

## Abschließender Sachbericht

# **Auf der Suche nach natürlichen Wegen zu einer außergewöhnlich langen Gesundheitsspanne – das Beispiel der Nacktmulle**

## Inhalt

Executive summary .....	3
Ausgangsfragen .....	4
Zielsetzung.....	4
Projektverlauf und Ergebnisse.....	5
WP1 "Establish age markers" IZW .....	5
WP2 "Refined gene catalog" FLI.....	6
WP3 "Crowning experiment" IZW .....	7
WP4 "Age series experiment" IZW/FLI.....	9
WP5 "Expression profiling" FLI .....	10
WP6 "Comparative transcriptomics, data mining and modeling" FLI .....	10
WP7 "Validation and follow-up experiments" FLI/IZW .....	12
Zusätzliche Experimente.....	12
Ausblick.....	13
Wirtschaftliche Verwertbarkeit von Ergebnissen .....	14
Beiträge von Kooperationspartnern .....	14
Qualifikationsarbeiten .....	15
Liste der Publikationen .....	16
Maßnahmen zur Sicherung und Verfügbarmachung der im Vorhaben produzierten Forschungsdaten.....	16
Liste von Pressemitteilungen und Medienberichten .....	16
Abbildungen .....	17
Referenzen.....	21

## Executive summary

Der kontinuierliche Anstieg der Lebenserwartung der Bevölkerung in den hochentwickelten Industriestaaten über die letzten 200 Jahre stellt für diese Gesellschaften eine große Herausforderung dar. Da das Alter den bedeutendsten Risikofaktor für verbreitete Erkrankungen wie Krebs, Demenz und Typ-2-Diabetes darstellt, ist eine Verlängerung der Spanne des Lebens bei guter Gesundheit (Gesundheitsspanne) von primärer medizinischer, sozialer, ökonomischer und ethischer Bedeutung.

Das Projekt, eine Initiative des Leibniz Instituts für Altersforschung – Fritz-Lipmann-Institut (FLI) und des Leibniz Instituts für ZOO und Wildtierforschung (IZW), zielte auf die Identifikation von molekularen Markern und Netzwerken ab, die der außergewöhnlich langen und gesunden Lebensspanne von fortpflanzungsaktiven Nacktmullen zu Grunde liegen. Lebensverlauf und soziale Organisation bei Nacktmullen bieten eine einzigartige Möglichkeit zur experimentellen Untersuchung des Übergangs von kurzlebigeren sich nicht vermehrenden Arbeitern zu langlebigeren fortpflanzungsaktiven Königinnen/Paschas unter gleichen genetischen und ökologischen Bedingungen.

Das Projekt wurde in 7 Arbeitspaketen („work package“, WP) durchgeführt und dabei bisher folgende Ergebnisse erzielt. Zur Altersbestimmung sind Dentalanalysen etabliert und für die Alterseinschätzung von Tieren aus der freien Wildbahn erstmals systematisch eingesetzt worden (WP1). Zur Etablierung von hochqualitativen Transkriptkatalogen wurde das Programmpaket FRAMA entwickelt und erfolgreich bei Mullen, Meerschweinchen und anderen Spezies eingesetzt (WP2). Im Projektverlauf wurden insgesamt acht Nacktmullkolonien durch Verpaarung je eines männlichen und eines weiblichen Tieres (Krönungspaar) etabliert und 558 Nacktmull- sowie 432 Meerschweinchen-Proben asserviert (WP3). Im Rahmen von 2 Äthiopien-Expeditionen wurden insgesamt 299 Wildtiere aus 12 Kolonien beprobt (WP4). Auf der Basis der asservierten Proben wurden bisher 697 Transkriptomprofile erstellt (WP5), anhand derer gezeigt werden konnte, dass die Geschlechtsreife beim Nacktmull erst während oder nach Etablierung als ranghöchste Tiere der Kolonie (Königin/Pascha) erfolgt. Es gibt erste Hinweise auf altersrelevante Gene, die eine gegenläufige Expression zwischen den Tierarten aufweisen. Während unverpaarte Nacktmulle und Meerschweinchen eine ähnliche Expressionshöhe zeigen, sind sie in Nacktmull-Krönungstieren und in verpaarten Meerschweinchen gegensinnig exprimiert. Dieses Expressionsmuster entspricht der dem Projektantrag zugrundeliegenden Hypothese und steht im Fokus weiterführender Analysen (WP6). Ausgewählte Kandidatengene wurden in funktionellen Studien weiterverfolgt (WP7 & zusätzliche Experimente). Ein Teil der Ergebnisse wurde in 4 wissenschaftlichen Artikeln veröffentlicht. Weitere sind in Vorbereitung.

Aufgrund der behördlichen Auflagen bei der Durchführung der Tierversuche (WP3) und organisatorisch-administrativer Probleme bei der Organisation der Expeditionen (WP4) kam es zu Verzögerungen in WP5-7, die trotz kostenneutraler Projektverlängerung bis zum 30.6.2015 nicht abgeschlossen werden konnten. Die Anschlussfinanzierung der laufenden Arbeiten erfolgt durch FLI und IZW. Deren Abschluss ist für Ende 2016 geplant.

Das Projekt erweitert den Kenntnisstand zur Transkriptom-basierten Expressionsanalyse von Nacktmullen und Meerschweinchen deutlich. Die gegenwärtig vorliegenden Ergebnisse haben Grundlagencharakter. Eine mögliche wirtschaftliche Verwertung wird nach Abschluss der noch geplanten Arbeiten Ende 2016 erneut erwogen. Dafür steht die Ascension GmbH als Technologietransferpartner beratend zur Seite.

## Ausgangsfragen

Der kontinuierliche Anstieg der Lebenserwartung der Bevölkerung in den hochentwickelten Industriestaaten über die letzten 200 Jahre stellt für diese Gesellschaften eine große Herausforderung dar. Da das Alter den bedeutendsten Risikofaktor für verbreitete Erkrankungen wie Krebs, Demenz und Typ-2-Diabetes darstellt, ist eine Verlängerung der Spanne des Lebens bei guter Gesundheit (Gesundheitsspanne) von primärer medizinischer, sozialer, ökonomischer und ethischer Bedeutung.

Die meisten unserer biomedizinischen Erkenntnisse zum Altern basieren auf Untersuchungen an kurzlebigen Modellorganismen (Hefe, Fadenwurm, Fruchtfliege, Maus), die von ihrer Natur aus nur geringe Resistenz gegen grundlegende Alternsprozesse entwickelt haben. Im Gegensatz dazu gehört der Mensch zu einer Gruppe von Lebewesen, die sich durch eine außergewöhnliche Langlebigkeit auszeichnen. Um Einblicke in die molekularen Mechanismen von Langlebigkeit zu gewinnen, bieten sich Untersuchungen von Arten mit extrem langem und gesundem Leben im Vergleich zu deren kurzlebigeren Verwandten an (Austad, 2009).

Nacktmulle (*Heterocephalus glaber*) sind die derzeit bekannt langlebigsten Nager (Buffenstein, 2005). Noch nie wurde bei ihnen Krebs festgestellt (Seluanov et al., 2009). Nacktmulle gehören zu einer Gruppe von Säugetieren, die eine echte eusoziale Gruppenstruktur entwickelt haben (Burda et al., 2000). Ähnlich zu einigen Insekten (Bienen, Termiten) wird in der Kolonie die Reproduktion durch ein Weibchen (Königin) sowie ein bzw. wenige Männchen (Pascha) monopolisiert. In reproduktivem Altruismus beteiligen sich die übrigen Kolonimitglieder (Arbeiter) an der Brutpflege (kooperative alloparentale Pflege) und übernehmen andere Aufgaben (Graben, Nahrungsbeschaffung, Verteidigung usw.).

Natürliche Selektion hat bei eusozialen Insekten zu einem besonderen Alternsphänotyp geführt (Hölldobler and Wilson, 1990): Langlebigkeit der Königin, kastenspezifische Alternsgeschwindigkeiten und Aufhebung des Gegensatz von Fortpflanzung und Selbsterhaltung/Langlebigkeit, wie er bei vielen der bisher untersuchten Organismen beobachtet wurde. Eusozialität bei Mullen (Sandgräber, Bathyergidae) hat zu ähnlichen Alterscharakteristiken geführt (Henning et al., 2014), was auf konvergente Evolution von Merkmalen des Lebensverlaufs in Abhängigkeit von ähnlichen sozialen Strukturen verweist.

Aus diesen Gründen sind Mulle von besonderem Interesse bei der Suche nach Mechanismen außergewöhnlich langen und gesunden Lebens. Welche Rolle Mulle, insbesondere der Nacktmull, in der Alternsforschung spielen können, wurde im Vorfeld des Projekts intensiver diskutiert. Mittlerweile sind sie als Modellorganismen etabliert.

## Zielsetzung

Das Projekt zielte auf die Identifikation von molekularen Markern und Netzwerken ab, die der außergewöhnlich langen und gesunden Lebensspanne von fortpflanzungsaktiven Nacktmullen zu Grunde liegen. Dabei war von besonderem Interesse, auf welcher Basis natürliche Selektion den bei vielen Tierarten festgestellten Antagonismus von Reproduktion und Langlebigkeit durch Eusozialität aufgehoben und – ungeachtet der enormen metabolischen Belastung bei der Fortpflanzung – zur Entwicklung von Resistenzmechanismen gegenüber dem Altern geführt hat.

Lebensverlauf und soziale Organisation bei Nacktmullen bieten eine einzigartige Möglichkeit zur experimentellen Untersuchung des Übergangs von kurzlebigeren sich nicht vermehrenden Arbeitern zu langlebigeren fortpflanzungsaktiven Königinnen/Paschas unter gleichen genetischen und ökologischen Bedingungen.

Das generelle Ziel des Projekts waren Erkenntnisse zu Mechanismen der Aufrechterhaltung genetischer und metabolischer Homöostase sowie der wahrscheinlich zugrundeliegenden

Reduktion der Schadensakkumulation, welche ansonsten zu altersbedingten Funktionsverlusten und Krankheiten führt. Perspektivisch könnten diese Erkenntnisse zur Verlängerung der Gesundheitsspanne in einer alternden menschlichen Gesellschaft beitragen.

## Projektverlauf und Ergebnisse

Das Projekt wurde in 7 Arbeitspaketen („work package“, WP) durchgeführt, deren Verlauf und Ergebnisse im Folgenden dargestellt werden.

### **WP1 "Establish age markers" IZW**

Zur Entwicklung von Altersmarkern wurden sowohl Proben und Daten aus unseren eigenen Nacktmull-Kolonien als auch Kolonien verschiedener zoologischer Einrichtungen gewonnen (Wien, Osnabrück, Dresden, Singapur, Stockholm, Jerusalem). Es wurden insgesamt 523 Tiere aus 15 Kolonien untersucht.

