können auch differente Temperaturoptima und Generationszeiten besitzen (Klass und Hirsh, 1976, Johnson und Wood, 1982, Kenyon *et al.*, 1993, Riddle *et al.*, 1997a). Unter optimalen Laborbedingungen weisen adulte Wildtypen eine Lebensspanne von durchschnittlich zwei bis drei Wochen auf, innerhalb der sie über die Selbstbefruchtung bis zu 300 Nachkommen produzieren können (Hodgkin und Barnes, 1991, Hunter, 1999, Muschiol *et al.*, 2009). Kommt es in seltenen Fällen zur Paarung eines Hermaphroditen mit einem Männchen, können während der Lebensdauer der Nematoden hingegen bis zu 1000 Nachkommen entstehen (Byerly *et al.*, 1976, Corsi *et al.*, 2015).

### 1.2.2 *C. elegans* als Modellorganismus

*C. elegans* wurden 1974 erstmals von Sydney Brenner isoliert und als Modellorganismus in die experimentelle Forschung eingeführt und etabliert (Brenner, 1974, Stiernagle, 2006). Im Labor werden *C. elegans* unter konstanten Temperaturbedingungen (20 °C) auf sogenannten *Nematode growth medium* (NGM)-Agarplatten kultiviert, die mit dem häufig als Nahrungsquelle dienendem, nicht-pathogenem und Uracil-auxotrophen *Escherichia coli* (*E. coli*)-Stamm OP50 besiedelt sind (Brenner, 1974, Sulston und Brenner, 1974, Stiernagle, 2006). Neben der Haltung der Nematoden auf Agarplatten, kann die Kultivierung auch in Flüssigmedien erfolgen, was oftmals zur Generierung einer hohen Nematodenzahl und in toxikologischen Untersuchungen Anwendung findet (Stiernagle, 2006, Celen *et al.*, 2018, Heshof *et al.*, 2019). Aufgrund der geringen Körpergröße, der einfachen und kostengünstigen Kultivierung, der hohen Nachkommenzahl sowie der kurzen Generationszeit, sind Untersuchungen mit den Nematoden mit hohem Durchsatz und vielen biologischen und experimentellen Replikaten möglich. Einen weiteren Vorteil bietet der transparente Körper der Nematoden, der mikroskopische Untersuchungen im lebenden Organismus auf Einzelzellebene und die vereinfachte Analyse von angefärbten oder mit Fluoreszenzproteinen markierten Strukturen oder von Genexpressionsmustern mithilfe von  $\beta$ -Galactosidase-Reportergenen ermöglicht (Fire *et al.*, 1990, Altun und Hall, 2009b, Wang *et al.*, 2021). Ferner können durch *C. elegans* einige komplexe, regulatorische Prozesse im ganzen Organismus untersucht werden, die *in vitro*-Assays hingegen kaum oder nicht abbildbar sind (Knight und Shokat, 2007). Im Gegensatz zu *C. elegans* erfordern experimentelle Untersuchungen mit anderen gängigen *in vivo*-Modellsystemen, wie Nagern, eine hohe Anzahl an Individuen, die aber auch aus ethischen Gründen schwer vertretbar sind (Ferdowsian und Beck, 2011, Doke und Dhawale, 2015). Diese Arbeiten unterliegen zudem strengen Richtlinien nach dem Tierschutzgesetz und sind deutlich zeit- und kostenintensiver in der Durchführung als Arbeiten mit *C. elegans* (Burden *et al.*, 2015). Ein weiterer Vorteil des Modellorganismus besteht in der hohen Stabilität des Nematodengenoms, da *C. elegans*-Hermaphroditen durch die Selbstbefruchtung genetisch identische Nachkommen mit einer fixen, definierten Anzahl somatischer Zellen im Adultalter produzieren (Altun und Hall, 2009a). Somit tritt nur eine geringe genetische Variabilität innerhalb und zwischen den Populationen auf, welche die Reproduzierbarkeit von Ergebnissen begünstigt. Neben den genannten Vorteilen weist der Modellorganismus jedoch auch seine Limitationen auf. So fehlen *C. elegans*, im Vergleich zu Säugern, einige anatomische und physiologische Merkmale, wie ein Blutgefäßsystem, eine Blut-Hirn-Schranke, ein adaptives Immunsystem, ein kardiales System oder komplexe Gewebestrukturen bzw. spezialisierte Organe, wie Lungen, Nieren oder Leber, weswegen Organ-spezifische molekulare Prozesse und Transportmechanismen in den Nematoden nicht stattfinden (Weinhouse *et al.*, 2018).

Insbesondere durch Unterschiede in der Ausstattung, Regulation und katalytischen Eigenschaften von Enzymen, wie die zur Metabolisierung bzw. Detoxifizierung von Xenobiotika<sup>5</sup> dienenden Cytochrom P450-Enzyme, können diverse Substanzen unterschiedliche oder auch keine Effekte in den Nematoden auslösen, die in anderen Organismen, wie dem Menschen, hingegen toxisch wirken können (Leung *et al.*, 2010, Weinhouse *et al.*, 2018). Ferner wird angenommen, dass in *C. elegans* aufgrund fehlender Enzyme keine DNA-Methylierungen stattfinden, die in epigenetischen Modifikationen einen wichtigen Mechanismus darstellen (Klass *et al.*, 1983, Simpson *et al.*, 1986, Iyer *et al.*, 2011, Wenzel *et al.*, 2011, Corsi *et al.*, 2015).

Die vollständige Sequenzierung des Genoms von *C. elegans* im Jahre 1998, als ersten multizellulären Organismus, erlaubte die Identifikation zahlreicher Homologien von Genen und grundlegenden Signalwegen, die auch in Säugern, einschließlich dem Menschen, von besonderer Bedeutung sind (Consortium, 1998, Roach *et al.*, 2020). Trotz der genannten Unterschiede können grundlegende molekulare Prozesse vereinfacht in *C. elegans* abgebildet werden, weswegen die Nematoden heute zu einem der am häufigsten verwendeten Modellorganismen zählen, um nahezu jeden Aspekt der Biologie zu untersuchen (Wenzel *et al.*, 2011, Corsi *et al.*, 2015). Die Forschungsgebiete umfassen dabei die Entwicklungs-, Zell-, Neuro- und Molekularbiologie, die Genetik, die Altersforschung und die Toxikologie (Riddle und Albert, 1997a, Riddle *et al.*, 1997b, Dengg und van Meel, 2004, Nass und Hamza, 2007, Leung *et al.*, 2008, Xiong *et al.*, 2017, Meneely *et al.*, 2019). Durch das vollständige genomische Wissen über *C. elegans* kann eine breite Palette von Genen und Signalwegen individuell untersucht werden, insbesondere durch die gezielte Veränderung der Genoms, bspw. durch die Ausschaltung einzelner Gene durch RNA-Interferenz (RNAi) oder die *Clustered regularly interspaced short palindromic repeats* (CRISPR)-Cas9-Methodik (Fire *et al.*, 1998, Dickinson und Goldstein, 2016). Zudem stehen durch gentechnische Manipulationen eine Vielzahl von transgenen und mutierten *C. elegans*-Stämmen zur Verfügung, um unterschiedlichste Endpunkte in den Nematoden zu untersuchen (Chen *et al.*, 2016b). Zu einem der häufig untersuchten Stoffwechselwege in *C. elegans* zählt der Fettmetabolismus (Ashrafi *et al.*, 2003, McKay *et al.*, 2003, Ashrafi, 2007, Lemieux *et al.*, 2011, Martorell *et al.*, 2012, Zheng und Greenway, 2012, Zhang *et al.*, 2013, Zheng *et al.*, 2016, Shen *et al.*, 2018, Yue *et al.*, 2021). Über genomweite RNAi-Untersuchungen konnten bislang insgesamt 471 Fettmetabolismus-assoziierte Gene in den Nematoden identifiziert werden, die für diverse Transkriptionsfaktoren, Enzyme, Transporter oder Signalmoleküle kodieren (Ashrafi *et al.*, 2003). Davon weisen 237 Gene Homologien zu Menschen, Mäusen, Ratten und *Drosophila melanogaster* auf, welche die hochkonservierte Natur der grundlegenden molekularen Mechanismen und Regulatoren des Fettmetabolismus zwischen den Spezies bestätigt (Ashrafi *et al.*, 2003, Wang *et al.*, 2008, Zhang *et*

---

<sup>5</sup> Fremdstoffe, meist chemische, körperfremde Substanzen



*al.*, 2013). Zwischen *C. elegans* und den Menschen unterscheidet sich der Fettmetabolismus jedoch in einigen Aspekten, wie beispielsweise die Speicherung von Fetten im Darm oder die Fähigkeit der *de novo*-Fettsäuresynthese der Nematoden (Watts und Browse, 2002, Ashrafi, 2007, Mullaney und Ashrafi, 2009). Darüber hinaus sind *C. elegans*, im Gegensatz zu Säugern, Cholesterol-auxotroph, d. h. sie sind nicht in der Lage Cholesterol selbst zu synthetisieren und müssen daher das für das Überleben notwendige Cholesterol aus der Nahrung beziehen (Hieb und Rothstein, 1968, Kurzchalia und Ward, 2003, Entchev und Kurzchalia, 2005, Lee *et al.*, 2009a, Martin *et al.*, 2010). Im Folgenden soll der Fettmetabolismus vom Fadenwurm näher betrachtet werden (siehe 1.2.3).

### 1.2.3 Fettmetabolismus in *C. elegans*

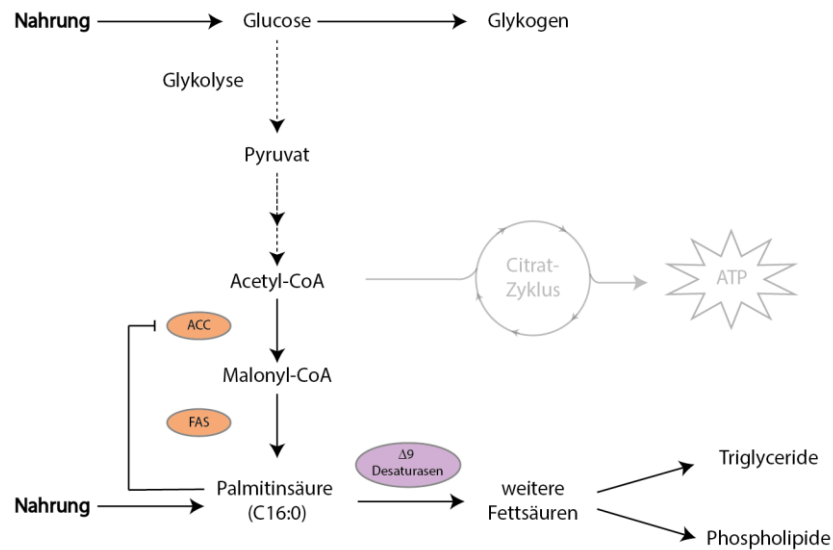
#### 1.2.3.1 Fettsynthese und -speicherung

Lipide und Kohlenhydrate stellen die Hauptenergiequellen aller Lebewesen dar (Jéquier, 1994). Energie ist essentiell für das Wachstum, die Entwicklung, die Reproduktion und die Lebenserhaltung von Organismen und wird aus der nährstoffreichen Nahrung gewonnen, weswegen die Ernährung eine wichtige Determinante in der Regulation des Energiehaushaltes darstellt (Lu und Goetsch, 1993, Hardie, 2012). Bei einer übermäßigen Nahrungszufuhr werden Nährstoffe in Menschen sowie in *C. elegans* in Form von Glykogen und Fetten gespeichert (Owen *et al.*, 1979, Ashrafi, 2007, Hellerer *et al.*, 2007, Mullaney und Ashrafi, 2009, Watts, 2009, Mak, 2012, Pang *et al.*, 2014a, Srinivasan, 2015, Cohen, 2018, Zečić *et al.*, 2019). In Menschen werden Fette in spezialisierten Zellen, den Adipozyten, gespeichert und können in braune, weiße und beige Fette mit unterschiedlichen Funktionen unterteilt werden (Pfeifer und Hoffmann, 2015, Cohen und Spiegelman, 2016, Herz und Kiefer, 2019, Shinde *et al.*, 2021). *C. elegans* hingegen besitzen keine Adipozyten und speichern ihre Fette stattdessen hauptsächlich im Darm und in geringen Anteilen in der Hypodermis (Ashrafi, 2007, Hellerer *et al.*, 2007, Mullaney und Ashrafi, 2009, Watts, 2009, Mak, 2012, Srinivasan, 2015, Cohen, 2018). Ein weiterer wesentlicher Unterschied liegt außerdem in der enzymatischen Ausstattung der Nematoden, die die *de novo*-Synthese von Fettsäuren (mehrfach ungesättigte und verzweigte Fettsäuren) erlaubt, während Menschen aufgrund des Defizits von  $\Delta 12$ - und  $\omega 3$ -Desaturasen von sogenannten „essentiellen Fettsäuren“, wie Linolsäure (C18:2n6) und  $\alpha$ -Linolensäure (18:3n3), aus der Nahrung abhängig sind (Bézar *et al.*, 1994, Wallis *et al.*, 2002, Watts und Browse, 2002, Simopoulos, 2010, Franco-Juárez *et al.*, 2021).

In *C. elegans* werden die Futterbakterien durch peristaltische Pumpbewegungen des Pharynx durch die Mundöffnung in den Pharynx geleitet, wo sie zunächst zerkleinert werden und anschließend in den Darm gelangen (Doncaster, 1962, Seymour *et al.*, 1983, Avery und Horvitz, 1989, Avery, 1993). Der Darm nimmt rund 80 % des Körpervolumens ein und stellt das zentrale Organ für die Resorption der Nahrung, die Nährstoffaufnahme in die Stoffwechselwege, die Fettspeicherung sowie

den -abbau dar, während diese Prozesse in Menschen hingegen in der Leber und den Adipozyten stattfinden (Ashrafi, 2007, Hellerer *et al.*, 2007, Mullaney und Ashrafi, 2009, Watts, 2009, Mak, 2012, Srinivasan, 2015, Cohen, 2018). Der Darm der Nematoden besteht aus 20 bilateral, in Zellpaaren symmetrisch angeordnete Epithelzellen, welche im Zentrum einen Hohlraum, das Darmlumen, bilden (Srinivasan, 2015). Ähnlich wie bei Menschen weisen die Darmzellen der Nematoden eine basolaterale und apikale Domäne mit epithelialen Ausstülpungen (Mikrovilli) auf (Lehane, 1997, McGhee *et al.*, 2007, Irazoqui *et al.*, 2010). Im Darmlumen werden die in Kohlenhydrate, Proteine und Lipide zerkleinerten Bestandteile der Futterbakterien durch Lysozyme und diverse Lipasen in kurzkettige Saccharide, Peptide und freie Fettsäuren gespalten und anschließend über die Diffusion oder spezialisierte Transportsysteme aufgenommen (Tcherepanova *et al.*, 2000, Mallo *et al.*, 2002, McGhee, 2007, McGhee *et al.*, 2007). Diese Transporterproteine umfassen die Peptid-Transporter PEPT-1, PEPT-2 und PEPT-3, diverse Fettsäuretransportproteine (FATPs), wie die Translokase CD36 (*cluster of differentiation*), und den Glucose-Transporter FGT-1 (*facilitated glucose transporter*), der ein Homolog zu den Glucose-Transportern (GLUT) in Menschen und Nagern darstellt (Fei *et al.*, 1998, Nehrke, 2003, Meissner *et al.*, 2004, Daniel *et al.*, 2006, Ashrafi, 2007, Mullaney und Ashrafi, 2009, Spanier *et al.*, 2009, Canfield und Bradshaw, 2019). Aufgenommene Peptide (Di- und Tripeptide) werden weiterhin zu Aminosäuren abgebaut und dienen anschließend zur Protein- oder Adenosintriphosphat (ATP)-Synthese oder fungieren als Signalmoleküle (Fei *et al.*, 1998, Nehrke, 2003, Meissner *et al.*, 2004, Daniel *et al.*, 2006, Spanier *et al.*, 2009, Canfield und Bradshaw, 2019).

Eine der wichtigsten Nährstoffe stellen Einfachzucker, wie Glucose, dar, welche zur Biosynthese von Trehalose und Glykogen dienen oder im Rahmen der Glykolyse über mehrstufige Schritte zu Acetyl-CoA verstoffwechselt werden können (Ashrafi, 2007). Acetyl-CoA wird im Citrat-Zyklus zur Energiegewinnung, in Form von ATP, genutzt oder dient als Substrat für die weitere Fettsynthese zur Fettspeicherung (Abbildung 4). Während der Fettsynthese wird Acetyl-CoA hauptsächlich über die Acetyl-CoA-Carboxylase (*ACC/pod-2*) und die Fettsäure-Synthase (*FAS/fasn-1*) zu Malonyl-CoA und anschließend zur Fettsäure Palmitinsäure (C16:0) umgewandelt (Watts, 2009, Lee *et al.*, 2010, Li *et al.*, 2011). Die somit endogen produzierte, als auch aus der Nahrung aufgenommene Palmitinsäure, kann wiederum zur Bildung weiterer Fettsäuren dienen, die anschließend für die Produktion von Phospholipiden verwendet werden oder, mit Glycerol verestert, Mono-, Di- und Triglyceride bilden (Watts und Browse, 2002, Salway, 2004). Triglyceride nehmen ca. 40 – 55% der Gesamtlipide im adulten Nematodenkörper ein, während die übrigen Anteile sich auf zirkuläre Lipide und Phospholipide, wie Ethanolamine, Choline, Sphingomyeline, Cardiolipine, Inositole und Lysocholine, verteilen (Satouchi *et al.*, 1993, Tanaka *et al.*, 1996, Ashrafi, 2007, O'Rourke *et al.*, 2009, Witting und Schmitt-Kopplin, 2016). Mono- und Diglyceride hingegen kommen in den Nematoden nur in sehr geringen Anteilen vor (Srinivasan, 2015).



**Abbildung 4: Schematische Darstellung wesentlicher Stoffwechselwege der Fettsynthese in *C. elegans*.**

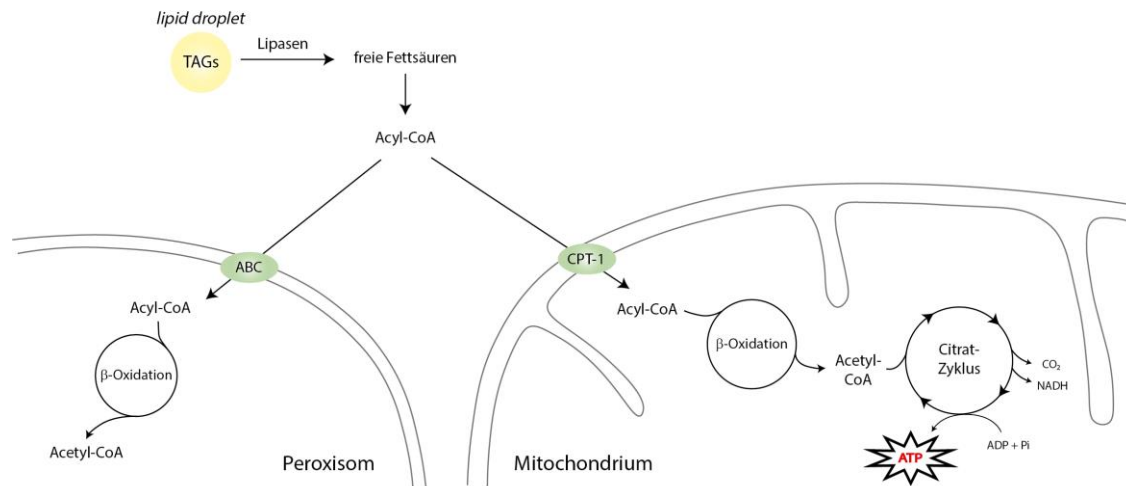
Aus der Nahrung stammende Kohlenhydrate, wie Glucose, werden über mehrstufige Prozesse zu Pyruvat und schließlich zu Acetyl-CoA abgebaut oder alternativ zu Glykogen umgewandelt und gespeichert. Acetyl-CoA, das nicht zur Generierung von Adenosintri-phosphat (ATP) genutzt wird, dient als Substrat für die Synthese von Fettsäuren, die über die Acetyl-CoA-Carboxylase (ACC) und Fettsäure-Synthase reguliert wird (FAS), und schließlich der Bildung von Triglyceriden und Phospholipiden dient. Abbildung modifiziert nach Watts (2009).

Triglyceride, auch Triacylglyceride (TAGs) genannt, bestehen jeweils aus einem Glycerolgerüst und drei Fettsäureketten, die in Lipidtröpfchen, sogenannten *lipid droplets*, überwiegend im Darm und in der Hypodermis vorzufinden sind (Kimble und Sharrock, 1983, Hellerer *et al.*, 2007, Mullaney und Ashrafi, 2009, Watts, 2009, Mak, 2012, Liu *et al.*, 2014, Srinivasan, 2015). Zusätzlich können TAGs ebenso in geringen Anteilen in den Muskeln, Gonaden und ferner in Dotterproteinen der Eier enthalten sein, welche den Lipoproteinen in Nagern ähneln (Kimble und Sharrock, 1983, Hall *et al.*, 1999, Hellerer *et al.*, 2007, Mullaney und Ashrafi, 2009, Watts, 2009, Mak, 2012, Liu *et al.*, 2014). Dotterproteine, die in den Darmzellen der Nematoden gebildet werden, vermitteln den Transport von Lipiden in die Oozyten, um die Versorgung der Embryonen während der Entwicklung zu gewährleisten (Kimble und Sharrock, 1983, Grant und Hirsh, 1999, Hall *et al.*, 1999, Kubagawa *et al.*, 2006). Mit gängigen Nachweisverfahren, wie der Kohärenten Anti-Stokes-Raman-Spektroskopie (CARS), der Stimulierten Raman-Streuung (SRS)-Mikroskopie oder Färbungen mit lipophilen Farbstoffen, zeigte sich, dass die Nematoden während der Entwicklung über die einzelnen Larvenstadien weiterhin Fette akkumulieren, was phasenweise durch rapide Zunahmen zwischen einzelnen Stadien (während der L1/L2- oder L3/L4-Transition) stattfindet (Yen *et al.*, 2010, Pino *et al.*, 2013, Fouad *et al.*, 2017, Gao *et al.*, 2017). Insbesondere nach dem Eintritt in die reproduktive Phase im Adultalter steigt der Fettgehalt in den Nematoden drastisch an und erreicht ca. am Tag 6 der Adoleszenz einen Sättigungsbereich (Wählby *et al.*, 2014, Gao *et al.*, 2017, Shen *et al.*, 2018). Nach Tag 7 der Adoleszenz hingegen setzt, mit zunehmendem Alter der Nematoden, eine graduelle Fettabnahme ein (Gao *et al.*, 2017, Shen *et al.*, 2018).

### 1.2.3.2 Fettabbau

In Zeiten erhöhten Energiebedarfs, wie beispielweise beim Wachstum, bei der Reproduktion, bei einem vorherrschenden Nahrungsmangel oder während des Dauerlarvenstadiums, kann die von *C. elegans* benötigte Energie, in Form von ATP, durch die Mobilisierung von Fetten aus den Fettreserven erfolgen (Mullaney und Ashrafi, 2009, Srinivasan, 2015). Für diesen Prozess werden diverse Lipasen aktiviert, die TAGs aus den *lipid droplets* hydrolysieren und so die gebundenen Fettsäuren freisetzen (Mullaney und Ashrafi, 2009, Srinivasan, 2015). In *C. elegans* wurden über 100 Gene identifiziert, die für Lipasen kodieren, von denen einige sowohl Homologien zu der humanen Magen-, als auch Pankreaslipase aufweisen und unter unterschiedlicher Regulation stehen (O'Rourke und Ruvkun, 2013, Srinivasan, 2015, Buis *et al.*, 2019). Die Hauptlipase in *C. elegans* stellt dabei ATGL-1 dar, ein Homolog zur Adipozyten-Triglyceridlipase in Menschen und Nagern, die durch den Nahrungsstatus, den Serotonin- und den Insulin-Signalweg aktiviert wird (Narbonne und Roy, 2009, Noble *et al.*, 2013, Lee *et al.*, 2014). Bei erhöhter körperlicher Bewegung, wie dem stetigen Schwimmen in Flüssigkultur, werden in den Nematoden nachweislich zwei weitere Lipasen induziert, die Phospholipasen C07E3.9 und C03H5.4 (Laranjeiro *et al.*, 2017). Bei Nahrungsrestriktion werden ferner die Lipase-ähnlichen Enzyme LIPL (*lipase-like*)-1, LIPL-3 und LIPL-4, und bei einer auftretenden Hungerphase (*starvation*) die Lipasen FIL (*fasting induced lipase*)-1-, FIL-2 und die hormonsensitive Lipase HOSL-1 aktiviert (Wang *et al.*, 2008, Jo *et al.*, 2009, O'Rourke und Ruvkun, 2013, Srinivasan, 2015). Dabei werden die zahlreichen Lipasen nicht nur in unterschiedlichen Zelltypen exprimiert (Intestinalzellen, Muskelzellen, Coelomozyten), sondern können auch an unterschiedlichen Zellstrukturen, wie *lipid droplets*, Membranen, ER, Lysosomen oder Lysosomen-ähnlichen Organellen (LRO), lokalisiert sein (Wang *et al.*, 2008, Jo *et al.*, 2009, O'Rourke und Ruvkun, 2013, Srinivasan, 2015).

Die aus der Nahrung aufgenommenen sowie die aus den TAGs der *lipid droplets* mobilisierten Fettsäuren werden mit Acetyl-CoA zu Acyl-CoA ligiert und über Carnitin-Palmitoyltransferase 1 (CPT-1)-Transporter in Mitochondrien oder über ATP-Bindekasette (ABC)-Transporter in Peroxisomen aufgenommen, wo der anschließende Fettabbau über die  $\beta$ -Oxidation erfolgt (Reddy und Hashimoto, 2001, Salway, 2004, Ashrafi, 2007, Watts und Ristow, 2017). Im Rahmen der  $\beta$ -Oxidation werden von den Fettsäuren sequentiell Kohlenstoffpaare abgespalten, um Acetyl-CoA zu generieren (Van Veldhoven, 2010). In Peroxisomen dient der Abbau der Lipide bspw. zur Bildung von Ascarosidpheromonen, die regulatorische Rollen im Übergang ins Dauerlarvenstadium, in der Lebensspanne und Verhaltensweise der Nematoden einnehmen (Morita und Imanaka, 2012, Park und Paik, 2017). In Mitochondrien hingegen dient Acetyl-CoA im Citrat-Zyklus schließlich zur Generierung von ATP, Kohlenstoffdioxid (CO<sub>2</sub>) und Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Hydrid (NADH) (Abbildung 5) (Watts und Ristow, 2017, Shen *et al.*, 2018).



**Abbildung 5: Schematische Darstellung des Fettabbaus in *C. elegans*.**

Triglyceride (TAGs) werden aus *lipid droplets* hydrolysiert und die Fettsäuren mittels diverser Lipasen freigesetzt. Diese werden in Form von Acyl-CoA über ATP-Bindekasette (ABC)-Transporter in Peroxisomen oder über Carnitin-Palmitoyltransferase 1 (CPT-1)-Transporter in Mitochondrien transportiert, wo die Generierung von Acetyl-CoA über die  $\beta$ -Oxidation erfolgt. Das in Mitochondrien generierte Acetyl-CoA tritt in den Citrat-Zyklus ein, zur Bildung von Energie in Form von Adenosintriphosphat (ATP). Die vereinfachte Darstellung des Fettabbaus in *C. elegans* ist modifiziert nach Yuan *et al.* (2012).

### 1.2.3.3 Regulation des Fettmetabolismus

Die Regulation der Lipidsynthese und -oxidation, die wie erwähnt primär vom Versorgungszustand der Nematoden abhängig ist, erfolgt, ähnlich wie in Menschen, sowohl über neuroendokrine Signale, als auch hauptsächlich über den Insulin/IGF-1 (*insulin growth factor 1*)-, den TGF- $\beta$  (*transforming growth factor  $\beta$* )-, den Serotonin- und den mTOR/AMPK (*molecular target of rapamycin/AMP-activated protein kinase*)-Signalweg (Kimura *et al.*, 1997, Sze *et al.*, 2000, Ashrafi *et al.*, 2003, Greer *et al.*, 2008, Soukas *et al.*, 2009). Dabei unterliegen diese Prozesse einer komplexen und strengen Regulation diverser Faktoren, die in Abbildung 6 zusammenfassend dargestellt sind.

Hauptsignalwege des Fettmetabolismus in *C. elegans*

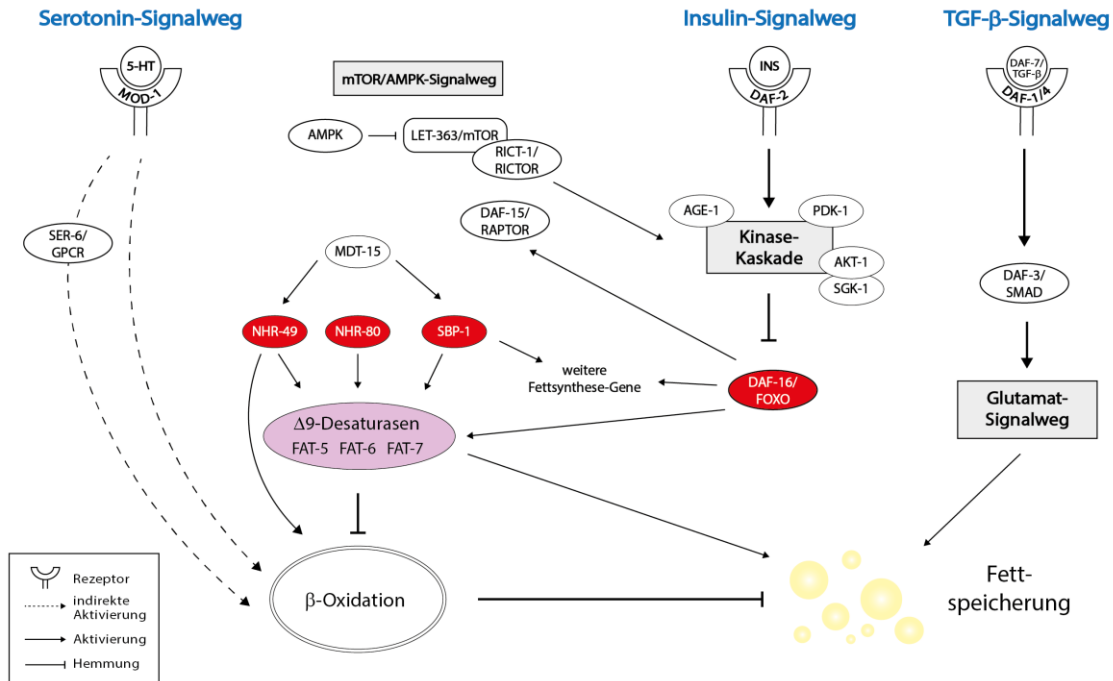


Abbildung 6: Schematische Darstellung der Hauptsignalwege der Fettsynthese in *C. elegans*.

Die Synthese des Fettes in *C. elegans* wird hauptsächlich über den Serotonin-, den Insulin/insulin growth factor 1 (IGF-1)- und den *molecular target of rapamycin/AMP-activated protein kinase* (mTOR/AMPK)-Signalweg reguliert. Beteiligte regulierende Faktoren sind zusätzlich dargestellt. Bei Unterschieden in der Nomenklatur zwischen *C. elegans* und Säugern sind die Namen der Säuger-Homologe angegeben. 5-HT: Serotonin, AGE-1: *ageing alteration-1*, AKT-1: *AKT kinase 1*, Proteinkinase B, DAF: *abnormal dauer formation*, FAT: *fatty acid desaturase*, FOXO: *forkhead box, subgroup O*, GPCR: G-Protein-gekoppelter Rezeptor, INS: Insulin, LET-363: *lethal-363*, MDT-15: *mediator protein 15*, MOD: *modulation of locomotion defective*, NHR: *nuclear hormone receptor*, PDK-1: *phosphoinositol-dependent kinase 1*, PI3K: *Phosphoinositid-3-Kinasen*, RAPTOR: *regulatory associated protein of mTOR*, RICT-1/RICTOR: *rapamycin-insensitive companion of TOR*, SBP-1: *sterol regulatory element binding protein*, SER-6: *serotonin receptor 6*, SGK-1: *serum and glucocorticoid-inducible kinase 1*, SMAD: *suppressor of mothers against decapentaplegic*. Die vereinfachte Darstellung ist modifiziert nach Watts (2009) und Kim *et al.* (2016).

Neuroendokrine Signale werden beispielsweise über Serotonin (5-Hydroxytryptamin, 5-HT) vermittelt, das ernährungsbedingte Verhaltensweisen in *C. elegans* reguliert, und dessen Bindung an den Rezeptor MOD-1 den Fettabbau über die  $\beta$ -Oxidation initiiert (Sze *et al.*, 2000, Srinivasan *et al.*, 2008). Der Insulin-Signalweg, der bekanntlich die Entwicklung und Lebensdauer von *C. elegans* moduliert, nimmt mit dem Insulinrezeptor DAF-2, ebenfalls eine wichtige Rolle im Fettmetabolismus ein (Kenyon *et al.*, 1993, Kenyon, 2010). Die Hemmung des Insulin-Signalweges über die beeinträchtigte Funktionalität von DAF-2, wodurch wiederum der Transkriptionsfaktor DAF-16/FOXO inaktiviert bleibt, führt zur Fettakkumulation in den Nematoden (Ogg *et al.*, 1997). Dabei sind die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen für die Fetterhöhung über die DAF-2-Hemmung jedoch noch nicht vollständig bekannt. Des Weiteren kann die Inaktivierung des Kinasekomplexes mTOR/RAPTOR über die Beeinflussung des Insulin-Signalweges ebenfalls zu einer Fetterhöhung, aber auch einem Entwicklungsarrest der Nematoden führen (Vellai *et al.*, 2003, Jia *et al.*, 2004). Für die Induktion des TGF- $\beta$ -Signalweges, der unter anderem die Entwicklung, Zellfunktion und den Übergang der Nematoden ins Dauerlarven-Stadium bestimmt, ist unter

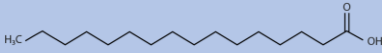
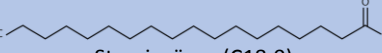
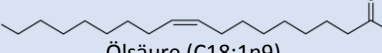
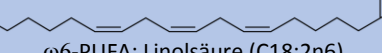
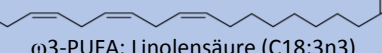
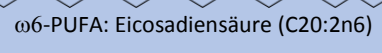
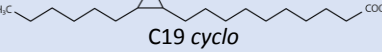
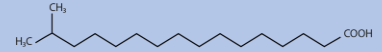
anderem der Ligand DAF-7 involviert, dessen Inaktivierung im gleichnamigen Gen ebenfalls in einer erheblichen Fettzunahme resultiert (Zhu und Burgess, 2001, Gumienny und Savage-Dunn, 2013). Eine besondere Stellung im Fettstoffwechsel von *C. elegans* nehmen die Stearoyl-CoA-Desaturasen, auch  $\Delta 9$ -Desaturasen genannt, ein (Ashrafi *et al.*, 2003, Brock *et al.*, 2006, Watts, 2009, Srinivasan, 2015, Watts und Ristow, 2017). Die funktionelle Rolle der  $\Delta 9$ -Desaturasen in der Fettsynthese von *C. elegans* konnte durch Mutationen in den entsprechend kodierenden Genen *fat-5*, *fat-6* und *fat-7* herausgestellt werden (Watts *et al.*, 2003). Gezielte Mutationen in den einzelnen Genen haben keine auffälligen phänotypischen Veränderungen in den Nematoden zur Folge, die auf eine Kompensierung der Funktionalität der deletierten Desaturase durch andere Desaturasen schließen ließ (Brock *et al.*, 2006, 2007). Doppelmutanten hingegen weisen Wachstumsverzögerungen, Veränderungen in der Fettsäurekomposition, reduzierte Fettgehalte sowie eine verminderte Fertilität auf, während Mutationen im allen drei  $\Delta 9$ -Desaturase-Genen larval letal sind (Van Gilst *et al.*, 2005b, Brock *et al.*, 2006, Liang *et al.*, 2010). Diese Schlüsselregulatoren der Fettsynthese und des -abbaus stehen unter transkriptioneller Kontrolle der Proteine NHR-49 und NHR-80 aus der nukleären Hormonrezeptorfamilie, dem Sterol-regulierenden Bindeprotein SBP-1 und dem Mediator-Protein MDT-15 (Van Gilst *et al.*, 2005a, Van Gilst *et al.*, 2005b, Brock *et al.*, 2006, Yang *et al.*, 2006). Dabei sind NHR-49 und SBP-1 besonders hervorzuheben, da diese entsprechende Homologe zum humanen Peroxisom-Proliferator-aktivierten Rezeptor- $\alpha$  (PPAR $\alpha$ ) und dem Sterol-regulierenden Bindeprotein SREBP darstellen und zusätzlich weitere Zielgene kontrollieren, die in der  $\beta$ -Oxidation, Lipidbindung und Fettsäure-Desaturierung involviert sind und schließlich die Lipidzusammensetzung der Nematoden determinieren (Ashrafi *et al.*, 2003, McKay *et al.*, 2003, Van Gilst *et al.*, 2005a, Van Gilst *et al.*, 2005b, Yang *et al.*, 2006, Atherton *et al.*, 2008, Pathare *et al.*, 2012).

### 1.2.3.4 Fettsäuren und ihre funktionellen Rollen

*C. elegans* besitzen ein großes Repertoire an Fettsäuren (FS), die abhängig von ihrem strukturellen Aufbau in Subklassen klassifiziert werden können, und, mit Ausnahme der Cyclopropan-Fettsäuren (Cyclo-FS), ebenso in Menschen und Nagern vorzufinden sind (Satouchi *et al.*, 1993, Watts und Browse, 2002, Kniazeva *et al.*, 2004, Calder, 2015). FS bestehen aus aliphatischen Kohlenstoffketten, die in *C. elegans* eine Länge von 12 – 22 Kohlenstoffatomen annehmen und in gesättigter (ohne Doppelbindung) oder ungesättigter (mit Doppelbindung) Form vorkommen können (Tanaka *et al.*, 1996, Watts und Browse, 2002, Watts, 2009, Henry *et al.*, 2016). Die FS unterscheiden sich dabei in der Anzahl und Position ihrer Doppelbindungen im Kohlenstoffgerüst, die unter anderem die mehrfach ungesättigten Fettsäuren (*polyunsaturated fatty acids*, PUFAs) zusätzlich in  $\omega 6$ - und  $\omega 3$ -PUFAs unterteilt (Tanaka *et al.*, 1996, Watts und Browse, 2002, Watts,

2009, Henry *et al.*, 2016). Die Klassifizierung der Fettsäuregruppen mit Beispielen und funktioneller Rolle in *C. elegans* sind nachfolgend in der Tabelle 1 aufgelistet.

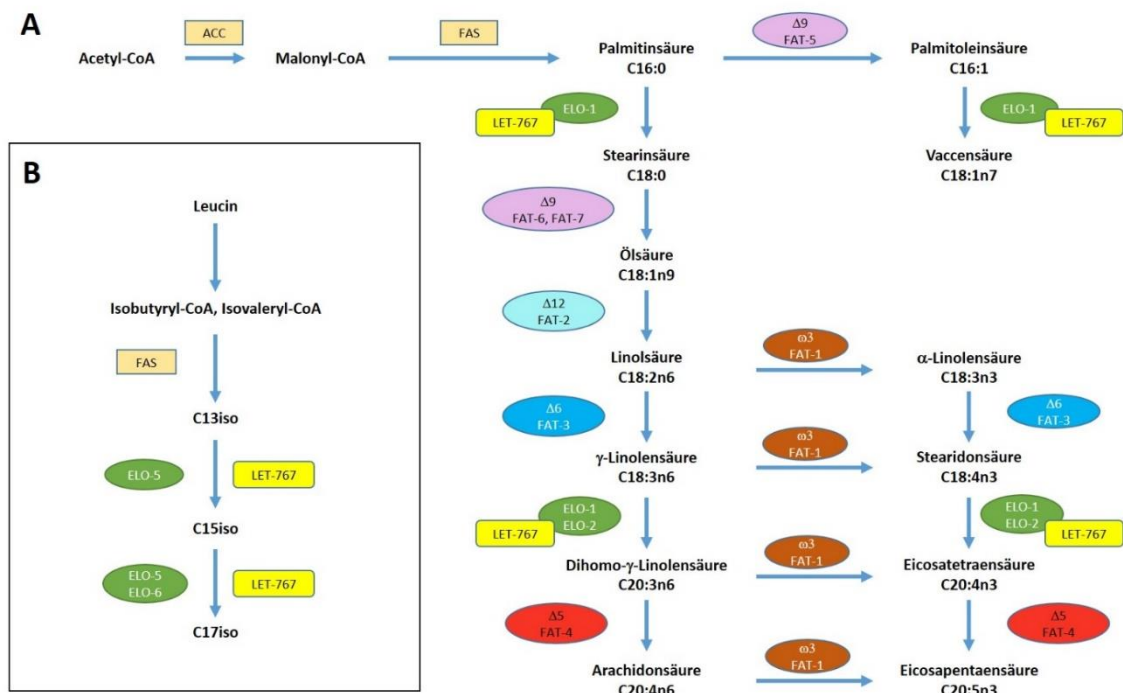
**Tabelle 1: Fettsäureklassen in *C. elegans*.** Beispiele und funktionelle Rollen von Fettsäuren in *C. elegans*

Fettsäure-Subklasse	Beispiel	Funktion	Referenz
gesättigte Fettsäuren	 Palmitinsäure (C16:0)	Thermoregulation	(Brock <i>et al.</i> , 2007, Murray <i>et al.</i> , 2007)
	 Stearinsäure (C18:0)		
einfach ungesättigte Fettsäuren	 Ölsäure (C18:1n9)	Regulation der Lebensspanne, Immunabwehr	(Han <i>et al.</i> , 2017, Anderson <i>et al.</i> , 2019)
mehrfach ungesättigte Fettsäuren	 ω6-PUFA: Linolsäure (C18:2n6)	Entwicklung, Wachstum, Reproduktion, Neurotransmission, Entzündungshemmung	(Watts und Browse, 2002, Lesa <i>et al.</i> , 2003, Watts, 2016)
	 ω3-PUFA: Linolensäure (C18:3n3)		
	 ω6-PUFA: Eicosadiensäure (C20:2n6)		
Cyclo-Fettsäuren	 C19 <i>cyclo</i>	unbekannt	(Kaul <i>et al.</i> , 2014, Watts und Ristow, 2017)
Verzweigte Fettsäuren	 C17 <i>iso</i>	Wachstum, Glucose-Stressresistenz, Regulator im Insulin-Signalweg	(Watts und Browse, 2002, Kniazewa <i>et al.</i> , 2008)

*C. elegans* beziehen viele dieser FS und FS-Vorstufen direkt aus der Nahrung oder können auch eine Reihe von FS *de novo* synthetisieren (Wallis *et al.*, 2002, Watts und Browse, 2002, Brock *et al.*, 2006). Für die Biosynthese mehrkettiger FS stehen den Nematoden mehrere FS-Desaturasen, diverse FS-Elongasen (ELO) sowie die 3-Ketoacyl-CoA-Reduktase (LET-767) zur Verfügung (Watts und Browse, 2002, Kniazewa *et al.*, 2003, Brock *et al.*, 2006, Entchev *et al.*, 2008, Watts und Ristow, 2017). Die *de novo*-Synthese der Fettsäuren beginnt mit dem aus den Nahrungsbestandteilen generierten Acetyl-CoA als Substrat, das in den ersten Schritten über die Enzyme ACC und FAS zur Palmitinsäure (C16:0) umgewandelt wird, welches die wichtigste Vorstufe von einfach ungesättigten Fettsäuren (*monounsaturated fatty acids*, MUFAs) und mehrfach ungesättigten Fettsäuren (*polyunsaturated fatty acids*, PUFAs) darstellt (Perez und Van Gilst, 2008, Watts und Ristow, 2017). Über die Δ<sup>9</sup>-Desaturasen FAT-5, FAT-6, FAT-7 und die Aktivität von Elongasen werden sequentiell weitere Kohlenstoffpaare und Doppelbindungen in die Palmitinsäure integriert, die zur Bildung von Palmitoleinsäure (C16:1), Ölsäure (C18:1n9) und Vaccensäure (C18:1n7) führen (Watts und Browse, 2002). Diese MUFAs können weiterhin zu PUFAs modifiziert werden, wobei die ω<sup>3</sup>-Desaturase



FAT-1 der Nematoden die Interkonvertierung von  $\omega$ 6- zu  $\omega$ 3-PUFAs erlaubt, wozu Säuger im Vergleich nicht in der Lage sind (Wallis *et al.*, 2002, Watts und Browse, 2002). Es entstehen dabei PUFAs wie Linolsäure (C18:2n6), Dihomo- $\gamma$ -Linolensäure (C18:3n6), Arachidonsäure (C20:4n6) und Eicosapentaensäure (C20:5n3) (Watts und Browse, 2002, Watts und Ristow, 2017). Verzweigte FS werden in *C. elegans* ausschließlich *de novo* gebildet und entstehen aus Isobutyryl- oder Isovaleryl-CoA, welche wiederum aus der Aminosäure Leucin generiert werden (Oku und Kaneda, 1988, Kniazeva *et al.*, 2004, Kniazeva *et al.*, 2008, Brooks *et al.*, 2009). Dabei stellen C15 *iso* und C17 *iso* die häufigsten Formen der verzweigten FS dar. Die Syntheseschritte der einzelnen Fettsäuren und die Involvierung der beteiligten Enzyme sind in Abbildung 7 dargestellt.



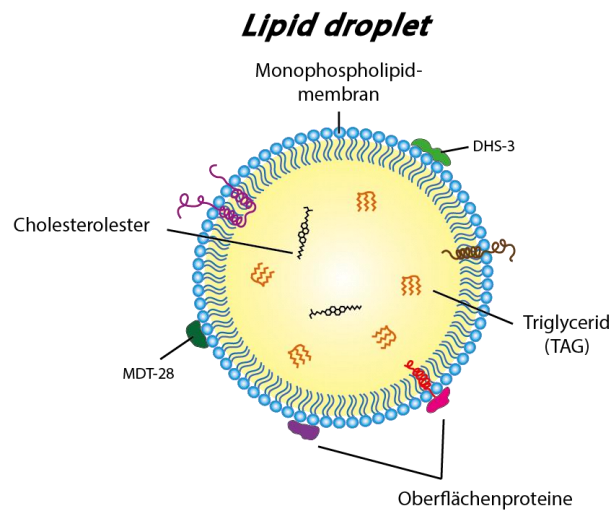
**Abbildung 7: Fettsäuresynthesewege in *C. elegans*.**

Signalwege der *de novo*-Synthese von einfach und mehrfach ungesättigten Fettsäuren (A) und die *de novo*-Synthese von verzweigten Fettsäuren (B). Beteiligte Enzyme, deren essentielle Funktion in Mutanten nachgewiesen wurden, sind zusätzlich dargestellt. ACC: Acetyl-CoA-Carboxylase, ELO: Elongase, FAS: Fettsäure-Synthase, FAT: *fatty acid desaturase*, LET-767: *lethal-767*,  $\Delta 5/\Delta 6/\Delta 9/\Delta 12$ : delta-5/6/9/12-Desaturasen,  $\omega 3$ : omega-3-Desaturasen. Die Abbildung ist modifiziert nach Watts (2009, 2016).

Im Allgemeinen tragen Fettsäuren als Bestandteil von Speicherlipiden (Triglyceride und Cholesterolester) und Membranlipiden (Phospholipide und Sphingolipiden) jeweils zur Fettspeicherung und zur Membranintegrität bei und können zusätzlich auch als Signalmoleküle, bspw. in Form von Fettsäureamiden, Eicosanoiden oder Endocannabinoiden, für unterschiedliche physiologische Prozesse fungieren (Watts und Browse, 2002, Vrablik und Watts, 2013, Watts und Ristow, 2017). Ein Ungleichgewicht im Fettsäurehaushalt wirkt sich auf den Gesamtfetthaushalt der Nematoden aus, kann zu Beeinträchtigungen der Entwicklung, des Körperwachstums, der Motilität, der Reproduktion, der Neurotransmission, der sensorischen Signalübertragung, der Lebensspanne, der Keimzellerhaltung oder des rhythmischen Verhaltens führen (Ashrafi, 2007).

### 1.2.3.5 Lipid droplets

*Lipid droplets* (LD) sind die Hauptspeicherorganellen für Fette in *C. elegans*, die sich auch in Bakterien, Nagern und fast allen multizellulären Organismen ubiquitär vorfinden (Farese und Walther, 2009, Goodman, 2009, Martin und Parton, 2006, Murphy 2011, Yang et al, 2012, Zhang et al. 2010, Na et al, 2015:). Die fettspeichernden Organellen bestehen aus einer einschichtigen Phospholipidmembran und Proteinen, die im Inneren einen hydrophoben Kern aus Neutrallipiden, hauptsächlich TAGs, aufweisen (Abbildung 8) (Bartz *et al.*, 2007, Walther und Farese, 2012, Vrablik *et al.*, 2015). Darüber hinaus sind in LD auch Cholesterolester vertreten, die anders als in Nagern oder Hefen, in den LD von *C. elegans* jedoch nur in sehr geringen Mengen vorkommen (Tauchi-Sato *et al.*, 2002, Merris *et al.*, 2003, Martin und Parton, 2006, Bartz *et al.*, 2007, Goodman, 2009, Robenek *et al.*, 2009, Grillitsch *et al.*, 2011, Walther und Farese, 2012).



**Abbildung 8: Schematischer Aufbau eines Lipidtröpfchens (*lipid droplet*) in *C. elegans*.**  
Abbildung modifiziert nach Vrablik *et al.* (2015) und Önal *et al.* (2017).

Unter optimalen Lebensbedingungen nehmen LD während der Nematodenentwicklung in Größe und Anzahl zu und können in adulten Wildtypen in der Regel einen Durchmesser zwischen 0,5 – 3  $\mu\text{m}$  erreichen (Hellerer *et al.*, 2007, Shi *et al.*, 2013). Durch die CARS-Mikroskopie konnte nachgewiesen werden, dass sich in den Intestinalzellen der Nematoden durchschnittlich größere LD ansammeln, als in den Hypodermiszellen (Hellerer *et al.*, 2007). Genmanipulierte *C. elegans*-Stämme hingegen, die Deletionen in bestimmten LD-regulierenden Genen aufweisen, zeigen vergrößerte LD mit Durchmessern von 3 – 10  $\mu\text{m}$  im L4-Stadium oder sogar weitaus größere LD im Adultstadium (Zhang *et al.*, 2010a, Li *et al.*, 2016). Vergleichsweise können in adipösen Geweben von Nagern oder Menschen die LD sogar einen Durchmesser von bis zu 100  $\mu\text{m}$  (Suzuki *et al.*, 2011). Dabei sind die Anzahl, Größe und Verteilung der LD vom Gesamttriglyceridgehalt abhängig, welcher wiederum vom physiologischen, metabolischen Status der Nematoden und äußeren Umweltveränderungen determiniert wird (Hellerer *et al.*, 2007, Kuerschner *et al.*, 2008, Farese und

Walther, 2009).

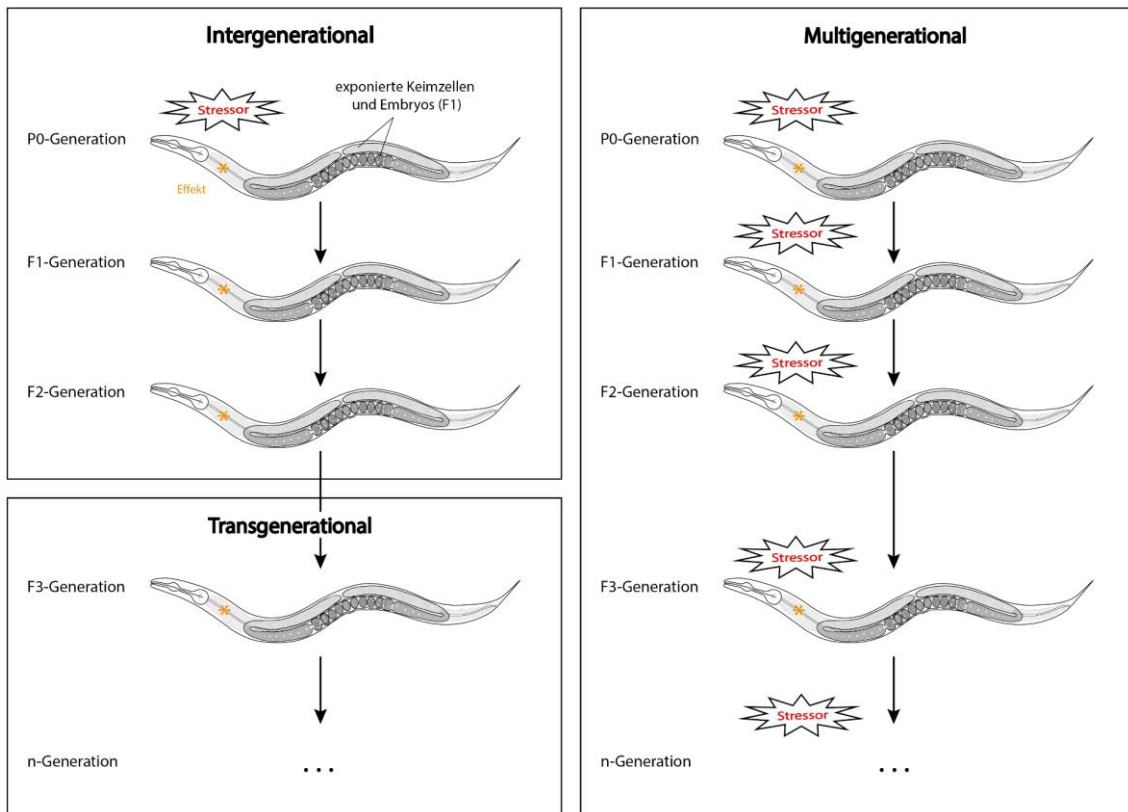
In Genexpressionsanalysen konnten 78 Gene in den Nematoden identifiziert werden, die an der Modellierung der LD-Morphologie beteiligt sind (Zhu *et al.*, 2018, Cao *et al.*, 2019). Mutationen in einzelnen dieser Gene führen zur Entstehung von sogenannten Riesenlipidtröpfchen, die einen Durchmesser von bis zu 10 µm annehmen können (Li *et al.*, 2016, Cao *et al.*, 2019). Die Hauptfunktion der LD gilt der Regulierung des Energiestoffwechsels und des intrazellulären Lipidtransportes, die durch die Interaktion und Kommunikation mit subzellulären Organellen, wie dem endoplasmatischen Retikulum (ER), frühen Endosomen, Mitochondrien und Peroxisomen, vermittelt werden (Martin *et al.*, 2005, Binns *et al.*, 2006, Liu *et al.*, 2007, Zehmer *et al.*, 2009, Pu *et al.*, 2011, Mak, 2012, Na *et al.*, 2015). In Embryos liefern LD wichtige Bausteine für die Membransynthese bei der Zellteilung und dienen insbesondere als Energiequelle für Entwicklungsprozesse bis zum Schlüpfen der Larven (Watts und Ristow, 2017). LD besitzen an der Membranoberfläche zahlreiche Proteine, die dabei eine Gewebespezifität aufweisen können (Na *et al.*, 2015, Liu *et al.*, 2018). Diese Proteine sind neben der Lipid-Synthese und -degradation, auch an der Proteindegradation und dem Membrantransport beteiligt (Yang *et al.*, 2012, Zhang *et al.*, 2012). Unter den strukturgebenden LD-assoziierten Proteinen sind die Oberflächenproteine *Mediator complex subunit* (MDT)-28 (auch als Perilipin PLIN-1 bekannt) und *short-chain dehydrogenase* (DHS)-3 die am häufigsten vorkommenden LD-Proteine in *C. elegans* (Na *et al.*, 2015, Liu *et al.*, 2018). Die Gewebespezifität einzelner LD-Proteine, wie das Darm-spezifische DHS-3, kann zur selektiven mikroskopischen Analyse, beispielsweise über Fluoreszenz-Markierungen, genutzt werden, um die Funktion und Dynamik der Proteine bzw. der LD in zellulären Prozessen zu erforschen (Liu *et al.*, 2018). Die Rolle der LD-assoziierten Proteine sowie die Mechanismen, die der Bildung, den morphologischen Veränderungen und der Funktion der LD unterliegen, sind bislang jedoch noch nicht vollständig geklärt.

### 1.3 Vererbung von mehrgenerationalen Effekten

Die Übertragung eines ausgeprägten Phänotyps der mütterlichen (maternalen) Generation durch Auswirkungen der von ihr erfahrenen Umwelt auf ihre Nachkommen wird als maternaler Effekt oder auch intergenerationaler Effekt bezeichnet (Mousseau und Fox, 1998, J. Marshall und Uller, 2007, Uller, 2008, Perez und Lehner, 2019). Neben der maternalen Beeinflussung und Veränderungen im intrauterinen Umfeld können auch paternale Effekte in den Nachkommen beobachtet werden (Isganaitis *et al.*, 2017). Diese intergenerationalen Effekte treten in Pflanzen, Wirbeltieren, einschließlich dem Menschen, aber auch wirbellosen Organismen, wie Nematoden, auf (Mousseau und Fox, 1998, Galloway und Etterson, 2007, Räsänen und Kruuk, 2007). Die Vererbung von Phänotypen resultiert dabei nicht aus einem veränderten Genom, sondern unterliegt vielmehr epigenetischen Modifikationen, die zu vererbbaaren Veränderungen der Genexpression führen (Heard und Martienssen, 2014, Peschansky und Wahlestedt, 2014). Diese umfassen zum Beispiel Histonmodifikationen, DNA-Methylierungen oder nicht-kodierende Ribonukleinsäuren (RNAs), wie mikroRNAs (miRNAs) und *P-element induced wimpy testis* (PIWI)-interagierende RNAs (piRNAs), die über die Keimbahn übertragen werden und als stabil, wenn auch potentiell reversibel gelten (Henderson und Jacobsen, 2007, Rechavi *et al.*, 2011, Rechavi und Lev, 2017, Bošković und Rando, 2018, Skvortsova *et al.*, 2018, Lev *et al.*, 2019a, Perez und Lehner, 2019, Duempelmann *et al.*, 2020). Ähnlich wie für andere Nicht-Nagermodelle, wie *Drosophila melanogaster* oder Hefen, wurde für *C. elegans* angenommen, dass den Nematoden diverse DNA-Methyltransferasen (DNMTs) zur DNA-Methylierungen fehlen, sodass dieser Mechanismus weniger eine Rolle in der epigenetischen Regulation spielen würde (Klass *et al.*, 1983, Simpson *et al.*, 1986, Feng *et al.*, 2010, Iyer *et al.*, 2011, Wenzel *et al.*, 2011, Sarda *et al.*, 2012, Corsi *et al.*, 2015). Neuere Studien hingegen wiesen in den Nematoden mit der Entdeckung der DNA-N6-Adenin-Methyltransferase 1 auch Methylierungen an der DNA-Base Adenin nach, und zeigten darüber hinaus die transgenerationale Vererbbarkeit dieser Methylierung (Greer *et al.*, 2015, Hu *et al.*, 2015, Ma *et al.*, 2019, Wan *et al.*, 2021).

Oftmals kann die phänotypische Plastizität nicht nur adverse Effekte, sondern auch adaptive Phänotypen hervorrufen, die die Fitness der Nachkommen erhöhen und darüber hinaus über mehrere darauffolgende Generationen (mehrgenerationale Effektvererbung) persistieren (Galloway, 2005, Jablonka und Raz, 2009, Carone *et al.*, 2010, Nelson und Nadeau, 2010, Ng *et al.*, 2010, Aiken und Ozanne, 2014, Lind und Spagopoulou, 2018, Van Cann *et al.*, 2019). Die Veränderung eines Phänotyps kann dabei sowohl bei fortbestehendem Stimulus (multigenerationaler Effekt), als auch bei Abwesenheit des auslösenden Stimulus bzw. Stressors von der Elterngeneration (Parentalgeneration, P0) in die Folgegenerationen (Filialgenerationen, F-Generation) vererbt werden (inter- oder transgenerationaler Effekt) (Jaenisch und Bird, 2003,

Pembrey *et al.*, 2006, Skinner, 2008, Daxinger und Whitelaw, 2010, Heard und Martienssen, 2014, Pang *et al.*, 2017). Eine transgenerationale Vererbung liegt vor, wenn ein Effekt in einer nachfolgenden Generation auftritt, die weder direkt noch indirekt (Exposition der Keimbahn und des Embryos) dem auslösenden Stressor ausgesetzt war. Entsprechend gilt ein auftretender Effekt erst ab der F3-Generation, bzw. F2-Generation bei paternaler Exposition, als transgenerational, während in vorigen Generationen auftretende Effekte als intergenerational bezeichnet werden (siehe Abbildung 9) (Heard und Martienssen, 2014, Tuscher und Day, 2019).



**Abbildung 9: Schematische Darstellung der Unterschiede zwischen inter-, trans- und multigenerationalen Effekten.** Unterschiede in der Definition der Effektererbung abhängig von dem Auftreten der Effekte nach Exposition der Parentalgeneration (P0) und entsprechenden Filialgenerationen (F) gegenüber einem Stressor.

Viele Faktoren, wie die Ernährungsweise, Umweltkontaminanten, chemische Substanzen, Temperaturschwankungen, aber auch traumatische Ereignisse und psychische Stressoren, können epigenetische Veränderungen in Individuen verursachen (Waddington, 1953, Francis *et al.*, 1999, Anway *et al.*, 2005, Baccarelli und Bollati, 2009, Mathers *et al.*, 2010, Gapp *et al.*, 2014, Norouzitallab *et al.*, 2014, Vickers, 2014, Klengel und Binder, 2015, Cadet, 2016, Nilsson *et al.*, 2018, Walker und Nestler, 2018). In den letzten zehn Jahren wurden solche Effekte in Hinblick auf die mehrgenerationale Vererbung zunehmend in den unterschiedlichsten Spezies wie Fischen, Nagern, Schweinen, Daphnien, *Drosophila melanogaster* oder auch in diversen Pflanzen untersucht (Norouzitallab *et al.*, 2014, Poma *et al.*, 2014, Skinner, 2014, Yohn *et al.*, 2015, Hanson und Skinner, 2016, Quadrana und Colot, 2016). Dabei umfassen die Studien beispielsweise Auswirkungen der

Ernährung, von Stress (Hitze, Kälte, reaktive Sauerstoffspezies), Drogen (Alkohol, Opiaten, Kokain, Nikotin), Schwermetallen, Chemikalien oder Nanopartikeln (Zinkoxide) auf Individuen (Schultz *et al.*, 2016, Klosin *et al.*, 2017, Lev *et al.*, 2019a, Tetreau *et al.*, 2019, Willis *et al.*, 2021, Toker *et al.*, 2022). Einige dieser Studien wurden im Rahmen der Adipositas-Forschung mit Fokus auf die Vererbbarkeit des metabolischen Zustandes, beispielsweise durch Variation des Ernährungsstatus oder die Exposition gegenüber Obesogenen<sup>6</sup>, auf die Nachkommen untersucht (Jones und Friedman, 1982, Bispham *et al.*, 2003, Fullston *et al.*, 2012, Stegemann und Buchner, 2015, Chen *et al.*, 2016a, Huypens *et al.*, 2016, Sharma *et al.*, 2016, Zhang *et al.*, 2018, Lee und Blumberg, 2019). Die vorhandenen Studien beschränken sich dabei auf die Untersuchung der Effekte von einigen, wenigen Folgegenerationen, was vermutlich durch die aufwendige Durchführung und ethische Vertretbarkeit hoher Tierversuchszahlen begründet ist. Im Gegensatz dazu ist *C. elegans* in diesen Aspekten nicht eingeschränkt und stellt, neben seinen anderen, zahlreichen Vorzügen, einen geeigneten Modellorganismus dar, um diverse Effekte über mehrere Generationen zu untersuchen. Dabei schließen die Studien unterschiedlichste Expositionsszenarien mit ein, deren externe Stimuli von einer definierten Ernährungsweise (fett-, protein- oder zuckerreich, Nahrungsrestriktion, *starvation*), Chemikalien, Schwermetallen, Nanopartikeln, Hitzestress, Pathogenen bis hin zu der physischen Aktivität reichen und die verschiedensten Auswirkungen auf das Wachstum, die Entwicklung, die Lebensspanne, das olfaktorische System, das Verhaltensmuster, die Reproduktion, die Motilität, die Immunabwehr, Stressresistenzen, Stoffwechselprozessen und sogar die sexuelle Attraktivität zeigen (Remy, 2010, Maxwell *et al.*, 2012, Kim *et al.*, 2013, Rechavi *et al.*, 2014, Tauffenberger und Parker, 2014, Jobson *et al.*, 2015, Yu und Liao, 2016, Kishimoto *et al.*, 2017, Kumsta *et al.*, 2017, Lev *et al.*, 2019a, Lev *et al.*, 2019b, Kaletsky *et al.*, 2020, Wei *et al.*, 2020, Wan *et al.*, 2022). Im Zusammenhang mit dem Fettmetabolismus zeigte sich auch in mehreren toxikologischen Studien mit *C. elegans* die mehrgenerationale Vererbbarkeit von diversen Substanz-induzierten Fettphänotypen (z. B. durch Lindan und Sulfomethoxazole, Benzyloquinolin-Alkaloide) (Chen *et al.*, 2018, Chow und Sato, 2019, Li *et al.*, 2020).

---

<sup>6</sup> chemische Fremdverbindungen, die die Lipidhomöostase stören und zur Fettleibigkeit führen

## 2 Zielsetzung

Der Ernährungsstatus und die stetige, ubiquitäre Exposition des Menschen gegenüber diversen Umweltkontaminanten erhöhen die Anfälligkeit für die Entstehung von Fettleibigkeit und Stoffwechselstörungen in der Bevölkerung und deren Nachkommen weltweit. Um die Hintergründe der Entstehung von Adipositas und damit verbundenen gesundheitlichen Schäden und Krankheitsbildern unter diesen Aspekten zu untersuchen und die Risiken bestimmter Substanzen mit potentiellen obesogenen Eigenschaften einschätzen zu können, sind geeignete Testsysteme notwendig, die die Untersuchung von Fettmetabolismus-assoziierten Effekten erlauben. In der vorliegenden Arbeit sollen die vielen, bereits erwähnten Vorzüge des Organismus *C. elegans* genutzt werden, um ein Fettmodellsystem zur Detektion von Fettgehaltsveränderungen in den Nematoden zu entwickeln, mit dem Ziel potentielle obesogene oder anti-obesogene Substanzen identifizieren zu können. Ferner soll das System genutzt werden, um die Vererbung von Fettmetabolismus-assoziierten Effekten über mehrere Generationen zu untersuchen.

Die in dieser Arbeit vorgelegte Studie umfasst dabei drei Teilprojekte und eine erste Anwendung zur Untersuchung der mehrgenerationalen Effektweitergabe des Fettphänotyps im Modellorganismus *C. elegans*:

1. Etablierung einer Nachweisstrategie zur Bestimmung des Fettgehalts in *C. elegans*
2. Charakterisierung eines *C. elegans*-Fettmodellsystems
3. Testung des Systems mit einer bekannten anti-obesogenen Substanz
4. Untersuchung der Vererbung von Futtermengen-assoziierten Effekten in die Folgegeneration(en)





### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Material

##### 3.1.1 Organismen

<b><i>C. elegans</i>-Stamm</b>	<b>Genotyp</b>	<b>Referenz</b>
N2 var. <i>Bristol</i>	Wildtyp	Caenorhabditis Genetics Center (CGC), Minnesota, USA
DA465	<i>eat-2(ad465) II.</i>	Caenorhabditis Genetics Center (CGC), Minnesota, USA
CB1370	<i>daf-2(e1370) III.</i>	Caenorhabditis Genetics Center (CGC), Minnesota, USA
LIU1	<i>ldrls1 [dhs-3p::dhs-3::GFP + unc-76(+)]</i>	Caenorhabditis Genetics Center (CGC), Minnesota, USA

<b>Bakterienstamm</b>	<b>Eigenschaft</b>	<b>Referenz</b>
<i>Escherichia coli</i> OP50	Uracil-auxotroph	Caenorhabditis Genetics Center (CGC), Minnesota, USA

### 3.1.2 Verbrauchsmaterialien

Einwegmaterial	Hersteller
384-well-Platte, ( <i>black, f-bottom</i> ), CellCarrier Ultra	PerkinElmer Inc., MA, USA
8-Well-Platte	TPP Techno Plastic Products AG, CH
96-well-Platte ( <i>black, f-bottom</i> ), CellCarrier	PerkinElmer Inc., MA, USA
96-well-Platte ( <i>clear, f-bottom</i> )	TPP Techno Plastic Products AG, CH
96-well-Platte ( <i>white, f-bottom</i> )	PerkinElmer Inc., MA, USA
Deckgläser (18 × 18 mm)	Thermo Fisher Scientific, MA, USA
Duran Präparatengläser Gewinde GL18, Kappe mit PTFE-Dichtung (Ø 16 × 100 mm)	Glasgerätebau Ochs, GÖ, DE
Eppendorfgefäße (0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml, 5 ml)	Eppendorf AG, HH, DE
Erlenmeyerkolben (500 ml)	Schott AG, MZ, DE
<i>High Precision</i> Deckgläser (24 × 60 mm)	Thermo Fisher Scientific, MA, USA
Kimtech Science, <i>Precision Wipes, White /Small</i>	Kimberly-Clark Professional™, UK
Kryoröhrchen (2 ml)	Sarstedt AG & CO.KG, Nümbrecht, DE
Objektträger, Superfrost®, Menzel Gläser	Thermo Fisher Scientific, MA, USA
Pasteurpipetten, Glas	VWR International GmbH, DD; DE
Pipettenspitzen (10 µl, 100 µl, 1000 µl, 5000 µl)	Eppendorf AG, HH, DE
Precellys® Zirconiumoxid Keramik-Kügelchen ( <i>beads</i> ) 1,4 mm	VWR International GmbH, DD, DE
Reagenzröhrchen mit Aluminiumkappen (20 ml)	Hirschmann/Belden Brand, S, DE
<i>SecureSeal™ imaging spacers</i>	Merck KGaA, DA, DE
Serologische Pipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml)	VWR International GmbH, DD; DE
Zellkulturflaschen (25 cm <sup>2</sup> )	TPP Techno Plastic Products AG, CH
Zellkulturpetrischalen (60 cm <sup>2</sup> )	TPP Techno Plastic Products AG, CH
Zentrifugenröhrchen (15 ml, 50 ml, Polypropylen)	Corning Life Sciences B.V., AMS, NLD
Zentrifugenröhrchen (15 ml, Polystyrene)	Corning Life Sciences B.V., AMS, NLD

### 3.1.3 Geräte

Gerät	Hersteller
Absaugvorrichtung für Zellkultur	neoLab Migge GmbH, HD, DE
Accu-jet <sup>®</sup> Pro Pipetboy	Brand GmbH + CO KG, MA, DE
Airy Scan LSM 880	Carl Zeiss Microscopy, NY, USA
Binokular (Stand K EDU + Microscope body Stemi 608)	Carl Zeiss Microscopy, NY, USA
CO <sub>2</sub> -Inkubator, BBD 6220	Thermo Fisher Scientific, MA, USA
Feinwaage Mettler AE163	Mettler Toledo International Inc., OH, USA
Heizblock, ThermoMixer <sup>®</sup> C 5382	Eppendorf AG, HH, DE
Heizblock, Typ 56006191	Gebr. Liebisch GmbH & Co. KG, BI, DE
Homogenisator, SpeedMill plus	Analytik Jena AG, J, DE
Inkubationsschüttler, Certomat <sup>®</sup> BS-1	Sartorius AG, GÖ, DE
Kühlinkubator, KT 115	BINDER GmbH, TUT, DE
Kühlschrank, 111.429 7/7929, 649285_40268	Quelle GmbH/Pivileg, FÜ, DE
Laborbrenner, Usbeck	Carl Friedrich Usbeck KG, Radevormwald, DE
Mikroskop, Axiovert 25 cfl	Carl Zeiss Microscopy, NY, USA
Multistepper Pipette Multipette <sup>®</sup> plus	Eppendorf AG, HH, DE
Opera Phenix High-Content Screening System	PerkinElmer Inc., MA, USA
Photometer, Ultrospec <sup>®</sup> 10	Amersham Biosciences, AHM, GB
Plattenleser, Synergy Neo 2	BioTek Instruments, VT, USA
Plattenleser, Infinite 200 Pro (Tecan)	Tecan Trading AG, CH
Plattformschüttler, kreisförmig vibrierend, Titramax 101	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, KEH, DE
Pipetten, elektr. (Ein- und Mehrkanal), Xplorer <sup>®</sup>	Eppendorf AG, HH, DE
Pipetten manuell – Reference, Research & Research plus	Eppendorf AG, HH, DE

Gerät	Hersteller
Reax top Vortexer	Eppendorf AG, HH, DE
Sicherheitswerkbank, HSPC 9	Tecan Group Ltd., Männedorf, CH
Zentrifuge 5804 R, 5424 R	Thermo Fisher Scientific, MA, USA
Zentrifuge, Labofuge 400	Heidolph Instruments GmbH & Co.KG, SC, DE
ZOE™ Fluorescent Cell Imager	Bio-Rad Laboratories, Inc., CA, USA

### 3.1.4 Softwares

Software	Entwickler
CombineTIFF, v. 1.18	Dr. Ing. Norman Violet, Bundesinstitut für Risikobewertung, B, DE
Microsoft Excel, v. 16.0.5215.1000	Microsoft Corporation, WA, USA
Infinite 200, v. 2.12	Tecan Trading AG, CH
Gen5.0, v. 3.09	BioTek Instruments, VT, USA
GraphPad Prism, v. 8.2.0 (441)	GraphPad Software Inc., CA, USA
Harmony, v. 4.8	PerkinElmer Inc., MA, USA
Imaris, v. 9.8.0	Oxford Instruments, UK
Image J, v. 1.53f51	Wayne Rasband, National Institute of Health, MA, USA
Adobe Illustrator, v. 26.3.1	Adobe Inc., CA, USA
Adobe Photoshop, v. 23.4.1	Adobe Inc., CA, USA
Wormdetector, v. 0.1b	Dr. Nils Körber, Bundesinstitut für Risikobewertung, B, DE

## 3.1.5 Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
$\alpha$ -D-Glucose	Sigma-Aldrich Corp., MO, USA
Agar-Agar	Carl Roth GmbH, KA, DE
Cadmiumchlorid, $\geq 99,99$ %	Sigma-Aldrich Corp., MO, USA
Calciumchlorid, $\geq 94$ %	Carl Roth GmbH, KA, DE
Calciumchlorid Dihydrat, $\geq 99$ %	Carl Roth GmbH, KA, DE
Cholesterol, $\geq 99$ %	Sigma-Aldrich Corp., MO, USA
Citronensäure Monohydrat, $\geq 99,5$ %	Carl Roth GmbH, KA, DE
di-Kaliumhydrogenphosphat Trihydrat, $\geq 99$ %	Carl Roth GmbH, KA, DE
di-Kaliumhydrogenphosphat $\geq 98$ %	Carl Roth GmbH, KA, DE
Dimethylsulfoxid (DMSO) $\geq 99,9$ %	Sigma-Aldrich Corp., MO, USA
Ethanol, $\geq 99,8$ %	Carl Roth GmbH, KA, DE
Glycerol, $\geq 99$ %	MP Biomedicals, LLC, CA, USA
Hefeextrakt	Carl Roth GmbH, KA, DE
Isopropanol, $\geq 99,8$ % (2-propanol)	Carl Roth GmbH, KA, DE
Kaliumchlorid	Carl Roth GmbH, KA, DE
Kaliumdihydrogenphosphat, $\geq 99$ %	Sigma-Aldrich Corp., MO, USA
Kaliumhydroxid, $\geq 85$ %	Carl Roth GmbH, KA, DE
Kupfer(II)-sulfat Pentahydrat $\geq 99$ %	Carl Roth GmbH, KA, DE
LB-Medium (Luria/Miller)	Carl Roth GmbH, KA, DE
LB-Medium mit Agar (Miller)	Sigma-Aldrich Corp., MO, USA
Magnesiumsulfat, $\geq 99,5$ %	Sigma-Aldrich Corp., MO, USA
Magnesiumsulfat Heptahydrat, $\geq 99$ %	Carl Roth GmbH, KA, DE
Mangan(II)-chlorid Tetrahydrat, $\geq 98$ %	Carl Roth GmbH, KA, DE
Mercaptoethanol	Merck KGaA, DA, DE
Natriumazid	Sigma-Aldrich Corp., MO, USA
Natriumchlorid, $\geq 99,5$ %	Carl Roth GmbH, KA, DE
Natriumhydroxid, $\geq 98$ %	Carl Roth GmbH, KA, DE
Natriumhypochlorit, 12 %	Carl Roth GmbH, KA, DE
Orlistat	Biovision Inc., CA, USA
Paraformaldehyd, 4%	Thermo Fisher Scientific, MA, USA
SeaPlaque® GTG® Agarose	Lonza, Rockland, ME, USA

Chemikalie	Hersteller
tri-Kaliumcitrat Monohydrat, ≥ 99 %	Carl Roth GmbH, KA, DE
Triton® X-100	AppliChem GmbH, DA, DE
Trypton/Pepton aus Casein	Carl Roth GmbH, KA, DE
Zinksulfat Heptahydrat, ≥ 97 %	Carl Roth GmbH, KA, DE

### 3.1.6 Puffer und Lösungen

#### Lysogeny broth (LB)-Agar

Trypton	10 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	10 g
Agar-Agar	15 g

ad. 1 l ddH<sub>2</sub>O, pH auf 7,0 einstellen,  
15 Minuten bei 121 °C autoklavieren

#### LB-Medium

Trypton	10 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	10 g

ad. 1 l ddH<sub>2</sub>O, pH auf 7,0 einstellen,  
15 Minuten bei 121 °C autoklavieren

#### M9-Puffer

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	6 g
NaCl	5 g

ad. 1 l ddH<sub>2</sub>O, 15 Minuten bei 121 °C  
autoklavieren, 60 °C abkühlen lassen und  
Zugabe von

1 M MgSO <sub>4</sub>	1 ml
-----------------------	------

#### Modified Ruvkun's Witches Brew (MRWB)-Puffer

ddH <sub>2</sub> O	696 ml
2 M KCl	80 ml
5 M NaCl	8 ml
0,1 M EGTA	140 ml
0,1 M Spermidine	10 ml
0,1 M Spermine	4 ml
0,1 M Na-PIPES	60 ml
0,1 M Mercaptoethanol	2 ml

frisch ansetzen und 1:1 mit M9-Puffer mischen

**Nematode growth medium (NGM)-Agarplatten**

Pepton von Casein	2,5 g
Agar	17 g
NaCl	3 g

ad. 972 ml ddH<sub>2</sub>O und 15 Minuten bei 121 °C autoklavieren, auf 60 °C abkühlen lassen und Zugabe von

5 mg/ml	Cholesterol	1 ml
1 mM	CaCl <sub>2</sub>	1 ml
1 mM	MgSO <sub>4</sub>	1 ml
25 mM	KPO <sub>4</sub>	25 ml

je 25 ml in eine Petrischale (60 cm<sup>2</sup>) pipettieren und auskühlen lassen

**S-Basal**

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	6 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1 g
NaCl	5,85 g

ad. 1 l ddH<sub>2</sub>O, 15 Minuten bei 121 °C autoklavieren

**S-Complete**

S-Basal	1000 ml
1 M Kaliumcitrat	1 ml
1 % (v/v) TMS	10 ml
3 mM CaCl <sub>2</sub>	3 ml
3 mM MgSO <sub>4</sub>	3 ml
5 mg/ml Cholesterol	3 ml

frisch ansetzen

**Trace Metals Solution (TMS)**

Na <sub>2</sub> EDTA	1,68 g
Fe(II)SO <sub>4</sub>	0,69 g
Mn(II)Cl <sub>2</sub>	0,20 g
ZnSO <sub>4</sub>	0,29 g
Cu(II)SO <sub>4</sub>	0,025 g

ad. 1 l ddH<sub>2</sub>O, 15 Minuten bei 121 °C autoklavieren

### 3.1.7 Farbstoffe

Farbstoff	Katalognummer	Hersteller
Nile Red (Nilrot)	72485	Sigma- Aldrich, MO, USA
HCS LipidTOX™ Deep Red Neutral Lipid Stain	H34477	Invitrogen, CA, USA

### 3.1.8 Kits

Kit	Anwendungsbereich	Katalognummer	Hersteller
DC™ Protein Assay	Proteinbestimmung	500-0116	Bio-Rad Laboratories, Inc., CA, USA
Triglyceride Quantification Kit	Triglycerid-Assay	MAK266	Sigma-Aldrich, MO, USA
Free Glycerol Determination Kit	Triglycerid-Assay	F6428, T2449 und G7793	Sigma-Aldrich, MO, USA



## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Allgemeine Kultivierungsmethoden

Die Standardmethoden zur Kultivierung von Bakterien und Nematoden sind aus dem Buch „*C. elegans* - A Practical Approach“ und den Methoden nach Sydney Brenner (1974) abgeleitet (Brenner, 1974, Michaelson, 2000).

#### 3.2.1.1 OP50-Futterbakterien-Aufzucht

Als Futterquelle für *C. elegans* wurde der Uracil-auxotrophe Bakterienstamm OP50 der Spezies *Escherichia coli* (*E. coli*) (Caenorhabditis Genetic Center, Minnesota, USA) genutzt, der für die Kultivierung der Nematoden im Labor häufig Verwendung findet (Brenner, 1974, Sulston und Hodgkin, 1988). Die OP50-Kultivierung erfolgte mit einer Übernachtskultur von 8 µl OP50 (Kryostock) in 5 ml *lysogeny broth* (LB)-Medium in Reagenzröhrchen (Glas, 20 ml) (Hirschmann) bei 37 °C und 100 rpm im Schüttelinkubator (Sartorius AG). Anschließend wurde diese Vorkultur in einen 500 ml Erlenmeyerkolben mit 200 ml LB-Medium überführt und für weitere 8 Stunden unter gleichen Bedingungen im Schüttelinkubator inkubiert. Nach der Inkubation, die insgesamt nicht mehr als 14 h überschritt, wurde die Bakteriensuspension auf vier 50 ml Zentrifugenröhrchen aufgeteilt und durch drei Waschschrte mit kaltem M9-Puffer (4 °C) und Zentrifugationsschritten für 10 min bei 3000 g und 4 °C aufgereinigt. Nach dem letzten Zentrifugationsschritt wurde der Überstand abgesaugt und das Bakterienpellet in je 20 ml S-Complete resuspendiert. Die optische Dichte (OD) der Bakteriensuspension wurde in einer 1:40 Verdünnung in S-Complete als Triplikat mit dem Ultrospec® 10 (Amersham Biosciences) bei einer Wellenlänge ( $\lambda$ ) von  $\lambda = 600$  nm bestimmt und die OD der unverdünnten Bakteriensuspension unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors berechnet. Anschließend wurde diese Bakteriensuspension durch Verdünnung in S-Complete auf die optische Dichte  $OD_{600} = 6,75$  eingestellt und die Bakterien bis zur Verwendung für maximal zwei Monate bei 4 °C gelagert.

#### 3.2.1.2 Kultivierung von *C. elegans*

##### 3.2.1.2.1 Haltung auf NGM-Agarplatten

Zur Erhaltung der Stämme wurden die Nematoden auf *Nematode growth medium* (NGM)-Agarplatten (60,1 cm<sup>2</sup>), die mit OP50 angeimpft wurden, bei 20 °C im Kühlkubator gehalten. Für die Herstellung dieser Futterplatten wurden unter sterilen Bedingungen 70 µl OP50 ( $OD_{600} = 6,75$ ) auf eine NGM-Agarplatte pipettiert und die Suspension mit einem mit Ethanol abgeflamnten Drigalskispatel gleichmäßig verteilt. Um die Besiedelung der Bakterien zu ermöglichen, wurden die Platten über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Die Nematoden wurden alle 3 – 4 Tage auf eine neue Futterplatte transferiert, um ein Aushungern

der Nematoden zu verhindern. Dazu wurde im semi-sterilen Bereich eines Bunsenbrenners mit einem sterilen Skalpell ein Dreieck aus dem Agar mit Nematoden herausgeschnitten und kopfüber auf eine neue Futterplatte gelegt. Nach 1–2 min migrierten die Nematoden auf die neue Futterplatte, sodass das Dreieck wieder entfernt und die Nematoden bei 20 °C weiterkultiviert werden konnten.

### 3.2.1.2.2 Haltung in Flüssigkultur

Die Nematoden der Flüssigkultur entstammten der Agarplatten-Kultivierung. Dazu wurden die Nematoden zweimal mit 4 ml kaltem M9-Puffer (4 °C) von einer NGM-Platte gespült, die Eier mit der Bleichmethode (siehe 3.2.1.2.3) isoliert und in die Flüssigkultur in 25 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflaschen (ZKF) oder 8-Well-Platten überführt. Das Kultivierungsmedium setzte sich aus S-Complete und der entsprechenden OP50-Menge zusammen. Die eingesetzte Futtermenge betrug 10<sup>9</sup> KbE/ml OP50 (Kolonie-bildende Einheit), die ebenso in anderen Flüssigkultur-basierten Untersuchungen Verwendung fand (Win *et al.*, 2013, Zheng *et al.*, 2017, Li *et al.*, 2021). Dabei wurde die Bakterienkonzentration von 10<sup>9</sup> KbE/ml OP50, die einer OD<sub>600</sub> = 0,675 in der finalen Lösung entspricht, als 1x OP50 definiert. Höhere Futtermengen wurden als Vielfaches der 1x OP50-Futtermenge eingesetzt. Das Gesamtvolumen betrug 10 ml (ZKF) bzw. 4 ml (8-Well) mit einer Dichte von 400 Nematoden/ml. Für die Erhaltung der Stämme in der Flüssigkultur wurden alle 3–4 Tage die Eier aus adulten Nematoden mit der Bleichmethode isoliert und in neuen ZKF mit je 1x OP50 oder 4x OP50 (entsprechend OD<sub>600</sub> = 2,7) gefüttert (400 Eier/ml). Bei der Überführung von Nematoden aus der Agarplattenkultivierung in die Flüssigkultur wurden in Studien phänotypische und transkriptomische Veränderungen in der Folgegeneration beschrieben (Celen *et al.*, 2018, Lev *et al.*, 2019a). Eigene Beobachtungen zeigten zumindest für die erste Folgegeneration ein asynchrones Wachstum innerhalb der Population, das in darauffolgenden Generationen jedoch nicht mehr auftrat, sodass für die Experimente der vorliegenden Arbeit ausschließlich Nematoden verwendet wurden, die nach der Überführung von NGM-Agarplatten in die Flüssigkultur mindestens fünf Generationen durchlaufen hatten, um eine zeitliche Adaption der Nematoden an die Kultivierungsbedingungen zu erlauben und einen stabilen Phänotyp zu gewährleisten.

### 3.2.1.2.3 Egg preparation und Alterssynchronisation

Zur Erhaltung einer synchronisierten Population wurde alle 3–4 Tage eine sogenannte *egg preparation* (*egg prep.*) durchgeführt. Die *egg prep.* ist eine Bleichmethode, bei der die Eier aus adulten Nematoden durch Zugabe einer Bleichlösung isoliert werden (Brenner, 1974, Porta-de-la-Riva *et al.*, 2012). Entweder wurden Nematoden zweimal mit 4 ml kaltem M9-Puffer (4 °C) von den Agarplatten herunter gespült oder direkt aus den ZKF entnommen und in ein 15 ml

Zentrifugenröhrchen (aus Polystyren) überführt. Die Nematoden wurden einmalig mit ca. 10 ml kaltem M9 Puffer (4 °C) gewaschen, zentrifugiert (2 min, 1300 g, 4 °C) und der Überstand bis auf ein Restvolumen von 2 ml abgesaugt. Die anschließende Lyse der Nematoden wurde durch Zugabe einer alkalischen Bleichlösung (420 µl 12 %-iges NaOCl + 250 µl 10 N NaOH) durch ein 2-minütiges Schütteln per Hand bei Raumtemperatur (RT) erreicht. Die Bleichlösung wurde anschließend durch dreifaches Waschen mit je 10 ml kaltem M9 (4 °C) Puffer vollständig wieder entfernt und die freigesetzten Eier in 3 ml frisch angesetzttem S-Complete aufgenommen. Die Eizahl pro µl in den 3 ml S-Complete wurde durch Auszählung von fünf 5 µl Tropfen unter einem Binokular (Microscope body Stemi 608, Zeiss) bestimmt. Zur Erhaltung der Stämme wurden anschließend je 400 Eier/ml in neuen ZKF mit Kultivierungsmedium überführt und kultiviert.

