



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

„Untersuchung des Populationswachstums,
Broodsize und Lifespan von *C. elegans* N2 im
Flüssigmedium nach Modifizierung des
Nährstoffgehaltes von Folsäure“

Verfasserin

Christina Stiegler

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Naturwissenschaften (Mag.rer.nat.)

Wien, 2011

Studienkennzahl lt. Studienblatt:

A 474

Studienrichtung lt. Studienblatt:

Diplomstudium Ernährungswissenschaften

Betreuerin / Betreuer:

Univ.-Prof. Dr. Jürgen König

Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle bei all jenen Personen bedanken, die mir diese Diplomarbeit ermöglicht haben und mir während ihrer Erarbeitung zur Seite gestanden sind.

Allen voran ein herzliches Dankeschön an Univ.- Prof. Dr. Jürgen König für die Themenvergabe und Betreuung meiner Arbeit.

Vielen Dank auch an das gesamte Team der Abteilung „Emerging Focus Nutrigenomics“, insbesondere an Mag. Doris Freistetter, die mich immer unterstützt hat und mir nicht nur während der Laborarbeit, sondern bis zur Fertigstellung der Diplomarbeit eine große Hilfe war.

Danke auch an Mag. Martina Köberl, Claudia Schimmer und Alexandra Maringer für die gute Zusammenarbeit im Labor.

Mein aufrichtigster Dank aber gilt meinen Eltern, ohne deren liebevolle Unterstützung diese Arbeit und mein gesamtes Studium nicht möglich gewesen wären.

Ihr habt nie an mir gezweifelt und mich immer ohne Wenn und Aber in jeder Situation unterstützt, ohne eure Hilfe hätte ich es nie so weit geschafft.

Vielen, vielen Dank für Alles!

Meiner Schwester Carolin danke ich von ganzem Herzen für die vielen aufbauenden Worte und hilfreichen Ratschläge, vor allem aber dafür, dass sie immer ein offenes Ohr für mich hatte und meine Stimmungsschwankungen verständnisvoll hingenommen hat.

Ein großes Dankeschön auch an meinen Bruder Christoph, der immer für mich da war.

Meinem Freund Manuel, der mir eine große Stütze war, danke ich von ganzem Herzen für das geduldige Zuhören, sein Verständnis und das tapfere Ertragen meiner Launen.

Schließlich möchte ich mich bei meinen Mädels bedanken, die mich mit ihren wertvollen Ratschlägen und Aufmunterungen durch das gesamte Studium begleitet haben und stets mit mir durch dick und dünn gegangen sind.

Danke für die schöne Studienzeit und den Zusammenhalt auch in schwierigen Zeiten!

Inhaltsverzeichnis:

1. Einleitung und Fragestellung	1
2. <i>Caenorhabditis elegans</i>	3
2.1. Allgemeine Beschreibung.....	3
2.2. <i>C. elegans</i> als Modellorganismus	5
2.3. Anatomie	6
2.4. Geschlechtsdifferenzierung.....	9
2.5. Lebenszyklus	10
2.6. Laborzucht von <i>C. elegans</i>	12
2.6.1. <i>C. elegans</i> auf NGM-Platten	13
2.6.2. <i>C. elegans</i> im Flüssigmedium	14
3. Folsäure.....	18
3.1. Chemische Struktur und Eigenschaften	18
3.2. Vorkommen.....	19
3.3. Bedarf.....	20
3.4. Folsäuremangel und Fehlbildungen	21
3.5. Aufnahme, Transport und Speicherung	22
3.6. Biochemische Funktion und Folsäurestoffwechsel beim Menschen	25
3.7. Folsäuremetabolismus bei <i>C. elegans</i>	27
3.8. Aufnahme von Folsäure bei <i>C. elegans</i>	28
3.9. Folsäure und andere Modellorganismen	29
4. Material	31
4.1. Chemikalien	31
4.2. Geräte	33
4.3. Verbrauchsmaterialien	33
4.4. <i>C. elegans</i> -Stamm	34
4.5. <i>Escherichia coli</i> OP 50	34
4.6. Zusammensetzung der Lösungen	34
4.6.1. NGM-Agar	34
4.6.1.1. KPO_4 -Puffer für den NGM-Agar	35
4.6.1.2. Cholesterin für den NGM-Agar	35

4.6.1.3. Nystatin-Lösung für den NGM-Agar.....	36
4.6.2. LB-Bouillon.....	36
4.6.3. LB-Agar.....	36
4.6.4. Bleach-Lösung	36
4.6.5. M9-Puffer	37
4.6.6. CeHRFD-Medium.....	37
4.6.7. Herstellung der Folsäurestammlösung (10 x konzentriert).....	42
5. Methoden.....	43
5.1. <i>C. elegans</i> auf NGM-Platten	43
5.2. <i>C. elegans</i> im Flüssigmedium	43
5.2.1. Basistechniken mit <i>C. elegans</i>	43
5.2.1.1. Starten einer Kultur von <i>C. elegans</i> im Flüssigmedium	44
5.2.1.2. Aufzucht und Haltung von <i>C. elegans</i> im Flüssigmedium	44
5.2.1.3. Synchronisieren von <i>C. elegans</i>	45
5.2.1.4. Mediumwechsel	46
5.3. Versuche	46
5.3.1. Populationswachstum	46
5.3.2. Broodsize	50
5.3.3. Lifespan.....	52
6. Ergebnisse und Diskussion.....	54
6.1. Populationswachstums-Versuch	54
6.1.1. Vergleich der verschiedenen Folsäurekonzentrationen	55
6.2. Broodsize-Versuch.....	62
6.2.1. Versuch mit 1 x Folsäure.....	64
6.2.2. Versuch mit 1/1000 Folsäure	67
6.2.3. Vergleich der Broodsize-Versuche.....	71
6.3. Lifespan-Versuch	74
6.3.1. Versuch mit 1 x Folsäure.....	76
6.3.2. Versuch mit 1/1000 Folsäure	78
6.3.3. Vergleich der Lifespan-Versuche	81
7. Schlussbetrachtung	84
8. Zusammenfassung.....	87