Der progressive bindegewebige Umbau des Nierenparenchyms konnte nicht als Altersmarker beibehalten werden, da dieses Kriterium nicht verlässlich mit dem Alter korreliert und in den untersuchten Nacktmullkolonien unterschiedlich stark ausgeprägt war. Vermutlich ist dies neben genetischen Prädispositionen vorrangig fütterungs- oder haltungsbedingt.

Ebenso wenig erwies sich die Veränderung in der Hautpigmentierung und -mikrostruktur als verlässliches Kriterium zur Altersbestimmung. Die mit Hilfe eines digitalen Mikroskops (Keyence VHX-1000D) erstellten Aufnahmen der Hautoberfläche erlaubten eine qualitative und quantitative Analyse der Hautbeschaffenheit und -pigmentierung. Eine Korrelation zwischen Alter und Hautveränderung konnte nicht gefunden werden.

Um Veränderungen in Skelett und Muskulatur in den verschiedenen Altersklassen zu untersuchen, wurden mehr als 100 Individuen beider Geschlechter mit bekanntem Alter einer CT-Untersuchung unterzogen. Dies soll in Verbindung mit Daten der Organvermessungen generiert durch Ultrasonographie weiteren Aufschluss über morphologische Kriterien in Hinblick auf altersbedingte Veränderungen geben. Es wurden in regelmäßigen Ultraschallkontrollen über die Darstellung und Vermessung der Gonaden (Ovarien mit Funktionskörpern, i.e. Follikeln/Gelbkörpern; Hoden mit Nebenhoden) sowie Fruchtanlagen (Embryonen/Föten) mit einem hochauflösenden Ultraschallgerät (Vevo 2001 Imaging Plattform) unter anderem die sexuelle Entwicklung dokumentiert. Aufgrund der komplexen Datenlage ist die finale Auswertung dieser Parameter noch nicht abgeschlossen.

Zur Altersbestimmung wurde an Tieren bekannten Alters die morphologischen Zahnveränderungen (Zahnbildung, Abnutzung, Verlust) – stellvertretend an den Backenzähnen (3 Molare pro Quadrant) – untersucht, da die Schneidezähne (Nagezähne) bei Nacktmullen kontinuierlich wachsen und daher keine Altersveränderungen in größerem Umfang aufwiesen. Es wurde hierzu ein digitales Mikroskop (Keyence VHX-1000D) eingesetzt und die Einzelbilder in Alterskategorien zusammengefasst und ausgewertet. Bei adulten Individuen konnte eindeutig anhand der Form und Höhe der Backenzähne, welche sich durch Wachstum und Abnutzung über die Lebenszeit charakteristisch verändern, eine Alterseinschätzung vorgenommen werden. Diese Altersparameter wurden für die Alterseinschätzung der Tiere, die aus der freien Wildbahn entnommen wurden, erstmals systematisch eingesetzt. Eine Veröffentlichung dieser Dentalanalysen zur Alterseinschätzung ist in Vorbereitung.

## **WP2 "Refined gene catalog" FLI**

Da die Doktorandenstelle für einen Bioinformatiker (FLI) erst am 16.08.2012 besetzt werden konnte, kam es zu anfänglichen Verzögerungen in diesem Arbeitspaket. Ein aus Vorarbeiten stammender Genkatalog für den Nacktmull, bestehend aus 10.500 Transkriptfragmenten, wurde mit Hilfe von mRNA-Sequenzierung (strangspezifische RNA-seq; Illumina HiSeq 2500; beidseitig 200 nt) und *de novo* Transkriptassemblierung (Trinity) komplett überarbeitet. Im Zuge dessen haben wir das Programmpaket FRAMA („From RNA-seq data to Annotated MRNA Assemblies“) entwickelt, welches den bioinformatischen Arbeitsablauf einer Genkatalogerstellung, beginnend bei den RNA-seq-Daten bis hin zum annotierten Genkatalog automatisiert (Abb. 1). Als Referenz für den Aufbau eines Genkatalogs dient dabei der bekannte Genkatalog eines verwandten Organismus, in unserem Falle der des Menschen. Dieser zeichnet sich durch hinreichend hohe Sequenzähnlichkeit aus (89,1% in der Protein-kodierenden Sequenz (CDS)) und ist umfassend mit Gensymbolen und funktioneller Information annotiert. FRAMA ist in der Lage, Fusions-, Fehl- und bruchstückhafte Assemblierungen basierend auf orthologen Transkripten zu identifizieren und zu korrigieren.

Die Qualität des neu erstellten Nacktmullgenkatalogs wurde umfangreich mit Hilfe des Nacktmullgenoms und den vorhandenen Genvorhersagen (Keane et al., 2014; Kim et al., 2011) evaluiert. Hierbei zeigte sich, dass Genmodelle basierend auf FRAMA-Transkripten besser durch biologische Daten unterstützt werden, als existierende Genvorhersagen. Insgesamt zeigen 98,1% der FRAMA-Genmodelle eine vollständige RNA-seq-Abdeckung, hingegen werden 87,6% der Genmodelle aus der "NCBI Eukaryotic Genome Annotation Pipeline" und nur 71,5% der Genmodelle, die im Zuge der Nacktmull-Genompublikation vorhergesagt wurden, komplett bestätigt. Des Weiteren konnten 1.695 Lücken im Nacktmullgenom mit 408,293 bp Sequenzinformationen gefüllt werden. Das Zusammenführen von bruchstückhaft assemblierten Transkripten konnte auf 3.488 Gene angewendet werden, deren Transkriptabdeckung damit 1,3-fach (um 3,3 Mb) gesteigert wurde. Diese und weitere Ergebnisse zeigen, dass FRAMA einen hochqualitativen Genkatalog mit repräsentativen mRNA-Transkripten erstellt und somit eine optimale Grundlage für Expressionsanalysen (WP6) bietet. Eine wissenschaftliche Publikation zur Beschreibung von FRAMA und seiner Anwendung zur Assemblierung eines hochqualitativen Nacktmull-Transkriptkatalogs wurde erstellt (Bens *et al.*, BMC Genomics, im Druck).

Des weiteren konnte FRAMA bereits erfolgreich in anderen Projekten sowohl zur Assemblierung und Annotation der MULLspezies *F. mechowii*, *Fukomys anelli*, *F. micklei* (Henning et al., 2014) als auch diverser Nothobranchius-Spezies (Reichwald et al., 2015) eingesetzt werden. Darüber hinaus lieferte der neu erstellte Nacktmull-Genkatalog die grundlegende Transkriptstruktur für Einzelgenstudien, z.B. für alpha-2-Makroglobulin, das in Kooperation mit der Gruppe Birkenmeier (Universität Leipzig) auf seine artspezifischen biochemischen Eigenschaften untersucht wurde (Thieme et al., 2015).

Der aktuelle Genkatalog für den Nacktmull umfasst 16.887 Gene, davon 12.583 mit vollständig rekonstruierter CDS (Bens *et al.*, BMC Genomics, im Druck). Die Basis für die Assemblierung lieferten 340,3 Millionen Sequenzen, die mit einem Illumina HiSeq 2500 generiert wurden (10 Gewebe: Cerebellum, Hypothalamus, Hypophyse, Schilddrüse, Nebenniere, Niere, Leber, Haut, Ovar und Testes; jeweils 22,4 bis 44,8 Millionen Sequenzen; beidseitig 200 nt). Um eine optimale Grundlage und gute Vergleichbarkeit der Expressionsanalysen zwischen Nacktmull und Meerschweinchen (WP6) zu gewährleisten, wurde auch für das Meerschweinchen ein neuer Genkatalog erstellt. Dieser basiert auf der Assemblierung von 178,6 Millionen Sequenzen (10 Gewebe: siehe oben; 11,9 bis 28,6 Millionen Sequenzen; beidseitig 200 nt) und umfasst 16.740 Gene, davon 12.100 mit vollständiger CDS.

### **WP3 "Crowning experiment" IZW**

Die behördliche Genehmigung des Tierversuchs lag am 28.09.2012 vor (G 0221/12). Eine von den Behörden angewiesene Modifikation des ursprünglichen Versuchsdesigns sah vor, den Versuchsabschluss für Nacktmulle sowie Meerschweinchen nicht bereits kurz nach Austragen des ersten Wurfes sondern erst nach Austragen und Ende der Laktation des zweiten Wurfes zu wählen. Das machte eine Verlängerung der geplanten Versuchslaufzeit bis maximal 31.03.2015 notwendig, welche am 17.04.2013 genehmigt wurde. Durch diese Verlängerung der Versuchsdauer konnte eine stärkere Ausprägung der Transkriptomveränderungen erwartet werden, deren Charakterisierung Hauptziel des Projekts war. Ebenfalls hofften wir, durch den längeren Versuchszeitraum stärker ausgeprägte morphologische Veränderungen der Krönungstiere beobachten zu können. Ein weiterer entscheidender Vorteil dieses neuen Versuchsdesigns bestand darin, dass sich das Transkriptom der Tiere nach dem Abstillen und vor erneuter Trächtigkeit der Königin in einem physiologisch dem Versuchsanfang vergleichbaren Zustand (nicht-trächtig und nicht laktierend) befand. Somit sind die zu Versuchsbeginn und -ende entnommen Proben besser vergleichbar. Im Rahmen der Versuchsanordnung wurden drei Versuchsgruppen jeweils bei den Nacktmullen und den Meerschweinchen etabliert (Abb. 2):

*Kontrollgruppe 1* umfasste die Versuchstiere, die mit Versuchsbeginn vollständig beprobt wurden und zur Lieferung von Baseline-Daten dienten – Nacktmulle: 2 Männchen + 4 Weibchen, Meerschweinchen: 3 Männchen + 3 Weibchen.

*Kontrollgruppe 2* umfasste nicht-verpaarte Versuchstiere, die entweder in ihrer Ursprungskolonie (Nacktmulle) verblieben oder in gleichgeschlechtlichen Gruppen (Meerschweinchen) gehalten wurden – Nacktmulle: 6 Männchen + 8 Weibchen (2 weitere männliche Kontrolltiere wurden wegen des Verlustes der korrespondierenden Krönungstiere nicht in die finale Beprobung einbezogen); Meerschweinchen: 6 Männchen + 6 Weibchen.

*Gruppe der Krönungstiere* umfasste die Versuchstiere die erfolgreich verpaart wurden und bei den weiblichen Individuen mindestens zwei Trächtigkeit nachgewiesen werden konnten – Nacktmulle: 6 Männchen + 8 Weibchen (Verlust von zwei weiteren männlichen Krönungstiere durch Kämpfe); Meerschweinchen: 6 Männchen + 6 Weibchen.