Für Versuchsansätze wurden die Eier nach der *egg prep.* in S-Complete über Nacht bei 20 °C und 150 rpm auf einem Schüttler im Inkubator gehalten. Die über Nacht geschlüpften Nematoden verharrten im sogenannten L1-Arrest, da sie sich aufgrund einer fehlenden Futterquelle nicht weiterentwickeln, wodurch die Alterssynchronisation der Nematoden auf dasselbe Larvenstadium möglich ist (Johnson und Wood, 1982, Baugh, 2013). Die Anzahl der L1-Larven pro ml wurde ebenfalls durch fünf ausgezählte 5 µl Tropfen bestimmt und für die Versuche auf eine Nematodendichte von 400 L1/ml in den ZKF verdünnt.

### 3.2.2 Methodenetablierung

#### 3.2.2.1 Nile Red-Färbung - Testung von Konzentrationen und Inkubationszeiten

Für die Fettgehaltsbestimmung wurde der lipophile Fluoreszenzfarbstoff Nile Red (NR) ausgewählt, der sich in fettreichen Strukturen der Nematoden anreichert (Greenspan und Fowler, 1985, Greenspan *et al.*, 1985). NR hat ein breit gefächertes Anregungs- sowie Emissionsspektrum, wobei die Emission abhängig vom Lösungsmittel sowie der hydrophoben Umgebung ist (Greenspan *et al.*, 1985, Ranall *et al.*, 2011). So zeigt NR bei Anregung mit grünem Licht (450 – 500 nm) ein Emissionsspektrum im gelb-roten Bereich (> 528 nm), wodurch vorwiegend hydrophobe Neutrallipide wie Triglyceride (auch Triacylglyceride genannt) oder Cholesterinester in *lipid droplets* nachgewiesen werden, bis hin zum dunkelroten Bereich (> 590 nm), in dem zusätzlich polare Lipide wie Phospholipide von Membranen erfasst werden (Greenspan und Fowler, 1985, Brown *et al.*, 1992, Diaz *et al.*, 2008, Liu *et al.*, 2014, Kalathimekkad *et al.*, 2015, Listenberger *et al.*, 2016). Durch die Proportionalität der emittierten Fluoreszenzintensität von NR zum Lipidgehalt, ist die semiquantitative Bestimmung des Fettgehalts in den Nematoden möglich (Chen *et al.*, 2009). Die Methode wurde zunächst auf folgende Parameter überprüft und optimiert: Konzentration und Inkubationsdauer des Fixierungsmediums Isopropanol, sowie der NR-Färbelösung. Für die Etablierungsphase der Färbemethode diente der *C. elegans*-Wildtypstamm N2 var. *Bristol* (CGC, Minnesota).

Im ersten Schritt wurde die Wirksamkeit von Isopropanol als Fixierungsmedium überprüft. Dazu wurden L1-Larven für zwei oder drei Tage (2 d oder 3 d) im Kultivierungsmedium mit 1x OP50 in 25 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen bei 20 °C inkubiert. Anschließend wurden 50 µl mit L4 (2 d) bzw. adulten Nematoden (3 d) aus den ZKF entnommen und in die Wells einer 96-Well-Platte (CellCarrier, *black, flat bottom*) pipettiert, was ca. 10 – 20 Nematoden pro Well entsprach. Durch die Zugabe von 75 µl unterschiedlicher Isopropanol-Konzentrationen wurden Endkonzentrationen von 85 %, 80 %, 60 %, 40 % und 20 % im Well erzielt. Alle fünf Minuten wurde manuell unter einem Stereomikroskop die Wirksamkeit der Fixierung überprüft, indem die Vitalität der Nematoden beurteilt wurde. Im zweiten Schritt erfolgte die Testung einer effizienten Konzentration und Inkubationszeit der NR-Färbelösung, die aus NR (Stock: 0,5 mg/ml NR in Aceton) in 40 %-igem Isopropanol bestand. Dazu wurden 75 µl der Isopropanol-Lösung aus den Wells entnommen und verworfen. Die Nematoden wurden anschließend mit 100 µl NR-Färbelösung unterschiedlicher Konzentrationen (3 – 30 µg/ml) unter Lichtausschluss für 15 – 180 min angefärbt. Nach der Inkubationszeit wurde die NR-Färbelösung aus den Wells entnommen und 100 µl 0,01 %-iges Triton<sup>®</sup> X-100 in M9-Puffer hinzugegeben. Die besten Parameter für die NR-Färbung ergaben sich aus einer 40 %-igen Isopropanolfixierung für 15 min und anschließender 30-minütiger Inkubation in 3 µg/ml NR-Färbelösung, die für weitere Versuche genutzt wurde. Die Bild-Aufnahme der Nematoden erfolgte in einer Ebene mit dem 5x-Luft-Objektiv (NA = 0,16) des High-Content Screening Systems Opera Phenix (PerkinElmer) im Durchlicht, bei  $\lambda_{\text{Ex}} = 522 \text{ nm}$  /  $\lambda_{\text{Em}} = 488 \text{ nm}$  und bei  $\lambda_{\text{Ex}} = 599 \text{ nm}$  /  $\lambda_{\text{Em}} = 561 \text{ nm}$ . Für eine detailreichere Betrachtung der Nematoden, wurden einzelne Nematoden mit dem 63x-Wasser-Objektiv (NA = 1,15) des Opera Phenix (PerkinElmer) bei denselben Wellenlängen aufgenommen. Die Auswertung der Körperflächen und Fluoreszenzintensitäten wurden mit der herstellereigenen Software Harmony (PerkinElmer) durchgeführt, die die automatisierte Erkennung der Nematoden und Messung der mittleren Fluoreszenzintensitäten (bei  $\lambda_{\text{Ex}} = 522 \text{ nm}$  /  $\lambda_{\text{Em}} = 488 \text{ nm}$ ) und der Körperfläche pro Nematode erlaubt. Die Bild-Aufnahme der Fluoreszenz bei  $\lambda_{\text{Ex}} = 599 \text{ nm}$  /  $\lambda_{\text{Em}} = 561 \text{ nm}$  diente hierbei lediglich zur Nematodenerkennung durch die Analyse-Software Harmony. Für die Auswertungen von selektierten Adulten, wurde ein vordefinierter Cut-off für die Körperfläche bei  $\geq 20000 \text{ } \mu\text{m}^2$  gesetzt, d. h. alle detektierten Nematoden mit einer Körperfläche kleiner als der Cut-off wurden ausgeschlossen. Zur Bestimmung der Größenparameter Körperlänge, -fläche und -volumen der Nematoden wurde zusätzlich die hausinterne Software Wormdetector (Nils Körber, BfR) herangezogen (siehe 3.2.4).

### 3.2.2.2 Testung von Positivkontrollen

Um die Aussagekraft der Nile Red-Färbemethode zur Bestimmung des Fettgehalts zu prüfen, war die Auswahl geeigneter Positivkontrollen notwendig. Dazu wurden Deletionsmutanten, Glucose-

gefütterte oder gehungerte Wildtypen untersucht, die mit unterschiedlichen Futtermengenkonditionen kultiviert wurden. Die Aufnahme der Nematoden erfolgte in 0,01 %-igem Triton<sup>®</sup> X-100 mit dem 5x-Luftobjektiv (NA = 0,16) des Opera Phenix bei den zuvor genannten Wellenlängen. Die Körperflächen und Fluoreszenzintensitäten wurden mittels der Harmony Software ausgewertet. Zusätzlich wurden 5 – 10 Durchlicht-Aufnahmen pro Nematodenstamm und Futterkondition am ZOE<sup>™</sup> Fluorescent Imager (Bio-Rad) aufgenommen (20x/0,4-Objektiv, 175x-Vergrößerung) (Bio-Rad), um die Körpergrößen und die Eizahl in den Nematoden zu bestimmen sowie die Larvenstadien und Morphologie der Nematoden zu untersuchen. Alle Aufnahmen am ZOE<sup>™</sup> Fluorescent Imager wurden für die Vergleichbarkeit in denselben Einstellungen aufgenommen (Expositionszeit: 300 ms, Belichtungsstufe: 8, LED-Intensitätsstufe: 60, Kontraststufe: 11).

### 3.2.2.2.1 Deletionsmutanten

Zur Detektion von Fettgehaltsveränderungen in *C. elegans* wurden die Deletionsmutanten *eat-2* (*ad465*) und *daf-2* (*e1370*) vom *Caenorhabditis* Genetics Center (CGC, Minnesota) herangezogen, die im Vergleich zum Wildtypstamm (N2) einen verringerten (*eat-2*) bzw. erhöhten (*daf-2*) Fettgehalt aufweisen (Kenyon *et al.*, 1993, Kimura *et al.*, 1997, Lakowski und Hekimi, 1998, Brooks *et al.*, 2009, Klapper *et al.*, 2011, Fouad *et al.*, 2017). Synchronisierte L1-Larven wurden mit 1x OP50 für drei Tage in ZKF bei 20 °C kultiviert.

### 3.2.2.2.2 Glucose und starvation

Das Kultivierungsmedium der Wildtypen wurde mit unterschiedlichen Glucose-Konzentrationen supplementiert, mit dem Ziel eine Erhöhung im Fettgehalt der Nematoden zu erreichen. L1-Larven in ZKF erhielten 1x OP50 und Glucose-Konzentrationen zwischen 1 µM und 100 mM. Am Tag 2, 3 und 4 wurden Nematoden aus den ZKF entnommen und die Fettgehalte mittels der NR-Färbung untersucht.

Um eine Erniedrigung des Fettgehalts zu induzieren, wurden 1x OP50- oder 4x OP50-gefütterte Wildtypen für eine definierte Zeit hungern gelassen (*starvation*). Dazu wurde die Futterquelle am Tag 3 entfernt und die Nematoden weiterhin für sechs Stunden (6 h) in S-Complete bei 20 °C gehalten. Für eine Hungerphase von 24 Stunden (24 h) wurde das OP50 entweder am Tag 2 oder Tag 3 entfernt.

### 3.2.2.2.3 Futtermenge

Als weitere Testung zur Veränderung des Fettgehalts der Nematoden wurde die Futtermenge variiert. L1-Larven wurden für zwei oder drei Tage mit Futtermengen zwischen 1x OP50 und

8x OP50 gefüttert. Die Kultivierung erfolgte abhängig von der benötigten Nematodenzahl in ZKF oder in 8-Well-Platten bei 20 °C. Die Generierung unterschiedlicher Fettphänotypen von *C. elegans* durch Variation der Futtermenge wurde neben der NR-Färbemethode (siehe 3.2.2.1) mit Hilfe des Triglycerid-Assays überprüft.

### 3.2.3 Triglycerid-Assay

Um die Aussagekraft der Ergebnisse der NR-Färbung zu stützen, diente ein zusätzlicher Assay, der einen absoluten Wert des Fettgehaltes wiedergab. Dazu wurden die Triglyceride (auch Triacylglyceride, TAGs) in den Nematoden gemessen, die die Hauptspeicherform des Fettes in *C. elegans* und somit einen wichtigen Messparameter in deren Fettbestimmung darstellt (Srinivasan, 2015). Dazu wurde der Triglycerid-Assay verwendet und die Relation der Triglyceridgehalte zum Körpervolumen von zwei und drei Tage alten Wildtypen bestimmt, die als geeignetes Maß für die Bewertung der Körperzusammensetzung und der Fettleibigkeit von Nematoden angesehen wird (Chaston *et al.*, 2007, Klapper *et al.*, 2011).

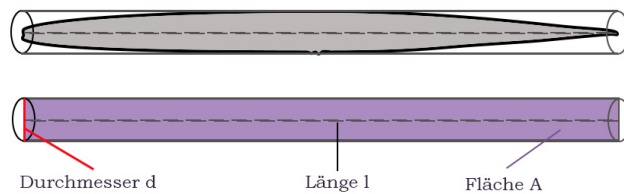
Zur Erfassung der Körpergröße wurden je 9 µl Nematodensuspension pro Kondition am Tag 2 oder Tag 3 aus den ZKF oder 8-Well-Platten entnommen und in zehn Wells einer 384-Well-Platte überführt. Die genaue Durchführung zur Körpergrößenbestimmung ist im folgenden Abschnitt beschrieben (siehe 3.2.4). Die übrigen Nematoden in den ZKF bzw. 8-Well-Platten wurden für die Bestimmung der Triglyceridgehalte mithilfe von zwei Triglycerid-Assay Kits von Sigma-Aldrich verwendet und der Assay nach Herstellerangaben durchgeführt. Zur Erhaltung des Nematodenlysats wurden die Nematoden zunächst zweimalig mit kaltem M9 (4 °C) sowie zweimalig mit kaltem ddH<sub>2</sub>O (4 °C) gewaschen, um das verbleibende OP50 zu entfernen (Zentrifugation bei 2 min, 1300 g, 4 °C). Anschließend wurden die Nematoden in ddH<sub>2</sub>O in einem Volumen von 200 µl aufgenommen, in ein 2 ml Kryoröhrchen mit Keramikkügelchen (Füllhöhe: 0,5 ml) überführt und bei -20 °C eingefroren. Die eingefrorenen Nematoden wurden mit einem Homogenisator (SpeedMill, Jena Analytics) in 2,5 Zyklen aufgeschlossen, wobei ein Zyklus 6x 30 sec mit 30-sekündiger Pause entsprach. Alle Lyseschritte erfolgten stets gekühlt. Das resultierende Nematodenlysate (ca. 150 – 200 µl) wurde anschließend vollständig in ein neues 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt. Für die Triglyceridwert-Bestimmung wurden in einem frischen Eppendorfgefäß 114 µl Nematodenlysate mit 6 µl Nonidet-P40 versetzt (Endkonzentration: 5 % Nonidet-P40) und zweimal im Heizblock für 5 min auf 100 °C erhitzt, um das Herauslösen von Lipiden aus Membranfragmenten zu erreichen. Zwischen den Heizphasen wurde das Lysat auf RT abkühlen gelassen und homogenisiert. Es folgte ein Zentrifugationsschritt für 2 min und 21130 rcf bei RT, um Nematodenreste und Nematodenlysate zu fraktionieren. Das resultierende Nematodenlysate wurde schließlich für die Bestimmung der Triglyceridwerte verwendet. Dazu

wurden zwei verschiedene Triglycerid-Assay Kits verwendet, da während des Arbeitszeitraumes der Standard des einen Kits nicht mehr einwandfrei funktionierte und der Assay nicht verwendet werden konnte. Die Ursache wurde in einem Fehler in der Zusammenstellung der Kit-Komponenten durch den Hersteller vermutet, da ab einem bestimmten Zeitraum mehrere Kits unterschiedlicher Lots nicht funktionierten, und daher ein anderes Assay Kit verwendet werden musste. Beide Triglycerid-Assay Kits funktionierten nach dem gleichen biochemischen Prinzip, unterschieden sich jedoch in ihrer Messsensitivität. Daher war für das Assay Kit 1 (MAK266, Sigma-Aldrich) eine Nematodenzahl von 1600 Nematoden pro Probe ausreichend (Ansatz in 8-Well-Platten), welche 1:10 verdünnt eingesetzt wurde und fluorimetrisch ( $\lambda_{\text{ex}} = 535 \text{ nm} / \lambda_{\text{em}} = 590 \text{ nm}$ ) gemessen werden konnte. Das Assay Kit 2 (bestehend aus F6428, T2449 und G7793, Sigma-Aldrich) hingegen benötigte eine Nematodenzahl von mind. 4000 Nematoden pro Probe, bei der die kolorimetrische Messung bei ( $A_{570}$ ) mit unverdünnten Proben erfolgte. Der Triglycerid-Assay basiert auf einer 2-stufigen enzymatischen Reaktion, mit der Umsetzung von mehrkettigen Glyceriden in Glycerol und freie Fettsäuren durch Zugabe einer Lipase und der Reaktion von Glycerol mit einem Substrat in ein kolorimetrisches bzw. fluorimetrisches Produkt. Der Assay erlaubt die Messung der Gesamtglycerol- sowie der freien Glycerolgehalte. Die Triglyceridgehalte wurden rechnerisch durch Subtraktion der beiden Glycerolgehalte ermittelt. Die Triglyceridwerte wurden anschließend pro Nematoden, pro Körpervolumen und pro Proteinmenge berechnet. Zur Bestimmung der Proteinmenge wurde das übrige Nematodenlysat ebenfalls zentrifugiert (2 min, 21130 rcf, RT) und der Überstand für die Proteinbestimmung mit dem DC<sup>TM</sup> Protein Assay Kit (Bio-Rad) verwendet.

### 3.2.4 Körpergrößen- und Eizahlbestimmung

Für die Durchlicht-Aufnahmen am ZOE<sup>TM</sup> Fluorescent Cell Imager (20x/0,4-Objektiv, 175x-Vergrößerung) (Bio-Rad) wurden 10  $\mu\text{l}$  Nematodensuspension auf einen Objektträger pipettiert und mit einem Deckglas eingedeckelt. Weiterhin wurden die Durchlicht-Aufnahmen am Opera Phenix durchgeführt. Dazu wurden 9  $\mu\text{l}$  Nematodensuspension, mit 5 – 10 Nematoden, und 1  $\mu\text{l}$  Natriumazid ( $\text{NaN}_3$ , 100 mM) in eine 384-Well-Platte pipettiert (10 Wells pro Kondition). Nach kurzer Zeit waren die Nematoden paralysiert. Die Well-Platte wurde kurz auf höchster Geschwindigkeit (1350 rpm) auf einem Plattenschüttler geschüttelt, um die vollständige Benetzung des Well-Bodens mit der Flüssigkeit und eine gleichmäßige Verteilung der Nematoden, möglichst ohne Nematodenüberlappungen, zu gewährleisten. Die Aufnahme am Opera Phenix mit paralysierten Nematoden berücksichtigt im Gegensatz zu „eingedeckelten“ Nematoden auf Objektträgern, bei denen der Nematodenkörper leicht zusammengedrückt wurden, die Erhaltung der morphologischen Körperstrukturen für die anschließende Berechnung der Körpervolumina. Die konfokale Aufnahme erfolgte kurz nach der Zugabe von  $\text{NaN}_3$  mit dem 10x-Luftobjektiv ( $\text{NA} = 0,3$ ) des Opera Phenix. Die Aufnahmen am Opera Phenix setzen sich aus neun Bildkacheln mit 5 %-iger

Überlappung zusammen, sodass für die Bestimmung der Körpergrößen ein Zusammenfügen der Bildkacheln notwendig war. Dazu diente das Programm „CombineTIFF“ von Norman Violet (BfR). Die nachfolgende Auswertung der zusammengesetzten Opera Phenix-Aufnahmen erfolgte schließlich mit dem „Wormdetector“ von Nils Körber (BfR). Dieses Programm erlaubte, basierend auf *Deep Learning*-Algorithmen, die automatisierte Erkennung und Ausmessung der Größenparameter Körperlänge und -fläche der Durchlicht-Aufnahmen vom Opera Phenix und ZOE™ Fluorescent Imager. Die Berechnung des Körpervolumens wurde mittels der gemessenen Körperlängen und -flächen und der Volumenformel für einen Zylinder approximiert (siehe Abbildung 10 und Formel 1 – 3). Die intrauterine Eizahl pro Nematode wurde durch manuelle Auszählung anhand der ZOE™-Aufnahmen erfasst.



**Abbildung 10: Schematische Darstellung der Körpergrößenberechnung von *C. elegans*.**

Das Körpervolumen der Nematoden wird über die gemessene Körperlänge und gemessene -fläche und der mathematischen Volumenformel eines Zylinders berechnet.

Das Volumen  $V$  eines Zylinders ergibt sich aus:

$$V = \frac{d^2 \cdot \pi}{4} \cdot l, \quad (\text{Formel 1})$$

mit Durchmesser  $d$  und der Länge  $l$  des Zylinders. Die detektierte Fläche  $A$  kann durch

$$A = l \cdot d \quad \leftrightarrow \quad d = \frac{A}{l} \quad (\text{Formel 2})$$

genähert werden, sodass sich für das Volumen:

$$V = \frac{A^2 \cdot \pi}{4 \cdot l} \quad (\text{Formel 3})$$

ergibt.



### 3.3 Charakterisierung von *C. elegans*-Fettphänotypen

L1-Larven des Wildtypen und des transgenen *C. elegans*-Stammes LIU1 (*ldrls1 [dhs-3p::dhs-3::GFP + unc-76(+)]*) (CGC, Minnesota) wurden mit entweder 1x OP50 oder 4x OP50 gefüttert, um Phänotypen mit einem „mageren“ und einen „fetten“ Fettprofil zu generieren. Die Nematoden wurden wie zuvor in den definierten Konditionen der Flüssigkultur in ZKF oder 8-Well-Platten für zwei oder drei Tage bei 20 °C gehalten.

Zur Charakterisierung der beiden Fettphänotypen wurden folgende Parameter bestimmt: Körpergrößen, Anzahl der Eier (*in utero*), Triglyceridgehalte, die Anzahl, Größe und Dichte von *lipid droplets*, Fettsäuregehalte sowie -muster.

#### 3.3.1 Analyse intestinaler *lipid droplets* mittels hochauflösender Mikroskopie

Für die Bestimmung der *lipid droplets* (LD) Anzahl, Größe und Dichte mittels hochauflösender Mikroskopie wurden drei Tage alte LIU1-Nematoden verwendet, die mit unterschiedlichen Futtermengen inkubiert wurden. LIU1-Nematoden weisen grün-fluoreszierende intestinale LD auf, die durch Kopplung des grün-fluoreszierenden Proteins GFP mit den ausschließlich im Darm vorkommenden LD-Oberflächenproteinen DHS-3 erzielt wurden (Liu *et al.*, 2014). Durch die Färbung der LD mit einem andersfarbig fluoreszierenden, lipophilen Farbstoff ist die Differenzierung zwischen hypodermalen und intestinalen LD möglich, die zusätzlich für die LD-Erkennung durch die Auswertesoftware notwendig war. Dazu wurde der fernrot-fluoreszierende Farbstoff HCS LipidTOX™ Deep Red Neutral Lipid Stain (Invitrogen), im Weiteren LipidTOX™ Deep Red genannt, genutzt.

Für die Mikroskopie wurden drei Tage alte Nematoden (Ansatz in 8-Well-Platten) in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt, zweimal mit ca. 10 ml kaltem M9-Puffer (4 °C) gewaschen (1300 g, 2 min, 4 °C) und mit 2 ml *Modified Ruvkun's Witches Brew (MRWB)*-Pufferlösung (*MRWB*-Puffer + 2 % Paraformaldehyd) für 1,5 h bei RT auf einem Schüttler fixiert. Es folgten drei Waschschrte mit 10 ml kaltem M9-Puffer (4 °C) (Zentrifugation bei 1300 g, 2 min, 4 °C) und anschließender Färbung mit LipidTOX™ Deep Red (1:1000 in M9-Puffer). Die Färbemethode wurde in vorangegangenen Arbeiten in der Arbeitsgruppe bereits etabliert und optimiert. Bei nicht sofortiger Bild-Aufnahme konnten die Nematoden in der Färbelösung über mehrere Monate unter Lichtausschluss bei 4 °C gelagert werden. Für die Größenbestimmung wurden die Nematoden in einer 384-Well-Platte im Opera Phenix aufgenommen (siehe 3.2.4). Für die Analyse der LD wurden Nematoden auf einen mit einem Abstandshalter (*SecureSeal™ imaging spacers*, 9 × 0,12 mm) präparierten *High precision*-Deckglas pipettiert und die Flüssigkeit vorsichtig mit einem Präzisionswischtuch (Kimtech Science) vollständig abgesaugt. 5 %-ige Agarose (*SeaPlaque® GTG®* Agarose in ddH<sub>2</sub>O) wurde in einem Heizblock auf 65 °C geheizt und anschließend für die

Verwendung auf 40°C temperiert. Die Nematoden wurden durch Zugabe von 10 µl der temperierten 5 %-igen Agarose eingebettet und durch ein Deckglas eingeschlossen. Es folgte eine Aufnahme des anterioren Bereich des Darms (die ersten 4 – 6 Darmzellen direkt hinter dem Pharynx) mit dem 63x-Öl-Objektiv (NA = 1,4) des Airy Scan LSM 880 Mikroskops (Zeiss). Pro Versuch und Kondition wurden zehn Nematoden mit einem Ebenenabstand von 380 nm in DIC bei  $\lambda_{\text{Ex}} = 488 \text{ nm}$  /  $\lambda_{\text{Em}} = 545 \text{ nm}$  (grüner Kanal) und bei  $\lambda_{\text{Ex}} = 633 \text{ nm}$  /  $\lambda_{\text{Em}} = 692 \text{ nm}$  (fernroter Kanal) aufgenommen. Mit Hilfe des Programms Imaris x.64 (Version 9.8.0) (Oxford Instruments) wurde eine maximale Projektion aller Ebenen für die 3D-Analyse erstellt. Um die Bildqualität für die LD-Auswertung möglichst zu optimieren wurden die Aufnahmen prozessiert, wobei im grünen Kanal eine Hintergrundsubtraktion mit einer Filterbreite von 5,00 µm und ein Gauß-Filter mit einem Wert von 0,07 µm verwendet wurden. Im fernroten Kanal erfolgte eine Einstellung der Hintergrundsubtraktion auf 5,00 µm. Pro Nematode wurden anschließend zufällig drei Quader ( $100 \times 100 \times 25 \text{ Pixel} = 698 \text{ µm}^3$ ) in den Darmabschnitt direkt hinter dem Pharynx gelegt und die Anzahl der LD sowie die Volumina aller LD (in  $\text{µm}^3$ ) in diesen definierten Quadern bestimmt. Die Summe der LD-Volumina wurde durch die Multiplikation der mittleren LD-Volumina mit der mittleren LD-Anzahl pro Quader berechnet. Für die jeweilig bestimmten Parameter der drei ausgewerteten Quader wurde anschließend ebenfalls der Mittelwert gebildet. Für die Auswertung wurde für die Aufnahmen eine doppelte Verblindung vorgenommen.

### 3.3.2 Fettsäure-Analyse mittels GC-MS

Gaschromatographie-gekoppelte Massenspektrometrie (GC-MS) ist ein Verfahren der analytischen Chemie, welches die physikalischen Trennfähigkeiten der Gaschromatographie mit den Massenanalysefähigkeiten der Massenspektrometrie kombiniert (McLafferty, 1957, Quehenberger *et al.*, 2011). Das Verfahren zeichnet sich durch besonders hohe Sensitivität und Spezifität aus und wird in der Analytik angewendet, um Einzelkomponenten in Gemischen zu identifizieren und zu quantifizieren (Quehenberger *et al.*, 2011). Für die Analyse der Fettsäuren in *C. elegans* und den Eiern mit dieser Methode wurden Wildtypen mit entsprechender Futtermenge in 25 cm<sup>2</sup>-ZKF bei 20 °C kultiviert. Am Tag 3 wurden die graviden<sup>7</sup> Nematoden in je 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt, zweifach mit kaltem M9 Puffer (4 °C) und zweifach mit kaltem ddH<sub>2</sub>O (4 °C) gewaschen (2 min, 1300 g, 4 °C). Vor der letzten Zentrifugation (2 min, 1300 g, 4 °C) wurden die Nematoden in 10 ml Duran-Präparatengläser (Ø 16 x 100 mm, Glasgerätebau Ochs) überführt und der Überstand nach der Zentrifugation vollständig abgesaugt. Die Nematodenpellets wurden zur Vorbereitung der Analyse bei -80 °C eingefroren. Analog erfolgte auch das Einfrieren der Nematodeneier, die vor den Waschschritten mittels der *egg prep.* aus den Nematoden isoliert wurden (siehe 3.2.1.2.3). Die FS-

---

<sup>7</sup> schwanger, einen Embryo in sich tragend

Gehalte und -muster wurden in drei Tage alten Nematoden sowie in den Eiern gemessen. Für die Nematodenproben waren mindestens 4000 Nematoden und für die Eier-Proben 8000 Nematoden notwendig. Die Anzahl der Nematoden bzw. Eier in den Proben wurde durch die Auszählung von fünf 20 µl (für die Nematoden) oder fünf 5 µl Tropfen (für die Eier) vor dem Einfrieren noch einmal bestimmt. Für einen unabhängigen Versuch wurden jeweils Triplikate für die Bestimmung der Gesamtlipide und der Fettsäuren angesetzt. Zusätzlich wurden separat 2x 500 µl der eingesetzten OP50-Bakterien pelletiert (15 min, 4000 rpm, 4° C) und für die FS-Messung ebenfalls bei -80 °C eingefroren.

Die Durchführung der Kultivierung sowie anschließender Messungen erfolgten vollständig durch PD Dr. Ralph Menzel (Humboldt Universität zu Berlin, HUB) und in Zusammenarbeit mit der HUB. Die Aufarbeitung der Proben und GC-MS-Analysen wurden von Rainer Nehring (Technischer Assistent an der HUB) nach dem Standardprotokoll der Arbeitsgruppe durchgeführt (Menzel *et al.*, 2018).

### 3.4 Orlistatbehandlung

Das Testsystem mit „mageren“ (mit 1x OP50 gefüttert) und „fetten“ Nematoden (mit 4x OP50 gefüttert) wurde für eine Substanztestung mit dem anti-diabetischen Pharmakon Orlistat verwendet. Orlistat ist ein selektiver und kompetitiver Lipasehemmer, der die Spaltung von Triglyceriden in Fettsäuren und Glycerol verhindert (Guerciolini, 1997, Ballinger und Peikin, 2002). Wildtypen oder LIU1-Nematoden wurden ab dem L1-Stadium für drei Tage in ZKF oder 8-Well-Platten bei 20 °C kultiviert. Das Kultivierungsmedium mit OP50-Futterbakterien wurde mit Orlistat (Sigma-Aldrich) oder der Lösungsmittelkontrolle Dimethylsulfoxid (DMSO) (Sigma-Aldrich) angereichert. DMSO wird häufig als Lösungsmittel in *in vivo*- und *in vitro*-Systemen zur Applikation und Gewährleistung der chemischen Stabilität von Substanzen verwendet, da einige Substanzen nur eine geringe Wasserlöslichkeit aufweisen (Cheng *et al.* 2003, Santos *et al.*, 2003). In mehreren Studien lösten DMSO-Konzentrationen ab 0,5 % diverse Wirkungen in *C. elegans* aus, die sich phänotypisch bspw. durch eine beeinträchtigte Beweglichkeit, verringerte pharyngeale Aktivität, Ausbildungen interner, membranartiger Einschlüsse und eine reduzierte Fruchtbarkeit und Nachkommenzahl oder auch einer verlängerten Lebensspanne ausprägten (Goldstein und Magnano, 1988, Boyd *et al.*, 2010, Wang *et al.*, 2010, Solis und Petrascheck, 2011, Frankowski *et al.*, 2013, Calahorro *et al.*, 2021).

Im ersten Schritt wurden daher der Effekt von DMSO auf die untersuchten Parameter Körpergröße, Anzahl der intrauterinen Eier und Triglyceridgehalt der Nematoden geprüft. Die getesteten DMSO-Konzentrationen lagen dabei zwischen 0,1 % und 2 % DMSO. Im zweiten Schritt erfolgte die Substanztestung mit 10 µM Orlistat und 0,2 % DMSO als Kontrolle. Die bestimmten Parameter umfassten die Messung der Körpergrößen, die Nile Red-Fluoreszenzintensitäten, die Triglyceridgehalte und die LD-Größe und -Dichte in adulten Nematoden. Die Gesamtfettsäuregehalte sowie FS-Muster wurden auch in diesem Versuch sowohl in adulten Nematoden, als auch in den Eiern in Triplikaten gemessen.

### 3.5 Mehrgenerationale Studien

Im letzten Teil der Arbeit wurde die Weitergabe der Fettmetabolismus-assoziierten Effekte durch unterschiedliche Futtermengengaben der Elterngeneration an die Folgegenerationen untersucht. Die Bestimmung des Fettgehalts von drei Tage alten Wildtypen erfolgte ausschließlich über den Triglycerid-Assay. Die Auswahl der Futtermenge für die mehrgenerationalen Versuche wurde auf 1x OP50 und 4x OP50 festgelegt. Für die Prüfung auf mehrgenerationale Effekte wurden Ausgangsnematoden genommen, die nach der Überführung aus der Agarplattenkultivierung über mindestens fünf Generationen 1x OP50 erhielten. Es wurden unterschiedliche Szenarien untersucht: die multigenerationale und die intergenerationale Effektvererbung.

Für die multigenerationalen Effektstudien wurde die parentale Generation P0 entweder mit 1x OP50 oder mit 4x OP50 gefüttert. Die Folgegenerationen der P0-Generationen (F1 – F3 bzw. F1 – F4) erhielten kontinuierlich jeweils die Futtermenge, die auch ihre jeweilige parentale Generation bekam.

Für die Studie auf intergenerationaler Ebene erhielt die parentale Generation (P0) entweder 1x OP50 oder 4x OP50, die jeweiligen F1-Generationen wurden wiederum entweder mit 1x OP50 oder 4x OP50 gefüttert, sodass in beiden Fällen die Nachkommen die gleiche oder die gegensätzliche Futtermenge wie P0 erhielten (*rechallenge*). Zur Veranschaulichung sind die Expositionsszenarien in Abbildung 11 vereinfacht dargestellt.

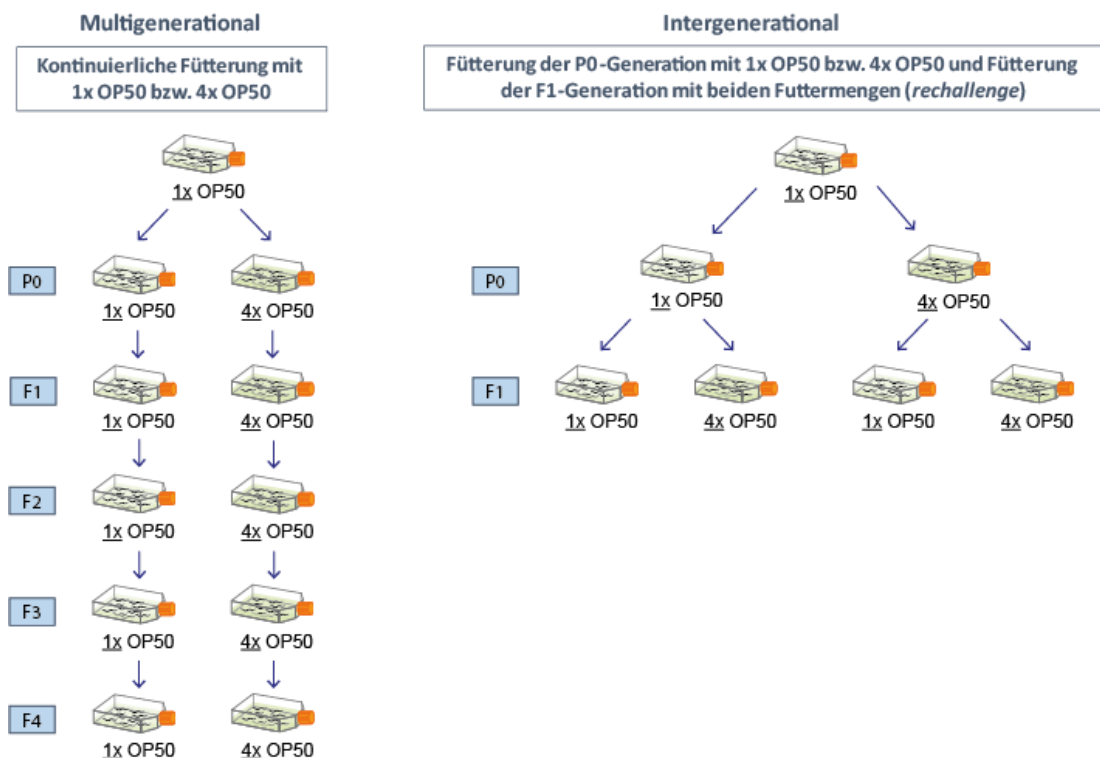


Abbildung 11: Schematische Darstellung der multi- und intergenerationalen Expositionsszenarien.

### 3.6 Statistische Analysen

Die normalverteilten Daten der Körpergrößen, mittleren Fluoreszenzintensitäten, Gesamtfettsäuregehalte sowie Triglyceridgehalte (und zugehörige Gesamtglycerol und freie Glycerolmengen) wurden über einen t-Test für unverbundene Stichproben (Mann Whitney U-Test,  $p \leq 0,05$ ) analysiert. Für den Vergleich von mehreren Gruppen wurde die ANOVA für normalverteilte, unverbundene Stichproben angewandt (Kruskal Wallis-Test,  $p \leq 0,05$ ).

Die Unterschiede in den Fettsäuregruppen unterschiedlich gefütterter Nematoden bzw. der Eier unterschiedlich gefütterter Nematoden wurden mit einem multiplen t-Test für unverbundene Stichproben bestimmt. Es erfolgte eine anschließende Korrektur für multiple Vergleiche über die Holm-Sidak-Methode. Die Statistikberechnungen und Diagrammdarstellungen erfolgten mit dem Programm Graphpad Prism (GraphPad Software Inc.).

Die Daten aus den mehrgenerationalen Versuchen wurden in einem anderen statistischen Modell mit Berücksichtigung der Generation analysiert (Statistik von Matthias Steinfarth, BfR). Dazu diente ein lineares gemischtes Modell, für die die Funktion *lme* aus dem R-Package *nlme* verwendet wurde:

$$y \sim \text{Futtermenge} + \text{Tag des Experiments} * \text{Generation} + \varepsilon$$

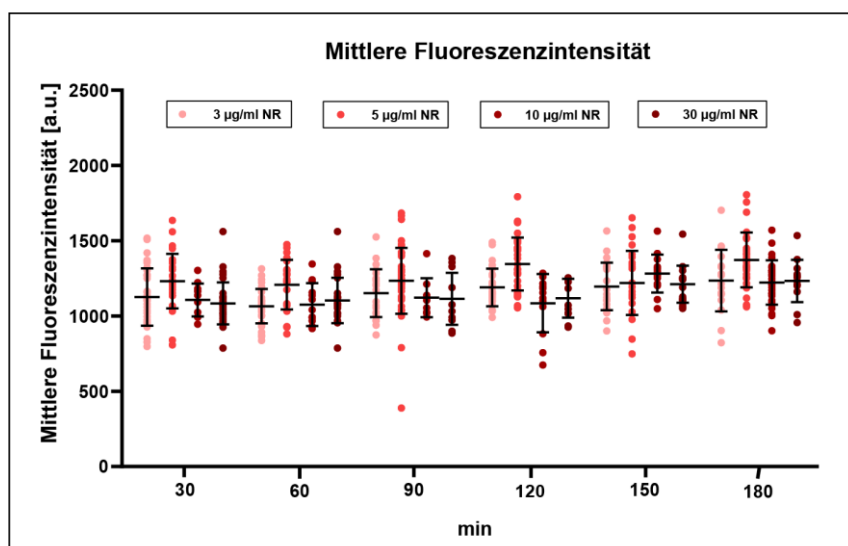
Die Futtermenge wurde als fester Effekt und die Kombination von Tag des Experiments und Generation als zufälliger, normalverteilter Effekt angesehen.  $\varepsilon$  repräsentiert die technische Störung. Die Signifikanzgrenze wurde für die bedingten t-Tests bei  $p \leq 0,05$  gesetzt.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Fettfärbung in *C. elegans* mit Nile Red

#### 4.1.1 Optimierung der Konzentration und Inkubationsdauer des Fixierungsmediums und der Nile Red-Färbelösung

Nile Red (NR) ist ein gängiger Fluoreszenzfarbstoff, der für den Nachweis von lipophilen Strukturen in der Zellbiologie Verwendung findet und über die Jahre an großer Beliebtheit zur Ganzkörperfärbung von Modellorganismen, wie *C. elegans*, gewann, um Fettmetabolismus-assoziierte Studien durchzuführen (Greenspan *et al.*, 1985, Ashrafi *et al.*, 2003, Wang *et al.*, 2008, Elle *et al.*, 2010, Pino *et al.*, 2013, Mari *et al.*, 2015, Escorcía *et al.*, 2018). Aufgrund der einfachen und häufigen Anwendung wurde NR auch in dieser Studie für die quantitative Messung des Fettgehalts in *C. elegans* genutzt. Die Durchführung der Methode wird in der Literatur sehr uneinheitlich beschrieben, weswegen die Färbemethode zunächst etabliert und optimiert wurde. Die in der Literatur beschriebenen Konzentrationen variieren zwischen 40 – 60 % Isopropanol und die Inkubationszeiten zwischen 3 min – 30 min (Brooks *et al.*, 2009, Soukas *et al.*, 2009, Pino *et al.*, 2013, Hobro und Smith, 2017, Escorcía *et al.*, 2018, Stuhr und Curran, 2020). Neben dem Fixierungsmittel wurden auch diverse NR-Konzentrationen zwischen 25 ng/ml – 1 g/ml und Inkubationszeiten zwischen 30 min – 120 min oder sogar über Nacht beschrieben, wobei die am häufigsten eingesetzte Konzentration 3 µg/ml NR betrug (Mak *et al.*, 2006, Zhang *et al.*, 2010a, Pino *et al.*, 2013, Wahlby *et al.*, 2014, Ramírez-Castrillón *et al.*, 2021). Basierend auf diesen Daten wurde Isopropanol in den Konzentrationen 20 %, 40 %, 60 %, 80 % und 85 % getestet. Die mikroskopische Beobachtung zeigte eine effektive Fixierung der Nematoden mit Konzentrationen > 40 % Isopropanol nach bereits fünf Minuten. Anschließend zur Fixierung wurde die Qualität der Färbung mit der gängigen Konzentration von 3 µg/ml NR in 40 %-igem Isopropanol überprüft und zusätzlich höhere Konzentrationen, im Einzelnen 5, 10 und 30 µg/ml NR in 40 %-igem Isopropanol, getestet. Die Ergebnisse zeigten weder für die unterschiedlichen NR-Konzentrationen, noch für die unterschiedlichen Inkubationszeiten von 30, 60, 90, 120, 150 oder 180 min Unterschiede in der Stärke der anschließend gemessenen Fluoreszenzsignale (Diagramm 1).



**Diagramm 1: Fluoreszenzintensitäten fixierter, adulter *C. elegans*-Wildtypen (N2) abhängig von der Nile Red-Konzentration und -Inkubationsdauer.**

L1-Larven wurden mit 1x OP50 für drei Tage gefüttert und anschließend mit Isopropanol fixiert und mit unterschiedlichen Nile Red (NR)-Konzentrationen über unterschiedliche Inkubationszeiten gefärbt. Die Bild-Aufnahme erfolgte mit dem 5x-Luft-Objektiv (NA = 0,16) des Opera Phenix (PerkinElmer) in einer Ebene bei  $\lambda_{\text{Ex}} = 522 \text{ nm}$ /  $\lambda_{\text{Em}} = 488 \text{ nm}$ . Die anschließende automatisierte Auswertung erfolgte mit der Software Harmony (PerkinElmer). Die dargestellten Datenpunkte repräsentieren jeweils die mittlere Fluoreszenzintensität pro Nematode (Körperfläche) aus einem Versuch (N = 20 – 34 Nematoden) und sind angegeben in *arbitrary units* (a. u.). Statistik: Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung, Kruskal Wallis-Test, \*p  $\leq$  0,05.

Bei näherer Betrachtung der Bild-Aufnahmen der Nematoden fiel auf, dass die Eier in den Nematoden, die ebenfalls Fette enthalten, unterschiedlich starke oder gar keine Fluoreszenzsignale aufwiesen. Repräsentativ ist die variable Färbung der Eier nach der NR-Färbung anhand der Fluoreszenzaufnahme in Abbildung 12 gezeigt. Um eine ausreichende Fixierungsdauer für die Zugänglichkeit des Farbstoffs zu gewährleisten, wurde die Inkubationszeit von Isopropanol in Zusammenhang mit der NR-Färbung nochmals untersucht. Eine Verlängerung der Inkubationszeit von bis zu 120 min ergab jedoch keine Veränderung in der Fluoreszenzintensität der Eier. Zwei weitere Replikate ergaben ein ähnliches Ergebnis (nicht gezeigt). Basierend auf diesen Resultaten und den in der Literatur häufig angegebenen Fixierungszeiten wurde die Färbemethode für weiterführende Untersuchungen auf eine 40 %-ige Isopropanol-Fixierung für 15 min festgelegt und die Färbung mit 3 µg/ml NR-Färbelösung auf 30 min verkürzt.





**Abbildung 12: Variable Färbung der Eier in einem Nile Red-gefärbten adulten *C. elegans*-Wildtypen (N2).** Dargestellt ist ein adulter Nematode (mit 1x OP50 gefüttert) mit variabel gefärbten Eiern nach einer 120-minütigen Isopropanol-Fixierung (40 % Isopropanol) und einer 30-minütigen Nile Red (NR)-Färbung (3  $\mu\text{g/ml}$  NR in 40% Isopropanol). Die Pfeile indizieren die unterschiedlich stark gefärbten Eier im Nematoden. Die Bild-Aufnahme erfolgte mit dem 63x-Wasser-Objektiv (NA = 1,15) des Opera Phenix (PerkinElmer) in einer Ebene bei  $\lambda_{\text{Ex}} = 522 \text{ nm}$  /  $\lambda_{\text{Em}} = 488 \text{ nm}$ .

#### 4.1.2 Etablierung von Positivkontrollen für die Fettbestimmung in *C. elegans*

##### 4.1.2.1 Unspezifischer Fettphänotyp der Deletionsmutanten *daf-2* und *eat-2* in der Flüssigkulturhaltung

Als Kontrolle für die NR-Färbung als Methode zur quantitativen Fettgehaltsbestimmung in *C. elegans* sollten die zwei Deletionsmutantenstämme *daf-2* (*e1370*) und *eat-2* (*ad465*) dienen, die im Vergleich zum Wildtypen (N2), im Weiteren nur Wildtyp genannt, einen entsprechend erhöhten (*daf-2*) bzw. verringerten (*eat-2*) Fettgehalt aufweisen (Avery, 1993, Brooks *et al.*, 2009, O'Rourke *et al.*, 2009, Bar *et al.*, 2016). Diese zwei charakteristischen Fettphänotypen der Deletionsmutanten sollten mit der NR-Färbemethode als Kontrollen identifiziert werden.

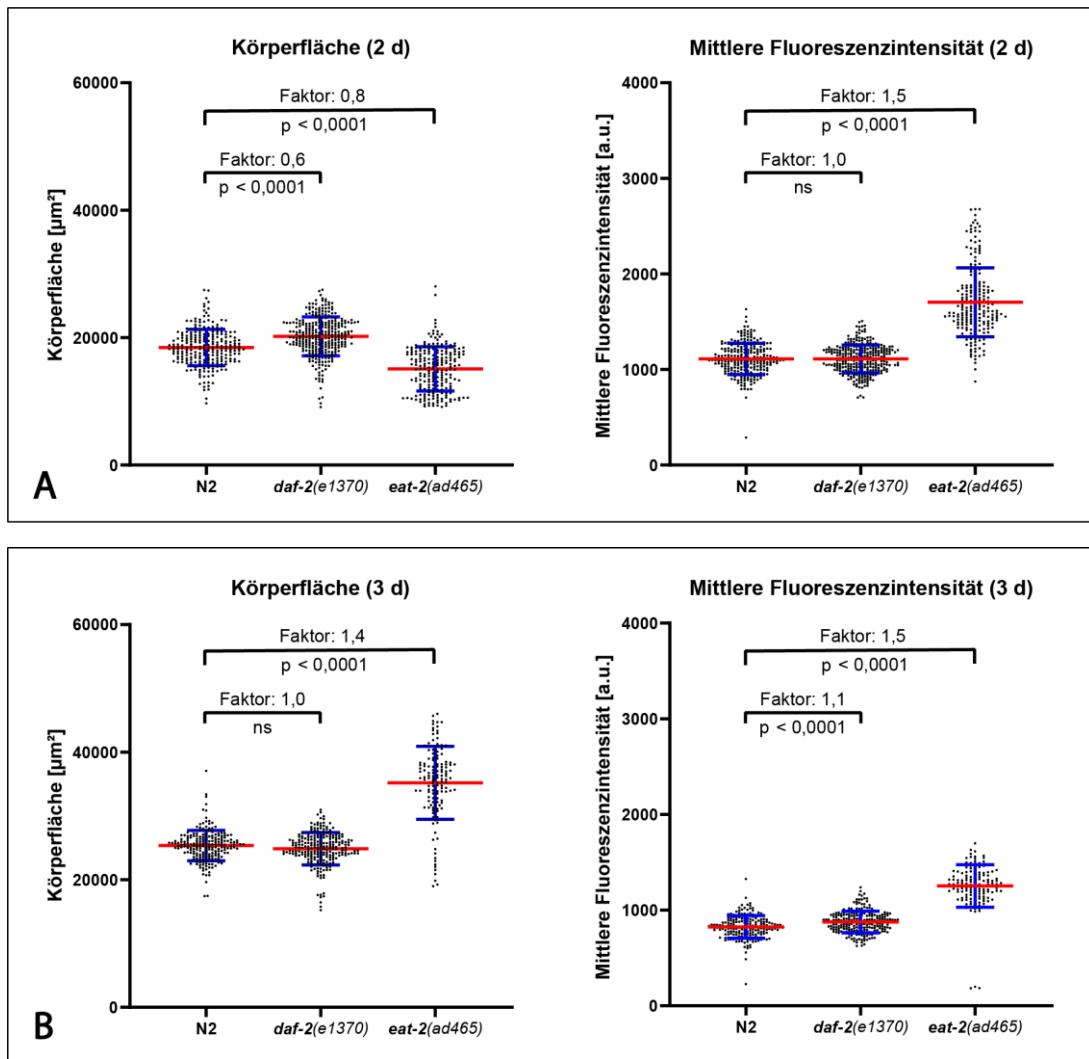
Bei der mikroskopischen Betrachtung der Nematoden fiel bereits auf, dass *daf-2*-defiziente Nematoden verglichen zum Wildtyp nach drei Tagen in Flüssigkultur nicht adult waren, sondern lediglich das L4/Jungadult-Stadium erreichten. *Eat-2*-defiziente Nematoden hingegen, die einen verringerten Fettgehalt aufweisen sollten, waren nach drei Tagen adult, zeigten in Durchlicht-Aufnahmen einen dunkleren erscheinenden Darm und trugen deutlich mehr Eier als die Wildtypen. Ein linearer Zusammenhang zwischen einem dunkler erscheinenden Darm unter der Durchlichtbeleuchtung und dem Fettgehalt der Nematoden wurde in einigen Studien beschrieben (Kenyon *et al.*, 1993, Apfeld und Kenyon, 1998, McKay *et al.*, 2003, Avery und You, 2012). Unter dieser Annahme deuteten die mikroskopischen Beobachtungen auf gegensätzliche Fettphänotypen der Deletionsmutanten hin, die durch repräsentative Durchlicht-Aufnahmen (ZOE™ Fluorescent Imager) in Abbildung 13 verdeutlicht werden. Darüber hinaus ist anzumerken, dass die Wildtypen nach dreitägiger Kultivierung Eier im Komma- oder Bretzelstadium aufwiesen (Abbildung 13).



**Abbildung 13: Durchlicht-Aufnahmen von drei Tage alten *C. elegans*-Wildtypen (N2), *daf-2* (e1370)- und *eat-2* (ad465)-Deletionsmutanten.**

L1-Larven wurden mit 1x OP50 für drei Tage gefüttert. Abgebildet sind repräsentative Aufnahmen des Wildtyps und der Deletionsmutanten, die Unterschiede im Entwicklungsstadium (Nematoden und Eier) und im Erscheinungsbild des Darms verdeutlichen. Die Durchlicht-Aufnahmen erfolgten am ZOE™ Fluorescent Imager (20x/0,4-Objektiv, 175x-Vergrößerung) (Bio-Rad).

Die anschließende Überprüfung der Fettgehalte mit der NR-Färbung wurde sowohl für zwei Tage (2 d) als auch drei Tage (3 d) alte Nematoden im Hochdurchsatzsystem (Opera Phenix) durchgeführt, welches zusätzlich die Messung der Körperfläche erlaubte. Nach zwei Tagen wiesen *daf-2*-defiziente Nematoden eine signifikant größere ( $20195 \pm 3054 \mu\text{m}^2$ ) und *eat-2*-defiziente Nematoden eine signifikant kleinere Körperfläche ( $15086 \pm 3478 \mu\text{m}^2$ ) im Vergleich zu den Wildtypen ( $18451 \pm 2850 \mu\text{m}^2$ ) auf (Diagramm 2 A). Anhand der Fluoreszenzintensitäten nach der NR-Färbung konnte kein signifikanter Unterschied im Fettgehalt zwischen *daf-2*-defizienten Nematoden und den Wildtypen nachgewiesen werden, in *eat-2*-defizienten Nematoden hingegen zeigte sich ein erhöhter Fettgehalt mit Fluoreszenzwerten von  $1704 \pm 360$  arbitrary units (a. u., im Deutschen „willkürliche Einheit“) im Gegensatz zu  $1111 \pm 164$  a. u. der Wildtypen (Diagramm 2 A). Am dritten Tag war zwischen *daf-2*-defizienten Nematoden und den Wildtypen kein Unterschied mehr in der Körperfläche zu beobachten, der Fettgehalt in *daf-2*-defizienten Nematoden war marginal, aber signifikant höher als in den Wildtypen (Diagramm 2 B). Der Vergleich der beiden *C. elegans*-Stämme nach dreitägiger Fütterung ist jedoch kritisch zu betrachten, da aufgrund der auftretenden Entwicklungsverzögerung, *daf-2*-defiziente Nematoden im Gegensatz zu den Wildtypen nicht adult waren (siehe Abbildung 13). Der erhöhte Fettgehalt von *eat-2*-defizienten Nematoden, der bereits nach zwei Tagen beobachtet wurde, war auch nach drei Tagen noch ersichtlich und ging zusätzlich mit einer erhöhten Körperfläche einher. Diese waren von *eat-2*-defizienten Nematoden nach drei Tagen signifikant höher ( $35190 \pm 5718 \mu\text{m}^2$ ) als die der Wildtypen ( $25358 \pm 2396 \mu\text{m}^2$ ), mit entsprechenden Fluoreszenzwerten von  $1253 \pm 223$  a. u. (*eat-2*-defiziente Nematoden) und  $824 \pm 118$  a. u. (Wildtyp). Die Vergrößerung der Körperflächen resultierte u. a. aus einer erhöhten Eizahl der Nematoden, die in den Durchlicht-Aufnahmen (ZOE™ Fluorescent Imager) bereits beobachtet wurde (Diagramm 2 B). Durch die auftretende Retardierung in *daf-2*-defizienten Nematoden und der Fettphänotypen beider Deletionsmutanten, die sich in der Flüssigkulturhaltung ausprägten und sich von den in der Literatur beschriebenen Fettphänotypen deutlich unterschieden, konnten die Deletionsstämme für weitere Untersuchungen des Fettgehalts in *C. elegans* nicht verwendet werden.



**Diagramm 2:** Körperflächen und Fettgehalte von zwei und drei Tage alten *C. elegans*-Wildtypen (N2), *daf-2* (e1370)- und *eat-2* (ad465)-Deletionsmutanten.

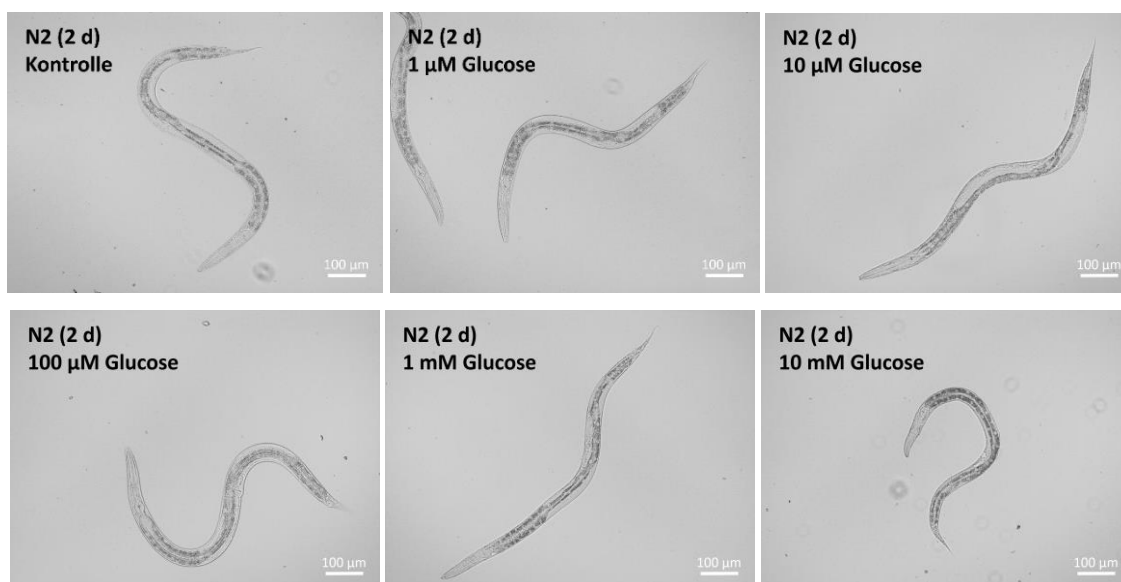
L1-Larven wurden mit 1x OP50 für zwei (A) oder drei Tage (B) gefüttert. Nach der Nile Red-Färbung von fixierten Nematoden erfolgte die Bild-Aufnahme mit dem 5x-Luft-Objektiv (NA = 0,16) des Opera Phenix (PerkinElmer) in einer Ebene bei  $\lambda_{Ex} = 522 \text{ nm}$  /  $\lambda_{Em} = 488 \text{ nm}$ . Die anschließende automatisierte Auswertung erfolgte mit der Software Harmony (PerkinElmer). Die dargestellten Datenpunkte repräsentieren jeweils die Körperfläche pro Nematode und die mittlere Fluoreszenzintensität pro Nematode (Körperfläche), angegeben in *arbitrary units* (a.u.), aus einem Versuch (A: N = 218 – 305 Nematoden, B: N = 124 – 232 Nematoden). Statistik: Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen, Mann Whitney U-Test, \* $p \leq 0,05$ , ns = nicht signifikant.

#### 4.1.2.2 Glucose-induzierte Fettgehaltserhöhung und Retardierung in *C. elegans*

Als alternative Positivkontrolle zu den Deletionsmutanten wurden die Wildtypen zusätzlich zu den Futterbakterien mit Glucose gefüttert, mit dem Ziel einen erhöhten Fettgehalt zu induzieren. In unterschiedlichen Studien konnte bereits gezeigt werden, dass Glucose-behandelte Wildtypen einen höheren Fettgehalt aufwiesen (Zhu *et al.*, 2010, Garcia *et al.*, 2015, Mejia-Martinez *et al.*, 2017, Alcántar-Fernández *et al.*, 2018, Seo *et al.*, 2018, Lin *et al.*, 2019). Diese Studien basierten auf der Kultivierung der Nematoden auf OP50-bestrichenen Agarplatten, die mit Glucose supplementiert waren. Die Reproduzierbarkeit der beschriebenen Glucose-Effekte in *C. elegans* war in dieser Arbeit zunächst in der Flüssigkultur zu zeigen. Die in der Literatur angegebenen

Testkonzentrationen variieren dabei zwischen 5,5 – 555 mM Glucose im NGM-Agar (Schlotterer *et al.*, 2009, Nomura *et al.*, 2010, Tauffenberger *et al.*, 2012, Garcia *et al.*, 2015, Mejia-Martinez *et al.*, 2017, Alcántar-Fernández *et al.*, 2018). Im Rahmen dieser Arbeit wurde jedoch zur Etablierung der Glucose-Fütterung in Flüssigkultur ergänzend ein breiteres Konzentrationsspektrum im Niedrigdosis-Bereich ab 1  $\mu$ M Glucose getestet. Synchronisierte L1-Larven erhielten über den beobachteten Zeitraum von zwei, drei oder vier Tagen 1x OP50 und Glucose-Konzentrationen zwischen 1  $\mu$ M und 100 mM, von denen anschließend die Körperflächen und Fettgehalte mit der NR-Färbemethode bestimmt wurden.

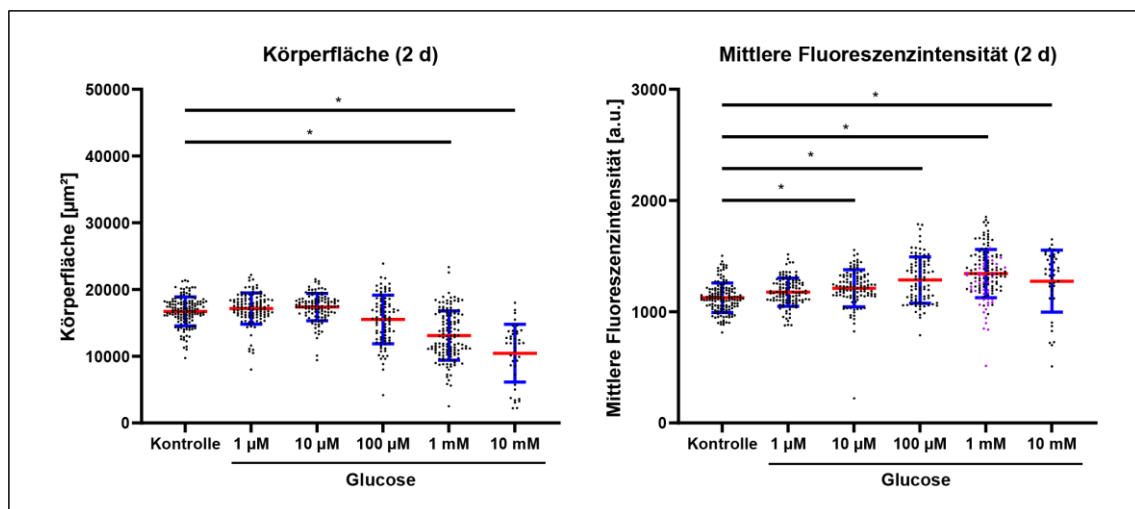
Die im Folgenden aufgeführten Resultate der Glucose-Testung mit unterschiedlichen, aber teilweise überlappenden Konzentrationen wurden individuell dargestellt, da im Rahmen der Etablierungsphase der Färbemethode die mikroskopischen Aufnahmeeinstellungen in den einzelnen Versuchen angepasst wurden, sodass die absoluten Fluoreszenzwerte von mehreren unabhängigen Experimenten nicht zusammengefasst dargestellt werden konnten. Nach zweitägiger Kultivierung der Nematoden mit 1x OP50 und 1  $\mu$ M - 10 mM Glucose, waren die Nematoden mit einer Glucose-Zugabe ab 1 mM deutlich kleiner und hatten unter Durchlichtbeleuchtung einen dunkler erscheinenden Darm als die Kontrollnematoden (mikroskopische Beobachtung, Abbildung 14). Bei mikroskopischer Betrachtung der Gesamtpopulation war bereits zu vermerken, dass die Fütterung von 10 mM Glucose zu einer ausgeprägten asynchronen Entwicklung der Population mit unterschiedlichen Larvenstadien führte, was auf eine verzögerte Entwicklung der Nematoden durch Glucose hindeutete.



**Abbildung 14: Durchlicht-Aufnahmen von *C. elegans*-Wildtypen (N2) nach zweitägiger Glucose-Fütterung.**

L1-Larven wurden mit 1x OP50 und 1  $\mu$ M – 10 mM Glucose für zwei Tage (2 d) gefüttert. Abgebildet sind repräsentative Nematoden der Glucose-Populationen nach zweitägiger Kultivierung. 10 mM Glucose-Nematoden weisen lichtmikroskopisch eine verringerte Körpergröße auf. Die Durchlicht-Aufnahmen erfolgten am ZOE™ Fluorescent Imager (20x/0,4-Objektiv, 175x-Vergrößerung) (Bio-Rad).

Die Aufnahme einer größeren Nematodenzahl im Hochdurchsatzsystem bestätigte die mikroskopisch beobachtete Heterogenität innerhalb der Populationen und zeigte, dass bereits 100  $\mu\text{M}$  Glucose eine hohe Varianz der Körpergröße nach zwei Tagen hervorrief (Diagramm 3). Lediglich 10  $\mu\text{M}$  Glucose verursachten keine Störung im Körperwachstum der Nematoden, führten jedoch zu einer marginalen, aber signifikanten Fetterhöhung (Diagramm 3). Die Anzucht bei zunehmender Glucose-Konzentration brachte jeweils mehr kleine Nematoden und eine breitere Streuung der Entwicklungsstadien innerhalb einer jeweils gleich behandelten Population hervor (Diagramm 3). Die mittlere Körperfläche reduzierte sich von  $16717 \pm 2178 \mu\text{m}^2$  (Kontrolle) auf  $13099 \pm 3689 \mu\text{m}^2$  (1 mM Glucose) bzw. auf  $10448 \pm 4330 \mu\text{m}^2$  (10 mM Glucose) (Diagramm 3). Im Vergleich zur Kontrollpopulation mit synchronisierten L4-Larven, bestand die 1 mM Glucose-gefütterte Population zu ca. 30 % aus L1 – L3-Larven ( $< 11000 \mu\text{m}^2$  Körperfläche), die 10 mM Glucose-gefütterte Population sogar zu ca. 44 % aus L1 – L3-Larven. Unabhängig von den unterschiedlichen Larvenstadien, indizierten tendenziell erhöhte Fluoreszenzsignale nach der NR-Färbung im Mittel höhere Fettgehalte für Nematoden mit einer Glucose-Behandlung ab 10  $\mu\text{M}$  (Diagramm 3).

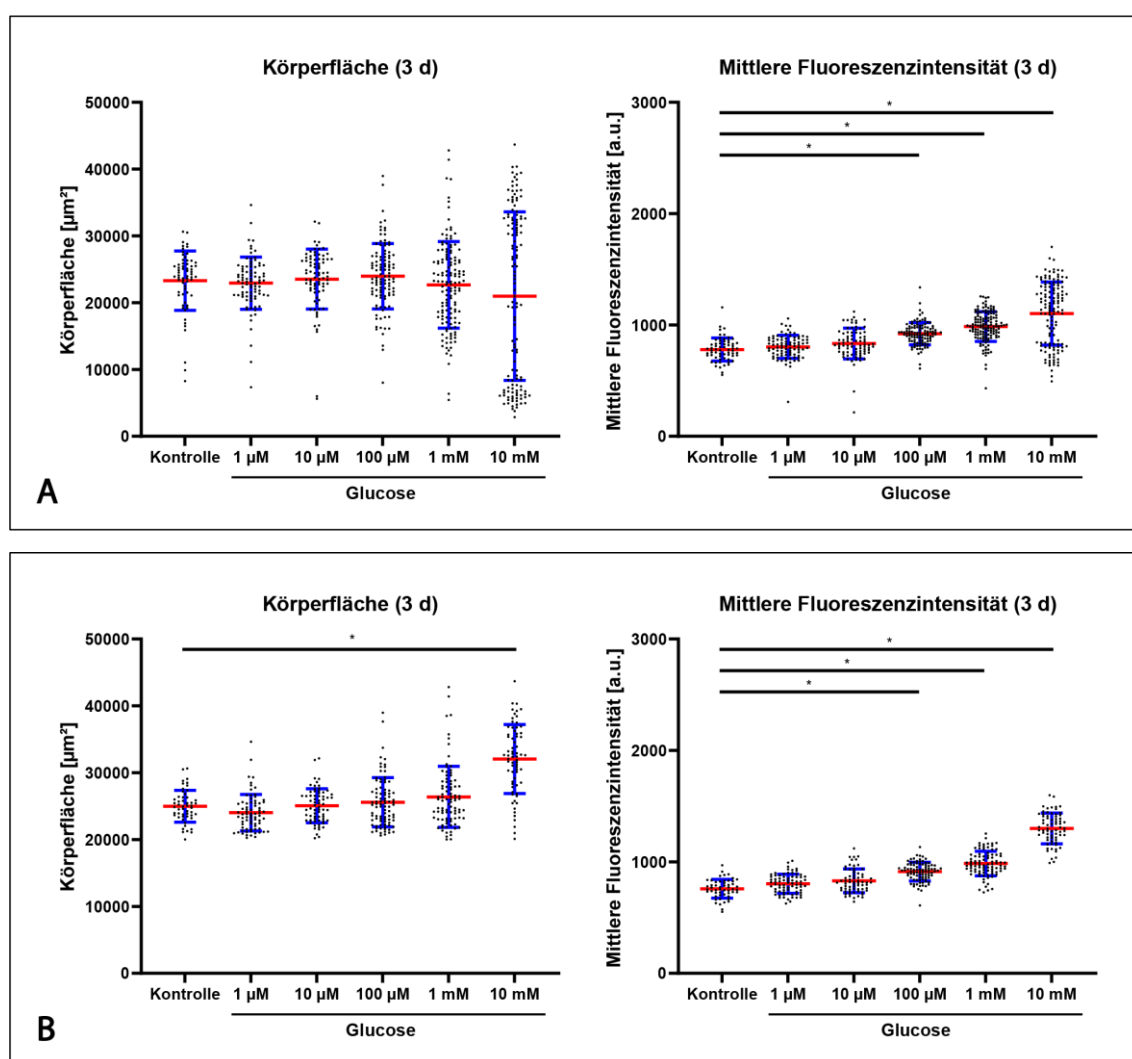


**Diagramm 3: Effekte von Glucose auf die Körperfläche und den Fettgehalt von *C. elegans*-Wildtypen (N2) nach zweitägiger Kultivierung.**

L1-Larven wurden mit  $1 \times \text{OP50}$  und 1  $\mu\text{M}$  – 10 mM Glucose für zwei (2 d) Tage gefüttert. Nach der Nile Red-Färbung von fixierten Nematoden erfolgte die Bild-Aufnahme mit dem 5x-Luft-Objektiv ( $\text{NA} = 0,16$ ) des Opera Phenix (PerkinElmer) in einer Ebene bei  $\lambda_{\text{Ex}} = 522 \text{ nm}$  /  $\lambda_{\text{Em}} = 488 \text{ nm}$ . Die anschließende automatisierte Auswertung erfolgte mit der Software Harmony (PerkinElmer). Die Datenpunkte repräsentieren die Körperfläche pro Nematode und die mittlere Fluoreszenzintensität pro Nematode (Körperfläche), angegeben in *arbitrary units* (a. u.), aus einem Versuch ( $N = 41 - 140$  Nematoden). Statistik: Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen, Kruskal Wallis-Test, \*  $p \leq 0,05$ .

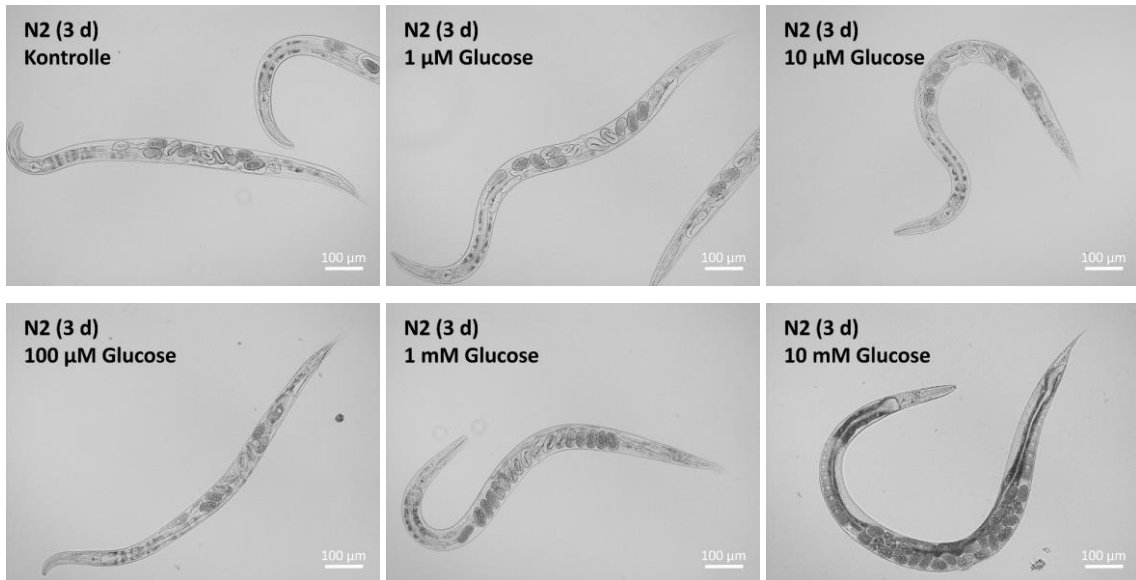
Nach dreitägiger Anzucht im Glucose-angereicherten Flüssigmedium war der Effektunterschied in der Körpergröße erst in 10 mM Glucose-Nematoden zu beobachten (Diagramm 4 A). Trotz insgesamt Retardierung war vor allem eine deutliche Aufspaltung der Gesamtpopulation der mit 10 mM Glucose gefütterten Nematoden in zwei Subpopulationen auffällig, die sich zu 47 % aus nicht-adulten und zu 53 % aus adulten Nematoden (Cut-off bei  $\geq 20000 \mu\text{m}^2$  Körperfläche)

zusammensetzten (Diagramm 4 A). Die Fluoreszenzmessung zeigte auch in drei Tage alten Nematoden mit steigenden Glucose-Konzentrationen ab 100  $\mu\text{M}$  signifikant höhere Signalwerte, mit selektiver Betrachtung der normal-entwickelten Adulten aus der 10 mM Glucose-behandelten Population (Diagramm 4 A). Zur besseren Veranschaulichung der Glucose-induzierten Fetterhöhung sind die Körperflächen und zugehörigen Fluoreszenzwerte der ausschließlich adulten Nematoden im Diagramm 4 B gezeigt. Die Darstellung dieser Nematoden zeigte eine signifikante Zunahme der Fettgehalte ab 100  $\mu\text{M}$  Glucose, welche sich mit 10 mM Glucose mit mittleren Fluoreszenzwerten von  $759 \pm 85$  a. u. (Kontrolle) auf  $1300 \pm 139$  a. u. nahezu verdoppelte (Diagramm 4 B). Repräsentative Aufnahmen von ausschließlich ausgewählten Adulten der jeweiligen Kultivierungskondition sind in Abbildung 15 dargestellt.



**Diagramm 4: Effekte von Glucose auf die Körperfläche und den Fettgehalt von *C. elegans*-Wildtypen (N2) nach dreitägiger Kultivierung.**

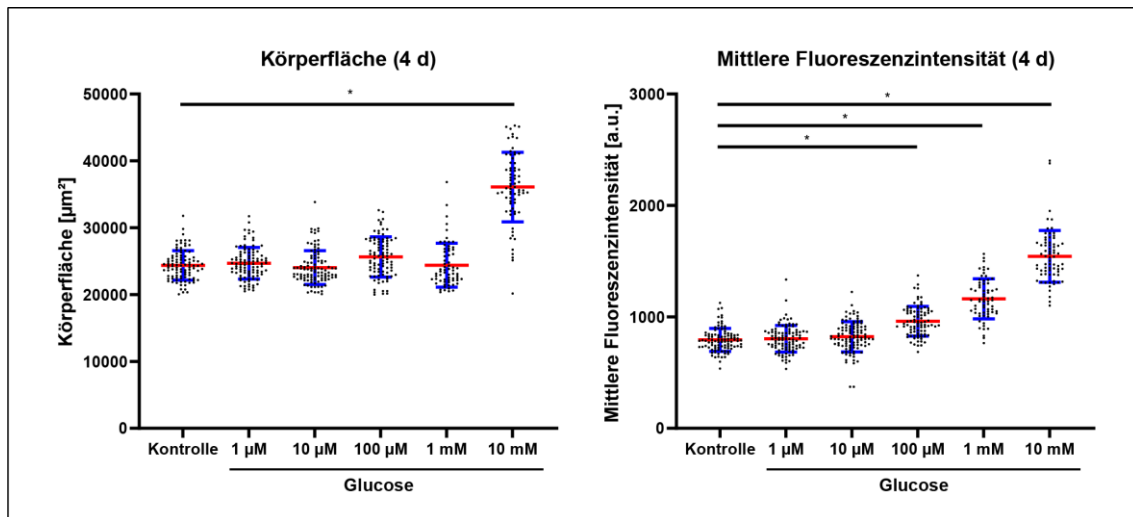
L1-Larven wurden mit 1x OP50 und 1  $\mu\text{M}$  – 10 mM Glucose für drei Tage (3 d) gefüttert. Nach der Nile Red-Färbung von fixierten Nematoden erfolgte die Bild-Aufnahme mit dem 5x-Luft-Objektiv (NA = 0,16) des Opera Phenix (PerkinElmer) in einer Ebene bei  $\lambda_{\text{Ex}} = 522 \text{ nm}$  /  $\lambda_{\text{Em}} = 488 \text{ nm}$ . Die anschließende automatisierte Auswertung erfolgte mit der Software Harmony (PerkinElmer). Die Datenpunkte repräsentieren die Körperfläche pro Nematode und die mittlere Fluoreszenzintensität pro Nematode (Körperfläche), angegeben in arbitrary units (a. u.), der Gesamtpopulation (A) und von selektierten Adulten (Cut-off bei  $\geq 20000 \mu\text{m}^2$  Körperfläche) (B) aus einem Versuch (Gesamtpopulation: N = 64 – 138 Nematoden, selektierte Adulte: N = 52 – 89 Nematoden). Statistik: Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen, Kruskal Wallis-Test, \* $p \leq 0,05$ .



**Abbildung 15: Durchlicht-Aufnahmen von *C. elegans*-Wildtypen (N2) nach dreitägiger Glucose-Fütterung.**

L1-Larven wurden mit 1xOP50 und 1 µM – 10 mM Glucose für drei Tage (3 d) gefüttert. Abgebildet sind repräsentative Glucose-behandelte Nematoden der selektierten, adulten Subpopulation, in denen der Fettgehalt bestimmt wurde. Die Durchlicht-Aufnahmen erfolgten am ZOE™ Fluorescent Imager (20x/0,4-Objektiv, 175x-Vergrößerung) (Bio-Rad).

Weitergehend wurde der Einfluss der Glucose-Supplementierung auf den Fettgehalt der Nematoden auch nach vier Tagen untersucht, um zu überprüfen, ob entwicklungsverzögerte Nematoden am Folgetag das Adultstadium erreichten. Aufgrund des inhibierenden Effektes von Glucose auf die Entwicklung der Nematoden und der entstehenden Mischpopulation, wurden im Weiteren lediglich adulte Nematoden der zuvor dreitägig bzw. viertägig mit Glucose kultivierten Populationen dargestellt. Die Daten der jeweiligen Gesamtpopulationen sind dem Anhang zu entnehmen. Die Anzahl adulter Nematoden in den heterogenen Populationen bei >100 µM Glucose war am Tag 4 zwar höher, jedoch wurden nicht alle Nematoden adult (siehe Anhang). Der Anteil nicht-adulter Nematoden nach dreitägiger Kultivierung mit 10 mM Glucose beispielsweise reduzierte sich am Folgetag von 47 % auf 24 % der Gesamtpopulation (siehe Anhang). Zusätzlich ist anzumerken, dass nach vier Tagen einige, bereits im Kultivierungsmedium geschlüpften L1-Larven der Folgegeneration mit adulten Nematoden überlappten und bei der automatisierten Auswertung der Körperflächen adulter Nematoden miterfasst wurden, sodass die gemessenen Körperflächen möglicherweise geringfügig überschätzt wurden. Da die Überlappung mit geschlüpften L1-Larven gleichermaßen in allen Populationen am vierten Kultivierungstag auftrat, wurde dieser Faktor bei der Auswertung vernachlässigt. Davon abgesehen, zeigten die Adulten nach viertägiger Kultivierung ähnliche Glucose-Effekte wie nach drei Tagen mit signifikanter Zunahme der Körperfläche um das 1,5-fache bei 10 mM Glucose und der Fettgehalte um das 1,2 – 1,9-fache ab 100 µM Glucose (Diagramm 5).

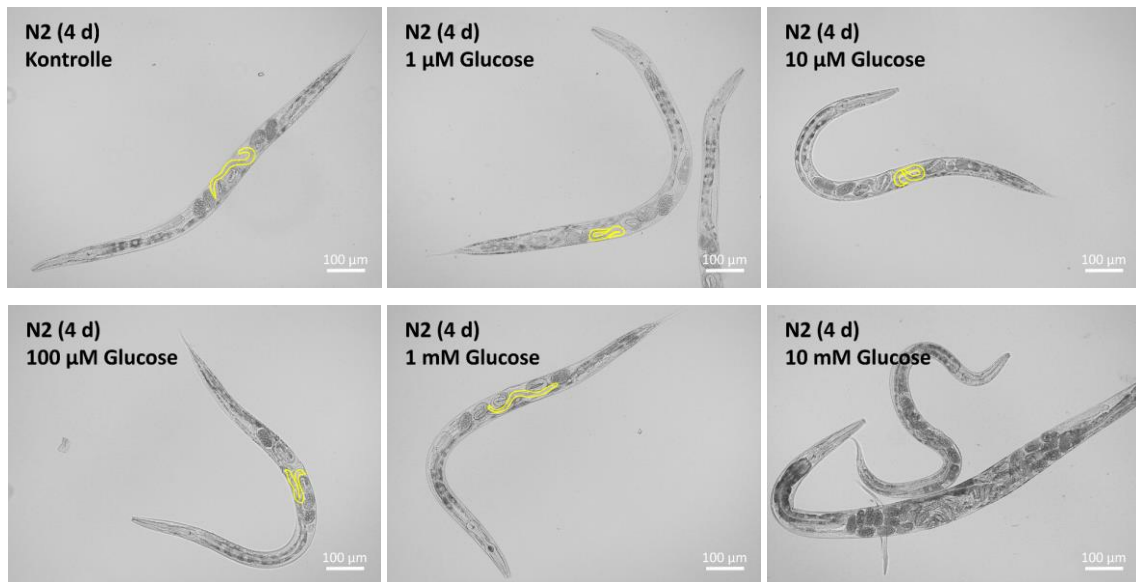


**Diagramm 5: Effekte von Glucose auf die Körperfläche und den Fettgehalt von *C. elegans*-Wildtypen (N2) nach viertägiger Kultivierung.**

L1-Larven wurden mit 1x OP50 und 1 µM – 10 mM Glucose für vier Tage (4 d) gefüttert. Nach der Nile Red-Färbung von fixierten Nematoden erfolgte die Bild-Aufnahme mit dem 5x-Luft-Objektiv (NA = 0,16) des Opera Phenix (PerkinElmer) in einer Ebene bei  $\lambda_{Ex} = 522 \text{ nm}$  /  $\lambda_{Em} = 488 \text{ nm}$ . Die anschließende automatisierte Auswertung erfolgte mit der Software Harmony (PerkinElmer). Die Datenpunkte repräsentieren die Körperfläche pro Nematode und die mittlere Fluoreszenzintensität pro Nematode (Körperfläche), angegeben in *arbitrary units* (a. u.), von selektierten Adulten (Cut-off bei  $\geq 20000 \mu\text{m}^2$  Körperfläche) aus einem Versuch (N = 66 – 103 Nematoden). Statistik: Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen, Kruskal Wallis-Test, \*p  $\leq 0,05$ .

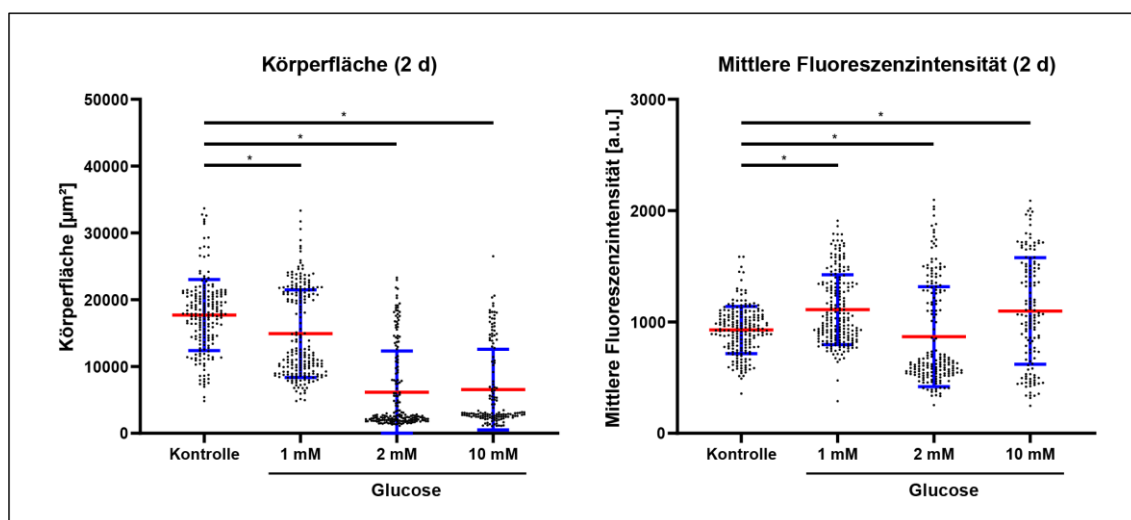
Bei näherer mikroskopischer Betrachtung der vier Tage alten Nematoden anhand von Durchlicht-Aufnahmen (ZOE™ Fluorescent Imager), zeigte sich das Auftreten von BOW durch das vorzeitige Schlüpfen von L1-Larven im Körper einiger Kontrollnematoden, als auch der mit Glucose gefütterten Populationen (1 µM – 1 mM Glucose) (siehe Abbildung 16). In der 10 mM Glucose-Kultur hingegen wiesen die wenigen, zu Adulten entwickelten Nematoden kein BOW auf, jedoch ließen sich in der Kultur zusätzlich zu den retardierten Nematoden auch viele tote Nematoden beobachten (mikroskopische Beobachtung). Zudem konnte in der 10 mM Glucose-Kultur, im Gegensatz zu den anderen Kulturen, weiterhin eine Trübung des Kultivierungsmediums festgestellt werden, die ein Indikator für das Vorhandensein von Bakterien ist, und eine höhere Bakteriendichte indizierte. Da *in utero* geschlüpfte L1-Larven sich von den Nematoden ernähren, sind der Fettgehalt und die Viabilität der Nematoden beeinflusst, weswegen folglich die Betrachtung der Glucose-Effekte auf die Fettgehalte der Nematoden nach viertägiger Kultivierung nicht sinnvoll war.





**Abbildung 16: Durchlicht-Aufnahmen von *C. elegans*-Wildtypen (N2) mit BOW nach viertägiger Glucose-Fütterung.** L1-Larven wurden mit 1x OP50 und 1 µM – 10 mM Glucose für vier Tage (4 d) gefüttert. Abgebildet sind repräsentative Glucose-behandelte Nematoden der jeweiligen adulten Subpopulationen. Adulte, Glucose-behandelte Nematoden wiesen *in utero* geschlüpfte L1-Larven auf, auch als *bag of worms* (BOW) bezeichnet, mit Ausnahme der 10 mM Glucose-behandelten Adulten, die gelb markiert sind. Die Durchlicht-Aufnahmen erfolgten am ZOE™ Fluorescent Imager (20x/0,4-Objektiv, 175x-Vergrößerung) (Bio-Rad).