9. Abstract.....	88
10.Literaturverzeichnis	89

Abbildungsverzeichnis:

Abb. 1: Querschnitt durch die Körpermitte eines adulten Hermaphroditen	7
Abb. 2: adulter Hermaphrodit.....	8
Abb. 3: Männchen.....	10
Abb. 4: Hermaphrodit.....	10
Abb. 5: Lebenszyklus von <i>C. elegans</i>	11
Abb. 6: Strukturformel Folat	19
Abb. 7: Resorption von Folat.....	23
Abb. 8: Stoffwechsel von Homocystein.....	26
Abb. 9: Formel Variationskoeffizient	47
Abb. 10: 6-Well	48
Abb. 11: Ergebnisse des Populationswachstums-Versuches.	55
Abb. 12: Populationsgrößen von <i>C. elegans</i> N2 an Tag 6 und 9 in %.	56
Abb. 13: Populationsgrößen von <i>C. elegans</i> N2 an Tag 6, 9 und 13 in %.	59
Abb. 14: durchschnittlicher Broodsize von <i>C. elegans</i> N2 pro Tag während der Eierlegperiode	64
Abb. 15: Broodsize pro Wurm bei 1 x FS.....	66
Abb. 16: durchschnittlicher Broodsize von <i>C. elegans</i> N2 pro Tag während der Eierlegperiode	67
Abb. 17: prolabierte Vulva, Vulva beim Wild-Typ.....	68
Abb. 18: Broodsize pro Wurm bei 1/1000 FS.....	70
Abb. 19: Vergleich der Broodsize-Versuche von <i>C. elegans</i> N2 bei 1 x FS und 1/1000 FS.....	72
Abb. 20: Lifespan von <i>C. elegans</i> N2 bei 1 x FS.....	76
Abb. 21: Kaplan-Meier-Überlebenskurve von <i>C. elegans</i> bei 1 x FS.	77
Abb. 22: Lifespan von <i>C. elegans</i> bei 1/1000 FS.....	79
Abb. 23: Kaplan-Meier-Überlebenskurve von <i>C. elegans</i> bei 1/1000 FS.	80
Abb. 24: Kaplan-Meier-Überlebenskurve von <i>C. elegans</i> bei 1 x FS und 1/1000 FS.....	81
Abb. 25: Vergleich der Lifespanversuche (Mean Lifespan) von <i>C. elegans</i> bei 1 x FS und 1/1000 FS.....	82

Tabellenverzeichnis:

Tab. 1: D-A-CH Zufuhrempfehlungen für Folsäure	20
Tab. 2: Auflistung der Angaben zum Broodsize von <i>C. elegans</i> in der Literatur	63
Tab. 3: Broodsize gesamt pro Tag während der Eierlegperiode bei 1 x FS.	65
Tab. 4: Broodsize gesamt pro Tag während der Eierlegperiode bei 1/1000 FS	69
Tab. 5: Vergleich der Broodsize-Versuche von 1 x FS und 1/1000 FS.	71
Tab. 6: Auflistung der Angaben zum Lifespan von <i>C. elegans</i> in der Literatur	75

1. Einleitung und Fragestellung

In den letzten Jahren hat sich der Fokus der Ernährungsforschung einem Wandel unterzogen, weg von der Epidemiologie und Physiologie hin zur molekularen Biologie und Genetik.

Dies ist hauptsächlich die Folge einer wachsenden Erkenntnis über die Auswirkungen der Ernährung auf Gesundheit und Krankheit.

Um diese begreifen zu können, ist ein tiefes Verständnis über die Wirkungsweise von Nährstoffen auf molekularer Ebene unerlässlich [MÜLLER, KERSTEN].

Die Schnittstelle zwischen der Ernährungsumwelt und zellulären sowie genetischen Prozessen wird als Nutritional Genomic oder kurz "Nutrigenomics" bezeichnet [KAPUT, RODRIGUEZ, 2003].

Nutrigenomic versucht die genomweiten Einflüsse der Ernährung zu studieren [MÜLLER, KERSTEN, 2003] und ein molekulargenetisches Verständnis dafür zu liefern, wie Nahrungsmittel und deren Bestandteile die Gesundheit durch die Veränderung der Expression sowie Veränderung der Struktur der genetischen Ausstattung eines Individuums beeinflussen.

Die grundlegenden Konzepte dieses Fachgebietes gehen davon aus, dass die Entwicklung von einem gesunden Phänotyp zu einem chronisch kranken Phänotyp durch Auftreten von Veränderungen in der Genexpression oder durch Unterschiede in der Tätigkeit von Proteinen und Enzymen hervorgerufen wird, und dass diätetische Chemikalien direkt oder indirekt die Expression von genomischen Informationen regulieren [KAPUT, RODRIGUEZ, 2003].