Für die sichere Aufbewahrung der genetischen Proben wurden ein neuer Kryolager- und Befüllungstank (TP100 und Arpege140, Air Liquide) für flüssigen Stickstoff (-196°C) angeschafft.

Die Leberbiopsien wurden aufgrund der geringen Größe der Tiere und der präzisen Entnahme unter einem speziellen mikrochirurgischen Binokular (Möller-Wedel GmbH) durchgeführt. Bei allen Versuchstieren war eine gute Verträglichkeit des Eingriffes mit einer nahezu blutungslosen Operation und schneller Erholung feststellbar. Insgesamt wurden 56 Biopsien (jeweils Leber und Haut) bei Nacktmullen und 24 Biopsien (jeweils Leber und Haut) bei Meerschweinchen durchgeführt. Während der unter Vollnarkose durchgeführten Entfernung des Nahtmaterials wurde gleichzeitig eine Ultraschallkontrolle der inneren Organe vorgenommen. Bei keinem Tier konnten pathologische Veränderungen an der Entnahmestelle festgestellt werden. Bei einigen der operierten Tiere traten leichte Wundheilungsstörungen im Hautbereich auf, welche wir auf immunologische Reaktionen auf das ursprünglich verwendete Nahtmaterial zurückführten. Sie heilten zügig und komplikationslos ab. Für die nachfolgenden Versuche wurden feinere Fäden (Ethicon GmbH, Typ 5-0) verwendet. Während der Autopsie wurden in Einzelfällen (unter 5%) punktuelle Anheftungen von Lebergewebe an der Bauchwand festgestellt. Keines dieser Tiere war klinisch auffällig.

Beim weiblichen Krönungstier des ersten Krönungspaares konnte bereits 2,5 Monate nach Versuchsbeginn mittels Ultraschall am 19.12.2012 die erste Trächtigkeit nachgewiesen werden. Dieser für Nacktmulle sehr kurze Zeitraum von bis zur ersten Trächtigkeit deutet

darauf hin, dass die Operation keine große Belastung für die Tiere dargestellt hat. Dieses Ergebnis spricht dafür, dass der experimentelle Ablauf und die Haltungsbedingungen günstig gewählt waren; da aus der Literatur bekannt ist, dass das Zusammensetzen eines männlichen und weiblichen Nacktmulls nicht immer zur erfolgreichen Verpaarung führt, bzw. die Zeit bis zum ersten Nachwuchs zum Teil erheblich länger dauern kann (Henry et al., 2007; **Mooney and Holmes, 2013**).

Die Meerschweinchenhaltung wurde ebenfalls erfolgreich in einem separaten Versuchstierraum etabliert (ZH 156, LaGeSo). Die Meerschweinchen (Stamm HsdDhl:DH; Harlan Laboratories) wurden parallel verpaart basierend auf dem Versuchsdesign. Das Teilerperiment wurde am 03.06.2013 begonnen und am 18. Februar 2014 abgeschlossen.

Im Projektverlauf wurden insgesamt acht Nacktmullkolonien durch Verpaarung je eines männlichen und eines weiblichen Tieres (Krönungspaar) etabliert (Abb. 3). Das erste Paar wurde am 03.10.2012 gegründet, die letzten Proben wurden am 17.12.2014 genommen.

Zur Analyse des Verhaltens der Kolonienmitglieder benutzten wir ein speziell angefertigtes Kameraüberwachungssystem (Nachtsicht-Überwachungskamera, 2,8-12mm, 600TVL) ausgestattet mit Bewegungsmeldern. Auf der Grundlage des 24-Stunden-Monitoring jeder Kolonie konnten eindeutig die verschiedenen Aktivitätsmuster der unterschiedlichen Kasten (Arbeiter, Bruthelfer, Soldaten, Pascha und Königin) erfasst werden. Diese Daten fanden bisher Eingang in die abgeschlossene Masterarbeit von Frau Michaela Morhart und werden weiterführend in ihrer Doktorarbeit ausgewertet.

Der Endpunkt des Versuches wurde von sechs dieser Paare durch die Aufzucht des zweiten Wurfes (Ende der Laktation) erfüllt, bei einem Paar durch die eines dritten Wurfes. Bei einem weiteren Paar wurde nach mehreren nicht-erfolgreich ausgetragenen Trächtigkeiten (mindestens zwei Trächtigkeiten wurden hierbei durch Ultraschall festgestellt) über den Zeitraum von mehr als einem Jahr das Experiment beendet. Zwei männliche Versuchstiere starben im Rahmen von Kämpfen mit Artgenossen und konnten somit nicht zur Probengewinnung herangezogen werden. Die zugehörigen Kontrolltiere wurden ebenfalls von der Probengewinnung ausgenommen. Insgesamt wurden in das Experiment 14 Krönungstiere (6 männliche, 8 weibliche), 6 Tiere der Kontrollgruppe I (2 männliche, 4 weibliche), sowie 16 Tiere der Kontrollgruppe II (8 männliche, 8 weibliche) eingeschlossen (Abb. 4).

Folgende Nacktmull-Proben wurden asserviert:

- a) Initial: Leberbiopsie, Blut und Haut von insgesamt 32 Tieren (n = 96);
- b) Zwischenbiopsie: Leberbiopsie, Blut und Haut von insgesamt 18 Tieren (n = 54);
- c) Finale Probenentnahme: 12 Gewebe/Tier (Blut, Nebenniere, Herz, Kleinhirn, Niere, Hypothalamus, Ovar/Hoden, Milz, Schilddrüse, Hypophyse, Leber und Haut) von insgesamt 34 Tieren (n = 408);

*Gesamtanzahl: 558 Proben.*

Die Experimente an der Vergleichsgruppe der Meerschweinchen begannen zeitlich versetzt, am 03.06.2013, waren jedoch aufgrund der bei dieser Tierart schnelleren Reproduktion auch eher beendet (Abb. 4). Das Ende war ebenfalls über die erfolgreiche Aufzucht des zweiten Wurfes (Ende der Laktation) definiert. Insgesamt waren 12 verpaarte Tiere (6 männliche; 6 weibliche), 6 Tiere der Kontrollgruppe I (3 männliche; 3 weibliche), sowie 12 Tiere der Kontrollgruppe II (6 männliche; 6 weibliche) ins Experiment eingeschlossen.

Folgende Meerschweinchen-Proben wurden asserviert:

- a) Initial: Leberbiopsie, Blut und Haut von insgesamt 24 Tieren (n = 72);  
Final: 12 Gewebe/Tier (siehe oben) von insgesamt 30 Tieren (n = 360);

*Gesamtanzahl: 432 Proben.*

Aliquote der Proben wurden zur Transkriptomanalyse bis zum 17.12.2014 ans FLI überführt. Es verblieb von den Geweben, deren Größe eine Teilung erlaubte (bis auf Hypophyse, Hypothalamus, Nebenniere, Schilddrüse), mindestens je ein Aliquot als Backup im Stickstofflager des IZW. Teile der größeren Organe (ungefähr dieselbe Anzahl an Proben) wurden zusätzlich in Formalin für weiterführende Untersuchungen aufbewahrt.

Aufgrund der behördlichen Auflagen bei der Durchführung der Tierversuche konnte dieses Arbeitspaket nicht wie geplant nach 18 sondern erst nach 36 Monaten abgeschlossen werden und führte zu entsprechenden Verzögerungen in WP5-7.

#### **WP4 "Age series experiment" IZW/FLI**

Die Realisierung einer ursprünglich geplanten Expedition zur Beprobung wildlebender Nacktmulle in Kenia gestaltete sich aus verwaltungstechnischen Gründen in Kenia schwieriger als erwartet (Kooperation Dr. Okita, Dr. Ngene, Dr. Muya). Aus diesem Grund wurde eine Kooperation mit Professor Alemayehu Lemma (ehemaliger Doktorand von Prof. Hildebrandt; Universität Addis Abeba, Standort Debre Zeit, Äthiopien) sowie mit Dr. Fitsum Lemma (Universität Haramaya, Äthiopien) etabliert. Es fanden insgesamt zwei Forschungsreisen statt:

##### *1. Reise: 4.12.2013 – 19.12.2013*

Team: Prof. Thomas B. Hildebrandt (IZW), Dr. Frank Göritz (IZW), Dr. Karol Szafranski (FLI), Prof. Alemayehu Lemma (University of Addis Abeba), Prof. Stanton Braude (Washington University), Dr. Susanne Holtze (IZW), Michaela Morhart (IZW), Stephan Karl (IZW).

Anzahl gefangener Nacktmulle: 163 Tiere aus 8 Kolonien; Probenanzahl insgesamt: 1.826 (in LN<sub>2</sub>: 624; RNAlater: 528; Formalin: 621; Alkohol: 53).

##### *2. Reise: 03.12.2014 – 11.12.2014*

Team: Prof. Thomas B. Hildebrandt (IZW), Prof. Alemayehu Lemma (University of Addis Abeba), Prof. Stanton Braude (Washington University), Dr. Fitsum Lemma (University of Haramaya), Dr. Susanne Holtze (IZW).

Anzahl gefangener Nacktmulle: 133 Tiere aus 4 Kolonien; Probenanzahl insgesamt: 527 (in LN<sub>2</sub>: 200; RNAlater: 91; Formalin: 103; Alkohol: 133).

Darüber hinaus wurden detaillierte Messungen der klimatischen Gegebenheiten von Nacktmulltunnelsystemen erhoben und Ultraschalluntersuchungen durchgeführt. Desweiteren wurden mehrere Blutparameter bestimmt (zwei Manuskripte in Vorbereitung).

Trotz des umfangreichen Tiermaterials (299 Tiere während zwei Expeditionen) war es nicht möglich, eine ausreichende Anzahl sehr alter Nacktmulle ( $\geq 20$  Jahre) für die Analyse der altersabhängigen Genexpression (WP5/6) zu gewinnen. Die Gründe dafür liegen vorrangig in der typischen Altersverteilung der mittels spezieller Nacktmullfallen gefangenen Kolonienmitglieder. Es standen uns von den technisch aufwendigen Fanggeräten, welche von Professor Braude selbst entwickelt wurden, insgesamt nur fünf Fallen zur Verfügung. Daher wurden die Fangaktionen an einem Standort auf maximal 72 Stunden begrenzt. Die Fangfrequenz nahm innerhalb der ersten 24 Stunden deutlich ab. Zusätzlich kam es häufig nach wenigen Stunden zur aktiven Deaktivierung (Füllung mit Sand) der Fanganlagen durch die Nacktmulle. In der Altersverteilung bezogen auf den Fangzeitpunkt ergab sich, dass die älteren Tiere prinzipiell zu einem späteren Zeitpunkt gefangen wurden. Dies traf insbesondere für die geschlechtsaktive Königin und den Pascha als die erfahrensten und ältesten Mitglieder der Kolonie zu. Von den insgesamt 12 Kolonien konnte nur bei 2 Kolonien eine vollständige Extraktion aller Kolonienmitglieder nach drei Tagen Fangzeit erreicht werden. Für eine statistisch fundierte Analyse wären mindestens 4 sehr alte Tiere gleichen Geschlechts notwendig, um sie mit einer gleichen Zahl junger (1-5 Jahre) und mittelalter (5-

15 Jahre) zu vergleichen. Obwohl damit dieses spezifische Forschungsziel des SAW-Projekts nicht erreicht wurde, halten wir an dem Vorhaben einer Altersserie fest und streben an, diese auf der Basis von Zootieren mit dokumentiert hohem Alter zu erstellen (siehe Ausblick).