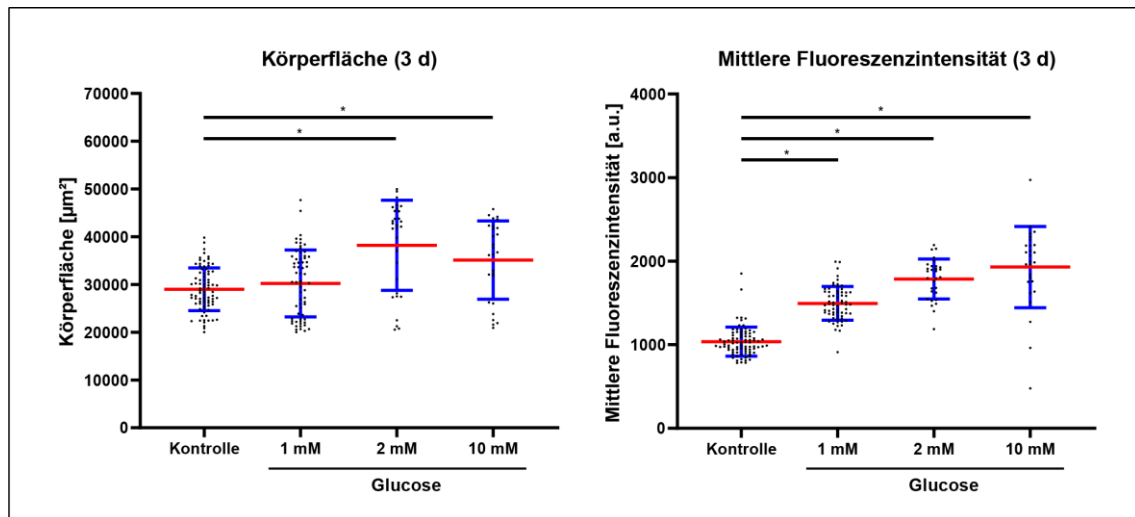
Die Wirkung von Glucose wurde im darauffolgenden Versuch im Hochdosisbereich (Millimolar-Bereich ab 1 mM Glucose) nochmals untersucht, mit Berücksichtigung einer weiteren Konzentration (2 mM Glucose), um die Wirkung im Millimolar-Bereich engermaschiger und die zuvor erhaltenen Ergebnisse auf ihre Reproduzierbarkeit zu prüfen. Die Wachstumsverzögerung, die zuvor nach zweitägiger Kultivierung mit 1 mM Glucose zu einer breiten Streuung der Entwicklungsstadien in der Nematodenpopulation führte, wurde in diesem Versuch weiterhin bestätigt (Diagramm 6). Der Glucose-Effekt prägte sich am zweiten Kultivierungstag durch die Abgrenzung der retardierten Nematoden von den normal-entwickelten Nematoden in zwei deutliche Subpopulationen aus, die zuvor erst bei 10 mM Glucose beobachtet wurde (Diagramm 6 und Diagramm 3). Darüber hinaus führten 2 mM und 10 mM Glucose zu einer massiven Wachstumsinhibierung der Nematoden, sodass sich rund 70 % der Gesamtpopulation noch im L1/L2-Stadium befanden (Cut-off bei  $< 7600 \mu\text{m}^2$  Körperfläche) (Diagramm 6). Durch die resultierende Mischpopulation waren die entsprechenden Fluoreszenzintensitäten der Populationen ebenfalls breit gestreut (Diagramm 6).



**Diagramm 6: Hochdosis-Effekte von Glucose auf die Körperfläche und den Fettgehalt von *C. elegans*-Wildtypen (N2) nach zweitägiger Kultivierung.**

L1-Larven wurden mit 1x OP50 und 1 mM, 2 mM oder 10 mM Glucose für zwei Tage (2 d) gefüttert. Nach der Nile Red-Färbung von fixierten Nematoden erfolgte die Bild-Aufnahme mit dem 5x-Luft-Objektiv (NA = 0,16) des Opera Phenix (PerkinElmer) in einer Ebene bei  $\lambda_{Ex} = 522 \text{ nm}$  /  $\lambda_{Em} = 488 \text{ nm}$ . Die anschließende automatisierte Auswertung erfolgte mit der Software Harmony (PerkinElmer). Die Datenpunkte repräsentieren die Körperfläche pro Nematode und die mittlere Fluoreszenzintensität pro Nematode (Körperfläche), angegeben in *arbitrary units* (a. u.), aus einem Versuch (N = 142 – 214 Nematoden). Statistik: Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen, Kruskal Wallis-Test, \*p  $\leq$  0,05.

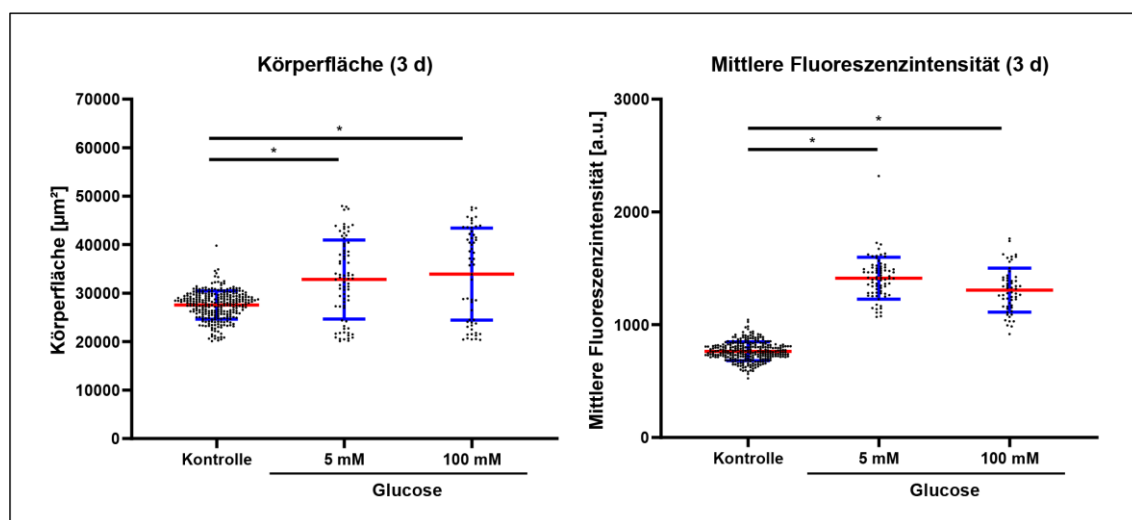
Nach dreitägiger Kultivierung war ähnlich wie im Vorversuch kein signifikanter Unterschied in der Körperfläche zwischen adulten Kontrollnematoden ( $30472 \pm 6464 \mu\text{m}^2$ ) und selektierten adulten mit 1 mM Glucose-gefütterten Nematoden ( $30220 \pm 6987 \mu\text{m}^2$ ) zu beobachten (Diagramm 7). Adulte, mit 2 mM und 10 mM Glucose gefütterte Nematoden hingegen waren signifikant größer als die Kontrollnematoden ( $38203 \pm 9442 \mu\text{m}^2$  und  $35113 \pm 8178 \mu\text{m}^2$  Körperfläche). Die adulten, im Hochdosisbereich gefütterten Glucose-Nematoden zeigten eine signifikante Erhöhung des Fettgehalts in linearer Abhängigkeit von der Glucose-Konzentration, die bei 10 mM Glucose nahezu eine Verdopplung des Fettgehaltes bewirkte (Diagramm 7). Die mittleren absoluten Fluoreszenzintensitäten der adulten Nematoden erhöhten sich dabei von  $1036 \pm 173 \text{ a. u.}$  (Kontrolle) auf  $1930 \pm 486 \text{ a. u.}$  (10 mM Glucose). Die 2 mM und 10 mM Glucose-Fütterung brachte in diesem Ansatz deutlich weniger adulte Nematoden hervor, die die signifikante Glucose-induzierte Wachstumsinhibierung der Nematoden widerspiegelte, die bereits nach zwei Tagen ersichtlich war (Diagramm 7 und Diagramm 6).



**Diagramm 7: Hochdosis-Effekte von Glucose auf die Körperfläche und den Fettgehalt von *C. elegans*-Wildtypen (N2) nach dreitägiger Kultivierung (selektierte Adulte).**

L1-Larven wurden mit 1x OP50 und 1 mM, 2 mM oder 10 mM Glucose für drei Tage (3 d) gefüttert. Nach der Nile Red-Färbung von fixierten Nematoden erfolgte die Bild-Aufnahme mit dem 5x-Luft-Objektiv ( $NA = 0,16$ ) des Opera Phenix (PerkinElmer) in einer Ebene bei  $\lambda_{\text{Ex}} = 522 \text{ nm}$  /  $\lambda_{\text{Em}} = 488 \text{ nm}$ . Die anschließende automatisierte Auswertung erfolgte mit der Software Harmony (PerkinElmer). Die Datenpunkte repräsentieren die Körperfläche pro Nematode und die mittlere Fluoreszenzintensität pro Nematode (Körperfläche), angegeben in *arbitrary units* (a. u.), von selektierten Adulten (Cut-off bei  $\geq 20000 \mu\text{m}^2$  Körperfläche) aus einem Versuch ( $N = 27 - 90$  Nematoden). Statistik: Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen, Kruskal Wallis-Test,  $*p \leq 0,05$ .

Auf der Basis der beobachteten linearen Fetterhöhung mit zunehmenden Glucose-Konzentrationen, wurden weitere Glucose-Konzentrationen im Hochdosisbereich getestet, um die Möglichkeit einer weiteren Steigerung des Fettgehalts im Nematoden zu prüfen. Eine stetige Wachstumsinhibierung zeigte sich mit Konzentrationen von 5 mM und 100 mM Glucose (Diagramm 8), die deutlich stärker ausgeprägt war, als mit zuvor getesteten Konzentrationen und reproduzierbar zu beobachten war ( $n = 7$ , nicht gezeigt). Mit Vergrößerung der mittleren Körperflächen adulter Nematoden um 16 – 22 % mit der 5 mM und 100 mM Glucose-Behandlung, erhöhten sich die Fettgehalte signifikant um das ca. 2-fache mit Fluoreszenzsignalen von  $765 \pm 84 \text{ a. u.}$  (Kontrolle) auf  $1413 \pm 186 \text{ a. u.}$  (5 mM Glucose) bzw.  $1307 \pm 195 \text{ a. u.}$  (10 mM Glucose) (Diagramm 8). Dabei war zwischen der 5 mM und 100 mM Glucose-Fütterung kein Unterschied in der Fetterhöhung der Nematoden zu erkennen.



**Diagramm 8: Hochdosis-Effekte von Glucose auf die Körperfläche und den Fettgehalt von *C. elegans*-Wildtypen (N2) nach dreitägiger Kultivierung (selektierte Adulte).**

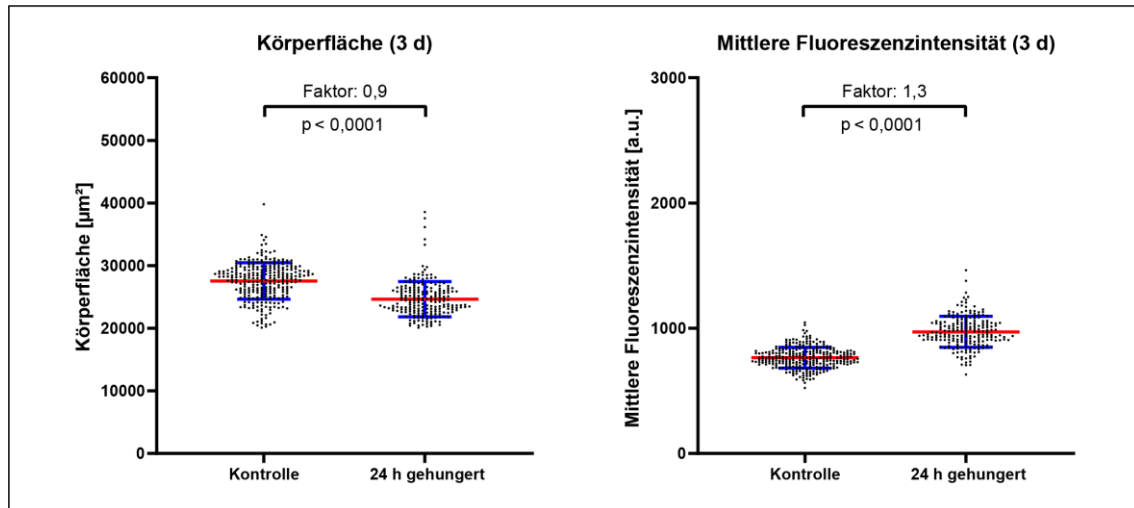
L1-Larven wurden mit 1x OP50 und 5 mM oder 100 mM Glucose für drei Tage (3 d) gefüttert. Nach der Nile Red-Färbung von fixierten Nematoden erfolgte die Bild-Aufnahme mit dem 5x-Luft-Objektiv (NA = 0,16) des Opera Phenix (PerkinElmer) in einer Ebene bei  $\lambda_{\text{Ex}} = 522 \text{ nm}$ /  $\lambda_{\text{Em}} = 488 \text{ nm}$ . Die anschließende automatisierte Auswertung erfolgte mit der Software Harmony (PerkinElmer). Die Datenpunkte repräsentieren die Körperfläche pro Nematode und die mittlere Fluoreszenzintensität pro Nematode (Körperfläche), angegeben in *arbitrary units* (a. u.), von selektierten Adulten (Cut-off bei  $\geq 20000 \mu\text{m}^2$  Körperfläche) aus einem Versuch (N = 57 – 282 Nematoden). Statistik: Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen, Kruskal Wallis-Test, \*p  $\leq 0,05$ .

Zusammenfassend zeigten sich Konzentrations-abhängige Glucose-Effekte, vorwiegend im Hochdosisbereich (im Millimolar-Bereich), die zu einer Körperversgrößerung der Nematoden und einer gesteigerten Fettakkumulation führten. Dabei prägte sich der Effekt auf beide Parameter lediglich in vereinzelt Nematoden aus, da hohe Glucose-Mengen eine zusätzliche, signifikante Wachstumsinhibierung eines Großteils der Population bewirkten. Der Wachstums-inhibierende Effekt von Glucose war bereits während der Nematodenentwicklung zu beobachten, die nach zweitägiger Kultivierung mit 100  $\mu\text{M}$  Glucose bereits zu einer breiten Streuung der Entwicklungsstadien führte und sich ab 1 mM Glucose signifikant ausprägte (Diagramm 3). Bei selektiver Betrachtung ausschließlich adulter Nematoden konnte ab 2 mM Glucose eine signifikante Körperflächenvergrößerung beobachtet werden, während sich der Fettgehalt mit zunehmenden Konzentrationen bereits ab 100  $\mu\text{M}$  Glucose signifikant erhöhte (Diagramm 6 und Diagramm 3). Die Fettzunahme bei 5 mM Glucose prägte sich in einer Verdopplung des Fettgehaltes der Kontrolle aus, welches mit höheren Glucose-Konzentrationen nicht darüber hinaus steigerbar war (Diagramm 7 und Diagramm 8). Der beobachtete BOW-Phänotyp bei prolongierter Kultivierung der Nematoden für vier Tage, ließ auf einen Nahrungsmangel schließen, weshalb die Futtermenge bei der Glucose-Fütterung in einem weiteren Versuch zusätzlich erhöht wurde (2x OP50 und 4x OP50, nicht gezeigt). Mit dieser Futtermengenerhöhung war die Wachstumsinhibition in den Nematoden jedoch stärker ausgeprägt und brachte kaum adulte Nematoden hervor, sodass die Futtermengenerhöhung nicht zielführend war. Aufgrund der signifikanten Wachstumsinhibierung und gering generierten Anzahl adulter Nematoden, stellten sich durch Glucose generierte, fette

Nematoden als ungeeignet heraus, um als Positivkontrolle für die Untersuchungen des Fettes in *C. elegans* mit der NR-Färbemethode im Hochdurchsatzsystem durchzuführen.

### 4.1.2.3 Hunger-induzierte Veränderung des Fettgehalts in *C. elegans*

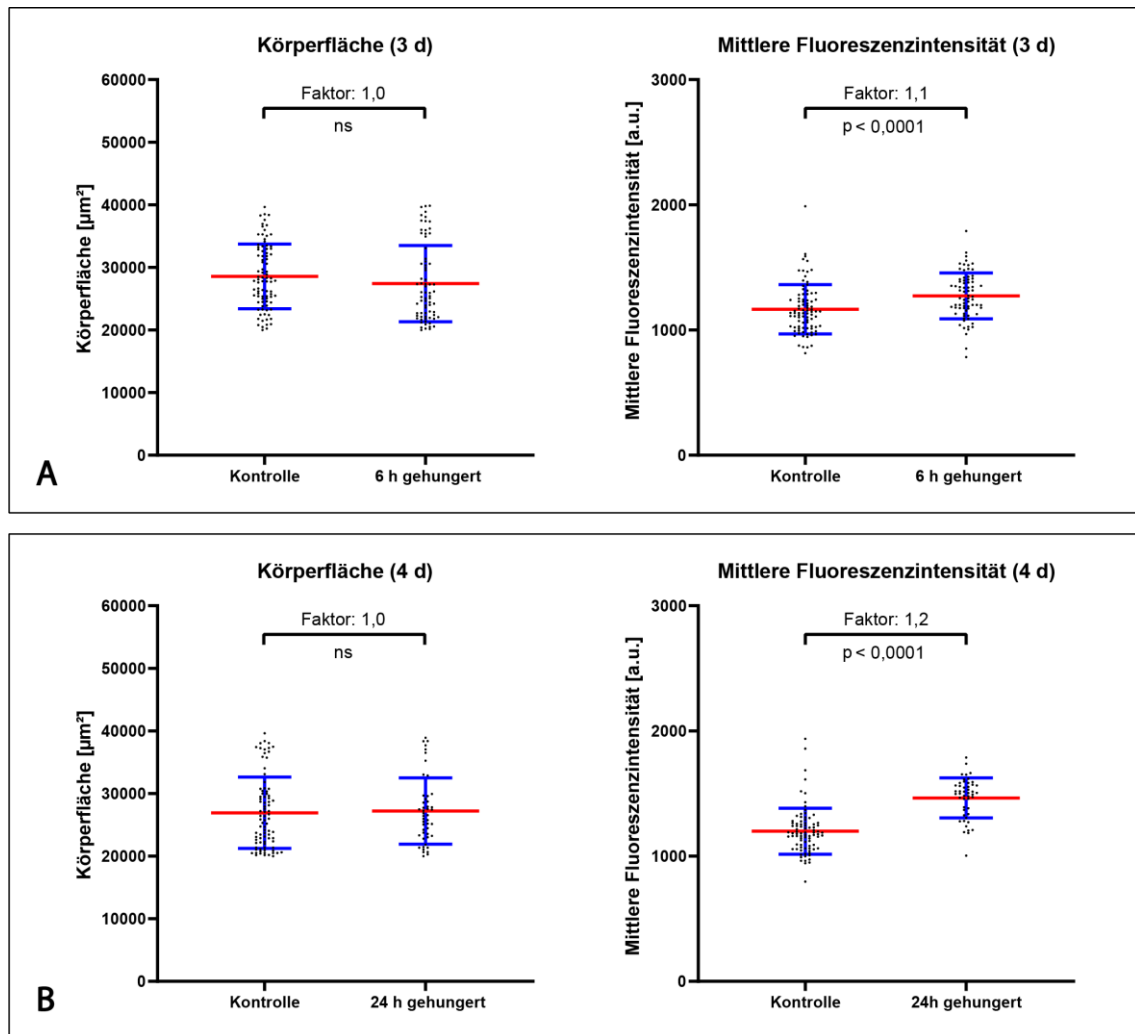
Als Positivkontrolle für den Fettnachweis in *C. elegans* mit der NR-Färbemethode war es notwendig, *C. elegans* mit einem geringen Fettprofil zu generieren. Dazu wurden die Nematoden einer Hungerphase ausgesetzt, mit dem Ziel den Fettabbau in den Nematoden zu induzieren. Diese Hypothese wurde in einigen Studien durch die Induktion einer Hungerphase zwischen 2 – 24 h in verschiedenen Larvenstadien durch unterschiedliche Nachweismethoden bestätigt (McKay *et al.*, 2003, Aarnio *et al.*, 2011, Lee *et al.*, 2014, Webster *et al.*, 2017). Da sich diese Daten jedoch auf die Plattenkultivierung stützten, wurde auch in diesem Teil der Arbeit die Induzierbarkeit des Fettabbaus durch eine eingeleitete Hungerphase in Nematoden in Flüssigkultur mit der NR-Färbung überprüft. Zunächst wurde der Fettgehalt von Wildtypen bestimmt, die zuvor 1x OP50 erhielten und im L4- (zwei Tage alt) oder Adultstadium (drei Tage alt) entweder für 6 h oder 24 h hungern gelassen wurden. Im ersten Ansatz zeigten mikroskopische Beobachtungen keinen Einfluss auf die Entwicklung von L4-Nematoden, die eine 24 h-Hungerphase erfuhren. Diese Nematoden erreichten nach der Hungerphase (Tag 3) trotz fehlendem OP50 das Adultstadium (mikroskopische Beobachtung). Dabei war die mittlere Körperfläche der gehungerten Nematoden mit  $24633 \pm 2825 \mu\text{m}^2$  signifikant, aber nur geringfügig kleiner als die der Kontrollnematoden mit  $27522 \pm 2911 \mu\text{m}^2$  (Diagramm 9), jedoch korrelierte dieser Unterschied mit einer geringeren Eizahl im Nematodenleib, der möglicherweise auf eine Wachstumsverzögerung hinwies (mikroskopische Beobachtung). Die 24 h-gehungerten Nematoden wiesen dabei jedoch höhere Fettgehalte auf, als die Kontrollnematoden mit Fluoreszenzwerten von  $971 \pm 123$  a. u. (24 h gehungert) gegenüber  $765 \pm 84$  a. u. (Kontrolle).



**Diagramm 9: Effekte einer 24 h-Hungerphase auf die Körperfläche und den Fettgehalt von *C. elegans*-Wildtypen (N2) im L4 Stadium.**

L1-Larven wurden mit 1x OP50 für zwei Tage gefüttert und anschließend einer 24-stündigen Hungerphase ausgesetzt. Nach der Nile Red-Färbung von fixierten Nematoden erfolgte die Bild-Aufnahme mit dem 5x-Luft-Objektiv (NA = 0,16) des Opera Phenix (PerkinElmer) in einer Ebene bei  $\lambda_{Ex} = 522 \text{ nm}$  /  $\lambda_{Em} = 488 \text{ nm}$ . Die anschließende automatisierte Auswertung erfolgte mit der Software Harmony (PerkinElmer). Die Datenpunkte repräsentieren die Körperfläche pro Nematode und die mittlere Fluoreszenzintensität pro Nematode (Körperfläche), angegeben in *arbitrary units* (a. u.), aus einem Versuch (N = 221 – 282 Nematoden). Statistik: Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen, Mann Whitney U-Test,  $p \leq 0,05$ .

Im nächsten Schritt wurden ausschließlich adulte Nematoden einer Hungerphase ausgesetzt, um entwicklungspezifische Faktoren, die vom Fett- bzw. Energiehaushalt abhängig sind, auszuschließen. Adulte Nematoden, die 6 h hungern gelassen wurden, zeigten im Vergleich zur Kontrolle keinen Unterschied in ihrer Körpergröße (27000 – 28000  $\mu\text{m}^2$  Körperfläche), aber eine leichte Erhöhung im Fettgehalt auf (um ca. 9 %) (Diagramm 10 A). Eine längere Hungerphase von 24 h führte ebenfalls mit übereinstimmenden Körperflächen (ca. 27000  $\mu\text{m}^2$  Körperfläche) zu keiner Beeinflussung der Nematodenentwicklung (Diagramm 10 B). Der Fettgehalt der gehungerten Nematoden erhöhte sich hingegen um 22 % im Gegensatz zu den nicht gehungerten Kontrollen gleichen Alters (Diagramm 10 B).



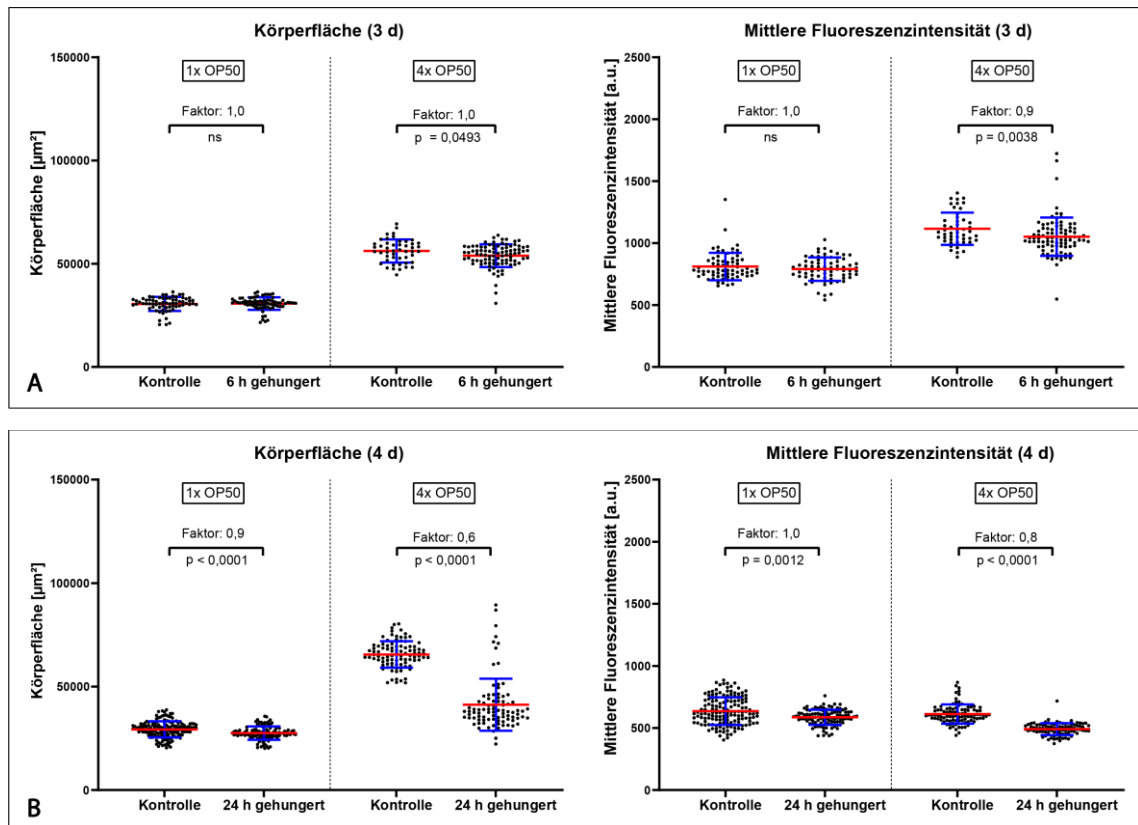
**Diagramm 10: Effekte einer 6 h- bzw. 24 h-Hungerphase auf die Körperfläche und den Fettgehalt von *C. elegans*-Wildtypen (N2) im Adultstadium.**

L1-Larven wurden mit 1x OP50 für drei Tage gefüttert und anschließend einer 6-stündigen (A) oder 24-stündigen (B) Hungerphase ausgesetzt. Nach der Nile Red-Färbung von fixierten Nematoden erfolgte die Bild-Aufnahme mit dem 5x-Luft-Objektiv (NA = 0,16) des Opera Phenix (PerkinElmer) in einer Ebene bei  $\lambda_{\text{Ex}} = 522 \text{ nm}$  /  $\lambda_{\text{Em}} = 488 \text{ nm}$ . Die anschließende automatisierte Auswertung erfolgte mit der Software Harmony (PerkinElmer). Die Datenpunkte repräsentieren die Körperfläche pro Nematode und die mittlere Fluoreszenzintensität pro Nematode (Körperfläche), angegeben in *arbitrary units* (a.u.), aus einem Versuch (A: N = 73 – 88 Nematoden, B: N = 48 – 85 Nematoden). Statistik: Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen, Mann Whitney U-Test,  $p \leq 0,05$ , ns = nicht signifikant.

Mit den Resultaten der vorangegangenen Versuche, konnte eine Verringerung des Fettgehalts durch die Induktion einer Hungerphase mit der NR-Färbung nicht gezeigt werden. Stattdessen indizierten die Fluoreszenzintensitäten erhöhte Fettgehalte. Nach drei Tagen ließ die kaum mehr vorhandene Trübung des Kultivierungsmediums das Fehlen bzw. den bereits vollständigen Verzehr von OP50 durch die Nematoden vermuten. Aus der Beobachtung wurde die Hypothese abgeleitet, dass die Nematoden nach drei Tagen möglicherweise nicht ausreichend Futter hatten, weswegen eine Verringerung des Fettgehalts nicht mehr möglich und dementsprechend mit der NR-Färbemethode nicht zu detektieren war. Auf dieser Grundlage wurden parallel zu den 1x OP50-gefütterten Nematoden, Nematoden mit einer höheren Futtermenge gefüttert (4x OP50) und zunächst adulte Nematoden beider Populationen einer Hungerphase von 6 h bzw. 24 h ausgesetzt.

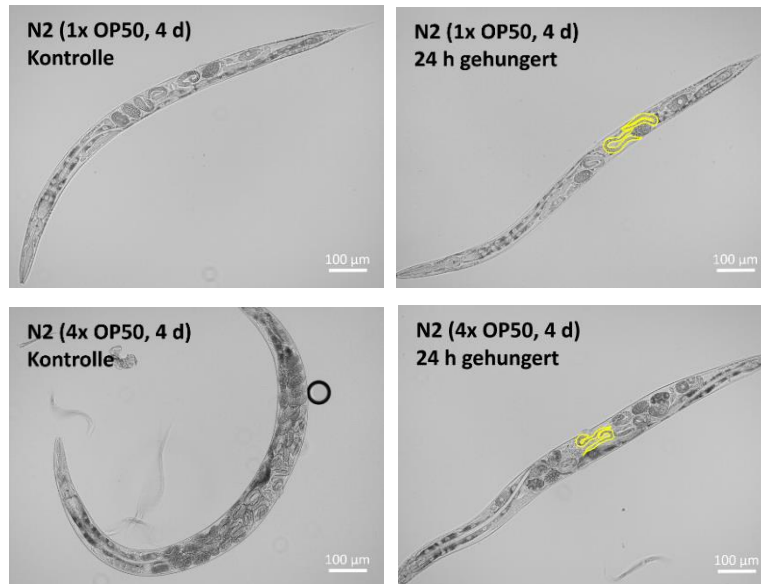
Nach drei- und viertägiger Kultivierung mit der 4-fachen OP50-Menge war das Vorhandensein von Bakterien anhand der Trübung des Kultivierungsmediums weiterhin zu erkennen. Eine 6-stündige Hungerphase zeigte Durchlicht-mikroskopisch keine Auffälligkeiten der Nematoden bezüglich ihrer Größe oder Darpigmentierung (mikroskopische Beobachtung). Mit der NR-Färbung war für die 6 h-Hungerphase für beide Futtermengen weder ein Einfluss auf die Körperfläche (ca. 30500  $\mu\text{m}^2$  bzw. 55000  $\mu\text{m}^2$ ), noch auf den Fettgehalt (ca. 800 a. u. bzw. 1000 a. u.) der adulten Nematoden zu beobachten (Diagramm 11 A). Auch die 24-stündige Hungerphase induzierte keine Veränderung in den beiden Parametern der 1x OP50-gefütterten Nematoden (Diagramm 11 A). Die 24 h gehungerten, zuvor mit 4x OP50 gefütterten Nematoden hingegen waren signifikant kleiner und hatten einen geringeren Fettgehalt als die Kontrolle (Diagramm 11 A). Dabei führte die 24 h-Hungerphase zu einer Reduktion der Körperfläche von  $65524 \pm 6370 \mu\text{m}^2$  (Kontrolle) zu  $41231 \pm 12584 \mu\text{m}^2$  (24 h gehungert) und der entsprechenden Fluoreszenzwerte von  $612 \pm 77$  a. u. zu  $491 \pm 48$  a. u. Die Durchlicht-Aufnahmen (ZOE™ Fluorescent Imager) zeigten zum einen, dass die kleineren Körperflächen unter anderem auf eine geringere Eizahl zurückzuführen war, und zum anderen, dass eine Hungerphase von 24 h (Tag 4) von zuvor mit 1x OP50 und 4x OP50 gefütterten Nematoden, das vorzeitige Schlüpfen der L1-Larven *in utero* (BOW) verursachte (Abbildung 17). Ein Unterschied in den Fettgehalten von Nematoden unterschiedlicher Futtermengen mit ähnlichen Fluoreszenzwerten um die 620 a. u. war hingegen nicht mehr zu beobachten (Diagramm 11 B).





**Diagramm 11: Effekte einer 24 h-Hungerphase auf die Körperfläche und den Fettgehalt unterschiedlich gefütterter *C. elegans*-Wildtypen (N2) im Adultstadium.**

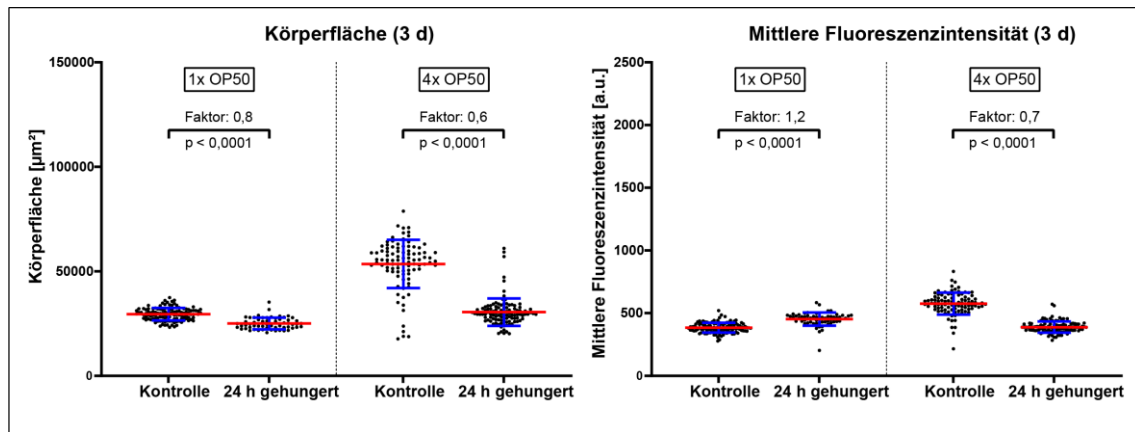
L1-Larven wurden mit 1x OP50 oder 4x OP50 für drei Tage gefüttert und anschließend jeweils einer 6-stündigen (A) oder 24-stündigen (B) Hungerphase ausgesetzt. Nach der Nile Red-Färbung von fixierten Nematoden erfolgte die Bildaufnahme mit dem 5x-Luft-Objektiv ( $NA = 0,16$ ) des Opera Phenix (PerkinElmer) in einer Ebene bei  $\lambda_{Ex} = 522 \text{ nm}$  /  $\lambda_{Em} = 488 \text{ nm}$ . Die anschließende automatisierte Auswertung erfolgte mit der Software Harmony (PerkinElmer). Die Datenpunkte repräsentieren die Körperfläche pro Nematode und die mittlere Fluoreszenzintensität pro Nematode (Körperfläche), angegeben in *arbitrary units* (a. u.), aus einem Versuch (A:  $N = 51 - 67$ , B:  $N = 89 - 149$  Nematoden). Statistik: Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen, Mann Whitney U-Test,  $p \leq 0,05$ , ns = nicht signifikant.



**Abbildung 17: Durchlicht-Aufnahmen von 24-gehungerten adulten *C. elegans*-Wildtypen (N2).**

L1-Larven wurden mit 1x OP50 oder 4x OP50 für drei Tage gefüttert und anschließend einer 24-stündigen Hungerphase ausgesetzt. Abgebildet sind repräsentative Aufnahmen von Nematoden der unterschiedlich gefütterten und gehungerten Populationen. Die Durchlicht-Aufnahmen erfolgten am ZOE™ Fluorescent Imager (20x/0,4-Objektiv, 175x-Vergrößerung) (Bio-Rad). *In utero* geschlüpfte L1-Larven, auch als *bag of worms* (BOW) bezeichnet, sind gelb markiert.

Um die Beeinflussung des Fettgehalts durch geschlüpfte L1-Larven auszuschließen, wurden Nematoden bereits im L4-Stadium einer 24 h-Hungerphase ausgesetzt. Die Adulten wiesen nach der Hungerphase kleinere Körperflächen für beide Futtermengen auf, wobei die Verringerung der mittleren Körperfläche mit Werten von  $53531 \pm 11537 \mu\text{m}^2$  auf  $30502 \pm 6577 \mu\text{m}^2$  (Reduktion um 43 %) bei 4x OP50-gefütterten Nematoden deutlich stärker ausgeprägt war, als bei 1x OP50-gefütterten Nematoden mit einer Verringerung von  $29491 \pm 3002 \mu\text{m}^2$  auf  $25052 \pm 2779 \mu\text{m}^2$  (Reduktion um 15 %) (Diagramm 12). Ähnlich wie bereits zuvor beobachtet, führte eine im L4-Stadium induzierte 24 h-Hungerphase in 1x OP50-gefütterten Nematoden zu einer Zunahme der Fettgehalte mit mittleren Fluoreszenzwerten von  $384 \pm 40$  a. u. zu  $452 \pm 53$  a. u. (Erhöhung um 18 %). In 4x OP50-gefütterten Nematoden hingegen war ein signifikanter reduzierender Effekt auf den Fettgehalt durch die Hungerphase zu beobachten, der die Fluoreszenzwerte von  $575 \pm 87$  a. u. zu  $388 \pm 45$  a. u. nahezu halbierte (Diagramm 12). Auffällig war die ähnliche Körperfläche (ca.  $30000 \mu\text{m}^2$  Körperfläche) und der ähnlich nachgewiesene Fettgehalt von 24 h gehungerten 4x OP50-gefütterten Nematoden und von 1x OP50-gefütterten Kontrollnematoden (ca. 385 a. u.) (Diagramm 12).



**Diagramm 12:** Effekte einer 24 h-Hungerphase auf die Körperfläche und den Fettgehalt unterschiedlich gefütterter *C. elegans*-Wildtypen (N2) im L4-Stadium.

L1-Larven wurden mit 1x OP50 oder 4x OP50 für zwei Tage gefüttert und anschließend jeweils einer 24-stündigen Hungerphase ausgesetzt. Nach der Nile Red-Färbung von fixierten Nematoden erfolgte die Bild-Aufnahme mit dem 5x-Luft-Objektiv (NA = 0,16) des Opera Phenix (PerkinElmer) in einer Ebene bei  $\lambda_{\text{Ex}} = 522 \text{ nm}$  /  $\lambda_{\text{Em}} = 488 \text{ nm}$ . Die anschließende automatisierte Auswertung erfolgte mit der Software Harmony (PerkinElmer). Die Datenpunkte repräsentieren die Körperfläche pro Nematode und die mittlere Fluoreszenzintensität pro Nematode (Körperfläche), angegeben in *arbitrary units* (a. u.), aus einem Versuch (N = 59 – 117 Nematoden). Statistik: Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen, Mann Whitney U-Test,  $p \leq 0,05$ .

Letztlich konnte eine Verringerung des Fettgehalts in 4x OP50-gefütterten Nematoden, aber nicht in 1x OP50-gefütterten Nematoden erreicht werden, die ab dem L4-Stadium für 24 Stunden hungern gelassen wurden. Stattdessen zeigten die gehungerten, zuvor mit 1x OP50 gefütterten Nematoden eine erhöhte Fluoreszenzintensität. Sowohl die 4x OP50-gefütterten Kontrollnematoden, als auch die im Adultstadium für 24 Stunden gehungerten, zuvor 4x OP50-gefütterten Nematoden wiesen niedrige Fettgehalte auf, die ähnlich wie in 1x OP50-gefütterten Kontrollnematoden nachgewiesen wurde, und zeigten zusätzlich das Auftreten von BOW. Auch in 1x OP50 Nematoden, die im Adultstadium einer Hungerphase ausgesetzt waren, zeigte sich das vorzeitige Schlüpfen von L1-Larven im Nematodenkörper (mikroskopische Beobachtung). Auf der Grundlage dieser Ergebnisse war die induzierte Hungerphase, zumindest in den gewählten Zeitintervallen, für die Generierung eines „mageren“ Nematoden als Kontrolle nicht geeignet.

#### 4.1.2.4 Einfluss unterschiedlicher Futtermengen auf den Fettgehalt von *C. elegans*

Da die charakteristischen Fettphänotypen der Deletionsmutanten in der Flüssigkultur nicht ausgeprägt werden konnten, die Glucose-Fütterung adverse Effekte auf die Entwicklung der Nematoden verursachte und die Hungerinduktion nur bedingt unter den durchgeführten, experimentellen Bestimmungen zu einer Fettverringerung führte, waren diese Nematoden als Kontrolle für die Untersuchung der Fettgehalte in *C. elegans* nicht geeignet.

Im vorigen Abschnitt wurde die Induktion einer Hungerphase in Kombination mit zwei unterschiedlichen Futtermengen untersucht. Aus den Ergebnissen kristallisierte sich die Variation der Futtermenge zur Veränderung des Fettgehaltes in *C. elegans* als vielversprechend heraus,

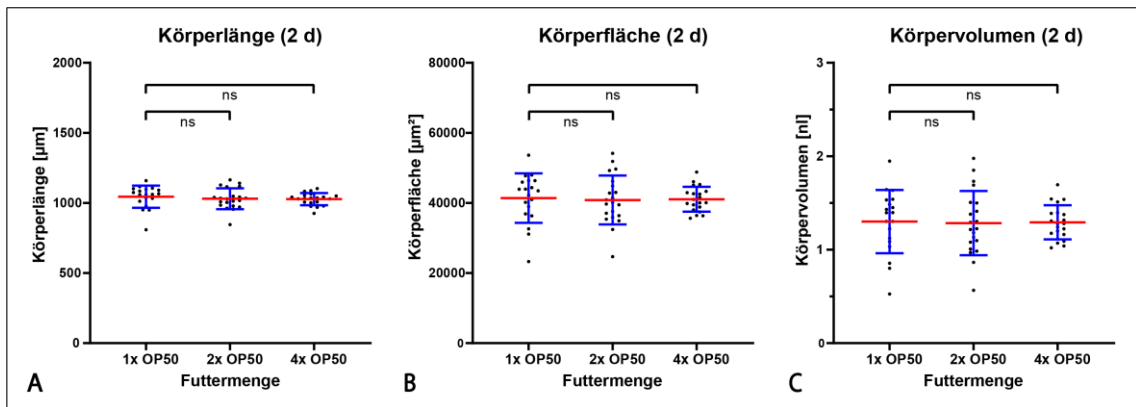
sodass der Einfluss der Futtermenge auf den Fettgehalt näher beleuchtet wurde. Triglyceride sind bekanntlich die überwiegende Form des gespeicherten Fettes in *C. elegans*, sodass die Triglyceridgehalte ein Maß für den Fettgehalt in den Nematoden darstellt (O'Rourke *et al.*, 2009). Zur Bestätigung der Ergebnisse der NR-Färbung und zur absoluten Quantifizierung des Fettgehalts in den Nematoden wurde daher ein Assay zur Bestimmung der Triglyceridgehalte herangezogen. Bei der semiquantitativen Fettbestimmung über die NR-Färbung wurden die indizierten Fettgehalte methodisch bedingt auf die Körperfläche bezogen. Für die Bestimmung der Triglyceridgehalte wurden die Werte auf das approximierte Körpervolumen berechnet, die die Dicke der Nematoden berücksichtigt und die Fettdichte in den Nematoden realer abbilden. Mittels des Triglycerid-Assays wurden die Mengen des Gesamtglycerols und des freien Glycerols gemessen, aus denen die Mono-, Di- und Triglyceridmengen berechnet wurden. Da Mono- und Diglyceride in *C. elegans* nicht vorherrschend sind, wurden die Werte im Folgenden als Triglyceridgehalte zusammengefasst (Srinivasan, 2015).

Die Triglyceridgehalte im Wildtypen wurden sowohl nach zwei- als auch dreitägiger Kultivierung mit unterschiedlichen Futtermengen bestimmt. Zwei Tage alte Nematoden, die mit 1x OP50, 2x OP50 oder 4x OP50 gefüttert wurden, zeigten in den Durchlicht-Aufnahmen (ZOE™ Fluorescent Imager) keine morphologischen Auffälligkeiten und keinen Unterschied in der Körpergröße auf, die durch die Bestimmung der Körpergrößenparameter bestätigt wurde (Abbildung 18 und Diagramm 13).



**Abbildung 18: Durchlicht-Aufnahmen von zwei Tage alten *C. elegans*-Wildtypen (N2) mit unterschiedlich gefütterten OP50-Mengen.**

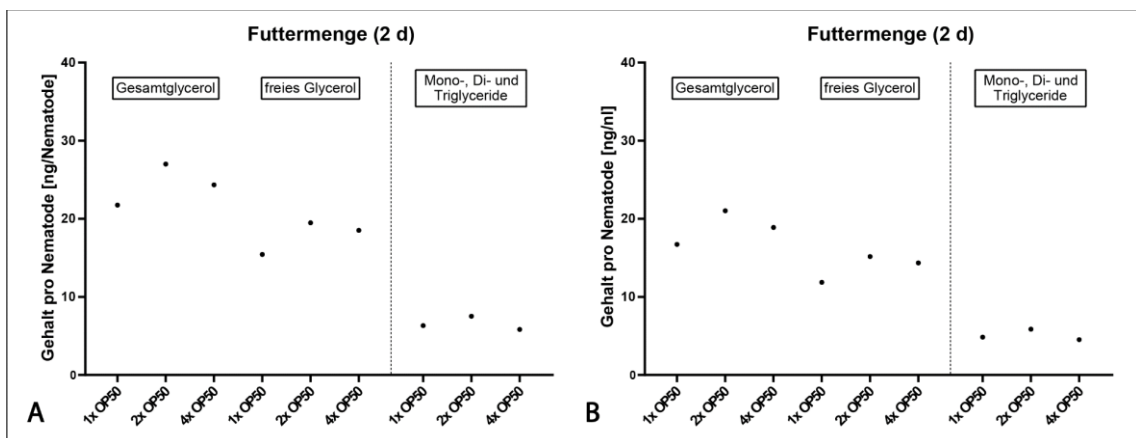
L1-Larven wurden mit 1x OP50, 2x OP50 oder 4x OP50 für zwei Tage (2 d) gefüttert. Abgebildet sind repräsentative Aufnahmen von Nematoden der unterschiedlich gefütterten Populationen. Die Durchlicht-Aufnahmen erfolgten am ZOE™ Fluorescent Imager (20x/0,4-Objektiv, 175x-Vergrößerung) (Bio-Rad).



**Diagramm 13: Einfluss der Futtermenge auf die Körpergröße von *C. elegans*-Wildtypen (N2) nach zweitägiger Kultivierung.**

L1-Larven wurden mit 1x OP50, 2x OP50 oder 4x OP50 für zwei Tage (2 d) gefüttert. Die Körperlängen (A) und -flächen pro Nematode (B) wurden anhand von Durchlicht-Aufnahmen (ZOE™ Fluorescent Imager) mit der Software Wormdetector (Nils Körber, BfR) bestimmt. Die Körpervolumina pro Nematode (C) wurden approximiert nach der Volumenformel eines Zylinders berechnet. Die Datenpunkte repräsentieren die jeweiligen Körperparameter pro Nematode aus einem Versuch (N = 19 – 21 Nematoden). Statistik: Mittelwerte ± Standardabweichungen, Kruskal Wallis-Test,  $p \leq 0,05$ , ns = nicht signifikant.

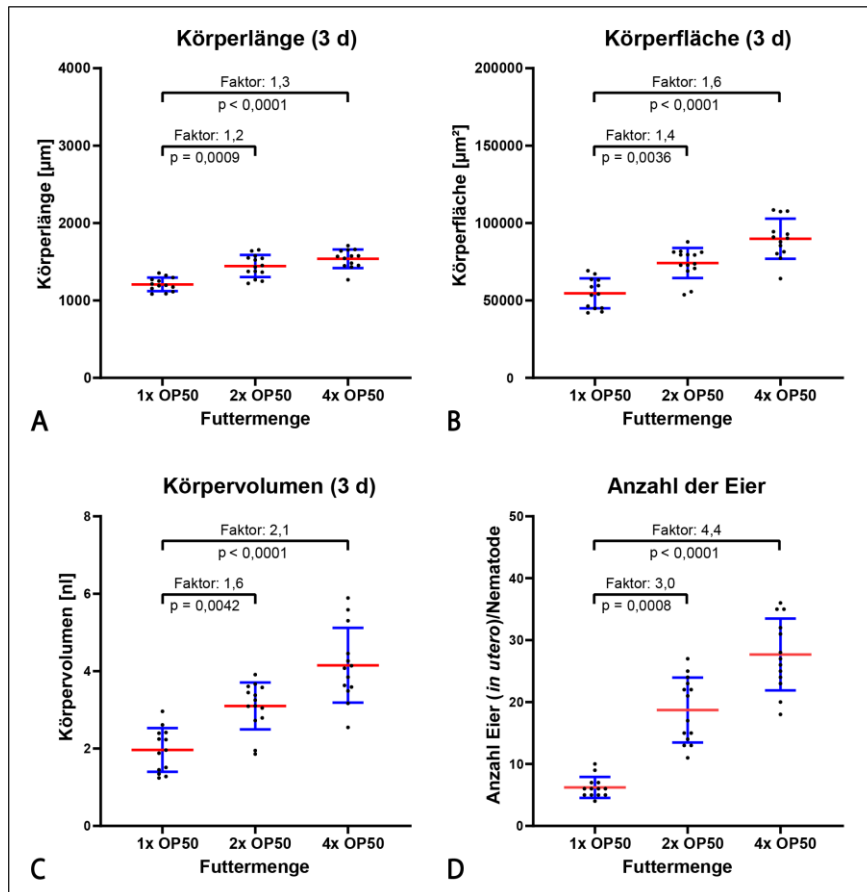
Darüber hinaus zeigte die Bestimmung der Triglyceridgehalte, dass die Futtermenge ebenfalls keinen Einfluss auf den Fettgehalt der zwei Tage alten Nematoden hatte. Im Diagramm 14 sind daher die Gesamtglycerol und freie Glycerolmengen zusätzlich zu den Triglyceridmengen pro Nematode und pro Körpervolumen dargestellt. Die Berechnung der Triglyceridmengen pro Proteinmenge wurde nicht dargestellt, da für die Proteinbestimmungen nicht genügend Probe vorhanden war. Die Triglyceridwerte pro Nematode und pro Körpervolumen lagen in diesem Ansatz bei rund 6 ng Triglyceride/Nematode (ng TAG/Nematode) und 5 ng Triglyceride/nl (ng TAG/nl) für die untersuchten Futtermengen 1x OP50, 2x OP50 und 4x OP50 (Diagramm 14).



**Diagramm 14: Einfluss der Futtermenge auf den Triglyceridgehalt von *C. elegans*-Wildtypen (N2) nach zweitägiger Kultivierung.**

L1-Larven wurden mit 1x OP50, 2x OP50 oder 4x OP50 für zwei Tage (2 d) gefüttert. Die Gesamtglycerol- und freien Glycerolgehalte wurden mittels des Triglycerid-Assays (Sigma-Aldrich) gemessen und die Triglyceridgehalte durch Subtraktion beider Werte berechnet. Die Datenpunkte repräsentieren entsprechende Gehalte pro Nematode (A) und pro Körpervolumen (B) aus einem Versuch.

Die Bestimmung der Körpergröße zeigte für drei Tage alte Nematoden (Adulte) hingegen eine lineare Zunahme der betrachteten Körpergrößenparameter in Abhängigkeit von der Futtermenge, die sich beispielsweise bis zu einer 2-fachen Erhöhung des Körpervolumens ausprägte (Diagramm 15). Mit steigender Futtermenge trugen die Nematoden vermehrt Eier im Körper, die ebenfalls von der Bakterienkonzentration abhängig war. Dabei erhöhte sich die Anzahl der Eier in den Nematoden bei einer Steigerung der 1x OP50-Futtermenge um das 3-fache (2x OP50) und 4-fache (4x OP50) (Diagramm 15).

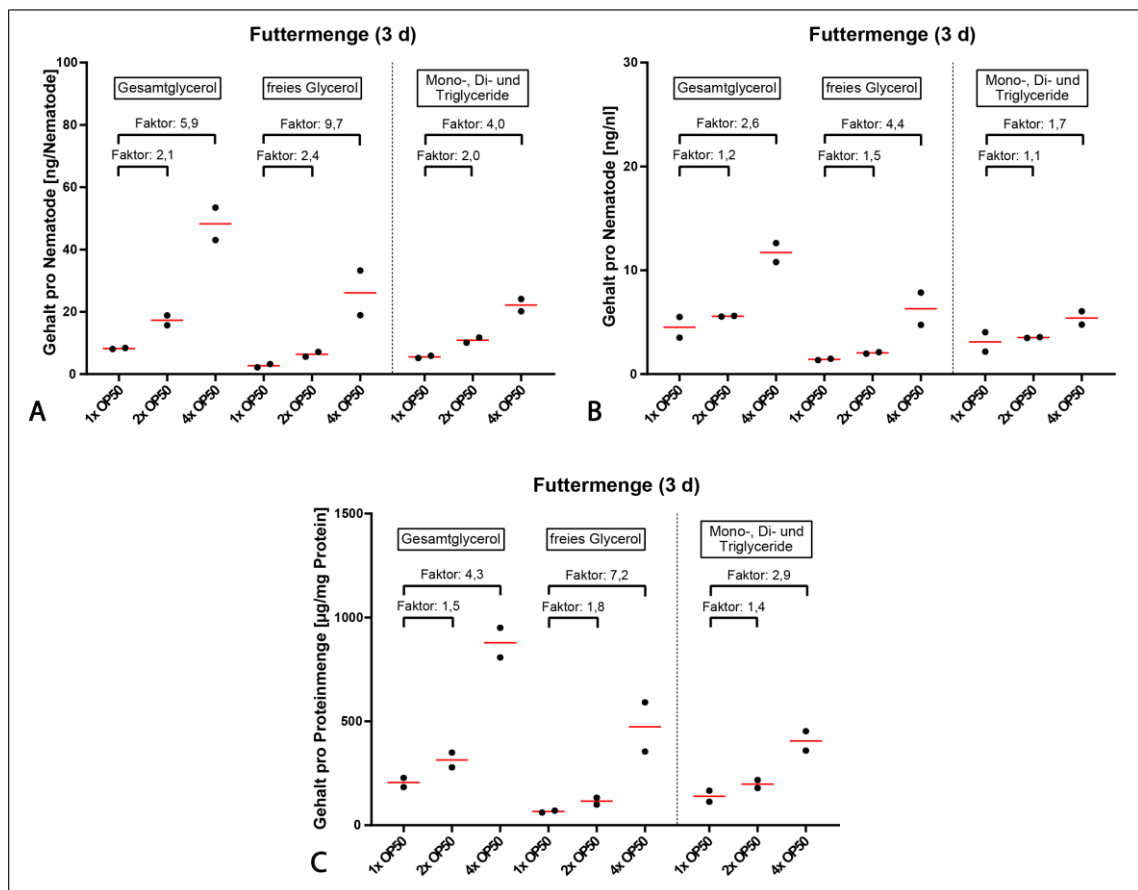


**Diagramm 15: Einfluss der Futtermenge auf die Körpergröße und die Anzahl der Eier (*in utero*) von *C. elegans*-Wildtypen (N2) nach dreitägiger Kultivierung.**

L1-Larven wurden mit 1x OP50, 2x OP50 oder 4x OP50 für drei Tage (3 d) gefüttert. Die Körperlängen (A) und -flächen pro Nematode (B) wurden anhand von Durchlicht-Aufnahmen (ZOETM Fluorescent Imager) mit der Software Wormdetector (Nils Körper, BfR) bestimmt. Die Körpervolumina pro Nematode (C) wurden approximiert nach der Volumenformel eines Zylinders berechnet. Die Anzahl der Eier im Nematoden (D) wurde durch Auszählung der Eier anhand von Durchlicht-Aufnahmen (ZOETM Fluorescent Imager) bestimmt. Die Datenpunkte repräsentieren die jeweiligen Körperparameter pro Nematode sowie die Anzahl der Eier (*in utero*) pro Nematode aus einem Versuch (N = 12 – 14 Nematoden). Statistik: Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen, Kruskal Wallis-Test,  $p \leq 0,05$ .

Mit der Fettbestimmung über den Triglycerid-Assay zeigte sich ebenfalls die Fetterhöhung durch die 4-fache Futtermenge durch erhöhte Triglyceridwerte (Diagramm 16). Die Werte lagen für die 1-fache Futtermenge im Mittel bei  $5,5 \pm 0,5$  ng TAG/Nematode (Diagramm 16 A),  $3,1 \pm 1,3$  ng TAG/nl (Diagramm 16 B) bzw.  $139,6 \pm 37,6$   $\mu$ g TAG/mg Protein (Diagramm 16 C), die sich mit der 4-fachen Futtermenge auf  $22,2 \pm 2,8$  ng TAG/Nematode,  $5,4 \pm 0,9$  ng TAG/nl bzw.

405,7 ± 65,9 µg TAG/mg Protein erhöhten. Abhängig von der Auswertung der Triglyceridwerte waren die Effekte unterschiedlich stark ausgeprägt. Der absolute Fettgehalt pro Nematode gibt nicht zwangsläufig die Fettleibigkeit der Nematoden wieder, da eine vermehrte Fütterung auch in einem größeren Nematodenkörper resultiert und die Fettdichte im Nematoden verändern kann. Um die Fettleibigkeit oder Magerkeit der Nematoden zu bestimmen, dient das Verhältnis der Fettmasse-zu-fettfreien-Masse oder Fettmasse-zu-Körpervolumen als Parameter, die die Körpergröße bzw. das Körpervolumen mitberücksichtigen (Chaston *et al.*, 2007, Klapper *et al.*, 2011). Dabei wird der Triglyceridgehalt oft auf Proteinmengen bezogen, als Korrelate für die Körpergröße (Conlon und Raff, 1999, So *et al.*, 2011). Da die Proteinmenge der untersuchten Nematoden vermutlich von den intrauterinen Eiern und deren Entwicklungsstadium abhängig war, wurden die Triglyceridgehalte in dieser Arbeit bevorzugt auf das berechnete Körpervolumen bezogen. Die jeweiligen Daten mit Bezug auf den Nematoden oder die Proteinmenge sind dem Anhang zu entnehmen.

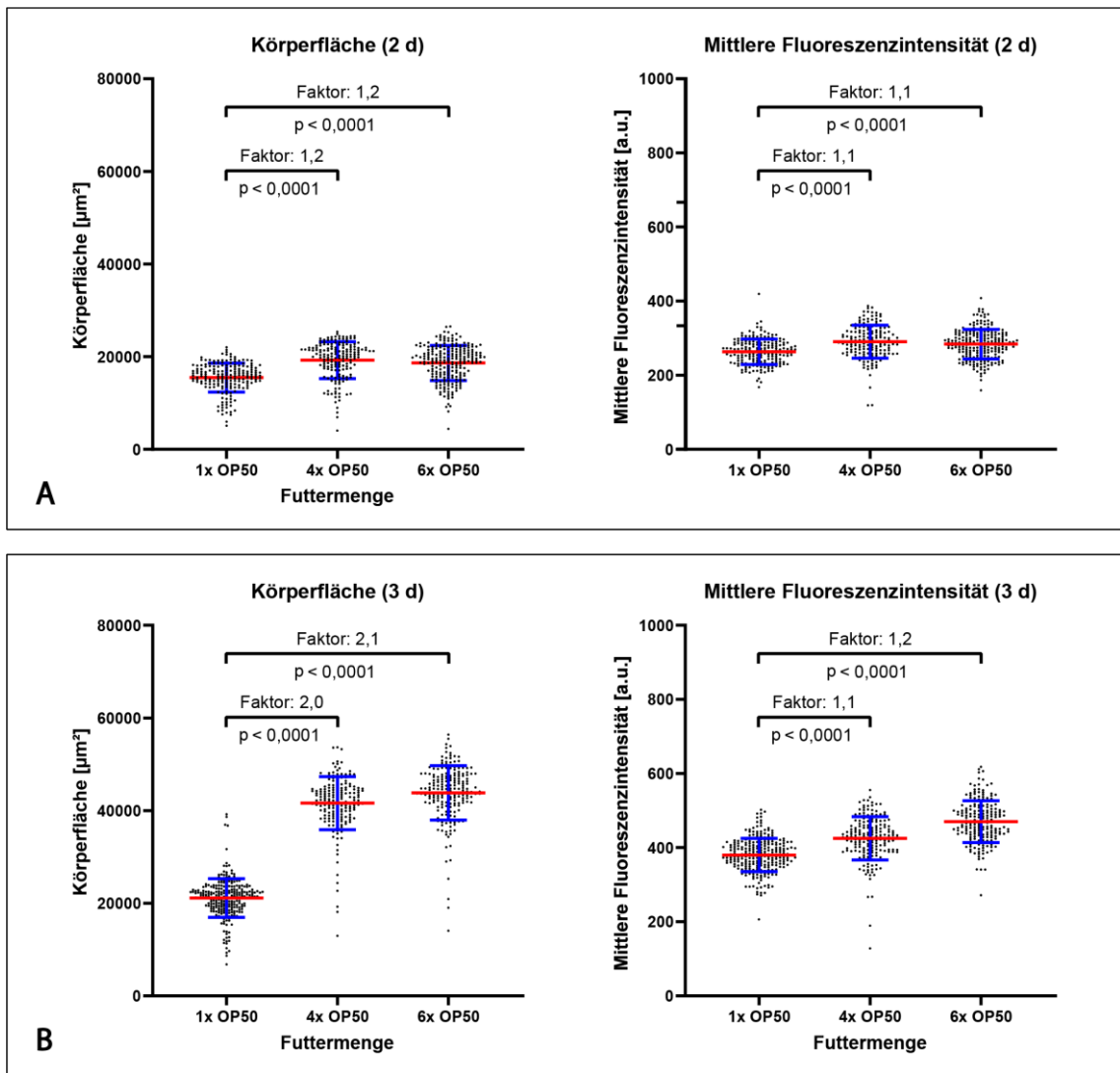


**Diagramm 16: Einfluss der Futtermenge auf den Triglyceridgehalt von *C. elegans*-Wildtypen (N2) nach dreitägiger Kultivierung.**

L1-Larven wurden mit 1x OP50, 2x OP50 oder 4x OP50 für drei Tage (3 d) gefüttert. Die Gesamtglycerol- und freien Glycerolgehalte wurden mittels des Triglycerid-Assays (Sigma-Aldrich) gemessen und die Triglyceridgehalte durch Subtraktion beider Werte berechnet. Die Datenpunkte repräsentieren entsprechende Gehalte pro Nematode (A), pro Körpervolumen (B) und pro Proteinmenge (C) aus einem Versuch mit einem technischen Duplikat. Rote Linien indizieren die Mittelwerte.

Bei Fütterung der vier- und sechsfach erhöhten Futtermenge und der Auswertung einer größeren Nematodenzahl, zeigte sich nach zwei Tagen eine geringfügige Körperflächenvergrößerung der 1x OP50-gefütterten Wildtypen (Diagramm 17 A). Einhergehend mit den Körpergrößen war auch eine signifikante Fluoreszenzsignalerhöhung für Nematoden mit erhöhter Futtermenge nach der NR-Färbung zu sehen (Diagramm 17 A). Für beide Parameter war zwischen 4x OP50- und 6x OP50-gefütterten Nematoden hingegen keine weitere Steigerung zu beobachten. Die mittlere Körperfläche vergrößerte sich von  $15491 \pm 3139 \mu\text{m}^2$  (1x OP50) auf  $19260 \pm 3982 \mu\text{m}^2$  (4x OP50) bzw.  $18641 \pm 3775 \mu\text{m}^2$  (6x OP50) und die mittleren Fluoreszenzwerte entsprechend von  $263 \pm 34$  a. u. auf  $290 \pm 44$  a. u. bzw.  $284 \pm 30$  a. u. (Diagramm 17 A). Nach dreitägiger Kultivierung hatte sich die Körperfläche von 4x OP50- ( $41602 \pm 5749 \mu\text{m}^2$ ) und 6x OP50-gefütterten Nematoden ( $43829 \pm 5878 \mu\text{m}^2$ ) im Vergleich zu 1x OP50-gefütterten Nematoden ( $21134 \pm 4189 \mu\text{m}^2$ ) nahezu verdoppelt (Diagramm 17 B). Die durch die Fluoreszenzintensitäten nach der NR-Färbung indizierten Fettgehalte waren mit zunehmender Futtermenge, ähnlich wie die Körperflächen, erhöht, wobei die Fetterhöhung weniger stark ausgeprägt war (Diagramm 17 B).





**Diagramm 17: Effekte der Futtermenge auf die Körperfläche und den Fettgehalt von *C. elegans*-Wildtypen (N2) nach zwei- und dreitägiger Kultivierung.**

L1-Larven wurden mit 1x OP50, 4x OP50 oder 6x OP50 nach zwei (A) und drei Tagen (B) gefüttert. Nach der Nile Red-Färbung von fixierten Nematoden erfolgte die Bild-Aufnahme mit dem 5x-Luft-Objektiv (NA = 0,16) des Opera Phenix (PerkinElmer) in einer Ebene bei  $\lambda_{\text{Ex}} = 522 \text{ nm}$  /  $\lambda_{\text{Em}} = 488 \text{ nm}$ . Die anschließende automatisierte Auswertung erfolgte mit der Software Harmony (PerkinElmer). Die dargestellten Datenpunkte repräsentieren jeweils die Körperfläche pro Nematode und mittlere Fluoreszenzintensität pro Nematode (Körperfläche), angegeben in *arbitrary units* (a. u.), aus einem Versuch (N = 137 – 228 Nematoden). Statistik: Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen, Kruskal Wallis-Test,  $p \leq 0,05$ .

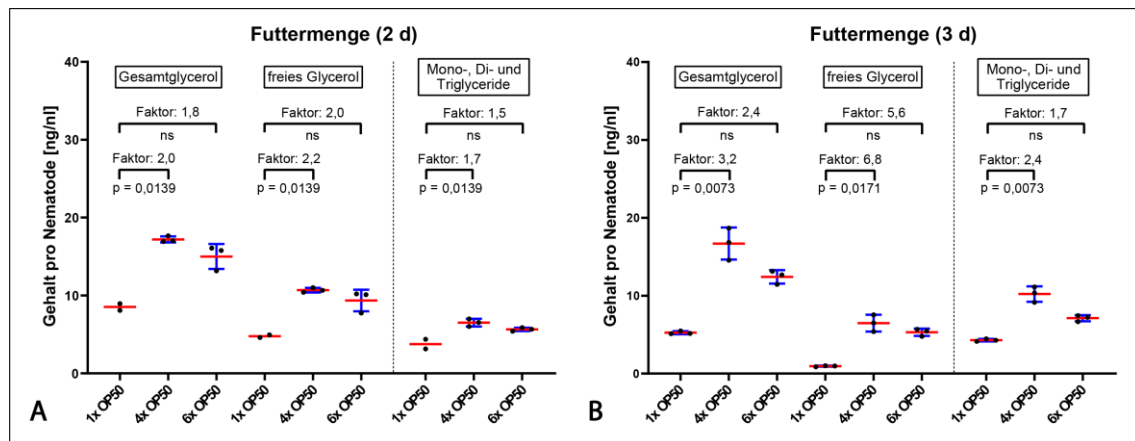
Die Durchlicht-Aufnahmen (ZOE<sup>TM</sup> Fluorescent Imager) bestätigten die Effekte der Futtermengen auf das Körpervolumen, die Reproduktion sowie die Fetteinlagerung in drei Tage alten Nematoden (Adulte), die sich auch durch vermehrte Anzahl an Eier *in utero* und das dunklere Erscheinungsbild des Darms im Durchlicht ausprägte (Abbildung 19).



**Abbildung 19: Durchlicht-Aufnahmen von drei Tage alten *C. elegans*-Wildtypen (N2) mit unterschiedlichen Futtermengen gefüttert.**

L1-Larven wurden mit 1x OP50, 4x OP50 oder 6x OP50 für drei Tage (3 d) gefüttert. Abgebildet sind repräsentative Aufnahmen von Nematoden der unterschiedlich gefütterten Populationen. Die Durchlicht-Aufnahmen erfolgten am ZOE™ Fluorescent Imager (20x/0,4-Objektiv, 175x-Vergrößerung) (Bio-Rad).

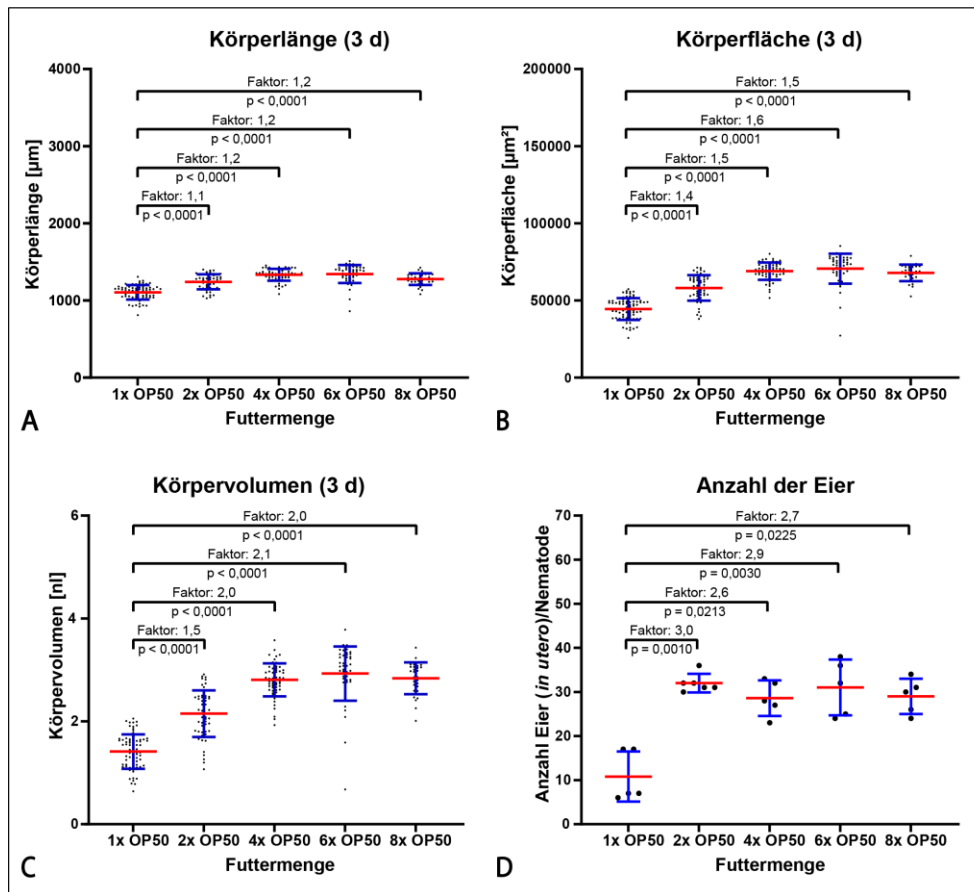
Die Ergebnisse der NR-Färbung bestätigten sich durch die Bestimmung der Triglyceridgehalte sowohl für höher gefütterte zwei, als auch drei Tage alte Nematoden (Diagramm 18 A und B). Im Vergleich zu 1x OP50-gefütterten Nematoden erhöhte sich der Triglyceridgehalt pro Körpervolumen in zwei Tage alten Nematoden mit höheren Futtermengen im Mittel von  $3,8 \pm 0,9$  ng TAG/nl (1x OP50) auf  $6,5 \pm 0,5$  ng TAG/nl (4x OP50) bzw.  $5,6 \pm 0,2$  ng TAG/nl (6x OP50), ohne signifikanten Unterschied zwischen den beiden höher gefütterten Nematoden (Diagramm 18 A). Nach drei Tagen verdoppelten sich die Triglyceridwerte pro Körpervolumen im Mittel bei erhöhter Futtermenge von  $4,3 \pm 0,1$  ng TAG/nl (1x OP50) zu  $10,2 \pm 1$  ng TAG/nl (4x OP50) bzw.  $7,1 \pm 0,4$  ng TAG/nl (6x OP50) (Diagramm 18 B).



**Diagramm 18: Effekte der Futtermenge auf den Triglyceridgehalt von *C. elegans*-Wildtypen (N2) nach zwei- und dreitägiger Kultivierung.**

L1-Larven wurden mit 1x OP50, 4x OP50 oder 6x OP50 für zwei (A) oder drei Tage (B) gefüttert. Die Gesamtglycerol- und freie Glycerolgehalte wurden mittels des Triglycerid-Assays (Sigma-Aldrich) gemessen und die die Triglyceridgehalte durch Subtraktion beider Werte berechnet. Die Datenpunkte repräsentieren entsprechende Gehalte pro Nematode (Körpervolumen) aus einem Versuch mit einem technischen Triplikat. Statistik: Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen, Kruskal Wallis-Test,  $p \leq 0,05$ , ns = nicht signifikant.

Die Effekte der Futtermenge auf den Fettgehalt der Nematoden wurden in einem weiteren Ansatz im umfangreicheren Konzentrationsbereich von 1x OP50 – 8x OP50 getestet, um eine mögliche Sättigung des Fettgehalts durch die Futtermenge zu bestimmen. Dabei wurden lediglich drei Tage alte Nematoden betrachtet. Mit steigenden OP50-Mengen nahmen die Körperlänge, -fläche sowie das -volumen von Adulten zunächst linear zu, erreichten ab einer Futtermenge von 4x OP50 aber scheinbar eine Sättigung (Diagramm 19). Als auffällig erschien die verkürzte Körperlänge der Nematoden bei einer 8-fachen Futtermenge im Vergleich zu der 6-fachen Fütterung, die jedoch kaum mit einer Veränderung der Körperfläche oder das -volumen einherging. Die Auszählung der Eizahl im Nematodenleib zeigte, dass bei der 2x OP50-Futtermenge die mittlere Eizahl sich von  $11 \pm 6$  Eier/Nematode auf  $32 \pm 2$  Eier/Nematode verdreifachte (Diagramm 19). Eine weitere Steigerung der Futtermenge indizierte keine vermehrte Eizahl in den Nematoden, die jedoch nicht ganz auszuschließen ist, da die Anzahl der Nematoden ( $N = 5$  Nematoden) möglicherweise nicht die Gesamtpopulation abbildete. Die erhöhte Anzahl an Eiern in den Nematoden kann ein erstes Indiz für die verfügbare Energie und damit für den Fettgehalt in den Nematoden sein, da für die Produktion der Nachkommen ein hoher Energieaufwand notwendig ist (Hansen *et al.*, 2013). Zusätzlich hatte die Anzahl der Eier potentiell einen Einfluss auf die resultierende Körperfläche und das -volumen, sodass bei der quantifizierten Körperflächenvergrößerung die Anzahl an Eiern zu berücksichtigen war. Da die Produktion der Eier nicht im Fokus stand und die Durchlicht-Aufnahmen vorrangig zur detailreicheren Abbildung der Morphologie der Nematoden diente, wurden in diesem Versuch keine weiteren Nematoden aufgenommen bzw. ausgewertet. Durch die Auswertung einer größeren Nematodenzahl im vorangegangenen Versuch konnte zumindest ein linearer Anstieg zwischen 1x OP50 und 4x OP50 und der Anzahl der Eier gezeigt werden (Diagramm 15).



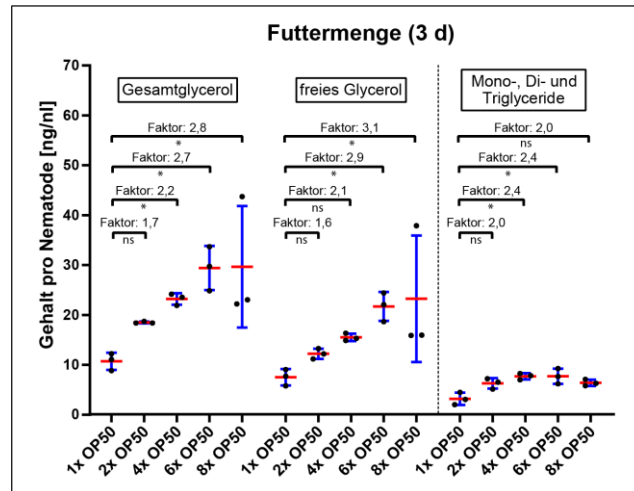
**Diagramm 19:** Einfluss der Futtermenge auf die Körpergröße und die Anzahl der Eier (*in utero*) von *C. elegans*-Wildtypen (N2) nach dreitägiger Kultivierung.

L1-Larven wurden mit 1x OP50 – 8x OP50 für drei Tage (3 d) gefüttert. Die Körperlängen (A) und -flächen pro Nematode (B) wurden anhand von Durchlicht-Aufnahmen vom Opera Phenix (PerkinElmer) mit der Software Wormdetector (Nils Körber, BfR) bestimmt und die Körpervolumina pro Nematode (C) approximiert nach der Volumenformel eines Zylinders berechnet. Die Anzahl der Eier im Nematoden (D) wurde durch Auszählung der Eier anhand von Durchlicht-Aufnahmen (ZOET<sup>TM</sup> Fluorescent Imager) bestimmt. Die Datenpunkte repräsentieren die jeweiligen Körperparameter pro Nematode aus einem Versuch (N = 47 – 74 Nematoden) und die Anzahl der Eier pro Nematoden (*in utero*) aus einem Versuch (N = 5 Nematoden). Statistik: Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen, Kruskal Wallis-Test,  $p \leq 0,05$ .

Die Triglyceridgehalte von drei Tage alten Nematoden nahmen ebenfalls mit zunehmender Futtermenge zu, wobei ab 4x OP50 keine weitere Erhöhung der Triglyceridmengen mehr zu sehen war (Diagramm 20). Die Werte lagen bei  $3,2 \pm 1,2$  ng TAG/nl (1x OP50) und  $7,7 \pm 0,6$  ng TAG/nl (4x OP50) und stimmten mit der beobachteten Verdopplung im Vorversuch ab einer 4-fachen OP50-Menge überein (Diagramm 20 und Diagramm 19). Bei Betrachtung der freien Glycerolmengen war ebenfalls ein linearer Anstieg mit zunehmender Futtermenge messbar, der scheinbar eine Sättigung mit 6x OP50 erreichte (Diagramm 20).

Zusammenfassend war eine Induktion der Fetterhöhung mit zunehmenden Futtermengen in zwei (L4) und drei Tage (Adult) alten Nematoden zu beobachten, die mit der NR-Färbemethode und dem Triglycerid-Assay bestätigt werden konnte. Die lineare Fettzunahme erreichte dabei bei einer 4-fach OP50-Fütterung eine Sättigung, mit einer Verdopplung des Triglyceridgehalts. Darüber hinaus war durch die vermehrte Fütterung auch eine Erhöhung der Körpergröße der

Nematoden, die keine weitere Zunahme ab 4x OP50 zeigte, und eine erhöhte Eizahl in den Nematoden zu erkennen, die ab einer Futtermenge von 2x OP50 nicht weiter gesteigert war.



**Diagramm 20: Effekte der Futtermenge auf den Triglyceridgehalt von *C. elegans*-Wildtypen (N2) nach dreitägiger Kultivierung.**

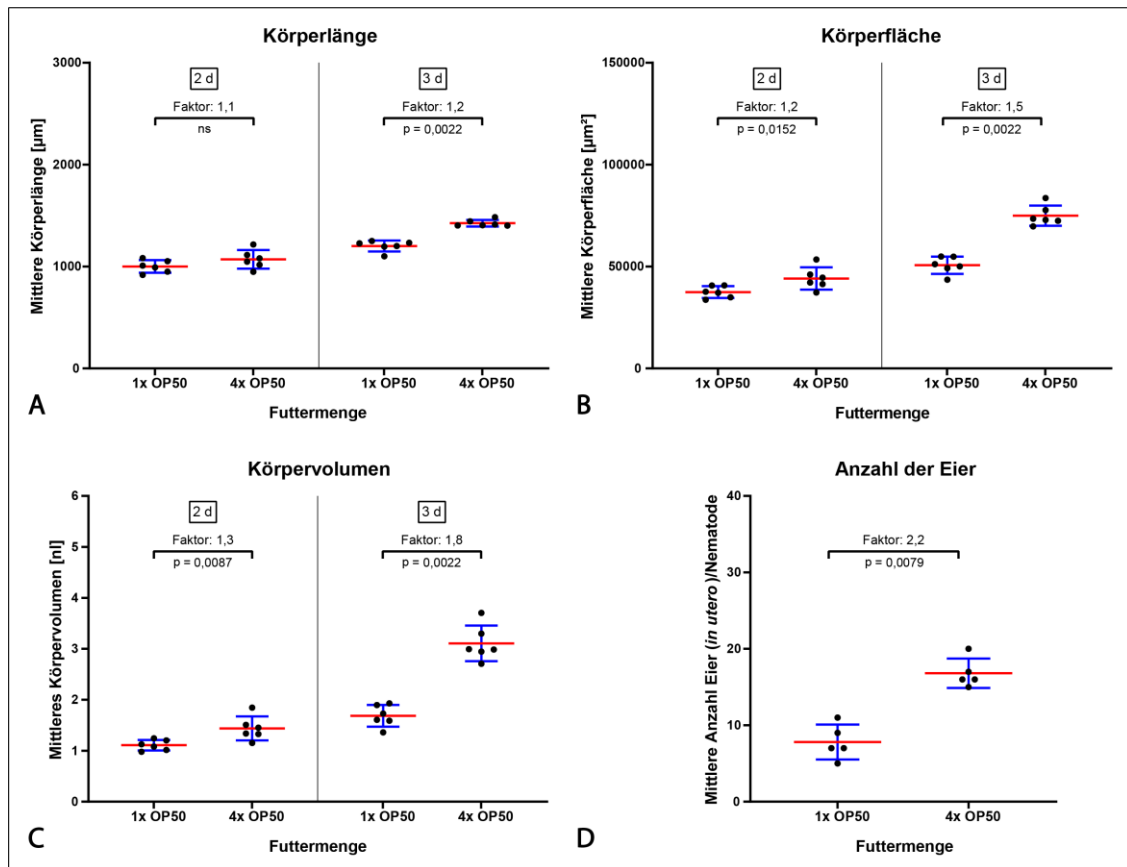
L1-Larven wurden mit 1x OP50 – 8x OP50 für drei Tage (3 d) gefüttert. Die Gesamtglycerol- und freie Glycerolgehalte wurden mittels des Triglycerid-Assays (Sigma-Aldrich) gemessen und die Triglyceridgehalte durch Subtraktion beider Werte berechnet. Die Datenpunkte repräsentieren entsprechende Gehalte pro Nematode (Körpervolumen) aus einem Versuch mit einem technischen Triplikat. Statistik: Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen, Kruskal Wallis-Test, \* $p \leq 0,05$ , ns = nicht signifikant.

## 4.2 Charakterisierung verschiedener *C. elegans*-Fettphänotypen im Testsystem

Die vorangegangenen Versuche zeigten die Möglichkeit zur Generierung von *C. elegans*-Phänotypen mit geringem und hohem Fettprofil durch die Variation der Futtermenge. Im Folgenden wurden die mit 1x OP50 und mit 4x OP50 gefütterten Nematoden als „magere“ bzw. „fette“ Nematoden bezeichnet, die näher charakterisiert und deren Fettgehalt über unterschiedliche Methoden bestimmt wurden. Die Daten der Körpergröße und der Triglyceridgehalte stammen aus dem intergenerationalen Versuch, der im Abschnitt 4.4.2 beschrieben wird. Da die Futtererfahrung der Vorfahren potentiell einen Einfluss auf den Fettgehalt der untersuchten Nematoden hat, wurden nur Nematoden aus dem intergenerationalen Versuch betrachtet, deren Vorfahren zuvor ausschließlich mit 1x OP50 kultiviert wurden. Im Folgenden wurde dieser Effekt detaillierter analysiert, um zu prüfen inwieweit dieser experimentelle Ansatz sich für weitergehende Analysen der Regulation des Fettsäurestoffwechsels eignet.

### 4.2.1 Einfluss der Futtermenge auf die Körpergröße, Anzahl der Eier *in utero* und den Triglyceridgehalt

Zunächst erfolgten die mikroskopische Bild-Aufnahme und Ausmessung der Körpergröße von zwei und drei Tage alten Nematoden, die erste Hinweise auf den Fettgehalt der Nematoden gaben. Wie bereits im vorigen Abschnitt gezeigt, schien die Körpergröße der Nematoden mit steigender Futtermenge nach zwei Tagen kaum beeinflusst zu sein (Diagramm 13 und Diagramm 17 A), was sich auch in dieser Untersuchung reproduzierbar beobachten ließ (Diagramm 21 A – C). Erst nach drei Tagen war die Abhängigkeit der Körpergröße von der Futtermenge in adulten Nematoden deutlich zu sehen (Diagramm 21 A – C). Dies zeigte sich für alle bestimmten Größenparameter: Körperlänge, -fläche und -volumen. Der durch höhere Futtermengen induzierte Wachstumseffekt sowie die Populationsverteilung waren in mehreren Replikaten ( $n = 6$ ) durch den stetigen Körpergrößenunterschied zwischen 1x OP50- und 4x OP50-gefütterten Nematoden reproduzierbar, sodass die Mittelwerte der jeweiligen Replikate dargestellt wurden (Diagramm 21). Die Größenparameter erhöhten sich um das 1,2-fache für die Körperlänge, um das 1,5-fache für die Körperfläche und um das 1,8-fache für das Körpervolumen (Diagramm 21 A – C). Die Körperflächenvergrößerung durch die erhöhte Futtermenge war unter anderem durch die Anzahl der Eier in den Nematoden beeinflusst. Wie bereits in den zuvor gezeigten Futtermengenversuchen, verdoppelte sich die Anzahl der Eier durch eine 4-fache Erhöhung der Futtermenge mit mittleren Werten von  $8 \pm 2$  Eier/Nematode auf  $17 \pm 2$  Eier/Nematode (Diagramm 21 D).



**Diagramm 21: Die Körpergröße und die Anzahl der Eier (*in utero*) von mageren und fetten *C. elegans*-Wildtypen (N2) nach zwei- und dreitägiger Kultivierung.**

L1-Larven wurden mit 1x OP50 (mager) oder 4x OP50 (fett) für zwei (2 d) oder drei Tage (3 d) gefüttert. Die Körperlängen und -flächen pro Nematode wurden anhand von Durchlicht-Aufnahmen (ZOE™ Fluorescent Imager) mit der Software Wormdetector (Nils Körper, BfR) bestimmt und die Körpervolumina (C) approximiert nach der Volumenformel eines Zylinders berechnet. Die Anzahl der Eier im Nematoden (D) wurde durch Auszählung der Eier anhand von Durchlicht-Aufnahmen (ZOE™ Fluorescent Imager) bestimmt. Die Datenpunkte repräsentieren die jeweiligen mittleren Körperparameter pro Nematode aus sechs unabhängigen Versuchen (N = 155 – 158 Nematoden) und die Anzahl der Eier pro Nematode (*in utero*) aus fünf unabhängigen Versuchen (N = 30 Nematoden). Statistik: Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen, Mann Whitney U-Test,  $p \leq 0,05$ , ns = nicht signifikant.

Bei der Bestimmung des Fettgehalts einer vermehrten Probenzahl mittels des Triglycerid-Assays konnte zwischen mageren und fetten Nematoden nach zwei Tagen kein signifikanter Unterschied im Triglyceridgehalt festgestellt werden, anders als die Ergebnisse im Vorversuch indizierten (Diagramm 22 A). Die mittleren Werte betragen nach beiden Fütterungsszenarien ca. 7 ng TAG/nl. Erst nach drei Tagen war ein Unterschied in adulten Nematoden messbar mit  $6,3 \pm 1,3$  ng TAG/nl für magere und  $9,3 \pm 2,2$  ng TAG/nl für fette Nematoden (Diagramm 22 B). Die 4-fache Futtermenge prägte sich auch in einer Erhöhung der freien Glycerolmenge aus, die von  $2,8 \pm 1,2$  ng freiem Glycerol/nl auf  $8,9 \pm 1,3$  ng freiem Glycerol/nl erhöht war (Diagramm 22 B).