Folsäure, ein essentielles B-Vitamin, ist nicht nur während der Schwangerschaft und der embryonalen Entwicklung von großer Bedeutung, sondern spielt auch in allen anderen Lebensabschnitten eine wichtige Rolle.

Teilweise sind jedoch die genauen Stoffwechselprozesse, v. a. in Bezug auf Absorption und Transport, noch nicht vollständig geklärt.

Auch die Auswirkungen eines Mangels bedürfen weiterer Untersuchungen.

Nutrigenomics liefert ein großes Potential für die Erforschung der Folsäure sowie ihrer Wirkungsweise und soll bei der Beantwortung noch offener Fragen behilflich sein.

Daher rückt das Thema Folsäure auch immer mehr in den Blickpunkt des Emerging Focus Nutrigenomics am Department für Ernährungswissenschaften.

Die Etablierung von *Caenorhabditis elegans* als Modellorganismus liegt bereits mehr als 45 Jahre zurück. Bis zum heutigen Zeitpunkt wurde dieser kleine Wurm für zahlreiche Studien verwendet und trug immens zur Gewinnung vieler Erkenntnisse, v. a. in genetischen Untersuchungen, bei.

Er besitzt eine große Anzahl an homologen Genen des Menschen, die mit zahlreichen Erkrankungen in Zusammenhang stehen.

So findet man in *C. elegans* auch homologe Gene des Folsäurestoffwechsels, weshalb er für die Folsäureforschung von großem Interesse ist.

Man hofft mit seiner Hilfe viele offene Fragen beantworten zu können und Unklarheiten zu beseitigen.

Das Augenmerk dieser Arbeit lag auf der Untersuchung des Folsäurestoffwechsels von *C. elegans* im Flüssigmedium.

Ziel war es, die Auswirkungen eines Folsäuremangels auf das Wachstum und die Reproduktivität der Würmer zu ermitteln.

Des Weiteren wurde eine Technik zur Bestimmung des Broodsize und Lifespan von *C. elegans* im Flüssigmedium etabliert.

Diese Arbeit stellt darüber hinaus die Grundlage für weiterführende Untersuchungen dar.

2. *Caenorhabditis elegans*

2.1. Allgemeine Beschreibung

C. elegans ist ein kleiner Fadenwurm, der freilebend im Erdboden in den meisten gemäßigten Gebieten der Welt zu finden ist. Als einzige Voraussetzungen für Wachstum und Fortpflanzung benötigt er eine feuchte Umgebung, Raumtemperatur, atmosphärischen Sauerstoff sowie Bakterien als Nahrungsquelle. Er ist somit besonders preiswert und leicht im Labor zu kultivieren. *C. elegans* wurde trotz seines häufigen Vorkommens außerhalb des Labors kaum bemerkt. Dies ist einerseits auf seine geringe Größe und andererseits auf seinen fehlenden direkten Einfluss auf größere Organismen zurückzuführen [HOPE, 1999].

Die Lebensstrategie von *C. elegans* ist gut für das Überleben im Erdboden angepasst, wo sich Futter- und Wasserverfügbarkeit, Temperatur sowie viele andere Variable ständig und drastisch ändern können [STRANGE, 2006].

C. elegans gehört zu dem Stamm der Nematoda.

Nematoden sind einige der zahlreichsten Tiere, weit verbreitet und in eigentlich allen Lebensräumen zu finden [STRANGE, 2006].

Der Stamm umfasst eine große Vielfalt von Arten, darunter auch einige Parasiten [KIONTKE, FITSCH, 2005].

Die Gattung *Caenorhabditis* gehört zur Familie *Rhabditidae*.

Diese Familie besteht aus mehr als zweihundert beschriebenen, frei lebenden Arten [SOMMER, 2005], die ökologisch und genetisch sehr vielfältig sind [KIONTKE, FITSCH, 2005]. Sie ist in ca. 10 verschiedenen Gattungen unterteilt [SOMMER, 2005] und umfasst hauptsächlich bakteriophage Nematoden [KIONTKE, FITSCH, 2005].

Bereits 1948 wiesen Dougherty und Calhoun auf den potenziellen Wert der *Rhabditis* Spezies für genetische Forschungen hin.

Beschrieben und benannt wurde *C. elegans* allerdings schon 1900 durch Maupas. Später wurde er durch Osche (1952) der Untergattung *Caenorhabditis* zugeordnet.

Der Name setzt sich aus griechischen und lateinischen Wörtern zusammen:

Caeno	Rhabditis	Elegans
neu	Stab, Rute	rein, elegant

Von den zahlreichen Stämmen haben insbesondere zwei eine historische Bedeutung.

Zum einen der Stamm *Bergerac*, der 1949 in Frankreich von Victor Nigon, einem Professor an der Universität von Lyon, aus dem Boden entnommen wurde. Zum anderen der Stamm *Bristol*, der von L. N. Staniland aus Pilzkompost in der Nähe von Bristol, England, isoliert wurde [RIDDLE et al., 1997].

Derzeit gibt es 18 beschriebene und 5 unbeschriebene *Caenorhabditis* Spezies, die der Wissenschaft bekannt sind.

Keine dieser *Caenorhabditis* Spezies ist ein Erdnematode in dem Sinne, dass man Populationen von sich vermehrenden Individuen in der Erde finden kann. Im Erdboden sind zwar junge Dauerlarven enthalten, aber es ist sehr unwahrscheinlich, dass sich diese im Boden ohne den Zusatz von organischen Stoffen weiterentwickeln.