#### ***WP5 "Expression profiling" FLI***

Die Methoden für die Erstellung von Expressionsprofilen standen zu Projektbeginn zur Anwendung bereit. Im Rahmen der Katalogisierung von Nacktmulltranskripten aus 10 verschiedenen Gewebetypen (WP2) und anhand von RNA-seq-Datensätzen, die wir im Vorfeld des Projekts erstellten, haben wir uns vergewissert, dass qualitativ hochwertige Expressionsprofile gewonnen werden.

Zur Messung der Genexpression wurden, wie im Antrag geplant, die Transkriptome von 10 Geweben beider Tierarten am FLI sequenziert (Illumina HiSeq 2500). Hierbei wurde für jeden Datensatz eine Sequenziertiefe von mindestens 20 Millionen Sequenzen (50 nt) generiert, um eine angemessene Auflösung der Messungen zu gewährleisten. Da sich die Beschaffenheit der eingesetzten RNA (Menge, Gewebshomogenität) und die Qualität der Sequenzierung entscheidend auf das Endergebnis auswirken, wurde bereits zeitnah mit den Sequenzierungen eine Qualitätskontrolle jeder Probe durchgeführt. Hierzu wurden Basenqualität und Duplikonrate der Sequenzen analysiert und die Gewebsidentität jeder Probe anhand von gewebsspezifischen Markergenen (VeryGene Database) sichergestellt. Somit konnten Wiederholungssequenzierungen zeitnah erfolgen und spätere Verzögerung vermieden werden.

Die gewonnen RNA-seq-Daten wurden auf den entsprechenden Genomen kartiert (STAR) und anschließend die Genexpression basierend auf den durch FRAMA gewonnen Genkatalogen (WP2) quantifiziert. Eine Kartierung auf die jeweiligen Genome wurde gewählt, um eine stabile und unabhängige Referenz zu verwenden. Für eine finale Qualitätsanalyse, wurde die Pearson-Korrelation der Expressionsprofile für Proben einer Replikatgruppe betrachtet und Ausreißer von den folgenden Analysen ausgeschlossen (Abb. 5).

Das Arbeitspaket ist aufgrund von Verzögerungen in WP3/4 noch nicht abgeschlossen. Die derzeit vorliegenden 697 RNA-seq-Datensätze umfassen die Proben, die im November 2014 aus den Nacktmull- und Meerschweinchen-Experimenten vorlagen. Die noch geplanten Arbeiten werden im Ausblick dargestellt.

#### ***WP6 "Comparative transcriptomics, data mining and modeling" FLI***

Für eine anfängliche, explorative Analyse wurde eine Hauptkomponentenanalyse (PCA) aller normalisierten Expressionsprofile einer Tierart durchgeführt. Hierbei werden die multidimensionalen Expressionsdaten so in einen niederdimensionalen Raum projiziert, dass die Variabilität zwischen den einzelnen Proben erhalten bleibt. Wie zu erwarten, wird die größte Variation in den Daten durch Expressionsunterschiede zwischen den Geweben hervorgerufen, sodass bereits mit Hilfe der ersten beiden Hauptkomponenten alle Proben nach ihrem zugehörigen Gewebe gruppiert werden (Abb. 6). Mit Ausnahme der Hautproben, zeigen dabei alle Gewebe eine geringe Streuung. Andere kontrollierte Variablen, wie Verpaarungsstatus oder Geschlecht, konnten mit Hilfe der PCA allerdings nicht mit Expressionsunterschieden assoziiert werden. Auch eine Analyse der Daten getrennt nach Geweben zeigte keine Separierung einzelner Replikatgruppen. Dieses Ergebnis wird auch durch eine hierarchische Clusteranalyse bestätigt. Hierzu wurden vier Distanzmetriken (Euklid, Canberra, Manhattan, Minkowski) in Kombination mit drei Linkage-Methoden (complete, single, average) verwendet, um gleichzeitig die Robustheit der Clusteranalyse zu prüfen. Auch hier zeigt sich eine klare Clusterbildung nach Gewebe, aber keine Clusterung

von Geschlecht oder Verpaarungsstatus innerhalb der Gewebe-Cluster. Das Ergebnis der explorativen Analyse weist damit darauf hin, dass sowohl Geschlecht als auch Verpaarungsstatus eher subtile Auswirkungen auf das Transkriptom des Nacktmulls und Meerschweinchens haben.

Für eine detaillierte Analyse wurde die Zahl differentiell exprimierter Gene (DEGs) zwischen den Gruppen für alle Gewebe und beide Tierarten bestimmt (DESeq2, FDR<0.01). Verglichen wurden sowohl Geschlechter, nach Verpaarungsstatus getrennt, als auch Verpaarungsstatus, nach Geschlechtern getrennt. Dadurch ergeben sich für jede Spezies und jedes Gewebe insgesamt vier Vergleiche. Eine Einschätzung der biologischen Funktion der DEGs wurde mit Hilfe von „Gene Ontology“ (GO) Kategorien durchgeführt (GOstats, hypergeometrischer Test, FDR<0.05). Das GO-Projekt (Ashburner et al., 2000) ist dabei die derzeit umfangreichste Quelle zur Katalogisierung von Genfunktionen.

Die Anzahl der DEGs im Nacktmull weist darauf hin, dass sich männliche und weibliche Arbeitertiere auf Transkriptomebene kaum voneinander unterscheiden, wodurch das Ergebnis der explorativen Analyse bestätigt wird. Die meisten DEGs (10) werden dabei im Herzen gefunden. Im Gegensatz dazu weisen Krönungstiere relativ große Geschlechtsunterschiede in der Genexpression auf. Zu erkennen sind diese Unterschiede vorrangig in der Nebenniere (533) und in der Schilddrüse (1.791). Die Liste von DEGs der Nebenniere enthält dabei signifikant überrepräsentiert viele Gene, die an Translationsprozessen beteiligt sind, sowohl Initiierung, Termination als auch Elongation. DEGs der Schilddrüse zeigen keine signifikante funktionelle Anreicherung, allerdings ist eine große Zahl von Genen an Methylierungsprozessen (51) und alternativem Spleißen (46) beteiligt. Die geringe Anzahl von DEGs zwischen Arbeitertieren und verhältnismäßig große DEG-Anzahl für die Geschlechtergruppen der Krönungstiere weisen auf eine Geschlechtsreifung hin, die erst durch die Verpaarung hervorgerufen wird. Das Meerschweinchen zeigt, im Gegensatz zum Nacktmull, Geschlechterunterschiede sowohl zwischen verpaarten als auch zwischen unverpaarten Tieren. Diese Unterschiede sind vor allem in Hypophyse, Nebenniere, Niere und Leber ausgeprägt. Dies weist auf eine abgeschlossene Geschlechtsreifung unabhängig von der reproduktiven Aktivität im Meerschweinchen hin.

Der Vergleich von Arbeiter- und Krönungstieren im Nacktmull zeigt signifikante Expressionsunterschiede in den Gonaden (Hoden: 381 Gene, Ovar: 502 Gene). Eine funktionelle Analyse der DEGs im Hoden zeigt eine signifikante Anreicherung von Genen, die an der Steroidbiosynthese beteiligt sind (speziell: Androgen-, Cholesteroll- und Sterolbiosynthese) oder diese positiv regulieren. Hierbei sind die beteiligten Gene in den Krönungstieren stärker exprimiert als in den Arbeitern. Dies weist auf eine erhöhte Synthese von Hormonen (Steroidbiosynthese) – speziell von Sexualhormonen (Androgenbiosynthese) – hin und auf eine einhergehende sexuelle Differenzierung, die sich erst bei Eintritt in den Krönungsstatus vollzieht. Weiterhin ist bei verpaarten Männchen eine Änderung der Expression in der Haut (223 DEGs) zu beobachten. Dies steht im Einklang mit beobachteten Änderungen in der Hautfärbung von Paschas.

Wie zu erwarten, zeigen die DEGs in den Ovarien eine signifikante Anreicherung für Reproduktionsprozesse (Abb. 7). Weiterhin gibt es Anzeichen für differentielle Expression von Genen, die für morphologische Veränderungen verantwortlich sind (kardiovaskuläres System, urogenitale Entwicklung, Entwicklung von anatomischen Strukturen, Entwicklung des Nervensystems). Dies steht im Einklang mit beobachtbaren morphologischen Veränderungen der Königinnen.

Um einen Einblick in die Beziehung zwischen den in der Reproduktion beobachteten Veränderung der Genexpression und dem Altern zu erhalten, wurde die Schnittmenge von DEGs mit alterungsrelevanten Genen gebildet (u.a. NetAge) (Tacutu et al., 2010). Im Vergleich zwischen Arbeiter- und Krönungstieren zeigen sich zwei Gene in Ovarien, die sowohl im Meerschweinchen als auch im Nacktmull differentiell exprimiert identifiziert wurden (Abb. 8). Auffällig ist hierbei, dass eins dieser Gene eine gegenläufige Expression zwischen

den Tierarten aufweist. Während unverpaarte Nacktmulle und Meerschweinchen eine ähnliche Expressionshöhe zeigen, ist dieses Gen in Nacktmull-Krönungstieren niedriger und in verpaarten Meerschweinchen höher exprimiert. Dieses Expressionsmuster entspricht der dem Projektantrag zugrundeliegenden Hypothese und steht im Fokus weiterführender Analysen.

Die Expressionsanalysen für das Krönungsexperiment sind noch nicht abgeschlossen und bisherige Ergebnisse sind als vorläufig zu betrachten (Stand November 2015). Bisher weisen unsere Ergebnisse auf minimale Geschlechterunterschiede in Nacktmullarbeitern hin, obwohl im Gegensatz dazu starke Unterschiede sowohl im Meerschweinchen, als auch zwischen reproduzierenden Nacktmullen vorhanden sind. Dies unterstützt unsere Hypothese, dass die Geschlechtsreife beim Nacktmull erst während oder nach Etablierung als ranghöchste Tiere der Kolonie (Königin/Pascha) erfolgt. Der Status der Tiere (Arbeiter, Krönungstier) kann für den Nacktmull anhand der Expressionsmuster gut nachvollzogen werden, denn starke Änderungen in den Gonaden korrelieren mit der reproduktiven Aktivität, und globale Expressionsveränderungen bei den Königinnen korrelieren mit deren auffälliger morphologischer Veränderung. Im Meerschweinchen gibt es keine signifikanten Expressionsmuster, die mit sexueller Aktivität korrelieren.