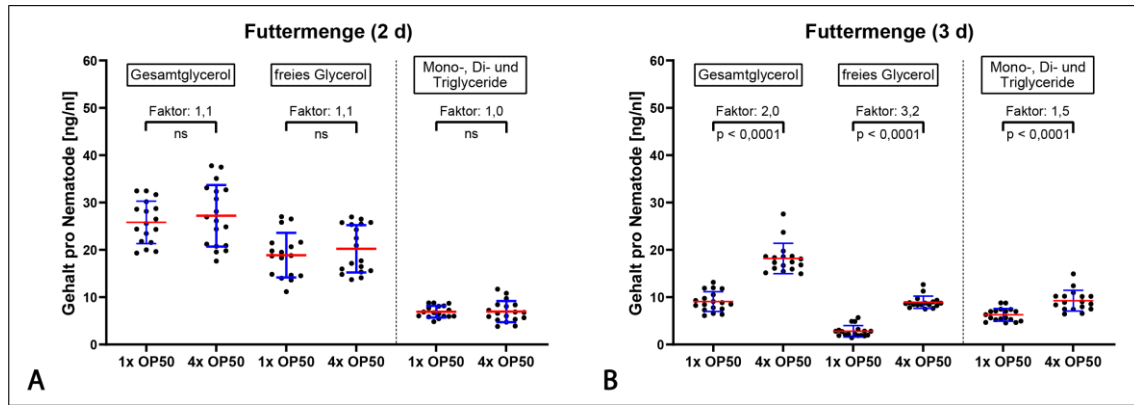


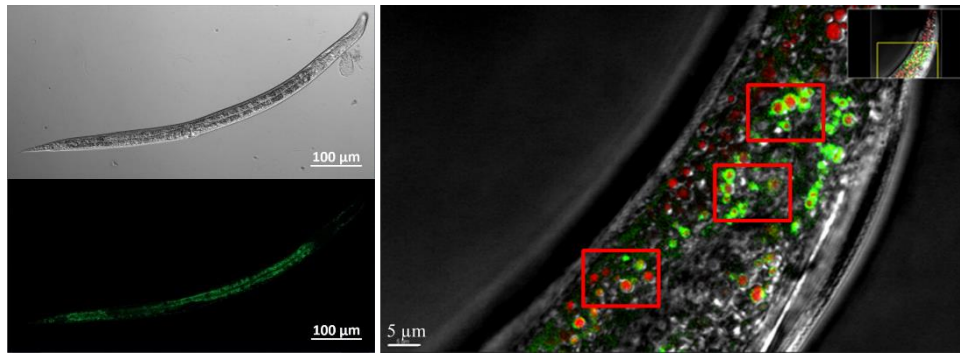
Diagramm 22: Triglyceridgehalte von mageren und fetten *C. elegans*-Wildtypen (N2) nach zwei- und dreitägiger Kultivierung.

L1-Larven wurden mit 1x OP50 (mager) oder 4x OP50 (fett) für zwei (2 d) oder drei Tage (3 d) gefüttert. Die Gesamtglycerol- und freien Glycerolgehalte wurden mittels des Triglycerid-Assays (Sigma-Aldrich) gemessen und die Triglyceridgehalte durch Subtraktion beider Werte berechnet. Die Datenpunkte repräsentieren entsprechende Gehalte pro Nematode (Körpervolumen) aus sechs unabhängigen Versuchen mit technischen Triplikaten (N = 17 – 18 Proben). Statistik: Mittelwert ± Standardabweichung, Mann Whitney U-Test,  $p \leq 0,05$ , ns = nicht signifikant.

#### 4.2.2 Einfluss der Futtermenge auf intestinale *lipid droplets*

Fett wird in *C. elegans* in Form von Lipidtröpfchen (*lipid droplets*, LD) gespeichert, die primär im Darm und in geringeren Anteilen in der Hypodermis lokalisiert sind (Martin und Parton, 2006, Mak, 2012, Srinivasan, 2015). Als zusätzlichen Endpunkt wurde daher der Einfluss der Futtermenge auf die Anzahl, Größe und Dichte der *lipid droplets* untersucht. Dazu diente als Modell der transgene *C. elegans*-Stamm LIU1 [dhs-3p::dhs-3::GFP + unc-76(+)], dessen intestinale LD mit dem grün-fluoreszierenden Protein GFP markiert sind (siehe Abbildung 20). Diese Eigenschaft wurde zum Vorteil genutzt, um intestinale LD von hypodermalen LD zu diskriminieren. Jones und Kollegen zeigten, dass die LD der ersten drei Zellpaare im anterioren Darmbereich repräsentativ für den Gesamtfettgehalt des Nematoden sind (Jones *et al.*, 2009). Daher wurden pro Nematode die LD repräsentativ in drei Quadern mit definierter Größe (je  $698 \mu\text{m}^3$ ) im anterioren Darmabschnitt untersucht (siehe Abbildung 20). Die quantifizierten LD-Parameter in den Nematoden unabhängiger Versuche wurden einzeln dargestellt, um die Varianz der LD zu verdeutlichen.

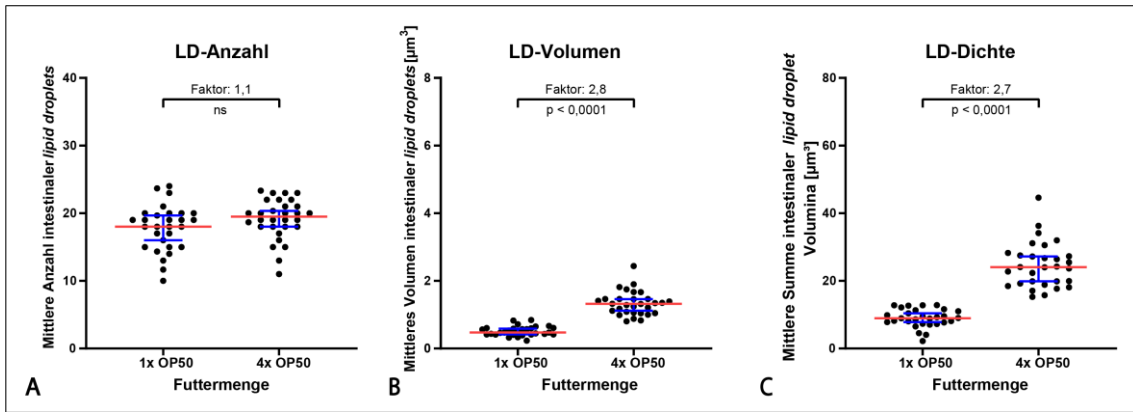




**Abbildung 20: Durchlicht- und Fluoreszenz-Aufnahmen eines gefärbten, transgenen LIU1-Nematoden.**

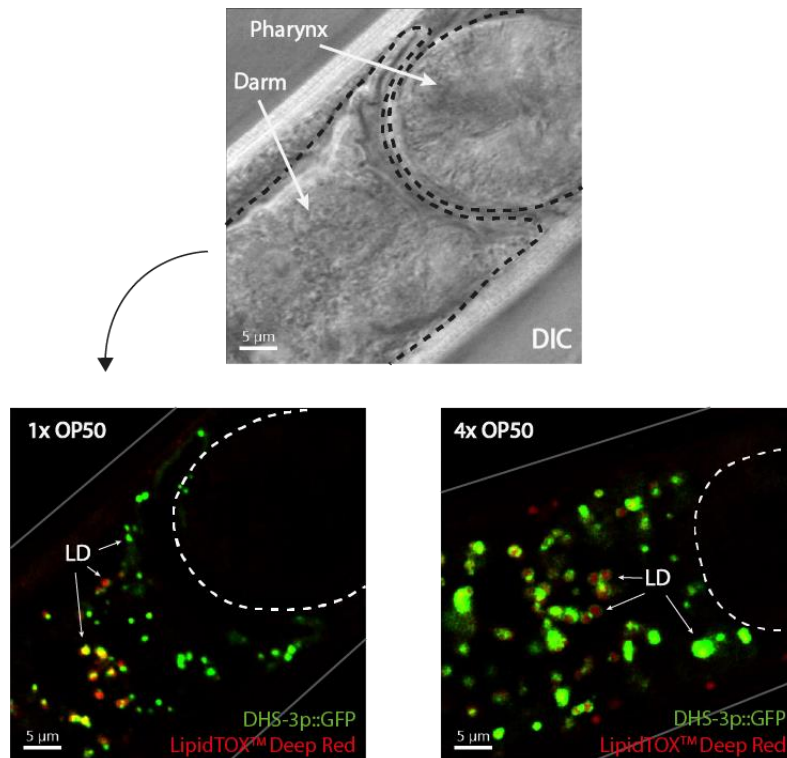
Abgebildet ist eine Ganzkörperaufnahme eines L4-Nematoden des LIU1-Stammes [dhs-3p::dhs-3::GFP + unc-76(+)] im Differentialinterferenzkontrast (DIC) (links oben) und bei  $\lambda_{\text{Ex}} = 488 \text{ nm}$  /  $\lambda_{\text{Em}} = 545 \text{ nm}$  (links unten), dessen intestinale *lipid droplets* (LD) mit dem grün-fluoreszierenden Protein GFP gekoppelt sind. Rechts ist der anteriore Darmabschnitt eines fixierten, adulten LIU1-Nematoden dargestellt, in dem die Gesamt-LD mit LipidTOX™ Deep Red (1:1000) gefärbt sind. Rot markierte Bereiche indizieren repräsentativ ausgewählte Bereiche für die LD-Auswertung. Die Aufnahmen erfolgten mit dem 10x-Luft-Objektiv (NA = 0,3) bzw. 63x-Öl-Objektiv (NA = 1,4) des Airy Scan LSM880 (Zeiss) im Differentialinterferenzkontrast (DIC), bei  $\lambda_{\text{Ex}} = 488 \text{ nm}$  /  $\lambda_{\text{Em}} = 545 \text{ nm}$  und im bei  $\lambda_{\text{Ex}} = 633 \text{ nm}$  /  $\lambda_{\text{Em}} = 692 \text{ nm}$ .

Basierend auf den Ergebnissen der Triglyceridwertbestimmung, dass in zwei Tage alten Nematoden kaum ein Unterschied in den Fettgehalten zu beobachten war, wurden die intestinalen LD lediglich von drei Tage alten, mageren und fetten LIU1-Nematoden analysiert. Die Analysen der LD zeigten für die verschiedenen Fütterungsszenarien keine Beeinflussung der mittleren LD-Anzahl, mit einem medianen Wert bei 18 LD/Nematode (15 – 20) für magere und 20 LD/Nematode (18 – 21) für fette Nematoden (Diagramm 23 A). Die mittleren LD von fetten Nematoden waren im Median ( $1,3 \mu\text{m}^3$ ;  $1,1 - 1,5 \mu\text{m}^3$ ) jedoch 2,8-fach größer als die von mageren Nematoden ( $0,5 \mu\text{m}^3$ ;  $0,4 - 0,6 \mu\text{m}^3$ ) (Diagramm 23 B). Folglich resultierte die 4x OP50-Fütterung auch in einer größeren mittleren Summe der LD-Volumina im definierten Bereich von  $698 \mu\text{m}^3$ , die im Median bei  $9 \mu\text{m}^3$  (7,5 – 11,1) für magere und bei  $24 \mu\text{m}^3$  (19,1 – 27,7) für fette Nematoden lagen (Diagramm 23 C). Die Summe der LD-Volumina wird in dieser Arbeit als Fettdichte der Nematoden angesehen. Unter der Annahme, dass die LD im ausgewerteten Darmbereich den Gesamtfettgehalt der Nematoden widerspiegeln, bestätigten die durch die erhöhte Futtermenge induzierte Vergrößerung der LD sowie die Erhöhung der Fettdichte im Nematoden die beobachtete Fettzunahme, die zuvor durch gesteigerte Triglyceridmengen gezeigt werden konnte. Repräsentative Bild-Aufnahmen der LD sind in Abbildung 21 gezeigt.



**Diagramm 23: Anzahl, Volumina und Dichten intestinaler *lipid droplets* (LD) in mageren und fetten LIU1-Nematoden nach dreitägiger Kultivierung.**

L1-Larven des transgenen LIU1-Stammes [*dhs-3p::dhs-3::GFP + unc-76(+)*] wurden mit 1x OP50 (mager) oder 4x OP50 (fett) für drei Tage gefüttert. Der anteriore Darmbereich von drei Tage alten, fixierten und mit LipidTOX™ Deep Red (1:1000) gefärbten LIU1-Nematoden wurde mit dem 63x-Öl-Objektiv (NA = 1,4) des Airy Scan LSM880 (Zeiss) im Differentialinterferenzkontrast (DIC), bei  $\lambda_{Ex} = 488 \text{ nm}$  /  $\lambda_{Em} = 545 \text{ nm}$  und im bei  $\lambda_{Ex} = 633 \text{ nm}$  /  $\lambda_{Em} = 692 \text{ nm}$  aufgenommen. Die Anzahl, Größe und Dichte von *lipid droplets* (LD) wurden in drei definierten Bereichen (je  $698 \mu\text{m}^3$ ) des anterioren Darmabschnitts mit der Software Imaris x.64 (Oxford Instruments) bestimmt und die Durchschnittswerte gemittelt. Die Datenpunkte repräsentieren die mittlere Anzahl (A), das mittlere Volumen (B) und die mittlere Dichte (Summe der Volumina) (C) intestinaler LD pro Nematode aus drei unabhängigen Versuchen (N = 30 Nematoden). Statistik: Median  $\pm$  95 % Konfidenzintervall, Mann Whitney U-Test,  $p \leq 0,05$ , ns = nicht signifikant.



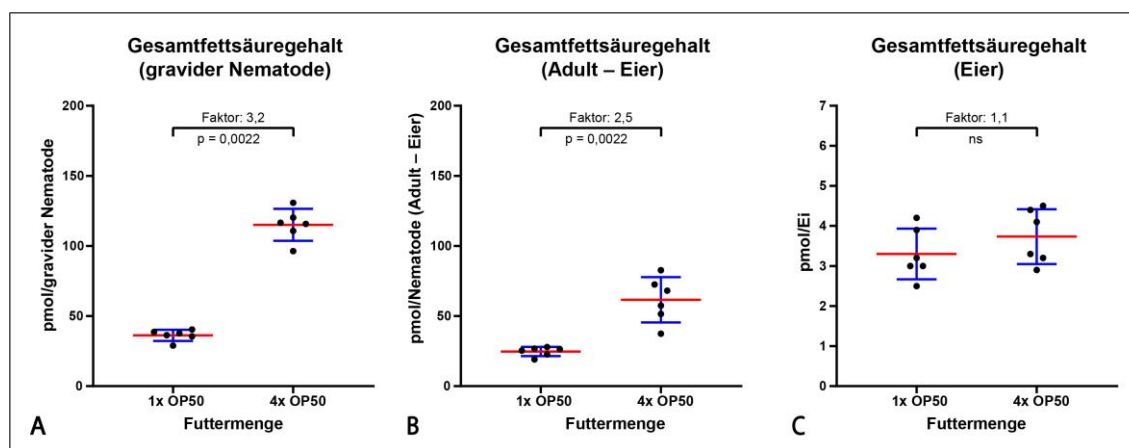
**Abbildung 21: Lipid droplets in adulten mageren und fetten LIU1-Nematoden.**

L1-Larven des transgenen LIU1-Stammes [*dhs-3p::dhs-3::GFP + unc-76(+)*] wurden mit 1x OP50 (mager) oder 4x OP50 (fett) für drei Tage gefüttert, fixiert und anschließend mit LipidTOX™ Deep Red (1:1000) angefärbt. Die Aufnahmen erfolgten mit dem 63x-Öl-Objektiv (NA = 1,4) des Airy Scan LSM880 (Zeiss) im Differentialinterferenzkontrast (DIC), bei  $\lambda_{Ex} = 488 \text{ nm}$  /  $\lambda_{Em} = 545 \text{ nm}$  und bei  $\lambda_{Ex} = 633 \text{ nm}$  /  $\lambda_{Em} = 692 \text{ nm}$ . Dargestellt sind die mit dem grün-fluoreszierenden Protein GFP-gekoppelten intestinalen *lipid droplets* (LD) und mit LipidTOX™ Deep Red gefärbten Gesamt-LD im Querschnitt des anterioren Nematoden-Darms.

#### 4.2.3 Einfluss der Futtermenge auf Fettsäuregehalt und -muster von adulten *C. elegans* und der Eier

Als ein weiteres Verfahren wurde die Fettsäure (FS)-Messung mittels Gaschromatographiegekoppelter Massenspektrometrie (GC-MS) herangezogen. Da Fettsäuren die Grundbausteine für die Bildung von Triglyceriden sind, gibt die Analyse der Fettsäuren Aufschluss sowohl über den Fettgehalt in *C. elegans*, als auch deren Fettsäuresynthese und -metabolismus über die Fettsäureprofile in Abhängigkeit von der Nahrungsmenge.

Die Analyse der Fettsäuregehalte sowie -muster erfolgte in adulten mageren und fetten Wildtypen. Auf der Grundlage der Beobachtung, dass mit mehr Futter versorgte Nematoden auch mehr Eier trugen, wurden zusätzlich die Fettsäuren der Eier von 1x OP50- und 4x OP50-gefütterten Nematoden getrennt quantifiziert. Da die FS-Gehalte der Eier rechnerisch von den FS-Gehalten gravider Nematoden abgezogen wurde und die Eizahl einen Einfluss auf das Körpervolumen hat, wurden die Gehalte pro Nematode berechnet und nicht pro Körpervolumen. Die Messungen bestätigten die vorherigen Resultate der Nile Red-Färbung, Triglyceridwertbestimmung und der *lipid droplets*-Analyse mit signifikanten Unterschieden im Fettgehalt zwischen beiden graviden Fettphänotypen: Im Mittel war der Fettsäuregehalt pro graviden Nematoden von fetten Nematoden mit  $115,1 \pm 11,4$  pmol FS/gravider Nematode fast 3-fach höher als der von mageren Nematoden mit  $36,3 \pm 4$  pmol FS/gravider Nematode (Diagramm 24 A). Die unterschiedliche Futtermenge hatte hingegen keinen Einfluss auf den FS-Gehalt der Eier (Diagramm 24 C). Die Werte unterschieden sich mit 3,7 pmol FS/Ei (von 4x OP50-gefütterten Nematoden) und 3,3 pmol FS/Ei (von 1x OP50-gefütterten Nematoden) kaum voneinander. Durch rechnerische Subtraktion der Fettsäuregehalte der Eier vom Fettsäuregehalt gravider Nematoden (Adult – Eier), war der Mengenunterschied der FS zwischen mageren und fetten Nematoden weiterhin signifikant (Diagramm 24 B). Im Mittel betrug die absoluten FS-Gehalte der mageren Nematoden  $24,7 \pm 3,3$  pmol FS/Nematode und der fetten Nematoden mit einer signifikanten Erhöhung  $61,6 \pm 16,2$  pmol FS/Nematode (Diagramm 24 B). Demnach nahm der FS-Gehalt der Eier bis zu 46 % des in den Nematoden bestimmten Gesamtfettsäuregehalts ein.

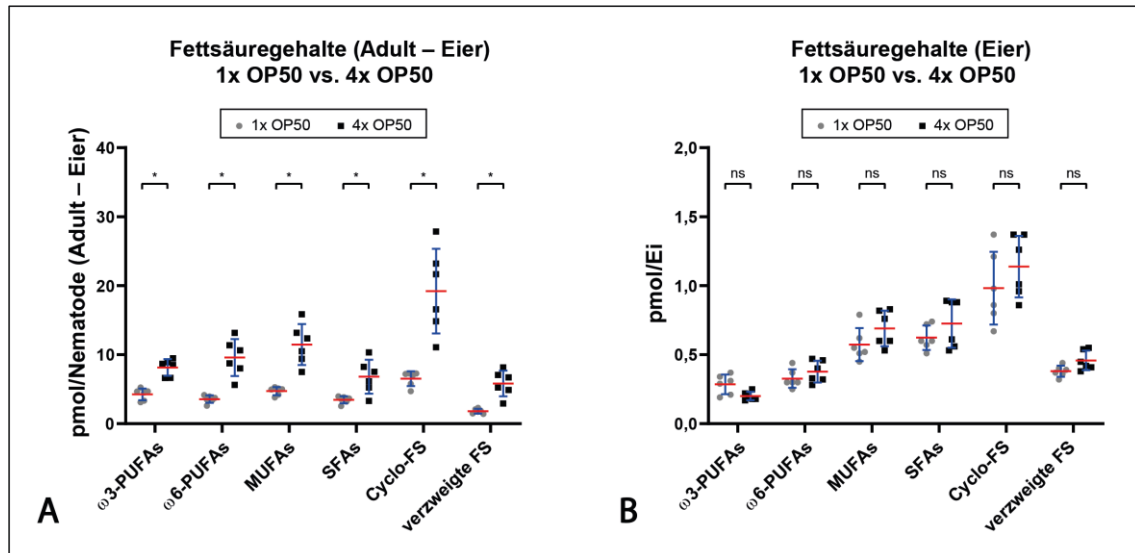


**Diagramm 24: Einfluss der Futtermenge auf den Gesamtfettsäuregehalt von adulten *C. elegans*-Wildtypen (N2) und der zugehörigen Eier nach dreitägiger Kultivierung.**

L1-Larven wurden mit 1x OP50 oder 4x OP50 für drei Tage gefüttert. Die Gesamtfettsäuregehalte von graviden Nematoden und aus graviden Nematoden isolierten Eiern wurden über die Gaschromatographie-gekoppelte Massenspektrometrie (GC-MS) bestimmt. Die Datenpunkte repräsentieren die mittleren Gesamtfettsäuregehalte pro gravidem Nematoden (A) und pro Ei (C), sowie die rechnerisch ermittelten mittleren Gesamtfettsäuregehalte pro Nematode (Adult – Eier) (B) aus zwei unabhängigen Versuchen mit technischen Triplikaten (N = 6 Proben). Statistik: Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen, Mann Whitney U-Test:  $p \leq 0,05$ , ns = nicht signifikant.

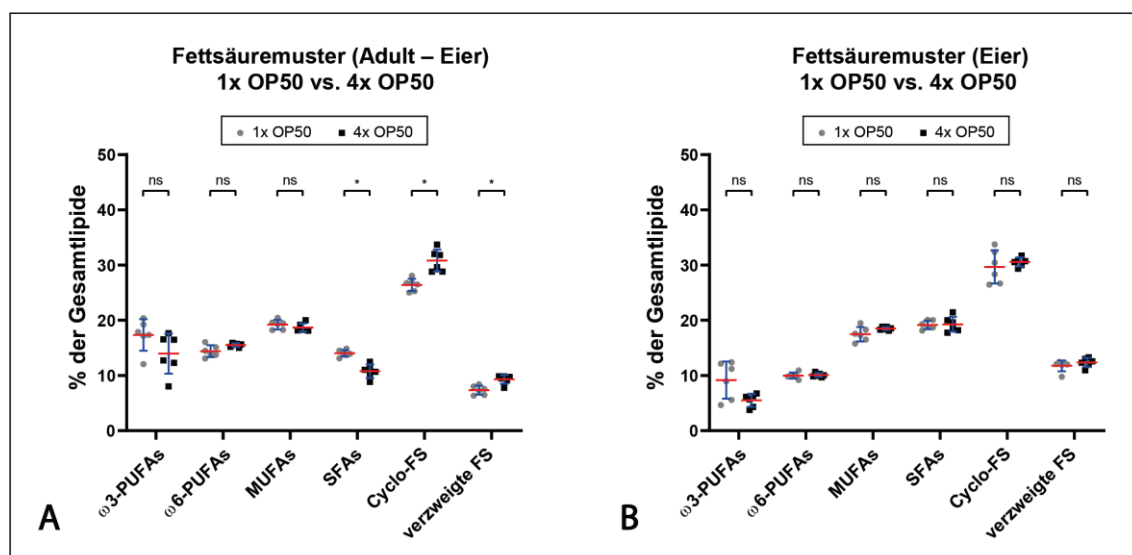
Weiterhin wurden für die Analyse der Fettsäuremuster einzelne Fettsäuregruppen nach ihrem strukturellen Aufbau klassifiziert. Dabei wurde zwischen gesättigten FS (*saturated fatty acids*, SFAs), einfach ungesättigten FS (*monounsaturated fatty acids*, MUFAs), verzweigten FS, Cyclo-FS und mehrfach ungesättigten FS (*polyunsaturated fatty acids*, PUFAs) unterschieden, wobei letztere wiederum in  $\omega$ 3-PUFAs und  $\omega$ 6-PUFAs unterteilt wurden. Die einzelnen gemessenen, den unterschiedlichen Subklassen zugehörigen Fettsäuren, sind der Tabelle 5 (Anhang) zu entnehmen. Im Weiteren wurden aufgrund der Relevanz weitere Fettsäuregehalte und -muster lediglich von adulten Nematoden (Adult – Eier) und von Eiern dargestellt und betrachtet. In Übereinstimmung mit dem Unterschied im Gesamtfettsäuregehalt zwischen den beiden Fettphänotypen, zeigten sich bei höherer Futtermenge ebenfalls signifikant erhöhte Werte für die einzelnen Fettsäuregruppen (Diagramm 25 A). Nach ihrem prozentualen Anteil waren in den Nematoden folgende FS vertreten (aufgeführt in absteigender Reihenfolge ihres Anteils): Cyclo-FS, MUFAs,  $\omega$ 3- und  $\omega$ 6-PUFAs, SFAs und verzweigte FS (Diagramm 26 A). Der Vergleich der relativen FS-Anteile in den Gesamtlipiden zeigte einen signifikanten Unterschied zwischen den Futtermengen in einem verringerten Anteil der SFAs und erhöhten Anteilen der Cyclo- und verzweigten FS in 4x OP50-gefütterten Nematoden (Diagramm 26 A). In den Eiern der unterschiedlich gefütterten Nematoden war kein signifikanter Einfluss der Futtermenge auf den Gesamtfettsäuregehalt oder die einzelnen Fettsäuregruppen zu verzeichnen (Diagramm 25 B und Diagramm 26 B). Die absoluten FS-Gehalte der Eier von fetten Nematoden waren jedoch tendenziell höher im Vergleich zu den Eiern magerer Nematoden, mit Ausnahme der  $\omega$ 3-PUFAs (Diagramm 25 B). Diese, gegen den allgemeinen Trend auftretende, Tendenz war ebenfalls in den relativen FS-Anteilen zu beobachten, während alle übrigen Fettsäuregruppen in den Eiern unterschiedlich gefütterter Nematoden anteilig nahezu

übereinstimmten (Diagramm 26 B). Die Fettsäuremuster zwischen Nematoden und Eiern hingegen unterschieden sich. Die Nematoden wiesen anteilig höhere Mengen an  $\omega$ 3- und  $\omega$ 6-PUFAs und einen geringeren SFA-Anteil auf, während die Eier einen höheren Anteil an SFAs und geringere Mengen an  $\omega$ 3- und  $\omega$ 6-PUFAs hatten (Diagramm 26 A und B).



**Diagramm 25: Einfluss der Futtermenge auf die absoluten Gehalte einzelner Fettsäuren von adulten *C. elegans*-Wildtypen (N2) und der zugehörigen Eier nach dreitägiger Kultivierung.**

L1-Larven wurden mit 1x OP50 oder 4x OP50 für drei Tage gefüttert. Die Fettsäuregehalte von graviden Nematoden und aus graviden Nematoden isolierten Eiern wurden über die Gaschromatographie-gekoppelte Massenspektrometrie (GC-MS) bestimmt. Die Datenpunkte repräsentieren rechnerisch ermittelte gruppierte, mittlere Fettsäuregehalte pro Nematode (Adult – Eier) (A) und pro Ei (B) aus zwei unabhängigen Versuchen mit technischen Triplikaten (N = 6 Proben). Statistik: Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen, t-Test mit Korrektur für multiple Vergleiche über die Holm-Sidak-Methode: \* $p \leq 0,05$ , ns = nicht signifikant.



**Diagramm 26:** Einfluss der Futtermenge auf das Fettsäuremuster von adulten *C. elegans*-Wildtypen (N2) und der zugehörigen Eier nach dreitägiger Kultivierung.

L1-Larven wurden mit 1x OP50 oder 4x OP50 für drei Tage gefüttert. Die Gesamtfettsäuregehalte von graviden Nematoden und aus graviden Nematoden isolierten Eiern wurden über die Gaschromatographie-gekoppelte Massenspektrometrie (GC-MS) bestimmt. Die Datenpunkte repräsentieren die relativen Fettsäuregehalte im Gesamtlipidgehalt (Fettsäuremuster) in den Nematoden (Adult-Eier) (A) und den Eiern (B) aus zwei unabhängigen Versuchen mit technischen Triplikaten (N = 6 Proben). Statistik: Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen, t-Test mit Korrektur für multiple Vergleiche über die Holm-Sidak-Methode: \* $p \leq 0,05$ , ns = nicht signifikant.

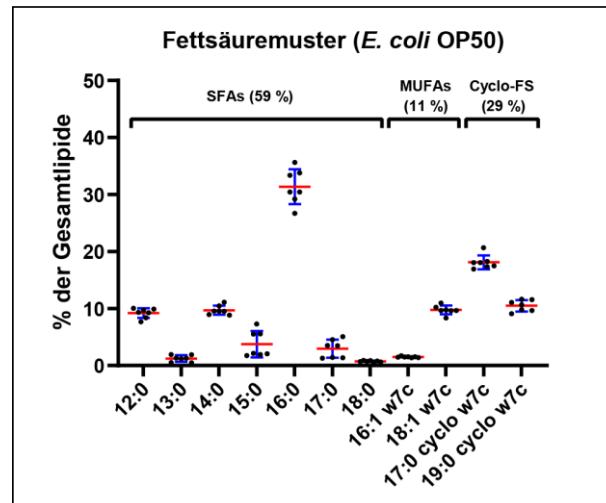
Zusätzlich wurden für die Nematoden die Verhältnisse zwischen  $\omega$ 6- und  $\omega$ 3-PUFAs sowie zwischen MUFAs und PUFAs, die oftmals im Zusammenhang von adversen Effekten bestimmt werden, ebenfalls berechnet und in nachfolgend in Tabelle 2 dargestellt (Simopoulos, 2004, Aarnio *et al.*, 2011, Gómez Candela *et al.*, 2011, Mancini *et al.*, 2015, Papsdorf und Brunet, 2019). Dabei zeigte sich für beide Parameter sowohl in den adulten Nematoden als auch in den jeweilig zugehörigen Eiern (einmal nur tendenziell indiziert) ein gesteigertes Verhältnis in Folge einer höheren Futtermenge (4x OP50). Die Ausnahme stellte das MUFA-zu-PUFA-Verhältnis in adulten Nematoden dar, in welchem keine Veränderung durch die erhöhte Nahrungsaufnahme vorlag.

**Tabelle 2:** Fettsäureverhältnisse in drei Tage alten, unterschiedlich gefütterten *C. elegans*-Wildtypen (Adult - Eier) und in den zugehörigen Eiern

	adulte Nematoden (Adult – Eier)		Eier	
	1x OP50	4x OP50	1x OP50	4x OP50
$\omega$ 6/ $\omega$ 3-PUFA	<b>0,86 <math>\pm</math> 0,26</b>	<b>1,20* <math>\pm</math> 0,42</b>	<b>1,28 <math>\pm</math> 0,63</b>	<b>1,93 <math>\pm</math> 0,51</b>
MUFA/PUFA	<b>0,61 <math>\pm</math> 0,07</b>	<b>0,64 <math>\pm</math> 0,09</b>	<b>0,94 <math>\pm</math> 0,19</b>	<b>1,19* <math>\pm</math> 0,10</b>

dargestellt sind **Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen** aus zwei unabhängigen Versuchen (N = 6 Proben), \*signifikant mit  $p \leq 0,05$  (Mann Whitney U-Test)

Zur Untersuchung des Nahrungseinflusses auf *C. elegans* wurde auch die FS-Zusammensetzung der OP50-Bakterien bestimmt, die als Futterquelle der Nematoden dienen. Die in dieser Arbeit eingesetzten OP50-Bakterien wiesen hauptsächlich gesättigte (59 %), Cyclo- (29 %) und einfach gesättigte Fettsäuren (11 %) auf. Dabei war in den SFAs Palmitinsäure (C16:0) mit 31 % prävalent, während in geringeren Mengen kurzkettige FS (< C16) und einfach ungesättigte FS vorhanden waren. Die MUFAs setzten sich hauptsächlich aus Palmitoleinsäure (C16:1n7) und Vaccensäure (C18:1n7) zusammen. Die Verteilung der einzelnen Fettsäuren ist im Diagramm 27 abgebildet.



**Diagramm 27: Fettsäurezusammensetzung des *E. coli*-Stammes OP50.**

Die Fettsäuren von *Escherichia coli* (OP50) wurden mittels Gaschromatographie-gekoppelter Massenspektrometrie (GC-MS) analysiert. Die Datenpunkte repräsentieren Mittelwerte der relativen Fettsäuregehalte aus sechs unabhängigen Versuchen mit technischen Duplikaten. Statistik: Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen.

Die unterschiedlichen Analysemethoden zur Fettbestimmung in *C. elegans* zeigten übereinstimmend einen geringeren Fettgehalt in 1x OP50-gefütterten Nematoden (magere Nematoden) bzw. einen höheren Fettgehalt in 4x OP50-gefütterten Nematoden (fette Nematoden). Sowohl die Triglyceridgehalte, Größe und Dichte der intestinalen *lipid droplets*, die Gesamtfettsäuregehalte, sowie die Gehalte der einzelnen Fettsäuregruppen waren in fetten Nematoden signifikant höher als in mageren Nematoden. Darüber hinaus waren auch die Körpergröße und Anzahl der Eier *in utero* durch die Futtermenge signifikant beeinflusst. Veränderungen in diesen beiden Parametern sind jedoch mit Vorsicht zu betrachten, da die Veränderungen der Körpergröße, die vermutlich von der Eizahl zusätzlich beeinflusst war, nicht nur Effekte auf das Größenwachstum, sondern auch Effekte auf die Entwicklung widerspiegeln könnten.

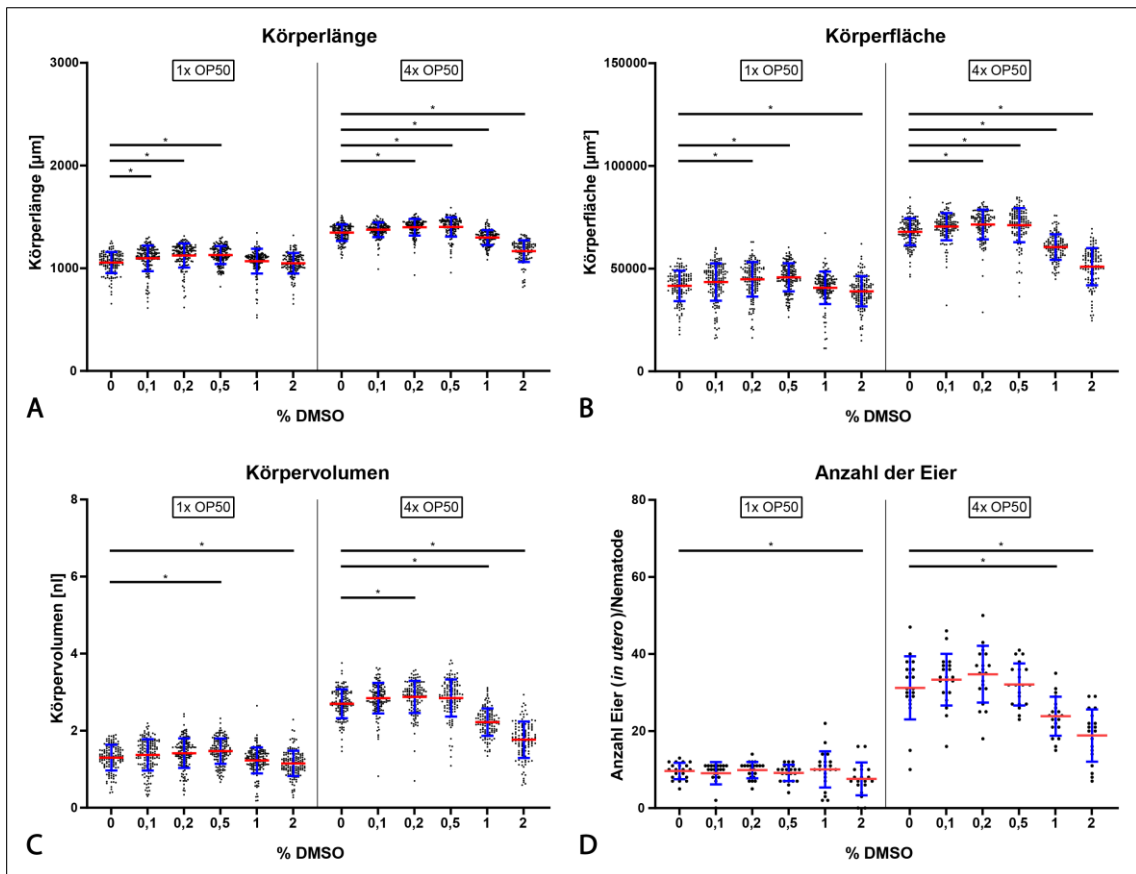
### 4.3 Einfluss von Orlistat auf den Fettgehalt von *C. elegans*

Nachdem die Fettgehalte der zwei *C. elegans*-Phänotypen mit den unterschiedlichen Methoden nachgewiesen werden konnten, wurde das Testsystem mit den als magere (mit 1x OP50 gefüttert) und fette (mit 4x OP50 gefüttert) definierte Nematoden für die Untersuchung des Einflusses einer Testsubstanz auf den Fettgehalt der Nematoden verwendet.

#### **DMSO-Effekte in *C. elegans***

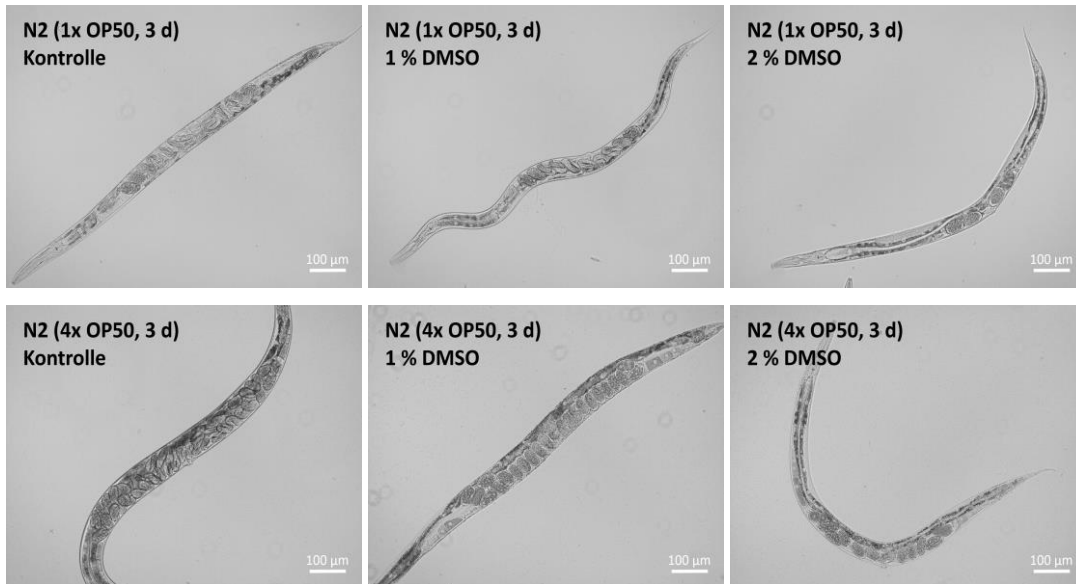
Dimethylsulfoxid (DMSO) ist ein gängiges Lösungsmittel für Chemikalien, welches jedoch in hohen Konzentrationen adverse Effekte im Testsystem verursachen kann (Galvao *et al.*, 2014, Verheijen *et al.*, 2019). Um vor der Behandlung der Nematoden mit der eigentlichen Testsubstanz mögliche Effekte des Lösemittels auszuschließen, wurde DMSO zum Kultivierungsmedium der L1-Larven gegeben und die unterschiedlich gefütterten Nematoden nach drei Tagen (Adultstadium) untersucht. Die getesteten DMSO-Konzentrationen zwischen 0,1 % und 2 % DMSO zeigten tendenziell ab 1 % DMSO sowohl für magere, als auch fette Nematoden einen reduzierenden Effekt auf die Körpergröße und die Anzahl der Eier in den Nematoden (Diagramm 28). Dabei war in fetten Nematoden eine starke Tendenz der Reduzierung der Körperfläche und dem -volumen zu beobachten, die unter anderem durch die Eizahl *in utero* bedingt waren. Repräsentative Durchlicht-Aufnahmen (ZOE™ Fluorescent Imager) der durch DMSO morphologisch veränderten Nematoden sind in Abbildung 22 gezeigt.





**Diagramm 28: Effekte von DMSO auf die Körpergröße und die Anzahl der Eier (*in utero*) von *C. elegans*-Wildtypen (N2) nach dreitägiger Kultivierung.**

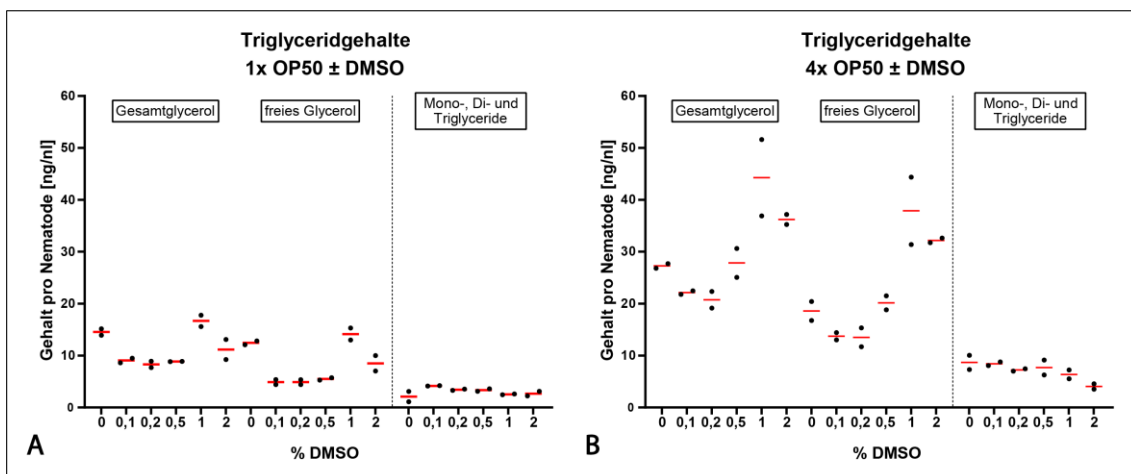
L1-Larven wurden mit 1x OP50 oder 4x OP50 und jeweils mit 0,1 %, 0,2 %, 0,5 %, 1 % oder 2 % DMSO für drei Tage gefüttert. Die Körperlängen (A) und -flächen pro Nematode (B) wurden anhand von Durchlicht-Aufnahmen (Opera Phenix, PerkinElmer) mit der Software Wormdetector (Nils Körber, BfR) bestimmt. Die Körpervolumina pro Nematode (C) wurden approximiert nach der Volumenformel eines Zylinders berechnet. Die Anzahl der Eier im Nematoden (D) wurde durch Auszählung der Eier anhand von Durchlicht-Aufnahmen (ZOET<sup>TM</sup> Fluorescent Imager) bestimmt. Die Datenpunkte repräsentieren die jeweiligen Körperparameter pro Nematode (N = 118 – 157 Nematoden) sowie die Anzahl der Eier (*in utero*) pro Nematode (N = 19 – 23 Nematoden) aus zwei unabhängigen Versuchen. Statistik: Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen, Kruskal Wallis-Test, \*p < 0,001.



**Abbildung 22: Durchlicht-Aufnahmen von adulten DMSO-behandelten *C. elegans*-Wildtypen (N2).**

L1-Larven wurden mit 1x OP50 (mager) oder 4x OP50 (fett) und jeweils mit 1 % oder 2 % DMSO für drei Tage (3 d) gefüttert. Abgebildet sind repräsentative Nematoden, in denen die DMSO-Effekte auf die Körpergröße und die Anzahl intrauteriner Eier verdeutlicht werden. Die Durchlicht-Aufnahmen erfolgten am ZOE™ Fluorescent Imager (20x/0,4-Objektiv, 175x-Vergrößerung) (Bio-Rad).

Die getesteten DMSO-Konzentrationen zeigten keinen Einfluss auf die Triglyceridgehalte von mageren Nematoden (Diagramm 29 A). Bei fetten Nematoden war der Triglyceridgehalt ab 1 % DMSO tendenziell niedriger als in der Kontrolle (Diagramm 29 B). Als auffällig erschien hierbei der Gehalt des freien Glycerols, der hingegen ab 1 % DMSO signifikant erhöht war. Die in der Literatur häufig zur Substanzinkubation von *C. elegans* verwendete DMSO-Konzentration von 0,2 % zeigte auch in dieser Arbeit keinen adversen Effekt auf die untersuchten Endpunkte, sodass für die Inkubation der Testsubstanz Orlistat 0,2 % DMSO verwendet wurde (Diagramm 29).

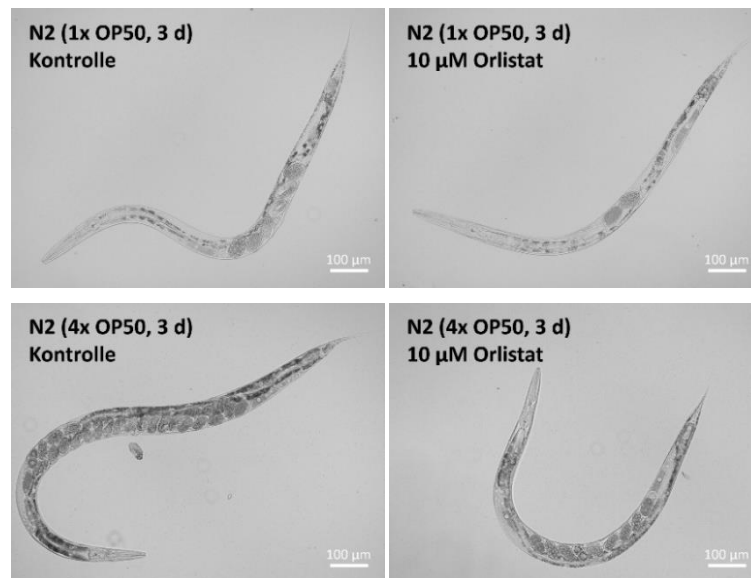


**Diagramm 29: Effekte von DMSO auf den Triglyceridgehalt von mageren und fetten *C. elegans*-Wildtypen (N2) nach dreitägiger Kultivierung.**

L1-Larven wurden mit 1x OP50 (mager) oder 4x OP50 (fett) und jeweils mit 0,1 %, 0,2 %, 0,5 %, 1 % oder 2 % DMSO für drei Tage gefüttert. Die Gesamtglycerol- und freie Glycerolgehalte wurden mittels des Triglycerid-Assays (Sigma-Aldrich) gemessen und Triglyceridgehalte durch Subtraktion beider Werte berechnet. Die Datenpunkte repräsentieren entsprechende Gehalte pro Nematode (Körpervolumen) aus zwei unabhängigen Versuchen. Rote Linien indizieren die Mittelwerte.

### 4.3.1 Einfluss von Orlistat auf die Körpergröße und die Anzahl der Eier *in utero*

Orlistat ist ein anti-obesogenes Pharmakon zur Behandlung von Adipositas bei Menschen (Guercioli, 1997, Ballinger und Peikin, 2002). Durch kovalente Bindung an das aktive Zentrum von Lipasen im Darm, werden diese irreversibel inaktiviert, sodass die Hydrolyse der Nahrungsfette in resorbierbare freie Fettsäuren und Monoglyceride nicht mehr erfolgen kann (Guercioli, 1997, Ballinger und Peikin, 2002). Die Fett-reduzierende Wirkung von Orlistat wurde, unter Verwendung als Positivkontrolle, in einigen Agarplatten-basierten Studien bereits gezeigt (Martorell *et al.*, 2012, Navarro-Herrera *et al.*, 2018, Llopis *et al.*, 2019, Aranaz *et al.*, 2020). Diese Wirkung wurde in der vorliegenden Studie in den Nematoden der Flüssigkultivierung mit unterschiedlichen Nachweismethoden überprüft und näher charakterisiert. Dazu wurden L1-Larven für drei Tage mit 1x OP50 und 4x OP50 und jeweils 10  $\mu$ M Orlistat kultiviert. Repräsentative Durchlicht-Aufnahmen von unbehandelten und Orlistat-behandelten Nematoden sind in Abbildung 23 dargestellt.

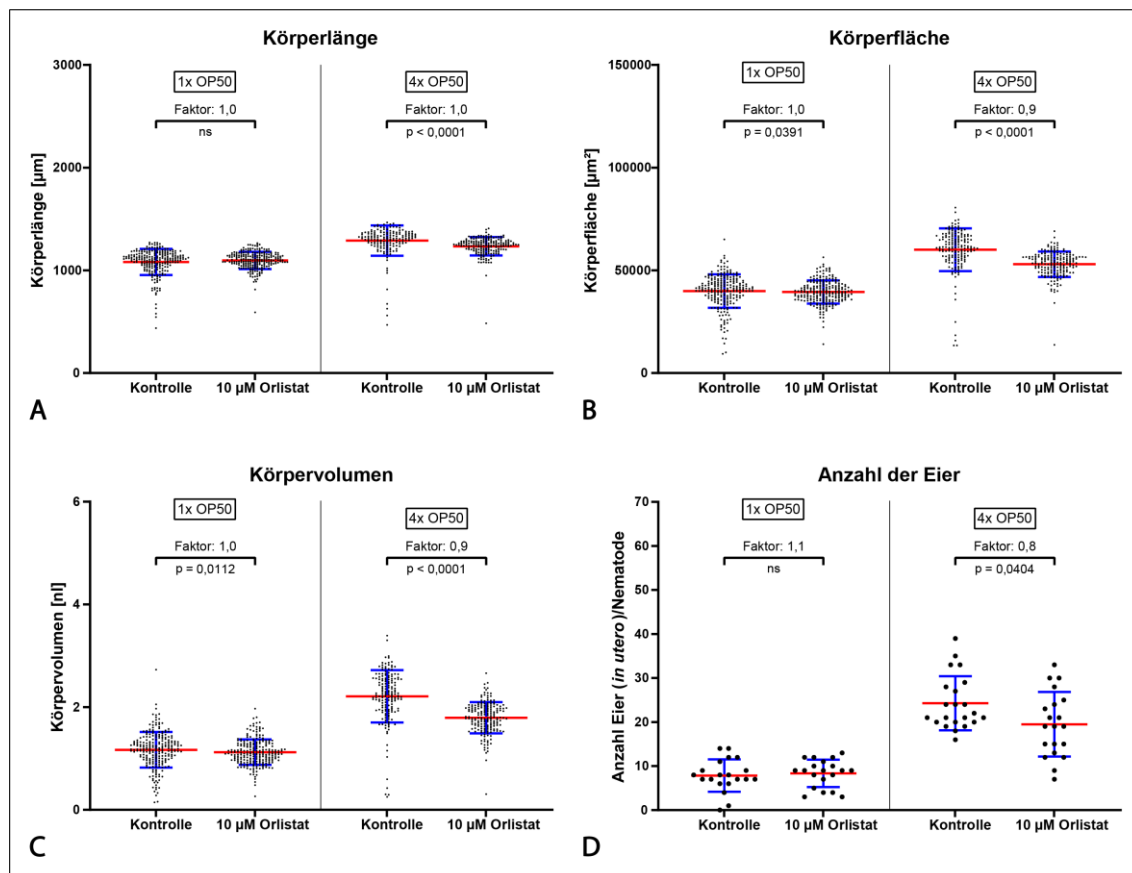


**Abbildung 23:** Durchlicht-Aufnahmen von Orlistat-behandelten *C. elegans*-Wildtypen (N2) nach dreitägiger Kultivierung.

L1-Larven wurden mit 1x OP50 oder 4x OP50 und jeweils 0,2 % DMSO (Kontrolle) oder 10  $\mu$ M Orlistat für drei Tage (3 d) gefüttert. Abgebildet sind repräsentative Aufnahmen von Nematoden der unterschiedlich gefütterten, Kontroll- und Orlistat-behandelten Populationen, die die Orlistat-Effekte auf die Entwicklung und die Anzahl intrauteriner Eier verdeutlichen. Die Durchlicht-Aufnahmen erfolgten am ZOE™ Fluorescent Imager (20x/0,4-Objektiv, 175x-Vergrößerung) (Bio-Rad).

Die quantitative Auswertung der Eizahl anhand der Durchlicht-Aufnahmen (ZOE™ Fluorescent Imager) zeigte im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle allerdings keinen signifikanten Effekt auf die Eizahl durch die Orlistat-Behandlung in mageren Nematoden ( $8 \pm 3$  Eier/Nematode), sondern nur in fetten Nematoden (Diagramm 30 D). Fette DMSO-Kontrollnematoden trugen im Mittel  $24 \pm 6$  Eier und fette, Orlistat-behandelte Nematoden hingegen nur  $20 \pm 7$  Eier. Die verringerte Eizahl *in utero* prägte sich auch lediglich in der Körperfläche und im berechneten Körpervolumen der fetten, Orlistat-behandelten Nematoden aus (Diagramm 30 B und Diagramm 30 C). Demnach

fürte die Orlistat-Behandlung in fetten Nematoden zu einer Reduzierung der Körperfläche um 12 % und des Körpervolumens um 19 %.

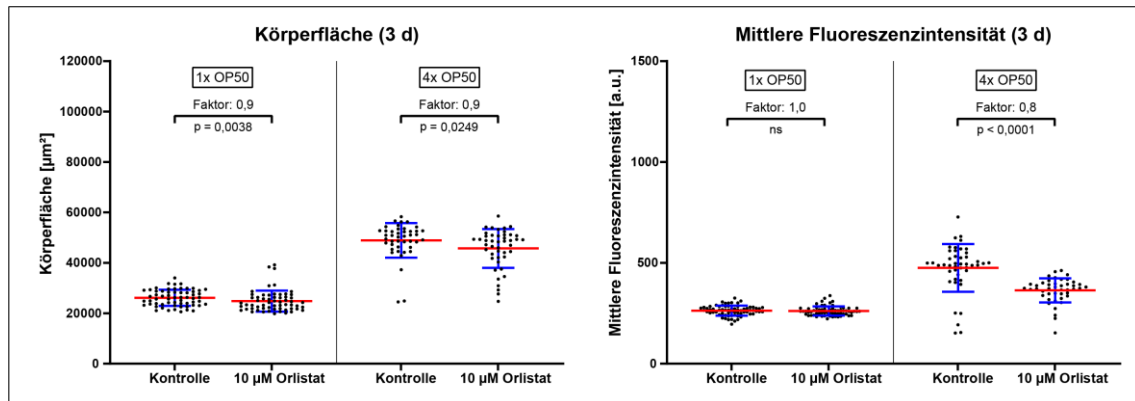


**Diagramm 30: Effekt von Orlistat auf die Körpergröße und die Anzahl der Eier (*in utero*) von *C. elegans*-Wildtypen (N2) nach dreitägiger Kultivierung.**

L1-Larven wurden mit 1x OP50 oder 4x OP50 und jeweils 0,2 % DMSO (Kontrolle) oder 10 µM Orlistat für drei Tage gefüttert. Die Körperlängen (A) und -flächen pro Nematode (B) wurden anhand von Durchlicht-Aufnahmen (Opera Phenix, PerkinElmer) mit der Software Wormdetector (Nils Körper, BfR) bestimmt. Die Körpervolumina pro Nematode (C) wurden approximiert nach der Volumenformel eines Zylinders berechnet. Die Anzahl der Eier im Nematoden (D) wurde durch Auszählung der Eier anhand von Durchlicht-Aufnahmen (ZOETM Fluorescent Imager) bestimmt. Die Datenpunkte repräsentieren die jeweiligen Körperparameter pro Nematode (N = 167 – 233 Nematoden) und Anzahl der Eier pro Nematode (*in utero*) (N = 20 – 22 Nematoden) aus drei unabhängigen Versuchen. Statistik: Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen, Mann Whitney U-Test,  $p \leq 0,05$ , ns = nicht signifikant.

### 4.3.2 Einfluss von Orlistat auf den Fett- bzw. Triglyceridgehalt

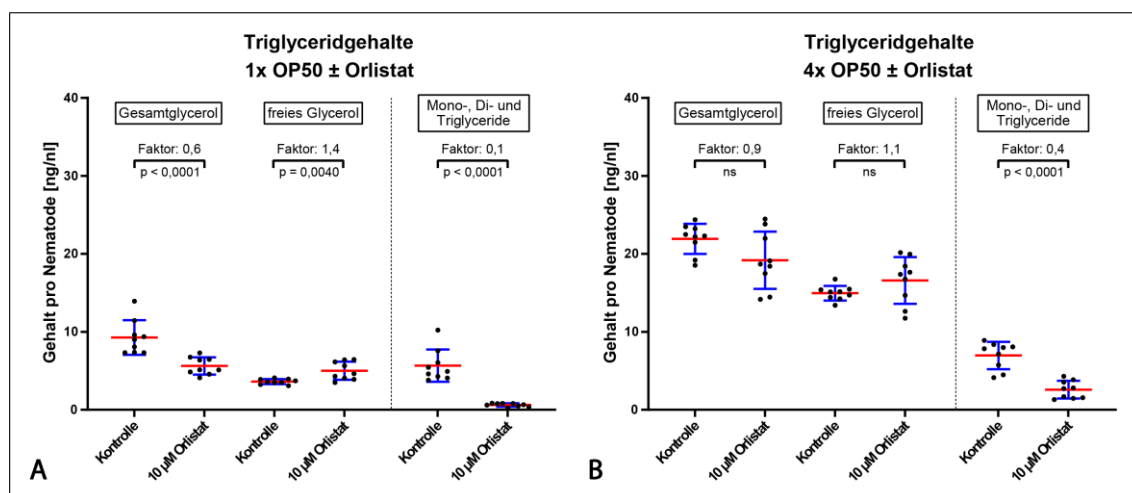
Der Orlistat-Effekt auf den Fettgehalt der Wildtypen wurde zunächst mit der Nile Red (NR)-Färbemethode überprüft. Diese zeigte für beide, durch unterschiedliche Futtermengen generierte Fettphänotypen kaum oder nur einen geringfügigen Orlistat-Effekt auf die Körperfläche. Der Fett-reduzierende Effekt durch Orlistat wurde mit der NR-Färbung nur in fetten Nematoden durch verringerte Fluoreszenzsignale indiziert (Diagramm 31).



**Diagramm 31: Effekte von Orlistat auf die Körperfläche und den Fettgehalt von *C. elegans*-Wildtypen (N2) nach dreitägiger Kultivierung.**

L1-Larven wurden mit 1x OP50 oder 4x OP50 und jeweils 0,2 % DMSO (Kontrolle) oder 10 µM Orlistat für drei Tage gefüttert (3 d). Nach der Nile Red-Färbung von fixierten Nematoden erfolgte die Bild-Aufnahme mit dem 5x-Luft-Objektiv (NA = 0,16) des Opera Phenix (PerkinElmer) in einer Ebene bei  $\lambda_{\text{Ex}} = 522 \text{ nm}$  /  $\lambda_{\text{Em}} = 488 \text{ nm}$ . Die anschließende automatisierte Auswertung erfolgte mit der Software Harmony (PerkinElmer). Die dargestellten Datenpunkte repräsentieren jeweils die Körperfläche pro Nematode und die mittlere Fluoreszenzintensität pro Nematode (Körperfläche), angegeben in *arbitrary units* (a. u.), aus einem Versuch (N = 43 – 61 Nematoden). Statistik: Mann Whitney U-Test,  $p \leq 0,05$ , ns = nicht signifikant.

Bei der Bestimmung der Triglyceridgehalte zeigte sich der inhibierende Effekt von Orlistat auf die Fetteinlagerung anhand von verringerten Triglyceridgehalten sowohl in mageren, als auch in fetten Nematoden (Diagramm 32). Dabei war eine auffällig drastische Reduzierung der Triglyceridgehalte nach der Orlistat-Behandlung zu beobachten. Die Werte nahmen im Mittel entsprechend von  $5,7 \pm 2,1 \text{ ng TAG/nl}$  (DMSO-Kontrolle) zu  $0,6 \pm 0,2 \text{ ng TAG/nl}$  (10 µM Orlistat) (Reduktion um 90 %) in mageren Nematoden (Diagramm 32 A) und von  $7 \pm 1,8 \text{ ng TAG/nl}$  zu  $2,6 \pm 1,1 \text{ ng TAG/nl}$  (Reduktion um 60 %) in fetten Nematoden ab (Diagramm 32 B). Darüber hinaus bewirkte die Orlistat-Behandlung scheinbar eine geringfügige Erhöhung der freien Glycerolmengen pro Körpervolumen in mageren Nematoden (Diagramm 32 A).

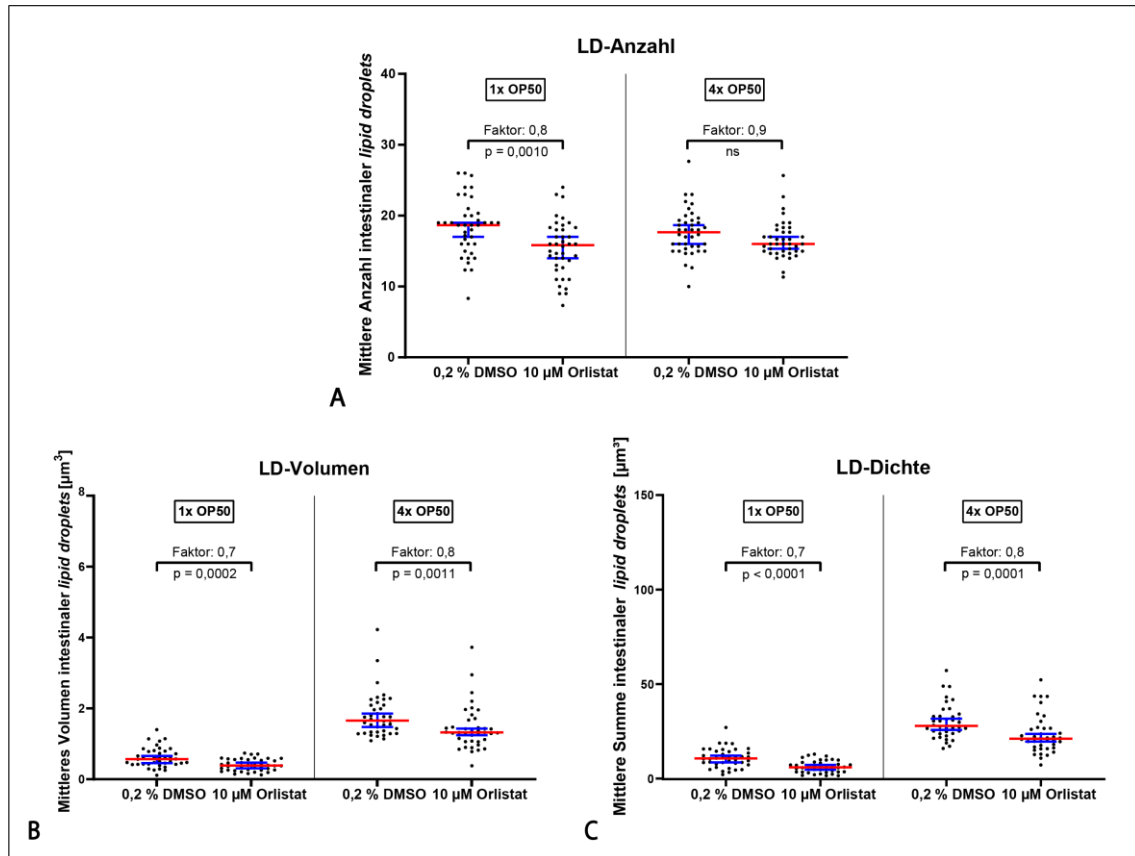


**Diagramm 32:** Effekte von Orlistat auf die Triglyceridgehalte von *C. elegans*-Wildtypen (N2) nach dreitägiger Kultivierung.

L1-Larven wurden mit 1x OP50 oder 4x OP50 und jeweils 0,2 % DMSO (Kontrolle) oder 10 µM Orlistat für drei Tage gefüttert. Die Gesamtglycerol- und freien Glycerolgehalte wurden mittels des Triglycerid-Assays (Sigma-Aldrich) gemessen und die Triglyceridgehalte durch Subtraktion beider Werte berechnet. Die Datenpunkte repräsentieren entsprechende Gehalte pro Nematode (Körpervolumen) aus drei unabhängigen Versuchen mit technischen Triplikaten (N = 8 – 9 Proben). Statistik: Mittelwert ± Standardabweichung, Mann Whitney U-Test,  $p \leq 0,05$ , ns = nicht signifikant.

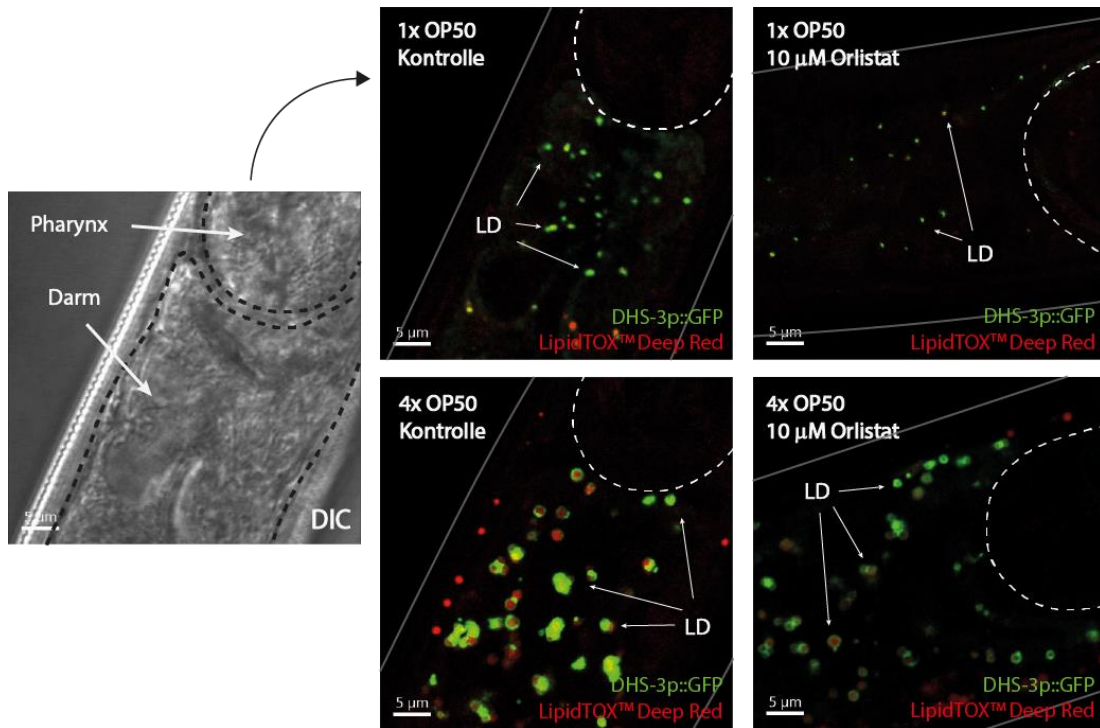
#### 4.3.3 Einfluss von Orlistat auf intestinale *lipid droplets*

Die Analyse der *lipid droplets* im anterioren Darmbereich spiegelte ebenfalls die Fett-reduzierende Wirkung von Orlistat wider. Eine Verringerung der mittleren Anzahl der LD war hierbei zwar nur in den mageren Nematoden zu sehen (um 16 %), die mittlere LD-Größe sowie die mittlere Summe der LD-Volumina waren im Median jedoch in beiden Fettphänotypen signifikant reduziert (Diagramm 33 B und C). Dabei lagen der Median der mittleren LD-Größe der mageren DMSO-Kontrollnematoden bei  $0,6 \mu\text{m}^3$  ( $0,4 - 0,8$ ) und der entsprechenden Orlistat-behandelten Nematoden bei  $0,4 \mu\text{m}^3$  ( $0,3 - 0,6$ ). Orlistat verringerte in fetten Nematoden die mittlere LD-Größe mit medianen Werten von  $1,7 \mu\text{m}^3$  ( $1,3 - 2,1$ ) auf  $1,3 \mu\text{m}^3$  ( $1,1 - 1,6$ ) (Diagramm 33 B). Die mittlere Summe der LD-Volumina reduzierte sich im Median nach der Orlistat-Behandlung in mageren Nematoden entsprechend von  $10,7 \mu\text{m}^3$  ( $7,8 - 14,5$ ) auf  $6 \mu\text{m}^3$  ( $3,5 - 8,5$ ) und in fetten Nematoden von  $27,9 \mu\text{m}^3$  ( $24,1 - 33,9$ ) auf  $21,2 \mu\text{m}^3$  ( $16,4 - 26,6$ ) (Diagramm 33 C). Repräsentative Bild-Aufnahmen (Airy Scan LSM 880) von unbehandelten und Orlistat-behandelten, mageren und fetten Nematoden sind in Abbildung 24 gezeigt.



**Diagramm 33: Effekte von Orlistat auf die intestinalen lipid droplets von LIU1-Nematoden nach dreitägiger Kultivierung.**

L1-Larven des transgenen LIU1-Stammes [dhs-3p::dhs-3::GFP + unc-76(+)] wurden mit 1x OP50 oder 4x OP50 und jeweils 0,2 % DMSO (Kontrolle) oder 10 µM Orlistat für drei Tage gefüttert, fixiert und anschließend mit LipidTOX™ Deep Red (1:1000) gefärbt. Es erfolgte die Aufnahme des anterioren Darmbereich der LIU1-Nematoden mit dem 63x-Öl-Objektiv (NA = 1,4) des Airy Scan LSM880 (Zeiss) im Differentialinterferenzkontrast (DIC), bei  $\lambda_{\text{Ex}} = 488 \text{ nm}$  /  $\lambda_{\text{Em}} = 545 \text{ nm}$  und im bei  $\lambda_{\text{Ex}} = 633 \text{ nm}$  /  $\lambda_{\text{Em}} = 692 \text{ nm}$ . Die Anzahl, Größe und Dichte von lipid droplets (LD) wurde in drei definierten Bereichen ( $698 \mu\text{m}^3$ ) des anterioren Darmabschnitts mit der Software Imaris x.64 (Oxford Instruments) bestimmt und die Durchschnittswerte gemittelt. Die Datenpunkte repräsentieren die mittlere Anzahl (A), das mittlere Volumen (B) und die mittlere Dichte (Summe der Volumina) (D) intestinaler LD pro Nematode aus vier unabhängigen Versuchen (N = 40 Nematoden). Statistik: Median  $\pm$  95 % Konfidenzintervall, Mann Whitney U-Test,  $p \leq 0,05$ , ns = nicht signifikant.



**Abbildung 24: Effekte von Orlistat auf die intestinalen lipid droplets von unterschiedlich gefütterten LIU1-Nematoden nach dreitägiger Kultivierung.**

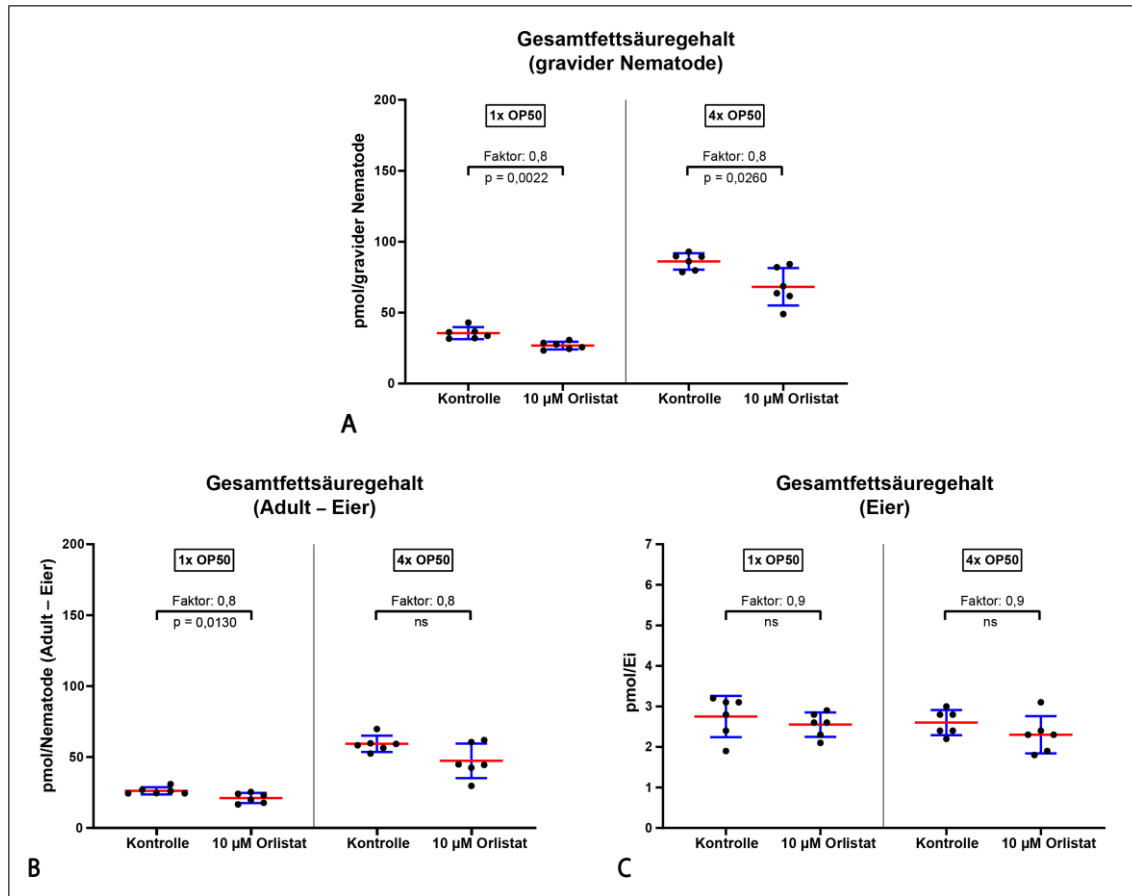
L1-Larven des transgenen LIU1-Stammes [*dhs-3p::dhs-3::GFP + unc-76(+)*] wurden mit 1x OP50 oder 4x OP50 und jeweils 0,2 % DMSO (Kontrolle) oder 10 µM Orlistat für drei Tage gefüttert, fixiert und anschließend mit LipidTOX™ Deep Red (1:1000) gefärbt. Die Aufnahme des anterioren Darmabschnitts der Nematoden erfolgte mit dem 63x-Öl-Objektiv (NA = 1,4) des Airy Scan LSM880 (Zeiss) im Differentialinterferenzkontrast (DIC), bei  $\lambda_{Ex} = 488 \text{ nm}$  /  $\lambda_{Em} = 545 \text{ nm}$  und bei  $\lambda_{Ex} = 633 \text{ nm}$  /  $\lambda_{Em} = 692 \text{ nm}$ . Dargestellt sind die mit dem grün-fluoreszierenden Protein GFP-gekoppelten intestinalen lipid droplets (LD) und mit LipidTOX™ Deep Red gefärbten Gesamt-LD im Querschnitt des anterioren Nematoden-Darms.

#### 4.3.4 Einfluss von Orlistat auf Fettsäuregehalt und-muster von adulten *C. elegans* und der Eier

Im Folgenden wurde der Effekt von Orlistat auf die Fettsäuremuster in mageren und fetten Wildtypen analysiert. Die quantitative Bestimmung mittels GC-MS zeigte ebenfalls die Beeinflussung der Fettsäuregehalte durch Orlistat in beiden Fettphänotypen. In graviden Nematoden beider Futtermengenregime waren die Gesamtfettsäuremengen durch Orlistat signifikant verringert (Diagramm 34 A): Die Abnahme der mittleren Fettsäuremengen von  $35,3 \pm 4,2 \text{ pmol FS/graviden Nematoden}$  zu  $26,8 \pm 2,7 \text{ pmol FS/graviden Nematoden}$  (magerer Nematode) und von  $86,1 \pm 5,8 \text{ pmol FS/graviden Nematoden}$  zu  $68,2 \pm 13,3 \text{ pmol FS/graviden Nematoden}$  (fetter Nematode). Die Messung der Fettsäuregehalte in den Eiern zeigte, dass weder die Futtermenge, die die parentalen Nematoden während des Heranreifens zu adulten Nematoden erhielten, noch die Orlistat-Behandlung einen signifikanten Effekt auf den FS-Gehalt der Eier hatte (Diagramm 34 C). Die Eier nahmen bis zu 30 % des Gesamtfettgehalts der graviden Nematoden (unbehandelt und Orlistat-behandelt) ein, wobei die mittleren, absoluten FS-Gehalte der Eier zwischen  $2,3 - 2,8 \text{ pmol FS/Ei}$  lagen (Diagramm 34 C). Bei rechnerischer Subtraktion der Fettsäuregehalte der Eier vom Gesamtfettsäuregehalt graviden Nematoden, war der Fett-



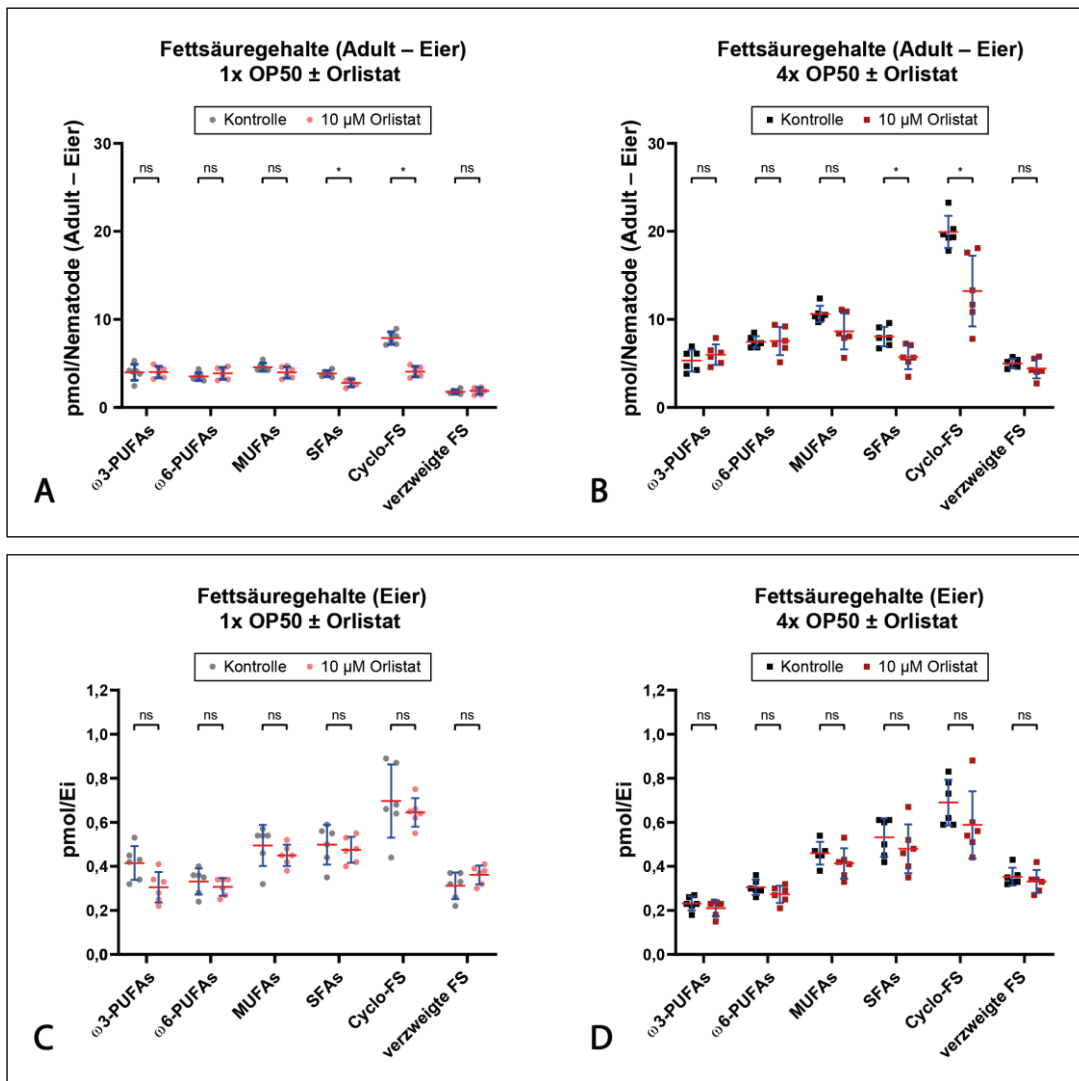
reduzierende Effekt von Orlistat in 1x OP50 und 4x OP50-gefütterten Nematoden nicht signifikant, wies aber einen Trend hin zu einer Verringerung des FS-Gehalts auf (Diagramm 34 B).



**Diagramm 34: Einfluss von Orlistat auf den Gesamtfettsäuregehalt von *C. elegans*-Wildtypen (N2) und der zugehörigen Eier nach dreitägiger Kultivierung.**

L1-Larven wurden mit 1x OP50 oder 4x OP50 und jeweils 0,2 % DMSO (Kontrolle) oder 10 µM Orlistat für drei Tage gefüttert. Die Gesamtfettsäuregehalte von graviden Nematoden und aus graviden Nematoden isolierten Eiern wurden über die Gaschromatographie-gekoppelte Massenspektrometrie (GC-MS) bestimmt. Die Datenpunkte repräsentieren die mittleren Gesamtfettsäuregehalte pro gravidem Nematoden (A) und pro Ei (C), sowie die rechnerisch ermittelten mittleren Gesamtfettsäuregehalte pro Nematode (Adult - Eier) (B) aus zwei unabhängigen Versuchen mit technischen Triplikaten (N = 6 Proben). Statistik: Mittelwerte ± Standardabweichungen, Mann Whitney U-Test:  $p \leq 0,05$ , ns = nicht signifikant.

Darüber hinaus beeinflusste Orlistat auch das FS-Mengen der Nematoden, wobei die Mengen an SFAs und Cyclo-FS sowohl in mageren, als auch fetten Nematoden signifikant vermindert waren (Diagramm 35 A und Diagramm 35 B). Der Gesamtfettsäuregehalt der Eier magerer und fetter Nematoden schien durch die Orlistat-Behandlung nicht beeinflusst zu sein, wobei die Analyse der FS-Zusammensetzung keine signifikante, jedoch tendenzielle Reduzierungen der einzelnen Fettsäuremengen indizierte (Diagramm 35 C und Diagramm 35 D).

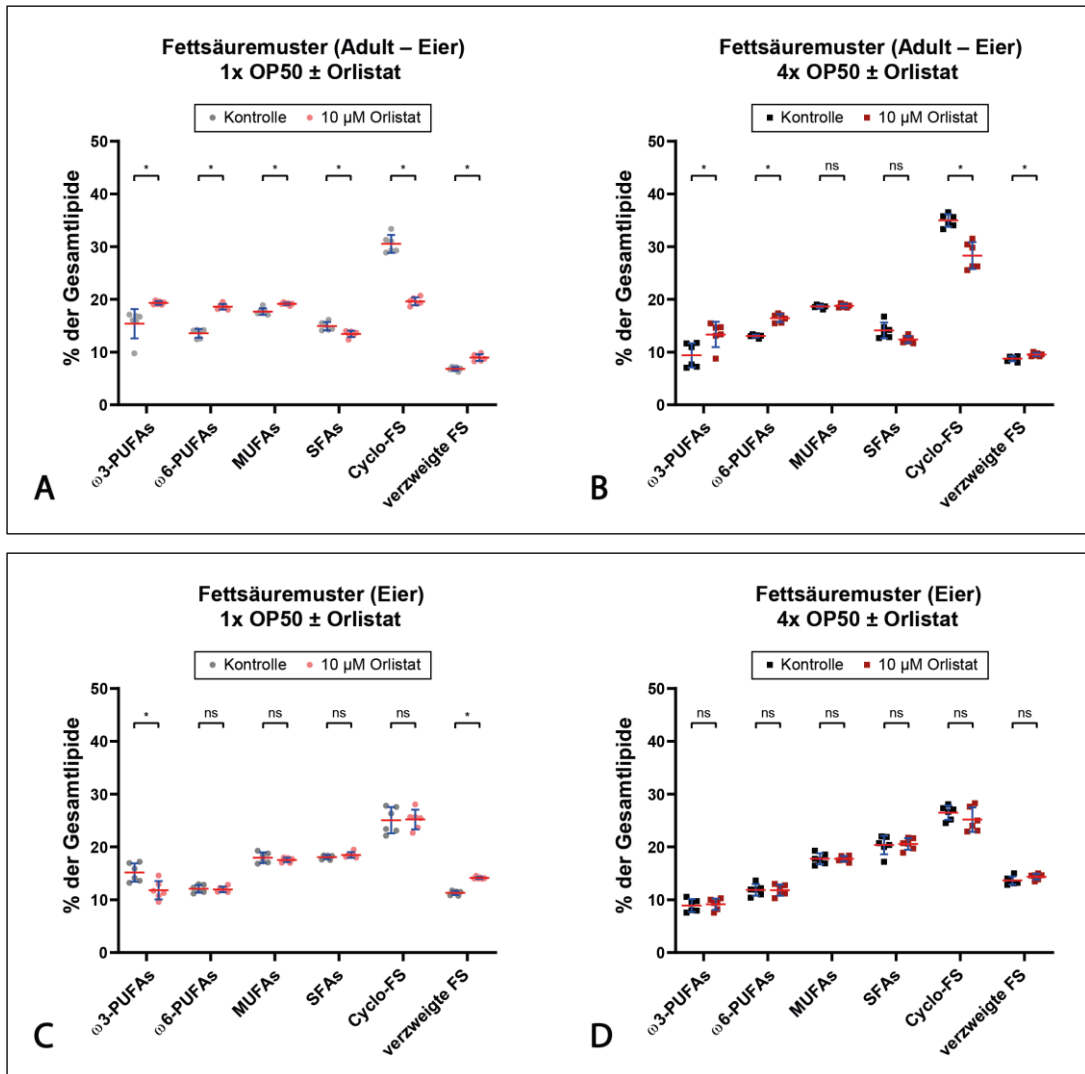


**Diagramm 35: Einfluss von Orlistat auf die absoluten Fettsäuregehalte einzelner Fettsäuregruppen von *C. elegans*-Wildtypen (N2) und zugehörigen Eier nach dreitägiger Kultivierung.**

L1-Larven wurden mit 1x OP50 oder 4x OP50 und jeweils 0,2 % DMSO oder 10 µM Orlistat für drei Tage gefüttert. Die Gesamtfettsäuregehalte von graviden unbehandelten und Orlistat-behandelten Nematoden und aus graviden unbehandelten und Orlistat-behandelten Nematoden isolierten Eiern wurden über die Gaschromatographie-gekoppelte Massenspektrometrie (GC-MS) bestimmt. Die Datenpunkte repräsentieren die rechnerisch ermittelten gruppierten mittleren Fettsäuregehalte pro Nematoden (Adult-Eier) (A – B) und pro Ei (C – D) aus zwei unabhängigen Versuchen mit technischen Triplikaten (N = 6 Proben). Statistik: Mittelwerte Standardabweichungen, t-Test mit Korrektur für multiple Vergleiche über die Holm-Sidak-Methode: \*p ≤ 0,05, ns = nicht signifikant.

Die prozentuellen Anteile einzelner Fettsäuregruppen von den Gesamtlipiden waren ebenfalls in den Nematoden und den Eiern durch Orlistat signifikant verändert (Diagramm 36). Die generell hohen relativen Anteile an ungesättigten FS (MUFAs, ω3- und ω6-PUFAs), im Gegensatz zu geringen SFA- bzw. Cyclo-FS-Anteilen, wurden in mageren Nematoden durch die Orlistat-Behandlung zusätzlich erhöht (Diagramm 36 A). Diese Zunahme ging einher mit einer signifikanten Erhöhung auch von verzweigten FS, während die relativen Anteile der SFAs und Cyclo-FS dahingegen verringert waren. Eine ähnliche Umverteilung der Fettsäureanteile im Gesamtlipidhaushalt war in den fetten Nematoden zu beobachten, jedoch mit Ausnahme der MUFA- und SFA-Anteile (Diagramm 36 B). Bei der Betrachtung der Eier zeigte sich lediglich eine signifikante Änderung der

FS-Anteile in den Eiern magerer Nematoden, die eine Verringerung der  $\omega$ 3-PUFA und eine Erhöhung der verzweigten FS durch die Orlistat-Behandlung der Nematoden aufwiesen (Diagramm 36 C).



