



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

Kultivierung von *Caenorhabditis elegans* über Flüssigmedium zur
Untersuchung des molekularen Folsäuremetabolismus

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Naturwissenschaften (Mag. rer.nat.)

Verfasserin / Verfasser:	Sophie Katharina Langer
Matrikel-Nummer:	0207906
Studienrichtung /Studienzweig (lt. Studienblatt):	A474 Diplomstudium Ernährungswissenschaften
Betreuerin / Betreuer:	Univ.-Prof. Dr. Jürgen König

Wien, im Juli 2009

Danksagung

Ein herzliches Dankeschön an Univ.- Prof. Dr. Jürgen König für die Themenvergabe, die rasche Korrektur und die tolle Unterstützung bei diversen Formatierungsschwierigkeiten. Mein Dank gilt auch Mag. Doris Freistetter, die immer Zeit für mich hatte und mir mit guten Ideen und Hilfestellungen zur Seite stand.

Besonders möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, ohne deren liebevolle Unterstützung mein gesamtes Studium und auch diese Arbeit nicht möglich gewesen wären. Vor allem meiner Mama ein großes Dankeschön für das mühselige Korrekturlesen. Auch meinen Großeltern, die mich immer durch ihr Interesse für mein Studium und meine Arbeit motivierten und durch glückbringendes Daumendrücken unterstützt haben, möchte ich an dieser Stelle von ganzem Herzen danken.

Meiner Schwester Stephanie, die immer ein offenes Ohr für mich hatte, danke ich ebenfalls für die vielen aufbauenden Worte, die liebevollen Aufmunterungen und die stets hilfreichen Tipps.

Meinem Freund Aris danke ich von ganzen Herzen vor allem für das geduldige Zuhören, das Verständnis und das tapfere Ertragen meiner Launen sowie die vielen wertvollen Ratschläge und Anregungen.

Zum Schluss danke ich all meinen Freunden, ins besonders meiner Freundin Monika, die immer aufbauende Worte für mich fand und auch in der noch so stressigen Zeit mich bei statistischen Problemen tatkräftig unterstützte.

Inhaltsverzeichnis:

1. Einleitung und Fragestellung	1
2. Caenorhabditis elegans	3
2.1. Was ist Caenorhabditis elegans?	3
2.2. Anatomie	4
2.3. Geschlechtsdifferenzierung	6
2.4. Lebenszyklus	7
2.5. <i>C. elegans</i> als Modellorganismus	9
2.6. <i>C. elegans</i> auf NGM-Platten	10
2.7. <i>C. elegans</i> im Flüssigmedium	11
3. Folsäure	14
3.1. Chemie	14
3.2. Vorkommen	15
3.3. Bedarf	16
3.4. Absorption und Metabolismus.....	17
3.5. Biochemische Funktionen im Stoffwechsel des Menschen	20
3.6. Der Folsäurestoffwechsel im Menschen	21
3.6.1.MTHFR.....	22
3.6.1.1. Der MTHFR C677T-Polymorphismus.....	22
3.6.1.2. Der MTHFR A1298C-Polymorphismus.....	24
3.6.2. Die Methioninsynthase (MS)	25
3.6.3. Cystathionin- β -Synthase (CBS).....	25
3.7. Folsäurebedarf bei <i>C. elegans</i>	26
3.8. Folsäureaufnahme bei <i>C. elegans</i>	27
3.8.1. Der folr1-Transporter	28

3.9. Homologe Gene des Folsäurestoffwechsels bei <i>C. elegans</i>	29
3.9.1. MTHFR bei <i>C. elegans</i>	29
3.9.2. MS bei <i>C. elegans</i>	30
3.9.3. CBS bei <i>C. elegans</i>	31
4. Material	34
4.1. Chemikalien.....	34
4.2. Geräte	37
4.3. Verbrauchsmaterialien	37
4.4. <i>C. elegans</i> -Stamm.....	38
4.5. OP 50 <i>Escherichia coli</i>	38
4.6. Zusammensetzung der Lösungen	38
4.6.1 LB-Bouillon.....	38
4.6.2. LB-Agar.....	39
4.6.3. NGM-Agar (Nematode Growth Medium).....	39
4.6.4. Cholesterin für den NGM-Agar.....	40
4.6.5. KPO ₄ -Puffer für den NGM-Agar.....	40
4.6.6. Nystatin-Lösung	40
4.6.7. Reinigungs-Lösung für die NGM-Platten.....	40
4.6.8. S-Puffer.....	41
4.6.9. M9-Puffer	41
4.6.10. Bleach-Lösung	41
4.6.11. CeHR (<i>C. elegans</i> Habitation and Reproduction)-Medium [nach HAMZA, k.A.]	41
5. Methoden.....	46
5.1. <i>C. elegans</i> auf NGM-Platten.....	46
5.1.1. Basistechniken mit <i>C. elegans</i>	46

5.1.1.1: Haltung und Vermehrung von <i>C. elegans</i>	46
5.1.1.2. Ansetzen, Beimpfen und „Seeden“ der OP50-Kultur	46
5.1.1.3. Umsetzen der Würmer	47
5.1.1.4. Entfernen von Bakterien/ Synchronisierung der Würmer.....	47
5.1.1.5. Einfrieren von <i>C. elegans</i> mittels Liquid Freezing Solution...	48
5.1.1.6 Beeinflussung der Anzahl von Männchen in einer Population	49
5.1.2. Versuche	50
5.1.2.1. Bodysize-Messungen	50
5.1.2.2. Life-Cycle	50
5.1.2.3. Ermittlung der Nachkommenschaft (Broodsize)	51
5.1.2.4. Lebensdauer von <i>C. elegans</i> (Lifespan).....	52
5.2. <i>C. elegans</i> im Flüssigmedium.....	52
5.2.1. Basistechniken mit <i>C. elegans</i> [Hamza I., k.A.].....	52
5.2.1.1. Starten einer Kultur von <i>C. elegans</i> im Flüssigmedium	52
5.2.1.2. Aufzucht und Haltung von <i>C. elegans</i> im Flüssigmedium.....	53
5.2.1.3. Egg Prep/-Bleachen	53
5.2.1.4. Mediumwechsel.....	54
5.2.2. Versuche	54
5.2.2.1. Bodysize-Messungen	54
5.2.2.2. Life-Cycle	55
6. Ergebnisse und Diskussion	56
6.1. Versuche auf NGM-Platten	56
6.1.1. Lifespan-Versuch	56
6.1.2. Broodsize von <i>C. elegans</i>	58
6.1.2.1. Broodsize der Hermaphroditen.....	58
6.1.2.2. Broodsize der Kreuzung Hermaphrodit und Männchen.....	59

6.1.2.3. Vergleich der Broodsize-Versuche.....	61
6.2. Versuche im Flüssigmedium und auf NGM-Platten.....	62
6.2.1. Bodysize-Messungen.....	62
6.2.1.1. Auf NGM-Platten.....	63
6.2.1.2. Im Flüssigmedium.....	64
6.2.1.3. Vergleich der Bodysize-Messungen.....	64
6.2.2. Life-Cycle.....	65
6.2.2.1. Auf NGM-Platten.....	65
6.2.2.2. Im Flüssigmedium.....	67
6.2.2.3. Vergleich der Life-Cycles.....	67
6.2.3. Vergleich des Flüssigmedium mit den NGM-Platten.....	68
7. Schlussbetrachtung:.....	70
8. Zusammenfassung:.....	72
9. Abstract.....	74
10. Anhang.....	76
10.1. Bodysize-Messungen.....	76
10.2. Lifespan.....	77
10.3. Broodsize.....	78
11. Literaturverzeichnis.....	80

Abbildungsverzeichnis:

Abb. 1: Querschnitt durch einen erwachsenen Hermaphroditen.....	5
Abb. 2: Ausgewachsener Hermaphrodit	5
Abb. 3: Anatomie eines adulten Männchens.....	6
Abb. 4: Life-Cycle bei 25°C.....	8
Abb. 5: Strukturformel der Folsäure	15
Abb. 6: Absorption von Folaten.....	18
Abb. 7: Metabolische Vorgänge der Folate.....	19
Abb. 8: Reduktion von Folsäure zu Tetrahydrofolsäure	20
Abb. 9: Der Folsäurestoffwechsel im menschlichen Körper.....	21
Abb. 10: Der Methionin-Zyklus.....	26
Abb. 11: Genomumgebung des C06H2.4-Genes	28
Abb. 12: Genposition der C08A8.1 Modelle	30
Abb. 13: Genomumgebung des R03D7.1-Gens	31
Abb. 14: Genomumgebung des F54A3.4.Gens	32
Abb. 15: Kaplan-Meier-Überlebenskurve	56
Abb. 16: Durchschnittlich gelegte Eier während der Eierlegeperiode	58
Abb. 17: Anzahl der gelegten Eier pro unbefruchteten Hermaphrodit	59
Abb. 18: Durchschnittlich gelegte Eier während der Eierlegephase	60
Abb. 19: Anzahl der gelegten Eier pro befruchteten Wurm.....	60
Abb. 20: Vergleich der durchschnittlich gelegten Eier eines unbefruchteten mit denen eines befruchteten Hermaphroditen	61
Abb 21: Vergleich der Bodysize-Messung mit der Literatur	65

Tabellenverzeichnis:

Tab. 1: D-A-CH Zufuhrempfehlung für Folsäure.....	16
Tab. 2: Genmodelle von C06A8.1	30
Tab. 3: Mittelwert der Körpergröße der verschiedenen Stadien von <i>C. elegans</i> verglichen mit der Literatur.....	63
Tab. 4: Mittelwert der Körperlängen der verschiedenen Stadien im Flüssigmedium.....	64
Tab. 5: Gegenüberstellung der Life-Cycles mit der Literatur	66

1. Einleitung und Fragestellung

Die junge Wissenschaft Nutritional Genomics, kurz „Nutrigenomics“, ist in den letzten Jahren immer mehr Teil der Ernährungswissenschaft geworden. Diese molekulare Ernährungsforschung legt ihr Augenmerk auf die Beeinflussung von Nährstoffen für diverse Stoffwechselwege in unserem Körper. So gilt es Störungen dieser Stoffwechselwege in den frühen Phasen ernährungsbedingter Krankheiten aufzuklären und das Ausmaß von verschiedenen sensibilisierten Genotypen auf diese Erkrankungen zu ermitteln [AFMAN und MÜLLER, 2006].

Folsäure, ein Vitamin der B-Gruppe, spielt vor allem in der embryonalen Entwicklung eine große Rolle. Doch auch in späteren Lebensphasen ist Folsäure von großer Bedeutung. Genaue Stoffwechselwege und Auswirkungen eines Mangels sind aber teilweise noch unbekannt. Mit Hilfe der Nutrigenomics sollen offene Fragen geklärt werden. So ist die Forschung der Folsäure auch ein Thema am Emerging Focus Nutrigenomics des Departments für Ernährungswissenschaften.

Caenorhabditis elegans wurde von Sydney Brenner in den 60iger Jahren als Modelloganismus eingeführt. Seitdem stieg seine Bedeutung in der Forschung stetig an. Bemerkenswert ist, dass für viele menschliche Gene, die bei Krankheiten eine Rolle spielen, *C. elegans* ein homologes Gen besitzt. So findet man in *C. elegans* auch homologe Gene für essentielle Enzyme des Menschen für den Folsäurestoffwechsel, wie die MTHFR, die MS oder die CBS. Durch Mutationen dieser Enzyme können in Folge diverse Krankheiten beim Menschen auftreten, wie Neuralrohrdefekte, Arteriosklerose oder Homocysteinurie. Dennoch sind viele Fragen zum Folsäurestoffwechsel offen, zu deren Beantwortung man auf die Hilfe von Studienergebnissen an *C. elegans* hofft.

Ziel dieser Arbeit war es, *C. elegans* am Emerging Focus Nutrigenomics des Departments für Ernährungswissenschaften zu etablieren sowie die grundlegende Handhabung und Basistechniken zu erarbeiten. Dazu zählen Medienwechsel, sowie diverse Versuche zur Entwicklung. Besonders die Etablierung von *C. elegans* im Flüssigmedium im Gegensatz zur Kultivierung auf Agarplatten mit *E. coli* als Nährstofflieferant ermöglicht den Grundstein für weitere Versuche im Bereich der Folsäureforschung.

2. *Caenorhabditis elegans*

2.1. Was ist *Caenorhabditis elegans*?

Caenorhabditis elegans ist ein kleiner, im Erdboden freilebender Nematode [WOOD, 1988] und gehört zu einer Tiergruppe, die durch ihre Artenvielfalt, hohe Individuendichte sowie teils große Nachkommenschaft gekennzeichnet ist [LORENZEN, 1996]. Er lebt in den meisten Temperaturregionen. Neben einer feuchten Umgebung sowie atmosphärischem Sauerstoff, benötigt er noch Bakterien als Futterquelle um zu überleben und gilt somit als relativ anspruchslos [HOPE, 1999].

C. elegans wurde erstmals von dem französischen Biologen Emile Maupas 1900 beschrieben, allerdings unter dem Namen *Rhabditis elegans*. Erst 1952 erhielt er seinen heutigen Namen durch den deutschen Biologen Günther Osche. Der Name *Caenorhabditis elegans* setzt sich aus der griechischen und lateinischen Sprache zusammen:

Caeno (griechisch): neu

Rhabditis (griechisch): Stock, Rute

Elegans (lateinisch): elegant

Von historischer Bedeutung sind zwei Stämme: Zum einen wurde *Bergerac* von Victor Nigon, Professor an der Universität in Lyon, aus dem Erdboden entnommen und zum anderen *Bristol*, erstmals isoliert von L.N. Staniland aus Pilzabfällen nahe Bristol, England [RIDDLE et al., 1997].

2.2. Anatomie

Die entwickelte *Caenorhabditis*-Larve, sowie auch die adulten Tiere bestehen aus einer konstanten Zahl somatischer Zellen bzw. Zellkernen [HAGEMANN, 1999]. Diese Konstanz in Zahl und Anordnung von Körperzellen (Eutelie) ist bei kleineren Nematoden verbreitet. Auch der Zelltod erfolgt bei *C. elegans* auf konstante Weise. Etwa 12% (= 131) aller im Leben gebildeter somatischer Zellen der Hermaphroditen sterben noch vor dem Erreichen des Adultstadiums ab [LORENZEN, 1996]. Im Larvenstadium besteht *C. elegans* aus 558 Zellen, der adulte Hermaphrodit aus 959 somatischen Zellkernen, wobei einige in Synzytien vorliegen. Ein adultes *Caenorhabditis*-Männchen besitzt 1031 Zellkerne. Darüberhinaus enthält jeder Wurm eine unbestimmte Anzahl an Geschlechtszellen. Sowohl Kern-, als auch Mitochondrien-DNA wurden vollständig sequenziert. Mit einer Größe von 10^8 Basenpaaren enthält das Kern-Genom 3.000 bis 4.000 Gene, die Mitochondrien-DNA besteht hingegen aus 13.784 Basenpaaren.

C. elegans kommt in 2 Geschlechtern vor: Männchen und Hermaphrodit. Der anatomische Aufbau des Wurmes ist bei beiden Geschlechtern sehr ähnlich. Das ausgewachsene Männchen ist nur etwas kürzer und dünner als der Hermaphrodit. Auf den genauen Aufbau, sowie die Unterschiede zwischen Hermaphrodit und Männchen wird in Kapitel 2.3. näher eingegangen.

C. elegans ist von einer dünnen Schutzschicht, der Kutikula umgeben, die aus mehreren Schichten Kollagen und damit assoziierten Proteinen zusammengesetzt ist. Direkt unter der Kutikula befindet sich eine flache Lage Hypodermiszellen, von denen die Kutikula gebildet wird. Entlang des gesamten Körpers verlaufen vier Längsmuskelstränge, die eine typische schlängelnde Fortbewegung des Wurmes ermöglichen. Neben den Längsmuskeln gibt es noch weitere spezialisierte Pharynx- und Vulva-Muskelzellen, sowie Muskelzellen des Exkretionssystems [SCHIERENBERG, CASSADA, 1986].

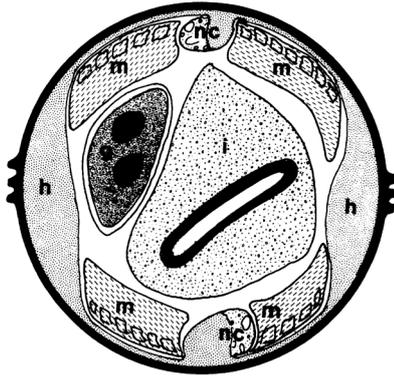


Abb. 1: Querschnitt durch einen erwachsenen Hermaphroditen, (g) Gonade, (h) Hypodermiszellen, (i) Darm, (m) Muskel, (nc) Nervenstrang; Quelle: WOOD, 1988

Der Verdauungstrakt, bestehend aus dem Pharynx und dem Darm, ist deutlich unter dem Mikroskop zu erkennen, da der Wurm durchsichtig ist. Er verläuft geradewegs vom Kopf bis zum Schwanz des Nematoden. Der Pharynx besteht aus 20 Muskelzellen, 20 Nervenzellen sowie 18 Epithelzellen [HOPE, 1999, S. 3]. Durch ständige Pumpbewegungen des Pharynx nimmt der Wurm Bakterien in die Mundhöhle auf. Nach Zerkleinerung gibt er die Nahrung an den Darm weiter.

Das Nervensystem des adulten Wurmes besteht aus 302 Zellen, wobei viele Zellen zu Ganglien gebündelt vorliegen. Um den Pharynx verläuft ein Nervenring, der das Gehirn des Wurmes bildet. Entlang der Bauchseite erstreckt sich der Hauptnervenstrang. Dieser besteht aus einer Serie von Motoneuronen, die die Körpermuskeln anregen. *C. elegans* verfügt auch über einige primitive Sinnesorgane, die als Mechano-, Thermo- und Chemorezeptoren fungieren [SCHIERENBERG, CASSADA, 1986].

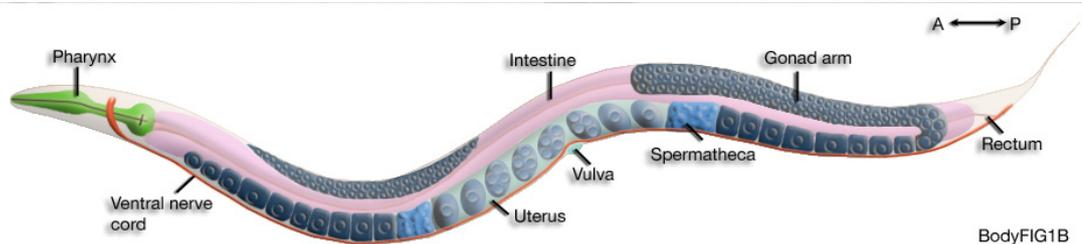


Abb. 2: Ausgewachsener Hermaphrodit, Quelle: www.wormatlas.com

2.3. Geschlechtsdifferenzierung

Der Wurm besitzt 5 Autosomen sowie ein X-Chromosom als Geschlechtschromosom. Die Geschlechtsbestimmung ist genetisch durch das Verhältnis Autosomen zu Heterosomen möglich. Hermaphroditen besitzen zwei X-Chromosome, wogegen X0-Formen Männchen sind. Die X0-Form entsteht durch „non-disjunction“, einem Verteilungsfehler während der Meiose [WOOD, 1988]. Die Hermaphroditen produzieren Spermien sowie auch Eizellen und können sich somit selbst befruchten ohne sich zu paaren, im Gegensatz zu den Männchen, die nur Spermien produzieren und so zur Fortpflanzung auf einen Hermaphroditen angewiesen sind. Nur etwa 0,1-0,2% der Population sind Männchen [CORSI, 2006]. Durch eine Kreuzung eines Hermaphroditen mit einem Männchen entstehen beide Geschlechter zu gleichen Anteilen, wogegen bei Selbstbefruchtung fast nur Hermaphroditen entstehen [HOPE, 1999].