### **WP7 "Validation and follow-up experiments" FLI/IZW**

Durch Auswertung von Transkriptdaten (WP5) sind wir auf ein Ferritin-Gen aufmerksam geworden, das sich durch besonders hohe Sequenzvariation auszeichnet - ein Anzeichen, dass dieses Gen eine außergewöhnliche evolutive Dynamik im Nacktmull hat. Die Folgearbeiten zeigten, dass das Gen im Nacktmull, aber nicht im verwandten Graumull (*Fukomys anelli*), mehrfach dupliziert wurde und jetzt in drei haploiden Kopien vorliegt. Durch Arbeiten von Dr. Chris Faulkes (Univ. London, UK) steht eine BAC-Klon-Ressource zur Verfügung, die uns erlaubte die Duplikationen genomisch näher zu charakterisieren. Demnach wurde eine ältere Duplikation von nur 4,5 kb wahrscheinlich durch flankierende Transposon-Kopien vermittelt. Untersuchte Tiere zeichnen sich an diesem Genkopie-Locus durch Insertions-/Deletionsallele aus, die teilweise über Leserahmenverschiebung zu funktionslosen Pseudogenkopien führen. Daher konnte diese Genkopie auch als längenpolymorpher Marker für Populationsstudien genutzt werden (Abschnitt „Zusätzliche Experimente“). Die zweite, jüngere Duplikation umfasst eine chromosomale Region von über 120 kb, die weitere benachbarte Gene einschließt. Des Weiteren wurden Arbeiten zur Charakterisierung der Ferritin-Isoformen des Nacktmulls durchgeführt, die jedoch keine Anhaltspunkte für deren funktionelle Bedeutung lieferten. Da die jüngere Duplikation mehrere andere Gene umfasst, existieren weitere Genkandidaten für funktionelle Studien, die mit den etablierten Ressourcen und Methoden weiterbearbeitet werden sollen.

### **Zusätzliche Experimente**

Wir haben im Berichtszeitraum weitere Arbeiten durchgeführt, die über die inhaltliche Planung des Antrags hinausgehen, aber auf der im Rahmen des SAW-Projekts etablierten Kooperationsstruktur zwischen IZW und FLI beruhen und deren Synergieeffekte ausnutzen.

Die äußerlich-morphologische Geschlechtsbestimmung von Nacktmullen ist unsicher und von einer großen Fehlerrate behaftet, besonders bei Jungtieren vor der physischen Geschlechtsreife (6 Monate). Eine Bestimmung per Ultraschall ist zuverlässiger, aber auch arbeitsaufwändiger. Molekulargenetische Methoden zur Geschlechtsbestimmung sind zuverlässig und leicht für hohe Probenzahlen anzuwenden und bieten zudem den Vorteil, dass Organproben posthum (bspw. als Qualitätskontrolle) einer Untersuchung unterzogen werden können. Ein beschriebener PCR-basierter Test zur Geschlechtsbestimmung (Katsushima et al., 2010) beruht auf dem qualitativen Nachweis des *DDX3Y*-Pseudogens, das nur auf dem Y-Chromosom zu finden ist. Als interne Positivkontrolle wird per Multiplex

ein Abschnitt des mitochondrialen Genoms amplifiziert. Wir haben bei der Anwendung wechselhafte Erfahrungen mit der Robustheit dieses Tests gemacht. Problematisch erschien, dass die interne Positivkontrolle auf einen mitochondrialen Marker abzielt, der nicht nur in multiplen Kopien pro Zelle sondern auch in variabler Kopienzahl vorkommt (ca. 100-400). Daher ist von konzeptioneller Seite schwer auszuschließen, dass die Positivkontrolle ein Signal liefert, während beim vorhandenen *DDX3Y*-Locus (Männchen) kein Produkt gebildet wird. Darum haben wir ein neues Konzept für einen PCR-basierten Test entwickelt, der neben dem *DDX3Y*-Pseudogen das *DDX3X*-Gen auf dem X-Chromosom als Referenzmarker amplifiziert (Abb. 9). Vorteile sind dabei, dass die Genloci bei Männchen in einem perfekten 1:1-Verhältnis vorliegen und dass ein einziges (Wobble-) Primerpaar genutzt werden kann, um beide Loci zu amplifizieren. Dieses Konzept hat sich in der Praxis gut bewährt und wird in der analytischen Routine eingesetzt. Die Publikation soll im Rahmen der nachfolgend dargestellten Studie erfolgen.

Eine weitere Fragestellung war die Familienstruktur von Nacktmullkolonien. Gut charakterisiert ist die eusoziale Struktur der Kolonien, d.h. der Nachwuchs wird fast ausnahmslos von einem einzigen weiblichen Tier, der sogenannten Königin, geboren. Weniger gut untersucht ist der väterliche Beitrag, also die Frage, wie viele männliche Tiere zur Nachkommenschaft beitragen. Die einzige belastbare Untersuchung zu dieser Frage beruht auf Restriktionsfragment-Längenpolymorphismen (RFLP) von Minisatelliten und kam zu der Schlussfolgerung, dass zwei männliche Kolonienmitglieder aktiv reproduzierten (Faulkes et al., 1997). Obwohl keine weiteren belastbaren Hinweise vorliegen, tragen gemäß geläufigen Darstellungen 1-3 erwachsene Männchen zur Reproduktion einer Nacktmullkolonie bei. Dies ist für sich genommen überraschend, weil systematische Untersuchungen der arbeitsteiligen Reproduktion zur Schlussfolgerung kamen, dass diese nur dann stabil ist wenn das Reproduktionsmonopol einem einzigen monogamen Elternpaar zufällt (**Lukas and Clutton-Brock, 2012**). Letzteres Modell ist überzeugend, weil allein in dieser Konstellation die Arbeitertiere, die auf Nachkommenschaft verzichten, eine 50%-ige genetische Übereinstimmung mit den reproduktiven Tieren, nämlich den Eltern oder Vollgeschwistern, haben. Um der Frage genauer auf den Grund zu gehen, haben wir Vaterschaftsanalysen an vier verschiedenen Nacktmullkolonien durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden 73 neue Mikrosatellitenmarker etabliert, von denen 62 informativ waren. Die Messung von 27-37 Markern bei 270 Nacktmullen konnte die Vaterschaft in allen Fällen auflösen. In allen vier Kolonien kam die Vaterschaft jeweils nur einem einzigen Männchen zu. Dies bestätigt das verallgemeinerte Modell, dass Monogamie eine voraussetzende Grundlage für arbeitsteilige Reproduktion ist. Diese Arbeiten stehen kurz vor der Einreichung zur Publikation (Szafranski *et al.*, in Vorbereitung).

## Ausblick

Aufgrund der behördlichen Auflagen bei der Durchführung der Tierversuche (WP3) kam es zu entsprechenden Verzögerungen in den aufbauenden WPs, die trotz kostenneutraler Projektverlängerung bis zum 30.6.2015 teilweise nicht abgeschlossen werden konnten (WP6/7). Zwei Expeditionen nach Äthiopien lieferten zwar umfangreiches Nacktmull-Wildtiermaterial, eine Altersserie (WP4) für statistisch fundierte Analysen konnte allerdings damit nicht realisiert werden. Wir planen aber, eine Altersserie durch Zootiere mit dokumentiert hohem Alter (20-30 Jahre) umzusetzen. Die Anschlussfinanzierung der laufenden Arbeiten (Personal, Verbrauchsmittel) erfolgt durch FLI und IZW. Der Abschluss der Vorhaben ist für Ende 2016 geplant.

Die bisherigen Ergebnisse der Expressionsanalysen bei den Krönungsexperimenten unterstützen die Hypothese, dass die Geschlechtsreife beim Nacktmull erst während oder nach Etablierung als ranghöchste Tiere der Kolonie (Königin/Pascha) erfolgt. Der Status der Tiere (Arbeiter, Krönungstier) manifestiert sich im Expressionsmuster. Globale Expressionsveränderungen bei den Königinnen korrelieren mit deren auffälliger

morphologischer Veränderung. Im Meerschweinchen gibt es keine signifikanten Expressionsmuster, die mit sexueller Aktivität korrelieren.

Es gibt erste Hinweise auf altersrelevante Gene, die eine gegenläufige Expression zwischen den Tierarten aufweisen. Während unverpaarte Nacktmulle und Meerschweinchen eine ähnliche Expressionshöhe zeigen, sind sie in Nacktmull-Krönungstieren und in verpaarten Meerschweinchen differentiell exprimiert. Dieses Expressionsmuster entspricht der dem Projektantrag zugrundeliegenden Hypothese und steht im Fokus weiterführender Analysen.

Für 2016 sind folgende abschließende Arbeiten und Publikationen geplant:

- Veröffentlichung der Dentalanalysen zur Alterseinschätzung;
- Etablierung einer auf dem Probenmaterial von Zootieren basierenden Nacktmull-Altersserie – Abschluss WP4;
- 2 Publikationen zu Messungen der klimatischen Gegebenheiten von Nacktmulltunnelsystemen, Ultraschalluntersuchungen und Blutparameter von Wildtieren;
- RNA-seq von nach November 2014 akquirierte Proben aus Nacktmull-Krönungsexperimenten (40) und der Nacktmull-Altersserie – Abschluss WP5;
- Publikation zu den vergleichenden Transkriptomanalysen der Krönungsexperimente bei Nacktmullen und Meerschweinchen sowie deren Relation zu altersrelevanten Expressionsänderungen – Abschluss WP6.

Weitere Synergieeffekte und vergleichende Analysemöglichkeiten ergeben sich zu dem derzeit laufenden DFG-Projekt „Molecular basis of delayed ageing in mammals with highly divergent ageing rates: African mole-rats *Fukomys* sp. (Rodentia)“ von FLI und Universität Essen-Duisburg (Philip Dammann). In Abhängigkeit von den Ergebnissen der oben genannten Abschlussarbeiten ist geplant, weiterführende Arbeiten in Form Projektanträgen im Rahmen der DFG und des Forschungsverbundes „Healthy Ageing“ zu finanzieren. Hierzu wurde ein gemeinsamer Förderungsantrag bei der Leibniz-Gemeinschaft (SAS) eingereicht.

## Wirtschaftliche Verwertbarkeit von Ergebnissen

Das Projekt erweitert den Kenntnisstand zur Transkriptom-basierten Expressionsanalyse von Nacktmullen und Meerschweinchen deutlich. Die Ergebnisse der *de novo* Assemblierung der Transkriptome beider Arten haben die entsprechenden Referenzdatensätze wesentlich verbessert. Der Wert der darauf basierenden Erkenntnisse besteht vor allem im Wissenszuwachs bezüglich der Geschlechtsreife beim Nacktmull.