Alle *Caenorhabditis* Arten, so auch *C. elegans*, besiedeln organisches Material, das reich an Nährstoffen und Mikroorganismen ist. Diese Nahrungsquellen werden in der Regel schnell besiedelt und die Populationen erreichen dort rasch eine hohe Dichte, so wie es bei der Kultivierung von *C. elegans* im Labor beobachtet werden kann [KIONTKE, SUDHAUS, 2006].

2.2. *C. elegans* als Modellorganismus

Die Etablierung von *C. elegans* als Modellorganismus für die Grundlagenforschung in der Biologie begann 1963 mit den Bemühungen Sydney Brenners. Sein Hauptaugenmerk lag darauf, ein geeignetes Tiermodell zu finden, in dem die Werkzeuge der genetischen Analysen angewandt werden konnten, um molekulare Mechanismen der Entwicklung und die Funktionen des Nervensystems definieren zu können. *C. elegans* liefert ein großes Potential und zahlreiche experimentelle Vorteile für solche Studien. Diese umfassen einen kurzen Lebenszyklus, die Produktion einer großen Anzahl von Nachkommen, einfache und kostengünstige Kultivierung im Labor, genetische Lenkbarkeit, eine relativ einfache Anatomie und geringe Größe [STRANGE, 2006].

C. elegans war der erste vielzellige Organismus, dessen Genom 1998 vollständig sequenziert wurde [THE *C. ELEGANS* SEQUENCING CONSORTIUM et al., 1998].

Danach wurde deutlich, dass das Genom dieses Wurmes eine bemerkenswerte Ähnlichkeit mit dem Genom des Menschen aufweist.

Für etwa 40 % der Gene, die mit menschlichen Krankheiten in Zusammenhang gebracht werden, besitzt *C. elegans* ein homologes Gen [CORSI, 2006].

Viele der bekannten biologischen Komponenten in *C. elegans* findet man auch beim Menschen wieder. So ist dieser winzige Wurm empfindlich gegenüber einer Reihe von menschlichen Toxinen und Medikamenten, die viele gleiche Moleküle und Signalwege in Säugetieren aktivieren.

Diese Ähnlichkeiten zwischen Wurm und Mensch, zusammen mit der leistungsstarken Genetik und Schnelligkeit in der Analyse, legen nahe, dass *C. elegans* erheblich bei der Aufklärung der molekularen Grundlagen der menschlichen zellulären Toxikologie helfen kann [HAMZA, NASS, 2007].

Mit nur etwa 1000 Zellen ist *C. elegans* ein simpler, multizellulärer Organismus. Seine kurze Generationszeit erlaubt die Durchführung schneller Experimente.

Darüber hinaus sind die Tiere in jedem Stadium ihres Lebenszyklus durchsichtig, wodurch es möglich ist, zelluläre Vorgänge wie Mitose oder Cytokinese in Echtzeit zu beobachten [CORSI, 2006].

Praktisch alle genetischen Untersuchungen von *C. elegans* wurden mit dem Stamm Bristol durchgeführt.

Genau genommen mit der N2-Linie, die Sydney Brenner von der Bristol-Kultur abgeleitet hat, die er im Frühjahr 1964 von Ellsworth Dougherty erhielt [RIDDLE et al., 1997].

Dieser Stamm wird nun seit Jahren in zahlreichen Laboren rund um die Welt als Wild-Typ von *C. elegans* verwendet [GEMS, RIDDLE, 2000].

2.3. Anatomie

Ähnlich wie andere Nematoden besitzt *C. elegans* eine unsegmentierte, zylindrische Körpergestalt [HALL, ALTUN, 2008].

Die Größe der beiden Geschlechter, Hermaphroditen und Männchen, beträgt in der Länge jeweils ca. 1 mm [WOOD, 1988].

Darüber hinaus besitzen sie aber einige interessante anatomische Merkmale, welche für das jeweilige Geschlecht typisch sind. Auf diese wird in Kapitel 2.4. genauer eingegangen.

Der grundlegende Körperbau ist jedoch für beide Geschlechter gleich.

Dieser besteht aus zwei konzentrischen Röhren, die durch einen flüssigkeitsgefüllten Körperhohlraum, oder Pseudocoel, getrennt werden [CORSI, 2006].

Abb. 1 zeigt einen Querschnitt durch die Körpermitte eines adulten Hermaphroditen.