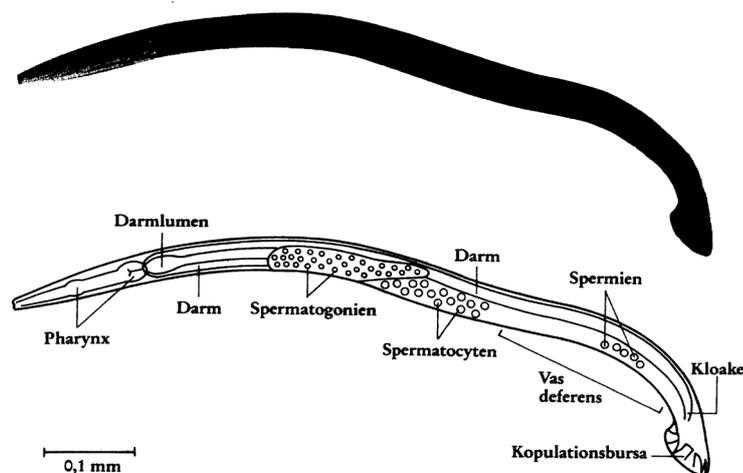


Abb. 3: Anatomie eines adulten Männchens, Quelle: SCHIERENBERG und CASSADA, 1986

Die Embryonalentwicklung der beiden Geschlechter verläuft nahezu ident. Das erste Anzeichen des sexuellen Dimorphismus ist im letzten Drittel der Embryogenese ersichtlich. Durch programmierten Zelltod sterben zwei hermaphroditen-spezifische Neuronen beim Männchen, sowie vier männlich-spezifische sensorische Neuronen beim Hermaphroditen ab. Es folgen

weitere geschlechtstypische Dimorphismen im ersten Larvenstadium, allerdings erst im L4-Stadium werden diese deutlich. Neben unterschiedlichen Verhaltensweisen zwischen Hermaphroditen und Männchen gibt es auch anatomische Abweichungen. So entsteht beim Hermaphroditen eine zweiarmige Gonade, in der Spermatogenese sowie Oogenese hintereinander stattfinden. Hingegen weisen Männchen nur eine einarmige Gonade auf, die in etwa 3000 Spermien enthält. Ein weiteres Unterscheidungsmerkmal ist der ungleich ausgeprägte Schwanz. Beim Hermaphroditen ist dieser nicht spezialisiert und spitzt sich gegen Ende hin zu, während sich beim Männchen das Schwanzende fächerartig ausweitet. Durch dieses markante Merkmal lassen sich Hermaphroditen und Männchen leicht unterscheiden. Weitere Unterschiede finden sich in geschlechtsspezifischen Muskeln oder Neuronen, die vor allem dem Eierlegen sowie der Paarung dienen. So ist zum Beispiel nur der Darm der Hermaphroditen darauf spezialisiert, Dotter zu bilden [EMMONS, STERNBERG, 1997].

2.4. Lebenszyklus

Unter standardisierten Laborbedingungen wächst der Wurm sehr rasch. Der Lebenszyklus dauert bei 20°C vom Ei bis zum erwachsenen eilegenden Wurm etwa 3.5 Tage. Bei 25°C verkürzt sich diese Spanne auf etwa 3 Tage, bei 15°C dauert ein Zyklus 6 Tage. Der Populationszuwachs ist bei 20°C am größten, mit einer Nachkommenschaft von mehr als 300 Würmern während einer 4-tägigen Eierlegephase

Die Entwicklung von der Befruchtung bis zum Schlüpfen der L1-Larve wird als Embryogenese bezeichnet. Das erste Larvenstadium hat schon denselben anatomischen Aufbau wie der ausgewachsene Wurm, nur kleiner, anstelle von 1mm etwa 250µm. Die postembryonale Entwicklung umfasst insgesamt 4 Stadien: L1-L4, bevor der Wurm durch eine letzte Häutung seine endgültige Größe und Aussehen erreicht. Bei 20°C dauert die

Embryogenese etwa 14 Stunden [HOPE, 1999], wobei die Entwicklung des Embryos bereits im Hermaphrodit beginnt. Sobald der Embryo das 28 bis 30 Zellstadium erreicht, beginnt die Eierlegephase und er wird an die Außenwelt abgegeben.

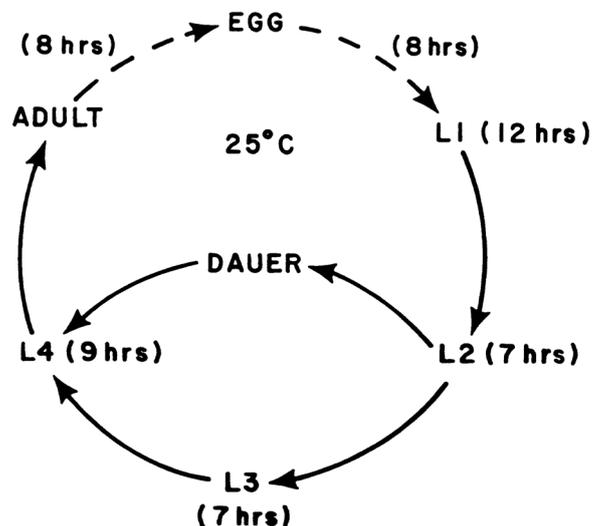


Abb. 4: Life-Cycle bei 25°C, Quelle: RIDDLE 1988

Die weitere Embryogenese verläuft nun vollständig den Umwelteinflüssen ausgesetzt in etwa 13 Stunden, bis zu einer Zellzahl von 558 Zellen. Damit ist das erste Larvenstadium erreicht und die L1-Larve schlüpft. Durch eine Häutung entsteht nun die L2-Larve [CORSI, 2006].

Wenn keine Nahrung vorhanden ist und eine große Populationsdichte vorherrscht, entsteht nach der zweiten Häutung anstelle von L3, das Larvenstadium „Dauerlarve“. Diese Form ist ein Beispiel von fakultativer Diapause und ermöglicht *C. elegans* unter widrigen Umweltbedingungen zu überleben. So kann der Wurm auch bei Nahrungskarenz oder Trockenheit einige Monate unbeschadet überleben. Diese etwas dünnere „Dauerlarve“ kann sich zwar aktiv bewegen, benötigt aber keine Nahrung, hat eine einzigartige Morphologie sowie Energie-Stoffwechsel, ist Stress-resistent und auch ihre Entwicklung ist gestoppt. So altert diese Larvenform nicht, da der Zeitraum der „Dauer“-Form nicht die gesamte Lebensspanne beeinflusst.

Dauerlarven leben drei bis achtmal solange wie Tiere, die sich direkt in das L3-Stadium weiterentwickeln. Wenn sich die Lebensbedingungen wieder bessern und mehr Nahrung vorhanden ist, findet eine Häutung zur L4-Larve statt. Schon etwa 2-3 Stunden nachdem man der Dauerlarve Nahrung zuführt, beginnt diese erneut zu fressen, nach 8-10 Stunden ist das L4-Stadium erreicht [RIDDLE, 1988].

2.5. *C. elegans* als Modellorganismus

Sydney Brenner etablierte 1965 *Caenorhabditis elegans* als Modellorganismus [RIDDLE et al., 1997]. In den letzten Jahrzehnten ist die Beliebtheit an *C. elegans* als Modellorganismus deutlich angestiegen. Dieser Nematode weist eine Vielzahl von Vorteilen und speziellen Eigenschaften auf, die seinen vielseitigen Einsatz in diversen Forschungsbereichen rechtfertigen. Diese Eigenschaften sind [CORSI, 2006]:

- Er ist einfach und kostengünstig im Labor zu kultivieren. Er kann sowohl auf Agarplatten sowie auch im Flüssigmedium gehalten werden.
- Es handelt sich um einen einfachen Vielzeller mit einer konstanten Zellanzahl (Eutelie) von etwa 1000 somatischen Zellen.
- Die kurze Generationszeit von etwa 3 Tagen sowie die große Nachkommenschaft von bis zu 1000 Würmern ermöglichen rasche Versuchsdurchführungen.
- Auch für die Genetik eignet sich *C. elegans* gut als Modellorganismus aufgrund seines sexuellen Dimorphismus. Die Hermaphroditen, die durch Selbstbefruchtung gekennzeichnet sind, ermöglichen eine Aufrechterhaltung homozygoter Mutationen, während man die Männchen für Kreuzungen verwenden kann.

- Der Wurm ist während des gesamten Lebenszyklus transparent. Dies ermöglicht die genaue Beobachtung diverser Zellabläufe wie etwa die Mitose oder die Cytokinese in Echtzeit.
- Die Tiere tolerieren auch Einfrieren. Auch die Ausbildung der „Dauer“-Form ermöglicht eine lange Aufbewahrung des Wurmes.
- 1998 war *C. elegans* der erste Vielzeller, dessen gesamtes Genom sequenziert wurde [HOPE, 1999]. Die Ähnlichkeit zum menschlichen Genom ist außergewöhnlich. Für etwa 40% der mit Krankheiten assoziierten Gene des Menschen existiert ein homologes Gen in *C. elegans*.

2.6. *C. elegans* auf NGM-Platten

Die kostengünstigste und einfachste Haltung von *C. elegans* erfolgt auf dem Nematode Growth Medium (NGM)-Agar. Dieser wird im flüssigen Zustand in Petrischalen gegossen und nach dem Trocknen mit der Nahrungsquelle *E. coli* versetzt. Je nach Verwendungszweck stehen verschiedene Größen von Petrischalen zur Verfügung. Kleine Platten (35 mm) werden vor allem für Kreuzungsversuche eingesetzt. Die mittlere Plattengröße (60 mm) eignet sich am besten zur Erhaltung der Population, während die größten Platten (120 mm) meist nur dann zum Einsatz kommen, wenn rasch eine Vielzahl an Würmern benötigt wird [STIERNAGLE, 2006]. Als Nahrungsquelle dienen üblicherweise *Escherichia coli* des Stammes OP50. Dieser Stamm ist Uracil auxotroph und überwuchert die NGM-Platten nicht. Kommt es zu einer Überwucherung durch die Bakterien können sich die Würmer nicht mehr so gut fortbewegen. Das Wachstum sowie auch die Beobachtung sind dadurch eingeschränkt. Wenn die NGM-Platten über einen längeren Zeitraum gelagert werden, kann Nystatin dem Agar zugesetzt werden. Dies verhindert einen Pilzbefall der Platten. *C. elegans* kann auch auf einem definierten synthetischen Medium gehalten werden ohne Bakterien als Nahrungsquelle.

Allerdings ist diese Variante teurer und das Wachstum der Würmer im Gegensatz zu NGM-Platten vermindert [LEWIS, FLEMING, 1995].

2.7. *C. elegans* im Flüssigmedium

Viele Jahre war die Haltung von *C. elegans* auf NGM-Platten das erste Mittel der Wahl. Jedoch erwies sich das Flüssigmedium als eine sehr vielseitige und einfache Kultivierungsart. Prinzipiell gibt es „monoxenische“ Medien, die eine zugesetzte Spezies oder Gewebe enthalten (z.B. das Alfalfa-Kallus-Gewebe), „dixenische“ Medien, die zwei zugefügte Spezies oder Gewebe enthalten usw. Medien die chemisch undefiniert sind nennt man „oligidisch“; „meridisch“ nennt man Medien, die aus einem definierten Grundanteil und variierenden Supplementen bestehen, im Gegensatz zu „holidischen Medien“, die nur genau definierte und unvermischte Chemikalien enthalten.

Bis zur Entwicklung des heute verwendeten axenischen Flüssigmediums gab es eine Vielzahl von Medien mit verschiedenen Inhaltsstoffen und Nahrungsquellen für *C. briggsae* bzw. *C. elegans*. Damit ein Wachstum sowie die Reproduktion von *C. briggsae* garantiert ist, wurden einerseits Bakterien, andererseits auch sogenannte „Wachstumsfaktoren“ dem Medium zugesetzt. So gab man früher etwa Hühnerembryoextrakte, Leberextrakte oder die Leberproteinfaktoren b und c dem Medien hinzu [VANFLETEREN, 1978]. Oft wurden auch Bakterien, wie *E. coli* als Nahrungsquelle zugegeben; dies kann sich allerdings als nachteilig erweisen. So ist der Zusatz eines zweiten komplexen Organismus in das Flüssigmedium bei der Auswertung ein Problem. Es kann zu Verwechslungen der Resultate kommen, da Nährstoffe oder andere Zusätze im Medium von *E. coli* verstoffwechselt oder modifiziert werden können. Um dieses Problem zu umgehen wurde vor über 30 Jahren ein definiertes Wachstumsmedium, das *Caenorhabditis briggsae* Maintenance Medium (CbMM) entwickelt. Dieses axenische Medium ist im Gegensatz zu früheren Flüssigmedien erstmals frei von jeglichen Kontaminationen und kann daher als steril angesehen werden.

Mittels wenigen Veränderungen wurde das CbMM zur Kultivierung von *C. elegans* angepasst. So entstand das *Caenorhabditis elegans* Maintenance Medium, kurz CeMM. Erstmals war es möglich nicht nur eine sehr große Population an Würmern ohne dementsprechenden Platzverbrauch zu kultivieren, sondern auch die Nährstoffe an die Versuche anzupassen. Allerdings ist die Wachstumsrate im CeMM deutlich langsamer als auf NGM-Platten. Tiere des N2-Wildtyps brauchen im CeMM zwei bis dreimal solange um eine Länge von 1 mm zu erreichen, als wenn sie auf NGM-Platten gehalten werden. Auch die Anzahl der Nachkommenschaft ist bei der Kultivierung im CeMM geringer als auf NGM-Platten. Einige Studien kamen somit zu dem Entschluss, dass ein axenisches Flüssigmedium „ungesund“ für *C. elegans* wäre, da seine Entwicklung länger dauert und die Nachkommenschaft geringer ist [SZEWCZYK et al., 2003]. Daher war es wichtig das Medium zu optimieren, um die experimentellen Ergebnisse und Daten mit denen der auf NGM-Platten lebenden Tiere vergleichen zu können. Dr. Eric Clegg formulierte 2002 das *Caenorhabditis elegans* Habitation and Reproduction-Medium (CeHR). Dieses axenische Medium erlaubt erstmals eine raschere Entwicklung von *C. elegans*. Das CeHR-Medium basiert auf den bisher publizierten Medien, sowie dem CbMM, enthält allerdings 20% (v/v) einer sterilen ultra-hocherhitzten Milch. Basierend auf dieser neuen Kultivierungsart, hat Dr. Iqbal Hamza die Nährstoffzusammensetzung des CeHR-Mediums verfeinert und so die maximale Wachstumsrate von *C. elegans* mit der maximalen Wachstumsrate auf NGM-Platten vergleichbar gemacht [HAMZA, 2005; HAMZA, k.A.].

Die Möglichkeit den Wurm in diesem definiertem Flüssigmedium zu halten, eröffnet eine völlig neue Dimension im Bereich der *C. elegans*-Forschung. Dies wird auch in Zukunft von großem Nutzen für die Analyse von genetischen und molekularen Faktoren in der Ernährungsforschung und bei toxikologischen Untersuchungen sein [HAMZA, k.A.]. Daher arbeitet auch das Department Emerging Focus Nutrigenomics mit dem von Hamza

überarbeiteten mCeHR-Medium und verwendet es auch für seine
Versuchsreihe im Flüssigmedium.

3. Folsäure

3.1. Chemie

Folsäure, Pteroylmonoglutaminsäure, ist ein wasserlösliches Vitamin aus der B-Vitamingruppe [STANGER, 2004]. Die Folsäure ist ein essentieller Nährstoff, der vom Menschen nicht synthetisiert werden kann und daher über die Nahrung zugeführt werden muss.

Folsäure wurde erstmals in den 30er Jahren entdeckt, als Patienten mit Megaloblastärer Anämie durch die Gabe von Hefe- und Leberextrakten behandelt wurden. Der wirksame Faktor dieser Extrakte wurde wenig später als essentieller Wachstumsfaktor für die Bakterien *Lactobacillus casei* und *Streptococcus faecalis* entdeckt. 1946 gelang dann erstmals die Aufklärung der chemischen Struktur sowie die Synthese [BÄSSLER et al., 2002]. Der Name Folsäure leitet sich vom lateinischen Wort folium (= Blatt) ab, da die Folsäure in grünem Blattgemüse in hoher Konzentration gefunden wurde [DONNELLY, 2001].

Unter Folsäure werden allgemein mehrere Derivate verstanden, die sich von einem gemeinsamen Grundskelett ableiten, aber unterschiedliche metabolische Eigenschaften aufweisen [STANGER, 2004]. Um Fehlinterpretationen zu vermeiden, unterscheidet man zwischen Folsäure und den Folaten. Der Begriff Folat umfasst die Summe aller folat-wirksamen Verbindungen [BÄSSLER et al., 2002].

Folate bestehen aus einem Pteridinring, an dem über eine Methylengruppe am C6 die Aminogruppe der p-Aminobenzoesäure und an deren Carboxylgruppe über eine Amidbindung, die Glutaminsäure gebunden ist. An der γ -Carboxylgruppe der Glutaminsäure können weitere Glutamatreste konjugiert sein [BÄSSLER et al., 2002]. Pteridin und p-Aminobenzoat bilden zusammen die Pteroinsäure. Je nach Anzahl der Glutamylreste

unterscheidet man Pteroylmonoglutamat (PteGlu) oder Pteroylpolyglutamate (PteGlu2-7) [BIESALSKI et al., 2002].

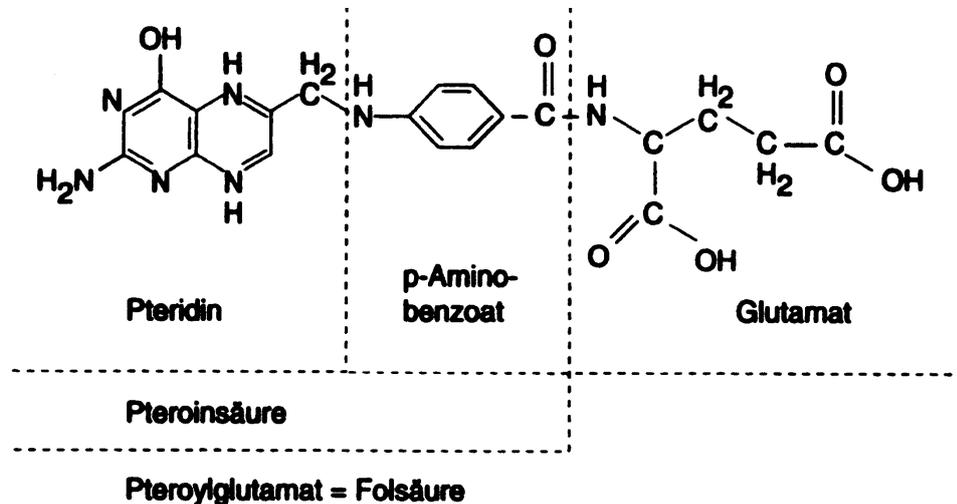


Abb. 5: Strukturformel der Folsäure, Quelle: BÄSSLER et al., 2002

Folsäure besteht aus einem Pteridinring und p-Aminobenzoesäure, an deren Carboxylende mindestens ein Glutamatmolekül gebunden ist. Die biologisch aktive Form der Folsäure ist das 5,6,7,8-Tetrahydrofolat, THF. Es entsteht aus dem Folat durch stufenweise Reduktion unter Verbrauch von zwei Molekülen NADPH mit 7,8-Dihydrofolat als Zwischenprodukt [STANGER, 2004].

3.2. Vorkommen

Folate kommen sowohl in pflanzlichen, als auch in tierischen Lebensmitteln vor. Das Vitamin ist praktisch in allen Blattgemüsen vertreten. Besonders gute Folsäurequellen sind Spinat, Salat, Spargel, Tomaten, Kohl, Getreide, sowie Leber. Relativ folatarm sind im Gegensatz dazu Rindfleisch, Fisch und Obst. Grundsätzlich aber werden Folate aus Nahrungsmitteln tierischer Herkunft besser absorbiert, als aus pflanzlichen Nahrungsbestandteilen [BÄSSLER et al., 2002]. Die in der Nahrung enthaltenen Folate liegen in den

unterschiedlichsten Bindungsformen vor, wobei sich die verschiedenen Polyglutamate im Hinblick auf ihre Bioverfügbarkeit stark unterscheiden. Viele Lebensmittel enthalten auch Inhibitoren, die die Konjugaseaktivität und somit auch die Bioverfügbarkeit reduzieren. Zusätzlich ist Folsäure sehr licht- und oxidationsempfindlich. Daher ist die Bioverfügbarkeit von Nahrungsfolat keine konstante Größe, sondern variiert erheblich [BIESALSK et al., 2002].