Die gegenwärtig vorliegenden Ergebnisse haben Grundlagencharakter. Eine mögliche wirtschaftliche Verwertung von Ergebnissen muss nach Abschluss der noch geplanten Arbeiten Ende 2016 erneut erwogen werden. Dafür steht dem FLI die Ascenion GmbH als Technologietransferpartner beratend zur Seite.

## Beiträge von Kooperationspartnern

**Prof. Stanton Braude & Dr. Karen Norberg (Washington University, USA)** standen zur Teilnahme an der für Ende 2012 geplanten Kenia-Expedition zur Beprobung wildlebender Nacktmulle bereit. Aufgrund der widrigen bürokratischen Gegebenheiten bei der Planung kam diese Expedition jedoch nicht zustande. Für die später durchgeführten Äthiopien-Expeditionen stand Dr. Norberg leider aufgrund anderer dienstlicher Verpflichtungen nicht mehr zur Verfügung.

Prof. Braude hat aufgrund seiner umfangreichen Felderfahrung wesentlich zum Erfolg der beiden Äthiopien-Expedition beigetragen und ist an der Abfassung der darauf basierenden

Publikationen beteiligt. Zur Auswertung der Feldforschungsergebnisse gab es einen Forschungsaufenthalt von Prof. Braude (22.07. bis 05.08.2014) am IZW.

**Dr. Okita (Kenya Wildlife Department), Dr. Ngene & Dr. Muya (Jomo Kenyatta University of Agriculture and Technology, Kenia)** waren ursprünglich als Partner bei der Beprobung wildlebender Nacktmulle vorgesehen. Die Realisierung dieser Expedition gestaltete sich aus bürokratischen Gründen jedoch schwieriger als erwartet. Die kenianischen Vorstellungen für einen Kooperationsvertrag gingen weit über den Rahmen der eigentlich geplanten gemeinsamen Arbeiten hinaus und waren u.a. mit finanzielle Belastungen in einer Höhe von 10% des Projektbudgets verbunden. Trotz intensiver Bemühungen kam eine für beide Seiten akzeptabler Kooperationsvereinbarung nicht zustande. Daher entschlossen sich die Projektverantwortlichen die Expedition stattdessen nach Äthiopien zu verlegen.

**Prof. Alemayehu Lemma (Addis Abeba University, Äthiopien) & Dr. Fitsum Lemma (University of Haramaya, Äthiopien)** boten sich nach dem Scheitern der Bemühungen um eine Kenia-Expedition als Kooperationspartner für eine Äthiopien-Expedition zur Beprobung wildlebender Nacktmulle an. Aufgrund der erfolgreichen ersten Äthiopien-Reise verbunden mit einem deutlich reduzierten Kostenaufwand (die Kostenkalkulation der ursprünglichen Kenia-Expedition lag wesentlich höher) konnte zusätzlich eine zweite Äthiopien-Expedition durchgeführt werden. Zur Auswertung der Feldforschungsergebnisse gab es einen Forschungsaufenthalt von Prof. Alemayehu Lemma am IZW. Im Rahmen des Besuchs wurde am IZW gemeinsam mit dem FLI am 07.10.2014 ein eintägiges nationales Arbeitstreffen von Mull-Experten (Nacktmull, Graumull, Spalax) organisiert. Es nahmen insgesamt 17 Teilnehmer aus 8 wissenschaftlichen Einrichtungen teil.

**Prof. Gerd Birkenmeier (Universität Leipzig)**, ein langjähriger Kooperationspartner der AG Genomanalyse, übernahm weiterführende vergleichende biochemische Analysen des Alpha-2-Makroglobulins von Nacktmull und Mensch, deren Ergebnisse gemeinsam publiziert wurden (Thieme et al., 2015).

**Dr. Philip Dammann (Universität Duisburg-Essen)**, Partner der AG Genomanalyse im o.g. gemeinsamen DFG-Projekt, bot sich als Kooperationspartner bei weiterführenden vergleichenden Analysen zur Physiologie der Schilddrüsenhormone bei verschiedenen Mullspezies an. Die Ergebnisse wurden gemeinsam publiziert (Henning et al., 2014).

## Qualifikationsarbeiten

Rösel, Luzie. Untersuchungen am vervielfachten Genlokus des mitochondrialen Ferritins im Nacktmull (*Heterocephalus glaber*). Bachelorarbeit, Fachbereich Medizintechnik/Biotechnologie, Ernst-Abbe-Fachhochschule, Jena, 2012.

Richter, Andreas. Expression von Varianten des mitochondrialen Ferritins aus dem Nacktmull (*Heterocephalus glaber*). Bachelorarbeit, Fachbereich Medizintechnik/Biotechnologie, Ernst-Abbe-Fachhochschule, Jena, 2013.

Morhart, Michaela. Selective traits of pup ontogeny and reproduction in two captive naked mole-rat (*Heterocephalus glaber*) colonies. Masterarbeit, Fachbereich Verhaltens-, Neuro- und Kognitionsbiologie, Universität Wien, 09/2015.

Bens, Martin. Investigating natural ways to exceptional long healthspan. Promotion, Biologisch -Pharmazeutische Fakultät, Friedrich-Schiller Universität Jena, seit 08/2012, geplanter Abschluss 08/2016.

## Liste der Publikationen

- Bens M, Sahm A, Groth M, Jahn N, Morhart M, Holtze S, Hildebrandt TB, Platzer M, Szafranski K. FRAMA: from RNA-seq data to annotated mRNA assemblies. BMC Genomics, im Druck.
- Henning Y, Vole C, Begall S, Bens M, Broecker-Preuss M, Sahm A, Szafranski K, Burda H, Dammann P. Unusual ratio between free thyroxine and free triiodothyronine in a long-lived mole-rat species with bimodal ageing. PLoS One 9, e113698 (2014).
- Reichwald K, Petzold A, Koch P, Downie BR, Hartmann N, Pietsch S, Baumgart M, Chalopin D, Felder M, Bens M, Sahm A, Szafranski K, Taudien S, Groth M, Arisi I, Weise A, Bhatt SS, Sharma V, Kraus JM, Schmid F, Priebe S, Liehr T, Gorlach M, Than ME, Hiller M, Kestler HA, Voff JN, Scharl M, Cellerino A, Englert C, Platzer M. Insights into sex chromosome evolution and aging from the genome of a short-lived fish. Cell 163, 1527-1538 (2015).
- Thieme R, Kurz S, Kolb M, Debebe T, Holtze S, Morhart M, Huse K, Szafranski K, Platzer M, Hildebrandt TB, Birkenmeier G. Analysis of alpha-2 macroglobulin from the long-lived and cancer-resistant naked mole-rat and human plasma. PLoS One 10, e0130470 (2015).

### *Eingereichte bzw. kurz davor stehende Manuskripte:*

- Dziegelewska M, Holtze S, Vole C, Wachter U, Menzel U, Morhart M, Groth M, Szafranski K, Sahm A, Sponholz C, Dammann P, Huse K, Hildebrandt T, Platzer M. Low sulfide levels and a high degree of cystathionine-beta-synthase (CBS) activation by S-adenosylmethionine (SAM) in the long-lived naked mole-rat. Eingereicht bei Redox Biology.
- Szafranski K, Morhart M, Holtze S, Leinweber L, Lieckfeldt D, Ludwig A, Huse K, Platzer M, Hildebrandt TB. Naked mole-rat colonies are organized as monogamous monarchies.

## Maßnahmen zur Sicherung und Verfügbarmachung der im Vorhaben produzierten Forschungsdaten

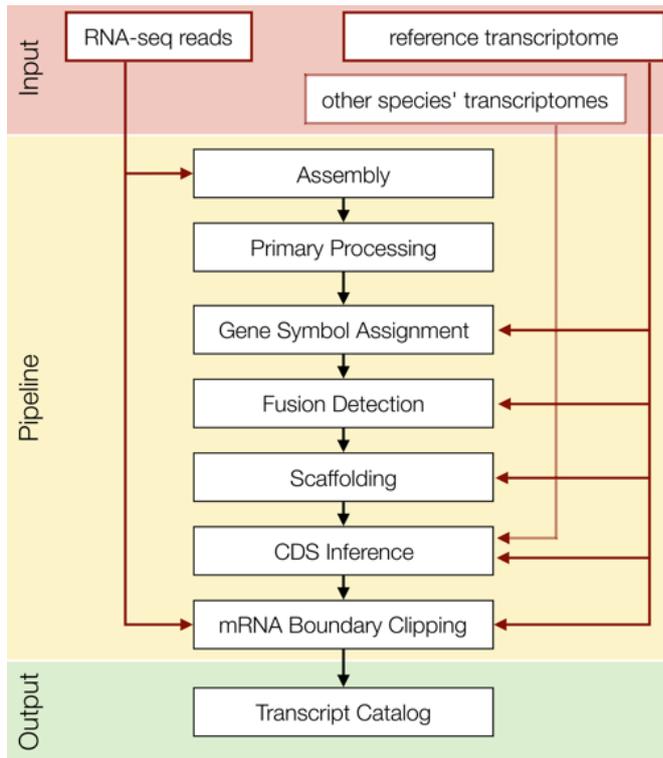
Das Programmpaket FRAMA ist für akademische Nutzer frei über das GitHub-Portal verfügbar <https://github.com/gengit/FRAMA>. Kommerzielle Interessenten können eine Lizenz über die Software-www-Seite der Arbeitsgruppe Genomanalyse des FLI erwerben <http://genome.imb-jena.de/software/index.php>.

Alle RNA-seq-Datensätze werden im Zusammenhang mit den jeweiligen Publikationen öffentlich zugänglich gemacht. Entsprechend wurde mit der FRAMA-Publikation in „Genome Research“ der Nacktmull-Transkriptkatalog (Bioproject PRJNA283581; GenBank transcriptome shotgun assembly (TSA) GEBF00000000) veröffentlicht.