**Diagramm 36: Einfluss von Orlistat auf das Fettsäuremuster von *C. elegans*-Wildtypen (N2) und der zugehörigen Eier nach dreitägiger Kultivierung.**

L1-Larven wurden mit 1x OP50 oder 4x OP50 und jeweils 0,2 % DMSO oder 10 µM Orlistat für drei Tage gefüttert. Die Gesamtfettsäuregehalte von graviden unbehandelten und Orlistat-behandelten Nematoden und aus graviden unbehandelten und Orlistat-behandelten Nematoden isolierten Eiern wurden über die Gaschromatographie-gekoppelte Massenspektrometrie (GC-MS) bestimmt. Die Datenpunkte repräsentieren die relativen Fettsäuregehalte im Gesamtlipidgehalt (Fettsäuremuster) in den Nematoden (Adult-Eier) (A – B) und den Eiern (C – D) aus zwei unabhängigen Versuchen mit technischen Triplikaten (N = 6 Proben). Statistik: Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen, t-Test mit Korrektur für multiple Vergleiche über die Holm-Sidak-Methode: \*p  $\leq$  0,05, ns = nicht signifikant.

Bei der Betrachtung ungesättigter FS verursachte Orlistat ebenfalls eine Verschiebung in den  $\omega$ 6/ $\omega$ 3-PUFA- und MUFA/PUFA-Verhältnissen, die der Tabelle 3 entnommen werden können. Die Orlistat-Behandlung bewirkte in mageren, adulten Nematoden keine Veränderung des  $\omega$ 6-zu- $\omega$ 3-PUFA-Verhältnisses, während in fetten, adulten Nematoden eine tendenzielle Verringerung des Verhältnisses zu beobachten war (Tabelle 3). Das MUFA-zu-PUFA-Verhältnis hingegen war durch Orlistat in beiden Fettphänotypen signifikant verringert. In den Eiern waren die beiden FS-Verhältnisse lediglich durch die Orlistat-Behandlung magerer Nematoden verändert und prägten

sich durch eine signifikante Erhöhung des  $\omega$ 6-zu- $\omega$ 3-PUFA-Verhältnisses und ein tendenziell gesteigertes MUFA-zu-PUFA-Verhältnis aus (Tabelle 3).

**Tabelle 3: Fettsäureverhältnisse in drei Tage alten, unterschiedlich gefütterten und Orlistat-behandelten *C. elegans* (Adult – Eier) und in den zugehörigen Eiern**

adulte Nematoden (Adult – Eier)				
	1x OP50		4x OP50	
	Kontrolle	10 $\mu$ M Orlistat	Kontrolle	10 $\mu$ M Orlistat
$\omega$ 6/ $\omega$ 3-PUFA	<b>0,92 <math>\pm</math> 0,25</b>	<b>0,96 <math>\pm</math> 0,03</b>	<b>1,46 <math>\pm</math> 0,34</b>	<b>1,27 <math>\pm</math> 0,29</b>
MUFA/PUFA	<b>0,62 <math>\pm</math> 0,09</b>	<b>0,50* <math>\pm</math> 0,01</b>	<b>0,84 <math>\pm</math> 0,10</b>	<b>0,64* <math>\pm</math> 0,07</b>
Eier				
	1x OP50		4x OP50	
	Kontrolle	10 $\mu$ M Orlistat	Kontrolle	10 $\mu$ M Orlistat
$\omega$ 6/ $\omega$ 3-PUFA	<b>0,80 <math>\pm</math> 0,04</b>	<b>1,03* <math>\pm</math> 0,12</b>	<b>1,34 <math>\pm</math> 0,16</b>	<b>1,30 <math>\pm</math> 0,08</b>
MUFA/PUFA	<b>0,66 <math>\pm</math> 0,06</b>	<b>0,74 <math>\pm</math> 0,08</b>	<b>0,86 <math>\pm</math> 0,05</b>	<b>0,85 <math>\pm</math> 0,07</b>

dargestellt sind **Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen** aus zwei unabhängigen Versuchen (N = 6 Proben), \*signifikant mit  $p \leq 0,05$  (Mann Whitney U-Test), Signifikanzen beziehen sich auf die jeweilige Kontrolle (0,2 % DMSO)

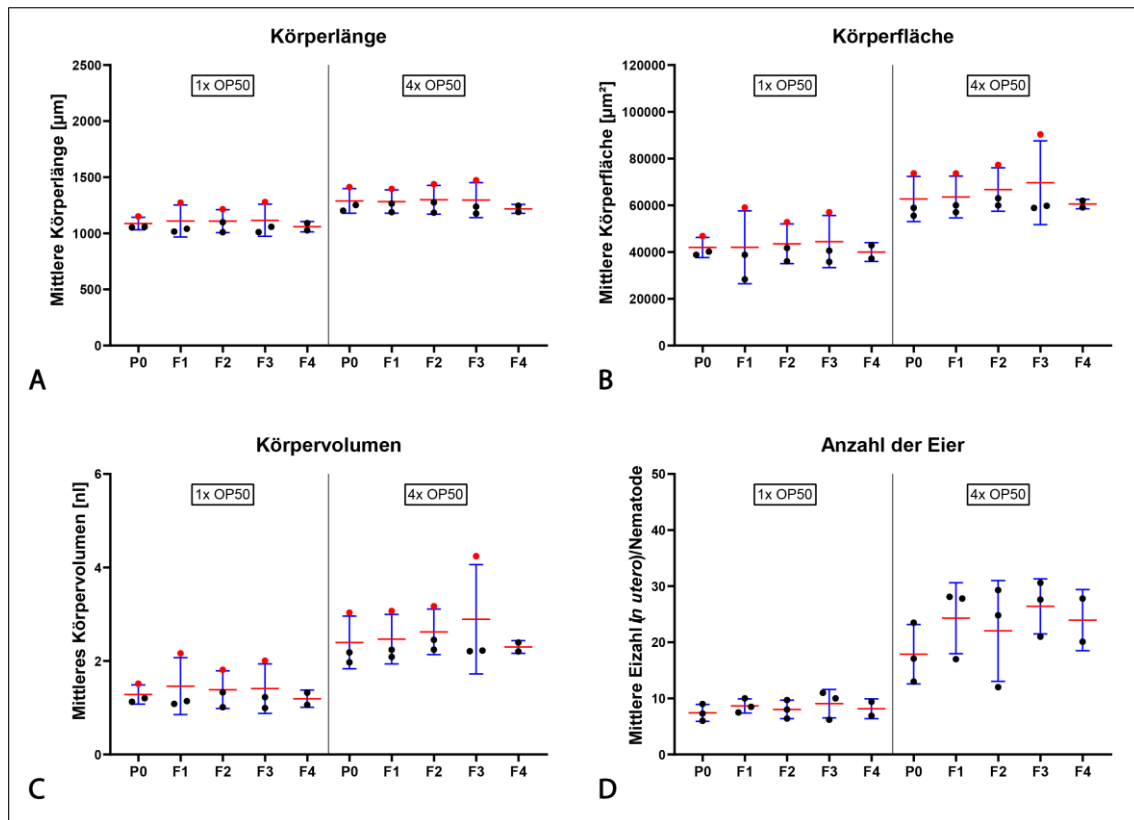
#### 4.4 Einfluss der Futtermengen-induzierten Fettgehalte von *C. elegans* auf den Fettgehalt der Folgegenerationen

Im letzten Teil der Arbeit wurde die Weitergabe von Fettmetabolismus-assozierten Effekten in die Folgegenerationen untersucht. Aus den vorherigen Untersuchungen ging hervor, dass eine vermehrte Futtergabe in einem erhöhten Fettgehalt resultierte. Die Veränderung der Futtermenge (Erhöhung oder Verringerung) wurde daher als externer Stimulus angesehen und der Effekt anhand der jeweiligen Fettgehalte in den Folgegenerationen näher analysiert. Dabei wurde zwischen der multigenerationalen und der intergenerationalen Effektweitergabe unterschieden. Die zuvor aufgeführten Methoden zur Fettbestimmung in *C. elegans* zeigten eine gute Korrelation zwischen den jeweiligen Messparametern, weswegen für die Analyse des Fettgehalts der Nematoden mehrerer Generationen eine Methodik ausgewählt wurde, die das Fett quantitativ gut abbildete und für einen hohen Durchsatz geeignet war: der Triglycerid-Assay. Dargestellt werden im Folgenden lediglich die Triglyceridgehalte der Nematoden. Die entsprechenden Daten der Gesamtglycerol- und freien Glycerolmenge sind dem Anhang zu entnehmen.

##### 4.4.1 Einfluss der kontinuierlichen, vermehrten Futtergabe auf den Fettgehalt der Folgegenerationen (multigenerationale Exposition)

Für die multigenerationale Studie wurde die Hypothese aufgestellt, dass eine anhaltende Ernährungsumstellung durch eine Futtermengenerhöhung von 1x OP50 auf 4x OP50, beginnend von der parentalen Generation über mehrere Folgegenerationen, bestimmte Effekte auf den Fetthaushalt der Nematoden der jeweiligen nachfolgenden Generationen auslöst. Dabei wurde die Fütterung einer 1-fachen OP50-Futtermenge als Ausgangspunkt angenommen.

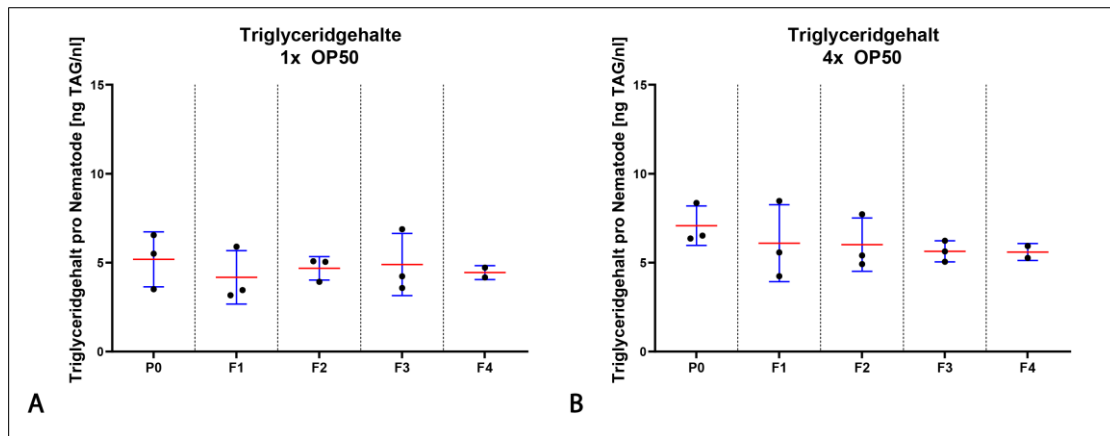
Für die Untersuchung erhielt die Elterngeneration P0 entweder 1x OP50 oder erstmalig 4x OP50. Über mindestens drei Folgegenerationen (F1 – F3) wurden die Nematoden jeweils kontinuierlich mit derselben Futtermenge gefüttert, und die Fettgehalte der Nematoden anhand der Triglyceridgehalte bestimmt (multigenerationale Exposition). Die kontinuierliche, erhöhte Fütterung mit 4x OP50 über mindestens vier Generationen zeigte zunächst weder einen signifikanten Einfluss auf die Körpergrößen, noch auf Anzahl der Eier in den Folgegenerationen F1 – F4 (Diagramm 37 A – D). Bei der Betrachtung der Generationen, die mit gleichbleibender 1x OP50 Futtermenge gefüttert wurden, blieben die zuvor genannten Parameter reproduzierbar stabil. Bei der Körpergrößenbestimmung ist anzumerken, dass die Daten aus einem Versuch sich auf die Ausmessung anhand von ZOE<sup>TM</sup>-Bild-Aufnahmen beziehen. Durch die methodisch bedingte Aufnahme der unter dem Deckgläschen zusammengedrückten Nematodenkörper, wurden Körperflächen und folglich berechneten Körpervolumina eher überschätzt (im Diagramm 37 rot markiert).



**Diagramm 37: Multigenerationale Effekte einer erhöhten Futtermenge auf die Körpergröße und Anzahl der Eier von adulten *C. elegans*-Wildtypen (N2).**

L1-Larven wurden kontinuierlich mit 1x OP50 oder kontinuierlich mit 4x OP50 über mehrere Generationen gefüttert (P0 – F4). Die Körperlängen und -flächen pro Nematode wurden anhand von Durchlicht-Aufnahmen vom ZOE™ Fluorescent Imager (Bio-Rad) oder Opera Phenix (PerkinElmer) mit der Software Wormdetector (Nils Körper, BfR) bestimmt und die Körpervolumina pro Nematode approximiert nach der Volumenformel eines Zylinders berechnet. Die Anzahl der Eier im Nematoden (D) wurde durch Auszählung der Eier anhand von Durchlicht-Aufnahmen (ZOE™ Fluorescent Imager) bestimmt. Die Datenpunkte repräsentieren die jeweiligen mittleren Körperparameter pro Nematode (A – C: N = 57 – 117 Nematoden) und die mittlere Anzahl der Eier (*in utero*) pro Nematode (D: N = 10 – 30 Nematoden) aus drei unabhängigen Versuchen. Statistik: Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen, Kruskal Wallis-Test, \* $p \leq 0,05$ .

Bei der Triglyceridgehaltsbestimmung war kein signifikanter Unterschied im Fettgehalt der jeweiligen Folgegenerationen durch die kontinuierliche Gabe einer 4-fachen Futtermenge zu erkennen (Diagramm 38 B). Ein Trend hin zu einer Fettgehaltsänderung war ebenfalls nicht ersichtlich, zumindest nicht mit der vorliegenden Anzahl an biologischen Replikaten ( $n = 3$  mit technischen Triplikaten). Der Unterschied zwischen den Fettgehalten der Nematoden beider Futtermengen innerhalb der jeweiligen Generationen war zwar nicht signifikant, allerdings ließ sich in den mit 4x OP50 gefütterten Nematoden aller Folgegenerationen weiterhin ein Trend hin zu höheren Triglyceridwerten gegenüber den mit 1x OP50 gefütterten Nematoden der gleichen Generation ausmachen (Diagramm 38 A und B).



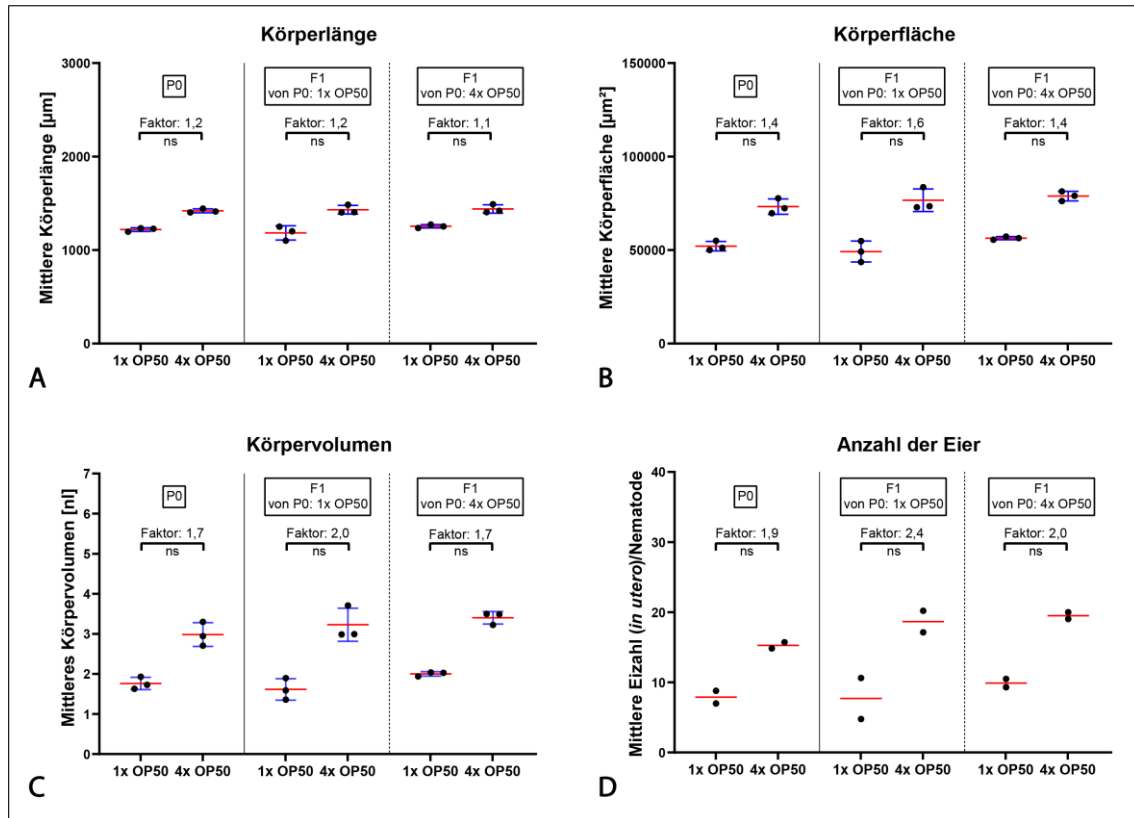
**Diagramm 38: Multigenerationale Effekte einer erhöhten Futtermenge auf die Triglyceridgehalte von adulten *C. elegans*-Wildtypen (N2).**

L1-Larven wurden kontinuierlich mit 1x OP50 (A) oder kontinuierlich mit 4x OP50 (B) über mehrere Generationen gefüttert (P0 – F4). Die Gesamtglycerol- und freien Glycerolgehalte wurden mittels des Triglycerid-Assays (Sigma-Aldrich) gemessen und die Triglyceridgehalte durch Subtraktion beider Werte berechnet. Die Datenpunkte repräsentieren entsprechende Mittelwerte von Triplikaten der Triglyceridgehalte pro Nematode (Körpervolumen) aus drei unabhängigen Versuchen. Statistik: Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen, bedingter t-Test (lineares gemischtes Modell), \* $p \leq 0,05$ .

#### 4.4.2 Einfluss der erhöhten Futtermenge in der parental Generation auf den Fettgehalt der Folgegeneration (intergenerationale Exposition)

Im nächsten Ansatz wurde die intergenerationale Effektvererbung der erhöhten Futtermenge auf den Fettgehalt der Wildtypen beleuchtet. Dazu wurde untersucht, ob ein Futtermengen-assoziiertes Effekt auf den Fettgehalt der direkten Nachkommen (F1) von der Elterngeneration P0 induzierbar war, wenn die P0 erstmalig einer 4-fachen Futtermenge exponiert war und F1-Generation beginnend ab dem L1-Stadium die 1-fache Futtermenge erhielt (*rechallenge*). Als Referenz dazu wurden Nematoden der F1-Generation ebenfalls mit 4x OP50 gefüttert. Als zusätzlicher Vergleich zu der erhöhten Futtermengen-Exposition wurden nicht-exponierte Nematoden von P0 (mit 1x OP50 gefüttert) parallel mitgeführt, deren F1-Generation ebenfalls mit jeweils einer der beiden Futtermengenooptionen kultiviert wurden.

Da die P0-Generation während der gesamten Entwicklung mit einer erhöhten Futtermenge gefüttert wurde, waren auch die Keimzellen der parental Nematoden der erhöhten Futtermenge exponiert. Durch die bestehende Exposition während der Reifung zum adulten Nematoden und der Produktion der Nachkommen waren folglich auch die Eier (F1-Generation) der Nematoden indirekt der erhöhten Futtermenge exponiert, sodass die Hypothese abgeleitet wurde, dass die parentale 4-fache Futtermengenerfahrung potentiell Einfluss auf die Regulierung des Fettmetabolismus der F1-Generation nimmt. Diese Hypothese wurde jedoch nicht bestätigt. Die Exposition der erhöhten Futtermenge in der P0-Generation zeigte weder ein Effekt auf die Körpergröße, noch die Anzahl der Eier der 1x OP50-gefütterten F1-Generation (*rechallenge*) (Diagramm 39 A – D).

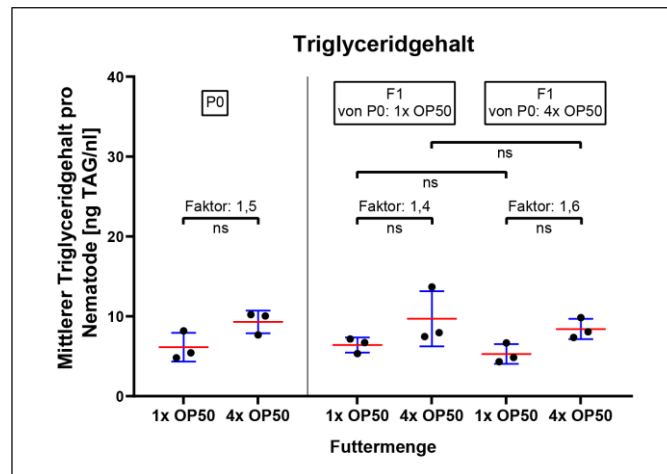


**Diagramm 39: Intergenerationale Effekte einer erhöhten Futtermenge auf die Körpergröße und Anzahl der Eier von *C. elegans*-Wildtypen (N2).**

L1-Larven der P0-Generation wurden mit 1x OP50 oder 4x OP50 für drei Tage gefüttert. Die L1-Larven der Folgegeneration (F1) von P0 (1x OP50), als auch von P0 (4x OP50) wurden anschließend jeweils mit 1x OP50 oder 4x OP50 für drei Tage gefüttert. Die Körperlängen und -flächen pro Nematode wurden anhand von Durchlicht-Aufnahmen vom ZOE™ Fluorescent Imager (Bio-Rad) oder Opera Phenix (PerkinElmer) mit der Software Wormdetector (Nils Körber, BfR) bestimmt und die Körpervolumina pro Nematoden approximiert nach der Volumenformel eines Zylinders berechnet. Die Anzahl der Eier im Nematoden wurde durch Auszählung der Eier anhand von Durchlicht-Aufnahmen (ZOE™ Fluorescent Imager) bestimmt. Die Datenpunkte repräsentieren die jeweiligen mittleren Körperparameter pro Nematode aus drei unabhängigen Versuchen (A – C: N = 67 – 91 Nematoden) und die mittlere Anzahl der Eier (*in utero*) pro Nematode aus zwei unabhängigen Versuchen (N = 60 Nematoden). Statistik: Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen, Mann Whitney U-Test,  $p \leq 0,05$ .

Anhand der Triglyceridgehalte war ebenfalls kein auffälliger Unterschied zwischen den 1x OP50-gefütterten F1-Generationen exponierter (*rechallenge*) und nicht-exponierter Elterngenerationen (P0) zu beobachten (Diagramm 40). Der Vergleich aller F1-Generationen, die mit derselben Futtermenge gefüttert wurden, zeigte, dass die Exposition einer erhöhten Futtermenge in der P0-Generation keine direkten Effekte auf alle betrachteten Parameter der Folgegeneration auslöste. Weiterhin konsistent war hingegen der Unterschied zwischen 1x OP50- und 4x OP50-gefütterten Nematoden, der in der Körpergröße sowie den Triglyceridgehalten innerhalb der jeweiligen Generationen zu sehen war (Diagramm 39 A – C und Diagramm 40). Zumindest in diesem Fütterungsmodell von *C. elegans* mit 1x OP50 und 4x OP50, zeigten sich anhand der vorliegenden Daten sowohl bei der multi- als auch intergenerationalen Exposition der erhöhten Futtermenge (4x OP50) keine Effekte auf die Körpergröße, Anzahl der Eier oder den Fettgehalt der Folgegenerationen.





**Diagramm 40: Intergenerationale Effekte einer erhöhten Futtermenge auf die Triglyceridgehalte von adulten *C. elegans*-Wildtypen (N2).**

L1-Larven der P0-Generation wurden mit 1x OP50 oder 4x OP50 für drei Tage gefüttert. Die L1-Larven der Folgegeneration (F1) von P0 (1x OP50), als auch von P0 (4x OP50) wurden anschließend jeweils mit 1x OP50 oder 4x OP50 für drei Tage gefüttert. Die Gesamtglycerol- und freien Glycerolgehalte wurden mittels des Triglycerid-Assays (Sigma-Aldrich) gemessen und die Triglyceridgehalte durch Subtraktion beider Werte berechnet. Die Datenpunkte repräsentieren entsprechende Mittelwerte von Triplikaten der Triglyceridgehalte pro Nematode (Körpervolumen) aus drei unabhängigen Versuchen. Statistik: Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen, bedingter t-Test (lineares gemischtes Modell),  $p \leq 0,05$ , ns = nicht signifikant.

## 5 Diskussion

### 5.1 Entwicklung eines optimierten Nile Red-Färbeprotokolls zur semiquantitativen Fettbestimmung in *C. elegans*

Zur Bestimmung des Fettes in *C. elegans* stehen unterschiedlichste mikroskopische und biochemische Nachweismethoden zur Verfügung (Clokey und Jacobson, 1986, Nan *et al.*, 2003, Cheng und Xie, 2004, Evans *et al.*, 2005, Elle *et al.*, 2010, Yen *et al.*, 2010, Zhang *et al.*, 2010b, Freudiger *et al.*, 2011, Klapper *et al.*, 2011, Castro *et al.*, 2012, Depuydt *et al.*, 2014, Wählby *et al.*, 2014, Fouad *et al.*, 2017, Gao *et al.*, 2017). Zusätzlich zur Quantifizierung von Fettgehalten und -zusammensetzungen, erlaubt der transparente Körper der Nematoden auch die Visualisierung des Fettes, welches in sogenannten *lipid droplets* gespeichert wird, und bietet somit zusätzliche Informationen über die Fettverteilung im Nematodenkörper (Riddle *et al.*, 1997b, Jones und Ashrafi, 2009). Die unterschiedlichen Methodiken mit ihren Schwächen und Limitationen, die teilweise abhängig von ihrer Durchführung sind, können der Tabelle 4 entnommen werden.

Tabelle 4: Methoden zur Bestimmung des Fettes in *C. elegans*

	Methoden	Endpunkt	Vorteile	Nachteile
Mikroskopische Verfahren	<u>Färbungen:</u> Nile Red (NR) Sudan Black BODIPY™ LipidTOX™ Oil-Red-O	semiquantitative Fettbestimmung anhand von Fluoreszenz-/Färbeintensitäten	einfache Anwendung, zeit- und kostengünstig, Hochdurchsatz möglich	oftmals Fixierung notwendig, variable Resultate und Fusion von <i>lipid droplets</i> (LD) abhängig vom Fixierungsmittel möglich, unspezifische Färbung von LRO bei Lebendfärbung (NR, BODIPY™)
	CARS <sup>8</sup> - und SRS <sup>9</sup> -Mikroskopie	Bestimmung der LD-Anzahl, -Größe und -Dichte	keine Färbung notwendig	spezielle Apparatur notwendig, kein Hochdurchsatz
	<u>Hochauflösungs-mikroskopie:</u> Färbungen transgene Nematoden	Bestimmung der LD-Anzahl, -Größe und -Dichte	Analyse der Fettverteilung, selektive Betrachtung verschiedener Kompartimente	spezielle Apparatur notwendig, kein Hochdurchsatz
Biochemische Verfahren	Triglycerid-Assay	quantitative Bestimmung von Triglyceridgehalten	Einfache Anwendung, Hochdurchsatz möglich	mögliche Einschränkung bei Untersuchungen von Lipase-hemmenden Substanzen
	GC-MS <sup>10</sup> LC-MS <sup>11</sup>	quantitative Bestimmung von Fettsäuren	Bestimmung der Gehalte und Zusammensetzung einzelner Lipidextrakte (spezifische Lipidfraktionen)	spezielle Apparatur notwendig, kein Hochdurchsatz

<sup>8</sup> Kohärente Anti-Stokes-Raman-Spektroskopie

<sup>9</sup> Stimulierte Raman-Streuung

<sup>10</sup> Gaschromatographie-gekoppelte Massenspektroskopie

<sup>11</sup> Flüssigkeitschromatographie-gekoppelte Massenspektroskopie

Eine häufig genutzte Methode zur Fettbestimmung stellt dabei das Anfärben von fettreichen Strukturen in den Nematoden mit lipophilen Farbstoffen, wie Nile Red (NR), dar (Fowler und Greenspan, 1985, Greenspan *et al.*, 1985, Chen *et al.*, 2009). Über die Jahre wurde für die Färbemethode mit dem Fluoreszenzfarbstoff NR die Notwendigkeit der Fixierung der Nematoden herausgestellt, um eine unspezifische Färbung von autofluoreszierenden Granula, den sogenannten Lysosomen-ähnlichen Organellen (LRO), zu vermeiden (Clokey und Jacobson, 1986, Hermann *et al.*, 2005, Schroeder *et al.*, 2007, Yen *et al.*, 2010, Zhang *et al.*, 2010b). Diese tritt zusätzlich zur Färbung der Hauptfettspeicher, den *lipid droplets* (LD), bei der Lebendfärbung auf und kann zur Fehlinterpretation von Ergebnissen führen (Clokey und Jacobson, 1986, Hermann *et al.*, 2005, Schroeder *et al.*, 2007, Yen *et al.*, 2010, Zhang *et al.*, 2010b). Für die Fixierung stehen Alkohol-basierte Medien wie Isopropanol, Ethanol oder Aceton zur Verfügung, wobei einige Studien für diese nachteilige Effekte, wie eine Fusionierung von LD, beschrieben, während Paraformaldehyd die morphologischen Strukturen der LD nicht beeinflusst (Fukumoto und Fujimoto, 2002, DiDonato und Brasaemle, 2003, Carter *et al.*, 2010, Fujimoto und Parton, 2011). Wählby und Kollegen wiederum beschrieben ebenso negative Effekte der Paraformaldehydfixierung, wie eine variable Färbung und die Entstehung von beschädigten Nematodenkörpern (Wählby *et al.*, 2014). Trotz der Fusion von LD durch Isopropanol, die in Parallelarbeiten in der eigenen Arbeitsgruppe ebenfalls beobachtet werden konnte, erlaubt das Fixierungsmittel die Detektion von Fettgehaltsänderungen in den Nematoden mit NR, die mit Paraformaldehyd hingegen nicht möglich ist (Wagner, 2020). Darüber hinaus wurde in einer Reihe von Studien nicht nur für die Färbung mit NR, sondern auch mit dem Farbstoff Oil-Red-O, Isopropanol als Fixierungsmedium bereits erfolgreich angewendet (O'Rourke *et al.*, 2009, Pino *et al.*, 2013, Wählby *et al.*, 2014, Lynn *et al.*, 2015, Sheng *et al.*, 2015, Vrablik *et al.*, 2015, Wang *et al.*, 2016, Webster *et al.*, 2017, Escorcía *et al.*, 2018). Basierend auf diesen Erkenntnissen erfolgte die in der vorliegenden Arbeit durchgeführte NR-Färbemethode mit Isopropanol, wobei eine Konzentration von 40 % Isopropanol und eine 15-minütige Inkubation als ausreichende Parameter identifiziert wurden, um die Fixierung und Zugänglichkeit des Farbstoffes in die Nematoden zu gewährleisten. Dabei wurde eine variable Färbung der fixierten intrauterinen Eier anhand der emittierten Fluoreszenz beobachtet, die nicht durch eine unzureichende Fixierungsdauer von Isopropanol zu erklären waren, da die variable Färbung nach einer Fixierung der Eier von bis zu 180 min weiterhin auftrat. Diese Beobachtung ließ darauf schließen, dass die Wirksamkeit der Fixierung möglicherweise vom Reifegrad der Eier und damit verbundenen Beschaffenheit der sechsschichtigen Eischale abhängig ist, die nach der Befruchtung der Oozyte undurchlässig für Lebendfarbstoffe wird (Stein und Golden, 2018). Da vereinzelt gefärbte und ungefärbte Eier entlang des Uterus hin zur Vulva beobachtet werden konnten, ist es jedoch unwahrscheinlich, dass der Reifegrad der Eier ursächlich ist. In der Literatur wird weder eine variable Färbung der Eier nach der NR-Färbung beschrieben, noch werden fixierte, NR-gefärbte

Nematoden mit Eiern abgebildet, die zum Vergleich dienen könnten. Da der Effekt in allen Nematoden auftrat und die Anwendbarkeit der NR-Färbung in dieser Studie, die lediglich eine semiquantitative Fettbestimmung erlaubte, für die Detektion von Fettgehaltsunterschieden in den Nematoden nicht einzuschränken schien, wurde die variable Färbung der Eier bei der Auswertung vernachlässigt. Zudem wurden die Fettgehalte der Eier in einer anderen, im Folgenden beschriebenen, und weitaus zuverlässigeren Methode zur Fettgehaltsbestimmung der Nematoden mitberücksichtigt (siehe 4.2.3). Eine nähere Untersuchung des Phänomens in zukünftigen Studien könnte einen wertvollen Beitrag zum gegenwärtigen Kenntnisstand über die Synthese, potentielle Modifikation und damit verbundene, funktionelle Rolle der einzelnen Schichten der Eischale während der unterschiedlichen Stadien der Embryonalentwicklung von *C. elegans* leisten, für die bis heute keine Daten vorliegen.

Für die Fettfärbung in den Nematoden wird häufig eine NR-Konzentration von 3 µg/ml eingesetzt (Mak *et al.*, 2006, Zhang *et al.*, 2010a, Pino *et al.*, 2013, Wählby *et al.*, 2014, Vrablik *et al.*, 2015, Ramírez-Castrillón *et al.*, 2021). In dieser Arbeit stellte sich bei der Prüfung zusätzlicher NR-Konzentrationen im höher konzentrierten Bereich (bis zu 30 µg/ml NR-Färbelösung), unter Berücksichtigung unterschiedlicher Inkubationszeiten, eine Inkubation für 30 Minuten mit 3 µg/ml NR-Färbelösung als ausreichende Parameter für die Fettfärbung in den Nematoden heraus. NR-Konzentrationen im niedrigeren Konzentrationsbereich (0,1 – 1 µg/ml NR-Färbelösung) wurden bereits in Wagners Arbeit für die Anwendbarkeit aufgrund unzureichender Färbung zur Erkennung der Nematoden mit dem automatisierten Analysesystem ausgeschlossen (Wagner, 2020).

Die in dieser Arbeit optimierte und etablierte NR-Färbemethode im 96-Well-Plattenformat stellt ein schnelles und einfaches Verfahren zur Erfassung des Fettgehaltes der Nematoden dar, die neben der semiquantitativen Fettgehaltsbestimmung auch die Messung der Körperfläche erlaubt. Somit konnte eine zeit- und kostengünstige, im Hochdurchsatz durchführbare Färbemethode etabliert werden, um initiale Aussagen über den relativen Fettgehalt in Nematoden zu erhalten.

## 5.2 Eignung der Deletionsmutanten *daf-2* und *eat-2* als Positivkontrollen für die Fettuntersuchungen in *C. elegans*

Zur Untersuchung von Veränderungen im Fettgehalt von *C. elegans* wurden *daf-2*- und *eat-2*-Deletionsmutanten als Referenz untersucht, für die bekanntlich ein fetterer (*daf-2*) und ein magerer Phänotyp (*eat-2*) im Vergleich zum Wildtypen beschrieben wurde (Kenyon *et al.*, 1993, Kimura *et al.*, 1997, Lakowski und Hekimi, 1998, Brooks *et al.*, 2009, Klapper *et al.*, 2011, Fouad *et al.*, 2017). *Daf-2*-defiziente Nematoden weisen eine Mutation in einem Gen auf, das dem humanen Rezeptors des Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktors 1 (IGF-1) ähnelt (Kimura *et al.*, 1997, Gems *et al.*, 1998). Dieser ist ein wesentlicher Faktor im Insulin/IGF-1-Signalweg, der insbesondere das Wachstum, die Entwicklung, Langlebigkeit und den Lipidstoffwechsel der Nematoden reguliert (Jia *et al.*, 2004, Ashrafi, 2007, Murphy und Hu, 2013). Die Hemmung des Insulin/IGF-1-Signalweges führt nachweislich zu einer Fettakkumulation in *C. elegans* (Kimura *et al.*, 1997, Xu *et al.*, 2012b, Depuydt *et al.*, 2014). *Daf-2*-defiziente Nematoden haben laut Literaturangaben ein Entwicklungsoptimum bei 15 °C, wohingegen eine Kultivierung bei 20 °C, welches dem Temperaturoptimum des Wildtyp-Stammes und der meisten *C. elegans*-Stämme entspricht, zu 15 % Dauerlarven in der *daf-2*-defizienten Population führt (Gems *et al.*, 1998). *Eat-2* kodiert für eine Untereinheit des nikotinischen Acetylcholinrezeptors, der für die muskuläre Kontraktion des Pharynx notwendig ist, weswegen Deletionen in diesem Gen zu einer verringerten pharyngealen Pumprate und somit zur verlangsamten Nahrungsaufnahme führen, die folglich in einem verminderten Fettgehalt der Nematoden resultieren (Raizen *et al.*, 1995, Lakowski und Hekimi, 1998, McKay *et al.*, 2004). Die charakteristischen Fettphänotypen von *daf-2*- und *eat-2*-Deletionsmutanten, die ausschließlich für die Agarplatten-basierte Kultivierung beschrieben wurden, konnten in dieser Arbeit, mit der Kultivierung in Flüssigmedium bei 20 °C, nicht beobachtet werden. Stattdessen wiesen in Flüssigmedium kultivierte *daf-2*-defiziente Nematoden ein ähnliches Fettprofil wie die Wildtypen auf (siehe Diagramm 2 B). Dabei ist jedoch anzumerken, dass die bei 20 °C kultivierten *daf-2*-defizienten Nematoden eine verzögerte Entwicklung aufzeigten (Abbildung 13) und zudem lichtmikroskopisch keine Dauerlarven in der Population beobachtet werden konnten. Bereits bei der Kultivierung bei dessen Temperaturoptimum von 15 °C in Vorstudien, trat diese Retardierung der Nematoden nicht nur in Flüssigmedium, sondern auch auf Agarplatten auf, sodass der Effekt nicht auf die Haltungsbedingung zurückzuführen war. Eine Temperaturverschiebung auf 20 °C beider Kultivierungsmethoden beschleunigte nur geringfügig die Entwicklung der *daf-2*-defizienten Nematoden, die Entwicklungsgeschwindigkeit war jedoch nicht mit der der Wildtypen vergleichbar (mikroskopische Beobachtung und NR-Datenauswertung, Daten nicht gezeigt), sodass für die Untersuchungen der Vergleich von einheitlichen Entwicklungsstadien mit Einhaltung derselben zeitlichen Haltungs- sowie Fütterungskonditionen nicht möglich war. Diese beobachtete Diskrepanz könnte auf eine negative Energiebilanz hinweisen, die sich nachteilig auf die

Entwicklungsgeschwindigkeit der *daf-2*-defizienten Nematoden auswirkte. Aufgrund der Kultivierung in Flüssigmedium sind die Nematoden gezwungen überwiegend zu schwimmen, was einen größeren Energieaufwand erfordert, als die kriechenden Fortbewegungen auf festen Agarplatten (Laranjeiro *et al.*, 2017). Bereits in Vorversuchen zeigten sich anhand von Durchlicht-Aufnahmen (ZOE™ Fluorescent Imager) Unterschiede in der Morphologie der Wildtypen, wobei Agarplatten-kultivierte Wildtypen deutlich dicker waren und einen dunkler erscheinenden Darm aufwiesen, als Nematoden aus der Flüssigkultur, die einen dünneren, etwas längeren Körper mit blass erscheinendem Darm hatten. Durch vermehrt vorkommende Lipidtröpfchen (*lipid droplets*) und Granula im Darm kann ein höherer Brechungsindex bzw. eine höhere optische Dichte vorliegen, die zur dunkleren Erscheinung des Darms führt. Ein Zusammenhang zwischen einem dunkler erscheinenden Darm unter der Durchlichtbeleuchtung und dem Fettgehalt in Nematoden wurde bereits in einigen Publikationen diskutiert (Kenyon *et al.*, 1993, Apfeld und Kenyon, 1998, McKay *et al.*, 2003, Avery und You, 2012). Bei Durchlicht-Aufnahmen am ZOE™ Fluorescent Imager kann allerdings, je nach der Dicke des Nematodenkörpers, die Quetschung des Körpers zwischen Objektträger und Deckglas unterschiedlich ausfallen und das Licht des Mikroskops unterschiedlich stark gestreut werden, sodass dieser Faktor zum Erscheinungsbild des Nematodenkörpers bzw. des Darms in der Interpretation der mikroskopischen Aufnahmen zu berücksichtigen sind. Der verlängerte Körper der Nematoden, der aus der Flüssigkulturhaltung resultiert, wurde in anderen Vergleichsstudien ebenfalls beobachtet (Harada *et al.*, 2016, Lev *et al.*, 2019a). Interessanterweise scheint die Flüssigkultur, durch den damit einhergehenden Energieverbrauch sowie die vermutete Fettreduzierung, auf *daf-2*-defiziente Nematoden einen größeren Einfluss zu haben, als auf Wildtypen, die in der Flüssigkultur hingegen einen normalen Entwicklungszyklus aufweisen. Die Beobachtung von intrauterinen Eiern im Komma- und Bretzelstadium in drei Tage alten, 1x OP50-gefütterten Wildtypen (Abbildung 13) wies auf eine verzögerte Eiablage der Nematoden hin, die unter veränderten, nachteiligen Umweltkonditionen, wie einem Futtermangel, auftritt und als *bag of worms* (BOW) bezeichnet wird (Trent *et al.*, 1983, Riddle *et al.*, 1997b, Chen und Caswell-Chen, 2004, Schafer, 2006, Zhang *et al.*, 2008). Folglich stellte die 1x OP50-Futtermenge in dieser Arbeit für den Versuchszeitraum von drei Tagen eine restriktive Nahrung für die Nematoden dar, sodass dieser Faktor bei der Entwicklungsverzögerung der *daf-2*-defizienten Nematoden eine Rolle gespielt haben könnte. Durch die Fütterung mit einer erhöhten OP50-Menge (in dieser Arbeit nicht gezeigt), konnten die in der Literatur beschriebenen Fettphänotypen beider Deletionsmutanten in der Flüssigkultur jedoch ebenfalls nicht ausgeprägt werden, sodass die beobachteten Fettphänotypen nicht mit einer eingeschränkten Ernährung erklärt werden konnten. Letztlich konnten die Faktoren, die zu dem unerwarteten Phänotyp geführt haben, in dieser Arbeit nicht identifiziert werden.

Im Vergleich dazu hatten in Flüssigmedium-kultivierte *eat-2*-Deletionsmutanten in dieser Arbeit

interessanterweise einen längeren und dickeren Körper mit dunkler erscheinenden Darm und trugen mehr Eier als die Wildtypen (Abbildung 13). Die NR-Färbung bestätigte die mikroskopischen Beobachtungen von erhöhten Körpergrößen und erhöhten Fettgehalten der *eat-2*-Deletionsmutanten (Diagramm 2 B). Die Kultivierung in Flüssigmedium und die erhöhte körperliche Aktivität schienen in *eat-2*-defizienten Nematoden, anders als in *daf-2*-defizienten Nematoden, paradoxerweise eine vermehrte Fetteinlagerung zu induzieren und die Entwicklung sowie die Reproduktion (Anzahl intrauteriner Eier) zu begünstigen. Der entstandene Phänotyp ist möglicherweise auf die Veränderung der Haltungskondition zurückzuführen, die eine Adaption der Nematoden an die Umgebungsbedingungen zufolge hatte. Die zugrundeliegenden Mechanismen für dieses Phänomen sind jedoch unklar. Eine Verwechslung der Deletionsmutanten-Stämme konnte durch Genotypisierung ausgeschlossen werden (Verifizierung über Eurofins Deutschland). Da beide Deletionsmutanten in der Flüssigkultur nicht die erwarteten, charakteristischen Fettphänotypen und keinen normalen Entwicklungszyklus aufzeigten, konnten sie als Kontrolle für die Fettbestimmung in *C. elegans* in dieser Arbeit nicht eingesetzt werden. Die Hintergründe der beobachteten Effekte erfordern weitere Untersuchungen, die gegebenenfalls mit Anpassungen der experimentellen Konditionen verbunden sind. Die Analyse von Genexpressionsmustern der Deletionsmutanten, bspw. mit Fokus auf zentrale Fettmetabolismus-assoziierte Gene wie *sbp-1*, *fasn-1*, *atgl-1*, *nhr-49*, *fat-5*, *fat-6* und *fat-7*, könnten sowohl die beobachteten Fettprofile verifizieren, als auch beteiligte Mechanismen identifizieren, die zu den widersprüchlichen Fettphänotypen der Deletionsmutanten geführt haben (Avery, 1993, Lockery *et al.*, 2012). Dabei sollte insbesondere die Genexpression von *eat-2* und *daf-2* untersucht werden, um mögliche (epigenetische) Genmodifikationen durch die Haltungsbedingung in Flüssigmedium auszuschließen. Die Genexpression und damit verbundene Nahrungsaufnahme sollte zudem durch Messungen der pharyngealen Pumprate der *eat-2*-defizienten, und zusätzlich der *daf-2*-defizienten Nematoden, über sogenannte Elektropharyngeogramme (EPG) überprüft werden (Weeks *et al.*, 2016). Die Untersuchung des Energiehaushalts könnte ebenfalls Aufschluss über das Wachstum, die Entwicklung und die Fettgehalte bieten, die sich in den beobachteten Phänotypen der Deletionsmutanten widerspiegeln. Zur Analyse des Energieverbrauchs in lebenden Nematoden stehen Methoden zur Verfügung, wie der Seahorse-Assay, der über die Messung der Sauerstoffbilanz der Nematoden indirekt den ATP-Level bzw. die zelluläre Atmung wiedergibt (Koopman *et al.*, 2016).

### 5.3 Eignung von Glucose zur Generierung eines *C. elegans*-Phänotyps mit hohem Fettprofil

Eine exzessive Nahrungszufuhr, insbesondere von Kohlenhydraten wie Glucose, resultiert in einem Ungleichgewicht zwischen Energieaufnahme und Verbrauch von Energiereserven, die zur Speicherung überschüssiger Nährstoffe in Form von Glykogen und Fetten in Menschen führt und bekanntlich zu einer Fettleibigkeit damit verbundenen Stoffwechselerkrankungen, *Diabetes mellitus* (Typ 2) und kardiovaskulären Erkrankungen beitragen kann (Minehira *et al.*, 2004, Haslam und James, 2005, Hu und Malik, 2010, Aarnio *et al.*, 2011, Basu *et al.*, 2013, Bray und Popkin, 2014, Te Morenga *et al.*, 2014, Czech, 2017, Petersen *et al.*, 2017). Ähnlich wie bei Menschen, zeigte sich die Induzierbarkeit der Fettakkumulation durch eine Glucose-reiche Ernährung auch in Nagern, *Drosophila melanogaster* und *C. elegans* (Musselman *et al.*, 2011, Tang *et al.*, 2014, Lee *et al.*, 2015, Musselman *et al.*, 2019).

Die Glucose-induzierte Fettakkumulation in *C. elegans* sollte in dieser Arbeit in der Flüssigkultur etabliert werden und als Positivkontrolle für die Fettuntersuchungen dienen. In diversen Studien konnten bereits eine Konzentrations-abhängige Fettakkumulation und Erhöhung der Körpergröße durch Glucose in den Nematoden beobachtet werden, die unter anderem durch die Aktivierung der Insulin/IGF-1- und TGF- $\beta$ /DAF-7-Signalwege, die Involvierung der Transkriptionsfaktoren SBP-1/MDT-15, DAF-16/FOXO und anderen Hauptakteuren des Glucose- und Fettmetabolismus nachgewiesen wurden (Truswell, 1994, Kimura *et al.*, 1997, Schulz *et al.*, 2007, Greer *et al.*, 2008, Lee *et al.*, 2009b, Schlotterer *et al.*, 2009, Nomura *et al.*, 2010, Choi, 2011, Pang *et al.*, 2014b, Garcia *et al.*, 2015, Lee *et al.*, 2015, Lu und Qiu, 2017b, Alcántar-Fernández *et al.*, 2018). Dabei unterscheiden sich die Studien jedoch in vielen experimentellen Aspekten, wie der exponierten Glucose-Menge, der Kultivierungsmethode, der Art und Dauer der Glucose-Exposition und den exponierten Larvenstadien, was einen Vergleich der Studien erschwert. Die Mehrheit dieser Glucose-Untersuchungen basiert auf der Kultivierung von Nematoden auf Agarplatten, bei denen die Glucose dem noch flüssigen, meist 55 °C warmen, Agar beigemischt wird. Dies kann jedoch zur Induktion der Maillard-Reaktion führen, bei der die zugegebene Glucose aufgrund der Wärme mit Proteinen im Agar reagiert und Reaktionsendprodukte, sogenannte *advanced glycation end products* (AGEs), bildet (Maillard, 1912, Monnier und Cerami, 1981, Feiner, 2006, Hunt, 2017). AGEs können in den Nematoden, neben der Glucose-Wirkung, zusätzliche Effekte hervorrufen und die Resultate der Glucose-Studien möglicherweise beeinflussen (Schlotterer *et al.*, 2018, Shin *et al.*, 2020, Dubois *et al.*, 2021, Kingsley *et al.*, 2021, Yokoyama *et al.*, 2021). Da die Nematoden sich auf der Oberfläche des festen, mit Glucose-supplementierten Agars fortbewegen und von den auf dem Agar befindlichen Bakterien ernähren, gelangt nur ein Bruchteil der Substanz in die Nematoden, der darüber hinaus schwer quantifizierbar ist (Caldicott *et al.*, 2006, Stiernagle, 2006, Hunt, 2017). Zusätzlich kann die exponierte Konzentration von der Löslichkeit der Glucose im Agar, von



Feuchtigkeitsschwankungen des Agars und der Nematodendichte abhängig sein (Stiernagle, 2006, Szewczyk *et al.*, 2006, Win *et al.*, 2013, Hunt, 2017). In der Flüssigkultur hingegen wird Glucose, aber auch die Futterbakterien, von den Nematoden oral über das Kultivierungsmedium aufgenommen, wodurch eine exaktere und kontrolliertere Administration der Substanzkonzentration und der Nahrungsmenge erfolgen kann (Szewczyk *et al.*, 2003, Hibshman *et al.*, 2021). Ungeachtet der methodischen Unterschiede zu anderen Glucose-Studien, konnte in der vorliegenden Arbeit nach dreitägiger Kultivierung mit Glucose (1  $\mu\text{M}$  – 10 mM), trotz auftretender Wachstumsinhibition eines Großteils der Nematodenpopulation, ab 100  $\mu\text{M}$  Glucose eine konzentrationsabhängige Erhöhung des Fettgehalts und der Körpergröße bedingt in selektierten adulten Nematoden mittels der NR-Färbemethode nachgewiesen werden (Diagramm 4 B). Die Fettakkumulation in den Nematoden bestätigte den Prozess der Umwandlung übermäßig zugeführter Energie, die in Form von Glucose erfolgte, zu speicherbaren Fetten. Die Ergebnisse der Fettbestimmung im Hochdosisbereich von Glucose (in dieser Arbeit definiert mit Konzentrationen im Millimolar-Bereich ab 1 mM) zeigten eine potentielle Sättigung des Fettgehaltes in den Nematoden bei einer Administration von 5 mM Glucose, die sich in einer Verdopplung des Fettgehalts der Nematoden ausprägte (Diagramm 8). Diese Fetterhöhung durch die Hochdosisgabe von Glucose stimmte mit Agarplatten-basierten Studien anderer überein, die ebenfalls Erhöhungen im Fettgehalt der Nematoden durch Glucose im Millimolar-Bereich mittels Nile Red- (lebende und fixierte Nematoden) oder Oil-Red-O-Färbungen, aber auch anhand von Triglyceridgehalten zeigen (Schulz *et al.*, 2007, Schlotterer *et al.*, 2009, Pang *et al.*, 2014b, Garcia *et al.*, 2015, Lu und Qiu, 2017b, Alcántar-Fernández *et al.*, 2018). Die über die Larvenstadien und die Körpergrößenreduktionen beobachtete Wachstumsinhibition war in den Nematoden bereits nach zweitägiger Kultivierung mit 100  $\mu\text{M}$  Glucose zu beobachten und prägte sich nach drei und vier Tagen in den Populationen deutlich stärker aus (Diagramm 3, Diagramm 4 A, Diagramm 41). Da Glucose-Konzentrationen zwischen 1  $\mu\text{M}$  – 10 mM in zwei Tage alten Nematoden kaum beachtenswerte Fetterhöhungen und vier Tage alte, adulte Nematoden vorzeitig *in utero* geschlüpfte L1-Larven aufwiesen (Abbildung 3 und Abbildung 16), erschienen diese Entwicklungsstadien für die Untersuchungen von Fettgehaltsunterschieden nicht sinnvoll. *In utero* geschlüpfte L1-Larven sind Merkmale von BOW, die Folgen der verzögerten Eiablage der Nematoden bei auftretendem Futtermangel sind und zum vorzeitigen Tod der parentalen Nematoden führen (Trent *et al.*, 1983, Riddle und Albert, 1997a, Chen und Caswell-Chen, 2004, Schafer, 2006, Zhang *et al.*, 2008). Die Hypothese eines auftretenden Futtermangels in vier Tage alten Nematoden war zusätzlich durch die fehlende Trübung des Kultivierungsmediums gestützt, die ein Indikator für das Vorhandensein von Bakterien darstellt. Die vorhandene Trübung im mit 10 mM Glucose-supplementieren Kultivierungsmedium, die vermutlich aus dem verringerten Verbrauch durch die reduzierte Anzahl lebender Nematoden in der Population resultierte, erklärte

die Tatsache, dass in den Nematoden dieser Kultivierungskondition kein BOW auftrat. Die dabei stärker ausgeprägte Wachstumsinhibierung in dieser Population ließ jedoch auf eine verringerte Nahrungsaufnahme der Nematoden und/oder potentielle toxische Wirkung der 10 mM Glucose hindeuten. Bei vermehrter Glucose-Gabe werden in *C. elegans* übermäßig intermediäre Metaboliten, wie die AGEs Carboxymethyllysin oder Methylglyoxal, während des Glucose- und Lipidstoffwechsels gebildet, die unter normalen Bedingungen endogen in niedrigen Konzentrationen vorkommen (Cerami *et al.*, 1986, Uribarri und Tuttle, 2006, Lorenzi, 2007, Morcos *et al.*, 2008, Schlotterer *et al.*, 2009, Watts und Ristow, 2017, Kingsley *et al.*, 2021). Ein drastischer Anstieg der AGE-Level in den Nematoden kann adverse bis toxische Wirkungen entfalten, die unter anderem durch die Einschränkung der Mitochondrienfunktion verbunden sind (Setoyama, 2020, Kingsley *et al.*, 2021). In verschiedensten Studien konnten zahlreiche Glucose-induzierte und AGE-verursachte Effekte beobachtet werden, wie die reduzierte Körperlänge, reduzierte Mobilität, der erhöhte oxidative Stress durch die vermehrte Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), die Verringerung der Lebensdauer, die Beeinträchtigung der pharyngealen Aktivität, die Störung der strukturellen Integrität des Nervensystems, die verringerte Fertilität und Legerate von Eiern sowie die Veränderung der Lipidkomposition von Membranen, und die beobachteten Glucose-Effekte auf die Nematoden der vorliegenden Arbeit erklären könnten (Lee *et al.*, 2009b, Schlotterer *et al.*, 2009, Choi, 2011, Mondoux *et al.*, 2011, Zarse *et al.*, 2011, Mendler *et al.*, 2012, Tauffenberger *et al.*, 2012, Schmeisser *et al.*, 2013a, Schmeisser *et al.*, 2013b, De Haes *et al.*, 2014, Tauffenberger und Parker, 2014, Lee *et al.*, 2015, Svensk *et al.*, 2016, Tauffenberger *et al.*, 2016, Teshiba *et al.*, 2016, Lu und Qiu, 2017a, Wang *et al.*, 2020, Kingsley *et al.*, 2021). Ähnliche Glucose-Effekte auf das Wachstum, die Lebensspanne, Fertilität und den oxidativen Stresslevel waren auch in *Drosophila melanogaster* nachweisbar (Lushchak *et al.*, 2011). Hohe AGE-Konzentrationen in Menschen können ebenfalls adverse Effekte auslösen und stehen in Verbindung mit der Entstehung vieler zellulärer Erkrankungen, einschließlich *Diabetes mellitus* und Herz-Kreislauf-Störungen (Thornalley, 1994, Brownlee, 1995, Chaudhuri *et al.*, 2018). Durch die Zugabe von Glucose über das Kultivierungsmedium trug vermutlich auch die Metabolisierung von Glucose durch die sich im Medium befindlichen Futterbakterien zu der Wachstumsretardierung der Nematoden bei. Die Hypothese wurde durch eine beobachtete massivere Wachstumsinhibierung und der Letalität vieler Nematoden (lichtmikroskopische Beobachtung) nach der Erhöhung der Futtermenge und gleichbleibender Glucose-Konzentration in dieser Arbeit gestützt (Daten nicht gezeigt). Die adversen Auswirkungen der bakteriellen Glucose-Metabolisierung auf die Nematoden, die durch die AGE-Bildung in den Bakterien verursacht werden, konnten in mehreren Studien nachgewiesen werden (Lee *et al.*, 2009b, Schlotterer *et al.*, 2009, Kingsley *et al.*, 2021). Demnach wurde die signifikante Wachstumsinhibierung eines großen Anteils der Nematodenpopulation in der vorliegenden Arbeit höchstwahrscheinlich durch die Kombination der oxidativen Prozesse in beiden

Organismen bei der Hochdosis-Gabe von Glucose verursacht. In Folgestudien könnten diese Prozesse über Messungen der AGE- und ROS-Level bzw. von oxidativem Stress via spezifische oxidative Stressmarker, über Aktivitätsmessungen antioxidativer Enzyme oder Genexpressionsanalysen von Stress-assoziierten Genen überprüft werden (Schlotterer *et al.*, 2009, Senchuk *et al.*, 2017, Yoon *et al.*, 2018). Unklar bleiben jedoch die Hintergründe der signifikanten Retardierung der Nematoden, die in der Flüssigkultur beobachtet und in diesem Ausmaß bislang weder für die Flüssig-, noch Agarplattenkultur in der Literatur beschrieben wurde. Die Entwicklung einzelner Nematoden zu Adulten hingegen ließ auf die biologische Variabilität und die Anpassung einzelner Individuen mit potentiell erhöhter Stressresistenz an die gegebenen Umstände schließen. Für künftige Versuche sollte für die Untersuchung von Glucose-Effekten auf die Nematoden, die Glucose-Metabolisierung durch Bakterien ausgeschlossen werden. Für diesen Zweck dienen oftmals tote Bakterien, die durch Sonifikation, UV-Bestrahlung oder hohe Temperaturen generiert werden, Glucosetransporter-defiziente Bakterien oder axenische Kultivierungsmedien, die keine Bakterien enthalten (Couillault und Ewbank, 2002, Garigan *et al.*, 2002, Houthoofd *et al.*, 2002, Kaeberlein *et al.*, 2006, Lee *et al.*, 2009b, Schlotterer *et al.*, 2009, Samuel *et al.*, 2014). Die Anwendung und Effektivität dieser Methoden werden in der Literatur jedoch kontrovers diskutiert. Während einige Studien die erfolgreiche Anwendung beschreiben, zeigte sich in anderen Studien die Ineffektivität der Methoden durch weiterhin vorhandene Bakterienaktivität trotz vermeintlicher Inaktivierung (UV-Bestrahlung), durch einen induzierten L1-Arrest (Hitze-inaktivierte Bakterien) oder sogar durch phänotypische und transkriptomische Veränderungen in den Nematoden (axenisches Medium), die teilweise den Effekten der kalorischen Restriktion ähneln (Dougherty und Hansen, 1956, Vanfleteren, 1974, Croll *et al.*, 1977, Brock-Utne und Gaffin, 1989, Lu und Goetsch, 1993, Houthoofd *et al.*, 2002, Szewczyk *et al.*, 2003, Wood *et al.*, 2004, Szewczyk *et al.*, 2006, Nass und Hamza, 2007, Lenaerts *et al.*, 2008, Miyamoto *et al.*, 2009, Samuel *et al.*, 2014, Lee und Kang, 2017, Qi *et al.*, 2017, García-Casas *et al.*, 2018, Lee *et al.*, 2020, Lopes *et al.*, 2020, Ma *et al.*, 2020, Beydoun *et al.*, 2021).

Letztlich stellten nicht nur die auftretende Wachstumsinhibierung in der Flüssigkultur, die Notwendigkeit der Selektion normalentwickelter Nematoden und die potentielle Entstehung von toxischen Intermediaten, sondern auch die aufwendigen Optimierungen für alternative Fütterungsmethoden heraus, dass Glucose zur Induktion der Fettakkumulation in *C. elegans* und folglich für den Einsatz als Positivkontrolle in dieser Arbeit nicht geeignet war.

#### 5.4 Eignung der Hunger-Induktion zur Generierung eines *C. elegans*-Phänotyps mit geringem Fettprofil

Während die übermäßige Nahrungszufuhr in Organismen zu einer vermehrten Einlagerung von Fett als Energiereserven führt, wird bei einer Nahrungsrestriktion oder Hungerphase auf diese Energiereserven zurückgegriffen, um essentielle zelluläre Funktionen aufrechtzuerhalten (Finn und Dice, 2006, Wang *et al.*, 2006, Mizushima, 2007). Dieser Vorgang ist nicht nur bei Säugern, sondern auch in *C. elegans* zu beobachten und mit der Herunterregulierung energieaufwändiger Prozesse, wie die Reproduktion und das Wachstum, und der Einleitung der Lipolyse, Lipophagie und dem Fettsäureabbau verbunden, die folglich zu verringerten Fettgehalten führen (O’Riordan und Burnell, 1990, Kimura *et al.*, 1997, McKay *et al.*, 2003, Van Gilst *et al.*, 2005a, Narbonne und Roy, 2009, Elle *et al.*, 2010, O’Rourke und Ruvkun, 2013, Settembre *et al.*, 2013, Texada *et al.*, 2019, Shin und Zoncu, 2020, Olsen *et al.*, 2021). Dabei umfassen die Prozesse insbesondere die Insulin/IGF-1-, TOR-, AMPK-Signalwege und den Fettabbau über die  $\beta$ -Oxidation, welche durch die Hauptlipase ATGL-1, aber auch anderen Lipasen, wie die Hormon-sensitive Lipasen (HOSL-1), die Lipase-ähnlichen Enzyme (LIPL-1 – LIPL-5) und *fasting induced*-Lipasen (FIL-1- und FIL-2), initiiert wird (Jo *et al.*, 2009, Elle *et al.*, 2012, O’Rourke und Ruvkun, 2013, Settembre *et al.*, 2013, Srinivasan, 2015). Phänotypisch zeigen Nahrungs-restriktierte Nematoden neben einem geringeren Fettprofil, auch ein reduziertes Wachstum, eine reduzierte Fertilität, verringerte Mobilität, eine erhöhte Stressresistenz und eine verlängerte Lebensspanne (Lenaerts *et al.*, 2008, Tain *et al.*, 2008).

In dieser Arbeit prägte sich eine 24-stündige Hungerphase (*starvation*) im L4-Stadium von zuvor mit 1x OP50 oder 4x OP50 gefütterten Nematoden in erster Linie in einer Verringerung der Körpergröße und einer Reduzierung der intrauterinen Eizahl aus, welche vermutlich aus verringert verfügbarer Energie durch einen induzierten Fettabbau resultierten, wobei die reduzierenden Effekte in zuvor mit 4x OP50 gefütterten Nematoden stärker ausgeprägt waren (Diagramm 12 und mikroskopische Beobachtung). Die L4-Larven beider Fütterungsregime erreichten interessanterweise trotz der Hungerphase das Adultstadium im normalen Zeitintervall und produzierten Nachkommen, sodass der beobachtete, kleinere Nematodenkörper nicht auf einen Entwicklungsarrest zurückzuführen war. Ähnlich wie beim Übergang ins Dauerlarven-Stadium von L1- oder L2-Larven, kann eine Nahrungsknappheit im L3- oder L4-Stadium zu einem larvalen Arrest führen (Cassada und Russell, 1975, Klass und Hirsh, 1976, Hu, 2007, Schindler *et al.*, 2014). Dabei ist der Zeitpunkt der einsetzenden Hungerphase entscheidend für den Übergang in das nachfolgende Larvenstadium, sodass Nematoden im L4-Stadium trotz Futtermangel das Adultstadium erreichen können, der Umstand führt jedoch zu einer sogenannten „adulten reproduktiven Diapause“ (Angelo und Van Gilst, 2009, Seidel und Kimble, 2011, Baugh, 2013). Nematoden, die im frühen L4-Stadium hungern, entwickeln sich eher zu Adulten als Nematoden, die in der späteren L4-Phase keine Nahrung mehr zur Verfügung haben, und zeigen einen späteren

Eintritt der Oogenese und eine geringere Produktion von Nachkommen (Seidel und Kimble, 2011, Baugh, 2013). Diese Effekte erklärten vermutlich die beobachtete Entwicklung der L4-Larven zu Adulten trotz Hungerphase und die Verringerung der intrauterinen Eizahl. Im L4-Stadium gehungerte, zuvor mit 1x OP50 gefütterte Nematoden wiesen dabei eine leichte Fetterhöhung auf, die nicht durch Limitierungen der Nile Red-Färbung erklärt werden kann, da eine messbare Verringerung des Fettgehaltes in gehungerten, zuvor mit 4x OP50 gefütterten, Nematoden nachweisbar war (Diagramm 12). Da die 4-fache Futtermenge keine restriktive Nahrung darstellte, konnten die Nematoden vermutlich bereits vor der Hungerphase ausreichende Fettreserven anlegen, sodass der Verbrauch während der Hungerphase durch die verringerten Fettgehalte messbar war. Dennoch steht sie im Widerspruch zu der Annahme, dass Nematoden bei kurzfristig auftretendem Nahrungsmangel, die benötigte Energie aus ihren Fettreserven beziehen und sich demnach der Fettgehalt verringert (McKay *et al.*, 2003, Van Gilst *et al.*, 2005b, Zheng *et al.*, 2014). Möglicherweise spiegelte die beobachtete Fetterhöhung in gehungerten, 1x OP50-Nematoden die Mobilisierung und Speicherung der noch vorhandenen Energie in Fettdepots wider, die ähnlich wie im Dauerlarvenstadium während der L1/L2-Transition stattfindet, um schlechte Konditionen überdauern zu können (Wadsworth und Riddle, 1989, Wang und Kim, 2003, Zečić *et al.*, 2019). Eine weitere, mögliche Ursache könnte in der restriktiven Fütterung der Nematoden mit 1x OP50 selbst liegen, die während der Entwicklung möglicherweise bereits eine Remodellierung des Energiehaushaltes verursachte, sodass bei einer plötzlich auftretenden Hungerphase in der späteren Entwicklungsphase die Fettakkumulation in den Nematoden induziert wird. Zumindest konnte in einzelnen Studien eine erhöhte Fettakkumulation nach einer andauernden Nahrungsrestriktion während der gesamten Larvenentwicklung in L4- und adulten Nematoden im Vergleich zu *ad libitum* gefütterten Nematoden gezeigt werden, die sich durch vermehrte LD, erhöhte Triglyceridgehalte und eine Hochregulierung von Lipidmetabolismus-assoziierten Genen ausprägte (Miersch und Döring, 2012, Palgunow *et al.*, 2012, Miersch und Döring, 2013, Klapper *et al.*, 2016a). Ein zusätzlicher Faktor für eine ausbleibende Fettverringerng könnte eine erhöhte Lipolyse-Resistenz von vergrößerten LD darstellen, die in einigen Studien durch eine verringerte Lipase-Zugänglichkeit bei einer Verringerung des Oberfläche-zu-Volumen-Verhältnisses von LD erklärt und anhand *C. elegans dhs-28*-Mutanten, aber auch transgenen *Drosophila melanogaster* gezeigt wurde (Guo *et al.*, 2008, Zhang *et al.*, 2010b, Kraemer *et al.*, 2011, Palgunow *et al.*, 2012). Bei der Betrachtung der Kontrollnematoden in der vorliegenden Arbeit, bei der die 1x OP50-Futtermenge der restriktiven Nahrung und die 4x OP50-Menge der *ad libitum*-Fütterung entsprechen würden, konnte die Hypothese zur Fetterhöhung durch die während der Entwicklung kontinuierlich erfahrene Nahrungsrestriktion allerdings nicht bestätigt werden. Dabei ist jedoch anzumerken, dass die induzierte Nahrungsrestriktion anderer Studien und der vorliegenden Arbeit schwer vergleichbar ist, da deutliche Unterschiede in der Definition und Konzentration der

restriktiven und *ad libitum*-Futtermenge bestehen (Miersch und Döring, 2012, Palgunow *et al.*, 2012, Miersch und Döring, 2013, Klapper *et al.*, 2016a). Aufgrund der restriktiven Futtermenge von 1x OP50, wurden nach drei Tagen auch die Kontrollnematoden vermutlich nicht mehr optimal ernährt, sodass nur geringe, unkontrollierte Effekte auf den Fettgehalt beobachtet werden konnten. Vermutlich ist der Fett-erhöhende Effekt, der durch die während der Entwicklung vorherrschende Nahrungsrestriktion ausgeprägt wurde, stark abhängig vom Grad der Nahrungseinschränkung (Futtermenge und Dauer) sowie der Definition von „*ad libitum*-Fütterung“. Diese Annahme wird beispielsweise von Restriktionsstudien mit Mäusen gestützt, bei denen eine andauernde, moderate Nahrungsrestriktion (um 5 %) im Vergleich zur *ad libitum*-Fütterung ebenfalls zu einem erhöhten Fettgehalt ohne Änderung des Körpergewichts führte, während drastischere Nahrungsrestriktionen (um 30 – 60 %) die Abnahme der Fettmasse, als auch des Körpergewichts der Mäuse bewirkte (Li *et al.*, 2010). Die Nahrungsrestriktion wird in der Regel durch eine verminderte Futtermenge unter Ausschluss einer Mangelernährung beschrieben, unter der in einigen Publikationen die *starvation* als eine Variation der Restriktion zusammengefasst wird (Smith *et al.*, 2008, Sutphin und Kaeberlein, 2008). In anderen Studien hingegen wurde eine deutliche Unterscheidung zwischen der Nahrungsrestriktion und der *starvation* gemacht, da letztere nicht durch eine verminderte Nahrung, sondern durch den vollständigen Entzug der Nahrungsquelle und daraus resultierenden, differenten Phänotypen gekennzeichnet ist (McKay *et al.*, 2003, Lee *et al.*, 2006a, Bishop und Guarente, 2007, Palgunow *et al.*, 2012). Zwar resultieren beide Konditionen in einer Verringerung der verfügbaren Energie in den Nematoden, die vermutlich auf ähnliche Effekte und involvierte Prozesse zurückzuführen sind, jedoch zeigte sich in einer Vielzahl von mechanistischen Untersuchungen, dass sowohl für die Nahrungsrestriktion, als auch die *starvation* spezifische Fettmetabolismus-regulierende Mechanismen induziert werden (Lee *et al.*, 2006b). In *Drosophila melanogaster* wurden ebenso wesentliche Unterschiede zwischen Genexpressionsmustern Nahrungs-restriktierter und gehungerter Fliegen herausgestellt (Whitaker *et al.*, 2014). Basierend auf diesen Erkenntnissen, sollte grundsätzlich zwischen der Nahrungsrestriktion und der *starvation* unterschieden werden. Unter diesem Aspekt ließ die in dieser Arbeit beobachtete Fetterhöhung in *C. elegans* nach einer Hungerphase im Vergleich zu den weiterhin Nahrungs-restriktierten Kontrollnematoden (1x OP50) auf die Involvierung eines anderen Mechanismus schließen. In einer vergleichbaren Untersuchung mit *Drosophila melanogaster* wurde ebenfalls eine Hunger-induzierte Fetterhöhung (Analyse der Triglyceridgehalte und LD) in adulten Fliegen festgestellt, ohne negative Beeinflussung des Wachstums der Fliegen (Rehman und Varghese, 2021). Diese wurde auf die restriktive Futtermengenerfahrung während der Entwicklung der Fliegen erklärt, die zu einer erhöhten *starvation*-Resistenz im Adultstadium und der Herunterregulierung des Insulin-Signalweges führt. Die Induktion der Hungerphase im Adultstadium in dieser Arbeit, wodurch der Faktor der Entwicklung und die dafür aufgewandte

Energie ausgeschlossen werden konnte, zeigte nach sechs Stunden jedoch kaum eine Beeinflussung der untersuchten Parameter beider Fettphänotypen und deutete somit vermutlich auf eine unzureichende *starvation*-Dauer von sechs Stunden hin, um eindeutige Effekte beobachten zu können (Diagramm 11 A). Eine ausgedehntere Hungerphase von 24 Stunden hingegen führte zu variablen Veränderungen im Fettgehalt 1x OP50-gefütterter Nematoden, wobei jedoch das Auftreten von BOW die Effekte beeinflusste (Diagramm 10 und Diagramm 11 B). Zudem verursachte die restriktive Futtermenge von 1x OP50 nach vier Tagen ungewollt eine Hungerinduktion in den Kontrollnematoden, die ebenfalls durch das Auftreten von BOW geprägt war, und somit kaum einen Unterschied zu der Nahrungskondition von 24-h gehungerten, 1x OP50-Nematoden darstellte (Diagramm 11 B und Abbildung 17). Die Beeinflussung des Fettgehalts durch *in utero* geschlüpfte L1-Larven und daraus resultierenden Ergebnisse waren daher eher zu kritisch zu betrachten. Die 24-stündige *starvation* in adulten, mit 4x OP50 gefütterten Nematoden führte hingegen zu einer signifikanten Reduzierung der Körperfläche, die durch die reduzierte Eizahl *in utero* verstärkt ausgeprägt war, welche auf eine Verringerung des Reproduktionsprozesses schließen ließ (Diagramm 11 B und Abbildung 17). Die dabei beobachtete drastische Fettreduktion in den Nematoden war ebenfalls durch das auftretende BOW beeinflusst. Die Kontrollnematoden dahingegen waren in der Lage aus der weiterhin vorhandenen Futterquelle Energie zu generieren und in die Reproduktion zu investieren. Interessanterweise reduzierte sich der Fettgehalt der adulten, 4x OP50-gefütterten Kontrollen im Vergleich zum Vortag und ließ darauf schließen, dass diese Nematoden vermutlich primär mehr Energie in die Reproduktion und auf Kosten ihrer Fettreserven investierten darstellte (Diagramm 11 A und B). Auffällig war hierbei zusätzlich, dass ähnliche Fettgehalte in adulten 4x OP50-gefütterten Kontrollnematoden wie in adulten 1x OP50-gefütterten Kontrollen zu beobachten war, obwohl diese am vierten Tag weiterhin ausreichend Futter zur Verfügung hatten und kein BOW aufwiesen (Abbildung 17). Nach dem Erreichen des Adultstadiums erhöhen die Nematoden nachweislich die Nachkommenproduktion, die ein Maximum zum Tag 2 der Adoleszenz erreicht und danach kontinuierlich wieder abnimmt, womit der beobachtete, vergleichsweise geringe Fettgehalt und die erhöhte Anzahl intrauteriner Eier der Nematoden am vierten Tag, der dem zweiten Tag der Adoleszenz entspricht, erklärbar wären (McCarter *et al.*, 1999, Scharf *et al.*, 2021).

Zusammenfassend waren die Effekte der *starvation* auf den Fettgehalt der Nematoden stark vom exponierten Larvenstadium, der Dauer der Hungerphase und der vorherigen Futtermengenerfahrung der Nematoden während der Entwicklung abhängig. Die Diskrepanz zwischen den beobachteten Effekten durch die Hungerphase lässt darauf schließen, dass ein schmaler Grat zwischen der Induktion einer Fetteinlagerung, der Aufrechterhaltung des Fettgehaltes und des Verbrauchs der Energiereserven bei Nematoden existiert. Die Auswahl der 1-fachen Futtermenge für diese Arbeit stellte sich als suboptimal heraus, um eine Fettreduzierung

durch die *starvation* in den Nematoden herbeizuführen, da diese bereits eine restriktive Nahrungsmenge für eine Versuchsdauer von drei bzw. vier Tagen darstellte und unkontrollierte Effekte, wie eine erhöhte Fettinduktion, oder das Auftreten von BOW zur Folge hatte. Die reduzierte Futtermenge während der Entwicklung der Nematoden führte potentiell zusätzlich zu einer Ausprägung einer *starvation*-Resistenz, sodass bei auftretender Hungerphase statt der Fettverringern Mechanismen zur Fettakkumulation induziert wurden. Darüber hinaus war die Auswahl des L4-Stadiums als exponiertes Larvenstadium ungünstig, um den Effekt der Fettreduktion durch die *starvation* in den Nematoden zu induzieren, da der *starvation*-Effekt durch die vermeintlich zusätzlich für die adäquate Entwicklung zu adulten Nematoden benötigte Energie überlagert wurde. Eine prolongierte Hungerphase im Adultstadium hingegen bewirkte vermehrt das Auftreten von BOW, wodurch der Fettgehalt und die Lebensfähigkeit der Nematoden durch die *in utero* geschlüpften L1-Larven erheblich beeinflusst wurde. Zukünftig sollte die *starvation*-assoziierte Fettreduktion daher in sterilen adulten Nematoden induziert werden, um diesen Faktor auszuschließen. Letztlich konnte aufgrund der aufgeführten Problematiken bei den durchgeführten Konditionen kein magerer *C. elegans*-Fettphänotyp durch die *starvation* generiert werden.



## 5.5 Eignung der Futtermenge zur Modulation des Fettgehalts von *C. elegans*

### 5.5.1 Einfluss der Futtermenge auf die adulte Körpergröße und Anzahl der Eier *in utero*

Eine erhöhte Energiezufuhr wurde in Form der unterschiedlichen Futtermengengabe alternativ zur Glucose-Gabe induziert, um eine vermehrte Fetteinlagerung in den Nematoden zu erzielen. Futtermengen-spezifische Effekte in *C. elegans* wurden oftmals mit dem Fokus auf die Nahrungsrestriktion untersucht, wobei verringerte Futtermengen Reduzierungen in der Körperlänge und den Fettgehalten sowie eine verzögerte Induktion der Reproduktion der Nematoden zeigen (Lenaerts *et al.*, 2008, Harvey und Orbidans, 2011, So *et al.*, 2011, Palgunow *et al.*, 2012, Miersch und Döring, 2013, Lüersen *et al.*, 2014, Hibshman *et al.*, 2016). Die Beobachtungen in diesen Nahrungsrestriktionsstudien verifizierten *per se* die Abhängigkeit der Körpergröße (Körperlänge, -fläche und -volumen) und des Fettgehalts, aber auch der Reproduktion (intrauterine Eizahl) der Nematoden von der Futtermenge, die in dieser Arbeit reproduzierbar mit der NR-Färbung und anhand von Durchlicht-Aufnahmen (ZOE™ Fluorescent Imager) gezeigt werden konnten.

Mit einer höheren Nahrungsverfügbarkeit wird nachweislich auch die pharyngeale Pumprate von *C. elegans* gesteigert, was zusätzlich zur höheren Futtermenge im Medium zu einer vermehrten Nahrungsaufnahme beiträgt und die Insulin/IGF-1-, TGF- $\beta$ - und mTOR-Signalwege, verstärkt induziert (Jia *et al.*, 2004, Ashrafi, 2007, Chen *et al.*, 2008, Roberts *et al.*, 2010, Avery und You, 2012, Gumienny und Savage-Dunn, 2013, Lee *et al.*, 2017). Diese Signalwege regulieren die Entwicklung, das Körperwachstum und den Fettstoffwechsel der Nematoden, sodass eine verstärkte Induktion durch erhöhte Futtermengen vermutlich die Resultate in dieser Arbeit erklären. Die bereits herausgestellte restriktive Futtermenge von 1x OP50 konnte in den Futtermengenversuchen durch die geringere Körpergröße und Anzahl intrauteriner Eier im Vergleich zu vermehrt gefütterten Nematoden weiterhin bestätigt werden (Diagramm 15, Diagramm 17, Diagramm 19). In vermehrt gefütterten Nematoden, bei denen kein Nahrungsmangel auftrat, zeigte sich bereits mit der 2-fachen Futtermenge eine hohe intrauterine Eizahl (im Durchschnitt ca. 30 Eier pro drei Tage alte Nematoden), welche mit erhöhter Futtermenge nicht weiter gesteigert wurde, sodass diese Anzahl an Eiern vermutlich die gewöhnliche Produktionsrate widerspiegelt und die gewöhnliche Menge an intrauterinen Eiern in Flüssigmedium kultivierter *C. elegans* unter uneingeschränkter Nahrungsverfügbarkeit repräsentiert (Diagramm 19). Die Zusammenhänge zwischen der durch die Nahrung verfügbaren Energie und der Körpergröße sowie der intrauterinen Eizahl der Nematoden können indirekt Hinweise auf den Fettgehalt in den Nematoden geben, welcher im Folgenden untersucht wurde.

### 5.5.2 Erhöhung der Triglyceridgehalte durch vermehrte Futtergabe

In dieser Arbeit zeigte die Bestimmung der Triglycerid (TAG)-Gehalte mittels des Triglycerid-Assays, dass die Fetteinlagerung in den Wildtypen bis zum Entwicklungsstadium der L4-Larve (zwei Tage alte Nematoden) unabhängig von der Futtermenge zu sein schien und sich ein wesentlicher Unterschied in der Fettakkumulation erst im Adultstadium ausprägte (Diagramm 22). Darüber hinaus zeigte sich eine Abhängigkeit des Triglyceridgehalts (pro Körpervolumen) der Nematoden von der Futtermenge mit einer indizierten Sättigung mit der 4-fachen Futtermenge, was den vorherigen Resultaten der NR-Färbung entsprach (Diagramm 18 B, Diagramm 20). Diese Beobachtungen stimmten mit denen von Palgunow und Kollegen überein, die im Rahmen ihrer Nahrungsrestriktionsstudien keine oder nur geringfügige Unterschiede im Fettgehalt (TAG/Nematode und TAG/Protein) unterschiedlich gefütterter L4-Larven nachwiesen, wohingegen sich die Triglyceridgehalte in Adulten signifikant unterschieden (Palgunow *et al.*, 2012). Nachweislich nimmt neben der Körpergröße auch der Fettgehalt in den Nematoden während der Entwicklung über die einzelnen Larvenstadien zu (Yen *et al.*, 2010, Pino *et al.*, 2013, Fouad *et al.*, 2017). Mit dem Erreichen der reproduktiven Reife im Adultstadium benötigen die Nematoden zusätzlich Energie für die Produktion von Nachkommen (Hansen *et al.*, 2013). Durch die Aufnahme einer höheren Nahrungsmenge standen den Nematoden in dieser Arbeit folglich vermutlich mehr bzw. übermäßig viele Nährstoffe zur Verfügung, die zur Hochregulierung der TAG-Synthese und vermehrten Speicherung von Triglyceriden führten. Die Speicherung überschüssiger Fette in Form von Triglyceriden dient den Nematoden dabei nicht nur als Energiereserve, sondern stellt auch einen Schutzmechanismus gegen die Lipo- und Glucotoxizität bzw. den zellulären Stress dar, die durch vermehrt vorhandene Glucose und Lipide verursacht werden (Listenberger *et al.*, 2003, Unger und Scherer, 2010). Zusätzlich wird in sowohl *C. elegans*, als auch Säugern, im Rahmen der Glykolyse und Glykogenolyse vermehrt Glycerol aus dem intermediären Glucose-6-Phosphat generiert, das anschließend als Schutz gegen die Glucotoxizität aus den Zellen exportiert wird (Fondy *et al.*, 1971, Possik und Pause, 2016, Rotondo *et al.*, 2017, Prentki *et al.*, 2020, Possik *et al.*, 2022). Im Allgemeinen dient die vermehrt induzierte Biosynthese von Glycerol, ein wichtiger Baustein von Triglyceriden und Phospholipiden, in *C. elegans* und in Säugern, dazu, die Entwicklung, das Größenwachstum und die Fettspeicherung zu ermöglichen (Rognstad *et al.*, 1974, Borgström, 1988, Hadváry *et al.*, 1991, Ransac *et al.*, 1991, Baba *et al.*, 1995, Branicky *et al.*, 2010). In *C. elegans* zeigte sich zusätzlich die Schutzfunktion der vermehrten Glycerol-Bildung gegenüber Nahrungsüberschuss-assoziierten, metabolischen, hyperosmotischen und -tonischen oder auch thermalen (Kälte-)Stress, wobei letzteres vermutlich eine geringere Rolle in dieser Arbeit spielt, da die Haltung der Nematoden in dieser Arbeit unter konstanten Temperaturbedingungen erfolgte (Lamitina *et al.*, 2004, Lee *et al.*, 2009b, Burkewitz *et al.*, 2012, Possik und Pause, 2016, Liu *et al.*, 2017). Die aufgeführten Prozesse könnten daher, neben der erhöhten Triglyceridsynthese, ebenso

zu den hohen freien Glycerolmengen beigetragen haben, die in dieser Arbeit bei der Fütterung der Nematoden mit zunehmender OP50-Menge beobachtet wurden. Die Quantifizierung von Glycerolmengen in den Nematoden könnte in künftigen Studien möglicherweise als zusätzlicher Endpunkt für die Untersuchung des Fettes oder aber auch als potentieller Stressindikator für hohe Nährstoffzufuhr dienen. Ferner könnten die Mechanismen, die der vermehrten Glycerolbildung zugrunde liegen, näher untersucht werden und somit das Verständnis über die funktionelle Rolle von Glycerol im Fettstoffwechsel von *C. elegans* und darüber hinaus erweitern.

### 5.5.3 Veränderung der Größe und Anzahl der *lipid droplets* adulter *C. elegans* durch die Futtermenge

Die Analyse von *lipid droplets* (LD), die Speicherorganellen von Triglyceriden (TAGs), stellt ebenfalls eine Möglichkeit zur Quantifizierung des Fettgehalts in *C. elegans* dar (Zhang *et al.*, 2010a, Zhang *et al.*, 2010b, Wilfling *et al.*, 2013, Lee *et al.*, 2014, Vrablik *et al.*, 2015). Mit der Nahrungsabhängigen Veränderung im Triglyceridgehalt, war auch eine Veränderung der Morphologie oder auch der Anzahl von LD in *C. elegans* zu erwarten, die bereits in anderen Studien durch die Fütterung der Nematoden mit verschiedenen Bakterienstämmen, welche sich in ihrer Zusammensetzung jeweils unterschieden, gezeigt werden konnten (Brooks *et al.*, 2009, Zhang *et al.*, 2010b, Ding *et al.*, 2015). In dieser Arbeit konnte die Hypothese der Nahrungsbedingten Modulation der LD-Größe (Volumen) durch Unterschiede der intestinalen LD in mageren (1x OP50) und fetten Nematoden (4x OP50) bestätigt werden. Interessanterweise verursachte die 4-fache Bakterienmenge eine Zunahme der mittleren LD-Volumina in den Nematoden, aber keine Änderung in der mittleren LD-Anzahl (Diagramm 23 B und A). Mit der Hypothese einer angehenden Sättigung mit der 4x OP50-Futtermenge, repräsentierten die bestimmten LD-Volumina (1,1 – 1,5  $\mu\text{m}^3$ ) vermutlich die maximalen LD-Durchschnittsgrößen in Flüssigmedium kultivierter *C. elegans*. Publierte LD-Größen können aufgrund der Diskrepanz in der Bestimmungsmethode, verwendeten Futtermenge und vor allem in der Kultivierungsmethode, aber auch in dem untersuchten Larvenstadium (L4- und jungadultes Stadium) nicht mit dieser Studie verglichen werden (Shi *et al.*, 2013, Vrablik *et al.*, 2015, Cao *et al.*, 2019).