3.3. Bedarf

Altersgruppe	Nahrungsfolat ($\mu\text{g-}\ddot{\text{A}}/\text{Tag}$)
0-4 Monate	60
4-12 Monate	80
1-4 Jahre	200
4-10 Jahre	300
10-15 Jahre	400
Jugendliche und Erwachsene ¹	400
Schwangere und Stillende	600

Tab. 1: D-A-CH Zufuhrempfehlung für Folsäure, modifiziert nach DGE et al., 2008

¹ Frauen, die schwanger werden wollen oder können, sollten zusätzlich 400 μg synthetischer Folsäure (= Pteroylmonoglutaminsäure/ PGA) in Form von Supplementen aufnehmen, um Neuralrohrdefekten vorzubeugen. Diese erhöhte Folsäurezufuhr sollte spätestens 4 Wochen vor Beginn der Schwangerschaft erfolgen und während des ersten Drittels der Schwangerschaft beibehalten werden. Quelle: DACH- Referenzwerte für die Nährstoffzufuhr, 2001

3.4. Absorption und Metabolismus

Folate liegen in der Nahrung hauptsächlich (zu 60-80%) als Polyglutamate vor (5-Methyl-THF und 10-Formyl-THF). Da aber nur Monoglutamate absorbiert werden können, müssen die Polyglutamatverbindungen durch eine in der Bürstensaummembran des Duodenum und des Jejunum enthaltene γ -Glutamylcarboxypeptidase (Konjugase) gespalten werden [BIESALSK et al., 2002]. Die Folsäure liegt nun als Monoglutamat vor und kann so leicht, vor allem im proximalen Dünndarm, absorbiert werden [STANGER, 2004].

Für die Folsäureresorption in die Zellen stehen mindestens 3 Transportsysteme zur Verfügung:

- der „Reduced Folate Carrier“, RFC
- der „Folatrezeptor α bzw. β “, FR α oder FR β
- und der „Protonen gekoppelte Folattransporter“, PCFT

Diese Rezeptoren unterscheiden sich durch ihre unterschiedliche Affinität für die Folatverbindungen sowie durch spezifische Temperatur und pH-Optima. Der Protonen gekoppelte Folattransporter stellt den Haupttransporter im Dünndarm dar. Der PCFT hat sein pH-Optimum im sauren Bereich, etwa bei pH 6,0-6,2 und ist somit den Bedingungen des Dünndarms perfekt angepasst [ZHAO, GOLDMAN, 2007].

Etwa 20-30% der Folate werden unabhängig von der Folatkonzentration passiv, über Diffusion, in die Zellen aufgenommen [BÄSSLER et al., 2002]. Abbildung 6 gibt einen Überblick über die Folsäureaufnahme im Körper. Im Blut findet man neben THF und 10-Formyl-THF hauptsächlich 5-Methyl-THF, das unspezifisch an Albumin, α -Makroglobulin und an Transferrin mit niedriger Affinität gebunden ist [STANGER, 2004]. Der Serum-Folatspiegel eines normal ernährten Menschen liegt zwischen 7-17 ng/ml, die Gesamtkörpermenge an Folat im menschlichen Organismus liegt zwischen

5-10 mg [BÄSSLER et al., 2002], wobei die Leber das wichtigste Speicherorgan ist.

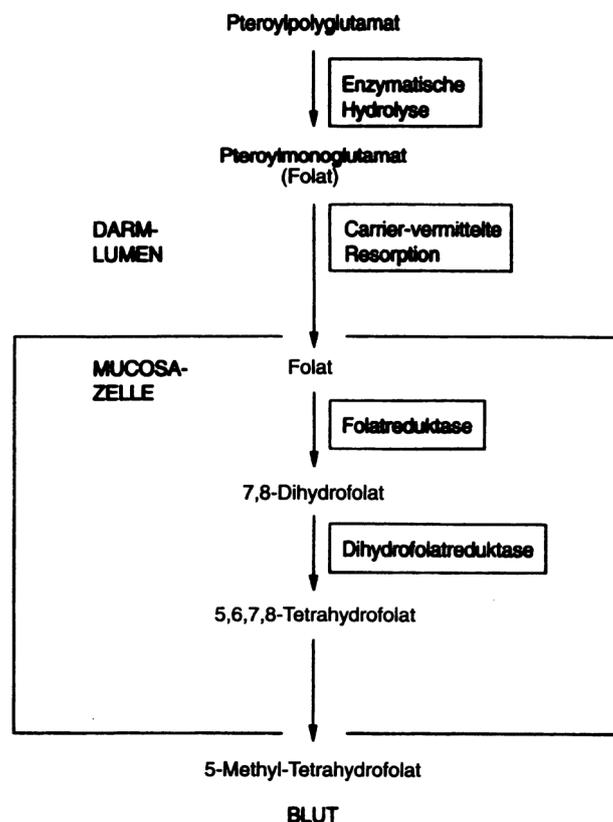


Abb. 6: Absorption von Folate, Quelle: BÄSSLER et al., 2002

Die Aufnahme der Folate in die Zielzellen erfolgt nun ebenfalls mittels dieser spezifischen Transportsysteme. Das Transportprotein mit geringer Affinität für Folsäure, jedoch großer Kapazität für reduziertes Folat (5-MTHF) ist der „Reduced Folate Carrier“ [STANGER, 2004]. Der RFC, oder auch SLC19A1, ist das Haupttransportsystem für Folate in fast allen Zellen und Geweben von Säugetieren. Das pH-Optimum des RFC liegt im neutralen Bereich bei etwa 7,4. Neben seiner allgemeinen Aufgabe des Folattransportes, besitzt der RFC noch einige spezialisierte Funktionen wie die Absorption über intestinale/colonale Epithelien, den Transport über die basolaterale Membran des proximalen Tubulus der Niere, sowie den Transport von Folate über die „Plazenta-“ und die „Blut-Hirn-“ Schranken hinweg. Eine verminderte Anzahl an RFC kann daher mit einem Folsäuremangel einhergehen, der sich in

kardiovaskulären Erkrankungen, fetalen Missbildungen, neurologischen Beschwerden und möglicherweise Krebs äußern kann [MATHERLY, HOU, 2008].

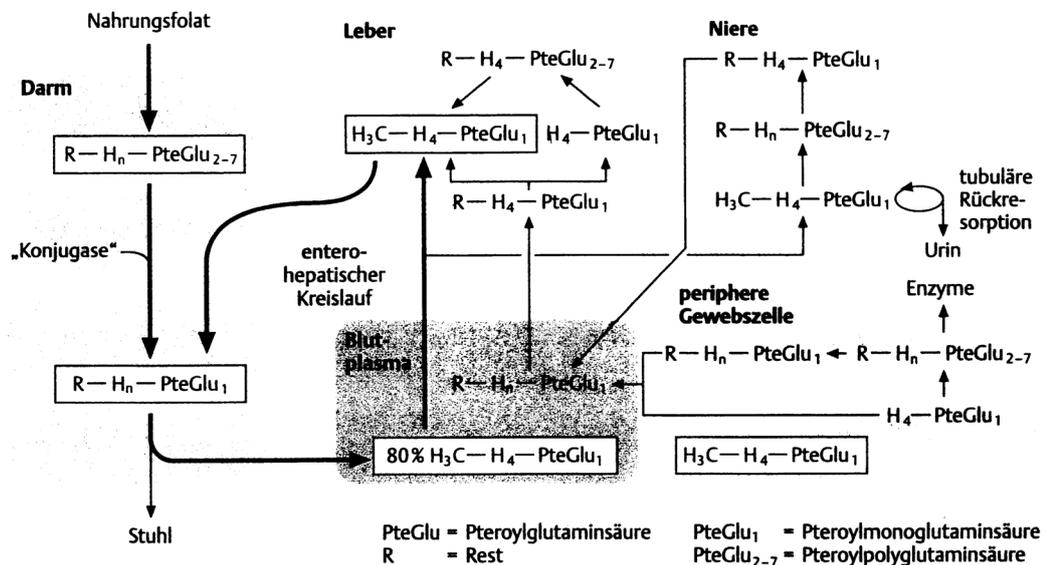


Abb. 7: Metabolische Vorgänge der Folate, Quelle: BIESALSKI et al., 2002

Die Ausscheidung erfolgt über Urin, Fäzes und Galle, wobei die Verluste über den Urin mit 1-12 µg/ Tag in Form von Folsäure, 5-Methyl-THF, 10-Formyl-THF sowie als inaktive Abbauprodukte, relativ gering sind. Die mit der Galle ausgeschiedenen Folatmengen von 10 bis zu 90 µg/Tag werden durch den enterohepatischen Kreislauf weitgehend reabsorbiert [BÄSSLER et al., 2002]. Obwohl Folsäure und ihre Folate zu den wasserlöslichen Vitaminen zählen, ist wie erwähnt der Verlust über den Urin nicht groß. Das ist der sogenannten renalen „Folat-Falle“ zu verdanken. Diese besteht aus den α -Folat-Rezeptoren, FR α , und RFCs. Der α -Folat-Rezeptor ist das hauptfolatbindende Protein der Nieren und ist für die Reabsorption von 5-Methyl-THF verantwortlich. Er besteht aus einem einzigen Polypeptid aus 225 Aminosäuren. Durch diese Kontrolle der Folatausscheidung spielt der α -Folat-Rezeptor eine entscheidende Rolle in der Aufrechterhaltung der Folat-Homöostase [DAMARAJU et al., 2008].

3.5. Biochemische Funktionen im Stoffwechsel des Menschen

Die aktive Form der Folsäure ist die reduzierte Tetrahydrofolsäure, die in zwei Reduktionsschritten entsteht (siehe Abbildung 8). Im Ersten wird die Folsäure durch eine Vitamin C-abhängige Folsäure-Reduktase zu Dihydrofolsäure reduziert. Im Zweiten erfolgt die Reduktion mittels der Dihydrofolat-Reduktase zu Tetrahydrofolat. Für beide Reaktionen wird NADPH/H⁺ als Elektronendonatoren benötigt. Die THF ist Ausgangsform für die verschiedenen Folsäure- Coenzyme [HORN et al., 2003]. Am längsten ist die Wirksamkeit der Folsäure als antianämischer Faktor bekannt. Inzwischen konnten aber viele weitere Stoffwechselwege identifiziert werden, bei denen Folate eine zentrale Rolle spielen.

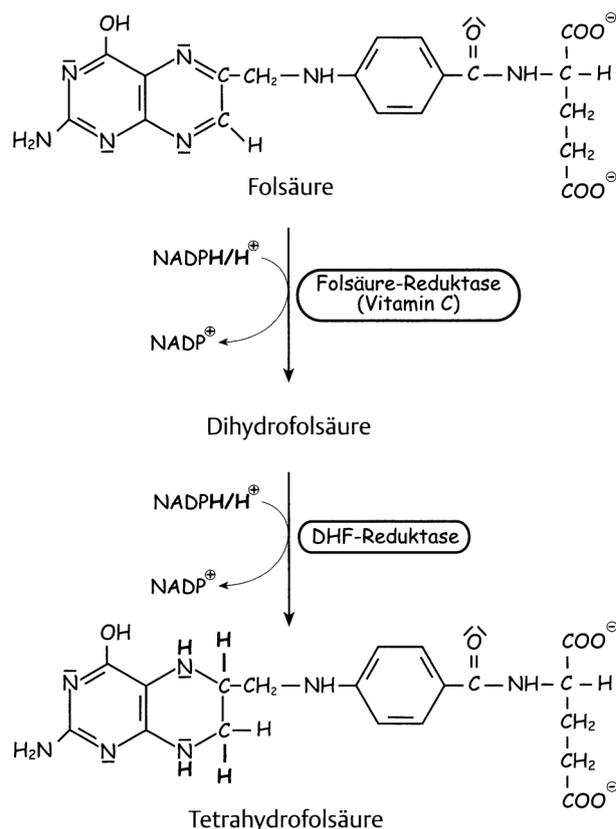


Abb. 8: Reduktion von Folsäure zu Tetrahydrofolsäure, Quelle: HORN, 2003

Folate sind besonders als Coenzyme von enormer Bedeutung [BIESALSKI et al., 2002]. Eine besonders wichtige Funktion als Coenzym nimmt Folsäure bei Transferreaktionen von C1-Gruppen (Methyl-, Formyl-, Forminat-, Hydroxymethylreste) zur Biosynthese von Purin und Pyrimidin und somit bei der Biosynthese der DNA ein [STANGER, 2004]. Neben der Bedeutung für die DNA-Bildung fungiert Folsäure als Akzeptor und Überträger von Hydroxymethylgruppen und Formylgruppen bei:

- Der Methylierung von Homocystein zu Methionin
- Der Umwandlung von Glycin zu Serin
- Im Histidinstoffwechsel
- Sowie bei der Cholinbiosynthese [BIESALSKI et al., 2002]

3.6. Der Folsäurestoffwechsel im Menschen

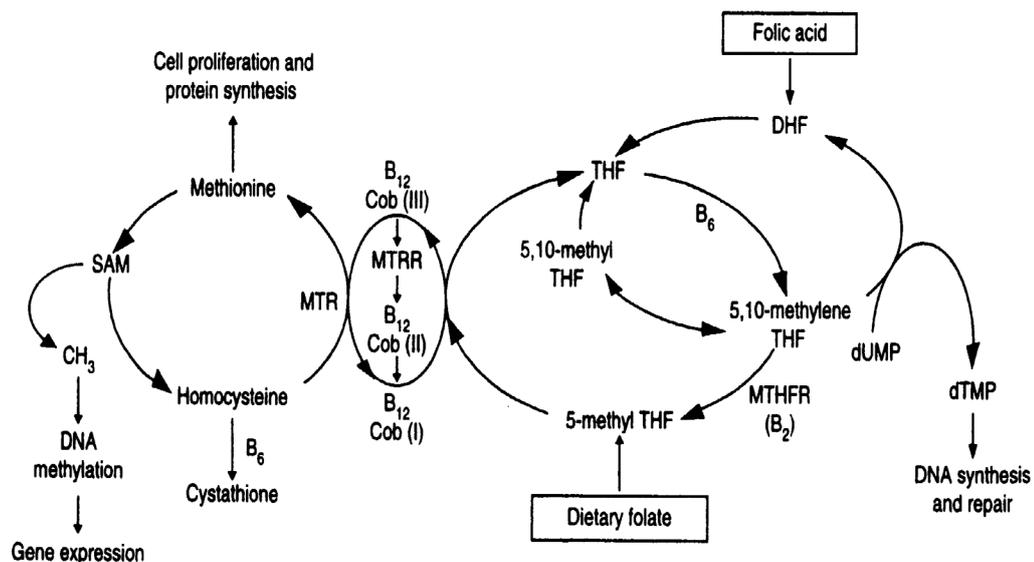


Abb. 9: Der Folsäurestoffwechsel im menschlichen Körper, Quelle: THOMAS, FENECH, 2008; WAGNER, 1995

3.6.1.MTHFR

Die 5,10-Methylen tetrahydrofolatreduktase, kurz MTHFR, ist ein zentrales Enzym des Folsäurestoffwechsels. Es ist ein Homodimer mit einer Molekülmasse von 77 kD und besitzt eine katalytische und eine regulatorische Domäne. 1994 wurde das menschliche Gen erstmals auf dem Chromosom 1p36.6 lokalisiert sowie isoliert und geklont.

Die MTHFR reduziert in einer NAD⁺-abhängigen Reaktion 5,10-Methylen-THF zu 5-Methyl-THF. Die dabei freiwerdende Methylgruppe wird für die Vitamin B12-abhängige Remethylierung von Homocystein zu Methionin benötigt. Bei einem Mangel an Folsäure oder Vitamin B12 sowie bei einer Blockierung der MTHFR kommt es zum Erliegen des Methylierungszyklus und zahlreiche Reaktionen können nicht mehr oder nur stark eingeschränkt ablaufen. Das betrifft die Funktion von Proteinen, Hormonen, Neurotransmittern bis hin zur DNA, da Hypomethylierung ein Merkmal vieler Tumore ist [STANGER, 2004].

Ein angeborener Mangel, autosomal rezessiv vererbt, des MTHFR-Enzyms ist sehr selten. Allerdings sind einige Mutationen im menschlichen Genom bekannt, unter diesen ist der C677T-Polymorphismus der am besten untersucht [STANGER, 2004].

3.6.1.1. Der MTHFR C677T-Polymorphismus

Unter Polymorphismus versteht man „Das gleichzeitige Vorkommen von zwei oder mehreren Allelen in einer Population mit Häufigkeiten, die nicht alleine durch wiederholte Mutation erklärt werden können“ [GRAW, 2006]. 1988 wurde der C677T-Polymorphismus, der zu einer thermolabilen Mutation der MTHFR führt, erstmals von KANG et al. beschrieben [KANG, 1988]. Hierbei kommt es zu einem Cytosin (C)- und Thymin (T) -Austausch an der Position 677 innerhalb des Exons 4; dies führt zu einer Substitution von Alanin durch Valin im MTHFR-Protein [THOMAS, FENECH, 2008]. Charakterisiert ist

diese Substitution durch eine verringerte spezifische Enzymaktivität bei 37°C und eine erhöhte Thermolabilität nach Erwärmung von Lymphozytenextrakten über 5 Minuten bei 46°C in vitro. Bei der homozygoten Mutation (T/T) liegt die Enzymaktivität bei 37°C etwa bei 25-45% gegenüber der vom Genotyp (C/C), während sich die heterozygote Form (C/T) prozentuell dazwischen befindet [STANGER, 2004].

Die Häufigkeit des C677T-Polymorphismus in der Bevölkerung weist aufgrund von ethnischer Herkunft und geographischer Lage große Unterschiede auf. WILCKEN et al. charakterisierte erstmals die Verteilung des C677T Allels in den verschiedensten Populationen. Er untersuchte mehr als 7000 Neugeborene von mehr als 16 verschiedenen ethnischen Gruppen in Europa, Asien, Amerika, dem Mittleren Osten sowie Australien. Vor allem in China (20%), im südlichen Italien (26%) und in Mexiko (32%) ist die homozygoten Mutation (T/T) weit verbreitet [WILCKEN et al., 2003]. Ein Maximum des homozygoten Typs ist im mediterranen Raum festzustellen, welches Richtung Norden verlaufend abnimmt. So findet man auch in Ländern mit historischer Besiedelung aus dem Mittelmeerraum ähnliche Frequenzen des T-Allels, während in der Bevölkerung Afrikas nur eine sehr geringe Prävalenz der homozygoten Mutation (T/T) vorhanden ist. Das typische Nord-Süd-Gefälle Europas lässt sich auch in Asien wiederfinden [STANGER, 2004].

Prinzipiell reagiert der TT-Phänotyp viel empfindlicher auf Folsäuregaben und hat einen größeren Folsäurebedarf um die Enzymaktivität aufrecht zu erhalten als die anderen Phänotypen. Bei schlechter Folsäureversorgung kommt es bei der T/T-Mutation, sowie auch beim C/T-Typ tendenziell zu höheren Nüchtern-Homocysteinwerten. Auch die homozygote Variante ist häufig mit einem niedrigeren Folsäurespiegel verbunden. Schon bei Kindern macht sich der homozygote Typ bei den Plasmakonzentrationen von Homocystein, Cobalamin und Folsäure bemerkbar.

In Mexiko, das eine hohe Prävalenz des T/T-Typs aufweist, findet man auch eine deutlich höhere Anzahl an Neuralrohrdefekten. Diese sind drei- bis viermal häufiger als in anderen Populationen. Bei der homozygoten Mutation ist das Risiko für einen Neuralrohrdefekt generell doppelt so hoch gegenüber der normalen Form [STANGER, 2004].