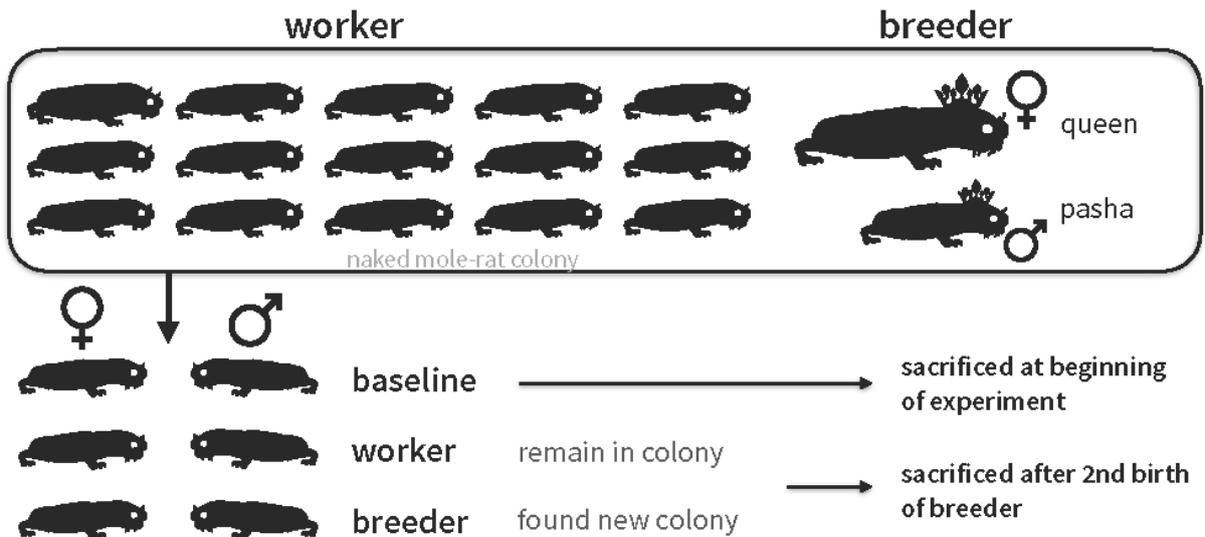
## Liste von Pressemitteilungen und Medienberichten

- 15.12.2011 - Eine "vergrabene" Anleitung zum gesunden Altern?  
<http://genome.leibniz-fli.de/news/download/news/2011-12-15-Naked-Nole-Rat-News.pdf>  
<http://www.alphagalileo.org/ViewItem.aspx?ItemId=115451&CultureCode=en>
- 03.12.2015 - Express-Altern und Zeitmaschine: Genom des Nothobranchius furzeri entziffert  
[http://genome.leibniz-fli.de/news/download/news/PM-nfgn\\_151209-d.pdf](http://genome.leibniz-fli.de/news/download/news/PM-nfgn_151209-d.pdf)  
[http://genome.leibniz-fli.de/news/download/news/PM-nfgn\\_151209-e.pdf](http://genome.leibniz-fli.de/news/download/news/PM-nfgn_151209-e.pdf)

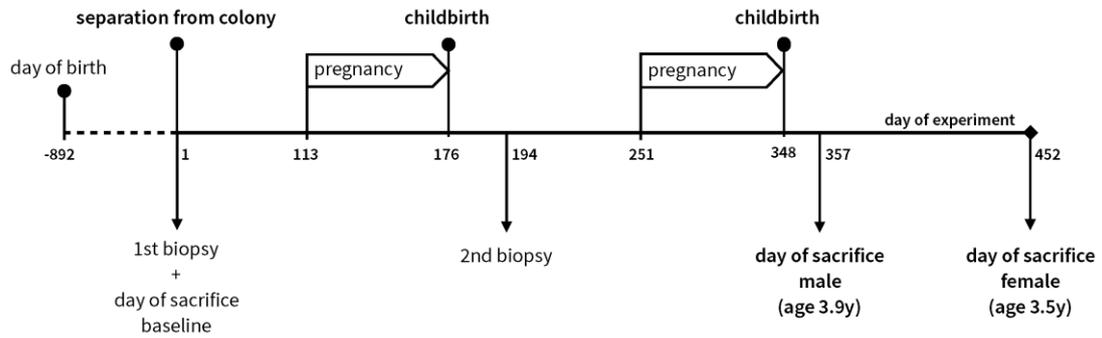
## Abbildungen



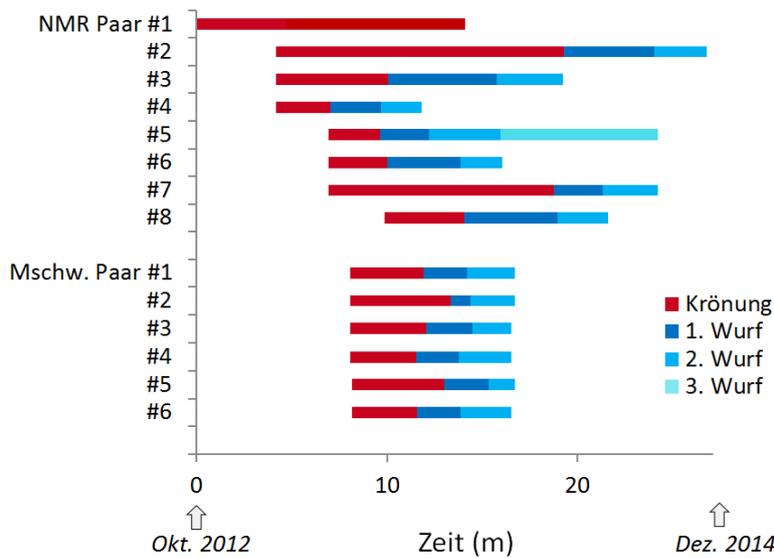
**Abbildung 1:** Programm FRAMA zur Erstellung eines Genkatalogs aus RNA-seq-Daten. Gliederung von Ein- und Ausgabe sowie Programmschritten.



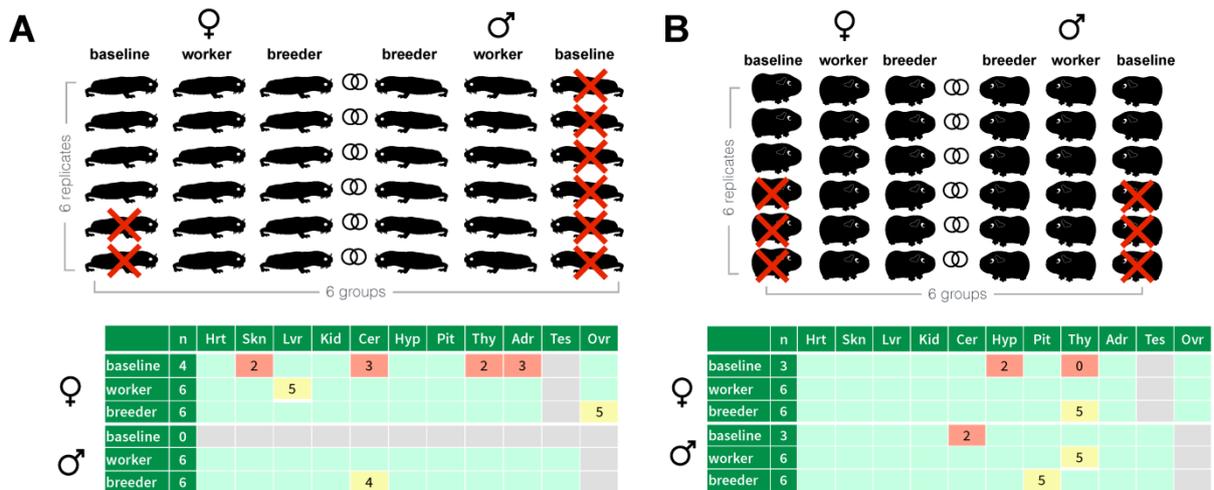
**Abbildung 2:** Versuchsdesign des Krönungsexperiment.



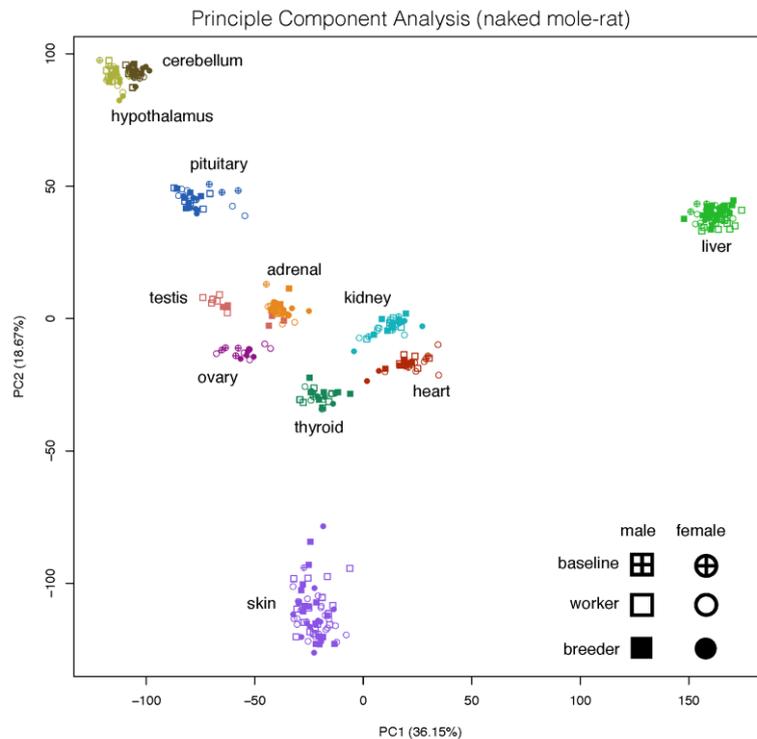
**Abbildung 3:** Einzelnes Krönungsexperiment im zeitlichen Verlauf, am Beispiel der Verpaarung von Tier 4722 und Tier 1147 (“Cleopatra” und “Caesar”).



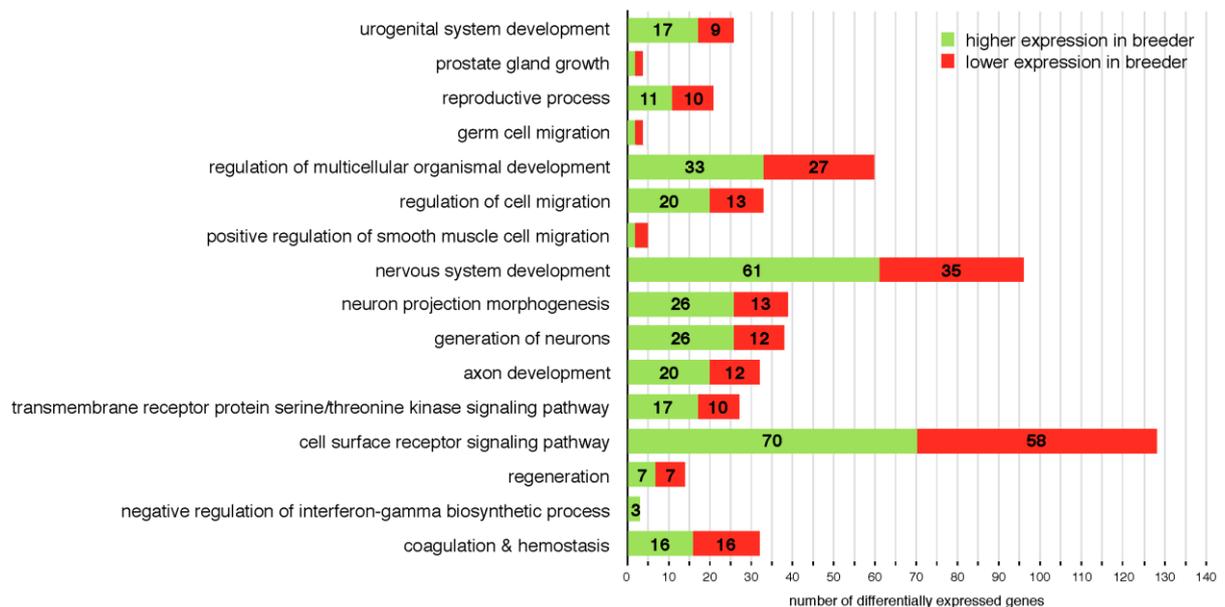
**Abbildung 4:** Zeitlicher Ablauf aller Krönungsexperimente. NMR: Nacktmulle, Mschw: Meerschweinchen.