Über die Jahre wurden durch zahlreiche Untersuchungen der *lipid droplets* in unterschiedlichen Zellen und Geweben von Bakterien über Nager, bis hin zum Menschen, zahlreiche Faktoren identifiziert, die in der *de novo*-Bildung, im Wachstum, der Fusion oder der Hydrolyse der LD eine Rolle spielen (Ploegh, 2007, Walther und Farese, 2012, Yang *et al.*, 2012). Dabei stellte sich heraus, dass die Regulation und Funktion von LD von Interaktionen mit zellulären Organellen, wie dem Endoplasmatischen Retikulum (ER), den Mitochondrien, den Peroxisomen oder den Endosomen abhängen und zwischen Bakterien, unterschiedlichen Säugern und *C. elegans* hochkonserviert sind (Martin *et al.*, 2005, Binns *et al.*, 2006, Liu *et al.*, 2007, Zehmer *et al.*, 2009, Pu *et al.*, 2011, Mak,

2012, Na *et al.*, 2015). Die molekularen Mechanismen, die der LD-Bildung, den morphologischen Veränderungen und den Funktionen zugrunde liegen wurden bislang jedoch noch nicht vollständig identifiziert. Durch die Abhängigkeit der LD-Größe von der in den Nematoden vorhandenen bzw. gespeicherten Triglyceridmenge, stellen die Triglyceridsynthese und die Lipolyse wesentliche Prozesse dar, die die Morphologie der LD bestimmen können (Zhang *et al.*, 2010b, Wilfling *et al.*, 2013, Lee *et al.*, 2014, Vrablik *et al.*, 2015). Abhängig von der Nahrung und der metabolischen Nachfrage werden diese Prozesse initiiert und reguliert, was folglich zur Veränderung der LD in ihrer Größe, Anzahl und Verteilung führt (Greenberg *et al.*, 1991, Walther und Farese, 2012). Dabei bewirkt, wie zuvor erwähnt, die Nahrungszusammensetzung direkte Veränderungen im TAG-Gesamtgehalt. Studien zeigten, dass beispielsweise ein geringer Fettsäure-Anteil der Vaccensäure (C18:1n7) in der aufgenommenen Nahrung zu einem geringeren TAG-Gesamtgehalt und zu kleineren LD in den Nematoden führt (Zhang *et al.*, 2010a). Da das Endoplasmatische Retikulum der Ort der LD-Entstehung und -Expansion ist, besitzt dieses eine wichtige, funktionelle Rolle in der Regulation der LD (Vrablik *et al.*, 2015, Cao *et al.*, 2019). Dabei stehen Acetyl-CoA-Synthasen (ACS) und Diacylglycerolacyltransferasen (DGAT) im Vordergrund, die auch bei der *de novo*-Fettsäuresynthese zur Bildung von TAGs beteiligt sind (Mullaney *et al.*, 2010, Zhang *et al.*, 2010a, Xu *et al.*, 2012a, Shi *et al.*, 2013). ACS-22 und DGAT-2 bspw. vermitteln als Komplex mit dem Fettsäuretransportprotein FATP-1 die Bindung zwischen den ER und den LD, um die Integration von TAGs in die LD zu ermöglichen (Mak, 2012, Xu *et al.*, 2012a). Einer der wichtigsten begrenzenden Faktoren in der LD-Größenregulation ist außerdem die Adipozyten-Triglyceridlipase (ATGL-1), da diese bei einem erhöhten Energiebedarf als Hauptlipase die benötigten Fettsäuren aus den LD mobilisiert (Zhang *et al.*, 2010a, Young und Zechner, 2013, Srinivasan, 2015). Bei auftretendem Futtermangel können zusätzlich die Lipasen-ähnlichen Enzyme LIPL-1 und LIPL-3, trotz ihrer Lokalisation an den Lysosomen-ähnlichen Organellen (LRO), beteiligt sein (Zhang *et al.*, 2010a, Young und Zechner, 2013, Srinivasan, 2015). Gene wie *maoc-1*, *dhs-28*, *daf-22* oder *prx-10*, die beim Fettabbau über die peroxisomale  $\beta$ -Oxidation relevant sind, definieren dabei ebenso die LD-Größe (Butcher *et al.*, 2009, Jo *et al.*, 2009, Zhang *et al.*, 2010a, Vrablik *et al.*, 2015). Andere Proteine, die ebenfalls in der LD-Größenmodellierung und -Funktionalität involviert sind, umfassen den Krüppel-ähnlichen Transkriptionsfaktor KLF-3, das Lipidbindeprotein LBP-5, das Seipin-Protein SEIP-1, die GTPase Atlastin, aber auch zahlreiche LD-Oberflächenproteine, wie DHS-3, DHS-28, MDT-28, oder auch der Phosphatidylcholingehalt spielt in diesen Mechanismen eine entscheidende Rolle (Turner und Crossley, 1999, Zhang *et al.*, 2010a, Walker *et al.*, 2011, Xu *et al.*, 2011, Zhang *et al.*, 2011, Klemm *et al.*, 2013, Chughtai *et al.*, 2015, Na *et al.*, 2015, Cao *et al.*, 2019, Salo *et al.*, 2019). Die aufgeführten Faktoren und die von Zhang und Kollegen identifizierten involvierten Gene könnten in weiterführenden Studien in Abhängigkeit von der Futtermenge, beispielsweise in Genexpressionsanalysen, näher beleuchtet werden, um den spezifischen Einfluss des

Versorgungsstatus der Nematoden auf die Regulation dieser Faktoren und damit die zugrundeliegenden Effekte der LD-Modulation weiter aufzuklären.

#### 5.5.4 Veränderung des Fettsäuregehalts und -musters in adulten *C. elegans* durch Modellierung des Nahrungsangebotes

Fettsäuren (FS) sind wesentliche Bausteine von Triglyceriden und Membranen oder fungieren als Signalmoleküle und erfüllen wichtige Rollen in der Erhaltung von essentiellen, physiologischen Prozessen in den unterschiedlichsten Organismen, von Säugern und Nicht-Säugern bis hin zu Pflanzen (van Meer *et al.*, 2008, Hulbert *et al.*, 2014, Bouyanfif *et al.*, 2019, Czumaj und Śledziński, 2020). Dabei haben aus der Nahrung bezogene FS einen wesentlichen Einfluss auf das Lipidom, die Gesamtheit der Lipide, dieser Organismen, da es energie günstiger ist diese direkt in Gewebe zu integrieren als FS für diesen Zweck erst modifizieren zu müssen (Grundy und Denke, 1990, Ruess und Chamberlain, 2010, Szeto *et al.*, 2011, Davies *et al.*, 2012, Gao *et al.*, 2017). Dieses Konzept wird als „*dietary routing*“ bezeichnet (Ruess und Chamberlain, 2010).

Nachweislich enthalten *E. coli* einfach gesättigte FS (SFAs), einfach ungesättigte FS (MUFAs) und Cyclopropan-FS (Cyclo-FS), während mehrfach ungesättigte Fettsäuren (PUFAs) von den Bakterien enzymatisch nicht synthetisiert werden können (Brooks *et al.*, 2009, Shi *et al.*, 2013). Dabei sind vorherrschend die SFA Palmitinsäure (C16:0) und Stearinsäure (C18:0), die zwei Cyclo-FS C17:0 *cyclo* und C19:0 *cyclo* und die MUFAs Palmitoleinsäure (C16:1n7) und Vaccensäure (C18:1n7) vorzufinden (Perez und Van Gilst, 2008, Brooks *et al.*, 2009). Cyclo-FS werden aus MUFAs und Methylengruppen über das Enzym Cyclopropan-Synthetase beim Erreichen der stationären Wachstumsphase der Bakterien gebildet, und agiert als Schutzmechanismus gegen entstehenden Säurestress bei hoher Zelldichte (Grogan und Cronan, 1997, Chang und Cronan, 1999, Kaur *et al.*, 2005). In mehreren Studien konnte durch die Fütterung mit diversen *E. coli*-Stämmen, die sich in ihrer Zusammensetzung unterschieden, die Nahrungs-bedingte Beeinflussung des *C. elegans*-Lipidoms gezeigt werden, wobei die Fettsäureprofile der Bakterien sich häufig in den Fettsäuremustern der Nematoden widerspiegeln (Brooks *et al.*, 2009, Szeto *et al.*, 2011, Davies *et al.*, 2012, Gao *et al.*, 2017, Menzel *et al.*, 2018, Spanier *et al.*, 2021). Dabei tragen Palmitinsäure (C16:0) und Stearinsäure (C18:0) der Bakterien wesentlich zum Gesamtgehalt der FS in *C. elegans* bei und werden nur jeweils zu 5 % bzw. 7 % *de novo* von den Nematoden synthetisiert (Perez und Van Gilst, 2008, Brooks *et al.*, 2009).

Übereinstimmend mit den Literaturdaten konnten in dieser Arbeit die in den OP50-Futterbakterien zuvor genannten vorherrschenden FS nachgewiesen werden (Diagramm 27). Die FS-Analysen von unterschiedlichen gefütterten Nematoden in dieser Arbeit bestätigten, kongruent mit den Daten der Triglyceridbestimmung, die Fettakkumulation in den Nematoden bei vermehrter Futtergabe, die sich durch die Erhöhung des Gesamtfettsäuregehalts sowie der einzelnen Fettsäuren der FS-

Kategorien in ähnlichen Verhältnissen ausprägte (Diagramm 25 A). Zudem war die vermehrte FS-Aufnahme durch die erhöhte Futtermenge anhand anteilig hoher Mengen an Cyclo-FS nachgewiesen, die ausschließlich durch die Futterbakterien aufgenommen werden können (Grogan und Cronan, 1997, Watts, 2009). Über die funktionelle Rolle von Cyclo-FS in den Nematoden ist bislang jedoch nichts bekannt (Watts und Browse, 2002, Kaul *et al.*, 2014). Mit der nahrungsbedingten, erhöhten Aufnahme von SFAs und der Aminosäure Leucin in die Nematoden, welche jeweils entsprechende Substrate für  $\omega$ 3-,  $\omega$ 6-PUFAs und verzweigte FS darstellen, war vermutlich die Synthese dieser FS verstärkt induziert, die die signifikant erhöhten Level der jeweiligen FS erklärte (Diagramm 25 A). Die funktionellen Rollen der PUFAs und verzweigten FS im Wachstum und der Reproduktion ließen sich zuvor in der gesteigerten Körpergröße und gesteigerten Reproduktionsrate (durch die Anzahl der Eier *in utero* indiziert) in vermehrt gefütterten Nematoden beobachten (Diagramm 21). Zusätzlich könnte die gesteigerte Synthese dieser FS bei vermehrter Futtergabe mit der Induktion eines Schutzmechanismus gegenüber adversen Effekten, wie die Verringerung der Lebensspanne, Lipotoxizität oder erhöhter oxidativer Stress, erklärt werden, die in einigen Studien im Zusammenhang mit einer übermäßigen Glucose-Zufuhr gezeigt wurden (Yang *et al.*, 2007, Lee *et al.*, 2009b, Walker *et al.*, 2010, Choi, 2011, Franco-Juárez *et al.*, 2021, Vieira *et al.*, 2022). Die Fettsäureprofile der unterschiedlich gefütterten Nematoden spiegelten somit einerseits die jeweilige Nahrungskondition wider, andererseits auch die induzierte Synthese einzelner FS, die für entsprechende physiologische Prozesse notwendig sind und/oder eine protektive Rolle gegenüber potentieller Gluco- und Lipotoxizität einnehmen.

Im Allgemeinen können diverse FS-Verhältnisse zusätzlich Aufschluss über mögliche adverse Effekte geben, wie hohe  $\omega$ 6-zu- $\omega$ 3-PUFAs- oder SFAs-zu-PUFA-Verhältnisse im Serum von Menschen, die als Indikatoren für ein erhöhtes Risiko gelten, an Fettleibigkeit, *Diabetes mellitus* (Typ 2), Herz-Kreislauf-Störungen oder Krebs zu erkranken (Simopoulos, 2004, Gómez Candela *et al.*, 2011, Mancini *et al.*, 2015, Marklund *et al.*, 2019, Gouaref *et al.*, 2020, Liput *et al.*, 2021). In zahlreichen Human- und Nagerstudien wurde die protektive Wirkung von  $\omega$ 3-FUFAs gegenüber Fettleibigkeit-assoziierten Effekten, wie erhöhte Cholesterol- oder TAG-Gehalte, hohem Blutdruck oder Entzündungsprozessen, aufgezeigt (Harris *et al.*, 1984, Goh *et al.*, 1997, Leaf, 2007, Sartore *et al.*, 2008, Gajos *et al.*, 2010, Kromhout *et al.*, 2012, Balogun *et al.*, 2014, Bercea *et al.*, 2021, Hernandez *et al.*, 2021). Diese Schutzfunktion von  $\omega$ 3-PUFAs erklärt vermutlich auch den Zusammenhang zwischen der Entstehung von Erkrankungen und geringen  $\omega$ 3-PUFA-Mengen bzw. hohen  $\omega$ 6/ $\omega$ 3-PUFA-Verhältnissen. In der vorliegenden Arbeit bewirkte eine vermehrte Futtergabe die Erhöhung von  $\omega$ 6/ $\omega$ 3-PUFA- und MUFA/PUFA-Verhältnissen (Tabelle 2). Da die Futterbakterien von *C. elegans* jedoch keine PUFAs enthalten und die Nematoden, im Gegensatz zum Menschen, in der Lage sind PUFAs *de novo* zu synthetisieren und zwischen  $\omega$ 6- und  $\omega$ 3-PUFAs zu

interkonvertieren, ist der direkte Vergleich bestimmter Fettsäureverhältnisse, wie das  $\omega 6/\omega 3$ -PUFA-Verhältnis, zwischen Menschen und *C. elegans* im Zusammenhang mit der Nahrungsaufnahme und involvierten Stoffwechselwege kritisch zu betrachten (Simopoulos, 2004, Perez und Van Gilst, 2008, Brooks *et al.*, 2009). Bisher in den Nematoden aufgestellte Hypothesen über die Zusammenhänge zwischen bestimmten FS-Gruppen und daraus resultierenden Effekten stellen hingegen MUFAs und PUFAs dar, als wichtige Schlüsselfaktoren in der FS-Homöostase, da deren niedriges Verhältnis mit einer verringerten Lebensdauer der Nematoden assoziiert wird (Wan *et al.*, 2019). Die Folgen der in dieser Arbeit beobachteten Erhöhung der MUFA/PUFA-Verhältnisse bei vermehrter Futtergabe bleiben jedoch unklar, da potentielle Endpunkte, wie die Lebensspanne, im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht wurden.

In den meisten Individuen werden während der Schwangerschaft insbesondere das Wachstum und die Entwicklung der Feten durch die maternale Ernährung determiniert. Im Zusammenhang mit dem Fettgehalt, führt bei Menschen und Nagern eine maternale Überernährung nachweislich zur Veränderung des Lipidoms der Feten (Kushtagi und Arvapally, 2009, Kulkarni *et al.*, 2013, Whyte *et al.*, 2013, Renault *et al.*, 2015). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass hohe Glucose-Level und hohe Triglyceridgehalte hyperglykämischer und adipöser Mütter direkt auf die Nachkommen übertragbar sind (Williams *et al.*, 2014, Pantaleão *et al.*, 2022). In Nahrungsrestriktionsstudien mit *C. elegans* von Klapper und Kollegen wurde durch Analysen von Triglyceridgehalten und Fettsäurespezies in adulten Nematoden und deren Embryonen die Hypothese aufgestellt, dass die Lipidmuster von Nematoden qualitativ und quantitativ auf die Nachkommen übertragbar sind (Klapper *et al.*, 2016b). Die Analyse der FS in den Eiern in der vorliegenden Arbeit zeigte trotz des beeinflussten Fettsäureprofils der Nematoden durch die Futtermenge, eine eher konstante Versorgung der Eier mit einem unveränderten Gesamtfettsäuregehalt an, mit eher nicht signifikanten Änderungen in den relativen Anteilen einzelner Fettsäuren (Diagramm 24 und Diagramm 26). Die mit 1x OP50 restriktiv gefütterten Nematoden schienen aufgrund ihrer verringert verfügbaren Energie bzw. Fettsäuren die Versorgung der Eier jedoch auf Kosten der Anzahl der Eier *in utero* zu gewährleisten (Diagramm 21 D). Bei der Betrachtung der zuvor erwähnten FS-Muster, spiegelten sich die erhöhten  $\omega 6/\omega 3$ -PUFA- sowie erhöhten MUFA/PUFA-Verhältnisse in vermehrt gefütterten adulten Nematoden ebenso in ihren Eiern wider, was auf eine mögliche Veränderung des Lipidhaushalts in den Nachkommen durch die parentale Ernährung hindeuten könnte. In einigen Studien wurde gezeigt, dass restriktiv gefütterte Nematoden zwar weniger Eier produzierten als *ad libitum* gefütterte, die Eier und L1-Larven (Körperlänge) dieser Nematoden jedoch größer waren (Harvey und Orbidans, 2011, Hibshman *et al.*, 2016). Die Divergenz in der Größe der Eier könnte die tendenzielle Erhöhung der absoluten FS-Gehalte in den Eiern höher gefütterter Nematoden in dieser Arbeit erklären, die sich bei der Betrachtung der relativen Anteile im Gesamtfettsäuregehalt hingegen nicht widerspiegelten (Diagramm 25 B,

Diagramm 26 B). Die absolute Größe der Eier wurde in dieser Arbeit nicht untersucht, die Bestimmung des Parameters wäre jedoch in künftigen Studien sinnvoll, insbesondere um ein besseres Verständnis über den Einfluss der veränderten Größe und FS-Komposition der Eier auf die weitere Entwicklung und auf den Fettmetabolismus der Embryonen zu erlangen, die zu potentiellen Veränderungen im Adultstadium führen könnten.

Durch die FS-Analyse der Nematoden bestätigte sich die bereits zuvor nachgewiesene Fettzunahme bei vermehrt zugeführtem Futter und stellt somit mit dem FS-Muster und den einzelnen FS-Verhältnissen zusätzliche, geeignete Endpunkte für die Fettbestimmung in *C. elegans* für Folgestudien bereit.



## 5.6 Fett-reduzierende Wirkung von Orlistat in *C. elegans*

Orlistat, auch bekannt unter dem Namen Xenical<sup>®</sup>, ist ein Pharmakon, das 1999 von der *Food and Drug Administration* der USA (FDA) für den Menschen zur Behandlung von Adipositas zugelassen wurde (McNeely und Benfield, 1998, Leonhardt *et al.*, 1999, MacConnachie, 1999, Halpern und Halpern, 2015). Das Anti-Diabetikum ist ein potenter und selektiver Inhibitor der humanen Magen- und Pankreaslipase, der auch in der Lage ist, die Lipase von Nagern nachweislich zu hemmen (Barbier und Schneider, 1987, Borgström, 1988, Hadvary *et al.*, 1991, Ransac *et al.*, 1991, Guerciolini, 1997, Sjöström *et al.*, 1998, Van Gaal *et al.*, 1998, Heck *et al.*, 2000, Bukhari *et al.*, 2021). Durch die Inaktivierung der Lipase wird die Spaltung extern aufgenommener Fette verhindert, sodass diese vom Darm nicht resorbiert und schließlich unverdaut ausgeschieden werden (Hadvary *et al.*, 1991, Heck *et al.*, 2000, Curran und Scott, 2004, Henness und Perry, 2006).

In der vorliegenden *C. elegans*-Studie bewirkte Orlistat eine Verringerung der Körpergröße und intrauterinen Eizahl sowie, ähnlich wie in Menschen und Nagern, eine Fettreduktion in sowohl mageren, als auch fetten Phenotypen in der Flüssigkultur, die wahrscheinlich aus einem geringeren Energieangebot durch vermindert resorbierter Fette resultierte (Diagramm 31, Diagramm 32). Mit der NR-Färbung zeigten sich in 1x OP50-gefütterten Nematoden keine Effekte der Orlistat-Behandlung, da in den Nematoden, aufgrund der restriktiven Futtermenge, vermutlich kaum abbaubare Fettspeicher vorhanden waren (Diagramm 31). Orlistat bewirkte lediglich in 4x OP50-gefütterten Adulten eine Fettreduktion um ca. 40 %, welche in etwa den Werten von Agarplatten-basierten Studien entsprach, in denen eine 25 – 30 %-ige Reduktion im Fettgehalt der Nematoden, jedoch in L4- und jungadulten Larven, durch 6 µg/ml Orlistat (entsprechend 12,1 µM Orlistat) mit der NR-Färbung (fixiert und lebend gefüttert) nachgewiesen wurde (Martorell *et al.*, 2012, Navarro-Herrera *et al.*, 2018, Llopis *et al.*, 2019, Aranaz *et al.*, 2020, Balaguer *et al.*, 2022).

Im Triglycerid-Assay der vorliegenden Arbeit konnte hingegen in 1x OP50- und 4x OP50-gefütterten Nematoden deutliche Abnahmen der Triglycerid (TAG)-Gehalte detektiert werden, wobei die Orlistat-induzierte drastische Reduktion um 90 % der TAGs in 1x OP50-gefütterten und die 60 %-ige TAG-Reduktion in 4x OP50-gefütterten Nematoden eher kritisch zu betrachten waren, da dieses Ausmaß der Fettreduzierung mit der NR-Färbung nicht beobachtet werden konnte (Diagramm 31 und Diagramm 32). Die Diskrepanz zwischen den quantifizierten Fettgehalten der beiden Bestimmungsmethoden ließ auf einen potentiellen Orlistat-Effekt im Triglycerid-Assay schließen, der durch eine direkte Hemmung der zugegebenen Lipase durch in der Probe noch vorhandenen Orlistat-Konzentration erklärt werden könnte. Zwar konnte eine vorliegende Lipaseaktivität durch einen messbaren Unterschied zwischen Proben mit Lipasezugabe im Vergleich zu Proben ohne Lipasezugabe (Ersatz durch Wasser) nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt), eine Herabsetzung der Lipaseaktivität durch die Nematoden aufgenommenes und potentiell

eingelagertes Orlistat ist jedoch nicht vollständig auszuschließen. Im Menschen wird Orlistat nach der Einmaleinnahme kaum resorbiert und innerhalb von drei bis fünf Tagen nahezu vollständig (99 %), in unveränderter oder minimal metabolisierter Form ausgeschieden (McClendon *et al.*, 2009). In *C. elegans* hingegen ist über die Pharmakokinetik von Orlistat bisher nichts bekannt. Lipaseaktivitätsassays und die Messung von potentiellen Orlistat-Konzentrationen im Kultivierungsmedium sowie in den Nematoden würden in weiterführenden Untersuchungen mehr Aufschluss über die aufgestellten Hypothesen sowie die Pharmakokinetik von Orlistat geben. Im Allgemeinen sollte bei der Untersuchung von Lipase-hemmenden Substanzen eine mögliche Beeinflussung der Resultate im Triglycerid-Assay berücksichtigt werden.

Die Analysen der *lipid droplets* (LD) und der Fettsäuren, die ebenso Indikatoren für TAG-Mengen darstellen, zeigten für magere und fette, Orlistat-behandelte Nematoden durchschnittlich kleinere LD, und folglich auch geringere LD-Dichten, sowie geringere Gesamtfettsäuregehalte (Reduktion um ca. 20 %), wodurch die Fett-reduzierende Wirkung von Orlistat in den Nematoden bestätigt werden konnte. Zusätzlich zur verringerten LD-Größe war auch die LD-Anzahl in mageren, Orlistat-behandelten Nematoden reduziert (Diagramm 33), die neben der verringerten TAG-Synthese und -speicherung in den LD durch verminderte Fettresorption im Darm, auch auf die notwendige Mobilisierung von TAGs aus den LD bei restriktiver Ernährung (hier 1x OP50) zurückgeführt werden könnte. Die Orlistat-vermittelte Inhibition der Hydrolyse bakterieller Lipide in resorbierbare Fettsäuren war in sowohl mageren, als auch fetten, Orlistat-behandelten Nematoden durch die signifikante Verringerung von SFAs und die tendenzielle Verringerung von MUFAs nachweisbar (Diagramm 35 A und B). Der bakterielle Ursprung dieser verringerten FS-Mengen war zusätzlich durch die verringert aufgenommenen Mengen an Cyclo-FS belegt (Diagramm 35 A und B), da diese ausschließlich durch die Futterbakterien aufgenommen werden können (Grogan und Cronan, 1997, Watts, 2009). Interessanterweise bewirkte die Orlistat-gehemmte FS-Resorption, durch die weniger SFAs und MUFAs zur Modifikation von langkettigen FS zur Verfügung standen, scheinbar eine vermehrte Induktion der *de novo*-PUFA-Synthese, die sich mit der Erhöhung von relativen  $\omega$ 3- und  $\omega$ 6-PUFA-Anteilen in beiden Fettphänotypen ausprägte (Diagramm 35 C). Insbesondere in 1x OP50-gefütterten Nematoden war die induzierte *de novo*-PUFA-Synthese deutlich ausgeprägt, was vermutlich zur Aufrechterhaltung des Wachstums und der Reproduktion der Nematoden diente, trotz geringerer vorhandenen Energie, die aus der restriktiven Fütterung sowie der Orlistat-gehemmten FS-Resorption resultierte. Fette, Orlistat-behandelte Nematoden hingegen wiesen vermutlich keinen Energiemangel auf, welches durch den Gesamtfettsäuregehalt indiziert war und weiterhin ein Vielfaches des Gesamtfettsäuregehalts der mageren Nematoden (unbehandelt und Orlistat-behandelt) entsprach, sodass die gesteigerte PUFA-Synthese in diesen Nematoden, anders als in mageren Nematoden, vermutlich aus anderen Gründen induziert wurde. Die gesteigerte PUFA-Synthese sowie die vermindert resorbierten MUFAs spiegelten sich ebenso, zumindest

teilweise, in den  $\omega 6/\omega 3$ -PUFA- und MUFA/PUFA-Verhältnissen beider Fettphänotypen wider (Diagramm 35 C, D und Tabelle 3). In mageren Nematoden zeigte sich keine Veränderung des  $\omega 6$ - und  $\omega 3$ -PUFA-Verhältnis durch die Orlistat-Behandlung, da die PUFA-Synthese beider Subklassen in diesen Nematoden im gleichen Maß induziert wurde (Tabelle 3). In fetten, Orlistat-behandelten Nematoden hingegen war eine tendenzielle Verringerung des  $\omega 6/\omega 3$ -PUFA-Verhältnis zu beobachten. Das signifikant verringerte MUFA/PUFA-Verhältnis in beiden Fettphänotypen ließ sich vermutlich durch die bereits indizierte verringerte MUFA-Resorption aus der Nahrung durch Orlistat erklären. Die Frage, welche Rolle die gesteigerte PUFA-Synthese in Orlistat-behandelten Nematoden einnimmt oder ob diese einen Orlistat-spezifischen Effekt darstellt, gilt es in weiterführenden Studien aufzuklären.

Die verringerte Fetteinlagerung durch Orlistat in den Nematoden hatte scheinbar keinen Einfluss auf die Versorgung der Eier beider Fettphänotypen, zumindest bezüglich der Gesamtfettsäuremengen. Bei der Betrachtung der einzelnen FS und FS-Verhältnisse wiesen die Eier magerer, Orlistat-behandelter Nematoden interessanterweise eine Erhöhung der  $\omega 6/\omega 3$ -PUFA- sowie MUFA/PUFA-Verhältnisse auf, die aus den signifikant reduzierten  $\omega 3$ -PUFAs resultierten (Tabelle 3). Die Auswirkungen der Versorgung der Eier mit geringeren  $\omega 3$ -PUFAs, aber auch zusätzlich beobachteten erhöhten Mengen verzweigter FS, auf die Entwicklung und den Fettgehalt der Nematoden im Adultstadium sind unklar, sollten in weiterführenden Untersuchungen der Folgegeneration(en) jedoch aufgeklärt werden. Die Untersuchungen könnten zusätzlich Aufschluss darüber geben, ob die Effekte auf die Nachkommen auf die Orlistat-Wirkung oder auf einen grundsätzlichen Energiemangel zurückzuführen sind. Die grundlegende Veränderung des FS-Musters in den Nematoden lässt auf zusätzlich induzierte Mechanismen in der FS-Homöostase durch Orlistat schließen, als nur die Inhibierung der Hydrolyse von Fetten und die damit verbundene verminderte Fettresorption. Tatsächlich wurden über die Jahre neben der Lipase-inhibierenden Wirkung in Zellkultur-basierten Studien für Orlistat zusätzliche Effekte, wie die Fettsäuresynthese-Inhibition über die Inaktivierung der Fettsäure-Synthase (FAS) oder die verminderte intestinale Absorption von Cholesterin über die Hemmung des humanen Niemann-Pick C1-ähnlichen Transportproteins 1 (NPC1L1) nachgewiesen, die in *C. elegans* ebenfalls zur Fettreduktion beigetragen haben könnten (Kridel *et al.*, 2004, Dowling *et al.*, 2009, Alqahtani *et al.*, 2015). *C. elegans* sind Cholesterin-auxotroph und besitzen das entsprechende NPC1L1-Homolog CUP-1 zur Aufnahme von essentiellen Cholesterin aus externen Quellen (Valdes *et al.*, 2012). Unter der Annahme einer analogen Orlistat-Wirkung auf CUP-1, könnte eine verringerte Cholesterinaufnahme, die in dieser Arbeit jedoch nicht untersucht wurde, zusätzlich die beobachtete Reduktion der Körpergröße und der intrauterinen Eizahl in den Nematoden erklären, da ein Cholesterinmangel sich bekanntlich negativ auf das Wachstum, die Signaltransduktion in den Gonaden, die Nachkommenzahl, aber auch auf die Stressresistenz der Nematoden auswirkt (Scheel

*et al.*, 1999, Yochem *et al.*, 1999, Merris *et al.*, 2003, Entchev und Kurzchalia, 2005, Wang *et al.*, 2008, Lee *et al.*, 2009a). Ferner wurden veränderte Expressionsmuster von 168 Genen in Orlistat-behandelten Säugerzellen identifiziert, die in essentiellen metabolischen Signalwegen des Fettmetabolismus involviert sind (Sankaranarayanapillai *et al.*, 2013). Eine veränderte Regulation solcher Mechanismen könnte auch die Orlistat-assoziierte Veränderung des FS-Musters der Nematoden erklären und sollte daher in zukünftigen Studien, z. B. mittels Genexpressionsanalysen, untersucht werden.

Unabhängig von weiterführenden Untersuchungen von Orlistat-Effekten auf die Nachkommen sowie der zugrundeliegenden Wirkmechanismen, konnte die Fett-reduzierende Wirkung von Orlistat in *C. elegans*, die in anderen Studien lediglich durch Fettfärbungen gezeigt wurden, weiterhin bestätigt und darüber hinaus anhand weiterer Fettbestimmungsparameter nachgewiesen werden. Schließlich konnte durch die gezeigte Orlistat-Wirkung auch die Eignung der Nematoden als alternatives Fettmodellsystem bestätigt werden, das Untersuchungen von Fettmetabolismus-assoziierten Substanzeffekten im Rahmen des gesundheitlichen Verbraucherschutzes ermöglichen könnte.

## 5.7 Untersuchung der mehrgenerationalen Weitergabe Futtermengen-induzierter Fettgehalte in *C. elegans* (multi- und intergenerationale Effektweitergabe)

Einige Humandaten und Erkenntnisse aus Nagerstudien legen nahe, dass bestimmte Ernährungsbedingte Phänotypen der Elterngeneration in die Folgegenerationen vererbbar sind und diese die Gesundheit der Nachkommen beeinflussen können, wie beispielsweise durch eine verstärkt ausgeprägte Fettleibigkeit (Ravelli *et al.*, 1998, Kaati *et al.*, 2002, Howie *et al.*, 2009, Lumey *et al.*, 2009, Lagisz *et al.*, 2014, Vickers, 2014, de Rooij *et al.*, 2015, Li *et al.*, 2015, Rando und Simmons, 2015, Hibshman *et al.*, 2016, Lecoutre *et al.*, 2018, Lecoutre *et al.*, 2021).

Die in dieser Arbeit gezeigte Nahrungsbedingte Modellierbarkeit des Fettgehalts von *C. elegans* wurde nachfolgend genutzt, um eine mehrgenerationale Übertragung von Nahrungs-induzierten Fettgehalten durch multi- oder intergenerationale Exposition gegenüber einer erhöhten Futtermenge zu überprüfen.

Für die erste multigenerationale Effektuntersuchung bestand die Hypothese darin, basierend auf den genannten Humandaten und Nagerstudien, dass bei einer kontinuierlichen Überfütterung der Nematoden mit 4x OP50 (multigenerationale Exposition), im Gegensatz zu den als Referenz dienenden, kontinuierlich mit 1x OP50 gefütterten Nematoden, Veränderungen in den Nematoden, als auch ihren Folgegenerationen induziert werden. Diese könnten sich beispielsweise in einer zunehmenden Fettakkumulation und/oder einer zunehmenden Körpergröße der Nematoden ausprägen, da durch das hohe Nahrungsangebot mehr als nur die für die Reproduktion benötigte Energie zur Verfügung steht, oder mögliche Stoffwechselstörungen in den Nachkommen zur Folge haben, die sich wiederum negativ auf die genannten Parameter auswirken. Dabei könnten die Effekte möglicherweise auch, oder zumindest partiell, unabhängig von der Nahrungssituation der betroffenen Generation sein. In dieser Arbeit führte die Erhöhung der gefütterten Bakterienmenge von 1x OP50 auf 4x OP50 beginnend in der P0-Generation zu einer Zunahme des Triglyceridgehalts in den Nematoden, die mit vorherigen Resultaten der Futtermengenuntersuchungen übereinstimmten (siehe 4.1.2.4 und 4.2.1). Die Untersuchung einer Effektweitergabe in die nachfolgenden Generationen (F1 – F4) mit der Fütterung einer gleichbleibenden, hohen Bakterienmenge (4x OP50) zeigte aber weder signifikante Veränderungen im Triglyceridgehalt, noch in der Körpergröße der Nachkommen im Adultstadium. Diese Beobachtungen stehen im Gegensatz zu Resultaten aus Nagerstudien, in denen multigenerationale Effekte einer fettreichen Diät über drei bis fünf Generationen nachweisbar waren, und sich in Form einer Zunahme des Körpergewichts sowie des Fettanteils von aufeinanderfolgenden Generationen ausprägten (Ding *et al.*, 2014, Adedeji *et al.*, 2019, Raad *et al.*, 2021). Dies könnte einen Spezies-Unterschied widerspiegeln, oder darauf hinweisen, dass in *C. elegans* multigenerationale Effekte nicht durch die Erhöhung der Bakterienmenge, wodurch das Verhältnis einzelner Nährstoffe in der aufgenommenen Nahrung unverändert bleibt, sondern vielmehr durch erhöhte Mengen bestimmter Nährstoffe in der Nahrung, wie Glucose oder

Fettsäuren, induzierbar ist. Zusätzlich war vermutlich mit der 4-fachen OP50-Menge bereits ein Sättigungsbereich der Fettspeicherung in den Nematoden erreicht, sodass eine potentiell zunehmende Fettakkumulation in aufeinanderfolgende Generationen in dieser Studie nicht ausgeprägt werden konnte. In Folgestudien könnten diese Hypothesen mit einer geringeren Futtermenge und der Fütterung einer beispielsweise fettreichen Diät überprüft und durch Genexpressionsanalysen verifiziert werden. Eine maternale restriktive Ernährung in Menschen und Nagern kann zu einem geringeren Geburtsgewicht und einer vermehrten Speicherung von Energiereserven im Laufe der Entwicklung der Nachkommen führen (Smith, 1947, Naeye *et al.*, 1973, Barker *et al.*, 1997, Apfeld und Kenyon, 1998, Ravelli *et al.*, 1998, Hales und Barker, 2001, de Rooij *et al.*, 2006, Painter *et al.*, 2006, Roseboom *et al.*, 2006, de Rooij *et al.*, 2010, Alqahtani *et al.*, 2015). Letzteres impliziert eine Anpassung der Nachkommen an möglicherweise langfristig schlechte Umweltbedingungen, wie Nahrungsknappheit, die bspw. in einer Ratten-Studie von Hardikar und Kollegen beobachtet wurde (Hardikar *et al.*, 2015). In dieser führte eine multigenerationale Exposition gegenüber einer restriktiven Futtermenge (kalorische und Proteinrestriktion) über 50 Generationen zu einer ausgeprägten Fettakkumulation in den Nachkommen (im späteren Alter), deren Fettgehalte die der Kontrolltiere deutlich überstiegen (Hardikar *et al.*, 2015). Des Weiteren wurde in dieser Studie gezeigt, dass der adipöse Phänotyp der Ratten trotz der Erfahrung einer normalen Nahrungsmenge in zwei darauffolgenden Generationen erhalten blieb und die Fettgehalte in den Ratten darüber hinaus zusätzlich anstiegen. Die Futtermenge von 1x OP50 stellte sich im Rahmen dieser Arbeit als restriktive Nahrungsmenge heraus, sodass die Fütterung der Referenznematoden mit 1x OP50 in dieser Untersuchung bereits eine andauernde Nahrungsrestriktion über mehrere Generationen entsprechen könnte. Die Hypothese einer Fettzunahme in aufeinanderfolgenden Generationen bei andauernder Nahrungsrestriktion, konnte in den als Referenz dienenden Nematoden jedoch nicht bestätigt werden. Dabei kann die kontinuierliche Fütterung mit 1x OP50 jedoch nur bedingt als multigenerationale Exposition gegenüber einer Nahrungsrestriktion angesehen werden, da die Nahrungsrestriktion nicht erst in der P0-Generation induziert wurde, sondern diese Fütterungskondition der Nematoden mit 1x OP50 bereits seit Beginn der Überführung der Nematoden von der Agarplattenkultur in die Flüssigkultur in der Stammhaltung der Nematoden Anwendung fand. Da die Nematoden in der Flüssigkultur zuvor keine andere Nahrungsmenge erfahren hatten, konnte demnach möglicherweise keine Adaptation der Nematoden an diese restriktive Nahrungskondition erfolgen.

In der zweiten mehrgenerationalen Studie wurde die intergenerationale Weitergabe von Futtermengen-assoziierten Effekten in den Nematoden untersucht. Die Hypothese bestand darin, dass ein plötzlich verändertes Nahrungsangebot, von einer geringen Futtermenge hin zu einer im Übermaß vorhandenen Futtermenge, eine Veränderung im Fettmetabolismus der Nematoden (P0) hervorruft, die in die unmittelbare Folgegeneration (F1) weitervererbt wird oder zu einem

adaptiven Fettphänotyp in diesen Nachkommen führt. Diverse Nagerstudien ergaben, übereinstimmend mit Humandaten, fundierte Belege dafür, dass eine nutritiv-bedingte Fettleibigkeit, beispielsweise durch Glucose- oder fettreiche Fütterung, intergenerational vererbt werden kann (Birch *et al.*, 2002, Dunn und Bale, 2009, Kushtagi und Arvapally, 2009, Massiera *et al.*, 2010, Dunn und Bale, 2011, Kulkarni *et al.*, 2013, Whyte *et al.*, 2013, Renault *et al.*, 2015, Harasymowicz *et al.*, 2020). Die Resultate der vorliegenden Arbeit, die nach Überfütterung der Parentalgeneration für die Folgegeneration unveränderte Fettgehalte zeigen, deuten dagegen darauf hin, dass in *C. elegans* eine intergenerationale Vererbung des Fettphänotyps, zumindest durch eine Erhöhung der Gesamtfuttermenge als auslösenden Reiz, nicht induzierbar ist.

Für beide mehrgenerationale Studien dieser Arbeit sollte aber auch die temporäre Hungerphase im L1-Stadium der Nematoden beachtet werden, die eine Synchronisation der Population ermöglicht, jedoch als zusätzliche Hungerphase die zu untersuchenden Nahrungs-bedingten Effekte überlagern könnte. Diese Hypothese wurde ebenso von Wan und Kollegen aufgestellt, die durch Genexpressionsanalysen jedoch zeigten, dass die transgenerational vererbten Effekte einer fettreichen Nahrung in *C. elegans* nicht durch Synchronisations-bedingte *starvation* beeinflusst waren (Wan *et al.*, 2022). Diese Feststellung sollte in Bezug auf das in der vorliegenden Arbeit verwendete Studiendesign in Folgestudien dennoch zusätzlich überprüft werden und die Untersuchung der mehrgenerationalen Vererbbarkeit des durch erhöhte Glucose- oder fettreiche Nahrung induzierten Fettphänotyps miteinschließen. Eine mehrgenerationale Vererbung von Fettmetabolismus-assoziierten Effekten durch die veränderte Ernährung der Nematoden in der vorliegenden Arbeit könnte möglicherweise dennoch vorliegen, die jedoch zumindest über den Triglycerid-Assay nicht erfassbar waren. Vorherige Resultate der Orlistat-Behandlung, welche eine verminderte Energieversorgung in den Nematoden verursachte und zu veränderten FS-Muster und FS-Verhältnissen in den Eiern führte (siehe 4.3), könnten auf vererbte (adaptive) Effekte in den Nachkommen hinweisen, die sich erst in späteren Entwicklungsstadien der Nematoden ausprägen. Diese Hypothese wird insbesondere durch Studien bestärkt, in denen nachweislich Nahrungs-restriktierte Nematoden größere Eier mit vergrößerten LD und erhöhten Triglyceridgehalten produzierten, welche in einer Reihe von adaptiven Phänotypen in den Nachkommen resultierten, die teilweise an die Folgegenerationen weitervererbt wurden (Harvey und Orbidans, 2011, Rechavi *et al.*, 2014, Jobson *et al.*, 2015, Hibshman *et al.*, 2016, Klapper *et al.*, 2016b, Kishimoto *et al.*, 2017, Jordan *et al.*, 2019). Demnach sollten weitere Untersuchungen, wie Analysen der Fettsäure- und der Genexpressionsmuster in unterschiedlich gefütterten Nematoden der jeweiligen Folgegenerationen durchgeführt werden, um potentielle, subtilere Veränderungen im Fettmetabolismus identifizieren zu können, die über die Triglyceridbestimmung nicht abgebildet werden. Dies könnte für Studien im Rahmen der mehrgenerationalen Effektweitergabe wertvoll sein und helfen andere, beschriebene mehrgenerationelle Effekte besser zu verstehen.

## 6 Ausblick

In dieser Arbeit konnten mehrere geeignete Nachweismethoden zur (semi-)quantitativen, als auch qualitativen Bestimmung des Fettgehalts in *C. elegans* durch die Modulation der gefütterten Bakterienmenge herausgestellt werden, die unterschiedliche Endpunkte adressieren. Die verschiedenen methodischen Messparameter ermöglichen eine umfangreiche Charakterisierung von *C. elegans*-Fettphänotypen. Zur Erweiterung des Verständnisses der involvierten Mechanismen, die bei den Veränderungen im Fettmetabolismus eine Rolle spielen, könnten Lipidomics- und Metabolomics-Studien durchgeführt werden, um die Signifikanz weiterer Lipidspezies, wie Diacylglycerole, Phosphatidylglycerole, -inositole, -serine, Cardiolipine, und Sphingomyeline, aber auch von Metaboliten herauszustellen (Satouchi *et al.*, 1993, Tanaka *et al.*, 1996, Shi *et al.*, 2016, Witting und Schmitt-Kopplin, 2016, Molenaars *et al.*, 2021). Verhältnisse zwischen Phosphatidylcholin und Phosphatidylethanolamin (PC/PE) dienen bspw. als indirekte Parameter für die Aktivität von  $\Delta 9$ -Desaturasen sowie für die Gehalte von SFAs und PUFAs in den Nematoden (Shi *et al.*, 2013, Vrablik *et al.*, 2015). Zusätzlich können Analysen von *lipid droplets* hypodermaler und muskulärer Zellen weitere Informationen über mögliche Stoffwechsellagerungen in den Nematoden bieten. Darüber hinaus sind Expressionsanalysen bekannter Fett-regulierender Gene in der mechanistischen Untersuchung von Fettmetabolismus-assoziierten Effekten unabdingbar, die durch RNA-Interferenz (RNAi)-Studien und den Einbezug von Mutanten- oder transgenen *C. elegans*-Stämmen gestützt werden könnten. Insbesondere sollten ebenso die erst kürzlich in den Nematoden nachgewiesenen homologen Gene überprüft werden, die im Menschen die Entstehung von Adipositas im Menschen fördern oder verhindern können (Ke *et al.*, 2021).

Trotz wesentlicher Unterschiede in der Regulation des Fettmetabolismus zum Menschen, scheinen *C. elegans* als Modellorganismus für die Untersuchung von Fettmetabolismus-assoziierten Effekten und human-relevanten Substanzwirkungen geeignet zu sein, die in dieser Arbeit durch die Fett-reduzierende Wirkung von Orlistat gezeigt werden konnte. Die Verwendung des Testsystems mit zwei gegensätzlichen *C. elegans*-Fettphänotypen bietet die Erfassung sowohl Fett-reduzierender, als auch -erhöhender Effekte bestimmter Stressoren, trotz potentiell auftretender Überlagerung mit Nahrungs-bedingten Effekten (bei einer Überernährung oder Mangelernährung). Dabei könnte die Energiebilanz in den Nematoden zusätzlich durch Messungen der ATP-Level über Bioluminescence Firefly Luciferase-Assays, die Seahorse-Methode oder durch den Einsatz von transgenen, Firefly Luciferase-exprimierenden *C. elegans* überprüft werden, die neben potentiellen Energiemängeln, auch das Ausmaß von Fettmetabolismus-assoziierten Substanzwirkungen miterfassen könnten (de Wet *et al.*, 1985, Lagido *et al.*, 2008, Lagido *et al.*, 2009, Palikaras und Tavernarakis, 2016). Darüber hinaus kann die optimierte Nile Red-Färbemethode als High-Throughput-Screening genutzt werden, um diverse Substanz-Bibliotheken auf Fettmetabolismus-,



aber auch Entwicklungs-assoziierte Effekte zu prüfen. Ferner könnten mit 4x OP50 gefütterte Nematoden als obesogenes Modell fungieren, wobei die charakteristischen Merkmale der Fettleibigkeit zunächst verifiziert werden sollten, beispielsweise durch den Vergleich mit einer Glucose- oder fettreichen Ernährung. Im weiteren Sinne könnten Nematoden mit unterschiedlichem Fettprofil jedoch ebenso genutzt werden, um Substanzwirkungen abhängig von ihrer Lipidzusammensetzung zu charakterisieren, die einen wichtigen Faktor in der Effektausprägung darstellen und mögliche Suszeptibilitäten von unterschiedlichen Fettphänotypen aufzeigen könnten. Die Erkenntnisse könnten weitgreifend bsw. in der Arzneimittelentwicklung zur Verbesserung der Wirksamkeit von Pharmaka dienen oder auch im Rahmen der individualisierten Medizin von großem Wert sein, da Wirkungen von Medikamenten, abhängig von ihren Eigenschaften, oftmals nur das Ganzkörpergewicht oder den *Body Mass Index* (BMI) der Patienten berücksichtigen, wobei diese Parameter jedoch auch von Faktoren, wie der Lipidzusammensetzung und der Knochendichte des Individuums, abhängig sein können (Hanley *et al.*, 2010). Schließlich soll das Testsystem mit unterschiedlichen *C. elegans*-Fettphänotypen weiterführend zur Untersuchung der mehrgenerationalen Vererbung von Fettmetabolismus-assoziierten Effekten durch diverse Substanzen dienen. Dabei wären Untersuchungen von endokrin wirkenden Substanzen aufgrund ihrer potentiell obesogenen Eigenschaften von Interesse, die eine Relevanz für die Gesundheit der Menschen darstellen, und von denen einige (z. B. Bisphenol A, Dichlordiphenyltrichlorethan, Glyphosat) bereits ein transgenerationales Vererbungspotential hinsichtlich der Fettleibigkeit in Nagernmodellen zeigten (zusammengefasst in Amato *et al.*, 2021). Trotz der Unterschiede in der hormonellen Regulation zwischen *C. elegans* und Säugern, können endokrine Disruptoren auch im Fadenwurm ähnliche Wirkungen entfalten (Höss und Weltje, 2007, Chen *et al.*, 2019, Zhou *et al.*, 2021). Zur Untersuchung epigenetischer Modifikationen könnten Genexpressionsveränderungen über Gesamt-Transkriptom-Shotgun (RNA-Seq)- oder *Chromatin ImmunoPrecipitation* DNA-Sequenzierungen (ChIP-Seq) und Histonmodifikationen über Western-Blot-Analysen erfasst werden (Rechavi *et al.*, 2014, Rechavi und Lev, 2017, Wan *et al.*, 2022).

Die zahlreich aufgeführten Untersuchungen der Fettmetabolismus-assoziierten Effekte bestimmter Stressoren sollen dazu dienen, das Verständnis über die Entstehung metabolischer Erkrankungen wie Adipositas, Diabetes, Herz-Kreislauf-Störungen oder auch Krebs zu erweitern und zusätzlich mögliche Therapieansätze hervorzubringen. Schließlich gilt es die Ursachen und Involvierung mechanistischer Prozesse in der mehrgenerationalen Effektvererbung tiefgreifender zu analysieren, um die Signifikanz und das Risiko bestimmter Substanzen für den Menschen und die Umwelt in diesem Zusammenhang besser abschätzen und bewerten zu können.

## 7 Zusammenfassung

*Caenorhabditis elegans* gilt als geeignetes Modellsystem für die Untersuchung von Stoffwechselstörungen, da grundlegende, molekulare Signalwege der Energiehomöostase zwischen *C. elegans* und dem Menschen hochkonserviert sind. Dabei kann die Analyse der Lipidhomöostase in den Nematoden, insbesondere im Hinblick auf die Fettakkumulation, wichtige Erkenntnisse über die molekularen Mechanismen liefern, die die Entstehung und Behandlung von Fettleibigkeit vermitteln.

Im Rahmen dieser Studie wurden *C. elegans* erfolgreich verwendet, um Phänotypen mit "geringem Körperfett" (mager) oder "hohem Körperfett" (fett), mit Hilfe verschiedener Ernährungsregime, zu erzeugen. Die generierten Fettphänotypen wurden mit Hinblick auf die Entwicklung, den Fettgehalt (Triacylglycerid- und Fettsäuregehalt) und Fettveränderungen auf der Ebene der *lipid droplets* (LD), sowie der Fettsäure (FS)-muster charakterisiert. Die Körpergröße, die Triacylglycerid (TAG)-Level, wie auch die Größe und das Volumen intestinaler LD werden durch die Menge verfügbarer Futtermittel reguliert. Insbesondere durch GC-MS-Analysen von "fetten" und "mageren" Phänotypen konnten signifikante Unterschiede im FS-Muster von adulten Nematoden, aber nicht ihren Eiern nachgewiesen werden. Vor allem Cyclo-FS, gesättigte Fettsäuren (SFAs) sowie verzweigte FS waren durch die Ernährung signifikant beeinflusst. Die Fett-reduzierende Wirkung von Orlistat, einem gängigen anti-obesogenen Medikament, konnte in *C. elegans* ebenfalls nachgewiesen werden, die sich anhand beeinflusster TAG-Gehalte, LD und FS-Muster adulter Nematoden zeigte. Darüber hinaus war eine Veränderung des FS-Musters der Eier Orlistat-behandelter Nematoden zu beobachten, was auf eine potenzielle Übertragung des Energiestatus bzw. Fettphänotypen auf die Nachkommen hindeuten könnte. Ferner wurden erste Untersuchungen zu multigenerationalen (P0 - F4) und intergenerationalen Effekten verschiedener Nahrungsregime in *C. elegans* durchgeführt, die jedoch keine Vererbung der induzierten Fettphänotypen anhand des TAG-Gehalts als Messparameter zeigten.

Mit der Verwendung verschiedener Fettphänotypen bietet der Fadenwurm ein vielversprechendes Testsystem zur Identifizierung und Bewertung des Risikos von potentiellen human-relevanten obesogenen und anti-obesogenen Substanzen in *C. elegans*. Darüber hinaus können diese als alternatives Modellsystem dienen, um die mehrgenerationale Weitergabe von Fettmetabolismus-assoziierten Effekten zu untersuchen. Das Testsystem könnte in Zukunft helfen, die Rolle von Umweltchemikalien bei der Entstehung von Fettleibigkeit besser zu verstehen und dabei gleichzeitig die Entwicklung von Medikamenten vereinfachen.

## 8 Abstract

*Caenorhabditis elegans* has become an emerging model system to investigate metabolic disorders as fundamental pathways regulating energy homeostasis are highly conserved between *C. elegans* and humans. Thus, the analysis of lipid homeostasis in *C. elegans*, in particular with regard to fat accumulation, can provide important insights into molecular mechanisms leading to obesity.

In this scope of study, *C. elegans* was successfully used as a model organism to generate "low body fat" (lean) or "high body fat"(fat) phenotypes by means of different food regimes. Hence, diet-induced fat phenotypes were characterized with respect to nematode development, fat content (triacylglyceride and fatty acid contents), changes on the level of lipid droplets (LD), as well as fatty acid (FA) patterns.

Body sizes, triacylglyceride (TAG) levels as well as sizes and density of intestinal LD were significantly increased in a diet-dependent manner. In addition, GC-MS analysis revealed significant differences in FA patterns of adult nematodes but not significantly of their eggs, with notable changes in cyclic FAs, saturated fatty acids (SFAs) as well as branched FAs levels, when comparing "lean" and "fat" phenotypes. As lean and fat nematodes were used for substance testing, interestingly, the fat-reducing effect of orlistat (a common anti-obesogenic drug) could also be demonstrated in *C. elegans*, evidenced by modified fat contents, LD and FA patterns in both adult fat phenotypes. Further, differences in FA patterns of eggs of orlistat-treated nematodes, suggested potential transmission of energy status/ fat phenotypes to the subsequent generation. Moreover, first investigations on multigenerational (P0 – F4) and intergenerational effects of different food regimes in *C. elegans* were carried out, but did not show inheritance of the induced fat phenotypes based on TAG content as readout parameter.

By using different fat phenotypes of *C. elegans*, the nematode provides a promising test system to identify and assess the risk of potential obesogenic and anti-obesogenic substances of human relevance. Further, it may serve as an alternate model system to investigate the transmission of fat metabolism-associated effects across generations. In the future, these studies could broaden the understanding of mechanisms of environmental chemicals leading to obesity, while valuable findings could also contribute to drug development.



## Literaturverzeichnis

- Aarnio, V., M. Lehtonen, M. Storvik, J. C. Callaway, M. Lakso und G. Wong (2011). *Caenorhabditis Elegans Mutants Predict Regulation of Fatty Acids and Endocannabinoids by the CYP-35A Gene Family*. Front Pharmacol 2: 12.
- Abdelaal, M., C. W. le Roux und N. G. Docherty (2017). *Morbidity and mortality associated with obesity*. Annals of translational medicine 5(7): 161-161.
- Adedeji, T. G., A. Fasanmade und E. Olapade-Olaopa (2019). *Multigenerational effects of dietary macronutrient intake on the metabolic phenotype of male Wistar rats*. Nutrition 58: 125-133.
- Aiken, C. E. und S. E. Ozanne (2014). *Transgenerational developmental programming*. Hum Reprod Update 20(1): 63-75.
- Albert, P. S. und D. L. Riddle (1988). *Mutants of Caenorhabditis elegans that form dauer-like larvae*. Dev Biol 126(2): 270-293.
- Alcántar-Fernández, J., R. E. Navarro, A. M. Salazar-Martínez, M. E. Pérez-Andrade und J. Miranda-Ríos (2018). *Caenorhabditis elegans respond to high-glucose diets through a network of stress-responsive transcription factors*. PLoS One 13(7).
- Alqahtani, S., H. Qosa, B. Primeaux und A. Kaddoumi (2015). *Orlistat limits cholesterol intestinal absorption by Niemann-pick C1-like 1 (NPC1L1) inhibition*. Eur J Pharmacol 762: 263-269.
- Altun, Z. F. und D. H. Hall (2009a) Introduction. In WormAtlas. DOI: 10.3908/wormatlas.1.1.
- Altun, Z. F. und D. H. Hall (2009b) Pericellular structures. In WormAtlas. DOI: 10.3908/wormatlas.1.20.
- Amato, A. A., H. B. Wheeler und B. Blumberg (2021). *Obesity and endocrine-disrupting chemicals*. Endocr Connect 10(2): R87-r105.
- Anderson, S. M., H. K. Cheesman, N. D. Peterson, J. E. Salisbury, A. A. Soukas und R. Pukkila-Worley (2019). *The fatty acid oleate is required for innate immune activation and pathogen defense in Caenorhabditis elegans*. PLOS Pathogens 15(6): e1007893.
- Angelo, G. und M. R. Van Gilst (2009). *Starvation protects germline stem cells and extends reproductive longevity in C. elegans*. Science 326(5955): 954-958.
- Anway, M. D., A. S. Cupp, M. Uzumcu und M. K. Skinner (2005). *Epigenetic transgenerational actions of endocrine disruptors and male fertility*. Science 308(5727): 1466-1469.
- Apfeld, J. und C. Kenyon (1998). *Cell nonautonomy of C. elegans daf-2 function in the regulation of diapause and life span*. Cell 95(2): 199-210.
- Aprison, E. Z. und I. Ruvinsky (2014). *Balanced trade-offs between alternative strategies shape the response of C. elegans reproduction to chronic heat stress*. PLoS One 9(8): e105513.
- Aranaz, P., D. Navarro-Herrera, M. Zabala, A. Romo-Hualde, M. López-Yoldi, J. L. Vizmanos, F. I. Milagro und C. J. González-Navarro (2020). *Phenolic Compounds Reduce the Fat Content in Caenorhabditis elegans by Affecting Lipogenesis, Lipolysis, and Different Stress Responses*. Pharmaceuticals (Basel, Switzerland) 13(11): 355.
- Ashrafi, K. (2007). *Obesity and the regulation of fat metabolism*. WormBook: 1-20.

- Ashrafi, K., F. Y. Chang, J. L. Watts, A. G. Fraser, R. S. Kamath, J. Ahringer und G. Ruvkun (2003). *Genome-wide RNAi analysis of Caenorhabditis elegans fat regulatory genes*. Nature 421(6920): 268-272.
- Atherton, H. J., O. A. Jones, S. Malik, E. A. Miska und J. L. Griffin (2008). *A comparative metabolomic study of NHR-49 in Caenorhabditis elegans and PPAR-alpha in the mouse*. FEBS Lett 582(12): 1661-1666.
- Avery, L. (1993). *The genetics of feeding in Caenorhabditis elegans*. Genetics 133(4): 897-917.
- Avery, L. und H. R. Horvitz (1989). *Pharyngeal pumping continues after laser killing of the pharyngeal nervous system of C. elegans*. Neuron 3(4): 473-485.
- Avery, L. und Y. J. You (2012). *C. elegans feeding*. WormBook: 1-23.
- Baba, H., X. J. Zhang und R. R. Wolfe (1995). *Glycerol gluconeogenesis in fasting humans*. Nutrition 11(2): 149-153.
- Baccarelli, A. und V. Bollati (2009). *Epigenetics and environmental chemicals*. Current opinion in pediatrics 21(2): 243.
- Balaguer, F., M. Enrique, S. Llopis, M. Barrena, V. Navarro, B. Álvarez, E. Chenoll, D. Ramón, M. Tortajada und P. Martorell (2022). *Lipoteichoic acid from Bifidobacterium animalis subsp. lactis BPL1: a novel postbiotic that reduces fat deposition via IGF-1 pathway*. Microb Biotechnol 15(3): 805-816.
- Ballinger, A. und S. R. Peikin (2002). *Orlistat: its current status as an anti-obesity drug*. Eur J Pharmacol 440(2-3): 109-117.
- Balogun, K. A., R. S. Randunu und S. K. Cheema (2014). *The effect of dietary omega-3 polyunsaturated fatty acids on plasma lipids and lipoproteins of C57BL/6 mice is age and sex specific*. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids 91(1-2): 39-47.
- Bar, D. Z., C. Charar, J. Dorfman, T. Yadid, L. Tafforeau, D. L. Lafontaine und Y. Gruenbaum (2016). *Cell size and fat content of dietary-restricted Caenorhabditis elegans are regulated by ATX-2, an mTOR repressor*. Proc Natl Acad Sci U S A 113(32): E4620-4629.
- Barbier, P. und F. Schneider (1987). *Syntheses of Tetrahydrolipstatin and Absolute Configuration of Tetrahydrolipstatin and Lipstatin*. Helvetica Chimica Acta 70: 196-202.
- Barker, M., S. Robinson, C. Osmond und D. J. Barker (1997). *Birth weight and body fat distribution in adolescent girls*. Arch Dis Child 77(5): 381-383.
- Bartz, R., W. H. Li, B. Venables, J. K. Zehmer, M. R. Roth, R. Welti, R. G. Anderson, P. Liu und K. D. Chapman (2007). *Lipidomics reveals that adiposomes store ether lipids and mediate phospholipid traffic*. J Lipid Res 48(4): 837-847.
- Basu, S., P. Yoffe, N. Hills und R. H. Lustig (2013). *The relationship of sugar to population-level diabetes prevalence: an econometric analysis of repeated cross-sectional data*. PLoS One 8(2): e57873.
- Baugh, L. R. (2013). *To grow or not to grow: nutritional control of development during Caenorhabditis elegans L1 arrest*. Genetics 194(3): 539-555.

- Bercea, C.-I., G. S. Cottrell, F. Tamagnini und A. J. McNeish (2021). *Omega-3 polyunsaturated fatty acids and hypertension: a review of vasodilatory mechanisms of docosahexaenoic acid and eicosapentaenoic acid*. *British Journal of Pharmacology* 178(4): 860-877.
- Berthon, B. S., L. K. MacDonald-Wicks und L. G. Wood (2014). *A systematic review of the effect of oral glucocorticoids on energy intake, appetite, and body weight in humans*. *Nutr Res* 34(3): 179-190.
- Beydoun, S., H. S. Choi, G. Dela-Cruz, J. Kruempel, S. Huang, D. Bazopoulou, H. A. Miller, M. L. Schaller, C. R. Evans und S. F. Leiser (2021). *An alternative food source for metabolism and longevity studies in *Caenorhabditis elegans**. *Commun Biol* 4(1): 258.
- Bézard, J., J. P. Blond, A. Bernard und P. Clouet (1994). *The metabolism and availability of essential fatty acids in animal and human tissues*. *Reprod Nutr Dev* 34(6): 539-568.
- Binns, D., T. Januszewski, Y. Chen, J. Hill, V. S. Markin, Y. Zhao, C. Gilpin, K. D. Chapman, R. G. Anderson und J. M. Goodman (2006). *An intimate collaboration between peroxisomes and lipid bodies*. *J Cell Biol* 173(5): 719-731.
- Birch, E. E., D. R. Hoffman, Y. S. Castañeda, S. L. Fawcett, D. G. Birch und R. D. Uauy (2002). *A randomized controlled trial of long-chain polyunsaturated fatty acid supplementation of formula in term infants after weaning at 6 wk of age*. *Am J Clin Nutr* 75(3): 570-580.
- Bishop, N. A. und L. Guarente (2007). *Two neurons mediate diet-restriction-induced longevity in *C. elegans**. *Nature* 447(7144): 545-549.
- Bispham, J., G. S. Gopalakrishnan, J. Dandrea, V. Wilson, H. Budge, D. H. Keisler, F. Broughton Pipkin, T. Stephenson und M. E. Symonds (2003). *Maternal endocrine adaptation throughout pregnancy to nutritional manipulation: consequences for maternal plasma leptin and cortisol and the programming of fetal adipose tissue development*. *Endocrinology* 144(8): 3575-3585.
- Blaxter, M. (1998). **Caenorhabditis elegans* is a nematode*. *Science* 282(5396): 2041-2046.
- Borgström, B. (1988). *Mode of action of tetrahydrolipstatin: a derivative of the naturally occurring lipase inhibitor lipstatin*. *Biochim Biophys Acta* 962(3): 308-316.
- Bošković, A. und O. J. Rando (2018). *Transgenerational Epigenetic Inheritance*. *Annual Review of Genetics* 52(1): 21-41.
- Bouyanfif, A., S. Jayarathne, I. Koboziev und N. Moustaid-Moussa (2019). *The Nematode *Caenorhabditis elegans* as a Model Organism to Study Metabolic Effects of  $\omega$ -3 Polyunsaturated Fatty Acids in Obesity*. *Adv Nutr* 10(1): 165-178.
- Boyd, W. A., S. J. McBride, J. R. Rice, D. W. Snyder und J. H. Freedman (2010). *A high-throughput method for assessing chemical toxicity using a *Caenorhabditis elegans* reproduction assay*. *Toxicology and applied pharmacology* 245(2): 153-159.
- Boyle, K. E., Z. W. Patinkin, A. L. Shapiro, P. R. Baker, 2nd, D. Dabelea und J. E. Friedman (2016). *Mesenchymal Stem Cells From Infants Born to Obese Mothers Exhibit Greater Potential for Adipogenesis: The Healthy Start BabyBUMP Project*. *Diabetes* 65(3): 647-659.
- Branicky, R., D. Desjardins, J. L. Liu und S. Hekimi (2010). *Lipid transport and signaling in *Caenorhabditis elegans**. *Dev Dyn* 239(5): 1365-1377.

- Bray, G. A. und B. M. Popkin (2014). *Dietary sugar and body weight: have we reached a crisis in the epidemic of obesity and diabetes?: health be damned! Pour on the sugar*. *Diabetes Care* 37(4): 950-956.
- Brenner, S. (1974). *The genetics of Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 77(1): 71-94.
- Brock-Utne, J. G. und S. L. Gaffin (1989). *Endotoxins and anti-endotoxins (their relevance to the anaesthetist and the intensive care specialist)*. *Anaesth Intensive Care* 17(1): 49-55.
- Brock, T. J., J. Browse und J. L. Watts (2006). *Genetic regulation of unsaturated fatty acid composition in C. elegans*. *PLoS Genet* 2(7): e108.
- Brock, T. J., J. Browse und J. L. Watts (2007). *Fatty acid desaturation and the regulation of adiposity in Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 176(2): 865-875.
- Brooks, K. K., B. Liang und J. L. Watts (2009). *The influence of bacterial diet on fat storage in C. elegans*. *PLoS One* 4(10): e7545.
- Brown, W. J., T. R. Sullivan und P. Greenspan (1992). *Nile red staining of lysosomal phospholipid inclusions*. *Histochemistry* 97(4): 349-354.
- Brownlee, M. (1995). *Advanced protein glycosylation in diabetes and aging*. *Annu Rev Med* 46: 223-234.
- Brumbaugh, D. E., P. Tearse, M. Cree-Green, L. Z. Fenton, M. Brown, A. Scherzinger, R. Reynolds, M. Alston, C. Hoffman, Z. Panet *al.* (2013). *Intrahepatic fat is increased in the neonatal offspring of obese women with gestational diabetes*. *J Pediatr* 162(5): 930-936.e931.
- Buis, A., S. Bellemin, J. Goudeau, L. Monnier, N. Loiseau, H. Guillou und H. Aguilaniu (2019). *Coelomocytes Regulate Starvation-Induced Fat Catabolism and Lifespan Extension through the Lipase LIPL-5 in Caenorhabditis elegans*. *Cell Rep* 28(4): 1041-1049.e1044.
- Bukhari, H. M., S. E. Zahran, E.-S. H. Bakr, F. A. Sahibzadah und E. A. Header (2021). *Comparison Study between Drugs (Orlistat and Chitocal) and Food Supplements (Green Tea and Apple Cider Vinegar) for Weight Loss and Hepatoprotection in Rats*. *The Egyptian Journal of Hospital Medicine* 83(1): 1218-1223.
- Burden, N., F. Sewell und K. Chapman (2015). *Testing Chemical Safety: What Is Needed to Ensure the Widespread Application of Non-animal Approaches?* *PLOS Biology* 13(5): e1002156.
- Burkewitz, K., K. P. Choe, E. C.-H. Lee, A. Deonarine und K. Strange (2012). *Characterization of the proteostasis roles of glycerol accumulation, protein degradation and protein synthesis during osmotic stress in C. elegans*. *PLoS one* 7(3): e34153-e34153.
- Butcher, R. A., J. R. Ragains, W. Li, G. Ruvkun, J. Clardy und H. Y. Mak (2009). *Biosynthesis of the Caenorhabditis elegans dauer pheromone*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(6): 1875-1879.
- Byerly, L., R. C. Cassada und R. L. Russell (1976). *The life cycle of the nematode Caenorhabditis elegans. I. Wild-type growth and reproduction*. *Dev Biol* 51(1): 23-33.
- Cadet, J. L. (2016). *Epigenetics of Stress, Addiction, and Resilience: Therapeutic Implications*. *Molecular Neurobiology* 53(1): 545-560.
- Calahorro, F., L. Holden-Dye und V. O'Connor (2021). *Impact of drug solvents on C. elegans pharyngeal pumping*. *Toxicology Reports* 8: 1240-1247.



- Calder, P. C. (2015). *Functional Roles of Fatty Acids and Their Effects on Human Health*. JPEN J Parenter Enteral Nutr 39(1 Suppl): 18s-32s.
- Caldicott, L. M., P. L. Larsen und D. L. Riddle (2006). *Chapter 19 - Laboratory Cultivation of Caenorhabditis elegans and Other Free-Living Nematodes*. Cell Biology (Third Edition). J. E. Celis. Burlington, Academic Press: 157-162.
- Canfield, C.-A. und P. C. Bradshaw (2019). *Amino acids in the regulation of aging and aging-related diseases*. Translational Medicine of Aging 3: 70-89.
- Cao, Z., Y. Hao, C. W. Fung, Y. Y. Lee, P. Wang, X. Li, K. Xie, W. J. Lam, Y. Qiu, B. Z. Tanget al. (2019). *Dietary fatty acids promote lipid droplet diversity through seipin enrichment in an ER subdomain*. Nature Communications 10(1): 2902.
- Carone, B. R., L. Fauquier, N. Habib, J. M. Shea, C. E. Hart, R. Li, C. Bock, C. Li, H. Gu, P. D. Zamore et al. (2010). *Paternally induced transgenerational environmental reprogramming of metabolic gene expression in mammals*. Cell 143(7): 1084-1096.
- Carrera-Bastos, P., Fontes, O'Keefe, Lindeberg und Cordain (2011). *The western diet and lifestyle and diseases of civilization*. Research reports in clinical cardiology 2(default): 15-35.
- Carter, E. A., B. S. Rayner, A. I. McLeod, L. E. Wu, C. P. Marshall, A. Levina, J. B. Aitken, P. K. Witting, B. Lai, Z. Cai et al. (2010). *Silicon nitride as a versatile growth substrate for microspectroscopic imaging and mapping of individual cells*. Mol Biosyst 6(7): 1316-1322.
- Cassada, R. C. und R. L. Russell (1975). *The dauerlarva, a post-embryonic developmental variant of the nematode Caenorhabditis elegans*. Dev Biol 46(2): 326-342.
- Castro, C., F. Sar, W. R. Shaw, M. Mishima, E. A. Miska und J. L. Griffin (2012). *A metabolomic strategy defines the regulation of lipid content and global metabolism by Delta9 desaturases in Caenorhabditis elegans*. BMC Genomics 13: 36.
- Celen, I., J. H. Doh und C. R. Sabanayagam (2018). *Effects of liquid cultivation on gene expression and phenotype of C. elegans*. BMC Genomics 19(1): 562.
- Cerami, A., H. Vlassara und M. Brownlee (1986). *Role of nonenzymatic glycosylation in atherogenesis*. J Cell Biochem 30(2): 111-120.
- Chang, Y. Y. und J. E. Cronan, Jr. (1999). *Membrane cyclopropane fatty acid content is a major factor in acid resistance of Escherichia coli*. Mol Microbiol 33(2): 249-259.
- Chasnov, J. R. und K. L. Chow (2002). *Why are there males in the hermaphroditic species Caenorhabditis elegans?* Genetics 160(3): 983-994.
- Chaston, T. B., J. B. Dixon und P. E. O'Brien (2007). *Changes in fat-free mass during significant weight loss: a systematic review*. Int J Obes (Lond) 31(5): 743-750.
- Chaudhuri, J., Y. Bains, S. Guha, A. Kahn, D. Hall, N. Bose, A. Gugliucci und P. Kapahi (2018). *The Role of Advanced Glycation End Products in Aging and Metabolic Diseases: Bridging Association and Causality*. Cell metabolism 28(3): 337-352.
- Chen, H., C. Wang, H. Li, R. Ma, Z. Yu, L. Li, M. Xiang, X. Chen, X. Hua und Y. Yu (2019). *A review of toxicity induced by persistent organic pollutants (POPs) and endocrine-disrupting chemicals (EDCs) in the nematode Caenorhabditis elegans*. Journal of Environmental Management 237: 519-525.

- Chen, J. und E. P. Caswell-Chen (2004). *Facultative Vivipary is a Life-History Trait in Caenorhabditis elegans*. J Nematol 36(2): 107-113.
- Chen, L., T. McCloskey, P. M. Joshi und J. H. Rothman (2008). *ced-4 and proto-oncogene tfg-1 antagonistically regulate cell size and apoptosis in C. elegans*. Curr Biol 18(14): 1025-1033.
- Chen, Q., M. Yan, Z. Cao, X. Li, Y. Zhang, J. Shi, G. H. Feng, H. Peng, X. Zhang, Y. Zhanget al. (2016a). *Sperm tsRNAs contribute to intergenerational inheritance of an acquired metabolic disorder*. Science 351(6271): 397-400.
- Chen, R., Z. Yu und D. Yin (2018). *Multi-generational effects of lindane on nematode lipid metabolism with disturbances on insulin-like signal pathway*. Chemosphere 210: 607-614.
- Chen, W., C. Zhang, L. Song, M. Sommerfeld und Q. Hu (2009). *A high throughput Nile red method for quantitative measurement of neutral lipids in microalgae*. J Microbiol Methods 77(1): 41-47.
- Chen, X., X. Feng und S. Guang (2016b). *Targeted genome engineering in Caenorhabditis elegans*. Cell & Bioscience 6(1): 60.
- Cheng, J.-X. und X. S. Xie (2004). *Coherent Anti-Stokes Raman Scattering Microscopy: Instrumentation, Theory, and Applications*. The Journal of Physical Chemistry B 108(3): 827-840.
- Choi, S. S. (2011). *High glucose diets shorten lifespan of Caenorhabditis elegans via ectopic apoptosis induction*. Nutr Res Pract 5(3): 214-218.
- Chow, Y. L. und F. Sato (2019). *Transgenerational lipid-reducing activity of benzylisoquinoline alkaloids in Caenorhabditis elegans*. Genes Cells 24(1): 70-81.
- Chughtai, A. A., F. Kassak, M. Kostrouchova, J. P. Novotny, M. W. Krause, V. Saudek, Z. Kostrouchova und M. Kostrouchova (2015). *Perilipin-related protein regulates lipid metabolism in C. elegans*. PeerJ 3: e1213.
- Clokey, G. V. und L. A. Jacobson (1986). *The autofluorescent "lipofuscin granules" in the intestinal cells of Caenorhabditis elegans are secondary lysosomes*. Mech Ageing Dev 35(1): 79-94.
- Cohen, P. und B. M. Spiegelman (2016). *Cell biology of fat storage*. Molecular biology of the cell 27(16): 2523-2527.
- Cohen, S. (2018). *Lipid Droplets as Organelles*. Int Rev Cell Mol Biol 337: 83-110.
- Conlon, I. und M. Raff (1999). *Size control in animal development*. Cell 96(2): 235-244.
- Consortium, C. e. S. (1998). *Genome sequence of the nematode C. elegans: a platform for investigating biology*. Science 282(5396): 2012-2018.
- Corsi, A. K., B. Wightman und M. Chalfie (2015). *A Transparent Window into Biology: A Primer on Caenorhabditis elegans*. Genetics 200(2): 387-407.
- Couillault, C. und J. J. Ewbank (2002). *Diverse bacteria are pathogens of Caenorhabditis elegans*. Infection and immunity 70(8): 4705-4707.
- Croll, N. A., J. M. Smith und B. M. Zuckerman (1977). *The aging process of the nematode Caenorhabditis elegans in bacterial and axenic culture*. Exp Aging Res 3(3): 175-189.
- Curran, M. P. und L. J. Scott (2004). *Orlistat: a review of its use in the management of patients with obesity*. Drugs 64(24): 2845-2864.

- Czech, M. P. (2017). *Insulin action and resistance in obesity and type 2 diabetes*. Nature medicine 23(7): 804-814.
- Czumaj, A. und T. Śledziński (2020). *Biological Role of Unsaturated Fatty Acid Desaturases in Health and Disease*. Nutrients 12(2).
- Daniel, H., B. Spanier, G. Kottra und D. Weitz (2006). *From Bacteria to Man: Archaic Proton-Dependent Peptide Transporters at Work*. Physiology 21(2): 93-102.
- Darbre, P. D. (2017). *Endocrine Disruptors and Obesity*. Curr Obes Rep 6(1): 18-27.
- Davies, S. K., A. M. Leroi und J. G. Bundy (2012). *Fluorodeoxyuridine affects the identification of metabolic responses to daf-2 status in Caenorhabditis elegans*. Mechanisms of Ageing and Development 133(1): 46-49.
- Daxinger, L. und E. Whitelaw (2010). *Transgenerational epigenetic inheritance: more questions than answers*. Genome Res 20(12): 1623-1628.
- De Haes, W., L. Froominckx, R. Van Assche, A. Smolders, G. Depuydt, J. Billen, B. P. Braeckman, L. Schoofs und L. Temmerman (2014). *Metformin promotes lifespan through mitohormesis via the peroxiredoxin PRDX-2*. Proc Natl Acad Sci U S A 111(24): E2501-2509.
- de Rooij, S. R., R. C. Painter, D. I. Phillips, C. Osmond, R. P. Michels, I. F. Godsland, P. M. Bossuyt, O. P. Bleker und T. J. Roseboom (2006). *Impaired insulin secretion after prenatal exposure to the Dutch famine*. Diabetes Care 29(8): 1897-1901.
- de Rooij, S. R., A. M. van Pelt, S. E. Ozanne, C. M. Korver, S. K. van Daalen, R. C. Painter, M. Schwab, M. H. Viegas und T. J. Roseboom (2015). *Prenatal undernutrition and leukocyte telomere length in late adulthood: the Dutch famine birth cohort study*. Am J Clin Nutr 102(3): 655-660.
- de Rooij, S. R., H. Wouters, J. E. Yonker, R. C. Painter und T. J. Roseboom (2010). *Prenatal undernutrition and cognitive function in late adulthood*. Proc Natl Acad Sci U S A 107(39): 16881-16886.
- de Wet, J. R., K. V. Wood, D. R. Helinski und M. DeLuca (1985). *Cloning of firefly luciferase cDNA and the expression of active luciferase in Escherichia coli*. Proc Natl Acad Sci U S A 82(23): 7870-7873.
- Dearden, L. und S. E. Ozanne (2015). *Early life origins of metabolic disease: Developmental programming of hypothalamic pathways controlling energy homeostasis*. Front Neuroendocrinol 39: 3-16.
- Dengg, M. und J. C. van Meel (2004). *Caenorhabditis elegans as model system for rapid toxicity assessment of pharmaceutical compounds*. J Pharmacol Toxicol Methods 50(3): 209-214.
- Depuydt, G., F. Xie, V. A. Petyuk, A. Smolders, H. M. Brewer, D. G. Camp, 2nd, R. D. Smith und B. P. Braeckman (2014). *LC-MS proteomics analysis of the insulin/IGF-1-deficient Caenorhabditis elegans daf-2(e1370) mutant reveals extensive restructuring of intermediary metabolism*. J Proteome Res 13(4): 1938-1956.
- Diaz, G., M. Melis, B. Batetta, F. Angius und A. M. Falchi (2008). *Hydrophobic characterization of intracellular lipids in situ by Nile Red red/yellow emission ratio*. Micron 39(7): 819-824.
- Dickinson, D. J. und B. Goldstein (2016). *CRISPR-Based Methods for Caenorhabditis elegans Genome Engineering*. Genetics 202(3): 885-901.

- DiDonato, D. und D. L. Brasaemle (2003). *Fixation methods for the study of lipid droplets by immunofluorescence microscopy*. J Histochem Cytochem 51(6): 773-780.
- Ding, Y., J. Li, S. Liu, L. Zhang, H. Xiao, J. Li, H. Chen, R. B. Petersen, K. Huang und L. Zheng (2014). *DNA hypomethylation of inflammation-associated genes in adipose tissue of female mice after multigenerational high fat diet feeding*. International Journal of Obesity 38(2): 198-204.
- Ding, Y., X. Zou, X. Jiang, J. Wu, Y. Zhang, D. Chen und B. Liang (2015). *Pu-erh tea down-regulates sterol regulatory element-binding protein and stearyl-CoA desaturase to reduce fat storage in Caenorhabditis elegans*. PLoS One 10(2): e0113815.
- Doke, S. K. und S. C. Dhawale (2015). *Alternatives to animal testing: A review*. Saudi Pharmaceutical Journal 23(3): 223-229.
- Doncaster, C. C. (1962). *Nematode Feeding Mechanisms. 1. Observations On Rhabditis and Pelodera*. Nematologica 8(4): 313-320.
- Dougherty, E. C. und E. L. Hansen (1956). *Axenic cultivation of Caenorhabditis briggsae (Nematoda: Rhabditidae). V. Maturation on synthetic media*. Proc Soc Exp Biol Med 93(2): 223-227.
- Dowling, S., J. Cox und R. J. Cenedella (2009). *Inhibition of fatty acid synthase by Orlistat accelerates gastric tumor cell apoptosis in culture and increases survival rates in gastric tumor bearing mice in vivo*. Lipids 44(6): 489-498.
- Dubois, C., R. Litke, S. Rianha, C. Paul-Constant, J.-M. Lo Guidice, S. Taront, F. J. Tessier, E. Boulanger und C. Fradin (2021). *Exposure of Caenorhabditis elegans to Dietary Nε-Carboxymethyllysine Emphasizes Endocytosis as a New Route for Intestinal Absorption of Advanced Glycation End Products*. Nutrients 13(12): 4398.
- Duempelmann, L., M. Skribbe und M. Bühler (2020). *Small RNAs in the Transgenerational Inheritance of Epigenetic Information*. Trends in Genetics 36(3): 203-214.
- Dunn, G. A. und T. L. Bale (2009). *Maternal High-Fat Diet Promotes Body Length Increases and Insulin Insensitivity in Second-Generation Mice*. Endocrinology 150(11): 4999-5009.
- Dunn, G. A. und T. L. Bale (2011). *Maternal High-Fat Diet Effects on Third-Generation Female Body Size via the Paternal Lineage*. Endocrinology 152(6): 2228-2236.
- Elle, I. C., L. C. Olsen, D. Pultz, S. V. Rodkaer und N. J. Faergeman (2010). *Something worth dyeing for: molecular tools for the dissection of lipid metabolism in Caenorhabditis elegans*. FEBS Lett 584(11): 2183-2193.
- Elle, I. C., S. V. Rødkær, J. Fredens und N. J. Faergeman (2012). *A method for measuring fatty acid oxidation in C. elegans*. Worm 1(1): 26-30.
- Entchev, E. V. und T. V. Kurzchalia (2005). *Requirement of sterols in the life cycle of the nematode Caenorhabditis elegans*. Semin Cell Dev Biol 16(2): 175-182.
- Entchev, E. V., D. Schwudke, V. Zagoriy, V. Matyash, A. Bogdanova, B. Habermann, L. Zhu, A. Shevchenko und T. V. Kurzchalia (2008). *LET-767 is required for the production of branched chain and long chain fatty acids in Caenorhabditis elegans*. J Biol Chem 283(25): 17550-17560.
- Escorcia, W., D. L. Ruter, J. Nhan und S. P. Curran (2018). *Quantification of Lipid Abundance and Evaluation of Lipid Distribution in Caenorhabditis elegans by Nile Red and Oil Red O Staining*. J Vis Exp(133).

- Evans, C. L., E. O. Potma, M. Puoris'haag, D. Côté, C. P. Lin und X. S. Xie (2005). *Chemical imaging of tissue in vivo with video-rate coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy*. Proc Natl Acad Sci U S A 102(46): 16807-16812.
- Farese, R. V. und T. C. Walther (2009). *Lipid Droplets Finally Get a Little R-E-S-P-E-C-T*. Cell 139(5): 855-860.
- Fei, Y. J., T. Fujita, D. F. Lapp, V. Ganapathy und F. H. Leibach (1998). *Two oligopeptide transporters from Caenorhabditis elegans: molecular cloning and functional expression*. Biochem J 332 ( Pt 2)(Pt 2): 565-572.
- Feiner, G. (2006). *4 - Definitions of terms used in meat science and technology*. Meat Products Handbook. G. Feiner, Woodhead Publishing: 46-71.
- Félix, M. A. und C. Braendle (2010). *The natural history of Caenorhabditis elegans*. Curr Biol 20(22): R965-969.
- Feng, S., S. J. Cokus, X. Zhang, P. Y. Chen, M. Bostick, M. G. Goll, J. Hetzel, J. Jain, S. H. Strauss, M. E. Halpernet al. (2010). *Conservation and divergence of methylation patterning in plants and animals*. Proc Natl Acad Sci U S A 107(19): 8689-8694.
- Ferdowsian, H. R. und N. Beck (2011). *Ethical and Scientific Considerations Regarding Animal Testing and Research*. PLOS ONE 6(9): e24059.
- Finn, P. F. und J. F. Dice (2006). *Proteolytic and lipolytic responses to starvation*. Nutrition 22(7-8): 830-844.
- Fire, A., S. W. Harrison und D. Dixon (1990). *A modular set of lacZ fusion vectors for studying gene expression in Caenorhabditis elegans*. Gene 93(2): 189-198.
- Fire, A., S. Xu, M. K. Montgomery, S. A. Kostas, S. E. Driver und C. C. Mello (1998). *Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in Caenorhabditis elegans*. Nature 391(6669): 806-811.
- Fondy, T. P., K. J. Herwig, S. J. Sollohub und D. B. Rutherford (1971). *Isolation and structural properties of cytoplasmic glycerol-3-phosphate dehydrogenase from rat liver*. Arch Biochem Biophys 145(2): 583-590.
- Fouad, A. D., S. H. Pu, S. Teng, J. R. Mark, M. Fu, K. Zhang, J. Huang, D. M. Raizen und C. Fang-Yen (2017). *Quantitative Assessment of Fat Levels in Caenorhabditis elegans Using Dark Field Microscopy*. G3 (Bethesda) 7(6): 1811-1818.
- Fowler, S. D. und P. Greenspan (1985). *Application of Nile red, a fluorescent hydrophobic probe, for the detection of neutral lipid deposits in tissue sections: comparison with oil red O*. J Histochem Cytochem 33(8): 833-836.
- Francis, D., J. Diorio, D. Liu und M. J. Meaney (1999). *Nongenomic transmission across generations of maternal behavior and stress responses in the rat*. Science 286(5442): 1155-1158.
- Franco-Juárez, B., S. Gómez-Manzo, B. Hernández-Ochoa, N. Cárdenas-Rodríguez, R. Arreguin-Espinosa, V. Pérez de la Cruz und D. Ortega-Cuellar (2021). *Effects of High Dietary Carbohydrate and Lipid Intake on the Lifespan of C. elegans*. Cells 10(9).