3.6.1.2. Der MTHFR A1298C-Polymorphismus

Eine weitere Mutation des MTHFR-Gens ist der A1298C-Polymorphismus. Hierbei kommt es zu einem Austausch von Adenin mit Cytosin innerhalb des Exon 7; dies resultiert in einem Wechsel von Glutamat zu Alanin. Die Enzymaktivität ist bei dieser Mutation ebenfalls herabgesetzt, allerdings in geringerem Ausmaß als beim C677T-Allel. Weder die homozygote, noch die heterozygote Form des A1298C-Polymorphismus führen zu einer erhöhten Homocysteinkonzentration oder einer abgesenkten Folsäurekonzentration im Plasma. So lässt sich sagen, dass der Effekt dieser Mutation gering ist und alleine wahrscheinlich bedeutungslos [STANGER, 2004; THOMAS, FENECH, 2008]. Allerdings hat die heterozygote Form des A1298C Polymorphismus in Kombination mit der CT-Variante des C677T-Polymorphismus einen deutlichen Effekt auf den Folsäurestoffwechsel und lässt sich auch mit der T/T-Mutation von diesem vergleichen. Dies zeigt sich in verringerter Enzymaktivität, hohen Homocysteinwerten und niedrigen Folsäurewerten im Plasma [THOMAS, FENECH, 2008]. Die Häufigkeitsverteilung des A1298C-Polymorphismus ist nicht so gut dokumentiert wie die der C677T-Mutation, die Prävalenz liegt bei etwa 10% [VAN DER PUT et al., 1998].

Bis heute wurden 30 weitere Mutationen des MTHFR-Gens gefunden, einige davon sind sehr selten. Neben den zwei erwähnten treten noch drei weitere Polymorphismen häufiger auf; der T1068C, der T1178+31C, und der T1317C Polymorphismus [THOMAS, FENECH, 2008; STANGER, 2004].

3.6.2. Die Methioninsynthase (MS)

Die MS ist ein Cobalamin (= Vitamin B12) abhängiges Enzym, welches für die Remethylierung von Homocystein zu Methionin benötigt wird. Die Umsetzung von Homocystein zu Methionin erfolgt über 3 getrennte Methyltransfer-Reaktionen, die an 4 verschiedenen Bindungsstellen des Enzyms ablaufen. Am N-terminalen Teil bindet Homocystein, eine zweite Stelle bindet und aktiviert 5-Methyl-THF für den Methyltransfer, an einer dritten Stelle bindet Cobalamin und am C-terminalen Teil bindet S-Adenosyl-Methionin (AdoMet). Die Methioninsynthase hat drei wichtige physiologische Funktionen:

1. Die Regeneration des THF-Cofaktors
2. Die Synthese der essentiellen Aminosäure Methionin und
3. Die Beseitigung des zellulären Homocysteins [FOX, STOVER, 2008].

Auch bei der MS können Polymorphismen auftreten. Ein häufiger ist die A2756G-Variante, bei der es zu einem Austausch der Asparaginsäure mit Glycin kommt. Ein A2756G-Polymorphismus führt zu einer verminderten Enzymaktivität sowie zu einer Homocysteinerhöhung und DNA-Hypomethylierung [STANGER, 2004]. Eine seltenere Mutation des MS Gens, die P1173L, ist mit Homocysteinurie, megaloblastischer Anämie, neuralen Dysfunktionen und mentaler Retardierung assoziiert [FOX, STOVER, 2008].

3.6.3. Cystathionin- β -Synthase (CBS)

Ein weiteres wichtiges Enzym im Folsäurestoffwechsel, das zur Senkung des Homocysteinspiegels im Plasma führt, ist die CBS. Diese setzt Homocystein und Serin zu Cystathionin um, daraus entsteht dann in weiterer Folge Cystein und Glutathion. Etwa 60% des Homocysteins wird auf diesem Weg eliminiert. Coenzyme der CBS sind Vitamin B6 sowie Häm [TCHANTCHOU,

SHEA, 2008]. Die häufigsten Mutationen sind T833C, G307S sowie 844ins68 [STANGER, 2004].

3.7. Folsäurebedarf bei *C. elegans*

Der Bedarf an Folsäure und Vitamin B12 für die Methionin-Biosynthese bei Säugetieren ist schon lange erwiesen. Abbildung 10 zeigt die Folsäure- und Vitamin B12-abhängige Remethylierung des Methionins aus Homocystein. Dass auch Folsäure und Vitamin B12 für Nematoden essentielle Nährstoffe sind haben Lu et al. in ihren Studien mit *C. briggsae* bewiesen [LU et al., 1976].

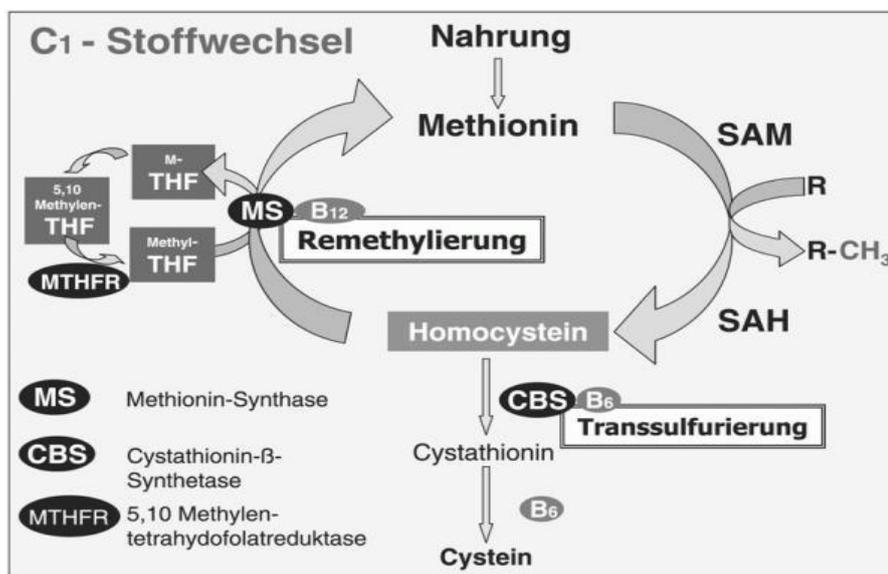


Abb. 10: Der Methionin-Zyklus; Quelle: [KLEINE-GUNK, 2003]

C. briggsae zählt zu den engsten Verwandten von *C. elegans* und unterscheidet sich nur durch sehr wenige morphologische Merkmale. Beide Arten weisen zum Teil idente Entwicklungsmuster auf, wie etwa bei der Geschlechtsbestimmung. *C. elegans* und *C. briggsae* besitzen die gleiche Anzahl an Chromosomen, sowie dieselbe Genomgröße. Insgesamt wurden 19.500 Protein-kodierende Gene bei *C. briggsae* gefunden. Davon sind 12.200 ortholog und 6.500 homolog zu *C. elegans* [STEIN et al., 2003; BRAECKMAN et al., 2009]. So können die meisten Ergebnisse auch auf *C. elegans* übertragen werden.

In den Studien von Lu et al. kam es aufgrund des Weglassens von Methionin im Flüssigmedium zu einem 80%igem Rückgang der *C. briggsae*-Population. Weiters stellten Lu et al. fest, dass mit einer Homocystein-Substitution, bei gleichzeitigem Überangebot an Vitamin B12 und Folsäure dieser Mangel ausgeglichen werden konnte. Das lässt darauf schließen, dass der Methionin-Zyklus genauso wie beim Menschen abläuft und somit Folsäure in Form der MTHFR mit dem Cofaktor Vitamin B12 als Schlüsselenzym fungiert. So ist die Biosynthese von Methionin aus Homocystein auch bei *C. briggsae* bzw. bei *C. elegans* Folsäure- und Vitamin B12-abhängig. Auch wurde gezeigt, dass eine über dem Bedarf liegende Folsäure- und Vitamin B12-Menge zusammen ein maximales Populationswachstum erzielte, wobei für Vitamin B12 der Wert von 6 ng/ml Medium als optimal gilt [LU et al., 1976].

3.8. Folsäureaufnahme bei *C. elegans*

Die Absorption von Folsäure findet bei *C. elegans* vor allem im Pharynx und im Darm mittels spezifischer Folsäuretransporter statt. Bis heute wurden zwei orthologe Gene des „human Reduced Folate Carrier“, hRFC, in *C. elegans* gefunden. Diese beiden Carrier, *fol-1* und *fol-2* sind zu 40 bzw. 31% mit dem Carrier des Menschen ident. Balamurugan et al. identifizierten allerdings nur *fol-1* als aktiven Folattransporter [BALAMURUGAN et al., 2007]. Dies zeigt sich vor allem in der großen Ähnlichkeit zum hRFC durch:

- gleiche Affinität zu oxidierten, reduzierten und substituierten Folatderivaten,
- der Empfindlichkeit gegenüber dem anti-inflammatorischen Erreger Sulfasalazin,
- und der inhibierenden Wirkung der beiden Anionen-Transporthemmer DIDS und SITS.

Für die beiden weiteren Folattransporter des Menschen, den PCFT sowie den FR, wurden keine orthologen Gene bei *C. elegans* gefunden [BALAMURUGAN et al., 2007].

3.8.1. Der folt-1-Transporter

Die Plattform „Wormbase“ ist eine Datenbank, die sämtliche Geninformationen von *C. elegans* und verwandten Nematoden enthält. So auch das orthologe Gen von *C. elegans* für den hRFC.

Sequenzname: C06H2.4

WB Gene ID: 00007388

Orthologe Gene beim Menschen: es existieren 3 Vertreter: SLC19A1, SLC19A2 und SLC19A3

Für dieses Gen existiert nur ein Genmodell mit 1233 Basenpaaren der kodierenden und 1566 der transkribierenden Nukleotide. Es werden insgesamt 410 Aminosäuren translatiert und das Protein WP:CE41500 entsteht. Abbildung 11 zeigt die genaue Lage des C06H2.4-Gens [www.wormbase.org].

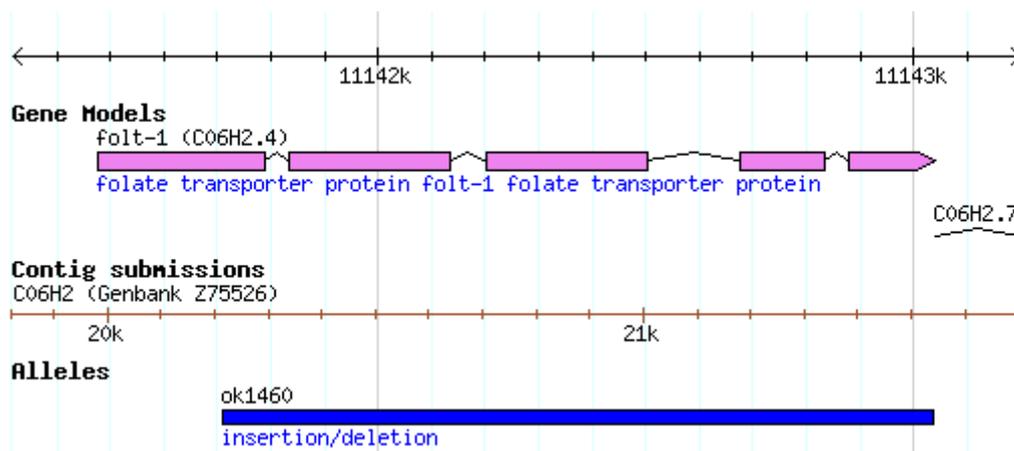


Abb. 11: Genomumgebung des C06H2.4-Genes, Quelle: www.wormbase.org

3.9. Homologe Gene des Folsäurestoffwechsels bei *C. elegans*

3.9.1. MTHFR bei *C. elegans*

Es existiert auch ein homologes Gen von *C. elegans* für die MTHFR des Menschen:

Sequenzname: C06A8.1

WB Gene ID: 00015512

Orthologes Gen beim Menschen: MSH HOMEO BOX HOMOLOG 1 (MTHFR)

Es existieren insgesamt 3 Genmodelle für C06A8.1. Zwei davon, nämlich C06A8.1a.1 und C06A8.1a.2, unterscheiden sich nur im Hinblick auf die Anzahl der transkribierenden Nukleotide. Dies hat keinen Einfluss auf die 663 translatierten Aminosäuren und das daraus entstehende Protein WP:CE30593. Das dritte Genmodell C06A8.1b unterscheidet sich allerdings sowohl in der Anzahl der transkribierenden als auch in der Anzahl der kodierenden Nukleotide. So werden auch weniger Aminosäuren translatiert und es entsteht ein anderes Protein, WP:CE31291, als bei den vorherigen Modellen. Tabelle 2 zeigt die verschiedenen Genmodelle mit ihren kodierenden und transkribierten Nukleotiden, sowie die Proteine und die Anzahl der Aminosäuren. Abbildung 12 gibt die genaue Lage sowie die nähere Umgebung des Gens auf dem Chromosom II an. Das Gen befindet sich auf der Position 0.56, von Basenpaar 7777755 bis zum Basenpaar 777803 [www.wormbase.org].

Gen Modell	Kodierende Nukleotide	Transkribierende Nukleotide	Protein	Aminosäuren
C06A8.1a.1	1992 Bp	3953 Bp	WP:CE30593	663
C06A8.1a.2	1992 Bp	3683 Bp	WP:CE30593	663
C06A8.1b	1929 Bp	3687 Bp	WP:CE31291	642

Tab. 2: Genmodelle von C06A8.1, Quelle: www.wormebase.org

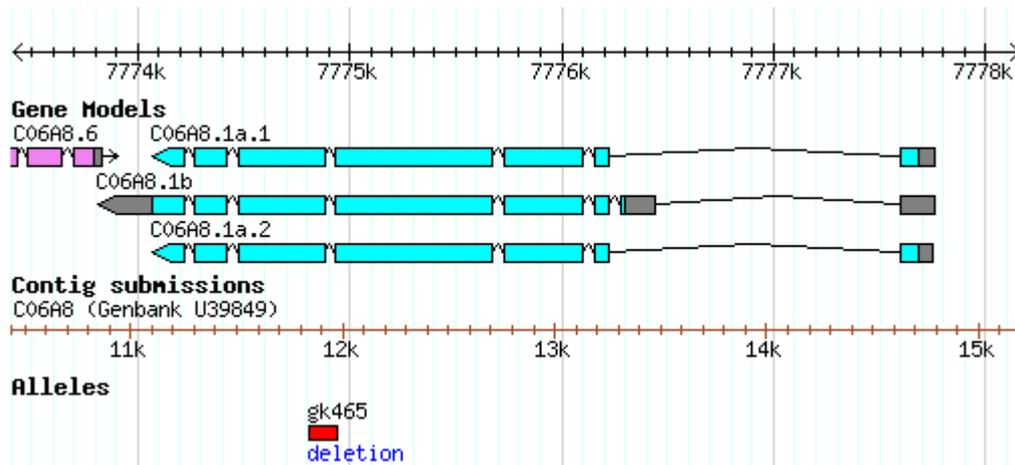


Abb. 12: Genposition der C08A8.1 Modelle, Quelle: www.wormebase.org

3.9.2. MS bei *C. elegans*

C. elegans besitzt auch ein homologes Gen für die MS.

Sequenzname: R03D7.1

WB Gen ID: 00010988

Orthologes Gen beim Menschen: METHIONIN SYNTHASE (MS)

Für dieses Gen existiert nur ein Genmodell, es besitzt 3750 Basenpaare der kodierenden und 4515 Basenpaare der transkribierten Nukleotide. Es werden 1249 Aminosäuren translatiert und es entsteht das Protein WP:CE01609.

Das R03D7.1-Gen befindet sich, wie in Abbildung 13 gezeigt, auf dem Chromosom II, auf der Position 3.13, vom Basenpaar 10926484 bis zum Basenpaar 10930998 [www.wormbase.org].

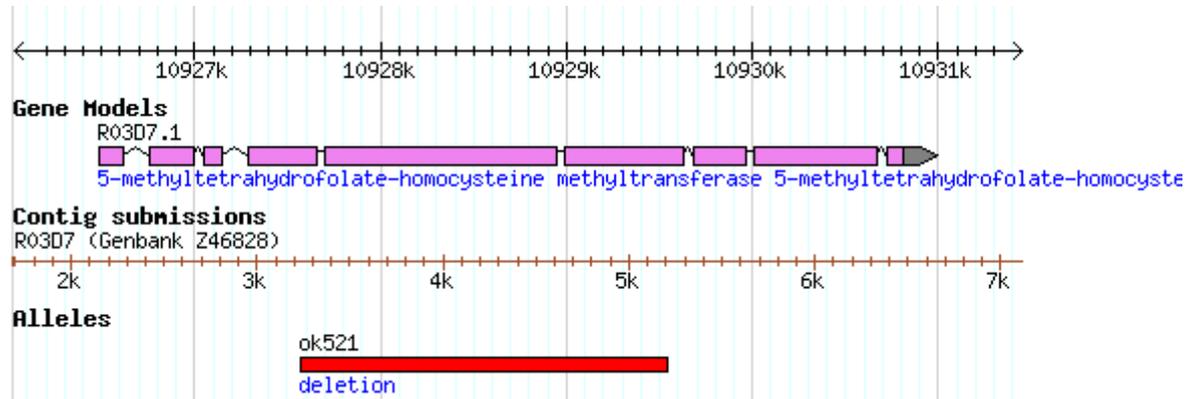


Abb. 13: Genomumgebung des R03D7.1-Gens, Quelle: www.wormbase.org

3.9.3. CBS bei *C. elegans*

Sequenzname: F54A3.4

WB Gen ID: 00018783

Orthologes Gen beim Menschen: Cystathionin Beta Synthase

Auch bei diesem Gen gibt es nur ein Modell. Dieses enthält 2268 Basenpaare der kodierenden Nukleotide und 3541 Basenpaare der transkribierten Nukleotide. Es kommen 755 translatierte Aminosäuren vor, die das Protein WP:CE20851 bilden. Abbildung 14 zeigt die genaue Lage des Gens mit Umgebung. Es befindet sich auf dem Chromosom II, auf der Position 13.83, zwischen den Basenpaaren 2223541 und 2220001[www.wormbase.org].

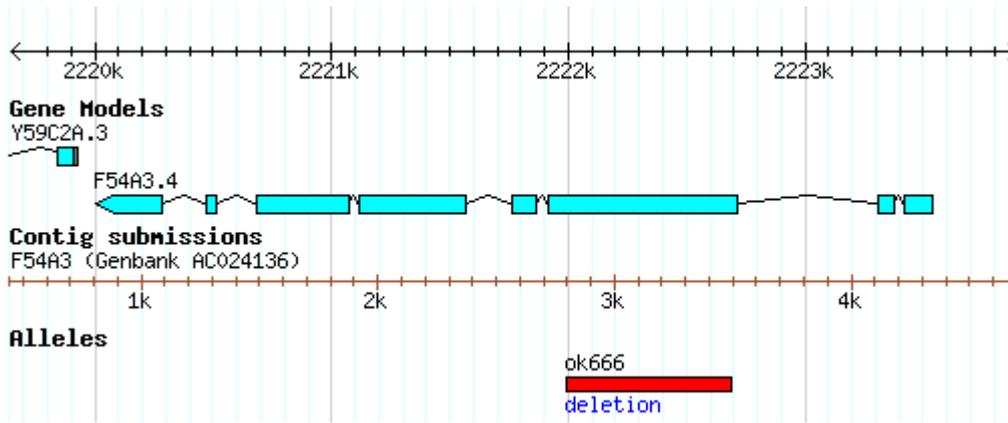


Abb. 14: Genomumgebung des F54A3.4.Gens, Quelle: www.wormebase.org

4. Material

4.1. Chemikalien

<u>Name:</u>	<u>Bezugsfirma:</u>	<u>Methode:</u>
Adenosin 5'-PO ₄	Sigma-Aldrich, Steinheim	4.6.11.
Agar-Agar	Roth, Karlsruhe	4.6.3.
Ammoniumacetat	Roth, Karlsruhe	4.6.6.
BHI Agar	Roth, Karlsruhe	5.2.1.2.
Biotin	Roth, Karlsruhe	4.6.11.
Calcium Chlorid	Roth, Karlsruhe	4.6.11.
Cholesterin	Roth, Karlsruhe	4.6.3. /4.6.4./ 4.6.11.
Cholin di-Azid Citrat	Sigma-Aldrich, Steinheim	4.6.11.
Cyanocobalamin (Vitamin B12)	Roth, Karlsruhe	4.6.11.
Cytidin 5-PO ₄	Sigma-Aldrich, Steinheim	4.6.11.
di-Kaliumhydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe	4.6.5./ 4.6.8.
di-Natriumhydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe	4.6.9.
DL-Alanin	Roth, Karlsruhe	4.6.11.
D-Glucose	Roth, Karlsruhe	4.6.11.
DL 6,8 Thiocitic Säure	Sigma-Aldrich, Steinheim	4.6.11.
Eisenammoniumsulfat-Hexahydrat (Fe (NH ₄) ₂ (SO ₄) ₂ *6H ₂ O)	Roth, Karlsruhe	4.6.11.
Ethanol, absolut zur Analyse	AustrAlco, Österr. Alkoholhandels-GmbH, Spillern	4.6.6./ 4.6.11.
Essentieller Aminosäure-Mix	Invitrogen-Gibco, New York	4.6.11.