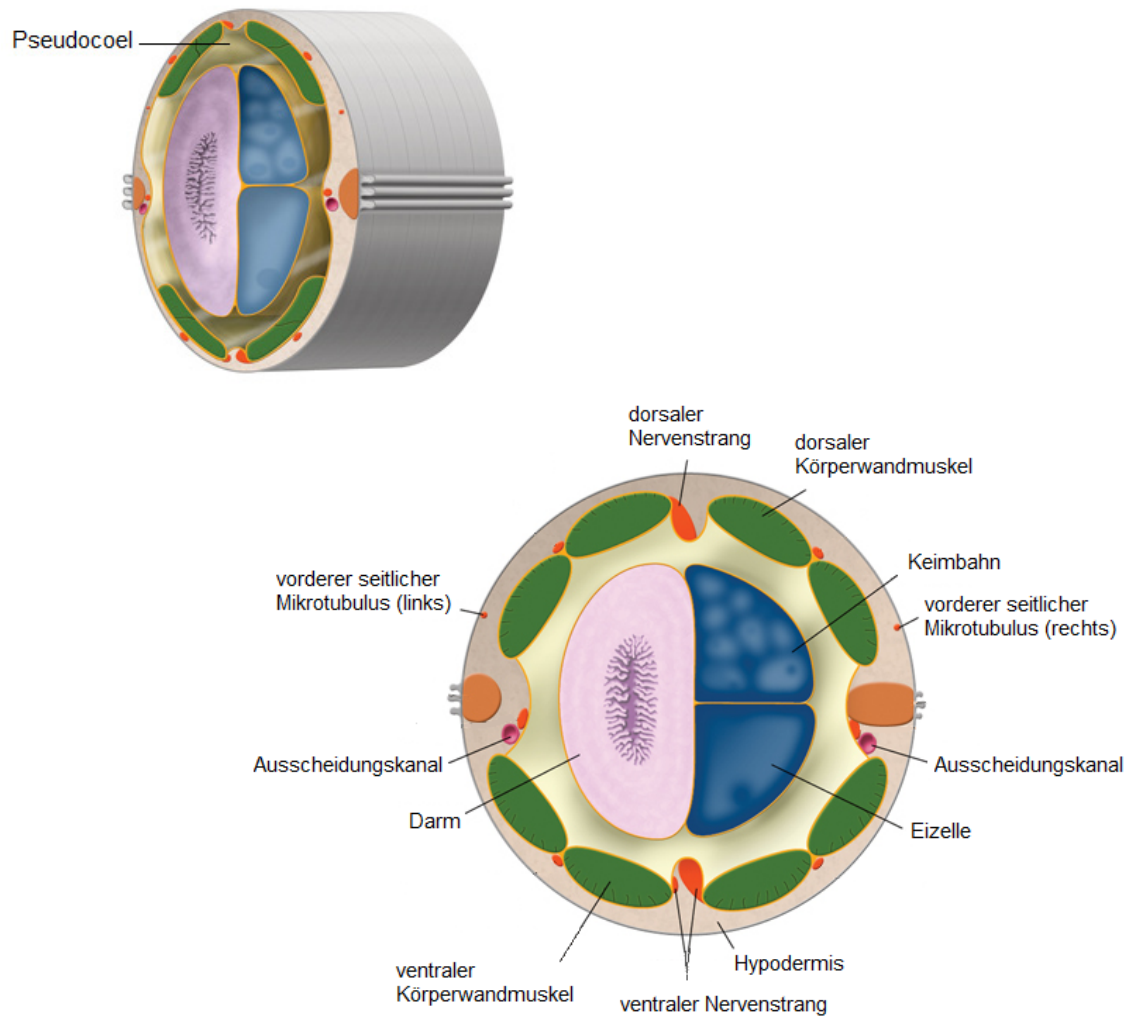


Abb. 1: Querschnitt durch die Körpermitte eines adulten Hermaphroditen,
modifiziert nach: <http://www.wormatlas.org/hermaphrodite/nervous/Neuroframeset.html>

Die äußere Körperwand besteht aus einer zähen, kollagenartigen Oberhaut, der Hypodermis, Muskeln und dem Nervensystem [STRANGE, 2006].

Die innere Röhre bildet das Verdauungssystem mit dem Pharynx an der vorderen Seite, gefolgt vom Darm, der sich entlang der Körperlänge bis zum hinteren Ende erstreckt und in der Analöffnung endet. Beim erwachsenen Tier befinden sich auch die Gonaden im Pseudocoel [CORSI, 2006].

Aufgrund der Transparenz von *C. elegans* sind sowohl der Pharynx als auch der Darm unter dem Mikroskop sichtbar [HOPE, 1999].

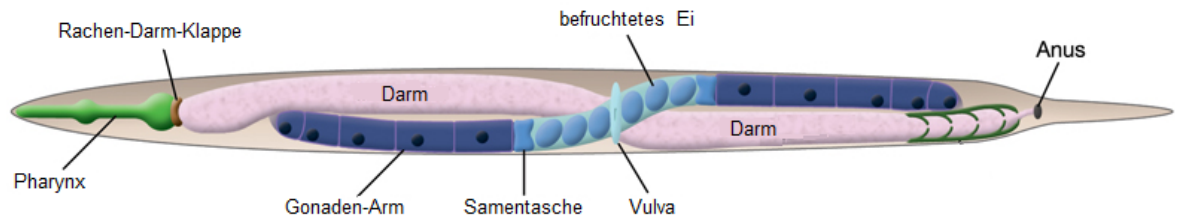


Abb. 2: adulter Hermaphrodit,
modifiziert nach <http://www.wormatlas.org/hermaphrodite/intestine/Intframeset.html>

Der Pharynx besitzt ein fast autonomes Nervensystem [RIDDLE et al., 1997] und setzt sich aus 20 Muskel-, 20 Nerven- und 18 Epithelzellen zusammen, die in einer Drei-Strahl-Symmetrie angeordnet und von einer Basalmembran umschlossen sind [HOPE, 1999].

Die Körperform von *C. elegans* wird durch hydrostatischen Druck im Pseudocoel aufrechterhalten [STRANGE, 2006].

Die Körpermuskulatur von ist in vier Längsstreifen angeordnet, die durch eine dünne Schicht Hypodermis an der Cuticula befestigt sind.

Kontraktion der beiden subventralen Muskelstreifen und Entspannung der subdorsalen Streifen, sowie umgekehrt, erzeugt eine sinusförmige Bewegung [RIDDLE et al., 1997].