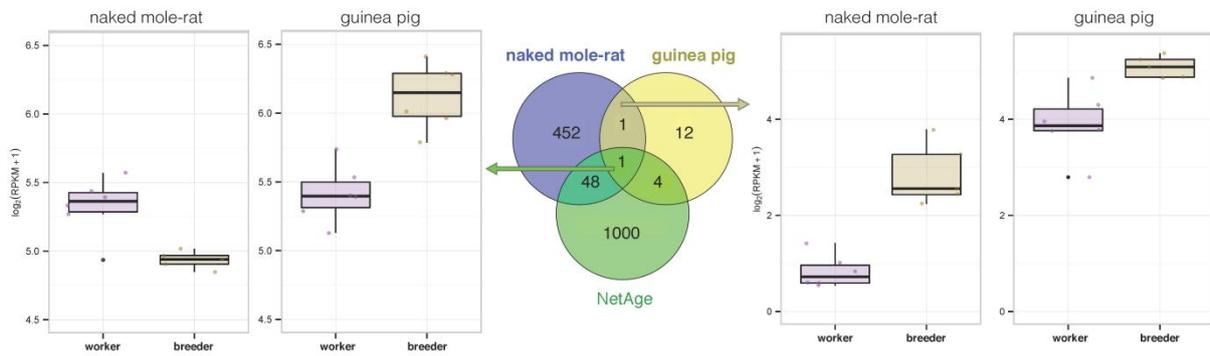
**Abbildung 5:** Übersicht der Proben, die für die Expressionanalysen verwendet wurden: (A) Nacktmull und (B) Meerschweinchen (Stand November 2015).



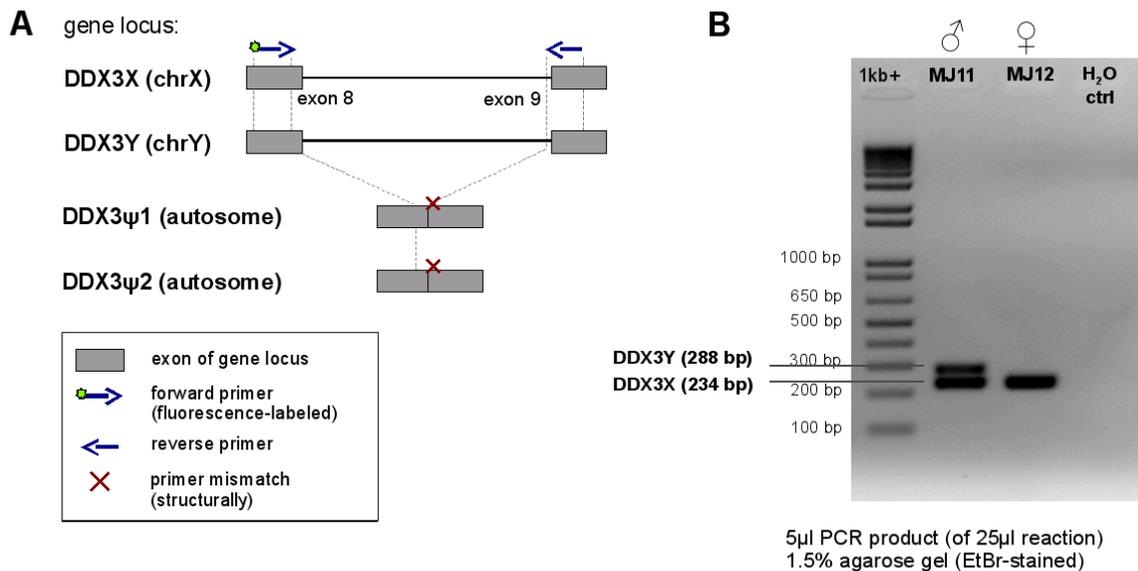
**Abbildung 6:** Hauptkomponentenanalyse der normalisierten Expressionsprofile (Nacktmull). Die Hauptkomponentenanalyse (PCA) projiziert die multidimensionalen Expressionsdaten derart in einen niederdimensionalen Raum, dass die Variabilität zwischen den einzelnen Proben maximal erhalten bleibt. Im Diagramm repräsentieren die Achsen die zwei Hauptkomponenten (PC), die die höchste Probenvariabilität abbilden. Jeder Datenpunkt repräsentiert ein Expressionsprofil aus einer Gewebeprobe (Gruppenlegende rechts unten).



**Abbildung 7:** Gene-Ontology-Analyse differenziell exprimierter Gene, die im im Nacktmull-Ovarium aus dem Vergleich von Arbeiter- und Krönungstieren identifiziert wurden. Gelistet sind statistisch überrepräsentierte funktionelle Kategorien mit der Anzahl der auf sie entfallenen Gene, aufgeschlüsselt nach höher- (grün) und niedriger exprimierten Genen (rot) in Krönungstieren.



**Abbildung 8:** Venn-Diagramm differenziell exprimierter Gene im Nacktmull und Meerschweinchen (Ovar, Arbeiter gegen Krönungstiere), sowie deren Überlapp mit altersrelevanten Genen (NetAge).



**Abbildung 9:** Molekulargenetische Geschlechtsbestimmung.

(A) Konzept des PCR-basierten Assays an den paralogen Genloci *DDX3X* (Chromosom X) und *DDX3Y* (Chromosom Y); weitere paraloge Genloci auf den Autosomen werden durch partiell intronische Lage des Reversprimers ausgeschlossen.

(B) Repräsentative PCR-Produkte von einem männlichen (linke Bahn) und einem weiblichen Tier (rechte Bahn).

## Referenzen

- Ashburner, M., Ball, C. A., Blake, J. A., Botstein, D., Butler, H., Cherry, J. M., Davis, A. P., Dolinski, K., Dwight, S. S., Eppig, J. T., *et al.* (2000). Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nat Genet* 25, 25-29.
- Austad, S. N. (2009). Comparative biology of aging. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 64, 199-201.
- Buffenstein, R. (2005). The naked mole-rat: a new long-living model for human aging research. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 60, 1369-1377.
- Burda, H., Honeycutt, R. L., Begall, S., Locker-Grütjen, O., and Scharff, A. (2000). Are naked and common mole-rats eusocial and if so, why? *Behav Ecol Sociobiol* 47, 293-303.
- Faulkes, C. G., Abbott, D. H., O'Brien, H. P., Lau, L., Roy, M. R., Wayne, R. K., and Bruford, M. W. (1997). Micro- and macrogeographical genetic structure of colonies of naked mole-rats *Heterocephalus glaber*. *Mol Ecol* 6, 615-628.
- Henning, Y., Vole, C., Begall, S., Bens, M., Broecker-Preuss, M., Sahm, A., Szafranski, K., Burda, H., and Dammann, P. (2014). Unusual ratio between free thyroxine and free triiodothyronine in a long-lived mole-rat species with bimodal ageing. *PLoS One* 9, e113698.
- Henry, E. C., Dengler-Crish, C. M., and Catania, K. C. (2007). Growing out of a caste--reproduction and the making of the queen mole-rat. *J Exp Biol* 210, 261-268.
- Hölldobler, B., and Wilson, E. O. (1990). *The ants* (Berlin Heidelberg New York: Springer).
- Katsushima, K., Nishida, C., Yosida, S., Kato, M., Okanoya, K., and Matsuda, Y. (2010). A multiplex PCR assay for molecular sexing of the naked mole-rat (*Heterocephalus glaber*). *Mol Ecol Resour* 10, 222-224.
- Keane, M., Craig, T., Alfoldi, J., Berlin, A. M., Johnson, J., Seluanov, A., Gorbunova, V., Di Palma, F., Lindblad-Toh, K., Church, G. M., and de Magalhaes, J. P. (2014). The Naked Mole Rat Genome Resource: facilitating analyses of cancer and longevity-related adaptations. *Bioinformatics* 30, 3558-3560.
- Kim, E. B., Fang, X., Fushan, A. A., Huang, Z., Lobanov, A. V., Han, L., Marino, S. M., Sun, X., Turanov, A. A., Yang, P., *et al.* (2011). Genome sequencing reveals insights into physiology and longevity of the naked mole rat. *Nature* 479, 223-227.
- Lukas, D., and Clutton-Brock, T. (2012). Cooperative breeding and monogamy in mammalian societies. *Proc Biol Sci* 279, 2151-2156.
- Mooney, S. J., and Holmes, M. M. (2013). Social condition and oxytocin neuron number in the hypothalamus of naked mole-rats (*Heterocephalus glaber*). *Neuroscience* 230, 56-61.
- Reichwald, K., Petzold, A., Koch, P., Downie, B. R., Hartmann, N., Pietsch, S., Baumgart, M., Chalopin, D., Felder, M., Bens, M., *et al.* (2015). Insights into Sex Chromosome Evolution and Aging from the Genome of a Short-Lived Fish. *Cell* 163, 1527-1538.
- Seluanov, A., Hine, C., Azpurua, J., Feigenson, M., Bozzella, M., Mao, Z., Catania, K. C., and Gorbunova, V. (2009). Hypersensitivity to contact inhibition provides a clue to cancer resistance of naked mole-rat. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 19352-19357.
- Tacutu, R., Budovsky, A., and Fraifeld, V. E. (2010). The NetAge database: a compendium of networks for longevity, age-related diseases and associated processes. *Biogerontology* 11, 513-522.
- Thieme, R., Kurz, S., Kolb, M., Debebe, T., Holtze, S., Morhart, M., Huse, K., Szafranski, K., Platzer, M., Hildebrandt, T. B., and Birkenmeier, G. (2015). Analysis of Alpha-2 Macroglobulin from the Long-Lived and Cancer-Resistant Naked Mole-Rat and Human Plasma. *PLoS One* 10, e0130470.