Folinat (Ca)	Sigma-Aldrich, Steinheim	4.6.11.
<u>Name:</u>	<u>Bezugsfirma:</u>	<u>Methode:</u>
Folsäure (Pteroylglutaminsäure)	Sigma-Aldrich, Steinheim	4.6.11.
Glucose	Roth, Karlsruhe	4.6.11.
Guanosin 5'-PO4	Sigma-Aldrich, Steinheim	4.6.11.
Glycerin	Roth, Karlsruhe	5.1.1.5.
Haushaltsbleiche		4.6.7./ 4.6.10.
Hemin Chlorid	Roth, Karlsruhe	4.6.11.
Hepes Na Salz	Roth, Karlsruhe	4.6.11.
i-Inositol	Sigma-Aldrich, Steinheim	4.6.11.
Kalium Citrat	Roth, Karlsruhe	4.6.11.
Kaliumdihydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe	4.6.5./ 4.6.8./ 4.6.9./4.6.11.
Kaliumhydroxid	Roth, Karlsruhe	4.6.11.
Kupferdichlorid Dihydrat	Roth, Karlsruhe	4.6.3./ 4.6.11./
Lactalbumin	Roth, Karlsruhe	4.6.11.
LB Agar	Roth, Karlsruhe	4.6.2.
LB Medium	Roth, Karlsruhe	4.6.1.
Magnesiumdichlorid- Hexahydrat	Roth, Karlsruhe	4.6.11.
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	Roth, Karlsruhe	4.6.3./ 4.6.9.
Mangandichlorid-Tetrahydrat	Roth, Karlsruhe	4.6.11.
Milch, ultra hoch erhitzt „Die Leichte 0,1%“	Maresi, 1131 Wien	4.6.11.
N-Acetylglucosamin	Sigma-Aldrich, Steinheim	4.6.11.
Natrium-Azid	Roth, Karlsruhe	5.2.1.4.
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe	4.6.3./ 4.6.8./ 4.6.9.
Natrium Citrat	Roth, Karlsruhe	4.6.11.

Natriumhydroxid	Roth, Karlsruhe	4.6.7./ 4.6.10./ 4.6.11.
<u>Name:</u>	<u>Bezugsfirma:</u>	<u>Methode:</u>
Niacin	Roth, Karlsruhe	4.6.11.
Niacinamid	Sigma-Aldrich, Steinheim	4.6.11.
Nicht-Essential Aminosäure- Mix	Invitrogen-Gibco, New York	4.6.11.
Nystatin	Roth, Karlsruhe	4.6.3./4.6.6.
p-Aminobenzsäure	Sigma-Aldrich, Steinheim	4.6.11.
Pantethin	Sigma-Aldrich, Steinheim	4.6.11.
Pantothenat Ca	Roth, Karlsruhe	4.6.11.
Pepton aus Casein, tryptisch verdaut	Roth, Karlsruhe	4.6.3.
Pyridoxal 5P	Sigma-Aldrich, Steinheim	4.6.11.
Pyridoxamin 2HCl	Sigma-Aldrich, Steinheim	4.6.11.
Pyridoxin HCl	Roth, Karlsruhe	4.6.11.
Riboflavin 5PO4 (Na)	Sigma-Aldrich, Steinheim	4.6.11.
Salzsäure 25%	Roth, Karlsruhe	4.6.11.
Tetracyclin-Hydrochlorid	Roth, Karlsruhe	5.2.1.2.
Thiamin HCl	Roth, Karlsruhe	4.6.11.
Thymin	Sigma-Aldrich, Steinheim	4.6.11.
Uridin 5'-PO4	Sigma-Aldrich, Steinheim	4.6.11.
Zink Dichlorid	Sigma-Aldrich, Steinheim	4.6.11.

4.2. Geräte

Autoklav Varioklav, Dampfsterilisator 500	H+P Labortechnik, Oberschleissheim
Kühlbrutschrank	Selecta, Barcelona
Laminar Flow ESCO	Ehret, Tulln
Magnetrührer RCT basic, beheizbar	IKA, Staufen
Millipore-Anlage	Seven Easy, Mettler Toledo
pH-Meter	Esco, Ehret Labor/ Pharmatechnik,
Pipettierhilfe Easypet	Eppendorf, Wien
Spiritusbrenner	Roth, Karlsruhe
Stereomikroskop Wild Heerbrugg	Kern, Aarau
Waage MC 41059	Sartorius AG, Göttingen
Unterlicht intralux 6000	Volpi, Schlieren
Vortex MS1 Minishaker	IKA, Staufen
Zentrifuge Jouan BR4i, multifunction	Thermo Scientific, USA

4.3. Verbrauchsmaterialien

Bechergläser	Roth, Karlsruhe
Cellstar Tissue Culture Flasks	Greiner Bio-one, Frickenhausen
Cellstar Suspension Culture Plate, 6 Wells	Greiner Bio-one, Frickenhausen
Flaschen (1L, 500 ml, 100 ml)	Roth, Karlsruhe
Gummisauger	Roth, Karlsruhe
Impfösen	VWR, Wien
Pasteurpipetten	Roth, Karlsruhe
Petrischalen (3,6,9 cm)	Greiner Bio-one, Frickenhausen

Pipetten, serologisch (10-50 ml)	Greiner Bio-one, Frickenhausen
Pipettenspitzen (0,05/ 1 ml)	Greiner Bio-one, Frickenhausen
Platindraht	Roth, Karlsruhe
Zentrifugenröhrchen	Greiner Bio-one, Frickenhausen

4.4. *C. elegans*-Stamm

Für alle Versuche wurde der Wildtype, N2 var. Bristol verwendet. Dieser wurde vom Caenorhabditis Genetics Center (CGC), University of Minnesota, St. Paul, USA bestellt.

4.5. OP 50 Escherichia coli

E. coli OP50 wurde ebenfalls über das CGC bestellt. Dieser Stamm ist Uracil auxotroph und hat ein eingeschränktes Wachstum. Damit wurde ein Überwuchern der NGM-Platten verhindert [CORSI, 2006].

4.6. Zusammensetzung der Lösungen

4.6.1 LB-Bouillon

10 g LB-Medium

500 ml Aqua dest.

werden vermengt und anschließend bei 121°C autoklaviert. Kühl gelagert ist die LB-Bouillon einige Monate haltbar.

4.6.2. LB-Agar

17,5 g LB-Agar

werden in 500 ml Aqua dest. gelöst und bei 121°C autoklaviert. Der noch warme Agar wird in Petrischalen pipettiert und ist bei +4°C einige Monate haltbar.

4.6.3. NGM-Agar (Nematode Growth Medium)

3,0 g Natriumchlorid

17,0 g Agar-Agar

2,5 g Pepton

werden in 1 L Aqua dest. gelöst, ein Rührfisch wird zugegeben und bei 121°C autoklaviert. Anschließend fügt man:

1 ml 1M CaCl₂

1ml Cholesterin (5 mg/ml)

1 ml 1M MgSO₄

25 ml 1M KPO₄-Puffer (pH6)

5 ml Nystatinlösung (optional)

hinzu. Der NGM-Agar wird im warmen, noch flüssigen Zustand in die Petrischalen pipettiert (25 ml für 10 cm, 12 ml für 6 cm und 4 ml für 3,5 cm-Platten). Dabei entstandene Luftbläschen sollten zerstört werden, da sonst Würmer in den Agar gelangen können. Die Petrischalen kopfüber für 2-3 Tage bei Raumtemperatur trocknen lassen. Luftdicht verschlossen sind die Platten bei +4°C für mehrere Wochen haltbar.

4.6.4. Cholesterin für den NGM-Agar

0,5 g Cholesterin

werden in 100 ml Ethanol gelöst und bei -20°C gelagert.

4.6.5. KPO4-Puffer für den NGM-Agar

34 g KH₂PO₄ zu 250 ml Aqua dest.

34,8 g K₂HPO₄ zu 200 ml Aqua dest.

Zu der KH₂PO₄-Lösung (pH4) wird nun die K₂HPO₄-Lösung gegeben bis sich ein pH von 6 eingestellt hat (ca. 100 ml). Die Lösung wird autoklaviert und bei Raumtemperatur gelagert.

4.6.6. Nystatin-Lösung

Lösung 1: 58 g Ammoniumacetat in 100 ml Aqua dest. nach und nach lösen (löst sich erst komplett im Endvolumen).

Lösung 2: 100 ml 96% Ethanol

Zu 2 g Nysatin werden nun die beiden Lösungen nach und nach hinzugegeben. Durch Erwärmen bei 55°C löst sich das Nystatin. Die Lösung wird sterilfiltriert und bei -20°C gelagert.

4.6.7. Reinigungs-Lösung für die NGM-Platten

1 ml Danchlor und

0,5 ml 5M NaOH immer frisch ansetzen.

4.6.8. S-Puffer

129 ml 0,05M K₂HPO₄

871ml 0,05M KH₂PO₄

5,85 g NaCl

werden auf pH 6 eingestellt und anschließend autoklaviert.

4.6.9. M9-Puffer

6,0 g Na₂HPO₄

3,0 g KH₂PO₄

5,0 g NaCl

0,25 g MgSO₄·7H₂O

werden in 1 L Aqua dest. gelöst, autoklaviert und bei +4°C gelagert.

4.6.10. Bleach-Lösung

5N NaOH

5% Natriumhypochlorit-Lösung

4.6.11. CeHR (*C. elegans* Habitation and Reproduction)-Medium [nach HAMZA, k.A.]

Folgende Stocklösungen werden in dieser Reihenfolge durch eine 1 L 0,2 µm Filtereinheit gefiltert:

10 ml Cholin

10 ml Vitamin-Mix

10 ml Inositol

10 ml Hemin Chlorid

250 ml Millipore-Wasser

- Abfiltrieren

20 ml Nukleinsäure-Mix

100 ml Salzlösung

20 ml Lactalbumin

20 ml Essential Amino Acid Mix

10 ml Non-essential Amino Acid Mix

20 ml KH₂PO₄

50 ml Glucose

10 ml HEPES

250 ml Millipore-Wasser

1 ml Cholesterin

- Abfiltrieren

Der pH-Wert liegt im Bereich zwischen 6,2 bis 6,3; das Medium wird nun bei +4°C lichtgeschützt gelagert.

Zusammensetzung der Stocklösungen für das CeHR-Medium

Salzlösung für das CeHR-Medium

Zu 800 ml Millipore-Wasser werden folgende Chemikalien hinzugefügt:

0,2 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

4,1 g $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

2,9 g Natrium-Citrat

4,9 g Kalium-Citrat $\cdot \text{H}_2\text{O}$

0,07 g $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

0,2 g $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$

0,1 g ZnCl_2

0,6 g $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4) \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

Anschließend wird mit Millipore-Wasser auf 1L aufgefüllt und mittels eines Bottle-top-Filters steril filtriert. Die sterile Salzlösung wird bei +4°C gelagert.

Vitamin-Mix für das CeHR-Medium

In 60 ml Millipore-Wasser löst man:

0,15 g N-Acetylglucosamin

0,15 g DL-Alanin

0,075 g Niacinamid

0,0375 g Pantethein

0,075 g Pantothentat (Ca)

0,075 g Folsäure

0,0375 g Pyridoxamin 2HCl

0,075 g Pyridoxin HCl

0,075 g Riboflavin 5 PO₄ (Na)

0,075 g Thiamin HCl

Weiters werden zu je 5 ml einer 1 N KOH hinzugefügt:

0,075 g p-Aminobenzoessäure

0,0375 g Biotin

0,0375 g Cyanocobalamin (B12)

0,0375 g Folinat (Ca)

0,075 g Niacin

0,0375 g Pyridoxal 5-phosphaat

Diese Mischung wird zu den vorherigen 60 ml hinzugefügt und mit 0,0375 g DL-6,8-Thioctic Säure in 1ml Ethanol gelöst, versetzt. Die Stocklösung wird nun auf 100 ml mit Millipore-Wasser aufgefüllt, durch Filtration sterilisiert und bei -20°C gelagert.

Nukleinsäure-Mix für das CeHR-Medium

In 60 ml Millipore-Wasser werden folgende Chemikalien hinzugefügt:

1,74 g Adenosin 5PO₄

1,84 g Cytidin 5PO₄

2,04 g Guanosin 5PO₄

1,84 g Uridin 5PO₄

0,63 g Thymin

Thymin ist schlecht löslich, leichtes Erhitzen und ständiges Rühren erleichtert das Lösen (ca.30 min). Die Stocklösung wird bei +4°C gelagert. Vor

Verwendung sollte man diese aufwärmen, da der Nukleinsäure-Mix bei Raumtemperatur ausfällt.

Weitere Komponenten für das CeHR-Medium

61,3 g/L KH₂PO₄

5,9 g/100 ml Cholin

4,32 g/100 ml Inositol

263 g/L Glucose

1 mg/ml Hemin Chlorid in 0,1 N NaOH

1M HEPES

5 mg/ml in Ethanol Cholesterin

17 g/100 ml Lactalbumin

Jede einzelne Stocklösung wird mit Millipore-Wasser aufgefüllt und separat durch Filtration sterilisiert mit Ausnahme von Cholesterin. Inositol, Glucose, HEPES sowie Lactalbumin lösen sich nur schwer. Die Lagerung der Stocklösungen erfolgt bei +4°C, außer Hemin Chlorid bei -20°C. Inositol und Hemin Chlorid sind lichtempfindlich und müssen zusätzlich in Alufolie gewickelt aufbewahrt werden.

5. Methoden

5.1. *C. elegans* auf NGM-Platten

5.1.1. Basistechniken mit *C. elegans*

5.1.1.1: Haltung und Vermehrung von *C. elegans*

C. elegans wird auf NGM (Nematode Growth Medium)-Petrischalen bei 20°C in einem Kühlbrutschrank gehalten [STIERNAGLE, 2006]. Als Nahrungsquelle fügt man die Bakterien *E. coli* des Stammes OP50 hinzu. Diese Bakterien sind Uracil auxotroph, weshalb sie langsamer wachsen und die Würmer nicht überwuchern. Zweimal pro Woche werden etwa fünf Würmer des L4-Stadiums auf eine neue, mit OP50 beimpfte Platte überführt, um den Fortbestand des Stammes zu gewährleisten.

5.1.1.2. Ansetzen, Beimpfen und „Seeden“ der OP50-Kultur

Auf einem sterilen LB Agar wird eine bereits bestehende OP50-Kolonie fraktioniert ausgestrichen und bei 37°C über Nacht bebrütet. Am nächsten Tag wird unter sterilen Bedingungen eine Einzelkolonie dieser Platte verwendet, um eine Flasche mit LB Bouillon zu beimpfen. Die beimpfte LB Bouillon wird erneut bei 37°C über Nacht inkubiert und kann bei +4°C einige Monate gelagert werden [STIERNAGLE, 2006].

Je 50 µl der beimpften LB Bouillon werden unter sterilen Bedingungen auf eine 60 mm NGM-Platte pipettiert und mittels einer Impföse verteilt. Bei 100 mm Platten nimmt man 200 µl Bouillon, bei 35 mm Platten reichen 10 µl, die direkt mit der Impföse auf die Platte aufgetragen werden. Wichtig ist es die Bouillon möglichst zentral auf die Platte aufzutragen und sie nicht zum Rand hin zu verteilen, da die Nahrungsquelle auch einen „Meeting-Point“ darstellen sollte. Des Weiteren besteht die Gefahr, dass die Würmer über den Rand

klettern und so auf andere Platten gelangen könnten. Die beimpften Petrischalen werden kopfüber bei Raumtemperatur über Nacht inkubiert und sind luftdicht bei +4°C für 3-4 Wochen haltbar.

5.1.1.3. Umsetzen der Würmer

a) Agarstück-Methode

Mit Hilfe einer sterilen Pipettenspitze oder eines sterilen Skalpells wird ein Stück Agar aus einer gut besiedelten NGM-Platte herausgeschnitten und auf eine neue, mit OP50 beimpfte, Platte überführt. Je nach gewünschter Anzahl der Würmer auf der neuen Platte wird das herausgeschnittene Agarstück wenig später wieder entfernt, oder auf dieser belassen.

b) Wormpick-Methode

Von der Spitze einer Pasteurpipette wird ein ca. 2 cm langes Stück abgebrochen. Mit Hilfe einer Zange wird nun ein 3 cm langes Stück eines Platindrahtes in den Pipettenhals eingeführt und das Glas über einer Flamme zum Schmelzen gebracht, bis der Draht fest sitzt. Anschließend biegt man den Draht leicht S-förmig und flacht die Drahtspitze mit der Zange ab, damit die Würmer nicht verletzt werden und leichter aufzunehmen sind. Platindraht hat den Vorteil, dass er nach Erhitzen rasch wieder abkühlt und so kann vor jedem Kontakt mit den Würmern der Draht kurz abgeflammt werden, um Kontaminationen zu vermeiden [STIERNAGLE, 2006].

5.1.1.4. Entfernen von Bakterien/ Synchronisierung der Würmer

Diese Methode wird zur Entfernung von bakteriellen Verunreinigungen von NGM-Platten verwendet, eignet sich aber auch um Würmer zu synchronisieren.

Man verwendet kontaminierte NGM-Platten mit möglichst vielen graviden Hermaphroditen, da nur die Embryos in den noch nicht gelegten Eiern diesen Vorgang überleben. Die Larven, die aus diesen Eiern schlüpfen sind beinahe gleich alt und können für verschiedene Versuche verwendet werden.

Die gesamte Population auf einer Agar-Platte wird mit Hilfe von Aqua dest. entfernt und in einem Zentrifugenröhrchen gesammelt. Die Wurmlösung wird mit Aqua dest auf 3,5 ml aufgefüllt und mit der Egg-Reinigungslösung (4.6.7.) versetzt. Das Röhrchen wird gut verschlossen, alle 2 Minuten geschüttelt und insgesamt für 10 Minuten inkubiert; anschließend für 1 Minute bei 2000 U zentrifugiert. Durch die Reinigungslösung und das Zentrifugieren werden die Würmer abgetötet und aufgebrochen, sodass die Eier freigesetzt werden. Wichtig ist es, die Reinigungslösung nicht länger als 10 Minuten einwirken zu lassen, da auch sonst die Eier beschädigt werden und keine Larven mehr schlüpfen. Die Eier setzen sich nach dem Zentrifugieren als Pellet ab und der Überstand wird vorsichtig entfernt. Nun fügt man erneut 5 ml Aqua dest. hinzu, um Rückstände der Bleiche zu entfernen, zentrifugiert erneut ab und entfernt nochmals den Überstand. Das Pellet wird nun mit Hilfe einer sterilen Pasteurpipette auf eine NGM Platte überführt und über Nacht bei 20°C stehen gelassen. Am nächsten Tag sind bereits L1-Larven geschlüpft, die nahezu gleich alt sind. Diese werden nun auf mit OP50 beimpften NGM-Platten überführt und können für Versuche verwendet werden.

5.1.1.5. Einfrieren von *C. elegans* mittels Liquid Freezing Solution

Um ein erfolgreiches Einfrieren zu garantieren, ist es wichtig, Würmer im geeigneten Stadium auszuwählen. L1-L2-Larven knapp vor dem Dauerstadium eignen sich am Besten zum Einfrieren. Hingegen überleben nur wenige gut ernährte, ausgewachsene Würmer, sowie Eier und Dauerstadien das Einfrieren [STIERNAGLE, 2006].