Frisch geschlüpfte L1-Larven haben 588 Zellen [STRANGE, 2006], wobei ca. 10% davon somatische Blastzellen sind, die sich weiter teilen und zusätzliche somatische Gewebe im erwachsenen Tier erzeugen [RIDDLE, 1997]. Diese zusätzlichen Teilungen kommen während der 4 Larvenstadien vor, die schließlich zu 959 somatischen Zellen bei reifen, erwachsenen Hermaphroditen und 1031 bei erwachsenen Männchen führen [STRANGE, 2006].

C. elegans besitzt ein Nervensystem das aus 302 Neuronen besteht. Diese laufen im vorderen Teil des Tieres in einem Nervenring zusammen, der eine Art Gehirn bildet. Ihre Hauptaufgabe besteht darin, die Körperwandmuskeln zu erregen, wodurch die sinusförmige Bewegung ausgelöst wird [CORSI, 2006]. Die meisten Zellen des Nervensystems sind rund um den Pharynx zu finden [WOOD, 1988].

2.4. Geschlechtsdifferenzierung

C. elegans kommt in zwei Geschlechtern vor, Hermaphroditen und Männchen. Hermaphroditen sind im Wesentlichen Weibchen [CORSI, 2006], die sowohl Spermien als auch Eizellen produzieren und sich durch Selbstbefruchtung ohne Paarung vermehren können.

Die Männchen hingegen produzieren nur Spermien, weshalb sie sich, um sich zu vermehren, mit Hermaphroditen paaren müssen [HOPE, 1999].

Eine Kreuzbefruchtung führt in Folge zu Männchen und Hermaphroditen im gleichen Verhältnis. Im Gegensatz dazu resultieren aus der Selbstbefruchtung nur Hermaphroditen [HOPE, 1999].

Eine Wildtyp-Population besteht überwiegend aus Hermaphroditen [STRANGE, 2006], Männchen machen in etwa nur 0,1 – 0,2 % aus.

Dieser sexuelle Dimorphismus stellt besonders für genetische Analysen einen großen Nutzen dar [CORSI, 2006].

Selbstbefruchtete Hermaphroditen produzieren etwa 300 Nachkommen während solche, die durch Männchen befruchtet wurden, mehr als 1000 Nachkommen haben können [STRANGE, 2006].

Hermaphroditen haben zwei X Chromosomen (XX), Männchen nur ein Einzelnes (XO). Letztere entstehen durch non-Disjunction des X-Chromosoms. Die Häufigkeit der non-Disjunction kann durch Hitzeschockbehandlung (33 °C,

4 h) erhöht werden wodurch mehr Männchen in der Nachkommenschaft beobachtet werden können [CORSI, 2006].

Adulte Hermaphroditen erkennt man durch den zugespitzten Schwanz am hinteren Ende. Die Männchen hingegen sind etwas kleiner und schmaler und haben einen fächerartigen Schwanz, der aus Strukturen, die für die Paarung erforderlich sind, gebildet wird [CORSI, 2006].

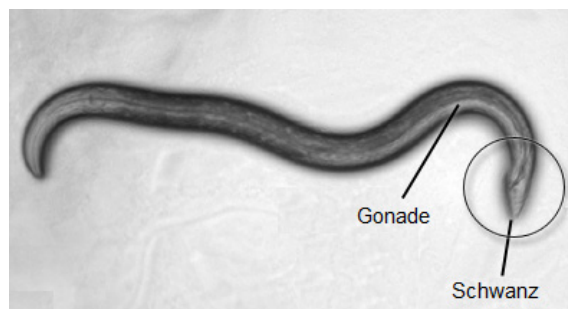


Abb. 3: Männchen,

modifiziert nach: <http://www.wormatlas.org/male/introduction/Introframeset.html>

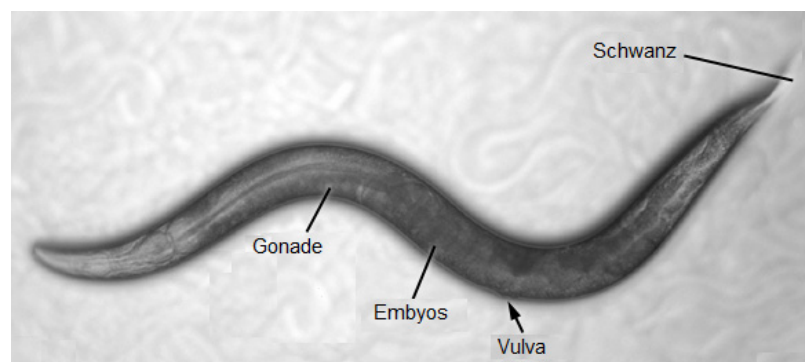


Abb. 4: Hermaphrodit,

modifiziert nach: <http://www.wormatlas.org/male/introduction/Introframeset.html>

2.5. Lebenszyklus

C. elegans hat einen schnellen Lebenszyklus, der aus mehreren Stufen besteht. Bei Raumtemperatur entwickelt er sich innerhalb von 3 Tagen vom

Embryo über 4 Larvenstadien zum fruchtbaren Erwachsenen [CORSI, 2006; GERSHON, GERSHON, 2002].