- Frankowski, H., S. Alavez, P. Spilman, K. A. Mark, J. D. Nelson, P. Mollahan, R. V. Rao, S. F. Chen, G. J. Lithgow und H. M. Ellerby (2013). *Dimethyl sulfoxide and dimethyl formamide increase lifespan of C. elegans in liquid*. Mech Ageing Dev 134(3-4): 69-78.
- Freudiger, C. W., W. Min, G. R. Holtom, B. Xu, M. Dantus und X. S. Xie (2011). *Highly specific label-free molecular imaging with spectrally tailored excitation stimulated Raman scattering (STE-SRS) microscopy*. Nat Photonics 5(2): 103-109.
- Frézal, L. und M. A. Félix (2015). *C. elegans outside the Petri dish*. Elife 4.
- Fujimoto, T. und R. G. Parton (2011). *Not just fat: the structure and function of the lipid droplet*. Cold Spring Harb Perspect Biol 3(3).
- Fukumoto, S. und T. Fujimoto (2002). *Deformation of lipid droplets in fixed samples*. Histochem Cell Biol 118(5): 423-428.
- Fullston, T., N. O. Palmer, J. A. Owens, M. Mitchell, H. W. Bakos und M. Lane (2012). *Diet-induced paternal obesity in the absence of diabetes diminishes the reproductive health of two subsequent generations of mice*. Hum Reprod 27(5): 1391-1400.
- Gajos, G., P. Rostoff, A. Undas und W. Piwowarska (2010). *Effects of polyunsaturated omega-3 fatty acids on responsiveness to dual antiplatelet therapy in patients undergoing percutaneous coronary intervention: the OMEGA-PCI (OMEGA-3 fatty acids after pci to modify responsiveness to dual antiplatelet therapy) study*. J Am Coll Cardiol 55(16): 1671-1678.
- Galloway, L. F. (2005). *Maternal effects provide phenotypic adaptation to local environmental conditions*. New Phytol 166(1): 93-99.
- Galloway, L. F. und J. R. Etterson (2007). *Transgenerational plasticity is adaptive in the wild*. Science 318(5853): 1134-1136.
- Galvao, J., B. Davis, M. Tilley, E. Normando, M. R. Duchon und M. F. Cordeiro (2014). *Unexpected low-dose toxicity of the universal solvent DMSO*. Faseb j 28(3): 1317-1330.
- Gao, A. W., I. A. Chatzispayrou, R. Kamble, Y. J. Liu, K. Herzog, R. L. Smith, H. van Lenthe, M. A. T. Vervaart, A. van Cruchten, A. C. Luyfet *al.* (2017). *A sensitive mass spectrometry platform identifies metabolic changes of life history traits in C. elegans*. Sci Rep 7(1): 2408.
- Gapp, K., A. Jawaid, P. Sarkies, J. Bohacek, P. Pelczar, J. Prados, L. Farinelli, E. Miska und I. M. Mansuy (2014). *Implication of sperm RNAs in transgenerational inheritance of the effects of early trauma in mice*. Nat Neurosci 17(5): 667-669.
- García-Casas, P., J. Arias-Del-Val, P. Alvarez-Illera, A. Wojnicz, C. de Los Ríos, R. I. Fonteriz, M. Montero und J. Alvarez (2018). *The Neuroprotector Benzothiazepine CGP37157 Extends Lifespan in C. elegans Worms*. Front Aging Neurosci 10: 440.
- Garcia, A. M., M. L. Ladage, D. R. Dumesnil, K. Zaman, V. Shulaev, R. K. Azad und P. A. Padilla (2015). *Glucose induces sensitivity to oxygen deprivation and modulates insulin/IGF-1 signaling and lipid biosynthesis in Caenorhabditis elegans*. Genetics 200(1): 167-184.
- Garigan, D., A. L. Hsu, A. G. Fraser, R. S. Kamath, J. Ahringer und C. Kenyon (2002). *Genetic analysis of tissue aging in Caenorhabditis elegans: a role for heat-shock factor and bacterial proliferation*. Genetics 161(3): 1101-1112.

- Gems, D., A. J. Sutton, M. L. Sundermeyer, P. S. Albert, K. V. King, M. L. Edgley, P. L. Larsen und D. L. Riddle (1998). *Two pleiotropic classes of daf-2 mutation affect larval arrest, adult behavior, reproduction and longevity in Caenorhabditis elegans*. Genetics 150(1): 129-155.
- Goh, Y. K., J. A. Jumpson, E. A. Ryan und M. T. Clandinin (1997). *Effect of omega 3 fatty acid on plasma lipids, cholesterol and lipoprotein fatty acid content in NIDDM patients*. Diabetologia 40(1): 45-52.
- Goldstein, P. und L. Magnano (1988). *Effects of dimethyl sulphoxide on early gametogenesis in Caenorhabditis elegans: ultrastructural aberrations and loss of synaptonemal complexes from pachytene nuclei*. Cytobios 56(224): 45-57.
- Gómez-Orte, E., E. Cornes, A. Zheleva, B. Sáenz-Narciso, M. de Toro, M. Iñiguez, R. López, J. F. San-Juan, B. Ezcurra, B. Sacristán et al. (2018). *Effect of the diet type and temperature on the C. elegans transcriptome*. Oncotarget 9(11): 9556-9571.
- Gómez Candela, C., L. M. Bermejo López und V. Loria Kohen (2011). *Importance of a balanced omega 6/omega 3 ratio for the maintenance of health: nutritional recommendations*. Nutr Hosp 26(2): 323-329.
- Goodman, J. M. (2009). *Demonstrated and inferred metabolism associated with cytosolic lipid droplets*. J Lipid Res 50(11): 2148-2156.
- Gouaref, I., A. Bouazza, S. A. Abderrhmane und E. A. Koceir (2020). *Lipid Profile Modulates Cardiometabolic Risk Biomarkers Including Hypertension in People with Type-2 Diabetes: A Focus on Unbalanced Ratio of Plasma Polyunsaturated/Saturated Fatty Acids*. Molecules 25(18).
- Gouvêa, D. Y., E. Z. Aprison und I. Ruvinsky (2015). *Experience Modulates the Reproductive Response to Heat Stress in C. elegans via Multiple Physiological Processes*. PLoS One 10(12): e0145925.
- Grant, B. und D. Hirsh (1999). *Receptor-mediated endocytosis in the Caenorhabditis elegans oocyte*. Mol Biol Cell 10(12): 4311-4326.
- Greenberg, A. S., J. J. Egan, S. A. Wek, N. B. Garty, E. J. Blanchette-Mackie und C. Londos (1991). *Perilipin, a major hormonally regulated adipocyte-specific phosphoprotein associated with the periphery of lipid storage droplets*. J Biol Chem 266(17): 11341-11346.
- Greenspan, P. und S. D. Fowler (1985). *Spectrofluorometric studies of the lipid probe, Nile red*. J Lipid Res 26(7): 781-789.
- Greenspan, P., E. P. Mayer und S. D. Fowler (1985). *Nile red: a selective fluorescent stain for intracellular lipid droplets*. J Cell Biol 100(3): 965-973.
- Greer, E. L., M. A. Blanco, L. Gu, E. Sendinc, J. Liu, D. Aristizábal-Corrales, C.-H. Hsu, L. Aravind, C. He und Y. Shi (2015). *DNA Methylation on N6-Adenine in C. elegans*. Cell 161(4): 868-878.
- Greer, E. R., C. L. Perez, M. R. Van Gilst, B. H. Lee und K. Ashrafi (2008). *Neural and molecular dissection of a C. elegans sensory circuit that regulates fat and feeding*. Cell Metab 8(2): 118-131.
- Grillitsch, K., M. Connerth, H. Köfeler, T. N. Arrey, B. Rietschel, B. Wagner, M. Karas und G. Daum (2011). *Lipid particles/droplets of the yeast Saccharomyces cerevisiae revisited: Lipidome meets Proteome*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids 1811(12): 1165-1176.

- Grogan, D. W. und J. E. Cronan, Jr. (1997). *Cyclopropane ring formation in membrane lipids of bacteria*. *Microbiol Mol Biol Rev* 61(4): 429-441.
- Grundy, S. M. und M. A. Denke (1990). *Dietary influences on serum lipids and lipoproteins*. *Journal of Lipid Research* 31(7): 1149-1172.
- Guerciolini, R. (1997). *Mode of action of orlistat*. *Int J Obes Relat Metab Disord* 21 Suppl 3: S12-23.
- Gumienny, T. L. und C. Savage-Dunn (2013). *TGF- $\beta$  signaling in C. elegans*. *WormBook*: 1-34.
- Guo, Y., T. C. Walther, M. Rao, N. Stuurman, G. Goshima, K. Terayama, J. S. Wong, R. D. Vale, P. Walter und R. V. Farese (2008). *Functional genomic screen reveals genes involved in lipid-droplet formation and utilization*. *Nature* 453(7195): 657-661.
- Gupta, R., P. Kumar, N. Fahmi, B. Garg, S. Dutta, S. Sachar, A. S. Matharu und K. S. Vimalaswaran (2020). *Endocrine disruption and obesity: A current review on environmental obesogens*. *Current Research in Green and Sustainable Chemistry* 3: 100009.
- Hadvary, P., W. Sidler, W. Meister, W. Vetter und H. Wolfer (1991). *The lipase inhibitor tetrahydrolipstatin binds covalently to the putative active site serine of pancreatic lipase*. *J Biol Chem* 266(4): 2021-2027.
- Hales, C. N. und D. J. Barker (2001). *The thrifty phenotype hypothesis*. *Br Med Bull* 60: 5-20.
- Hall, D. H., V. P. Winfrey, G. Blaeuer, L. H. Hoffman, T. Furuta, K. L. Rose, O. Hobert und D. Greenstein (1999). *Ultrastructural features of the adult hermaphrodite gonad of Caenorhabditis elegans: relations between the germ line and soma*. *Dev Biol* 212(1): 101-123.
- Halpern, B. und A. Halpern (2015). *Safety assessment of FDA-approved (orlistat and lorcaserin) anti-obesity medications*. *Expert Opin Drug Saf* 14(2): 305-315.
- Han, S., E. A. Schroeder, C. G. Silva-García, K. Hebestreit, W. B. Mair und A. Brunet (2017). *Mono-unsaturated fatty acids link H3K4me3 modifiers to C. elegans lifespan*. *Nature* 544(7649): 185-190.
- Hanley, M. J., D. R. Abernethy und D. J. Greenblatt (2010). *Effect of Obesity on the Pharmacokinetics of Drugs in Humans*. *Clinical Pharmacokinetics* 49(2): 71-87.
- Hansen, D. und D. B. Pilgrim (1999). *Sex and the single worm: sex determination in the nematode C. elegans*. *Mechanisms of Development* 83: 3-15.
- Hansen, M., T. Flatt und H. Aguilaniu (2013). *Reproduction, fat metabolism, and life span: what is the connection?* *Cell Metab* 17(1): 10-19.
- Hanson, M. A. und M. K. Skinner (2016). *Developmental origins of epigenetic transgenerational inheritance*. *Environ Epigenet* 2(1).
- Harada, S., T. Hashizume, K. Nemoto, Z. Shao, N. Higashitani, T. Etheridge, N. J. Szewczyk, K. Fukui, A. Higashibata und A. Higashitani (2016). *Fluid dynamics alter Caenorhabditis elegans body length via TGF- $\beta$ /DBL-1 neuromuscular signaling*. *NPJ Microgravity* 2: 16006.
- Harasymowicz, N. S., Y.-R. Choi, C.-L. Wu, L. Iannucci, R. Tang und F. Guilak (2020). *Intergenerational Transmission of Diet-Induced Obesity, Metabolic Imbalance, and Osteoarthritis in Mice*. *Arthritis & rheumatology (Hoboken, N.J.)* 72(4): 632-644.
- Hardie, D. G. (2012). *Organismal carbohydrate and lipid homeostasis*. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4(5).



- Hardikar, Anandwardhan A., Sarang N. Satoor, Mahesh S. Karandikar, Mugdha V. Joglekar, Amrutesh S. Puranik, W. Wong, S. Kumar, A. Limaye, Dattatray S. Bhat, A. S. Januszewskiet al. (2015). *Multigenerational Undernutrition Increases Susceptibility to Obesity and Diabetes that Is Not Reversed after Dietary Recuperation*. *Cell Metabolism* 22(2): 312-319.
- Harris, W. S., W. E. Connor, S. B. Inkeles und D. R. Illingworth (1984). *Dietary omega-3 fatty acids prevent carbohydrate-induced hypertriglyceridemia*. *Metabolism* 33(11): 1016-1019.
- Harvey, S. C. und H. E. Orbidans (2011). *All eggs are not equal: the maternal environment affects progeny reproduction and developmental fate in *Caenorhabditis elegans**. *PLoS One* 6(10): e25840.
- Harvey, S. C. und M. E. Viney (2007). *Thermal variation reveals natural variation between isolates of *Caenorhabditis elegans**. *J Exp Zool B Mol Dev Evol* 308(4): 409-416.
- Haslam, D. W. und W. P. James (2005). *Obesity*. *Lancet* 366(9492): 1197-1209.
- Heard, E. und R. A. Martienssen (2014). *Transgenerational Epigenetic Inheritance: myths and mechanisms*. *Cell* 157(1): 95-109.
- Heck, A. M., J. A. Yanovski und K. A. Calis (2000). *Orlistat, a new lipase inhibitor for the management of obesity*. *Pharmacotherapy* 20(3): 270-279.
- Hellerer, T., C. Axäng, C. Brackmann, P. Hillertz, M. Pilon und A. Enejder (2007). *Monitoring of lipid storage in *Caenorhabditis elegans* using coherent anti-Stokes Raman scattering (CARS) microscopy*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104(37): 14658-14663.
- Henderson, I. R. und S. E. Jacobsen (2007). *Epigenetic inheritance in plants*. *Nature* 447(7143): 418-424.
- Heness, S. und C. M. Perry (2006). *Orlistat: a review of its use in the management of obesity*. *Drugs* 66 12: 1625-1656.
- Henry, P., O. Owopetu, D. Adisa, T. Nguyen, K. Anthony, D. Ijoni-Animadu, S. Jamadar, F. Abdel-Rahman und M. A. Saleh (2016). *Fatty acids composition of *Caenorhabditis elegans* using accurate mass GCMS-QTOF*. *J Environ Sci Health B* 51(8): 546-552.
- Hermann, G. J., L. K. Schroeder, C. A. Hieb, A. M. Kershner, B. M. Rabbitts, P. Fonarev, B. D. Grant und J. R. Priess (2005). *Genetic analysis of lysosomal trafficking in *Caenorhabditis elegans**. *Mol Biol Cell* 16(7): 3273-3288.
- Hernandez, J. D., T. Li, C. M. Rau, W. E. LeSuer, P. Wang, D. K. Coletta, J. A. Madura, E. A. Jacobsen und E. De Filippis (2021).  *$\omega$ -3PUFA supplementation ameliorates adipose tissue inflammation and insulin-stimulated glucose disposal in subjects with obesity: a potential role for apolipoprotein E*. *International Journal of Obesity* 45(6): 1331-1341.
- Herndon, L., C. Wolkow und D. Hall (2018). *WormAtlas Aging Handbook - Introduction to Aging in *C. elegans**. *WormAtlas*.
- Herz, C. T. und F. W. Kiefer (2019). *Adipose tissue browning in mice and humans*. *J Endocrinol* 241(3): R97-r109.
- Heshof, R., B. Visscher, S. Prömel und S. Hughes (2019). *Large-scale cultivation of *Caenorhabditis elegans* in a bioreactor using a labor-friendly fed-batch approach*. *BioTechniques* 67(1): 33-39.

- Hibshman, J. D., A. Hung und L. R. Baugh (2016). *Maternal Diet and Insulin-Like Signaling Control Intergenerational Plasticity of Progeny Size and Starvation Resistance*. PLoS genetics 12(10): e1006396-e1006396.
- Hibshman, J. D., A. K. Webster und L. R. Baugh (2021). *Liquid-culture protocols for synchronous starvation, growth, dauer formation, and dietary restriction of Caenorhabditis elegans*. STAR Protoc 2(1): 100276.
- Hieb, W. F. und M. Rothstein (1968). *Sterol requirement for reproduction of a free-living nematode*. Science 160(3829): 778-780.
- Hobro, A. J. und N. I. Smith (2017). *An evaluation of fixation methods: Spatial and compositional cellular changes observed by Raman imaging*. Vibrational Spectroscopy 91: 31-45.
- Hodgkin, J. und T. M. Barnes (1991). *More is not better: brood size and population growth in a self-fertilizing nematode*. Proc Biol Sci 246(1315): 19-24.
- Hodgkin, J., H. R. Horvitz und S. Brenner (1979). *Nondisjunction Mutants of the Nematode CAENORHABDITIS ELEGANS*. Genetics 91(1): 67-94.
- Höss, S. und L. Weltje (2007). *Endocrine disruption in nematodes: effects and mechanisms*. Ecotoxicology 16(1): 15-28.
- Houthoofd, K., B. P. Braeckman, I. Lenaerts, K. Brys, A. De Vreese, S. Van Eygen und J. R. Vanfleteren (2002). *Axenic growth up-regulates mass-specific metabolic rate, stress resistance, and extends life span in Caenorhabditis elegans*. Exp Gerontol 37(12): 1371-1378.
- Howie, G. J., D. M. Sloboda, T. Kamal und M. H. Vickers (2009). *Maternal nutritional history predicts obesity in adult offspring independent of postnatal diet*. J Physiol 587(Pt 4): 905-915.
- Hu, C. W., J. L. Chen, Y. W. Hsu, C. C. Yen und M. R. Chao (2015). *Trace analysis of methylated and hydroxymethylated cytosines in DNA by isotope-dilution LC-MS/MS: first evidence of DNA methylation in Caenorhabditis elegans*. Biochem J 465(1): 39-47.
- Hu, F. B. und V. S. Malik (2010). *Sugar-sweetened beverages and risk of obesity and type 2 diabetes: epidemiologic evidence*. Physiol Behav 100(1): 47-54.
- Hu, P. J. (2007). *Dauer*. WormBook: 1-19.
- Hulbert, A. J., M. A. Kelly und S. K. Abbott (2014). *Polyunsaturated fats, membrane lipids and animal longevity*. Journal of Comparative Physiology B 184(2): 149-166.
- Hunt, P. R. (2017). *The C. elegans model in toxicity testing*. J Appl Toxicol 37(1): 50-59.
- Hunter, C. P. (1999). *Caenorhabditis elegans: Embryonic Axis Formation; Signalling in Early Development*. Development: Genetics, Epigenetics and Environmental Regulation. V. E. A. Russo, D. J. Cove, L. G. Edgar, R. Jaenisch und F. Salamini. Berlin, Heidelberg, Springer Berlin Heidelberg: 233-250.
- Huypens, P., S. Sass, M. Wu, D. Dyckhoff, M. Tschöp, F. Theis, S. Marschall, M. Hrabě de Angelis und J. Beckers (2016). *Epigenetic germline inheritance of diet-induced obesity and insulin resistance*. Nat Genet 48(5): 497-499.
- Irazoqui, J. E., J. M. Urbach und F. M. Ausubel (2010). *Evolution of host innate defence: insights from Caenorhabditis elegans and primitive invertebrates*. Nature reviews. Immunology 10(1): 47-58.

- Isganaitis, E., H. Suehiro und C. Cardona (2017). *Who's your daddy?: paternal inheritance of metabolic disease risk*. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 24(1): 47-55.
- Iyer, L. M., S. Abhiman und L. Aravind (2011). *Natural history of eukaryotic DNA methylation systems*. *Prog Mol Biol Transl Sci* 101: 25-104.
- J. Marshall, D. und T. Uller (2007). *When is a maternal effect adaptive?* *Oikos* 116(12): 1957-1963.
- Jablonka, E. und G. Raz (2009). *Transgenerational Epigenetic Inheritance: Prevalence, Mechanisms, and Implications for the Study of Heredity and Evolution*. *The Quarterly Review of Biology* 84(2): 131-176.
- Jaenisch, R. und A. Bird (2003). *Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals*. *Nat Genet* 33 Suppl: 245-254.
- Jéquier, E. (1994). *Carbohydrates as a source of energy*. *Am J Clin Nutr* 59(3 Suppl): 682s-685s.
- Jia, K., D. Chen und D. L. Riddle (2004). *The TOR pathway interacts with the insulin signaling pathway to regulate C. elegans larval development, metabolism and life span*. *Development* 131(16): 3897-3906.
- Jo, H., J. Shim, J. H. Lee, J. Lee und J. B. Kim (2009). *IRE-1 and HSP-4 contribute to energy homeostasis via fasting-induced lipases in C. elegans*. *Cell Metab* 9(5): 440-448.
- Jobson, M. A., J. M. Jordan, M. A. Sandrof, J. D. Hibshman, A. L. Lennox und L. R. Baugh (2015). *Transgenerational Effects of Early Life Starvation on Growth, Reproduction, and Stress Resistance in Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 201(1): 201-212.
- Johnson, R. J., M. S. Segal, Y. Sautin, T. Nakagawa, D. I. Feig, D. H. Kang, M. S. Gersch, S. Benner und L. G. Sánchez-Lozada (2007). *Potential role of sugar (fructose) in the epidemic of hypertension, obesity and the metabolic syndrome, diabetes, kidney disease, and cardiovascular disease*. *Am J Clin Nutr* 86(4): 899-906.
- Johnson, T. E. und W. B. Wood (1982). *Genetic analysis of life-span in Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79(21): 6603-6607.
- Jones, A. P. und M. I. Friedman (1982). *Obesity and adipocyte abnormalities in offspring of rats undernourished during pregnancy*. *Science* 215(4539): 1518-1519.
- Jones, K. T. und K. Ashrafi (2009). *Caenorhabditis elegans as an emerging model for studying the basic biology of obesity*. *Dis Model Mech* 2(5-6): 224-229.
- Jones, K. T., E. R. Greer, D. Pearce und K. Ashrafi (2009). *Rictor/TORC2 regulates Caenorhabditis elegans fat storage, body size, and development through sgk-1*. *PLoS Biol* 7(3): e60.
- Jordan, J. M., J. D. Hibshman, A. K. Webster, R. E. W. Kaplan, A. Leinroth, R. Guzman, C. S. Maxwell, R. Chitrakar, E. A. Bowman, A. L. Fryet *al.* (2019). *Insulin/IGF Signaling and Vitellogenin Provisioning Mediate Intergenerational Adaptation to Nutrient Stress*. *Current Biology* 29(14): 2380-2388.e2385.
- Justice, A. E., T. Karaderi, H. M. Highland, K. L. Young, M. Graff, Y. Lu, V. Turcot, P. L. Auer, R. S. Fine, X. Guoet *al.* (2019). *Protein-coding variants implicate novel genes related to lipid homeostasis contributing to body-fat distribution*. *Nat Genet* 51(3): 452-469.
- Kaati, G., L. O. Bygren und S. Edvinsson (2002). *Cardiovascular and diabetes mortality determined by nutrition during parents' and grandparents' slow growth period*. *Eur J Hum Genet* 10(11): 682-688.

- Kaeberlein, T. L., E. D. Smith, M. Tsuchiya, K. L. Welton, J. H. Thomas, S. Fields, B. K. Kennedy und M. Kaeberlein (2006). *Lifespan extension in Caenorhabditis elegans by complete removal of food*. Aging Cell 5(6): 487-494.
- Kalathimekkad, S., J. Missinne, D. Schaubroeck, R. Mandamparambil und G. Van Steenberge (2015). *Alcohol Vapor Sensor Based on Fluorescent Dye-Doped Optical Waveguides*. IEEE Sensors Journal 15: 76-81.
- Kaletsky, R., R. S. Moore, G. D. Vrla, L. R. Parsons, Z. Gitai und C. T. Murphy (2020). *C. elegans interprets bacterial non-coding RNAs to learn pathogenic avoidance*. Nature 586(7829): 445-451.
- Kaul, T. K., P. Reis Rodrigues, I. V. Ogungbe, P. Kapahi und M. S. Gill (2014). *Bacterial fatty acids enhance recovery from the dauer larva in Caenorhabditis elegans*. PLoS One 9(1): e86979.
- Kaur, A. P., A. Chaudhary, A. Kaur, R. Choudhary und R. Kaushik (2005). *Phospholipid fatty acid - A bioindicator of environment monitoring and assessment in soil ecosystem*. Current Science 89: 1103-1112.
- Ke, W., J. N. Reed, C. Yang, N. Higgason, L. Rayyan, C. Wählby, A. E. Carpenter, M. Civelek und E. J. O'Rourke (2021). *Genes in human obesity loci are causal obesity genes in C. elegans*. PLoS Genet 17(9): e1009736.
- Kenyon, C. (1988). *The nematode Caenorhabditis elegans*. Science 240(4858): 1448-1453.
- Kenyon, C., J. Chang, E. Gensch, A. Rudner und R. Tabtiang (1993). *A C. elegans mutant that lives twice as long as wild type*. Nature 366(6454): 461-464.
- Kenyon, C. J. (2010). *The genetics of ageing*. Nature 464(7288): 504-512.
- Kim, D.-K., T. H. Kim und S.-J. Lee (2016). *Mechanisms of aging-related proteinopathies in Caenorhabditis elegans*. Experimental & Molecular Medicine 48(10): e263-e263.
- Kim, S. W., J. I. Kwak und Y.-J. An (2013). *Multigenerational Study of Gold Nanoparticles in Caenorhabditis elegans: Transgenerational Effect of Maternal Exposure*. Environmental Science & Technology 47(10): 5393-5399.
- Kimble, J. und W. J. Sharrock (1983). *Tissue-specific synthesis of yolk proteins in Caenorhabditis elegans*. Dev Biol 96(1): 189-196.
- Kimura, K. D., H. A. Tissenbaum, Y. Liu und G. Ruvkun (1997). *daf-2, an insulin receptor-like gene that regulates longevity and diapause in Caenorhabditis elegans*. Science 277(5328): 942-946.
- Kingsley, S. F., Y. Seo, C. Allen, K. S. Ghanta, S. Finkel und H. A. Tissenbaum (2021). *Bacterial processing of glucose modulates C. elegans lifespan and healthspan*. Sci Rep 11(1): 5931.
- Kishimoto, S., M. Uno, E. Okabe, M. Nono und E. Nishida (2017). *Environmental stresses induce transgenerationally inheritable survival advantages via germline-to-soma communication in Caenorhabditis elegans*. Nat Commun 8: 14031.
- Klapper, M., M. Ehmke, D. Palgunow, M. Bohme, C. Matthaus, G. Bergner, B. Dietzek, J. Popp und F. Doring (2011). *Fluorescence-based fixative and vital staining of lipid droplets in Caenorhabditis elegans reveal fat stores using microscopy and flow cytometry approaches*. J Lipid Res 52(6): 1281-1293.

- Klapper, M., D. Findeis, H. Koefeler und F. Döring (2016a). *Methyl group donors abrogate adaptive responses to dietary restriction in C. elegans*. *Genes & Nutrition* 11(1): 4.
- Klapper, M., D. Findeis, H. Koefeler und F. Döring (2016b). *Methyl group donors abrogate adaptive responses to dietary restriction in C. elegans*. *Genes Nutr* 11: 4.
- Klass, M. und D. Hirsh (1976). *Non-ageing developmental variant of Caenorhabditis elegans*. *Nature* 260(5551): 523-525.
- Klass, M., P. N. Nguyen und A. Dechavigny (1983). *Age-correlated changes in the DNA template in the nematode Caenorhabditis elegans*. *Mech Ageing Dev* 22(3-4): 253-263.
- Klemm, R. W., J. P. Norton, R. A. Cole, C. S. Li, S. H. Park, M. M. Crane, L. Li, D. Jin, A. Boye-Doe, T. Y. Luet *al.* (2013). *A conserved role for atlastin GTPases in regulating lipid droplet size*. *Cell Rep* 3(5): 1465-1475.
- Klengel, T. und E. B. Binder (2015). *Epigenetics of Stress-Related Psychiatric Disorders and Gene × Environment Interactions*. *Neuron* 86(6): 1343-1357.
- Klosin, A., E. Casas, C. Hidalgo-Carcedo, T. Vavouri und B. Lehner (2017). *Transgenerational transmission of environmental information in C. elegans*. *Science* 356(6335): 320-323.
- Kniazeva, M., Q. T. Crawford, M. Seiber, C.-Y. Wang und M. Han (2004). *Monomethyl branched-chain fatty acids play an essential role in Caenorhabditis elegans development*. *PLoS biology* 2(9): E257-E257.
- Kniazeva, M., T. Euler und M. Han (2008). *A branched-chain fatty acid is involved in post-embryonic growth control in parallel to the insulin receptor pathway and its biosynthesis is feedback-regulated in C. elegans*. *Genes Dev* 22(15): 2102-2110.
- Kniazeva, M., M. Sieber, S. McCauley, K. Zhang, J. L. Watts und M. Han (2003). *Suppression of the ELO-2 FA elongation activity results in alterations of the fatty acid composition and multiple physiological defects, including abnormal ultradian rhythms, in Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 163(1): 159-169.
- Knight, Z. A. und K. M. Shokat (2007). *Chemical genetics: where genetics and pharmacology meet*. *Cell* 128(3): 425-430.
- Koopman, M., H. Michels, B. M. Dancy, R. Kamble, L. Mouchiroud, J. Auwerx, E. A. Nollen und R. H. Houtkooper (2016). *A screening-based platform for the assessment of cellular respiration in Caenorhabditis elegans*. *Nat Protoc* 11(10): 1798-1816.
- Kopp, W. (2019). *How Western Diet And Lifestyle Drive The Pandemic Of Obesity And Civilization Diseases*. *Diabetes Metab Syndr Obes* 12: 2221-2236.
- Krahmer, N., Y. Guo, F. Wilfling, M. Hilger, S. Lingrell, K. Heger, H. W. Newman, M. Schmidt-Supprian, D. E. Vance, M. Mannel *al.* (2011). *Phosphatidylcholine synthesis for lipid droplet expansion is mediated by localized activation of CTP:phosphocholine cytidyltransferase*. *Cell Metab* 14(4): 504-515.
- Kridel, S. J., F. Axelrod, N. Rozenkrantz und J. W. Smith (2004). *Orlistat is a novel inhibitor of fatty acid synthase with antitumor activity*. *Cancer Res* 64(6): 2070-2075.
- Kromhout, D., S. Yasuda, J. M. Geleijnse und H. Shimokawa (2012). *Fish oil and omega-3 fatty acids in cardiovascular disease: do they really work?* *Eur Heart J* 33(4): 436-443.

- Kubagawa, H. M., J. L. Watts, C. Corrigan, J. W. Edmonds, E. Sztul, J. Browse und M. A. Miller (2006). *Oocyte signals derived from polyunsaturated fatty acids control sperm recruitment in vivo*. *Nat Cell Biol* 8(10): 1143-1148.
- Kuerschner, L., C. Moessinger und C. Thiele (2008). *Imaging of Lipid Biosynthesis: How a Neutral Lipid Enters Lipid Droplets*. *Traffic* 9(3): 338-352.
- Kulkarni, S. R., K. Kumaran, S. R. Rao, S. D. Chougule, T. M. Deokar, A. J. Bhalerao, V. A. Solat, D. S. Bhat, C. H. Fall und C. S. Yajnik (2013). *Maternal lipids are as important as glucose for fetal growth: findings from the Pune Maternal Nutrition Study*. *Diabetes Care* 36(9): 2706-2713.
- Kumsta, C., J. T. Chang, J. Schmalz und M. Hansen (2017). *Hormetic heat stress and HSF-1 induce autophagy to improve survival and proteostasis in C. elegans*. *Nat Commun* 8: 14337.
- Kurzchalia, T. V. und S. Ward (2003). *Why do worms need cholesterol?* *Nat Cell Biol* 5(8): 684-688.
- Kushtagi, P. und S. Arvapally (2009). *Maternal mid-pregnancy serum triglyceride levels and neonatal birth weight*. *Int J Gynaecol Obstet* 106(3): 258-259.
- Lagido, C., D. McLaggan, A. Flett, J. Pettitt und L. A. Glover (2009). *Rapid sublethal toxicity assessment using bioluminescent Caenorhabditis elegans, a novel whole-animal metabolic biosensor*. *Toxicol Sci* 109(1): 88-95.
- Lagido, C., J. Pettitt, A. Flett und L. A. Glover (2008). *Bridging the phenotypic gap: real-time assessment of mitochondrial function and metabolism of the nematode Caenorhabditis elegans*. *BMC physiology* 8: 7-7.
- Lagisz, M., H. Blair, P. Kenyon, T. Uller, D. Raubenheimer und S. Nakagawa (2014). *Transgenerational effects of caloric restriction on appetite: a meta-analysis*. *Obes Rev* 15(4): 294-309.
- Lakowski, B. und S. Hekimi (1998). *The genetics of caloric restriction in Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(22): 13091-13096.
- Lamitina, S. T., R. Morrison, G. W. Moeckel und K. Strange (2004). *Adaptation of the nematode Caenorhabditis elegans to extreme osmotic stress*. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 286(4): C785-C791.
- Laranjeiro, R., G. Harinath, D. Burke, B. P. Braeckman und M. Driscoll (2017). *Single swim sessions in C. elegans induce key features of mammalian exercise*. *BMC Biol* 15(1): 30.
- Leaf, A. (2007). *Prevention of sudden cardiac death by n-3 polyunsaturated fatty acids*. *Journal of Cardiovascular Medicine* 8: S27-S29.
- Lecoutre, S., S. Maqdasy und C. Breton (2021). *Maternal obesity as a risk factor for developing diabetes in offspring: An epigenetic point of view*. *World journal of diabetes* 12(4): 366-382.
- Lecoutre, S., P. Petrus, M. Rydén und C. Breton (2018). *Transgenerational Epigenetic Mechanisms in Adipose Tissue Development*. *Trends in Endocrinology & Metabolism* 29(10): 675-685.
- Lee, D., D. E. Jeong, H. G. Son, Y. Yamaoka, H. Kim, K. Seo, A. A. Khan, T. Y. Roh, D. W. Moon, Y. Lee et al. (2015). *SREBP and MDT-15 protect C. elegans from glucose-induced accelerated aging by preventing accumulation of saturated fat*. *Genes Dev* 29(23): 2490-2503.

- Lee, E. Y., P. Y. Jeong, S. Y. Kim, Y. H. Shim, D. J. Chitwood und Y. K. Paik (2009a). *Effects of sterols on the development and aging of Caenorhabditis elegans*. *Methods Mol Biol* 462: 167-179.
- Lee, G. D., M. A. Wilson, M. Zhu, C. A. Wolkow, R. de Cabo, D. K. Ingram und S. Zou (2006a). *Dietary deprivation extends lifespan in Caenorhabditis elegans*. *Aging Cell* 5(6): 515-524.
- Lee, G. D., M. A. Wilson, M. Zhu, C. A. Wolkow, R. de Cabo, D. K. Ingram und S. Zou (2006b). *Dietary deprivation extends lifespan in Caenorhabditis elegans*. *Aging cell* 5(6): 515-524.
- Lee, J. H., J. Kong, J. Y. Jang, J. S. Han, Y. Ji, J. Lee und J. B. Kim (2014). *Lipid droplet protein LID-1 mediates ATGL-1-dependent lipolysis during fasting in Caenorhabditis elegans*. *Mol Cell Biol* 34(22): 4165-4176.
- Lee, K., I. Escobar, Y. Jang, W. Kim, F. M. Ausubel und E. Mylonakis (2020). *In the Model Host Caenorhabditis elegans, Sphingosine-1-Phosphate-Mediated Signaling Increases Immunity toward Human Opportunistic Bacteria*. *Int J Mol Sci* 21(21).
- Lee, K. S., S. Iwanir, R. B. Kopito, M. Scholz, J. A. Calarco, D. Biron und E. Levine (2017). *Serotonin-dependent kinetics of feeding bursts underlie a graded response to food availability in C. elegans*. *Nature Communications* 8(1): 14221.
- Lee, K. Z., M. Kniazeva, M. Han, N. Pujol und J. J. Ewbank (2010). *The fatty acid synthase fasn-1 acts upstream of WNK and Ste20/GCK-VI kinases to modulate antimicrobial peptide expression in C. elegans epidermis*. *Virulence* 1(3): 113-122.
- Lee, M. K. und B. Blumberg (2019). *Transgenerational effects of obesogens*. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* 125(S3): 44-57.
- Lee, S. J., C. T. Murphy und C. Kenyon (2009b). *Glucose Shortens the Lifespan of Caenorhabditis elegans by Down-Regulating Aquaporin Gene Expression*. *Cell Metab* 10(5): 379-391.
- Lee, S. Y. und K. Kang (2017). *Measuring the Effect of Chemicals on the Growth and Reproduction of Caenorhabditis elegans*. *Journal of visualized experiments : JoVE*(128): 56437.
- Lehane, M. J. (1997). *Peritrophic matrix structure and function*. *Annu Rev Entomol* 42: 525-550.
- Lemieux, G. A., J. Liu, N. Mayer, R. J. Bainton, K. Ashrafi und Z. Werb (2011). *A whole-organism screen identifies new regulators of fat storage*. *Nat Chem Biol* 7(4): 206-213.
- Lenaerts, I., G. A. Walker, L. Van Hoorebeke, D. Gems und J. R. Vanfleteren (2008). *Dietary restriction of Caenorhabditis elegans by axenic culture reflects nutritional requirement for constituents provided by metabolically active microbes*. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 63(3): 242-252.
- Leonhardt, M., B. Hrupka und W. Langhans (1999). *New approaches in the pharmacological treatment of obesity*. *Eur J Nutr* 38(1): 1-13.
- Lesa, G. M., M. Palfreyman, D. H. Hall, M. T. Clandinin, C. Rudolph, E. M. Jorgensen und G. Schiavo (2003). *Long chain polyunsaturated fatty acids are required for efficient neurotransmission in C. elegans*. *J Cell Sci* 116(Pt 24): 4965-4975.
- Leung, M. C., P. L. Williams, A. Benedetto, C. Au, K. J. Helmcke, M. Aschner und J. N. Meyer (2008). *Caenorhabditis elegans: an emerging model in biomedical and environmental toxicology*. *Toxicol Sci* 106(1): 5-28.

- Leung, M. C. K., J. V. Goldstone, W. A. Boyd, J. H. Freedman und J. N. Meyer (2010). *Caenorhabditis elegans Generates Biologically Relevant Levels of Genotoxic Metabolites from Aflatoxin B1 but Not Benzo[a]pyrene In Vivo*. *Toxicological Sciences* 118(2): 444-453.
- Lev, I., R. Bril, Y. Liu, L. I. Ceré und O. Rechavi (2019a). *Inter-generational consequences for growing Caenorhabditis elegans in liquid*. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 374(1770): 20180125.
- Lev, I., H. Gingold und O. Rechavi (2019b). *H3K9me3 is required for inheritance of small RNAs that target a unique subset of newly evolved genes*. *Elife* 8.
- Li, J., L. Na, H. Ma, Z. Zhang, T. Li, L. Lin, Q. Li, C. Sun und Y. Li (2015). *Multigenerational effects of parental prenatal exposure to famine on adult offspring cognitive function*. *Sci Rep* 5: 13792.
- Li, S., S. Xu, Y. Ma, S. Wu, Y. Feng, Q. Cui, L. Chen, S. Zhou, Y. Kong, X. Zhanget al. (2016). *A Genetic Screen for Mutants with Supersized Lipid Droplets in Caenorhabditis elegans*. *G3 (Bethesda)* 6(8): 2407-2419.
- Li, X., M. B. Cope, M. S. Johnson, D. L. Smith, Jr. und T. R. Nagy (2010). *Mild calorie restriction induces fat accumulation in female C57BL/6J mice*. *Obesity (Silver Spring, Md.)* 18(3): 456-462.
- Li, Y., K. Na, H. J. Lee, E. Y. Lee und Y. K. Paik (2011). *Contribution of sams-1 and pmt-1 to lipid homeostasis in adult Caenorhabditis elegans*. *J Biochem* 149(5): 529-538.
- Li, Y. X., N. N. Wang, Y. X. Zhou, C. G. Lin, J. S. Wu, X. Q. Chen, G. J. Chen und Z. J. Du (2021). *Planococcus maritimus ML1206 Isolated from Wild Oysters Enhances the Survival of Caenorhabditis elegans against Vibrio anguillarum*. *Mar Drugs* 19(3).
- Li, Z., Z. Yu, C. Cui, F. Ai und D. Yin (2020). *Multi-generational obesogenic effects of sulfomethoxazole on Caenorhabditis elegans through epigenetic regulation*. *Journal of Hazardous Materials* 382: 121061.
- Liang, B., K. Ferguson, L. Kadyk und J. L. Watts (2010). *The role of nuclear receptor NHR-64 in fat storage regulation in Caenorhabditis elegans*. *PLoS One* 5(3): e9869.
- Lin, Y., B. Bao, H. Yin, X. Wang, A. Feng, L. Zhao, X. Nie, N. Yang, G. P. Shi und J. Liu (2019). *Peripheral cathepsin L inhibition induces fat loss in C. elegans and mice through promoting central serotonin synthesis*. *BMC Biol* 17(1): 93.
- Lind, M. I. und F. Spagopoulou (2018). *Evolutionary consequences of epigenetic inheritance*. *Heredity* 121(3): 205-209.
- Liput, K. P., A. Lepczyński, M. Ogłuszka, A. Nawrocka, E. Poławska, A. Grzesiak, B. Ślaska, C. S. Pareek, U. Czarnik und M. Pierzchała (2021). *Effects of Dietary n-3 and n-6 Polyunsaturated Fatty Acids in Inflammation and Cancerogenesis*. *International Journal of Molecular Sciences* 22(13): 6965.
- Listenberger, L. L., X. Han, S. E. Lewis, S. Cases, R. V. Farese, Jr., D. S. Ory und J. E. Schaffer (2003). *Triglyceride accumulation protects against fatty acid-induced lipotoxicity*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(6): 3077-3082.
- Listenberger, L. L., A. M. Studer, D. A. Brown und N. E. Wolins (2016). *Fluorescent Detection of Lipid Droplets and Associated Proteins*. *Curr Protoc Cell Biol* 71: 4.31.31-34.31.14.
- Liu, F., Y. Xiao, X.-L. Ji, K.-Q. Zhang und C.-G. Zou (2017). *The cAMP-PKA pathway-mediated fat mobilization is required for cold tolerance in C. elegans*. *Scientific Reports* 7(1): 638.



- Liu, P., R. Bartz, J. K. Zehmer, Y.-s. Ying, M. Zhu, G. Serrero und R. G. W. Anderson (2007). *Rab-regulated interaction of early endosomes with lipid droplets*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research 1773(6): 784-793.
- Liu, Y., S. Xu, C. Zhang, X. Zhu, M. A. Hammad, X. Zhang, M. Christian, H. Zhang und P. Liu (2018). *Hydroxysteroid dehydrogenase family proteins on lipid droplets through bacteria, C. elegans, and mammals*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids 1863(8): 881-894.
- Liu, Z., X. Li, Q. Ge, M. Ding und X. Huang (2014). *A lipid droplet-associated GFP reporter-based screen identifies new fat storage regulators in C. elegans*. J Genet Genomics 41(5): 305-313.
- Llopis, S., M. J. Rodrigo, N. González, S. Genovés, L. Zacarías, D. Ramón und P. Martorell (2019).  *$\beta$ -Cryptoxanthin Reduces Body Fat and Increases Oxidative Stress Response in Caenorhabditis elegans Model*. Nutrients 11(2): 232.
- Lockery, S. R., S. E. Hulme, W. M. Roberts, K. J. Robinson, A. Laromaine, T. H. Lindsay, G. M. Whitesides und J. C. Weeks (2012). *A microfluidic device for whole-animal drug screening using electrophysiological measures in the nematode C. elegans*. Lab on a chip 12(12): 2211-2220.
- Lopes, A. F. C., K. Bozek, M. Herholz, A. Trifunovic, M. Rieckher und B. Schumacher (2020). *A C. elegans model for neurodegeneration in Cockayne syndrome*. Nucleic Acids Res 48(19): 10973-10985.
- Lorenzi, M. (2007). *The polyol pathway as a mechanism for diabetic retinopathy: attractive, elusive, and resilient*. Exp Diabetes Res 2007: 61038.
- Lu, N. C. und K. M. Goetsch (1993). *Carbohydrate Requirement of Caenorhabditis Elegans and the Final Development of a Chemically Defined Medium*. Nematologica 39(1-4): 303-311.
- Lu, Z. und Z. Qiu (2017a). *High glucose concentration restricts fat consumption in Caenorhabditis elegans*.
- Lu, Z. und Z. Qiu (2017b). *High glucose concentration restricts fat consumption in Caenorhabditis elegans*. International Journal of Clinical and Experimental Medicine 10: 10554-10559.
- Lubrano, C., G. Genovesi, P. Specchia, D. Costantini, S. Mariani, E. Petrangeli, A. Lenzi und L. Gnessi (2013). *Obesity and metabolic comorbidities: environmental diseases?* Oxid Med Cell Longev 2013: 640673.
- Lüersen, K., U. Faust, D. C. Gottschling und F. Döring (2014). *Gait-specific adaptation of locomotor activity in response to dietary restriction in Caenorhabditis elegans*. J Exp Biol 217(Pt 14): 2480-2488.
- Lumey, L. H., P. Ekamper, G. Bijwaard, G. Conti und F. van Poppel (2021). *Overweight and obesity at age 19 after pre-natal famine exposure*. International Journal of Obesity 45(8): 1668-1676.
- Lumey, L. H., A. D. Stein und H. Kahn (2009). *Food restriction during gestation and impaired fasting glucose or glucose tolerance and type 2 diabetes mellitus in adulthood: Evidence from the DutchHunger Winter Families Study*. Journal of Developmental Origins of Health and Disease 1: S164.
- Lumey, L. H., A. D. Stein und E. Susser (2011). *Prenatal famine and adult health*. Annual review of public health 32: 237-262.

- Lushchak, O. V., B. M. Rovenko, D. V. Gospodaryov und V. I. Lushchak (2011). *Drosophila melanogaster larvae fed by glucose and fructose demonstrate difference in oxidative stress markers and antioxidant enzymes of adult flies*. Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol 160(1): 27-34.
- Lynn, D. A., H. M. Dalton, J. N. Sowa, M. C. Wang, A. A. Soukas und S. P. Curran (2015). *Omega-3 and -6 fatty acids allocate somatic and germline lipids to ensure fitness during nutrient and oxidative stress in Caenorhabditis elegans*. Proc Natl Acad Sci U S A 112(50): 15378-15383.
- Ma, C., R. Niu, T. Huang, L. W. Shao, Y. Peng, W. Ding, Y. Wang, G. Jia, C. He, C. Y. Liet *al.* (2019). *N6-methyldeoxyadenine is a transgenerational epigenetic signal for mitochondrial stress adaptation*. Nat Cell Biol 21(3): 319-327.
- Ma, J., X. Xu, R. Wang, H. Yan, H. Yao, H. Zhang, S. Jiang und A. Xu (2020). *Lipopolysaccharide exposure induces oxidative damage in Caenorhabditis elegans: protective effects of carnosine*. BMC Pharmacol Toxicol 21(1): 85.
- MacConnachie, A. M. (1999). *Orlistat (Xenical)*. Intensive Crit Care Nurs 15(5): 298-299.
- Maguire, Sean M., Christopher M. Clark, J. Nunnari, Jennifer K. Pirri und Mark J. Alkema (2011). *The C. elegans Touch Response Facilitates Escape from Predacious Fungi*. Current Biology 21(15): 1326-1330.
- Maillard, L. (1912). Action of amino acids on sugars. Formation of melanoidins in a methodical way. J. Neonatol 54: 66-68.
- Mak, H. Y. (2012). *Lipid droplets as fat storage organelles in Caenorhabditis elegans: Thematic Review Series: Lipid Droplet Synthesis and Metabolism: from Yeast to Man*. J Lipid Res 53(1): 28-33.
- Mak, H. Y., L. S. Nelson, M. Basson, C. D. Johnson und G. Ruvkun (2006). *Polygenic control of Caenorhabditis elegans fat storage*. Nat Genet 38(3): 363-368.
- Mallo, G. V., C. L. Kurz, C. Couillault, N. Pujol, S. Granjeaud, Y. Kohara und J. J. Ewbank (2002). *Inducible Antibacterial Defense System in C. elegans*. Current Biology 12(14): 1209-1214.
- Mancini, A., E. Imperlini, E. Nigro, C. Montagnese, A. Daniele, S. Orrù und P. Buono (2015). *Biological and Nutritional Properties of Palm Oil and Palmitic Acid: Effects on Health*. Molecules 20(9).
- Mari, M., G. Filippidis, K. Palikaras, B. Petanidou, C. Fotakis und N. Tavernarakis (2015). *Imaging ectopic fat deposition in Caenorhabditis elegans muscles using nonlinear microscopy*. Microsc Res Tech 78(6): 523-528.
- Marklund, M., J. H. Y. Wu, F. Imamura, L. C. D. Gobbo, A. Fretts, J. d. Goede, P. Shi, N. Tintle, M. Wennberg, S. Aslibekyanet *al.* (2019). *Biomarkers of Dietary Omega-6 Fatty Acids and Incident Cardiovascular Disease and Mortality*. Circulation 139(21): 2422-2436.
- Martin, R., E. V. Entchev, T. V. Kurzchalia und H. J. Knölker (2010). *Steroid hormones controlling the life cycle of the nematode Caenorhabditis elegans: stereoselective synthesis and biology*. Org Biomol Chem 8(4): 739-750.
- Martin, S., K. Driessen, S. J. Nixon, M. Zerial und R. G. Parton (2005). *Regulated Localization of Rab18 to Lipid Droplets: EFFECTS OF LIPOLYTIC STIMULATION AND INHIBITION OF LIPID DROPLET CATABOLISM\**. Journal of Biological Chemistry 280(51): 42325-42335.
- Martin, S. und R. G. Parton (2006). *Lipid droplets: a unified view of a dynamic organelle*. Nat Rev Mol Cell Biol 7(5): 373-378.

- Martorell, P., S. Llopis, N. Gonzalez, F. Monton, P. Ortiz, S. Genoves und D. Ramon (2012). *Caenorhabditis elegans as a model to study the effectiveness and metabolic targets of dietary supplements used for obesity treatment: the specific case of a conjugated linoleic acid mixture (Tonalin)*. J Agric Food Chem 60(44): 11071-11079.
- Massiera, F., P. Barbry, P. Guesnet, A. Joly, S. Luquet, C. Moreilhon-Brest, T. Mohsen-Kanson, E. Z. Amri und G. Ailhaud (2010). *A Western-like fat diet is sufficient to induce a gradual enhancement in fat mass over generations*. J Lipid Res 51(8): 2352-2361.
- Mathers, J. C., G. Strathdee und C. L. Relton (2010). *Induction of Epigenetic Alterations by Dietary and Other Environmental Factors*. Advances in Genetics. 71: 3-39.
- Maxwell, C. S., I. Antoshechkin, N. Kurhanewicz, J. A. Belsky und L. R. Baugh (2012). *Nutritional control of mRNA isoform expression during developmental arrest and recovery in C. elegans*. Genome Res 22(10): 1920-1929.
- McCarter, J., B. Bartlett, T. Dang und T. Schedl (1999). *On the control of oocyte meiotic maturation and ovulation in Caenorhabditis elegans*. Dev Biol 205(1): 111-128.
- McClendon, K. S., D. M. Riche und G. I. Uwaifo (2009). *Orlistat: current status in clinical therapeutics*. Expert Opin Drug Saf 8(6): 727-744.
- McGhee, J. D. (2007). *The C. elegans intestine*. WormBook: 1-36.
- McGhee, J. D., M. C. Sleumer, M. Bilenky, K. Wong, S. J. McKay, B. Goszczynski, H. Tian, N. D. Krich, J. Khattrra, R. A. Holtet *al.* (2007). *The ELT-2 GATA-factor and the global regulation of transcription in the C. elegans intestine*. Dev Biol 302(2): 627-645.
- McKay, J. P., D. M. Raizen, A. Gottschalk, W. R. Schafer und L. Avery (2004). *eat-2 and eat-18 are required for nicotinic neurotransmission in the Caenorhabditis elegans pharynx*. Genetics 166(1): 161-169.
- McKay, R. M., J. P. McKay, L. Avery und J. M. Graff (2003). *C. elegans: A Model for Exploring the Genetics of Fat Storage*. Dev Cell 4(1): 131-142.
- McLafferty, F. W. (1957). *Mass Spectrometry in Chemical Research and Production*. Applied Spectroscopy 11(4): 148-156.
- McNeely, W. und P. Benfield (1998). *Orlistat*. Drugs 56(2): 241-249; discussion 250.
- Meissner, B., M. Boll, H. Daniel und R. Baumeister (2004). *Deletion of the intestinal peptide transporter affects insulin and TOR signaling in Caenorhabditis elegans*. J Biol Chem 279(35): 36739-36745.
- Mejia-Martinez, F., B. Franco-Juarez, E. Moreno-Arriola, A. Hernandez-Vazquez, M. Martinez-Avila, S. Gomez-Manzo, J. Marcial-Quino, K. Carvajal, A. Velazquez-Arellano und D. Ortega-Cuellar (2017). *The MXL-3/SBP-1 Axis Is Responsible for Glucose-Dependent Fat Accumulation in C. elegans*. Genes (Basel) 8(11).
- Mendler, M., A. Schlotterer, M. Morcos und P. P. Nawroth (2012). *Understanding diabetic polyneuropathy and longevity: what can we learn from the nematode Caenorhabditis elegans?* Exp Clin Endocrinol Diabetes 120(4): 182-183.
- Meneely, P. M., C. L. Dahlberg und J. K. Rose (2019). *Working with Worms: Caenorhabditis elegans as a Model Organism*. Current Protocols Essential Laboratory Techniques 19(1): e35.

- Menzel, R., R. Nehring, D. Simsek und L. Ruess (2018). *Fatty Acid 13C Isotopologue Profiling Provides Insight into Trophic Carbon Transfer and Lipid Metabolism of Invertebrate Consumers*. Journal of visualized experiments : JoVE(134): 57110.
- Merris, M., W. G. Wadsworth, U. Khamrai, R. Bittman, D. J. Chitwood und J. Lenard (2003). *Sterol effects and sites of sterol accumulation in Caenorhabditis elegans: developmental requirement for 4alpha-methyl sterols*. J Lipid Res 44(1): 172-181.
- Michaelson, L. (2000). *C. elegans: A Practical Approach*. Heredity 85(1): 99-99.
- Miersch, C. und F. Döring (2012). *Paternal dietary restriction affects progeny fat content in Caenorhabditis elegans*. IUBMB Life 64(7): 644-648.
- Miersch, C. und F. Döring (2013). *Sex differences in body composition, fat storage, and gene expression profile in Caenorhabditis elegans in response to dietary restriction*. Physiol Genomics 45(13): 539-551.
- Minehira, K., N. Vega, H. Vidal, K. Acheson und L. Tappy (2004). *Effect of carbohydrate overfeeding on whole body macronutrient metabolism and expression of lipogenic enzymes in adipose tissue of lean and overweight humans*. Int J Obes Relat Metab Disord 28(10): 1291-1298.
- Miyamoto, T., S. Okano und N. Kasai (2009). *Inactivation of Escherichia coli endotoxin by soft hydrothermal processing*. Appl Environ Microbiol 75(15): 5058-5063.
- Mizushima, N. (2007). *Autophagy: process and function*. Genes Dev 21(22): 2861-2873.
- Molenaars, M., B. V. Schomakers, H. L. Elfrink, A. W. Gao, M. A. T. Vervaart, M. L. Pras-Raves, A. C. Luyf, R. L. Smith, M. G. Sterken, J. E. Kammenga et al. (2021). *Metabolomics and lipidomics in Caenorhabditis elegans using a single-sample preparation*. Disease models & mechanisms 14(4): dmm047746.
- Mondoux, M. A., D. C. Love, S. K. Ghosh, T. Fukushige, M. Bond, G. R. Weerasinghe, J. A. Hanover und M. W. Krause (2011). *O-Linked-N-Acetylglucosamine Cycling and Insulin Signaling Are Required for the Glucose Stress Response in Caenorhabditis elegans*. Genetics 188(2): 369-382.
- Monnier, V. M. und A. Cerami (1981). *Nonenzymatic Browning in Vivo: Possible Process for Aging of Long-Lived Proteins*. Science 211(4481): 491-493.
- Moore, S. E., T. J. Cole, E. M. Poskitt, B. J. Sonko, R. G. Whitehead, I. A. McGregor und A. M. Prentice (1997). *Season of birth predicts mortality in rural Gambia*. Nature 388(6641): 434.
- Morcos, M., X. Du, F. Pfisterer, H. Hutter, A. A. Sayed, P. Thornalley, N. Ahmed, J. Baynes, S. Thorpe, G. Kukudovet et al. (2008). *Glyoxalase-1 prevents mitochondrial protein modification and enhances lifespan in Caenorhabditis elegans*. Aging Cell 7(2): 260-269.
- Morita, M. und T. Imanaka (2012). *Peroxisomal ABC transporters: Structure, function and role in disease*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease 1822(9): 1387-1396.
- Mousseau, T. A. und C. W. Fox (1998). *The adaptive significance of maternal effects*. Trends Ecol Evol 13(10): 403-407.
- Mullaney, B. C. und K. Ashrafi (2009). *C. elegans fat storage and metabolic regulation*. Biochim Biophys Acta 1791(6): 474-478.

- Mullaney, B. C., R. D. Blind, G. A. Lemieux, C. L. Perez, I. C. Elle, N. J. Faergeman, M. R. Van Gilst, H. A. Ingraham und K. Ashrafi (2010). *Regulation of C. elegans fat uptake and storage by acyl-CoA synthase-3 is dependent on NR5A family nuclear hormone receptor nhr-25*. Cell Metab 12(4): 398-410.
- Murphy, C. T. und P. J. Hu (2013). *Insulin/insulin-like growth factor signaling in C. elegans*. WormBook: 1-43.
- Murray, P., S. A. Hayward, G. G. Govan, A. Y. Gracey und A. R. Cossins (2007). *An explicit test of the phospholipid saturation hypothesis of acquired cold tolerance in Caenorhabditis elegans*. Proc Natl Acad Sci U S A 104(13): 5489-5494.
- Muschiol, D., F. Schroeder und W. Traunspurger (2009). *Life cycle and population growth rate of Caenorhabditis elegans studied by a new method*. BMC ecology 9: 14-14.
- Musil, R., M. Obermeier, P. Russ und M. Hamerle (2015). *Weight gain and antipsychotics: a drug safety review*. Expert Opin Drug Saf 14(1): 73-96.
- Musselman, L. P., J. L. Fink und T. J. Baranski (2019). *Similar effects of high-fructose and high-glucose feeding in a Drosophila model of obesity and diabetes*. PloS one 14(5): e0217096-e0217096.
- Musselman, L. P., J. L. Fink, K. Narzinski, P. V. Ramachandran, S. S. Hathiramani, R. L. Cagan und T. J. Baranski (2011). *A high-sugar diet produces obesity and insulin resistance in wild-type Drosophila*. Dis Model Mech 4(6): 842-849.
- Na, H., P. Zhang, Y. Chen, X. Zhu, Y. Liu, Y. Liu, K. Xie, N. Xu, F. Yang, Y. Yuet al. (2015). *Identification of lipid droplet structure-like/resident proteins in Caenorhabditis elegans*. Biochim Biophys Acta 1853(10 Pt A): 2481-2491.
- Naeye, R. L., W. Blanc und C. Paul (1973). *Effects of maternal nutrition on the human fetus*. Pediatrics 52(4): 494-503.
- Nan, X., J. X. Cheng und X. S. Xie (2003). *Vibrational imaging of lipid droplets in live fibroblast cells with coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy*. J Lipid Res 44(11): 2202-2208.
- Narbonne, P. und R. Roy (2009). *Caenorhabditis elegans dauers need LKB1/AMPK to ration lipid reserves and ensure long-term survival*. Nature 457(7226): 210-214.
- Nass, R. und I. Hamza (2007). *The nematode C. elegans as an animal model to explore toxicology in vivo: solid and axenic growth culture conditions and compound exposure parameters*. Curr Protoc Toxicol Chapter 1: Unit1.9.
- Navarro-Herrera, D., P. Aranaz, L. Eder-Azanza, M. Zabala, A. Romo-Hualde, C. Hurtado, D. Calavia, M. Lopez-Yoldi, J. A. Martinez, C. J. Gonzalez-Navarro et al. (2018). *Borago officinalis seed oil (BSO), a natural source of omega-6 fatty acids, attenuates fat accumulation by activating peroxisomal beta-oxidation both in C. elegans and in diet-induced obese rats*. Food Funct 9(8): 4340-4351.
- Nehrke, K. (2003). *A reduction in intestinal cell pHi due to loss of the Caenorhabditis elegans Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger NHX-2 increases life span*. J Biol Chem 278(45): 44657-44666.
- Nelson, V. R. und J. H. Nadeau (2010). *Transgenerational genetic effects*. Epigenomics 2(6): 797-806.

Nett, E. M., N. B. Sepulveda und L. N. Petrella (2019). *Defects in mating behavior and tail morphology are the primary cause of sterility in Caenorhabditis elegans males at high temperature*. Journal of Experimental Biology 222(24).

Ng, S. F., R. C. Lin, D. R. Laybutt, R. Barres, J. A. Owens und M. J. Morris (2010). *Chronic high-fat diet in fathers programs  $\beta$ -cell dysfunction in female rat offspring*. Nature 467(7318): 963-966.

Nilsson, E. E., I. Sadler-Riggelman und M. K. Skinner (2018). *Environmentally induced epigenetic transgenerational inheritance of disease*. Environmental Epigenetics 4(2): dvy016.

Noble, T., J. Stieglitz und S. Srinivasan (2013). *An integrated serotonin and octopamine neuronal circuit directs the release of an endocrine signal to control C. elegans body fat*. Cell Metab 18(5): 672-684.

Nomura, T., M. Horikawa, S. Shimamura, T. Hashimoto und K. Sakamoto (2010). *Fat accumulation in Caenorhabditis elegans is mediated by SREBP homolog SBP-1*. Genes Nutr 5(1): 17-27.

Norouzitallab, P., K. Baruah, M. Vandegehuchte, G. Van Stappen, F. Catania, J. Vanden Bussche, L. Vanhaecke, P. Sorgeloos und P. Bossier (2014). *Environmental heat stress induces epigenetic transgenerational inheritance of robustness in parthenogenetic Artemia model*. Faseb j 28(8): 3552-3563.

O'Riordan, V. B. und A. M. Burnell (1990). *Intermediary metabolism in the dauer larva of the nematode Caenorhabditis elegans—II. The glyoxylate cycle and fatty-acid oxidation*. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry 95(1): 125-130.

O'Rourke, E. J. und G. Ruvkun (2013). *MXL-3 and HLH-30 transcriptionally link lipolysis and autophagy to nutrient availability*. Nat Cell Biol 15(6): 668-676.

O'Rourke, E. J., A. A. Soukas, C. E. Carr und G. Ruvkun (2009). *C. elegans major fats are stored in vesicles distinct from lysosome-related organelles*. Cell Metab 10(5): 430-435.

Ogg, S., S. Paradis, S. Gottlieb, G. I. Patterson, L. Lee, H. A. Tissenbaum und G. Ruvkun (1997). *The Fork head transcription factor DAF-16 transduces insulin-like metabolic and longevity signals in C. elegans*. Nature 389(6654): 994-999.

Oku, H. und T. Kaneda (1988). *Biosynthesis of branched-chain fatty acids in Bacillus subtilis. A decarboxylase is essential for branched-chain fatty acid synthetase*. Journal of Biological Chemistry 263(34): 18386-18396.

Olsen, L., E. Thum und N. Rohner (2021). *Lipid metabolism in adaptation to extreme nutritional challenges*. Dev Cell 56(10): 1417-1429.

Önal, G., O. Kutlu, D. Gozuacik und S. Emre (2017). *Lipid Droplets in Health and Disease*. Lipids in Health and Disease 16.

Owen, O. E., G. A. Reichard, Jr., M. S. Patel und G. Boden (1979). *Energy metabolism in feasting and fasting*. Adv Exp Med Biol 111: 169-188.

Painter, R. C., S. R. de Rooij, P. M. Bossuyt, T. A. Simmers, C. Osmond, D. J. Barker, O. P. Bleker und T. J. Roseboom (2006). *Early onset of coronary artery disease after prenatal exposure to the Dutch famine*. Am J Clin Nutr 84(2): 322-327; quiz 466-327.

Painter, R. C., C. Osmond, P. Gluckman, M. Hanson, D. I. Phillips und T. J. Roseboom (2008). *Transgenerational effects of prenatal exposure to the Dutch famine on neonatal adiposity and health in later life*. Bjog 115(10): 1243-1249.

- Palgunow, D., M. Klapper und F. Doring (2012). *Dietary restriction during development enlarges intestinal and hypodermal lipid droplets in *Caenorhabditis elegans**. PLoS One 7(11): e46198.
- Palikaras, K. und N. Tavernarakis (2013). *Caenorhabditis elegans (Nematode)*. Brenner's Encyclopedia of Genetics (Second Edition). S. Maloy und K. Hughes. San Diego, Academic Press: 404-408.
- Palikaras, K. und N. Tavernarakis (2016). *Intracellular Assessment of ATP Levels in *Caenorhabditis elegans**. Bio-protocol 6(23): e22048.
- Pang, G., J. Xie, Q. Chen und Z. Hu (2014a). *Energy intake, metabolic homeostasis, and human health*. Food Science and Human Wellness 3(3): 89-103.
- Pang, S., D. A. Lynn, J. Y. Lo, J. Paek und S. P. Curran (2014b). *SKN-1 and Nrf2 couples proline catabolism with lipid metabolism during nutrient deprivation*. Nat Commun 5: 5048.
- Pang, T. Y. C., A. K. Short, T. W. Bredy und A. J. Hannan (2017). *Transgenerational paternal transmission of acquired traits: Stress-induced modification of the sperm regulatory transcriptome and offspring phenotypes*. Current opinion in behavioral sciences 14: 140-147.
- Pantaleão, L. C., I. Inzani, S. Furse, E. Loche, A. Hufnagel, T. Ashmore, H. L. Blackmore, B. Jenkins, A. A. M. Carpenter, A. Wilczynska et al. (2022). *Maternal diet-induced obesity during pregnancy alters lipid supply to mouse E18.5 fetuses and changes the cardiac tissue lipidome in a sex-dependent manner*. Elife 11.
- Papsdorf, K. und A. Brunet (2019). *Linking Lipid Metabolism to Chromatin Regulation in Aging*. Trends in Cell Biology 29(2): 97-116.
- Park, S. und Y. K. Paik (2017). *Genetic deficiency in neuronal peroxisomal fatty acid  $\beta$ -oxidation causes the interruption of dauer development in *Caenorhabditis elegans**. Sci Rep 7(1): 9358.
- Pathare, P. P., A. Lin, K. E. Bornfeldt, S. Taubert und M. R. Van Gilst (2012). *Coordinate regulation of lipid metabolism by novel nuclear receptor partnerships*. PLoS Genet 8(4): e1002645.
- Pembrey, M. E., L. O. Bygren, G. Kaati, S. Edvinsson, K. Northstone, M. Sjöström und J. Golding (2006). *Sex-specific, male-line transgenerational responses in humans*. Eur J Hum Genet 14(2): 159-166.
- Perez, C. L. und M. R. Van Gilst (2008). *A  $^{13}C$  Isotope Labeling Strategy Reveals the Influence of Insulin Signaling on Lipogenesis in *C. elegans**. Cell Metabolism 8(3): 266-274.
- Perez, M. F. und B. Lehner (2019). *Intergenerational and transgenerational epigenetic inheritance in animals*. Nat Cell Biol 21(2): 143-151.
- Peschansky, V. J. und C. Wahlestedt (2014). *Non-coding RNAs as direct and indirect modulators of epigenetic regulation*. Epigenetics 9(1): 3-12.
- Petersen, M. C., D. F. Vatner und G. I. Shulman (2017). *Regulation of hepatic glucose metabolism in health and disease*. Nat Rev Endocrinol 13(10): 572-587.
- Petrakis, D., L. Vassilopoulou, C. Mamoulakis, C. Psycharakis, A. Anifantaki, S. Sifakis, A. O. Docea, J. Tsiaoussis, A. Makrigiannakis und A. M. Tsatsakis (2017). *Endocrine Disruptors Leading to Obesity and Related Diseases*. Int J Environ Res Public Health 14(10).
- Petrella, L. N. (2014). *Natural variants of *C. elegans* demonstrate defects in both sperm function and oogenesis at elevated temperatures*. PLoS One 9(11): e112377.

- Pfeifer, A. und L. S. Hoffmann (2015). *Brown, beige, and white: the new color code of fat and its pharmacological implications*. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 55: 207-227.
- Piché, M. E., A. Tchernof und J. P. Després (2020). *Obesity Phenotypes, Diabetes, and Cardiovascular Diseases*. *Circ Res* 126(11): 1477-1500.
- Pino, E. C., C. M. Webster, C. E. Carr und A. A. Soukas (2013). *Biochemical and high throughput microscopic assessment of fat mass in Caenorhabditis elegans*. *J Vis Exp*(73).
- Ploegh, H. L. (2007). *A lipid-based model for the creation of an escape hatch from the endoplasmic reticulum*. *Nature* 448(7152): 435-438.
- Poma, A., S. Colafarina, G. Fontecchio und G. Chichiricò (2014). *Transgenerational effects of NMs*. *Adv Exp Med Biol* 811: 235-254.
- Porta-de-la-Riva, M., L. Fontrodona, A. Villanueva und J. Cerón (2012). *Basic Caenorhabditis elegans methods: synchronization and observation*. *J Vis Exp*(64): e4019.
- Possik, E. und A. Pause (2016). *Glycogen: A must have storage to survive stressful emergencies*. *Worm* 5(2): e1156831.
- Possik, E., C. Schmitt, A. Al-Mass, Y. Bai, L. Côté, J. Morin, H. Erb, A. Oppong, W. Kahloan, J. A. Parker et al. (2022). *Phosphoglycolate phosphatase homologs act as glycerol-3-phosphate phosphatase to control stress and healthspan in C. elegans*. *Nature Communications* 13(1): 177.
- Prentki, M., M. L. Peyot, P. Masiello und S. R. M. Madiraju (2020). *Nutrient-Induced Metabolic Stress, Adaptation, Detoxification, and Toxicity in the Pancreatic  $\beta$ -Cell*. *Diabetes* 69(3): 279-290.
- Pu, J., C. W. Ha, S. Zhang, J. P. Jung, W. K. Huh und P. Liu (2011). *Interactomic study on interaction between lipid droplets and mitochondria*. *Protein Cell* 2(6): 487-496.
- Qi, B., M. Kniazeva und M. Han (2017). *A vitamin-B2-sensing mechanism that regulates gut protease activity to impact animal's food behavior and growth*. *Elife* 6.
- Qi, Q., A. Y. Chu, J. H. Kang, J. Huang, L. M. Rose, M. K. Jensen, L. Liang, G. C. Curhan, L. R. Pasquale, J. L. Wiggset et al. (2014). *Fried food consumption, genetic risk, and body mass index: gene-diet interaction analysis in three US cohort studies*. *Bmj* 348: g1610.
- Quadrana, L. und V. Colot (2016). *Plant Transgenerational Epigenetics*. *Annu Rev Genet* 50: 467-491.
- Quehenberger, O., A. M. Armando und E. A. Dennis (2011). *High sensitivity quantitative lipidomics analysis of fatty acids in biological samples by gas chromatography-mass spectrometry*. *Biochimica et biophysica acta* 1811(11): 648-656.
- Raad, G., F. Serra, L. Martin, M. A. Derieppe, J. Gilleron, V. L. Costa, D. F. Pisani, E. Z. Amri, M. Trabucchi und V. Grandjean (2021). *Paternal multigenerational exposure to an obesogenic diet drives epigenetic predisposition to metabolic diseases in mice*. *Elife* 10.
- Raizen, D. M., R. Y. Lee und L. Avery (1995). *Interacting genes required for pharyngeal excitation by motor neuron MC in Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 141(4): 1365-1382.
- Rakhra, V., S. L. Galappaththy, S. Bulchandani und P. K. Cabandugama (2020). *Obesity and the Western Diet: How We Got Here*. *Mo Med* 117(6): 536-538.



- Ramírez-Castrillón, M., V. P. Jaramillo-García, H. Lopes Barros, J. A. Pegas Henriques, V. Stefani und P. Valente (2021). *Nile Red Incubation Time Before Reading Fluorescence Greatly Influences the Yeast Neutral Lipids Quantification*. *Front Microbiol* 12: 619313.
- Ranall, M. V., B. G. Gabrielli und T. J. Gonda (2011). *High-content imaging of neutral lipid droplets with 1,6-diphenylhexatriene*. *Biotechniques* 51(1): 35-36, 38-42.
- Rando, O. J. und R. A. Simmons (2015). *I'm eating for two: parental dietary effects on offspring metabolism*. *Cell* 161(1): 93-105.
- Ransac, S., Y. Gargouri, H. Moreau und R. Verger (1991). *Inactivation of pancreatic and gastric lipases by tetrahydrolipstatin and alkyl-dithio-5-(2-nitrobenzoic acid). A kinetic study with 1,2-didecanoyl-sn-glycerol monolayers*. *Eur J Biochem* 202(2): 395-400.
- Räsänen, K. und L. E. B. Kruuk (2007). *Maternal effects and evolution at ecological time-scales*. *Functional Ecology* 21(3): 408-421.
- Ravelli, A. C., J. H. van der Meulen, R. P. Michels, C. Osmond, D. J. Barker, C. N. Hales und O. P. Bleker (1998). *Glucose tolerance in adults after prenatal exposure to famine*. *Lancet* 351(9097): 173-177.
- Rechavi, O., L. Houry-Ze'evi, S. Anava, W. S. S. Goh, S. Y. Kerk, G. J. Hannon und O. Hobert (2014). *Starvation-induced transgenerational inheritance of small RNAs in C. elegans*. *Cell* 158(2): 277-287.
- Rechavi, O. und I. Lev (2017). *Principles of Transgenerational Small RNA Inheritance in Caenorhabditis elegans*. *Curr Biol* 27(14): R720-r730.
- Rechavi, O., G. Minevich und O. Hobert (2011). *Transgenerational inheritance of an acquired small RNA-based antiviral response in C. elegans*. *Cell* 147(6): 1248-1256.
- Reddy, J. K. und T. Hashimoto (2001). *Peroxisomal beta-oxidation and peroxisome proliferator-activated receptor alpha: an adaptive metabolic system*. *Annu Rev Nutr* 21: 193-230.
- Rehman, N. und J. Varghese (2021). *Larval nutrition influences adult fat stores and starvation resistance in Drosophila*. *PLoS One* 16(2): e0247175.
- Reichetzedder, C. (2021). *Overweight and obesity in pregnancy: their impact on epigenetics*. *European Journal of Clinical Nutrition* 75(12): 1710-1722.
- Remy, J.-J. (2010). *Stable inheritance of an acquired behavior in Caenorhabditis elegans*. *Current Biology* 20(20): R877-R878.
- Ren, X. M., Y. Kuo und B. Blumberg (2020). *Agrochemicals and obesity*. *Mol Cell Endocrinol* 515: 110926.
- Renault, K. M., E. M. Carlsen, K. Nørgaard, L. Nilas, O. Pryds, N. J. Secher, D. Cortes, J.-E. Beck Jensen, S. F. Olsen und T. I. Halldorsson (2015). *Intake of carbohydrates during pregnancy in obese women is associated with fat mass in the newborn offspring*. *The American Journal of Clinical Nutrition* 102(6): 1475-1481.
- Riddle, D. L. und P. S. Albert (1997a). *Genetic and Environmental Regulation of Dauer Larva Development*. *C. elegans II*. D. L. Riddle, T. Blumenthal, B. J. Meyer und J. R. Priess. Cold Spring Harbor (NY), Cold Spring Harbor Laboratory Press. Copyright © 1997, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

- Riddle, D. L. und P. S. Albert (1997b). *Summary of Anatomy and Development of the Germ Line*. *C. elegans* II. D. L. Riddle, T. Blumenthal, B. J. Meyer und J. R. Priess. Cold Spring Harbor (NY), Cold Spring Harbor Laboratory Press. Copyright © 1997, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Riddle, D. L., T. Blumenthal, B. J. Meyer und J. R. Priess (1997a). *Ageing in C. elegans*. *C. elegans* II. D. L. Riddle, T. Blumenthal, B. J. Meyer und J. R. Priess. Cold Spring Harbor (NY), Cold Spring Harbor Laboratory Press. Copyright © 1997, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Riddle, D. L., T. Blumenthal, B. J. Meyer und J. R. Priess (1997b). *Introduction*. *C. elegans* II. D. L. Riddle, T. Blumenthal, B. J. Meyer und J. R. Priess. Cold Spring Harbor (NY), Cold Spring Harbor Laboratory Press. Copyright © 1997, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Riddle, D. L., M. M. Swanson und P. S. Albert (1981). *Interacting genes in nematode dauer larva formation*. *Nature* 290(5808): 668-671.
- Roach, N. P., N. Sadowski, A. F. Alessi, W. Timp, J. Taylor und J. K. Kim (2020). *The full-length transcriptome of C. elegans using direct RNA sequencing*. *Genome Res* 30(2): 299-312.
- Robenek, H., I. Buers, O. Hofnagel, M. J. Robenek, D. Troyer und N. J. Severs (2009). *Compartmentalization of proteins in lipid droplet biogenesis*. *Biochim Biophys Acta* 1791(6): 408-418.
- Roberts, A. F., T. L. Gumienny, R. J. Gleason, H. Wang und R. W. Padgett (2010). *Regulation of genes affecting body size and innate immunity by the DBL-1/BMP-like pathway in Caenorhabditis elegans*. *BMC Developmental Biology* 10(1): 61.
- Rognstad, R., D. G. Clark und J. Katz (1974). *Pathways of glyceride glycerol synthesis*. *Biochem J* 140(2): 249-251.
- Roseboom, T., S. de Rooij und R. Painter (2006). *The Dutch famine and its long-term consequences for adult health*. *Early Hum Dev* 82(8): 485-491.
- Roseboom, T. J., J. H. van der Meulen, C. Osmond, D. J. Barker, A. C. Ravelli und O. P. Bleker (2000). *Plasma lipid profiles in adults after prenatal exposure to the Dutch famine*. *Am J Clin Nutr* 72(5): 1101-1106.
- Roseboom, T. J., J. H. van der Meulen, A. C. Ravelli, C. Osmond, D. J. Barker und O. P. Bleker (2001). *Effects of prenatal exposure to the Dutch famine on adult disease in later life: an overview*. *Mol Cell Endocrinol* 185(1-2): 93-98.
- Rotondo, F., A. C. Ho-Palma, X. Remesar, J. A. Fernández-López, M. d. M. Romero und M. Alemany (2017). *Glycerol is synthesized and secreted by adipocytes to dispose of excess glucose, via glycerogenesis and increased acyl-glycerol turnover*. *Scientific Reports* 7(1): 8983.
- Ruess, L. und P. M. Chamberlain (2010). *The fat that matters: Soil food web analysis using fatty acids and their carbon stable isotope signature*. *Soil Biology and Biochemistry* 42(11): 1898-1910.
- Salo, V. T., S. Li, H. Vihinen, M. Hölttä-Vuori, A. Szkalicity, P. Horvath, I. Belevich, J. Peränen, C. Thiele, P. Somerharju et al. (2019). *Seipin Facilitates Triglyceride Flow to Lipid Droplet and Counteracts Droplet Ripening via Endoplasmic Reticulum Contact*. *Dev Cell* 50(4): 478-493.e479.
- Salway, J. G. (2004). *Metabolism at a glance*. Malden, Mass., Blackwell Pub.

- Sammut, M., S. J. Cook, K. C. Q. Nguyen, T. Felton, D. H. Hall, S. W. Emmons, R. J. Poole und A. Barrios (2015). *Glia-derived neurons are required for sex-specific learning in C. elegans*. Nature 526(7573): 385-390.
- Samuel, T. K., J. W. Sinclair, K. L. Pinter und I. Hamza (2014). *Culturing Caenorhabditis elegans in axenic liquid media and creation of transgenic worms by microparticle bombardment*. J Vis Exp(90): e51796.
- Sankaranarayananpillai, M., N. Zhang, K. A. Baggerly und J. G. Gelovani (2013). *Metabolic shifts induced by fatty acid synthase inhibitor orlistat in non-small cell lung carcinoma cells provide novel pharmacodynamic biomarkers for positron emission tomography and magnetic resonance spectroscopy*. Mol Imaging Biol 15(2): 136-147.
- Sarda, S., J. Zeng, B. G. Hunt und S. V. Yi (2012). *The evolution of invertebrate gene body methylation*. Mol Biol Evol 29(8): 1907-1916.
- Sartore, G., A. Lapolla, R. Reitano, S. Zambon, G. Romanato, R. Marin, C. Cosma, E. Manzato und D. Fedele (2008). *Desaturase activities and metabolic control in type 2 diabetes*. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids 79(1-2): 55-58.
- Satouchi, K., K. Hirano, M. Sakaguchi, H. Takehara und F. Matsuura (1993). *Phospholipids from the free-living nematode Caenorhabditis elegans*. Lipids 28(9): 837-840.
- Schafer, W. F. (2006). *Genetics of egg-laying in worms*. Annu Rev Genet 40: 487-509.
- Scharf, A., F. Pohl, B. M. Egan, Z. Kocsisova und K. Kornfeld (2021). *Reproductive Aging in Caenorhabditis elegans: From Molecules to Ecology*. Frontiers in cell and developmental biology 9: 718522-718522.
- Scheel, J., J. Srinivasan, U. Honnert, A. Henske und T. V. Kurzchalia (1999). *Involvement of caveolin-1 in meiotic cell-cycle progression in Caenorhabditis elegans*. Nat Cell Biol 1(2): 127-129.
- Schindler, A. J., L. R. Baugh und D. R. Sherwood (2014). *Identification of Late Larval Stage Developmental Checkpoints in Caenorhabditis elegans Regulated by Insulin/IGF and Steroid Hormone Signaling Pathways*. PLOS Genetics 10(6): e1004426.
- Schlotterer, A., G. Kukudov, F. Bozorgmehr, H. Hutter, X. Du, D. Oikonomou, Y. Ibrahim, F. Pfisterer, N. Rabbani, P. Thornalley et al. (2009). *C. elegans as model for the study of high glucose-mediated life span reduction*. Diabetes 58(11): 2450-2456.
- Schlotterer, A., F. Pfisterer, G. Kukudov, B. Heckmann, D. Henriquez, C. Morath, B. K. Krämer, H.-P. Hammes, V. Schwenger und M. Morcos (2018). *Neuronal damage and shortening of lifespan in C. elegans by peritoneal dialysis fluid: Protection by glyoxalase-1*. Biomedical reports 8(6): 540-546.
- Schmeisser, K., J. Mansfeld, D. Kuhlow, S. Weimer, S. Priebe, I. Heiland, M. Birringer, M. Groth, A. Segref, Y. Kanfi et al. (2013a). *Role of sirtuins in lifespan regulation is linked to methylation of nicotinamide*. Nat Chem Biol 9(11): 693-700.
- Schmeisser, S., S. Priebe, M. Groth, S. Monajembashi, P. Hemmerich, R. Guthke, M. Platzer und M. Ristow (2013b). *Neuronal ROS signaling rather than AMPK/sirtuin-mediated energy sensing links dietary restriction to lifespan extension*. Mol Metab 2(2): 92-102.
- Schroeder, L. K., S. Kremer, M. J. Kramer, E. Currie, E. Kwan, J. L. Watts, A. L. Lawrenson und G. J. Hermann (2007). *Function of the Caenorhabditis elegans ABC transporter PGP-2 in the biogenesis of a lysosome-related fat storage organelle*. Mol Biol Cell 18(3): 995-1008.

- Schultz, C. L., A. Wamuch, O. V. Tsyusko, J. M. Unrine, A. Crossley, C. Svendsen und D. J. Spurgeon (2016). *Multigenerational exposure to silver ions and silver nanoparticles reveals heightened sensitivity and epigenetic memory in Caenorhabditis elegans*. Proc Biol Sci 283(1832).
- Schulz, L. C. (2010). *The Dutch Hunger Winter and the developmental origins of health and disease*. Proceedings of the National Academy of Sciences 107(39): 16757-16758.
- Schulz, T. J., K. Zarse, A. Voigt, N. Urban, M. Birringer und M. Ristow (2007). *Glucose restriction extends Caenorhabditis elegans life span by inducing mitochondrial respiration and increasing oxidative stress*. Cell Metab 6(4): 280-293.
- Scully, T., A. Ettela, D. LeRoith und E. J. Gallagher (2021). *Obesity, Type 2 Diabetes, and Cancer Risk*. Frontiers in Oncology 10.
- Seidel, H. S. und J. Kimble (2011). *The oogenic germline starvation response in C. elegans*. PLoS One 6(12): e28074.
- Senchuk, M. M., D. J. Dues und J. M. Van Raamsdonk (2017). *Measuring Oxidative Stress in Caenorhabditis elegans: Paraquat and Juglone Sensitivity Assays*. Bio Protoc 7(1).
- Seo, Y., S. Kingsley, G. Walker, M. A. Mondoux und H. A. Tissenbaum (2018). *Metabolic shift from glycogen to trehalose promotes lifespan and healthspan in Caenorhabditis elegans*. Proc Natl Acad Sci U S A 115(12): E2791-e2800.
- Setoyama, O. (2020). *Effect of high glucose concentration on aging and glycation in Caenorhabditis elegans*. Int J Anal Bio-Sci Vol 8(3).
- Settembre, C., R. De Cegli, G. Mansueto, P. K. Saha, F. Vetrini, O. Visvikis, T. Huynh, A. Carissimo, D. Palmer, T. J. Klischet *al.* (2013). *TFEB controls cellular lipid metabolism through a starvation-induced autoregulatory loop*. Nat Cell Biol 15(6): 647-658.
- Seymour, M. K., K. A. Wright und C. C. Doncaster (1983). *The action of the anterior feeding apparatus of Caenorhabditis elegans (Nematoda: Rhabditida)*. Journal of Zoology 201(4): 527-539.
- Sharma, U., C. C. Conine, J. M. Shea, A. Boskovic, A. G. Derr, X. Y. Bing, C. Belleannee, A. Kucukural, R. W. Serra, F. Sunet *al.* (2016). *Biogenesis and function of tRNA fragments during sperm maturation and fertilization in mammals*. Science 351(6271): 391-396.
- Shen, P., Y. Yue und Y. Park (2018). *A living model for obesity and aging research: Caenorhabditis elegans*. Crit Rev Food Sci Nutr 58(5): 741-754.
- Sheng, M., A. Hosseinzadeh, S. V. Muralidharan, R. Gaur, E. Selstam und S. Tuck (2015). *Aberrant fat metabolism in Caenorhabditis elegans mutants with defects in the defecation motor program*. PLoS One 10(4): e0124515.
- Shi, X., J. Li, X. Zou, J. Greggain, S. V. Rodkaer, N. J. Faergeman, B. Liang und J. L. Watts (2013). *Regulation of lipid droplet size and phospholipid composition by stearoyl-CoA desaturase*. J Lipid Res 54(9): 2504-2514.
- Shi, X., P. Tarazona, T. J. Brock, J. Browse, I. Feussner und J. L. Watts (2016). *A Caenorhabditis elegans model for ether lipid biosynthesis and function*. J Lipid Res 57(2): 265-275.
- Shin, H. R. und R. Zoncu (2020). *The Lysosome at the Intersection of Cellular Growth and Destruction*. Dev Cell 54(2): 226-238.

- Shin, M.-G., J.-W. Lee, J.-S. Han, B. Lee, J.-H. Jeong, S.-H. Park, J.-H. Kim, S. Jang, M. Park, S.-Y. Kim et al. (2020). *Bacteria-derived metabolite, methylglyoxal, modulates the longevity of *C. elegans* through TORC2/SGK-1/DAF-16 signaling*. Proceedings of the National Academy of Sciences 117(29): 17142-17150.
- Shinde, A. B., A. Song und Q. A. Wang (2021). *Brown Adipose Tissue Heterogeneity, Energy Metabolism, and Beyond*. Frontiers in Endocrinology 12.
- Simopoulos, A. P. (2004). *Omega-6/Omega-3 Essential Fatty Acid Ratio and Chronic Diseases*. Food Reviews International 20(1): 77-90.
- Simopoulos, A. P. (2010). *The omega-6/omega-3 fatty acid ratio: health implications*. OCL 17(5): 267-275.
- Simpson, V. J., T. E. Johnson und R. F. Hammen (1986). *Caenorhabditis elegans DNA does not contain 5-methylcytosine at any time during development or aging*. Nucleic Acids Res 14(16): 6711-6719.
- Singh, S., M. L. Ricardo-Silgado, S. J. Bielinski und A. Acosta (2021). *Pharmacogenomics of Medication-Induced Weight Gain and Antiobesity Medications*. Obesity (Silver Spring) 29(2): 265-273.
- Sjöström, L., A. Rissanen, T. Andersen, M. Boldrin, A. Golay, H. P. Koppeschaar und M. Krempf (1998). *Randomised placebo-controlled trial of orlistat for weight loss and prevention of weight regain in obese patients. European Multicentre Orlistat Study Group*. Lancet 352(9123): 167-172.
- Skinner, M. K. (2008). *What is an epigenetic transgenerational phenotype? F3 or F2*. Reprod Toxicol 25(1): 2-6.
- Skinner, M. K. (2014). *Endocrine Disruptor Induction of Epigenetic Transgenerational Inheritance of Disease*. Mol Cell Endocrinol 398(0): 4-12.
- Skvortsova, K., N. Iovino und O. Bogdanović (2018). *Functions and mechanisms of epigenetic inheritance in animals*. Nature Reviews Molecular Cell Biology 19(12): 774-790.
- Smil, V. (1999). *China's great famine: 40 years later*. Bmj 319(7225): 1619-1621.
- Smith, C. A. (1947). *The effect of wartime starvation in Holland upon pregnancy and its product*. Am J Obstet Gynecol 53(4): 599-608.
- Smith, E. D., T. L. Kaeberlein, B. T. Lydum, J. Sager, K. L. Welton, B. K. Kennedy und M. Kaeberlein (2008). *Age- and calorie-independent life span extension from dietary restriction by bacterial deprivation in Caenorhabditis elegans*. BMC Dev Biol 8: 49.
- So, S., K. Miyahara und Y. Ohshima (2011). *Control of body size in C. elegans dependent on food and insulin/IGF-1 signal*. Genes Cells 16(6): 639-651.
- Solis, G. M. und M. Petrascheck (2011). *Measuring Caenorhabditis elegans life span in 96 well microtiter plates*. J Vis Exp(49).
- Soukas, A. A., E. A. Kane, C. E. Carr, J. A. Melo und G. Ruvkun (2009). *Rictor/TORC2 regulates fat metabolism, feeding, growth, and life span in Caenorhabditis elegans*. Genes Dev 23(4): 496-511.
- Spanier, B., K. Lasch, S. Marsch, J. Benner, W. Liao, H. Hu, H. Kienberger, W. Eisenreich und H. Daniel (2009). *How the intestinal peptide transporter PEPT-1 contributes to an obesity phenotype in Caenorhabditis elegans*. PLoS One 4(7): e6279.