Man nimmt 1 große, 2-3 mittlere, oder 5-6 kleine NGM-Platten mit ausreichender Wurmanzahl und wäscht diese mit 0,6 ml S-Puffer (siehe 4.6.8.) pro gewünschter Anzahl der Cryoröhrchen zum Einfrieren. Anschließend sammelt man die Lösung in einem sterilen Röhrchen und fügt dasselbe Volumen an S-Puffer + 30% Glycerin (v/v) hinzu und mischt gut durch. Man aliquotiert je 1 ml der Mischung in ein 1,8 ml Cryoröhrchen, verpackt diese in einer Styroporbox und friert sie bei -80°C für mindestens 12 Stunden ein.

Am nächsten Tag werden die Cryoröhrchen dauerhaft eingefroren, eines wird aufgetaut um zu kontrollieren ob die Würmer überlebt haben.

Zum Auftauen von *C. elegans* nimmt man die Cryoröhrchen aus dem Gefrierschrank und lässt sie bei Raumtemperatur etwa 15-30 Minuten langsam auftauen. Sobald sich die Larven anfangen zu bewegen, werden sie mit Hilfe einer Pipette samt etwas Liquid Freezing-Solution auf eine mit OP 50 beimpfte NGM-Platte überführt. Bereits am nächsten Tag nehmen die Würmer ihr Wachstum erneut auf. Nach 2-3 Tagen können einige Würmer auf neue Platten gesetzt werden [STIERNAGLE, 2006].

5.1.1.6 Beeinflussung der Anzahl von Männchen in einer Population

Die Anzahl der Männchen in einer Hermaphroditen-Population ist mit einer Häufigkeit von 1:500 sehr gering. Um die Anzahl der Männchen in einer Population zu erhöhen, werden Hermaphroditen des L4-Stadiums einem Hitze-Schock ausgesetzt [WOOD, 1988]. Dafür wird die Temperatur des Brutschrankes für ca. 8 Stunden auf 30-35°C erhöht. Die folgende Generation weist eine deutlich höhere Anzahl an Männchen auf. Um die Anzahl noch weiter zu erhöhen, werden Männchen mit Hermaphroditen gekreuzt (siehe auch Broodsize-Versuch). Dadurch wird eine Population mit bis zu 50% Männchen erreicht.

5.1.2. Versuche

5.1.2.1. Bodysize-Messungen

Bei *Caenorhabditis elegans* unterscheidet man 4 Larvenstadien, den adulten Wurm sowie zwei Geschlechter, Hermaphrodit und Männchen. Die adulten Hermaphroditen fallen vor allem durch ihre mit Eiern gefüllten Reproduktionsorgane auf, die neben dem Darmtrakt den größten Teil des Körpers ausmachen. Adulte Männchen sind durch ihre Spikula am hinteren Ende deutlich von den Hermaphroditen zu unterscheiden. Mit Ausnahme des 4. Larvenstadiums, das durch einen weißen ovalen Fleck an der ventralen Körperseite zu erkennen ist und des L3-Stadiums, welches durch die entstehenden Gonaden in Form eines kleinen Dreiecks charakterisiert ist, unterscheiden sich die anderen Larvenstadien optisch nur im Hinblick auf ihre Länge. Um die Körperlänge der verschiedenen Stadien zu messen, wird ein einzelner Wurm des gewünschten Stadiums auf einen, mit einem Tropfen Wasser versehenen Objektträger umgesetzt. Über einer Flamme wird das Wasser zum Verdampfen gebracht. Durch die Hitze wird der Wurm getötet und streckt sich gerade. Nun kann die Körperlänge unter dem Mikroskop mit einem integrierten Lineal bei verschiedenen Vergrößerungen gemessen werden.

5.1.2.2. Life-Cycle

Um sich mit den verschiedenen Stadien von *C. elegans* vertraut zu machen wurden Life-Cycles bei 20 und 25°C durchgeführt. Hierzu wurden einige Eier auf beimpfte NGM-Platten gesetzt und bei der jeweiligen Temperatur im Kühlbrutschrank gehalten. Jeden Tag zu bestimmten Uhrzeiten wurde die aktuelle Entwicklung der Würmer beobachtet. Laut I.A. Hope dauert der gesamte Life-Cycle vom Ei bis zum adulten Wurm, der erneut Eier legt, bei 20°C 3,5 Tage und bei 25°C weniger als 3 Tage [HOPE, 1999].

5.1.2.3. Ermittlung der Nachkommenschaft (Broodsize)

Laut W.B. Wood legen unbefruchtete Hermaphroditen ca. 300 Eier, hingegen steigt die Anzahl der Eier bei befruchteten Hermaphroditen auf bis zu 1000 [WOOD, 1988].

Das Ziel des Broodsize Versuches ist es, die genaue Anzahl der Nachkommen eines einzelnen Wurmes zu ermitteln.

a) Broodsize der Hermaphroditen

Der Broodsize-Versuch schließt direkt an die Synchronisierung an, um Würmer des gleichen Alters zu erhalten. Die geschlüpften L1-Larven werden „gesinglet“ (einzeln auf mit OP50 beimpfte NGM-Platte überführt) und bis zum adulten Stadium auf den Platten heranwachsen gelassen. Nun tritt die Eierlegeperiode ein und jeder Wurm wird jeden Tag auf eine neue Platte umgesetzt. Die gelegten Eier werden unter dem Mikroskop mit Hilfe eines Rasters gezählt. Am nächsten Tag werden die nichtgeschlüpften Larven gezählt und somit der Schlüpfungserfolg kontrolliert.

b) Broodsize nach erfolgreicher Kreuzung von Hermaphrodit und Männchen

2 Hermaphroditen und 6 Männchen des L4-Stadiums werden über Nacht gemeinsam auf eine NGM-Platte umgesetzt. Am nächsten Tag werden die befruchteten Hermaphroditen „gesinglet“ und ihre Eier gezählt. Während der Eierlegeperiode werden die Würmer jeden Tag auf eine neue Platte überführt und ihre Nachkommenschaft gezählt.

5.1.2.4. Lebensdauer von *C. elegans* (Lifespan)

Nach J.A. Lewis und J.T. Fleming beträgt die mittlere Lebensdauer eines Männchens 17,7 und die eines Hermaphroditen 19,9 Tage [LEWIS, FLEMING, 1995]. Ziel des Lifespan-Versuches ist es, die genaue Lebensdauer eines einzelnen Wurmes zu bestimmen. Dazu wurden 90 synchronisierte L1-Larven auf, mit OP50 beimpfte Platten verteilt und bei 20°C im Kühlbrutschrank gehalten. Jeden Tag wurden die Würmer auf neue Platten überführt, bis zum Ende ihrer reproduktiven Phase. Danach wurde ein Plattenwechsel nur mehr im Falle einer Verunreinigung oder Nahrungsknappheit durchgeführt. Täglich wurde der Bestand gezählt und etwaige tote Tiere entfernt. So wurde die maximale Lebensdauer der Würmer ermittelt.

5.2. *C. elegans* im Flüssigmedium

5.2.1. Basistechniken mit *C. elegans* [Hamza I., k.A.]

5.2.1.1. Starten einer Kultur von *C. elegans* im Flüssigmedium

Ca. 5 gut besiedelte NGM-Platten mit möglichst wenigen Bakterien werden mit M9-Puffer gewaschen und die Wurmlösung in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen pipettiert. Nun wird das Röhrchen 5-10 Minuten stehen gelassen, damit sich die Würmer absetzen können, anschließend wird der Überstand, der eine große Anzahl der Bakterien enthält, entfernt. Dann wird das Pellet noch zweimal mit M9-Puffer resuspendiert und der Überstand erneut entfernt. Nach zweimaligem Waschen folgt das Bleachen. Danach wird das Pellet in eine mit CeHR-Medium gefüllte Zellkulturflasche überführt.

5.2.1.2. Aufzucht und Haltung von *C. elegans* im Flüssigmedium

C. elegans wird in 25 cm³ Zellkulturflaschen bei einer Temperatur von 20°C im Kühlbrutschrank gehalten. Um eine gute Sauerstoffversorgung zu gewährleisten, werden die Zellkulturflaschen auf einem Plattform-Shaker bei ca. 70 rpm ständig bewegt. Das Medium setzt sich aus 80% CeHR-Medium und 20% Milch zusammen. Bei der Milch handelt es sich um eine handelsübliche ultra-hocherhitze Milch (UHT-Milch) mit einem möglichst geringen Fettanteil, da das Fett die Beobachtung der Würmer erschwert. Anfangs wird 100 µg/ml Tetracyclin als Antibiotikum hinzugefügt, um etwaige bakterielle Verunreinigungen auszuschließen. Bereits nach zwei erfolgreichen Bleaching-Runden kann dieses aber abgesetzt werden. Um sicher zu gehen, dass die Milch frei von bakteriellen Verunreinigungen ist, wird sie auf BHI-Agar-Platten ausgestrichen und 3 Tage bei Raumtemperatur und 37°C inkubiert.

5.2.1.3. Egg Prep/-Bleachen

Um Würmer des gleichen Alters zu erhalten, d. h. sie zu synchronisieren, bleached man. Dazu pipettiert man den gesamten Inhalt einer Zellkulturflasche in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen und zentrifugiert die Würmer bei 800 g 2 Minuten ab. Der Überstand wird anschließend entfernt und zu dem Pellet fügt man 10 ml 0,1 N NaCl-Lösung hinzu und lässt das Röhrchen für 5 Minuten in Eis inkubieren. Die Würmer sinken dabei zu Boden und der Überstand kann anschließend erneut gut abgenommen werden. Nun fügt man 6 ml 0,1 N NaCl-Lösung, 2 ml 5% Bleiche sowie 1 ml 5 N NaOH hinzu. Am Vortex mischen und solange warten (max. 10 min), bis die Würmer aufplatzen und sich alle Embryos herausgelöst haben. Dazwischen wird öfters unter dem Mikroskop der Fortschritt kontrolliert. Anschließend noch 30-40 sec. ruhen lassen, um sicher zu gehen, dass sich alle Eier herausgelöst haben, und dann für 45 Sekunden bei 4°C, 800 g zentrifugieren. Der Überstand wird mit einer Pasteurpipette entfernt. Das

Pellet mit 5-10 ml sterilem Wasser auffüllen, für 5 Sekunden am Vortex mischen, 45 Sekunden erneut zentrifugieren und den Überstand abnehmen. Dieser Waschvorgang mit sterilem Wasser wird noch einmal wiederholt. Zum Schluss werden die Eier in eine Zellkulturflasche mit 10 ml M9-Puffer überführt und über Nacht bei 20°C im Kühlbrutschrank auf dem Plattform-Shaker gestellt. Am nächsten Tag sind L1-Larven geschlüpft. Diese sind synchronisiert und können für verschiedene Versuche verwendet werden.

5.2.1.4. Mediumwechsel

Alle 3-4 Tage sollte ein Mediumwechsel vorgenommen werden. Zu diesem Zweck pipettiert man den gesamten Inhalt der Zellkulturflasche in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen und zentrifugiert das Medium bei 800 g für 2 Minuten ab. Der Überstand wird abgenommen und das Pellet in eine neue Zellkulturflasche mit 8 ml Medium und 2 ml Milch überführt.

5.2.2. Versuche

5.2.2.1. Bodysize-Messungen

Um die Körperlänge der verschiedenen Stadien im Flüssigmedium zu ermitteln, werden Würmer einzeln mit Hilfe einer Pipette aus dem Medium entnommen und in einen Tropfen Wasser auf einen Objektträger pipettiert. Anschließend wird das Wasser über einer Flamme zum Verdampfen gebracht. Der Wurm streckt sich dabei gerade und kann nun unter dem Mikroskop mit Hilfe des integrierten Lineals vermessen werden.

5.2.2.2. Life-Cycle

Um sich eine bessere Handhabung der Stadien anzueignen, sowie genauere Versuchsplanungen ermitteln zu können, wurde ein Life- Cycle bei 20°C durchgeführt. Hierbei wurden synchronisierte L1-Larven in das Medium überführt und jeden Tag hinsichtlich ihres Wachstums und ihrer Entwicklung beobachtet. Der Life-Cycle-Versuch gilt als beendet, wenn die nächste Generation geschlüpft ist. Laut I. Hamza dauert ein Life-Cycle im Flüssigmedium an die 4 Tage [HAMZA, k.A.].

6. Ergebnisse und Diskussion

6.1. Versuche auf NGM-Platten

6.1.1. Lifespan-Versuch

Insgesamt 90 Würmer wurden auf ihre Lebenserwartung getestet. Mit Hilfe des Statistikprogrammes XLSTAT wurden die protokollierten Daten anschließend ausgewertet. Die mittlere Überlebensdauer eines Wurmes im durchgeführten Lifespan-Versuch betrug 18,5 Tage. Die ersten Würmer verstarben am Tag 6., die maximale Lebensdauer betrug in diesem Versuch 27 Tage. Die meisten Tiere verstarben zwischen dem 20. und dem 25. Tag, wobei Tag 22. mit 11 verstorbenen Tieren das Maximum aufweist. Abbildung 15 zeigt die Kaplan-Meier-Überlebenskurve, mit der Lebenswahrscheinlichkeit aller Würmer über die gesamte Versuchsdauer.

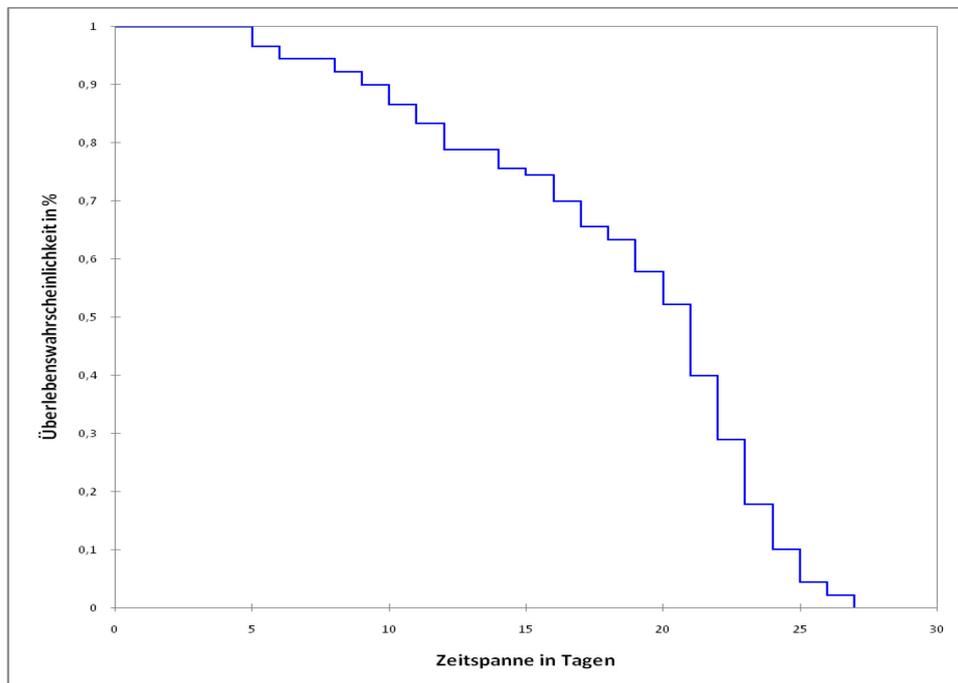


Abb. 15.: Kaplan-Meier-Überlebenskurve

Die Angaben zur Lebenserwartung des Wildtypes von *C. elegans* in der Literatur reichen von Wochenangaben bis zu genauen Tagesberechnungen. Laut Schierenberg und Cassada beträgt die Lebenserwartung von *C. elegans* etwa 3 Wochen [SCHIERENBERG, CASSADA, 1986]. Lewis und Fleming geben die mittlere Lebensdauer eines Hermaphroditen mit 19,9 Tagen an [LEWIS, FLEMING, 1995]. Aber auch eine kürzere Lebensdauer, wie etwa eine mittlere Lebensdauer von 11,8 bis 20 Tage, ist möglich [GEMS, RIDDLE, 2000]. Das durchschnittlich erreichte Alter der Würmer lag mit 18,5 Tagen daher im Bereich des in der Literatur angegebenen Alters.

Die Tatsache, dass einige Würmer früher verstorben sind kann folgende Ursachen haben:

- Ab dem Einsetzen der Eierablage mussten die Würmer täglich mit Hilfe des Wormpicks auf neue NGM-Platten überführt werden, da es aufgrund der hohen Reproduktionsrate von *C. elegans* und der raschen Entwicklung der Larven zu Verwechslungen zwischen den ursprünglichen Versuchswürmern und ihren Nachkommen kommen hätte können. Der Umgang mit dem Wormpick benötigt etwas Übung und so könnte es sein, dass anfänglich Würmer beim Picken verletzt worden sind und somit ihre Lebenserwartung herabgesetzt wurde.
- Mit zunehmendem Alter sinkt bei *C. elegans* nicht nur die Motorik sondern auch die Stresstoleranz. Ältere Würmer bewegen sich kaum noch und sind um einiges empfindlicher gegenüber Berührungen. Es reicht ein leichtes „Antupfen“ mit dem „Wormpick“, um zu überprüfen, ob sie noch am Leben sind. Auch das Überführen auf neue Platten sollte nur in Ausnahmefällen, wie etwa bei einer Überwucherung der Platten, durchgeführt werden. Ältere Tiere sind sehr stressempfindlich und überleben einen Plattenwechsel selten. Es ist möglich, dass die Kontaktaufnahme zu den Würmern mittels des „Wormpicks“ anfangs nicht mit der nötigen Sensibilität durchgeführt wurde und die Würmer

so einem erhöhten Stress ausgesetzt waren, der ihre Lebensdauer beeinflusst haben könnte.

Die genauen Daten des Lifespan-Versuches sind aus dem Anhang zu entnehmen.

6.1.2. Broodsize von *C. elegans*

6.1.2.1. Broodsize der Hermaphroditen

Insgesamt wurden 5 Würmer für den Broodsize-Versuch verwendet. Abbildung 16 zeigt die durchschnittlich gelegten Eier in der Eierlegeperiode.

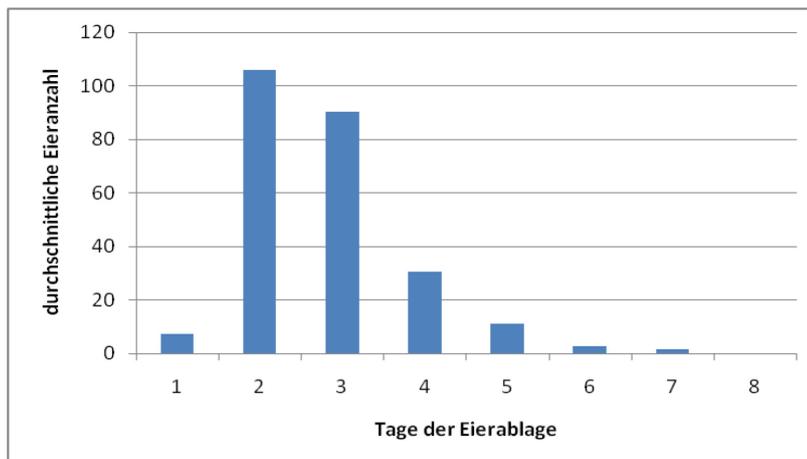


Abb.16: Durchschnittlich gelegte Eier während der Eierlegeperiode

Die Dauer der Eierablage betrug 5 (Wurm 5) bis maximal 7 Tage (Wurm 2). Die meisten Eier wurden am Tag 2 gelegt. Insgesamt waren es 530 Eier; das entspricht einem Durchschnittswert von 106 Eiern pro Wurm. Am ersten Tag wurden 37 Eier gelegt (7,4 Eier pro Wurm), am dritten Tag 452 (90,4 Eier pro Wurm), am vierten Tag 152 (30,4 Eier pro Wurm), am fünften Tag 55 (11 Eier

pro Wurm), am sechsten Tag 14 (2,8 Eier pro Wurm) und am siebenten Tag 7 (1,4 Eier pro Wurm).