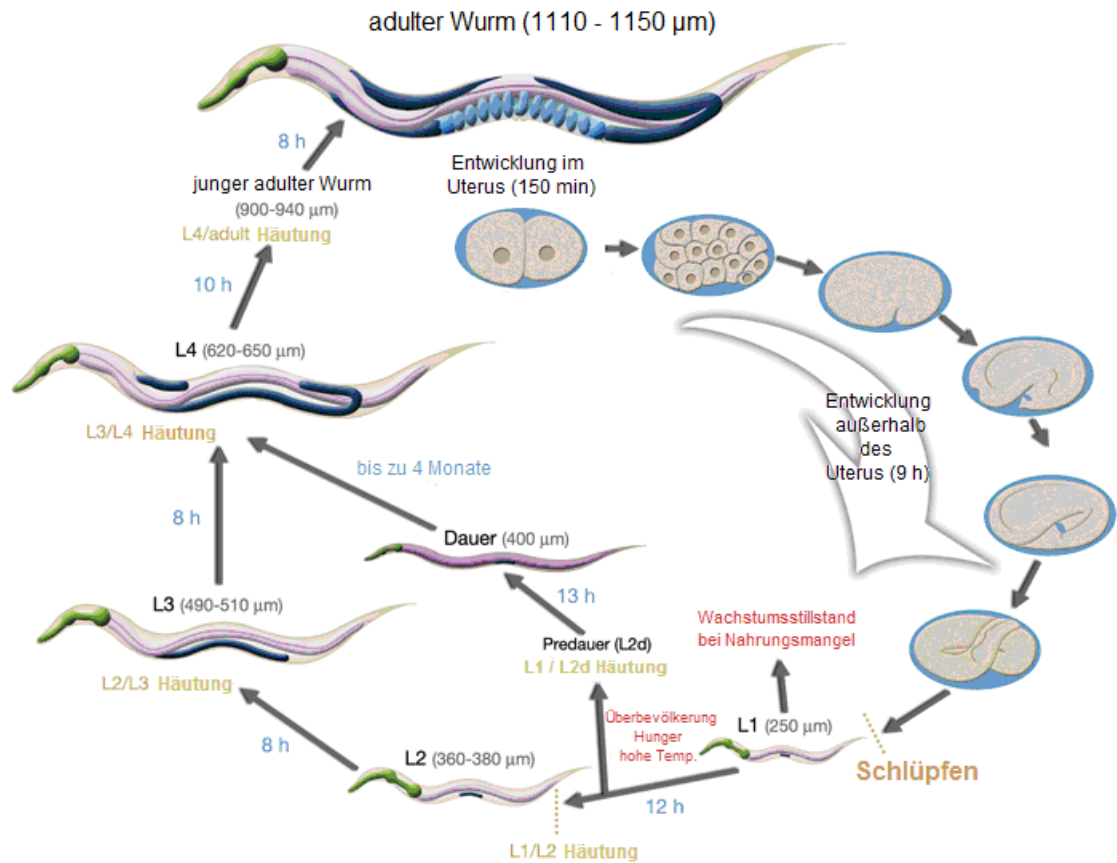


Abb. 5: Lebenszyklus von *C. elegans*,
modifiziert nach: <http://www.wormatlas.org/hermaphrodite/introduction/IMAGES/introfig6leg.html>

Die Entwicklung des Embryos beginnt im Uterus des Hermaphroditen [CORSI, 2006].

Reife Oocyten verlassen die Spermathek und werden befruchtet. Dies geschieht entweder durch die eigenen Spermien des Hermaphroditen oder durch die des Männchen, die durch Paarung in den Uterus gelangen und in der Spermathek gespeichert werden. Während der 30 min. nach der Befruchtung entwickelt die befruchtete Eizelle eine robuste, chitinartige Schale sowie eine Dotterhaut, die es dem Embryo ermöglicht außerhalb des Uterus zu überleben [WOOD, 1988].

Sobald der Embryo aus ca. 28 – 30 Zellen besteht, wird er in der Regel durch die Vulvaöffnung an die Umgebung abgegeben. Die Embryogenese wird dann außerhalb des Hermaphroditen, in einem Zeitraum von ca. 13 Stunden, abgeschlossen. Kurz vor dem Schlüpfen hat eine voll ausgebildete Larve 558 Zellen, die man in der Eischale in Form einer Brezel erkennen kann [CORSI, 2006].

Während der Larvenentwicklung verfügt *C. elegans* über einen hochwirksamen Stressresistenz-Mechanismus [GERSHON, GERSHON, 2002]. So werden L1 Larven beim Schlüpfen in ihrer Entwicklung gehemmt wenn keine Nahrung zur Verfügung steht und treten in den Dauer- oder Diapause-Stoffwechsel über. Dauer Larven sind äußerst resistent gegenüber Stress und treten wieder ins L4 Stadium des normalen Lebenszyklus ein wenn sich die Bedingungen verbessert haben [CORSI, 2006].

Unter normalen Umweltbedingungen durchlaufen die geschlüpften L1 Larven in ihrer Entwicklung drei weitere Stufen und zwar L2, L3 und L4 [WOOD, 1988].

Diese 4 Larvenstadien werden durch Häutungen unterbrochen, bei denen jedes Mal eine neue Kutikula mit spezifischer Zusammensetzung abgesondert und die alte Haut abgeworfen wird [RIDDLE, 1997].

Die Cuticula unterscheidet sich nicht nur strukturell sondern auch molekular in jedem Stadium des Wurms [WOOD, 1988].

2.6. Laborzucht von *C. elegans*

C. elegans kann unter relativ einfachen und kostengünstigen Laborbedingungen gehalten und gepflegt werden.

Es gibt zwei häufig verwendete Kultivierungsmethoden:

- Monoxenisch: mit *Escherichia coli* (*E. coli*) als Nahrungsquelle
- Axenisch: in definiertem Medium [GERSHON, GERSHON, 2002], ohne der Anwesenheit eines anderen Organismus

Jede dieser Methoden hat ihre Vor- und Nachteile, auf die im Folgenden genauer eingegangen wird.