- Spanier, B., A. Laurençon, A. Weiser, N. Pujol, S. Omi, A. Barsch, A. Korf, S. W. Meyer, J. J. Ewbank, F. Paladino *et al.* (2021). *Comparison of lipidome profiles of Caenorhabditis elegans—results from an inter-laboratory ring trial*. *Metabolomics : Official journal of the Metabolomic Society* 17(3): 25-25.
- Srinivasan, S. (2015). *Regulation of body fat in Caenorhabditis elegans*. *Annu Rev Physiol* 77: 161-178.
- Srinivasan, S., L. Sadegh, I. C. Elle, A. G. Christensen, N. J. Faergeman und K. Ashrafi (2008). *Serotonin regulates C. elegans fat and feeding through independent molecular mechanisms*. *Cell Metab* 7(6): 533-544.
- Stegeman, G. W., D. Medina, A. D. Cutter und W. S. Ryu (2019). *Neuro-genetic plasticity of Caenorhabditis elegans behavioral thermal tolerance*. *BMC neuroscience* 20(1): 26-26.
- Stegemann, R. und D. A. Buchner (2015). *Transgenerational Inheritance of Metabolic Disease*. *Semin Cell Dev Biol* 43: 131-140.
- Stein, K. K. und A. Golden (2018). *The C. elegans eggshell*. *WormBook* 2018: 1-36.
- Stiernagle, T. (2006). *Maintenance of C. elegans*. *WormBook*: 1-11.
- Stuhr, N. L. und S. P. Curran (2020). *Bacterial diets differentially alter lifespan and healthspan trajectories in C. elegans*. *Communications Biology* 3(1): 653.
- Sulston, J. und J. Hodgkin (1988). *The nematode Caenorhabditis elegans*.
- Sulston, J. E. und S. Brenner (1974). *The DNA of Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 77(1): 95-104.
- Sulston, J. E., E. Schierenberg, J. G. White und J. N. Thomson (1983). *The embryonic cell lineage of the nematode Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol* 100(1): 64-119.
- Sutphin, G. L. und M. Kaeberlein (2008). *Dietary restriction by bacterial deprivation increases life span in wild-derived nematodes*. *Exp Gerontol* 43(3): 130-135.
- Suzuki, M., Y. Shinohara, Y. Ohsaki und T. Fujimoto (2011). *Lipid droplets: size matters*. *J Electron Microsc (Tokyo)* 60 Suppl 1: S101-116.
- Svensk, E., R. Devkota, M. Ståhlman, P. Ranji, M. Rauthan, F. Magnusson, S. Hammarsten, M. Johansson, J. Borén und M. Pilon (2016). *Correction: Caenorhabditis elegans PAQR-2 and IGLR-2 Protect against Glucose Toxicity by Modulating Membrane Lipid Composition*. *PLoS Genet* 12(6): e1006112.
- Sze, J. Y., M. Victor, C. Loer, Y. Shi und G. Ruvkun (2000). *Food and metabolic signalling defects in a Caenorhabditis elegans serotonin-synthesis mutant*. *Nature* 403(6769): 560-564.
- Szeto, S. S., S. N. Reinke und B. D. Lemire (2011). *(1)H NMR-based metabolic profiling reveals inherent biological variation in yeast and nematode model systems*. *J Biomol NMR* 49(3-4): 245-254.
- Szewczyk, N. J., E. Kozak und C. A. Conley (2003). *Chemically defined medium and Caenorhabditis elegans*. *BMC Biotechnol* 3: 19.
- Szewczyk, N. J., I. A. Udranszky, E. Kozak, J. Sunga, S. K. Kim, L. A. Jacobson und C. A. Conley (2006). *Delayed development and lifespan extension as features of metabolic lifestyle alteration in C. elegans under dietary restriction*. *J Exp Biol* 209(Pt 20): 4129-4139.
- Tain, L. S., E. Lozano, A. G. Sáez und A. M. Leroi (2008). *Dietary regulation of hypodermal polyploidization in C. elegans*. *BMC Dev Biol* 8: 28.

- Tanaka, T., K. Ikita, T. Ashida, Y. Motoyama, Y. Yamaguchi und K. Satouchi (1996). *Effects of growth temperature on the fatty acid composition of the free-living nematode Caenorhabditis elegans*. *Lipids* 31(11): 1173-1178.
- Tang, L. L., X. H. Tang, X. Li, H. B. Yu, Z. G. Xie, X. Y. Liu und Z. G. Zhou (2014). *Effect of high-fat or high-glucose diet on obesity and visceral adipose tissue in mice*. *Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao* 36(6): 614-619.
- Tauchi-Sato, K., S. Ozeki, T. Houjou, R. Taguchi und T. Fujimoto (2002). *The surface of lipid droplets is a phospholipid monolayer with a unique Fatty Acid composition*. *J Biol Chem* 277(46): 44507-44512.
- Tauffenberger, A. und J. A. Parker (2014). *Heritable Transmission of Stress Resistance by High Dietary Glucose in Caenorhabditis elegans*. *PLoS Genet* 10(5).
- Tauffenberger, A., A. Vaccaro, A. Aulas, C. V. Velde und J. A. Parker (2012). *Glucose delays age-dependent proteotoxicity*. *Aging Cell* 11(5): 856-866.
- Tauffenberger, A., A. Vaccaro und J. A. Parker (2016). *Fragile lifespan expansion by dietary mitohormesis in C. elegans*. *Aging (Albany NY)* 8(1): 50-61.
- Tcherepanova, I., L. Bhattacharyya, C. S. Rubin und J. H. Freedman (2000). *Aspartic proteases from the nematode Caenorhabditis elegans. Structural organization and developmental and cell-specific expression of asp-1*. *J Biol Chem* 275(34): 26359-26369.
- Te Morenga, L. A., A. J. Howatson, R. M. Jones und J. Mann (2014). *Dietary sugars and cardiometabolic risk: systematic review and meta-analyses of randomized controlled trials of the effects on blood pressure and lipids*. *Am J Clin Nutr* 100(1): 65-79.
- Teshiba, E., K. Miyahara und H. Takeya (2016). *Glucose-induced abnormal egg-laying rate in Caenorhabditis elegans*. *Biosci Biotechnol Biochem* 80(7): 1436-1439.
- Tetreau, G., J. Dhinaut, B. Gourbal und Y. Moret (2019). *Trans-generational Immune Priming in Invertebrates: Current Knowledge and Future Prospects*. *Front Immunol* 10: 1938.
- Texada, M. J., A. Malita, C. F. Christensen, K. B. Dall, N. J. Faergeman, S. Nagy, K. A. Halberg und K. Rewitz (2019). *Autophagy-Mediated Cholesterol Trafficking Controls Steroid Production*. *Dev Cell* 48(5): 659-671.e654.
- Thornalley, P. J. (1994). *Methylglyoxal, glyoxalases and the development of diabetic complications*. *Amino Acids* 6(1): 15-23.
- Toker, I. A., I. Lev, Y. Mor, Y. Gurevich, D. Fisher, L. Hourri-Zeevi, O. Antonova, H. Doron, S. Anava, H. Gingold et al. (2022). *Transgenerational inheritance of sexual attractiveness via small RNAs enhances evolvability in C. elegans*. *Developmental Cell* 57(3): 298-309.e299.
- Trent, C., N. Tsuing und H. R. Horvitz (1983). *Egg-laying defective mutants of the nematode Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 104(4): 619-647.
- Truswell, A. S. (1994). *Food carbohydrates and plasma lipids--an update*. *Am J Clin Nutr* 59(3 Suppl): 710s-718s.
- Turner, J. und M. Crossley (1999). *Mammalian Krüppel-like transcription factors: more than just a pretty finger*. *Trends Biochem Sci* 24(6): 236-240.

- Tuscher, J. J. und J. J. Day (2019). *Multigenerational epigenetic inheritance: One step forward, two generations back*. *Neurobiol Dis* 132: 104591.
- Uller, T. (2008). *Developmental plasticity and the evolution of parental effects*. *Trends Ecol Evol* 23(8): 432-438.
- Unger, R. H. und P. E. Scherer (2010). *Gluttony, sloth and the metabolic syndrome: a roadmap to lipotoxicity*. *Trends Endocrinol Metab* 21(6): 345-352.
- Uribarri, J. und K. R. Tuttle (2006). *Advanced glycation end products and nephrotoxicity of high-protein diets*. *Clin J Am Soc Nephrol* 1(6): 1293-1299.
- Valdes, V. J., A. Athie, L. S. Salinas, R. E. Navarro und L. Vaca (2012). *CUP-1 is a novel protein involved in dietary cholesterol uptake in *Caenorhabditis elegans**. *PLoS One* 7(3): e33962.
- van Abeelen, A. F., S. G. Elias, T. J. Roseboom, P. M. Bossuyt, Y. T. van der Schouw, D. E. Grobbee und C. S. Uiterwaal (2012). *Postnatal acute famine and risk of overweight: the dutch hungerwinter study*. *Int J Pediatr* 2012: 936509.
- Van Cann, J., E. Koskela, T. Mappes, A. Sims und P. C. Watts (2019). *Intergenerational fitness effects of the early life environment in a wild rodent*. *J Anim Ecol* 88(9): 1355-1365.
- Van Gaal, L. F., J. I. Broom, G. Enzi und H. Toplak (1998). *Efficacy and tolerability of orlistat in the treatment of obesity: a 6-month dose-ranging study*. *Orlistat Dose-Ranging Study Group*. *Eur J Clin Pharmacol* 54(2): 125-132.
- Van Gilst, M. R., H. Hadjivassiliou, A. Jolly und K. R. Yamamoto (2005a). *Nuclear hormone receptor NHR-49 controls fat consumption and fatty acid composition in *C. elegans**. *PLoS Biol* 3(2): e53.
- Van Gilst, M. R., H. Hadjivassiliou und K. R. Yamamoto (2005b). *A *Caenorhabditis elegans* nutrient response system partially dependent on nuclear receptor NHR-49*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(38): 13496-13501.
- van Meer, G., D. R. Voelker und G. W. Feigenson (2008). *Membrane lipids: where they are and how they behave*. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 9(2): 112-124.
- Van Veldhoven, P. P. (2010). *Biochemistry and genetics of inherited disorders of peroxisomal fatty acid metabolism[S]*. *Journal of Lipid Research* 51(10): 2863-2895.
- Vanfleteren, J. R. (1974). *Nematode growth factor*. *Nature* 248(445): 255-257.
- Vellai, T., K. Takacs-Vellai, Y. Zhang, A. L. Kovacs, L. Orosz und F. Müller (2003). *Genetics: influence of TOR kinase on lifespan in *C. elegans**. *Nature* 426(6967): 620.
- Verheijen, M., M. Lienhard, Y. Schrooders, O. Clayton, R. Nudischer, S. Boerno, B. Timmermann, N. Selevsek, R. Schlapbach, H. Gmuenderet *al.* (2019). *DMSO induces drastic changes in human cellular processes and epigenetic landscape in vitro*. *Sci Rep* 9(1): 4641.
- Vickers, M. H. (2014). *Early life nutrition, epigenetics and programming of later life disease*. *Nutrients* 6(6): 2165-2178.
- Vieira, A. F. C., M. A. Xatse, H. Tifeki, C. Diot, A. J. M. Walhout und C. P. Olsen (2022). *Monomethyl branched-chain fatty acids are critical for *Caenorhabditis elegans* survival in elevated glucose conditions*. *Journal of Biological Chemistry* 298(2): 101444.



- Vowels, J. J. und J. H. Thomas (1992). *Genetic analysis of chemosensory control of dauer formation in Caenorhabditis elegans*. Genetics 130(1): 105-123.
- Vrablik, T. L., V. A. Petyuk, E. M. Larson, R. D. Smith und J. L. Watts (2015). *Lipidomic and proteomic analysis of Caenorhabditis elegans lipid droplets and identification of ACS-4 as a lipid droplet-associated protein*. Biochim Biophys Acta 1851(10): 1337-1345.
- Vrablik, T. L. und J. L. Watts (2013). *Polyunsaturated fatty acid derived signaling in reproduction and development: insights from Caenorhabditis elegans and Drosophila melanogaster*. Molecular reproduction and development 80(4): 244-259.
- Waddington, C. H. (1953). *Genetic assimilation of an acquired character*. Evolution: 118-126.
- Wadsworth, W. G. und D. L. Riddle (1989). *Developmental regulation of energy metabolism in Caenorhabditis elegans*. Dev Biol 132(1): 167-173.
- Wagner, A. (2020). *Untersuchungen zum Einfluss der Futterbakteriendichte auf Fettgehalt und -verteilung in Caenorhabditis elegans*. Bachelor of Science. (unveröffentlichte Bachelorarbeit), Beuth Hochschule für Technik Berlin.
- Wählby, C., A. L. Conery, M. A. Bray, L. Kamentsky, J. Larkins-Ford, K. L. Sokolnicki, M. Veneskey, K. Michaels, A. E. Carpenter und E. J. O'Rourke (2014). *High- and low-throughput scoring of fat mass and body fat distribution in C. elegans*. Methods 68(3): 492-499.
- Walker, A. K., R. L. Jacobs, J. L. Watts, V. Rottiers, K. Jiang, D. M. Finnegan, T. Shioda, M. Hansen, F. Yang, L. J. Niebergall et al. (2011). *A conserved SREBP-1/phosphatidylcholine feedback circuit regulates lipogenesis in metazoans*. Cell 147(4): 840-852.
- Walker, A. K., F. Yang, K. Jiang, J. Y. Ji, J. L. Watts, A. Purushotham, O. Boss, M. L. Hirsch, S. Ribich, J. J. Smith et al. (2010). *Conserved role of SIRT1 orthologs in fasting-dependent inhibition of the lipid/cholesterol regulator SREBP*. Genes Dev 24(13): 1403-1417.
- Walker, D. M. und E. J. Nestler (2018). *Neuroepigenetics and addiction*. Handb Clin Neurol 148: 747-765.
- Wallis, J. G., J. L. Watts und J. Browse (2002). *Polyunsaturated fatty acid synthesis: what will they think of next?* Trends Biochem Sci 27(9): 467.
- Walther, T. C. und R. V. Farese, Jr. (2012). *Lipid droplets and cellular lipid metabolism*. Annu Rev Biochem 81: 687-714.
- Wan, Q.-L., X. Meng, C. Wang, W. Dai, Z. Luo, Z. Yin, Z. Ju, X. Fu, J. Yang, Q. Ye et al. (2022). *Histone H3K4me3 modification is a transgenerational epigenetic signal for lipid metabolism in Caenorhabditis elegans*. Nature Communications 13(1): 768.
- Wan, Q.-L., Z.-L. Yang, X.-G. Zhou, A.-J. Ding, Y.-Z. Pu, H.-R. Luo und G.-S. Wu (2019). *The Effects of Age and Reproduction on the Lipidome of Caenorhabditis elegans*. Oxidative medicine and cellular longevity 2019: 5768953-5768953.
- Wan, Q. L., X. Meng, W. Dai, Z. Luo, C. Wang, X. Fu, J. Yang, Q. Ye und Q. Zhou (2021). *N(6)-methyldeoxyadenine and histone methylation mediate transgenerational survival advantages induced by hormetic heat stress*. Sci Adv 7(1).
- Wang, C., C. Xia, Y. Zhu und H. Zhang (2021). *Innovative fluorescent probes for in vivo visualization of biomolecules in living Caenorhabditis elegans*. Cytometry Part A 99(6): 560-574.

- Wang, J. und S. K. Kim (2003). *Global analysis of dauer gene expression in Caenorhabditis elegans*. Development 130(8): 1621-1634.
- Wang, L., F. Xu, G. Wang, X. Wang, A. Liang, H. Huang und F. Sun (2016). *C30F12.4 influences oogenesis, fat metabolism, and lifespan in C. elegans*. Protein Cell 7(10): 714-721.
- Wang, M. C., E. J. O'Rourke und G. Ruvkun (2008). *Fat metabolism links germline stem cells and longevity in C. elegans*. Science 322(5903): 957-960.
- Wang, T., C. C. Hung und D. J. Randall (2006). *The comparative physiology of food deprivation: from feast to famine*. Annu Rev Physiol 68: 223-251.
- Wang, X., X. Wang, L. Li und D. Wang (2010). *Lifespan extension in Caenorhabditis elegans by DMSO is dependent on sir-2.1 and daf-16*. Biochem Biophys Res Commun 400(4): 613-618.
- Wang, X., L. Zhang, L. Zhang, W. Wang, S. Wei, J. Wang, H. Che und Y. Zhang (2020). *Effects of excess sugars and lipids on the growth and development of Caenorhabditis elegans*. Genes Nutr 15: 1.
- Watts, J. L. (2009). *Fat synthesis and adiposity regulation in Caenorhabditis elegans*. Trends Endocrinol Metab 20(2): 58-65.
- Watts, J. L. (2016). *Using Caenorhabditis elegans to Uncover Conserved Functions of Omega-3 and Omega-6 Fatty Acids*. J Clin Med 5(2).
- Watts, J. L. und J. Browse (2002). *Genetic dissection of polyunsaturated fatty acid synthesis in Caenorhabditis elegans*. Proc Natl Acad Sci U S A 99(9): 5854-5859.
- Watts, J. L., E. Phillips, K. R. Griffing und J. Browse (2003). *Deficiencies in C20 polyunsaturated fatty acids cause behavioral and developmental defects in Caenorhabditis elegans fat-3 mutants*. Genetics 163(2): 581-589.
- Watts, J. L. und M. Ristow (2017). *Lipid and Carbohydrate Metabolism in Caenorhabditis elegans*. Genetics 207(2): 413-446.
- Webster, C. M., E. C. Pino, C. E. Carr, L. Wu, B. Zhou, L. Cedillo, M. C. Kacergis, S. P. Curran und A. A. Soukas (2017). *Genome-wide RNAi Screen for Fat Regulatory Genes in C. elegans Identifies a Proteostasis-AMPK Axis Critical for Starvation Survival*. Cell Rep 20(3): 627-640.
- Weeks, J. C., K. J. Robinson, B. Wanjeri, P. F. Copenhaver und W. M. Roberts (2016). *Microfluidic EPG recordings show striking pharyngeal pumping phenotype in a C. elegans Alzheimer's disease model*. MicroPubl Biol 2016.
- Wei, C.-C., P.-L. Yen, A. Chaikritsakarn, C.-W. Huang, C.-H. Chang und V. H.-C. Liao (2020). *Parental CuO nanoparticles exposure results in transgenerational toxicity in Caenorhabditis elegans associated with possible epigenetic regulation*. Ecotoxicology and Environmental Safety 203: 111001.
- Weinhouse, C., L. Truong, J. N. Meyer und P. Allard (2018). *Caenorhabditis elegans as an emerging model system in environmental epigenetics*. Environmental and molecular mutagenesis 59(7): 560-575.
- Wenzel, D., F. Palladino und M. Jedrusik-Bode (2011). *Epigenetics in C. elegans: facts and challenges*. Genesis 49(8): 647-661.

- Whitaker, R., M. P. Gil, F. Ding, M. Tatar, S. L. Helfand und N. Neretti (2014). *Dietary switch reveals fast coordinated gene expression changes in Drosophila melanogaster*. Aging (Albany NY) 6(5): 355-368.
- White, J. (1988). *The anatomy*. The Nematode *Caenorhabditis elegans*: 81-122.
- Whyte, K., H. Kelly, V. O'Dwyer, M. Gibbs, A. O'Higgins und M. J. Turner (2013). *Offspring birth weight and maternal fasting lipids in women screened for gestational diabetes mellitus (GDM)*. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 170(1): 67-70.
- Wilfling, F., H. Wang, J. T. Haas, N. Kraemer, T. J. Gould, A. Uchida, J. X. Cheng, M. Graham, R. Christiano, F. Fröhlich et al. (2013). *Triacylglycerol synthesis enzymes mediate lipid droplet growth by relocating from the ER to lipid droplets*. Dev Cell 24(4): 384-399.
- Williams, L., Y. Seki, P. M. Vuguin und M. J. Charron (2014). *Animal models of in utero exposure to a high fat diet: a review*. Biochim Biophys Acta 1842(3): 507-519.
- Willis, A. R., W. Zhao, R. Sukhdeo, L. Wadi, H. T. El Jarkass, J. M. Claycomb und A. W. Reinke (2021). *A parental transcriptional response to microsporidia infection induces inherited immunity in offspring*. Sci Adv 7(19).
- Win, M. T., Y. Yamamoto, S. Munesue, D. Han, S. Harada und H. Yamamoto (2013). *Validated Liquid Culture Monitoring System for Lifespan Extension of Caenorhabditis elegans through Genetic and Dietary Manipulations*. Aging Dis 4(4): 178-185.
- Witting, M. und P. Schmitt-Kopplin (2016). *The Caenorhabditis elegans lipidome: A primer for lipid analysis in Caenorhabditis elegans*. Arch Biochem Biophys 589: 27-37.
- Wood, J. G., B. Rogina, S. Lavu, K. Howitz, S. L. Helfand, M. Tatar und D. Sinclair (2004). *Sirtuin activators mimic caloric restriction and delay ageing in metazoans*. Nature 430(7000): 686-689.
- World Health Organization (2021). *Fact sheets: Obesity and overweight*.
- Xiong, H., C. Pears und A. Woollard (2017). *An enhanced C. elegans based platform for toxicity assessment*. Scientific Reports 7(1): 9839.
- Xu, M., H. J. Joo und Y. K. Paik (2011). *Novel functions of lipid-binding protein 5 in Caenorhabditis elegans fat metabolism*. J Biol Chem 286(32): 28111-28118.
- Xu, N., S. O. Zhang, R. A. Cole, S. A. McKinney, F. Guo, J. T. Haas, S. Bobba, R. V. Farese, Jr. und H. Y. Mak (2012a). *The FATP1-DGAT2 complex facilitates lipid droplet expansion at the ER-lipid droplet interface*. J Cell Biol 198(5): 895-911.
- Xu, X., P. Gopalacharyulu, T. Seppänen-Laakso, A. L. Ruskeepää, C. C. Aye, B. P. Carson, S. Mora, M. Orešič und A. A. Teleanu (2012b). *Insulin signaling regulates fatty acid catabolism at the level of CoA activation*. PLoS Genet 8(1): e1002478.
- Yang, F., B. W. Vought, J. S. Satterlee, A. K. Walker, Z. Y. Jim Sun, J. L. Watts, R. DeBeaumont, R. M. Saito, S. G. Hyberts, S. Yanget et al. (2006). *An ARC/Mediator subunit required for SREBP control of cholesterol and lipid homeostasis*. Nature 442(7103): 700-704.
- Yang, L., Y. Ding, Y. Chen, S. Zhang, C. Huo, Y. Wang, J. Yu, P. Zhang, H. Na, H. Zhanget et al. (2012). *The proteomics of lipid droplets: structure, dynamics, and functions of the organelle conserved from bacteria to humans*. Journal of lipid research 53(7): 1245-1253.

- Yang, W., T. Kelly und J. He (2007). *Genetic epidemiology of obesity*. *Epidemiol Rev* 29: 49-61.
- Yen, K., T. T. Le, A. Bansal, S. D. Narasimhan, J. X. Cheng und H. A. Tissenbaum (2010). *A comparative study of fat storage quantitation in nematode *Caenorhabditis elegans* using label and label-free methods*. *PLoS One* 5(9).
- Yochem, J., S. Tuck, I. Greenwald und M. Han (1999). *A gp330/megalin-related protein is required in the major epidermis of *Caenorhabditis elegans* for completion of molting*. *Development* 126(3): 597-606.
- Yohn, N. L., M. S. Bartolomei und J. A. Blendy (2015). *Multigenerational and Transgenerational Inheritance of Drug Exposure: The effects of alcohol, opiates, cocaine, marijuana, and nicotine*. *Prog Biophys Mol Biol* 118(0): 21-33.
- Yokoyama, I., O. Setoyama, A. Urakawa, M. Sugawara, Y. Jia, Y. Komiya, J. Nagasao und K. Arihara (2021). *Lysine-glucose Maillard reaction products promote longevity and stress tolerance in *Caenorhabditis elegans* via the insulin/IGF-1 signaling pathway*. *Journal of Functional Foods* 87: 104750.
- Yoon, D. S., M. H. Lee und D. S. Cha (2018). *Measurement of Intracellular ROS in *Caenorhabditis elegans* Using 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein Diacetate*. *Bio Protoc* 8(6).
- Young, S. G. und R. Zechner (2013). *Biochemistry and pathophysiology of intravascular and intracellular lipolysis*. *Genes Dev* 27(5): 459-484.
- Yu, C. W. und V. H. Liao (2016). *Transgenerational Reproductive Effects of Arsenite Are Associated with H3K4 Dimethylation and SPR-5 Downregulation in *Caenorhabditis elegans**. *Environ Sci Technol* 50(19): 10673-10681.
- Yuan, Y., C. Kadiyala, T.-T. Ching, P. Hakimi, S. Saha, H. Xu, C. Yuan, V. Mullangi, L. Wang, E. Fivenson et al. (2012). *Enhanced Energy Metabolism Contributes to the Extended Life Span of Calorie-restricted *Caenorhabditis elegans**. *The Journal of biological chemistry* 287: 31414-31426.
- Yue, Y., S. Li, P. Shen und Y. Park (2021). **Caenorhabditis elegans* as a model for obesity research*. *Curr Res Food Sci* 4: 692-697.
- Zarse, K., A. Bossecker, L. Muller-Kuhrt, K. Siems, M. A. Hernandez, W. G. Berendsohn, M. Birringer und M. Ristow (2011). *The phytochemical glaucarubinone promotes mitochondrial metabolism, reduces body fat, and extends lifespan of *Caenorhabditis elegans**. *Horm Metab Res* 43(4): 241-243.
- Zečić, A., I. Dhondt und B. P. Braeckman (2019). *The nutritional requirements of *Caenorhabditis elegans**. *Genes Nutr* 14: 15.
- Zehmer, J. K., Y. Huang, G. Peng, J. Pu, R. G. Anderson und P. Liu (2009). *A role for lipid droplets in inter-membrane lipid traffic*. *Proteomics* 9(4): 914-921.
- Zevian, S. C. und J. L. Yanowitz (2014). *Methodological considerations for heat shock of the nematode *Caenorhabditis elegans**. *Methods (San Diego, Calif.)* 68(3): 450-457.
- Zhang, B., R. Xiao, E. A. Ronan, Y. He, A.-L. Hsu, J. Liu und X. Z. S. Xu (2015). *Environmental Temperature Differentially Modulates *C. elegans* Longevity through a Thermosensitive TRP Channel*. *Cell reports* 11(9): 1414-1424.
- Zhang, J., R. Bakheet, R. S. Parhar, C. H. Huang, M. M. Hussain, X. Pan, S. S. Siddiqui und S. Hashmi (2011). *Regulation of fat storage and reproduction by Kruppel-like transcription factor KLF3 and fat-associated genes in *Caenorhabditis elegans**. *J Mol Biol* 411(3): 537-553.

- Zhang, M., S. H. Chung, C. Fang-Yen, C. Craig, R. A. Kerr, H. Suzuki, A. D. Samuel, E. Mazur und W. R. Schafer (2008). *A self-regulating feed-forward circuit controlling C. elegans egg-laying behavior*. *Curr Biol* 18(19): 1445-1455.
- Zhang, P., H. Na, Z. Liu, S. Zhang, P. Xue, Y. Chen, J. Pu, G. Peng, X. Huang, F. Yanget *al.* (2012). *Proteomic study and marker protein identification of Caenorhabditis elegans lipid droplets*. *Mol Cell Proteomics* 11(8): 317-328.
- Zhang, S. O., A. C. Box, N. Xu, J. Le Men, J. Yu, F. Guo, R. Trimble und H. Y. Mak (2010a). *Genetic and dietary regulation of lipid droplet expansion in Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(10): 4640-4645.
- Zhang, S. O., R. Trimble, F. Guo und H. Y. Mak (2010b). *Lipid droplets as ubiquitous fat storage organelles in C. elegans*. *BMC Cell Biol* 11: 96.
- Zhang, Y., X. Zhang, J. Shi, F. Tuorto, X. Li, Y. Liu, R. Liebers, L. Zhang, Y. Qu, J. Qianet *al.* (2018). *Dnmt2 mediates intergenerational transmission of paternally acquired metabolic disorders through sperm small non-coding RNAs*. *Nat Cell Biol* 20(5): 535-540.
- Zhang, Y., X. Zou, Y. Ding, H. Wang, X. Wu und B. Liang (2013). *Comparative genomics and functional study of lipid metabolic genes in Caenorhabditis elegans*. *BMC Genomics* 14: 164.
- Zhao, X., Y. Yang, D. H. Fitch und M. A. Herman (2002). *TLP-1 is an asymmetric cell fate determinant that responds to Wnt signals and controls male tail tip morphogenesis in C. elegans*. *Development* 129(6): 1497-1508.
- Zheng, J., C. Gao, M. Wang, P. Tran, N. Mai, J. W. Finley, S. B. Heymsfield, F. L. Greenway, Z. Li, D. Heberet *al.* (2017). *Lower Doses of Fructose Extend Lifespan in Caenorhabditis elegans*. *J Diet Suppl* 14(3): 264-277.
- Zheng, J. und F. L. Greenway (2012). *Caenorhabditis elegans as a model for obesity research*. *Int J Obes (Lond)* 36(2): 186-194.
- Zheng, J., F. L. Greenway, S. B. Heymsfield, W. D. Johnson, J. F. King, M. J. King, C. Gao, Y. F. Chu und J. W. Finley (2014). *Effects of three intense sweeteners on fat storage in the C. elegans model*. *Chem Biol Interact* 215: 1-6.
- Zheng, J., J. R. Vasselli, J. F. King, M. L. King, W. We, Z. Fitzpatrick, W. D. Johnson, J. W. Finley, R. J. Martin, M. J. Keenanet *al.* (2016). *Using Caenorhabditis elegans as a Model for Obesity Pharmacology Development*. *Am J Ther* 23(6): e1363-e1370.
- Zhou, X., J. Li, X. Zhang, C. Zhang, J. Bai, Y. Zhao, Y. Zhu, J. Zhang und X. Xiao (2021). *Bisphenol S promotes fat storage in multiple generations of Caenorhabditis elegans in a daf-16/nhr-49 dependent manner*. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 250: 109175.
- Zhu, C., C. B. Ji, C. M. Zhang, C. L. Gao, J. G. Zhu, D. N. Qin, C. Z. Kou, G. Z. Zhu, C. M. Shi und X. R. Guo (2010). *The lin-4 gene controls fat accumulation and longevity in Caenorhabditis elegans*. *Int J Mol Sci* 11(12): 4814-4825.
- Zhu, H. J. und A. W. Burgess (2001). *Regulation of transforming growth factor-beta signaling*. *Mol Cell Biol Res Commun* 4(6): 321-330.
- Zhu, X., Y. Liu, H. Zhang und P. Liu (2018). *Whole-genome RNAi screen identifies methylation-related genes influencing lipid metabolism in Caenorhabditis elegans*. *J Genet Genomics* 45(5): 259-272.



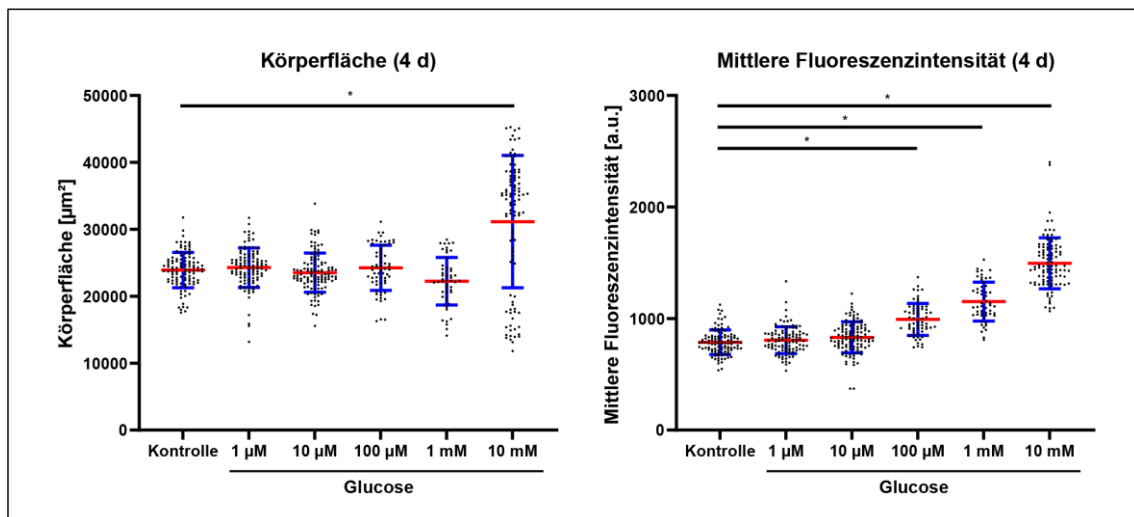
## Anhang

Im Folgenden sind ergänzende Daten der Nile Red-Färbungen und des Triglycerid-Assays dargestellt.

Die Daten der Nile Red-Färbungen zeigen die entsprechenden Körpergrößen und Fettgehalte der *C. elegans*-Gesamtpopulationen, von denen zuvor lediglich die selektierten Adulten gezeigt wurden.

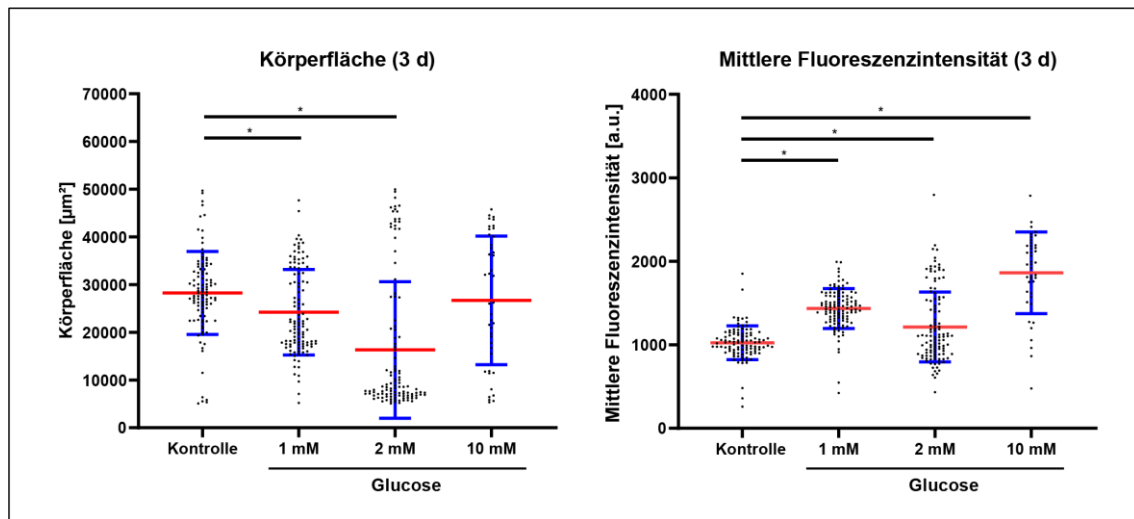
Die Daten des Triglycerid-Assays zeigen die gemessenen Gesamtglycerol- und freie Glycerolmengen unterschiedlich gefütterter *C. elegans*-Wildtypen, aus denen die Triglyceridgehalte berechnet wurden. Ergänzend zu den bereits gezeigten Daten sind die auf die Nematoden und die Proteinmengen bezogenen Gehalte dargestellt. Für die mehrgenerationalen Untersuchungen sind ebenfalls die entsprechenden gemessenen Gesamtglycerol- und freie Glycerolmengen dargestellt, von denen zuvor lediglich die daraus berechneten Triglyceridgehalte gezeigt wurden.

### Zu 4.1.2.2 Glucose-induzierte Fettgehaltserhöhung und Retardierung in *C. elegans*



**Diagramm 41: Effekte von Glucose auf die Körperfläche und den Fettgehalt von *C. elegans*-Wildtypen (N2) nach viertägiger Kultivierung.**

L1-Larven wurden mit 1x OP50 und 1  $\mu\text{M}$  – 10 mM Glucose für vier Tage (4 d) gefüttert. Nach der Nile Red-Färbung von fixierten Nematoden erfolgte die Bild-Aufnahme mit dem 5x-Luft-Objektiv ( $\text{NA} = 0,16$ ) des Opera Phenix (PerkinElmer) in einer Ebene bei  $\lambda_{\text{Ex}} = 522 \text{ nm}$  /  $\lambda_{\text{Em}} = 488 \text{ nm}$ . Die anschließende automatisierte Auswertung erfolgte mit der Software Harmony (PerkinElmer). Die Datenpunkte repräsentieren die Körperfläche pro Nematode und mittlere Fluoreszenzintensitäten pro Nematode (Körperfläche), angegeben in *arbitrary units* (a. u.), der Gesamtpopulation aus einem Versuch ( $N = 66 - 113$  Nematoden). Statistik: Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen, Kruskal Wallis-Test,  $*p \leq 0,05$ .

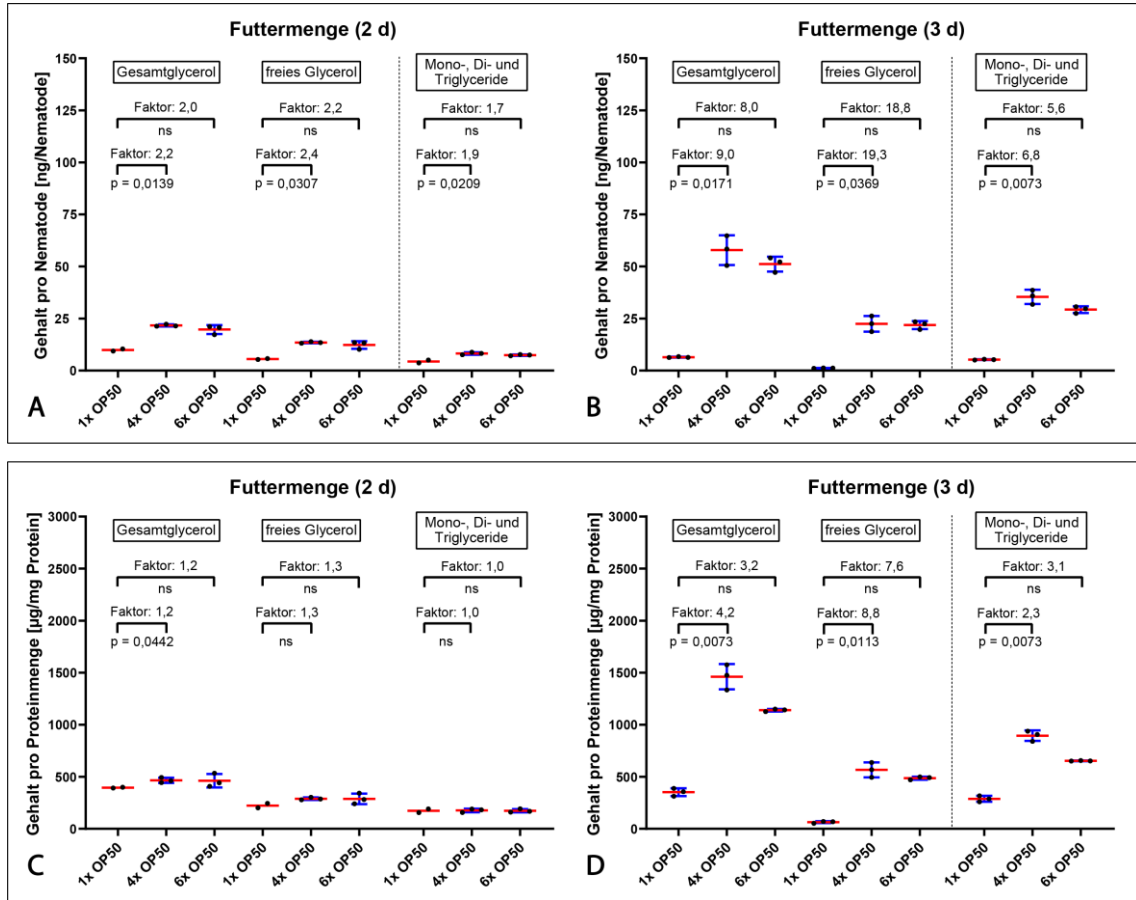


**Diagramm 42: Hochdosis-Effekte von Glucose auf die Körperfläche und den Fettgehalt von *C. elegans*-Wildtypen (N2) nach dreitägiger Kultivierung.**

L1-Larven wurden mit 1x OP50 und 1 mM, 2 mM oder 10 mM Glucose für drei Tage (3 d) gefüttert. Nach der Nile Red-Färbung von fixierten Nematoden erfolgte die Bild-Aufnahme mit dem 5x-Luft-Objektiv (NA = 0,16) des Opera Phenix (PerkinElmer) in einer Ebene bei  $\lambda_{\text{Ex}} = 522 \text{ nm}$  /  $\lambda_{\text{Em}} = 488 \text{ nm}$ . Die anschließende automatisierte Auswertung erfolgte mit der Software Harmony (PerkinElmer). Die Datenpunkte repräsentieren die Körperfläche pro Nematode und mittlere Fluoreszenzintensitäten pro Nematode (Körperfläche), angegeben in *arbitrary units* (a. u.), der Gesamtpopulation aus einem Versuch (N = 42 – 113 Nematoden). Statistik: Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen, Kruskal Wallis-Test, \*p  $\leq$  0,05.

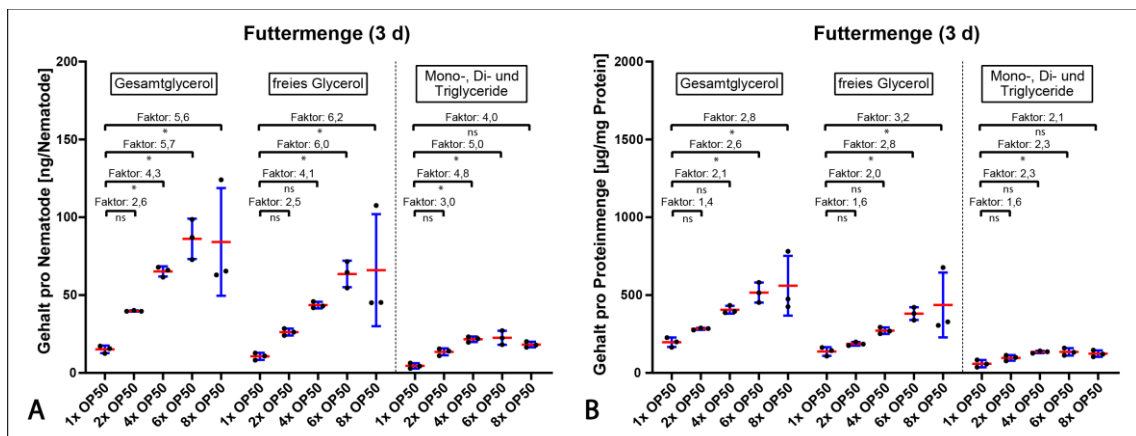


Zu 4.1.2.4 Einfluss unterschiedlicher Futtermengen auf den Fettgehalt von *C. elegans*



**Diagramm 43:** Effekte der Futtermenge auf den Triglyceridgehalt von *C. elegans*-Wildtypen (N2) nach zwei- und dreitägiger Kultivierung.

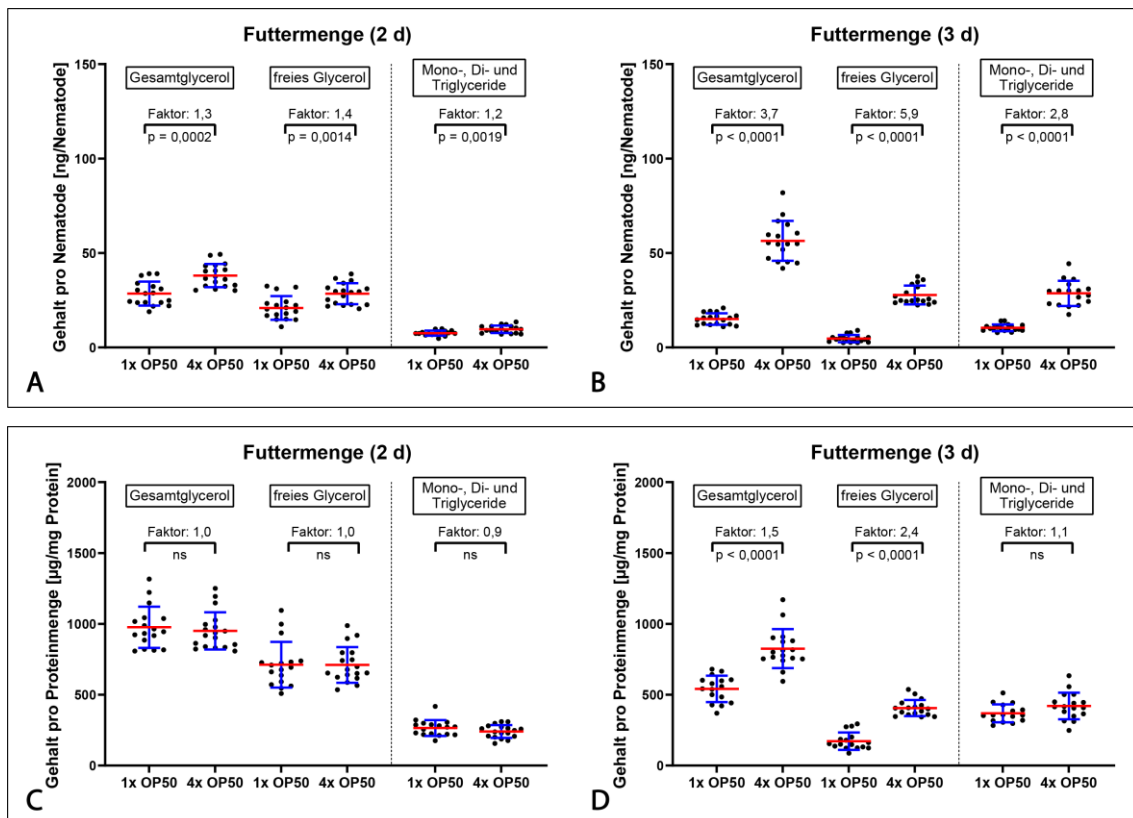
L1-Larven wurden mit 1x OP50, 4x OP50 oder 6x OP50 für zwei (2 d) oder drei Tage (3 d) gefüttert. Die Gesamtglycerol- und freie Glycerolgehalte wurden mittels des Triglycerid-Assays (Sigma-Aldrich) gemessen und die Triglyceridgehalte durch Subtraktion beider Werte berechnet. Die Datenpunkte repräsentieren entsprechende Gehalte pro Nematode (A und B) und pro Proteinmenge (C und D) aus einem Versuch mit einem technischen Triplikate. Statistik: Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen, Kruskal Wallis-Test,  $p \leq 0,05$ , ns = nicht signifikant.



**Diagramm 44:** Effekte der Futtermenge auf den Triglyceridgehalt von *C. elegans*-Wildtypen (N2) nach dreitägiger Kultivierung.

L1-Larven wurden mit 1x OP50 – 8x OP50 für drei Tage (3 d) gefüttert. Die Gesamtglycerol- und freie Glycerolgehalte wurden mittels des Triglycerid-Assays (Sigma-Aldrich) gemessen und die Triglyceridgehalte durch Subtraktion beider Werte berechnet. Die Datenpunkte repräsentieren entsprechende Gehalte pro Nematode (A) und pro Proteinmenge (B) aus einem Versuch mit einem technischen Triplikate. Statistik: Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen, Kruskal Wallis-Test, \* $p \leq 0,05$ , ns = nicht signifikant.

### Zu 4.2.1 Einfluss der Futtermenge auf die Körpergröße, Anzahl der Eier *in utero* und den Triglyceridgehalt



**Diagramm 45: Triglyceridgehalte von mageren und fetten *C. elegans*-Wildtypen (N2) nach zwei- und dreitägiger Kultivierung.**

L1-Larven wurden mit 1x OP50 (mager) oder 4x OP50 (fett) für zwei (2 d) oder drei Tage (3 d) gefüttert. Die Gesamtglycerol- und freien Glycerolgehalte wurden mittels des Triglycerid-Assays (Sigma-Aldrich) gemessen und die Triglyceridgehalte durch Subtraktion beider Werte berechnet. Die Datenpunkte repräsentieren entsprechende Gehalte pro Nematode (A und B) und pro Proteinmenge (C und D) aus sechs unabhängigen Versuchen mit technischen Triplikaten (N = 17 – 18 Proben). Statistik: Mittelwert ± Standardabweichung, Mann Whitney U-Test,  $p \leq 0,05$ , ns = nicht signifikant.

### Zu 4.2.3 Einfluss der Futtermenge auf Fettsäuregehalt und -muster von adulten *C. elegans* und der Eier

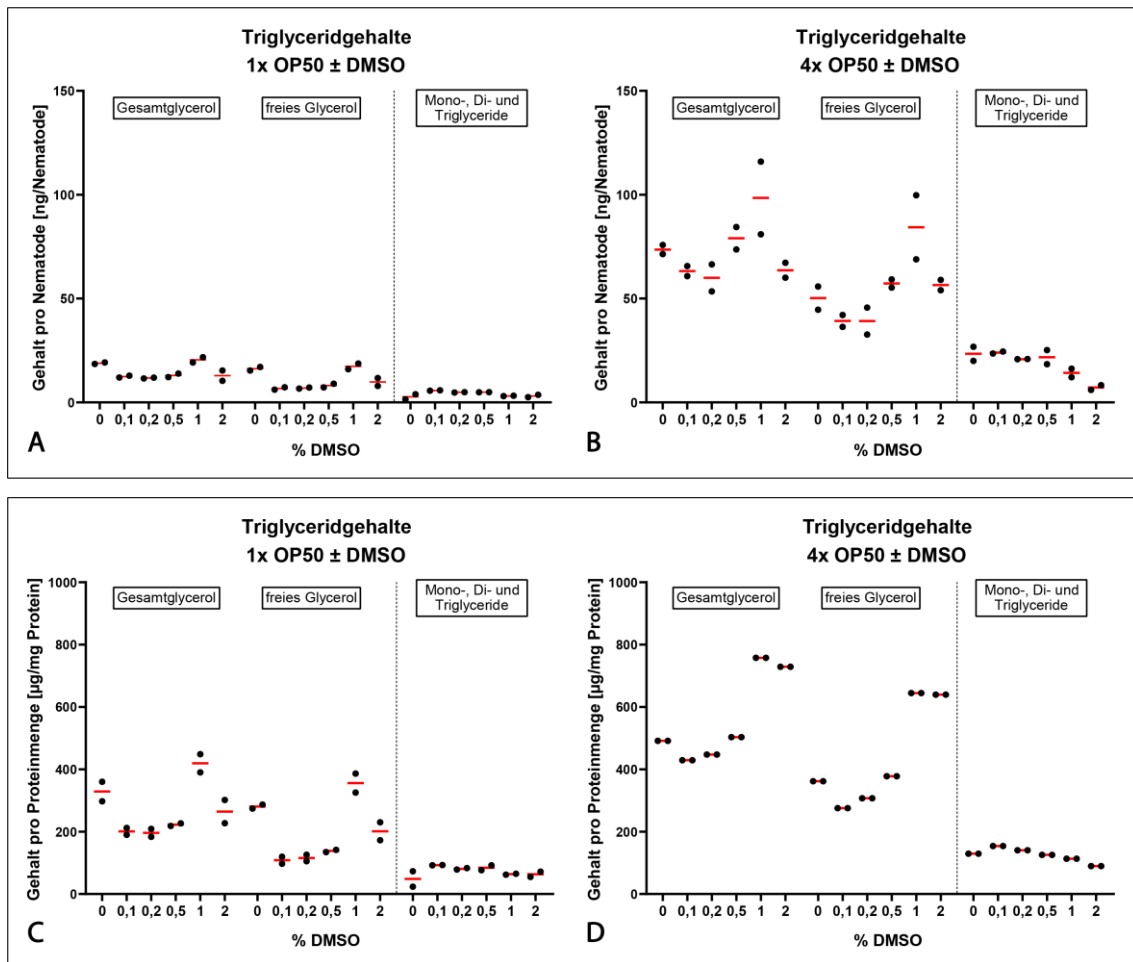
In Tabelle 5 sind die einzelnen, in der GC-MS-Analyse gemessenen Fettsäuren und ihre Zugehörigkeit in die kategorisierten Fettsäuresubklassen aufgelistet.

Tabelle 5: Gruppeneinteilung der nachgewiesenen Fettsäuren der GC-MS-Analyse

Fettsäuregruppe	Anzahl C-Atome : Doppelbindungen	Bezeichnung
<b>Gesättigte Fettsäuren</b> ( <i>saturated fatty acids</i> , SFAs)	C14:0 C16:0 C17:0 C18:0 C20:0	Myristinsäure Palmitinsäure Margarinsäure Stearinsäure Arachinsäure
<b>Einfach ungesättigte Fettsäuren</b> ( <i>monounsaturated fatty acids</i> , MUFAs)	C14:1 ω7c C15:1 ω8c C16:1 ω5c C16:1 ω7c C16:1 ω9c C17:1 ω8c C18:1 ω5c C18:1 ω7c C18:1 ω9c	Myristoleinsäure  Palmitoleinsäure  Margoreinsäure  Vaccensäure Ölsäure
<b>Cyclopropan-Fettsäuren</b>	C19:0 <i>cyclo</i> ω7c C17:0 <i>cyclo</i> ω7c	
<b>Verzweigte Fettsäuren</b>	C17:0 <i>iso</i> C15:0 <i>iso</i> C19:0 <i>iso</i>	
<b>ω3-mehrfach ungesättigte Fettsäuren</b> ( <i>ω3-polyunsaturated fatty acids</i> , PUFAs)	C20:3 ω3c C20:4 ω3c C20:5 ω3c	Eicosatriensäure Eicosatetraensäure Eicosapentaensäure
<b>ω6-mehrfach ungesättigte Fettsäuren</b> ( <i>ω6-polyunsaturated fatty acids</i> , PUFAs)	18:2 ω6c 18:3 ω6c 20:2 ω6c 20:3 ω6c 20:4 ω6c	Linolsäure (LA) Gamma-Linolensäure (GLA) Eicosadiensäure Dihomo-gamma-Linolensäure Arachidonsäure

### Zu 4.3 Einfluss von Orlistat auf den Fettgehalt von *C. elegans*

Ergänzende Daten von DMSO-Effekten auf den Triglyceridgehalt der Nematoden.



**Diagramm 46: Effekte von DMSO auf den Triglyceridgehalt (pro Nematode und pro Proteinmenge) von mageren und fetten *C. elegans*-Wildtypen (N2) nach dreitägiger Kultivierung.**

L1-Larven wurden mit 1x OP50 (mager) oder 4x OP50 (fett) und jeweils mit 0,1 %, 0,2 %, 0,5 %, 1 % oder 2 % DMSO für drei Tage gefüttert. Die Gesamtglycerol- und freie Glycerolgehalte wurden mittels des Triglycerid-Assays (Sigma-Aldrich) gemessen und die Triglyceridgehalte durch Subtraktion beider Werte berechnet. Die Datenpunkte repräsentieren entsprechende Gehalte pro Nematode (A und B) und pro Proteinmenge (C und D) aus zwei unabhängigen Versuchen. Rote Linien indizieren die Mittelwerte.

## Zu 4.3.2 Einfluss von Orlistat auf den Fett- bzw. Triglyceridgehalt

Ergänzende Daten von Orlistat-Effekten auf den Triglyceridgehalt der Nematoden.

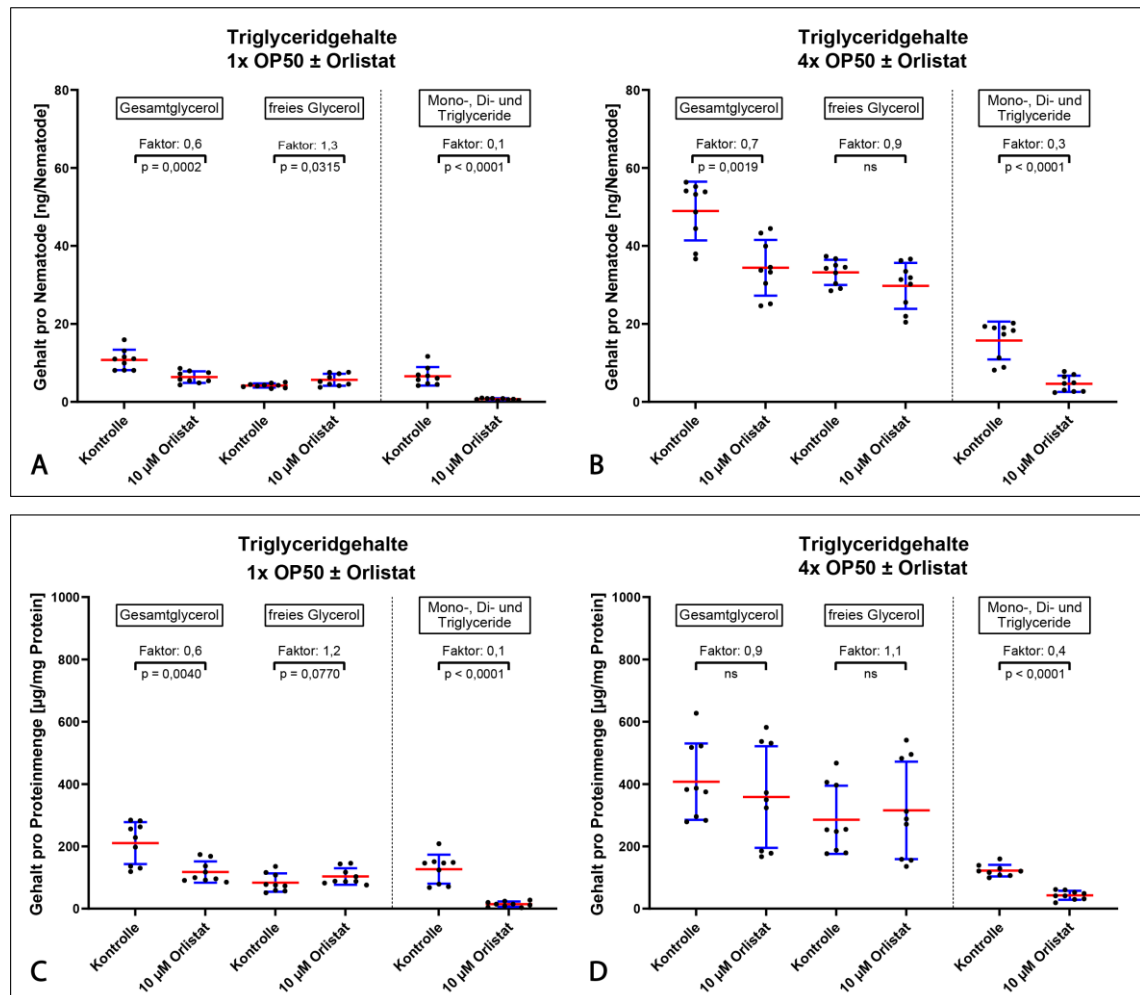
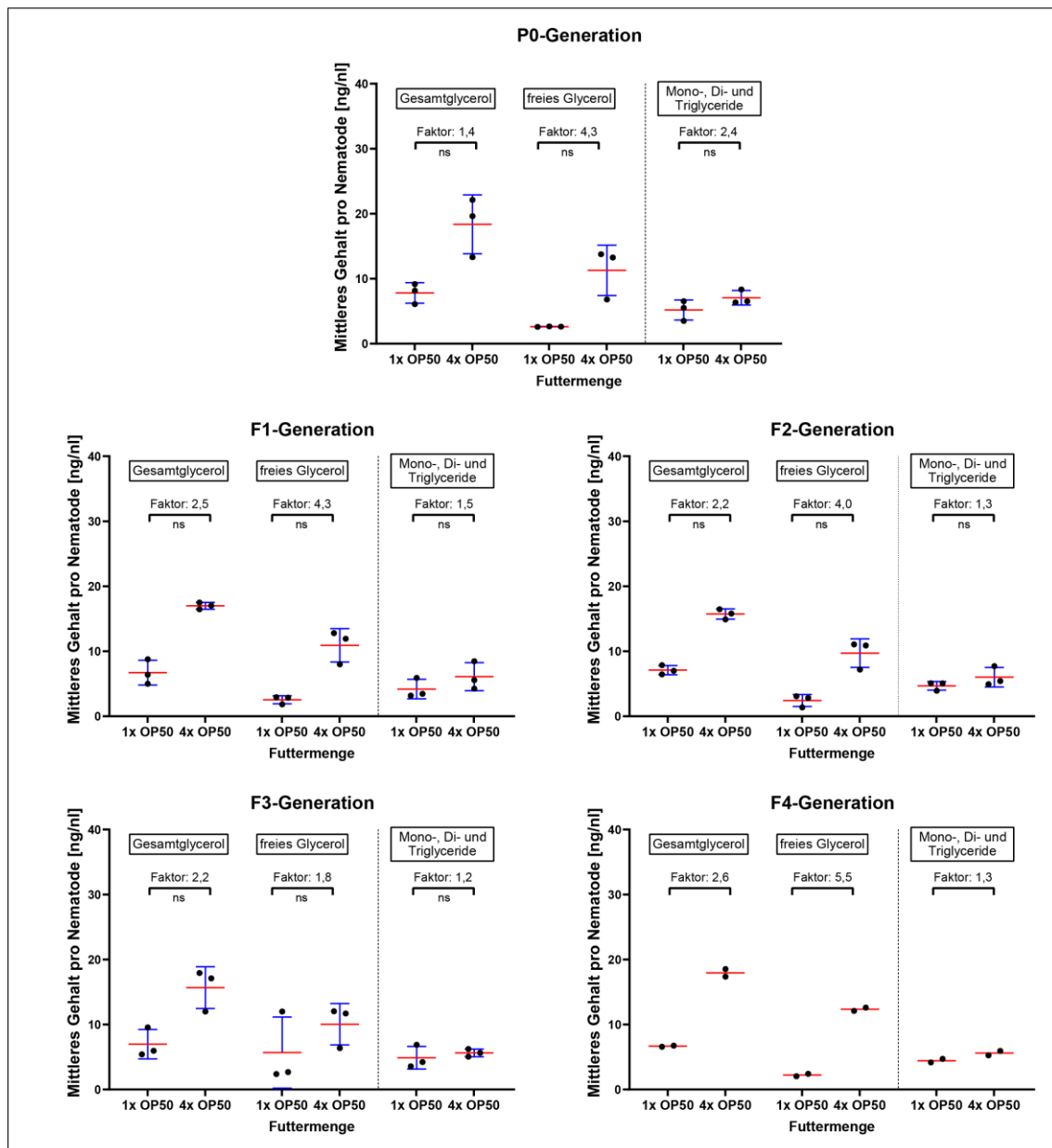


Diagramm 47: Effekte von Orlistat auf die Triglyceridgehalte von *C. elegans*-Wildtypen (N2) nach dreitägiger Kultivierung.

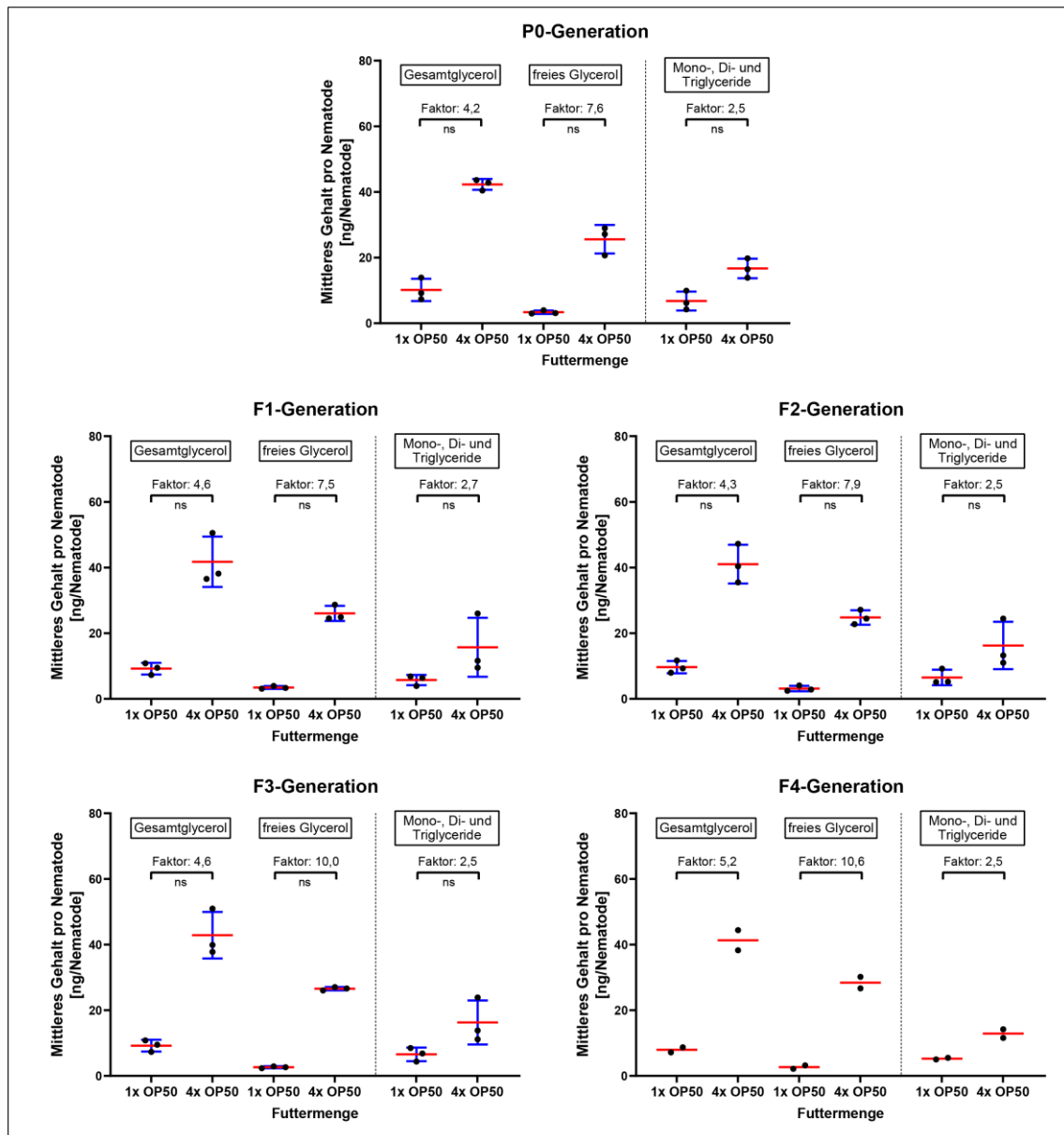
L1-Larven wurden mit 1x OP50 oder 4x OP50 und jeweils 0,2 % DMSO (Kontrolle) oder 10 µM Orlistat für drei Tage gefüttert. Die Gesamtglycerol- und freien Glycerolgehalte wurden mittels des Triglycerid-Assays (Sigma-Aldrich) gemessen und die Triglyceridgehalte durch Subtraktion beider Werte berechnet. Die Datenpunkte repräsentieren entsprechende Gehalte pro Nematode (A und B) und pro Proteinmenge (C und D) aus drei unabhängigen Versuchen mit technischen Triplikaten (N = 8 – 9 Proben). Statistik: Mittelwert ± Standardabweichung, Mann Whitney U-Test,  $p \leq 0,05$ , ns = nicht signifikant.

### Zu 4.4.1 Einfluss der kontinuierlichen, vermehrten Futtergabe auf den Fettgehalt der Folgegenerationen (multigenerationale Exposition)



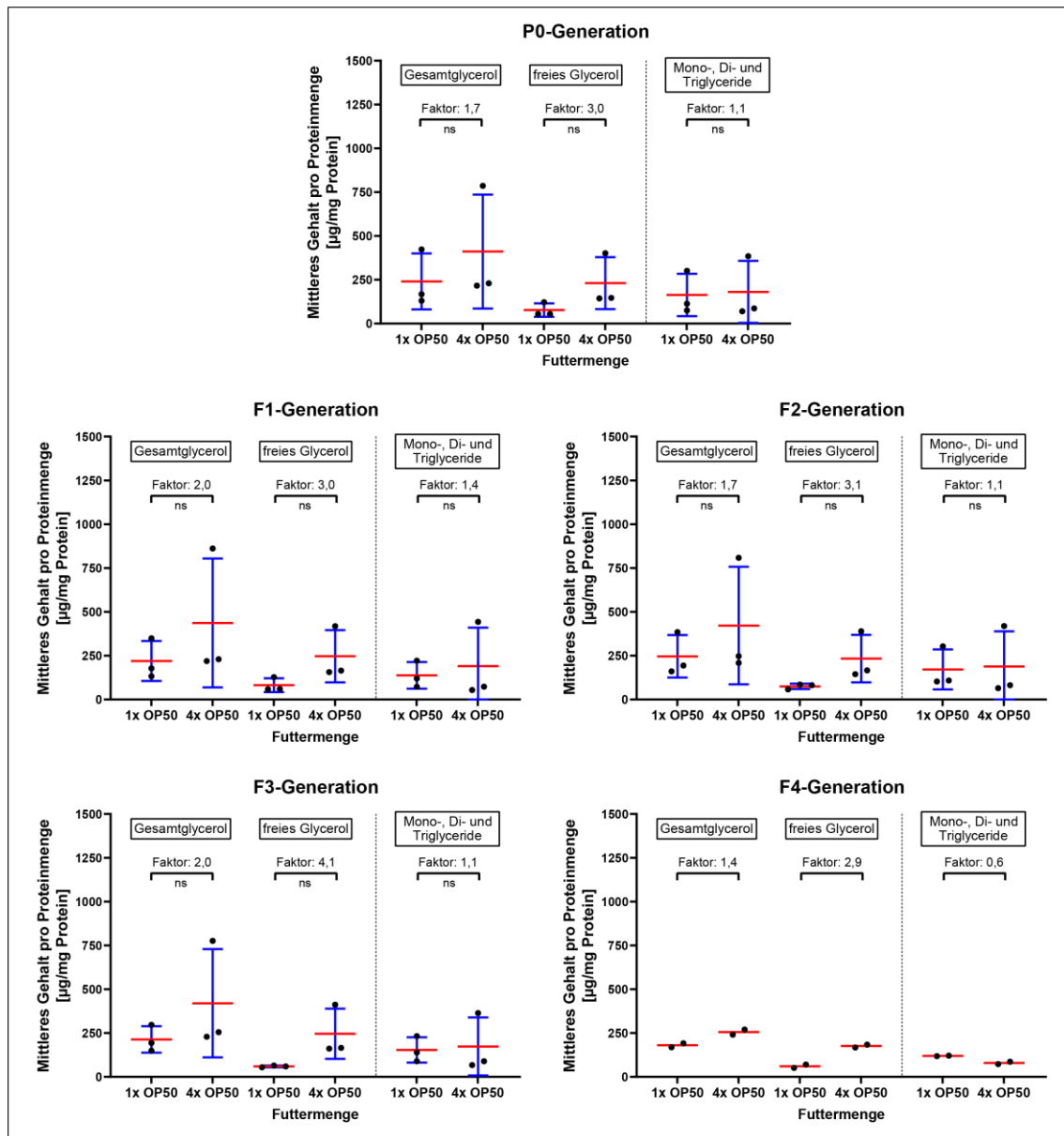
**Diagramm 48: Multigenerationale Effekte einer erhöhten Futtermenge auf die Triglyceridgehalte von adulten *C. elegans*-Wildtypen (N2) (alle Daten).**

L1-Larven wurden kontinuierlich mit 1x OP50 oder kontinuierlich mit 4x OP50 über mehrere Generationen (P0–F4) gefüttert. Die Gesamtglycerol- und freien Glycerolgehalte wurden mittels des Triglycerid-Assays (Sigma-Aldrich) gemessen und die Triglyceridgehalte durch Subtraktion beider Werte berechnet. Die Datenpunkte repräsentieren entsprechende Mittelwerte von Triplikaten der Gehalte pro Nematode (Körpervolumen) aus drei unabhängigen Versuchen. Statistik: Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen, bedingter t-Test (lineares gemischtes Modell), \* $p \leq 0,05$ .



**Diagramm 49: Multigenerationale Effekte einer erhöhten Futtermenge auf die Triglyceridgehalte (pro Nematode) von adulten *C. elegans*-Wildtypen (N2).**

L1-Larven wurden kontinuierlich mit 1x OP50 oder kontinuierlich mit 4x OP50 über mehrere Generationen (P0 – F4) gefüttert. Die Gesamtglycerol- und freien Glycerolgehalte wurden mittels des Triglycerid-Assays (Sigma-Aldrich) gemessen und die Triglyceridgehalte durch Subtraktion beider Werte berechnet. Die Datenpunkte repräsentieren entsprechende Mittelwerte von Triplikaten der Gehalte pro Nematode aus drei unabhängigen Versuchen. Statistik: Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen, bedingter t-Test (lineares gemischtes Modell), \* $p \leq 0,05$ .



**Diagramm 50: Multigenerationale Effekte einer erhöhten Futtermenge auf die Triglyceridgehalte (pro Proteinmenge) von adulten *C. elegans*-Wildtypen (N2).**

L1-Larven wurden kontinuierlich mit 1x OP50 oder kontinuierlich mit 4x OP50 über mehrere Generationen (P0 – F4) gefüttert. Die Gesamtglycerol- und freien Glycerolgehalte wurden mittels des Triglycerid-Assays (Sigma-Aldrich) gemessen und die Triglyceridgehalte durch Subtraktion beider Werte berechnet. Die Datenpunkte repräsentieren entsprechende Mittelwerte von Triplikaten der Gehalte pro Proteinmenge aus drei unabhängigen Versuchen. Statistik: Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen, bedingter t-Test (lineares gemischtes Modell),  $*p \leq 0,05$ .



### Zu 4.4.2 Einfluss der erhöhten Futtermenge in der parental Generation auf den Fettgehalt der Folgegeneration (intergenerationale Exposition)

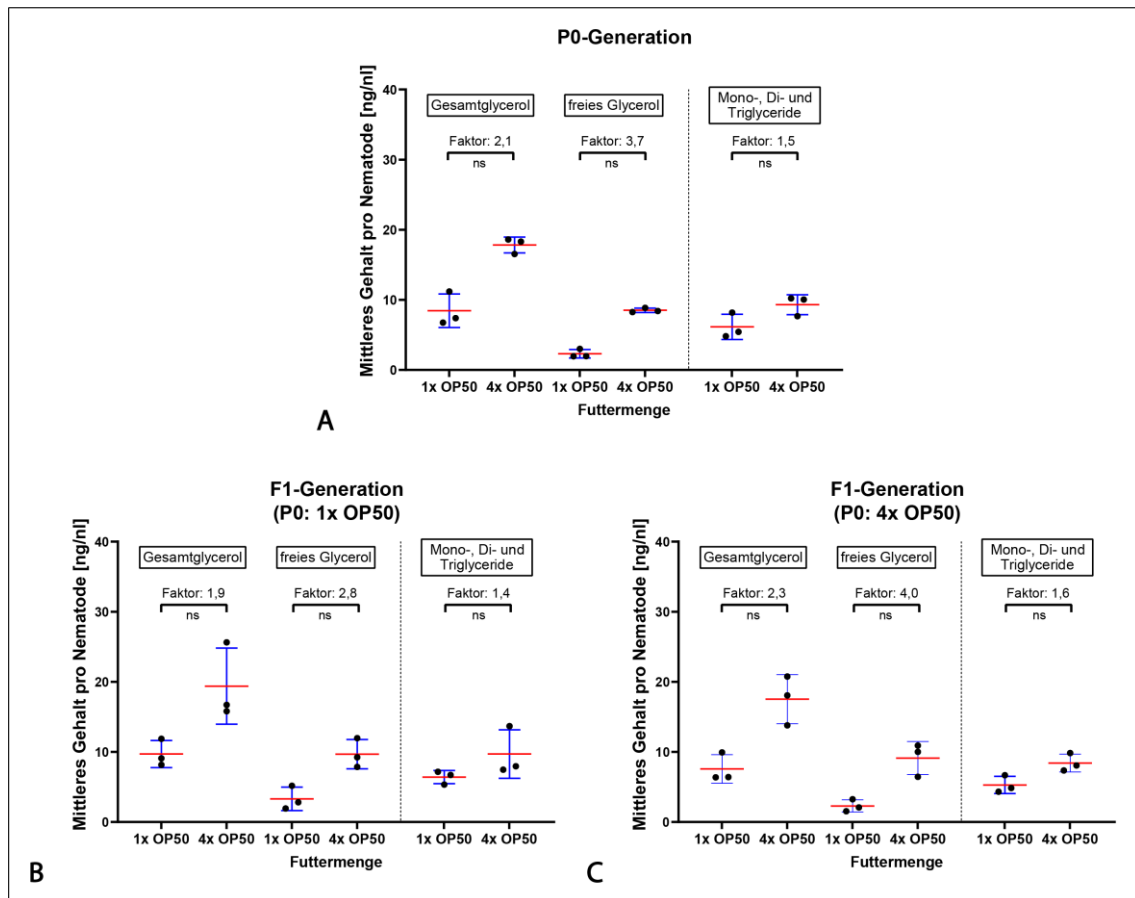
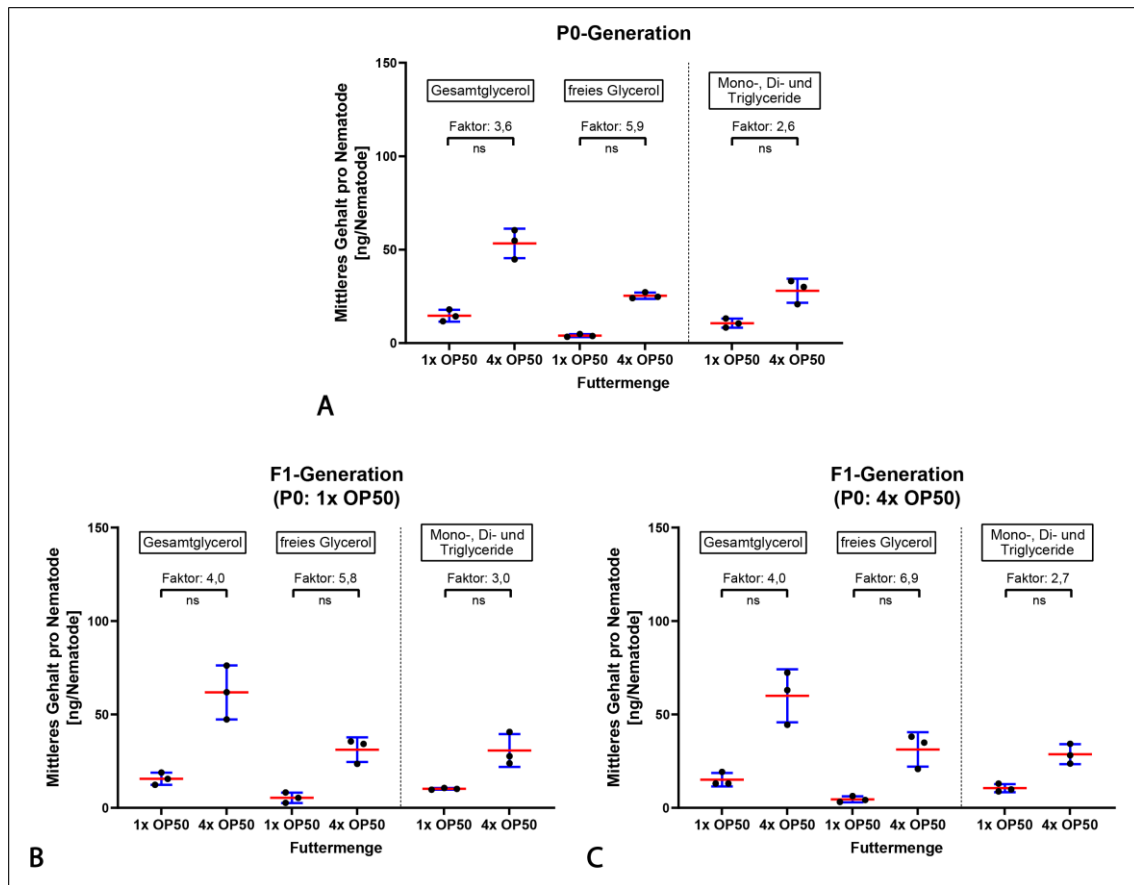


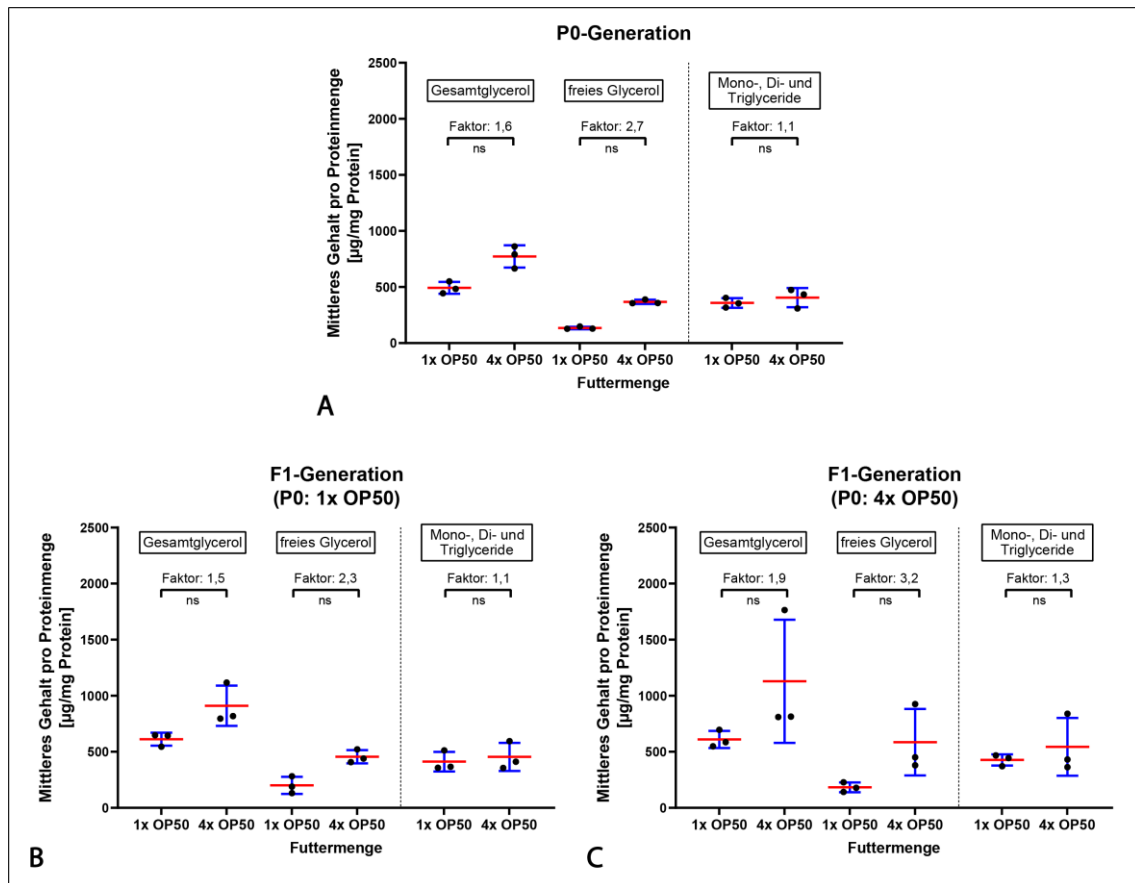
Diagramm 51: Intergenerationale Effekte einer erhöhten Futtermenge auf die Triglyceridgehalte von adulten *C. elegans*-Wildtypen (N2) (alle Daten).

L1-Larven der P0-Generation wurden mit 1x OP50 oder 4x OP50 für drei Tage gefüttert. Die L1-Larven der Folgegeneration (F1) von P0 (1x OP50), als auch von P0 (4x OP50) wurden anschließend jeweils mit 1x OP50 oder 4x OP50 für drei Tage gefüttert. Die Gesamtglycerol- und freien Glycerolgehalte wurden mittels des Triglyrid-Assays (Sigma-Aldrich) gemessen und die Triglyceridgehalte durch Subtraktion beider Werte berechnet. Die Datenpunkte repräsentieren entsprechende Mittelwerte von Triplikaten der Gehalte pro Nematode (Körpervolumen) aus drei unabhängigen Versuchen. Statistik: Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen, bedingter t-Test (lineares gemischtes Modell),  $p \leq 0,05$ , ns = nicht signifikant.



**Diagramm 52: Intergenerationale Effekte einer erhöhten Futtermenge auf die Triglyceridgehalte (pro Nematode) von adulten *C. elegans*-Wildtypen (N2).**

L1-Larven der P0-Generation wurden mit 1x OP50 oder 4x OP50 für drei Tage gefüttert. Die L1-Larven der Folgegeneration (F1) von P0 (1x OP50), als auch von P0 (4x OP50) wurden anschließend jeweils mit 1x OP50 oder 4x OP50 für drei Tage gefüttert. Die Gesamtglycerol- und freien Glycerolgehalte wurden mittels des Triglycerid-Assays (Sigma-Aldrich) gemessen und die Triglyceridgehalte durch Subtraktion beider Werte berechnet. Die Datenpunkte repräsentieren entsprechende Mittelwerte von Triplikaten der Gehalte pro Nematode aus drei unabhängigen Versuchen. Statistik: Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen, bedingter t-Test (lineares gemischtes Modell),  $p \leq 0,05$ , ns = nicht signifikant.



**Diagramm 53: Intergenerationale Effekte einer erhöhten Futtermenge auf die Triglyceridgehalte (pro Proteinmenge) von adulten *C. elegans*-Wildtypen (N2).**

L1-Larven der P0-Generation wurden mit 1x OP50 oder 4x OP50 für drei Tage gefüttert. Die L1-Larven der Folgegeneration (F1) von P0 (1x OP50), als auch von P0 (4x OP50) wurden anschließend jeweils mit 1x OP50 oder 4x OP50 für drei Tage gefüttert. Die Gesamtglycerol- und freien Glycerolgehalte wurden mittels des Triglycid-Assays (Sigma-Aldrich) gemessen und die Triglyceridgehalte durch Subtraktion beider Werte berechnet. Die Datenpunkte repräsentieren entsprechende Mittelwerte von Triplikaten der Gehalte pro Proteinmenge aus drei unabhängigen Versuchen. Statistik: Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen, bedingter t-Test (lineares gemischtes Modell),  $p \leq 0,05$ , ns = nicht signifikant.