Abbildung 17 zeigt die Anzahl der gelegten Eier der fünf unbefruchteten Hermaphroditen. Die meisten Eier legte Wurm Nummer 5 mit 253 Eiern, die wenigsten Wurm Nummer 1 mit 166 Eiern. Die höchste Eiablage pro Tag erzielte Wurm Nummer 1. Er legte am zweiten Tag 123 Eier.

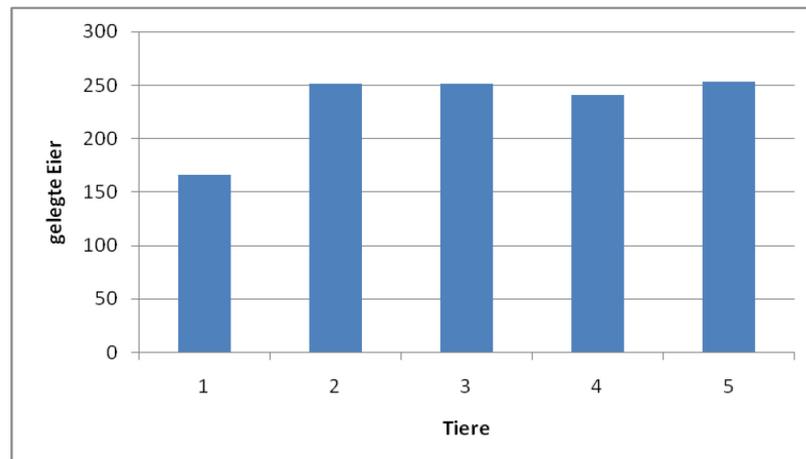


Abb. 17: Anzahl der gelegten Eier pro unbefruchteten Hermaphrodit

Ein Vergleich der Nachkommenschaft mit der Literatur, sowie eine Gegenüberstellung zur Kreuzung, wird in 6.4.3. behandelt.

6.1.2.2. Broodsize der Kreuzung Hermaphrodit und Männchen

Es wurden für diesen Versuch 9 Kreuzungen durchgeführt. Abbildung 18 zeigt die durchschnittlich gelegten Eier während der Legephase. Die meisten Eier (894) wurden am zweiten Tag gelegt (99,3 Eier pro Wurm). Am ersten Tag wurden 47 Eier (5,2 Eier pro Wurm) gelegt, am dritten 791 (87,8 Eier pro Wurm), am vierten 708 (78,6 Eier pro Wurm), am fünften 461 (51,2 Eier pro Wurm), am sechsten 145 (16,1 Eier pro Wurm), am siebenten 111 (12,3 Eier pro Wurm), am achten 122 (13,5 Eier pro Wurm), am neunten 90 (10 Eier pro

Wurm), am zehnten 56 (6,2 Eier pro Wurm), am elften 20 (2,2 Eier pro Wurm) und am zwölften 7 (0,7 Eier pro Wurm).

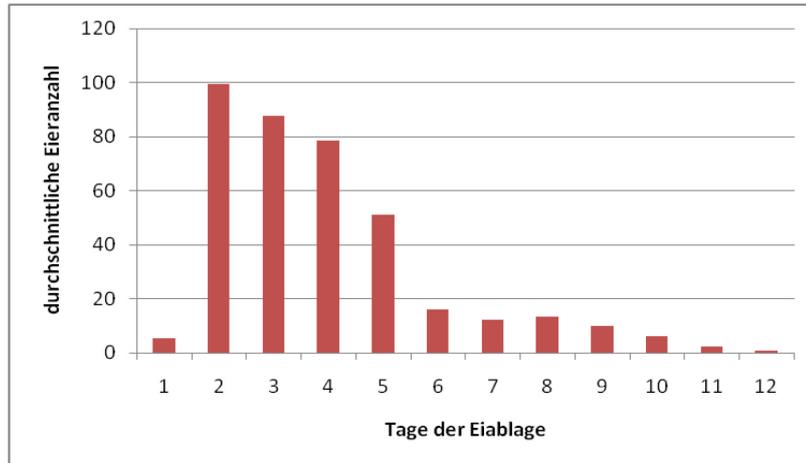


Abb. 18: Durchschnittlich gelegte Eier während der Eierlegephase

Abbildung 19 zeigt die Anzahl der gelegten Eier pro Wurm. Die meisten Eier legte Wurm Nummer 1 (513 Eier), die wenigsten der Wurm mit der Nummer 4 (306 Eier).

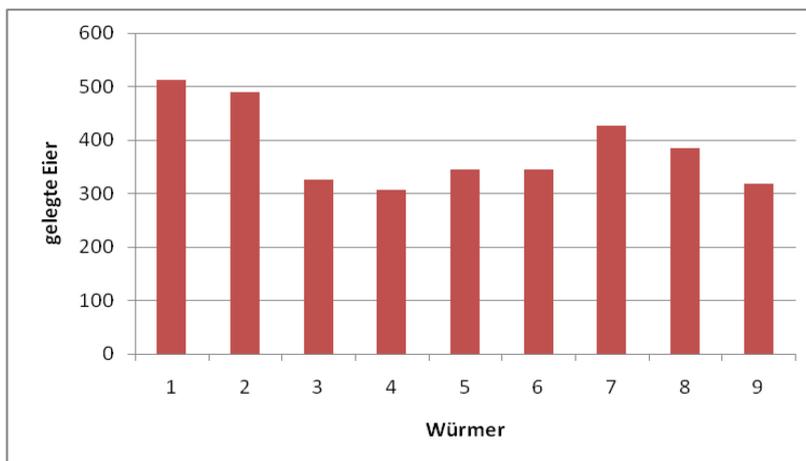


Abb. 19: Anzahl der gelegten Eier pro befruchteten Wurm

Die meisten Eier pro Tag (126) legte Wurm Nummer 1 und 4. Die Eierlegephase erstreckte sich auch hier über mehrere Tage. Sie dauerte im kürzesten Fall 8 Tage und im Längsten 12 Tage. Ein Vergleich der

Nachkommenschaft mit der Literatur, sowie eine Gegenüberstellung mit der Nachkommenschaft von unbefruchteten Hermaphroditen werden in 6.1.2.3. behandelt.

6.1.2.3. Vergleich der Broodsize-Versuche

Laut Literatur legt ein unbefruchteter Hermaphrodit an die 300 Eier, hingegen ein befruchteter Wurm bis zu 1000 Eier. Mit einem Durchschnittswert von 232,4 Eiern pro Wurm ist das Ergebnis des Broodsize-Versuches von unbefruchteten Hermaphroditen mit der Literatur vergleichbar. Allerdings ist die Eianzahl bei den befruchteten Würmern deutlich geringer, als in der Literatur angegeben. Sie unterscheidet sich zwar mit 349 Eiern pro Wurm eindeutig von der der unbefruchteten Würmer, erreicht aber nicht einmal die Hälfte des Literaturwertes. Abbildung 20 zeigt den Vergleich der Nachkommenschaft zwischen unbefruchteten und befruchteten Hermaphrodite

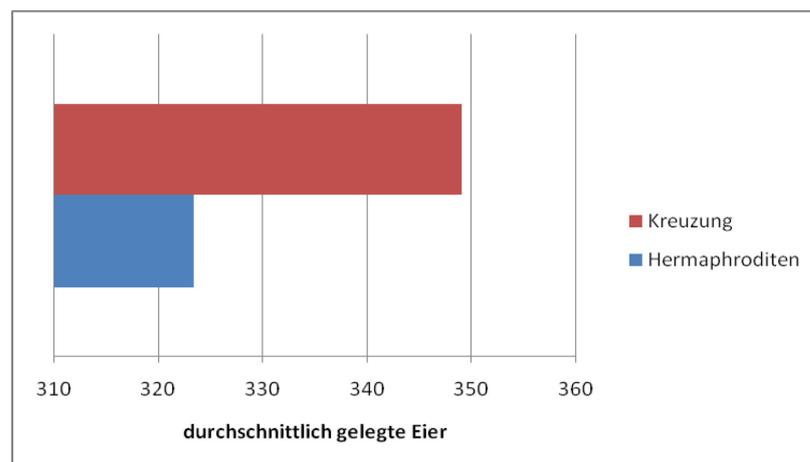


Abb. 20: Vergleich der durchschnittlich gelegten Eier eines unbefruchteten mit denen eines befruchteten Hermaphroditen

Dies kann mehrere Gründe haben. Zum einen erfordert der Broodsize-Versuch ein tägliches Umsetzen der Würmer auf eine neue NGM-Platte. Trotz geübter Handhabung mit dem „Wormpick“ könnte es dabei zu leichten

Verletzungen oder überhöhten Stress gekommen sein, was eine verminderte Eiablage zur Folge gehabt haben könnte. Weiters wäre eine suboptimale Haltung ein Auslöser für verminderte Nachkommenschaft. Da die Platten einer konstanten Temperatur von 20°C ausgesetzt waren, und *E. coli* keine sichtbaren Veränderungen, wie etwa Überwucherung oder vermindertes Wachstum aufgewiesen hat, lassen sich suboptimale Bedingungen bei der Haltung ausschließen. Auch ist es möglich, dass das im Agar zugesetzte Nystatin Auswirkungen auf die Nachkommenschaft hat. Nystatin ist ein Pilzhemmstoff, der vor allem zur längeren Lagerung der Platten zugesetzt wird. Allerdings sollte es nicht in den Platten enthalten sein, die man für die Aufzucht oder diverse Beobachtungen verwendet, da es zu Wachstums und Verhaltensänderungen der Würmer kommen kann [LEWIS, FLEMING, 1995]. Es ist möglich, dass in den für den Broodsize-Versuch verwendeten Platten Nystatin enthalten war, da nicht nur frisch gegossenen, sondern auch Platten aus dem Lager verwendet worden sind. Dies kann ebenfalls einen Einfluss auf die Anzahl der Nachkommenschaft gehabt haben.

Ein weiterer Unterschied zwischen unbefruchteten und befruchteten Hermaphroditen zeigt sich in der Eierlegeperiode. Die Dauer der Eierablage ist bei den Unbefruchteten deutlich kürzer. Sie beträgt in etwa 6 Tage, während bei den befruchteten Würmern eine Eiablage bis zu 12 Tage möglich ist.

Von den insgesamt gelegten 4269 Eiern aller 14 Versuchstiere, sind 41 Eier nicht geschlüpft. Das entspricht in etwa 1% der Nachkommenschaft und weist auf einen sehr hohen Reproduktionserfolg hin.

6.2. Versuche im Flüssigmedium und auf NGM-Platten

6.2.1. Bodysize-Messungen

6.2.1.1. Auf NGM-Platten

Es wurden mit jedem Larvenstadium, sowie mit adulten Würmern vor und nach der Eiablage, 15 Bodysize-Messungen durchgeführt. Tabelle 3 gibt den Mittelwert der 15 Messungen und die entsprechenden Literaturangaben für jedes Stadium an. Die genauen Daten sind aus dem Anhang zu entnehmen.

Stadium	Bodysize in μm	Literatur² (μm)
L1	275	250
L2	420	360-380
L3	620	490-510
L4	820	620-650
Adult	930	900-940
Adult nach Eierablage	1210	1110-1150

Tab.3: Mittelwert der Körpergröße der verschiedenen Stadien von *C. elegans* verglichen mit der Literatur

Im Unterschied zur Literatur wurden die Messungen stets am Ende eines Stadiums, kurz vor Erreichen des Nächsten, durchgeführt, wenn die einzelnen Stadien eindeutig erkennbar waren. Während die Literatur sich meist auf die Mitte eines Stadiums bezieht. So ist die Körperlänge der einzelnen Stadien im Versuch nahe am Wert des nächsten Stadiums in der Literatur, denn es ist zu beachten, dass es innerhalb der einzelnen Larvenstadien verschiedene Entwicklungsstufen gibt. Ein gutes Beispiel ist das L4-Stadium. Das L4-Stadium ist durch einen ovalen Fleck an der ventralen Körperseite charakterisiert. Dieser Fleck ändert während des L4-Stadiums sein Aussehen. Zu Beginn erscheint er dunkler und wird gegen Übergang zum adulten Wurm zu einem deutlich weißen Fleck. So lässt sich der genaue Zeitpunkt des L4-Stadiums gut festlegen. Auch das L3-Stadium

² Quelle: CORSI, 2006

lässt sich gut an den dreieckförmigen, in Ausbildung befindlichen Gonaden erkennen. Jedoch ist es bei den anderen Stadien schwierig, den genauen Zeitpunkt der Entwicklung zu definieren und so könnte es sein, dass nicht immer exakt zum gleichen Entwicklungsfortschritt die Messungen durchgeführt wurden.

6.2.1.2. Im Flüssigmedium

In Zuge des Life-Cycle-Versuchs wurden Würmer von jedem Stadium aus dem Medium entnommen und vermessen. Tabelle 4 gibt den Mittelwert der Messungen an. In Punkt 6.2.1.3. werden die Daten diskutiert und mit den Ergebnissen der NGM-Platten verglichen.

Stadium	Bodysize in μm
L1	257
L2	325
L3	400
L4	570
Adult	770
Adult nach Eierablage	980

Tab. 4: Mittelwert der Körperlängen der verschiedenen Stadien im Flüssigmedium

6.2.1.3. Vergleich der Bodysize-Messungen

Die Bodysize-Messungen ergaben, dass es einen Unterschied der Körperlängen hinsichtlich Flüssigmedium und NGM-Platten gibt. Die einzelnen Stadien sind im Flüssigmedium deutlich kleiner als auf den Platten. Während das L1-Larvenstadium des Flüssigmediums noch dem der Platten entspricht, ist ab der L2-Larve das Wachstum verlangsamt und es dauert länger bis die Größe von 1 mm erreicht ist. Anhand der bereits erwähnten, in

Ausbildung stehenden dreieckigen Gonaden bzw. dem ovalen Fleck an der ventralen Körperseite, konnten das L3- und das L4-Stadium identifiziert werden, um sicherzugehen, dass die gemessene Körperlänge auch dem richtigen Entwicklungsstand zugeschrieben wurde. Abbildung 21 zeigt den Körperlängen-Vergleich des Versuches mit der Literatur.

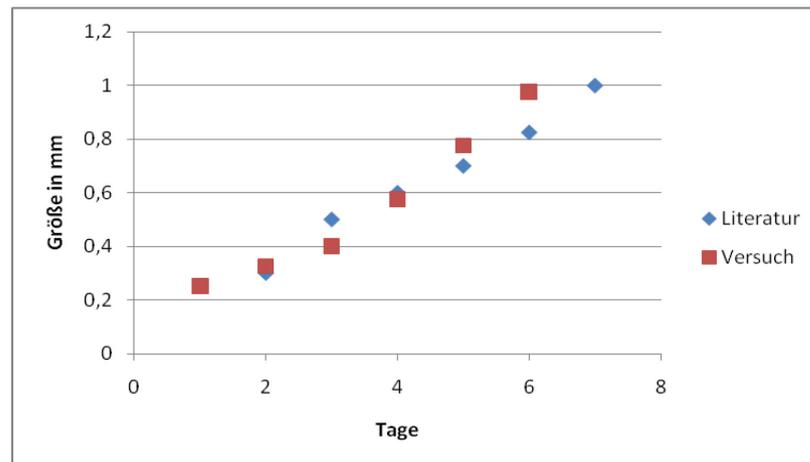


Abb 21: Vergleich der Bodysize-Messung mit der Literatur, Daten der Literatur: SZEWCZYK et al., 2006

6.2.2. Life-Cycle

6.2.2.1. Auf NGM-Platten

Der Life-Cycle Versuch wurde bei 20° sowie bei 25°C zweimal durchgeführt und aus beider Versuchsdurchgängen der Mittelwert entnommen. Tabelle 5 zeigt die Life-Cycles bei 20° und 25°C im Vergleich zur Literatur.

In der Literatur findet man viele unterschiedliche Zeitangaben der Entwicklungsphasen vom gelegten Ei bis zum adulten Wurm, der wieder Eier ablegt. Üblicherweise dauert ein Life-Cycle bei 20°C etwa 3,5 Tage und bei 25°C etwa 3 Tage [HOPE, 1999]. Der Versuch bei 25°C ist, abgesehen von dem verfrühten Schlüpfen der Larven, mit der Literatur vergleichbar. Der Versuch bei 20°C verläuft rascher als in der Literatur angegeben. Vor allem

schlüpfen die L1-Larven bei beiden Versuchen deutlich früher als erwartet. Dies kann daran liegen, dass bei den durchgeführten Versuchen Eier von verschiedenen Würmern verwendet wurden, die sich schon in unterschiedlichen Zellstadien befunden hatten. Somit ist es möglich, dass die Eier zu Versuchsbeginn in ihrer Entwicklung weiter fortgeschritten waren und daher auch früher schlüpften, als in der Literatur angegeben

	Literatur 22°C³	Versuch 20°C	Literatur 25°C⁴	Versuch 25°C
L1	9 h	6 h	8 h	5 h
L2	21 h	22 h	20 h	21 h
L3	29 h	30 h	27 h	26 h
L4	37 h	50 h	34 h	40 h
Adult	48 h	57 h	43 h	46 h
Eierablage	53 h	67 h	51 h	55 h

Tab. 5: Gegenüberstellung der Life-Cycles mit der Literatur

Der Life-Cycle-Versuch diente vor allem dazu, sich mit dem Wachstum von *C. elegans* vertraut zu machen und die einzelnen Stadien zu identifizieren. Daher ist zu beachten, dass hier eine Gruppe an Würmern beobachtet und daraus einen Durchschnittswert entnommen wurde. Hatten die meisten Würmer der Platte ein Stadium erreicht, wurde dieser Zeitpunkt für ein Stadium definiert, auch wenn noch nicht alle Würmer so weit entwickelt waren.

³ Quelle: www.wormbook.org

⁴ Quelle: RIDDLE, 1988

Weiters ist allgemein zu berücksichtigen, dass die Versuche nur zweimal durchgeführt und die Zeitpunkte der Entwicklungsüberwachungen an die Laborbedingungen angepasst wurden. Während der Nacht fiel die Kontrolle somit zur Gänze aus. Über den Tag hinweg wurden alle zwei bis drei Stunden nach den Würmern gesehen. Die Entwicklungsstufen im Laufe der Nacht wurden am nächsten Tag rekonstruiert.

Auch hier ist wieder zu beachten, dass es innerhalb der einzelnen Larvenstadien die verschiedenen Entwicklungsstufen gibt. Dies kann ein weiterer Grund für zeitliche Abweichungen der einzelnen Stadien zur Literatur sein.

Unter Berücksichtigung dieser Tatsachen lässt sich sagen, dass der Life-Cycle-Versuch sich gut mit den Angaben der Literatur deckt und durchaus vergleichbar ist.

6.2.2.2. Im Flüssigmedium

Der Life-Cycle wurde im Flüssigmedium bei 20°C durchgeführt. Ein Zyklus von der L1-Larve bis zum erneut geschlüpften Wurm dauert 4,5 Tage. In Punkt 6.2.3. wird der Life-Cycle des Flüssigmediums mit dem der NGM-Platten verglichen.

6.2.2.3. Vergleich der Life-Cycles

Der Life-Cycle bei 20°C verläuft auf den NGM-Platten mit 2,8 Tagen deutlich rascher als im Flüssigmedium. Hier dauert ein Zyklus 4,5 Tage. Laut I. Hamza dauert am Beginn der Kultivierung im Flüssigmedium ein Life-Cycle 7-10 Tage. Bei den folgenden Generationen verkürzt sich dieser schließlich auf etwa 4 Tage [HAMZA, k. A.]. Der Life-Cycle verläuft daher im Flüssigmedium prinzipiell langsamer als unter entsprechenden Bedingung auf NGM-Platten. 4,5 Tage stimmen somit mit der in der Literatur

angegebenen Zeit überein und lassen auf eine bereits etablierte Population schließen.

6.2.3. Vergleich des Flüssigmedium mit den NGM-Platten

Der Life-Cycle-Versuch sowie die Bodysize-Messungen haben gezeigt, dass es Unterschiede hinsichtlich der Entwicklung und des Wachstums von *C. elegans* im Flüssigmedium und auf NGM-Platten gibt. Der Entwicklungszyklus dauert bei gleichen Verhältnissen im Flüssigmedium um etwa 1 Tag länger. Auch hinsichtlich der Körperlänge gibt es Abweichungen. Die Larven im Flüssigmedium sind kleiner und es dauert länger bis *C. elegans* eine Länge von 1 mm erreicht hat. Jedoch erzielte das von I. Hamza modifizierte CeHR-Medium (kurz mCeHR-Medium) deutliche Verbesserungen hinsichtlich des Wachstums und der Entwicklung von *C. elegans* im Vergleich zum CeMM. Dauerte es beim CeMM noch zwei bis dreimal solange bis eine Länge von 1 mm erreicht wurde [SZEWCZYK et al., 2003], erreicht der Wurm im mCeHR-Medium diese Länge wesentlich rascher. Der Unterschied zu den NGM-Platten liegt hier bei wenigen Tagen. Auch der Life-Cycle mit nur 1 Tag Unterschied zur Literatur [HOPE, 1999] zeigt im mCeHR-Medium einen Fortschritt zum CeMM. So lässt sich sagen, dass die Entwicklung des mCeHR-Mediums Versuchsdaten mit denen der NGM-Platten vergleichbar gemacht hat, auch wenn, wie die 2 durchgeführten Versuche gezeigt haben, noch keine völlig identen Ergebnisse erzielt werden können.

Ob eine komplette Annäherung an die NGM-Platten erreicht werden kann, muss mit Hilfe weiterer Versuch geklärt werden. Jedoch schließe ich mich der Meinung von Szewczyk et al. an. Demnach passt sich *C. elegans* den verschiedenen Lebensmöglichkeiten, im Flüssigmedium und auf NGM-Platten, unterschiedlich an. Die Unterschiede in der Entwicklung sowie im Wachstum im axenischen Flüssigmedium resultieren laut Szewczyk et al. durch unterschiedliche Umweltbedingungen und einer unterschiedlichen Diät

[SZEWCZYK et al., 2006]. Das Leben im Flüssigmedium erscheint mir wesentlich stressreicher für die Würmer, da eine beinahe durchgehende Bewegung erforderlich ist. So ist es meiner Meinung nach fraglich, ob auch mit weiter veränderten Nährstoffbedingungen und weiteren Optimierungen des mCeHR-Mediums diese zusätzliche Belastung ausgeglichen werden kann.

7. Schlussbetrachtung:

Ziel dieser Arbeit war einerseits die Etablierung von *C. elegans*, sowie das Erlernen von Basistechniken und grundlegenden Handhabungen in seiner Aufzucht und Haltung. So war es wichtig sich mit *C. elegans* nicht nur auf den NGM-Platten, sondern auch im Flüssigmedium vertraut zu machen. Um dies zu gewährleisten, wurden neben Üben mit dem „Wormpick“ oder Synchronisierung auch Life-Cycles, Lebenserwartung, Wurmgrößen und die Nachkommenschaft von *C. elegans* ermittelt. Hierbei war es interessant, herauszufinden, dass es Unterschiede in Bezug auf das Wachstum und die Entwicklung von *C. elegans* auf den NGM-Platten und im Flüssigmedium gibt. So dauert ein Life-Cycle bei 20°C im Flüssigmedium länger als unter denselben Bedingungen auf den NGM-Platten. Auch wächst der Wurm im Flüssigmedium langsamer heran und die Stadien sind vergleichsweise kleiner. Jedoch liegt dies meiner Meinung nach nicht am Medium selbst, eher lassen sich die Unterschiede auf die verschiedenen Umweltbedingungen zurückführen. Ein Leben im Flüssigmedium ist weitaus stressreicher und bedarf einer beinahe ständigen Bewegung der Würmer. Dies könnte der Grund für einen längeren Life-Cycle und eine geringere Körpergröße sein.

Im Bezug auf die Nachkommenschaft kann gesagt werden, dass sich die Anzahl der gelegten Eier von unbefruchteten und befruchteten Hermaphroditen auf NGM-Platten unterscheidet. Befruchtete Hermaphroditen haben eine deutlich höhere Nachkommenschaft und eine dementsprechend längere Eierlegeperiode als ihre unbefruchteten Artgenossen. Die Lebenserwartung auf NGM-Platten liegt mit durchschnittlich 17,2 Tagen im Bereich des Literaturwertes. Die Umweltbedingungen sowie die Handhabung mit *C. elegans* können somit als optimal angesehen werden.

8. Zusammenfassung:

Folate spielen eine wichtige Rolle im menschlichen Stoffwechsel. Neben der Bedeutung für die DNA-Bildung fungieren Folate auch als Überträger von Methylgruppen, vor allem bei der Methylierung von Homocystein zu Methionin. Die Methylentetrahydrofolatreduktase (MTHFR) ist hierbei, neben der Methioninsynthase (MS) und der Cystathionin-beta-Synthase (CBS), das zentrale Enzym des Folatstoffwechsels. Aufgrund verschiedener Mutationen kann es zu Polymorphismen der jeweiligen Enzyme kommen. So gibt es bei der MTHFR den C677T-Polymorphismus, sowie den A1298C-Polymorphismus. Bei der Methioninsynthase kann eine A2756G-Variante auftreten und auch bei der CBS treten diverse Polymorphismen auf. Diese Mutationen können einen erhöhten Folsäurebedarf zur Aufrechterhaltung der Enzymaktivität, einen erhöhten Homocysteinspiegel im Plasma, sowie schwerwiegende Erkrankungen bis hin zu Fehlbildungen beim Embryo zur Folge haben.

Der Nematode *C. elegans* wurde erstmals um 1900 entdeckt und war von Anfang an für die Forschung von Interesse. In den 60er Jahren als Modellorganismus eingeführt, stieg seine Bedeutung enorm an und wird auch in Zukunft in der Forschung nicht mehr wegzudenken sein. Bemerkenswert ist vor allem die Ähnlichkeit zum humanen Genom. So gibt es in *C. elegans* homologe Gene für die MTHFR, die MS und die CBS. Auch wurde ein orthologes Gen für einen Folattransporter, *fol-1*, beim Wurm gefunden.

In den praktischen Versuchen dieser Arbeit wurden die Körperlänge, die Life-Cycles, die Lebensdauer sowie die Nachkommenschaft ermittelt und mit der Literatur verglichen. Weiters wurden die Unterschiede zwischen der Haltung auf NGM-Platten und im Medium anhand der Bodysize-Messungen und dem Life-Cycle hervorgehoben. Bei Abweichungen von Literaturwerten wurde in

der Diskussion auf mögliche Ursachen eingegangen und Überlegungen für Verbesserungen aufgezeigt.

9. Abstract

Folates play an important role in the human metabolism. They are important for the DNA-formation, as well as for the methyl -transfer, especially for the methylation of homocysteine to methionine. The methylene tetrahydrofolate reductase (MTHFR), the methionine synthase (MS) and the cystathionine beta synthase (CBS) are the central enzymes of the folate metabolism. Due to certain mutations, polymorphism of these enzymes may appear. The two most important polymorphism of the MTHFR are the C677T-polymorphism and the A1298C-polymorphism. For the methionine synthase, the A2756G-polymorphism is one of the most common. Mutations also appear for the CBS. These mutations may result in an increased requirement for folic acid to maintain the enzymatic activity, an increased homocysteine-level and some diseases or even malformation of the embryo.

The nematode *C. elegans* was first discovered 1900 and from the very beginning it was in the focus of research- interest. During the 60ies it was established as a model organism. Since then, the interest it gained increased enormously and it will retain its role as an important research object in the scientific future. Its similarity to the human genome is remarkable. Some homologue genes exist in *C. elegans* for the MTHFR, the MS and the CBS. An orthologue gene for the folate-transporter *fol-1* was also found.

During experimental work of this thesis, the bodysize, life-cycles, life-span and progeny were determined and compared with investigations from the literature. Especially the differences between cultivation on NGM-plates and in liquid medium were investigated by comparing the bodysize and the life-cycles. Probable cases of deviations within the present results to the data in the literature are discussed in this work and suggestions for future improvements are indicated.

10. Anhang

10.1. Bodysize-Messungen

Auf NGM-Platten:

L1	L2	L3	L4	Adult	Adult nach Egg
0,025	0,0425	0,05	0,085	0,0925	0,12
0,025	0,04	0,045	0,0825	0,0975	0,1225
0,03	0,04	0,065	0,09	0,0875	0,1125
0,03	0,0425	0,065	0,0875	0,095	0,1075
0,0275	0,0375	0,0725	0,09	0,09	0,1175
0,0325	0,04	0,06	0,0725	0,0975	0,13
0,03	0,0475	0,0725	0,0775	0,0925	0,1375
0,025	0,04	0,065	0,075	0,0975	0,1275
0,03	0,0425	0,065	0,085	0,0875	0,1225
0,025	0,045	0,0675	0,0825	0,0925	0,115
0,025	0,0425	0,0525	0,0775	0,0975	0,125
0,0325	0,045	0,06	0,075	0,09	0,12
0,03	0,0375	0,07	0,085	0,0975	0,1225
0,0225	0,0425	0,0575	0,0825	0,095	0,1175
0,0225	0,04	0,065	0,085	0,09	0,12

Im Flüssigmedium

0,025	0,0325	0,0375	0,0575	0,0725	0,0975
0,025	0,03	0,04	0,0525	0,0725	0,095
0,0275	0,035	0,0375	0,0525	0,075	0,1025
		0,04	0,055	0,08	
		0,045	0,0675	0,085	

10.2. Lifespan

Tag	Anzahl der lebende Würmer
1	90
2	90
3	90
4	90
5	90
6	87
7	85
8	85
9	83
10	81
11	78
12	75
13	71
14	71
15	68
16	67
17	63
18	59
19	57
20	52
21	47
22	36
23	26
24	16
25	9
26	4
27	2
28	0

10.3. Broodsize

Tag	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	Gesamteianzahl
Wurm													
1⁵	16	123	97	11	5	2	/	/	/	/	/	/	166
2⁶	17	126	94	89	53	24	19	31	29	23	7	1	513
3	7	89	96	94	57	32	28	42	20	11	8	6	490
4	7	85	87	46	9	10	7	/	/	/	/	/	251
5	6	61	84	75	44	24	11	6	7	7	/	/	325
6	7	106	91	27	16	1	/	/	/	/	/	/	251
7	2	126	86	48	18	7	6	5	6	1	1	/	306
8	2	92	95	63	31	16	21	12	10	2	1	/	345
9	3	91	108	55	78	6	3	1	/	/	/	/	345
10	3	119	90	114	62	9	8	9	4	5	3	/	426
11	4	100	82	36	18	1	/	/	/	/	/	/	241
12	3	116	95	32	7	/	/	/	/	/	/	/	253
13	4	98	90	105	71	10	4	2	/	/	/	/	384
14	3	92	48	65	47	17	11	14	14	7	/	/	318

⁴ unbefruchtete Hermaphroditen

⁶ befruchtete Hermaphroditen

11. Literaturverzeichnis

AFMAN L., MÜLLER M.: Nutrigenomics: from molecular nutrition to prevention of disease, *J Am Diet Assoc.*, 2006 Apr; 106(4):569-76

BÄSSLER K. H., GOLLY I., LOEW D., PIETRZIK K.: Vitamin Lexikon für Ärzte, Apotheker und Ernährungswissenschaftler, Urban& Fischer Verlag, 3. Auflage, 2002

BIESALSKI H. K., KÖHRLE J., SCHÜMANN K.: Vitamine, Spurenelemente und Mineralstoffe, Prävention und Therapie mit Mikronährstoffen, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 2002

BRAECKMAN B.P., HOUTHOOFD K., VANFLETEREN J.R.: Intermediary metabolism, *WormBook*, ed. The *C. elegans* Research Community, 2009, www.wormbook.org 14.5.2009

CORSI A. K.: A biochemist's guide to *Caenorhabditis elegans*, Elsevier, Science Direct, *Analytical Biochemistry* 359 (2006) 1-17

DAMARAJU V. L., CASS C. E., SAWYER M. B.: Renal Conservation of Folates: role of folate transport proteins, in LITWACK G. (Hrsg.) *Vitamins and Hormones Volume 79: Folic Acid and Folates*, Elsevier Inc., 2008

DGE, ÖGE, SGE, SVE (Hrsg.): Referenzwerte für die Nährstoffzufuhr, Umschau Braus Verlag, Frankfurt am Main, 1. Auflage, 3. korrigierter Nachdruck, 2008

DONNELLY J.G., Folic acid, *Critical Reviews in Clinical Laboratory Science*, 38(3):183-223, 2001

EMMONS S. W., STERNBERG D. W.: Male Development and Mating Behavior, in RIDDLE D. L., BLUMENTHAL T., MEYER B. J., PRIESS J. R. (Hrsg.): *C. elegans II*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1997 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bv.fcgi?call=bv.View..ShowTOC&rid=ce2.TOC&depth=10> 14.3.09

FOX J. T., STOVER P. J.: Folate-Mediated One-Carbon Metabolism, in LITWACK G. (Hrsg.) *Vitamins and Hormones Volume 79: Folic Acid and Folates*, Elsevier Inc., 2008

GRAW J.: Genetik, Springer Verlag, Berlin Heidelberg, 4. Auflage, 2006

KANG, S.S. et al.: Intermediate Hyperhomocysteinemia: a Thermolabile Variant of Methylene tetrahydrofolate Reductase. *Am. J. Hum. Genet.* 43, 414-421, 1988

HAGEMANN R.: Allgemeine Genetik, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg Berlin, 4. Auflage, 1999

HAMZA I.: Maintenance of *C. elegans* in axenic growth cultures and generation of large numbers for biochemical studies, Department of Animal & Avian Science and Department of Cell Biology & Molecular Genetics, University of Maryland, College Park, Maryland 20742, USA, http://ansc.umd.edu/I_Hamza/mCeHR%20Growth%20Medium_hamza.pdf
14.03.2009

HAMZA I.: Modified *C. elegans* Habitation and Reproduction Medium (mCeHR medium), Februar 2005 http://www.lib.umd.edu/drum/bitstream/1903/2204/1/CeHR_medium.htm 28.8.2008

HOPE I. A.: *C. elegans*: A Practical Approach, Background on *Caenorhabditis elegans*, Oxford University Press, 1999

HORN F., LINDENMEIER G., MOC I., GRILLHÖSL C., BERGHOLD S., SCHNEIDER N., MÜNSTER B.: Biochemie des Menschen, Georg Thieme Verlag, 2. Auflage, 2002

LEWIS J.A., FLEMING J.T.: Basic Culture Methods, in EPSTEIN H.F. und SHAKES D.C. (Hrsg.) *Methods in Cell Biology*, Volume 48, *Caenorhabditis elegans*: Modern Biological Analysis of an Organism, Academic Press, 1995

LORENZEN S.: Nematoda, Fadenwürmer, in WESTHEIDE W., RIEGER R. (Hrsg.), *Spezielle Zoologie*, Erster Teil: Einzeller und Wirbellose Tiere, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, Jena, New York, 1996

LU N.C., HIEB W.F., STOKSTAD E.L.R.: Effect of Vitamin B12 and Folate on Biosynthesis of Methionine from Homocysteine in the Nematode *Caenorhabditis briggsae*, *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 151, 701-706 (1976)

MATHERLY L. H., HOU Z.: Structure and Function of the Reduced Folate Carrier: a paradigm of a major facilitator superfamily mammalian nutrient transporter, in LITWACK G. (Hrsg.) *Vitamins and Hormones* Volume 79: Folic Acid and Folates, Elsevier Inc., 2008

RIDDLE D. L.: The Dauer Larva, in WOOD W. B. and the Community of *C. elegans* Researchers (Hrsg.), The Nematode *Caenorhabditis Elegans*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1988 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bv.fcgi?call=bv.View..ShowTOC&rid=ce2.TOC&depth=10> 14.3.09

RIDDLE D. L., BLUMENTHAL T., MEYER B. J., PRIESS J. R. (Hrsg.): *C. elegans* II, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1997

SCHIERENBERG E., CASSADA R.: Der Nematode *Caenorhabditis elegans*- ein entwicklungsbiologischer Modellorganismus, Biologie in unserer Zeit, Vol. 16. No. 1-February 1986

STANGER O.: Homocystein: Grundlagen, Klinik, Therapie, Prävention, Verlag für medizinische Wissenschaft Wilhelm Maudrich, Wien, 2004

STEIN L.D., BAO Z., BLASIAZ D., BLUMENTHAL T., BRENT M.R., CHEN N., CHINWALLA A., CLARKE L., CLEE C., COGLAN A., COULSON A., D'EUSTACHIO P. et al.: The Genome Sequence of *Caenorhabditis briggsae*: A Plattform of Comparative Genomics, PLoS Biology, 2003, Volume 1, Issue 2, Page 166-192

STIERNAGLE T.: Maintenance of *C. elegans*, 11th Februar 2006, The *C.elegans* Research Community, WormBook, www.wormbook.org 16.5.2008

SZEWCZYK N. J., KOZAK E., CONLEY C. A.: Chemically defined medium and *Caenorhabditis elegans*, BMC Biotechnology 2003, 3:19

SZEWCZYK N. J., UDRANSZKY I. A., KOZAK E., SUNGA J., KIM S. K., JACOBSON L. A., CONLEY C. A.: Delayed development and lifespan extension as features of metabolic lifestyle alteration in *C. elegans* under dietary restriction, The Journal of Experimental Biology 209, 4129-4139, 2006

TCHANTCHOU F., SHEA T. B.: Folate Deprivation, the Methionine Cycle, and Alzheimers Disease, in LITWACK G. (Hrsg.) Vitamins and Hormones Volume 79: Folic Acid and Folates, Elsevier Inc., 2008

THOMAS P., FENECH M.: Methylenetetrahydrofolat Reductase, Common Polymorphisms, and Relation to Disease, in LITWACK G. (Hrsg.) Vitamins and Hormones Volume 79: Folic Acid and Folates, Elsevier Inc., 2008

VAN DER PUT N. M., GABREELS F., STEVENS E. M., SMEITINK J. A., TRIJBELS F. J., ESKES T. K., VAN DER HEUVEL L. P., BLOM H. J.: A second common mutation in the methylenetetrahydrofolat reductase gene: An additional risk factor für neural-tube defects? Am. J. Hum. Genet., 1998, 62, 1044-1051

VANFLETEREN J. R.: Axenic Culture of Free-Living, Plant-Parasitic, and Insect -Parasitic Nematodes, *Ann. Rev. Phytopathol.* 1978. 16:131-57

WILCKEN B., BAMFORTH F., LI Z., ZHU H., RITVANEN A., REDLUND M., STOLL C., ALEMBIK Y., DOTT B., CZEIZEL A. E., GELMAN-KOHAN Z., SCARANO G. et al.: Geographical and ethnic variation of the 677C>T allele of 5, 10 methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR): Findings from over 7000 newborns from 16 areas world wide, *J. Med. Genet.*, 2003, 40, 619-625

WOOD W. B.: Introduction to *C. elegans* Biology, in WOOD W. B. and the Community of *C. elegans* Researchers (Hrsg.), *The Nematode Caenorhabditis Elegans*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1988

ZHAO R., GOLDMAN I. D.: The molecular identity and characterization of a Proton-Coupled Folate Transporter-PCFT; biological ramification and impact on the activity of pemetrexed, *Cancer Metastasis Review*, (2007) 26:129-139

Lebenslauf:

Angaben zur Person:

Name: Sophie Katharina Langer

Geburtsdatum: 21.03.1984

Geburtsort: Wien

Schulische Ausbildung:

1990-1994: Volksschule Schäfergasse, 1040 Wien

1994-2002: BR/BRG Rainergasse, 1050 Wien

2002-2009: Studium der Ernährungswissenschaften

Praktika:

Juli 2006: Universität für Bodenkultur Wien, Department für
Lebensmittelwissenschaften und Lebensmitteltechnologie

September 2006: AGES

August 2007: Wieden Bräu, Biererzeugung

Oktober 2007: Edith Kubiena, Diätologin

Ich habe mich bemüht, sämtliche Inhaber der Bildrechte ausfindig zu machen und ihre Zustimmung zur Verwendung der Bilder in dieser Arbeit eingeholt. Sollte dennoch eine Urheberrechtsverletzung bekannt werden, ersuche ich um Meldung bei mir.