2.6.1. *C. elegans* auf NGM-Platten

Als man begann *C. elegans* als genetisches Modellsystem zu nutzen, wurde die Kultivierung in chemisch definiertem Medium gefördert.

Dessen Entwicklung blieb jedoch weit hinter der Entwicklung von *C. elegans* als genetisches System zurück. Dies führte dazu, dass sich die monoxenischen Kultivierung auf NGM-Platten (Nematode Growth Medium) mit *E. coli* als Nahrungsquelle als Standard-Kultur-Methode durchgesetzt hat [SZEWCZYK et al., 2003].

Obwohl diese Art der Kultivierung einen immensen Erfolg brachte, sind damit einige Nachteile verbunden.

Zum einen stellt sie eine Herausforderung an die Automatisierung von Experimenten dar, zum anderen ist der Bakterienmetabolismus vor allem in Arzneimittel-, Ernährungs- und Toxikologiestudien ein unerwünschter Nebenfaktor [SZEWCZYK et al., 2006; HAMZA, k. A.].

Denn bei der Verwendung von komplexen Organismen wie *E. coli* als Nahrungsquelle, können diese die Nährstoffe assimilieren und modifizieren bevor sie der Wurm aufnehmen kann und so die Ergebnisse dieser Studien verfälschen.

Andere Probleme gibt es im Zusammenhang mit biochemischen Untersuchungen. Hier liegt die Schwierigkeit darin, sicherzustellen, dass die gemessene Enzymaktivität nicht von *E. coli* stammt [HAMZA, k. A.].

Mit dieser Methode wurde auch potentiell das Verständnis über die Biologie von *C. elegans* verzerrt.

Zum Beispiel zeigt *C. elegans*, wenn er mit einer bakteriellen Ernährung kultiviert wird, im Wesentlichen eine invariante Entwicklung mit einer voraussagbaren Zelllinie, Zellzahl und Nervensystem. Man weiß nicht, ob diese

Eigenschaften unter anderen Wachstumsbedingungen ebenso invariant bleiben [SZEWCZYK et al., 2006].

Darüber hinaus ist es sehr schwierig die Dichte des Bakterienwachstums auf den Agarplatten zu kontrollieren. Dies ist insofern ungünstig, da der Lebenszyklus von *C. elegans*, und somit dessen Charakteristik und Eigenschaften, stark von der Nahrungsmitteldichte abhängen [MUSCHIOLE et al. 2008].

Um dem entgegenzuwirken wird in der Regel *E. coli* OP50 als Nahrungsquelle verwendet. Diese Bakterien sind Uracil autotroph und wachsen langsam, wodurch ein Überwuchern der NGM-Platten verhindert werden kann [CORSI, 2006].

Große Mengen von *C. elegans* können auch in flüssigem Medium mit Bakterien als Nahrungsquelle kultiviert werden. Dazu wird in der Regel S-Medium mit konzentrierter *E. coli* OP50 verwendet. Für diese Methode gelten allerdings auch die oben genannten Vorbehalte [STIERNAGLE, 2006].

2.6.2. *C. elegans* im Flüssigmedium

Um die Probleme der Kultivierung von *C. elegans* auf NGM-Platten zu umgehen, kam es vor mehr als 30 Jahren zur Entwicklung eines definierten Wachstumsmediums (CbMM – *Caenorhabditis briggsae* maintenance medium) für Würmer [HAMZA, k. A.].

Den bahnbrechenden Arbeiten von Dougherty folgend wurde später eine chemisch definierte Variante des CbMM, das *C. elegans* Maintenance Medium (CeMM), entwickelt, welches ein axenisches Wachstum von *C. elegans* in flüssigem Medium ermöglicht [SZEWCZYK et al, 2006].

Allerdings treten in Bezug auf die Entwicklung der Würmer einige Unterschiede zur Kultivierung auf NGM-Platten auf.

Würmer, die in CeMM kultiviert werden

- benötigen 2- bis 3-mal länger für ihr Wachstum [HAMZA, k. A.],
- haben eine erhöhte Lebensdauer,
- verringerte Körpermasse,
- verminderte Fruchtbarkeit,
- verminderte Fettspeicher im Darm sowie
- einen erhöhten Stoffwechsel [SZEWCZYK et al., 2006].

Untersuchungen zeigen, dass diese Veränderungen nicht auf die physikalische Beschaffenheit des CeMM-Mediums zurückzuführen sind.

Tiere, die auf 1,7% Agar CeMM-Platten gehalten wurden, erreichen eine Länge von 1mm in nahezu der gleichen Zeit, wie sie in flüssigem CeMM beobachtet werden kann.

Dies deutet darauf hin, dass die oben erwähnten Unterschiede ein Effekt der CeMM-Zusammensetzung und nicht der physikalischen Natur des Mediums ist [SZEWCZYK et al., 2003].

Darüber hinaus kann beobachtet werden, dass Würmer, die in CeMM gehalten werden, zweimal häufiger an einer prolapierten (aus einer Körperöffnung herausgetretenen) Vulva und innerlichem Schlüpfen der Eier sterben, als Würmer auf NGM-Agar [SZEWCZYK et al., 2006].

Ein Vergleich der Ergebnisse von Studien mit *C. elegans*, bei denen die Würmer mit einer reduzierten Menge an *E. coli* gezüchtet wurden, deutet darauf hin, dass eine axenische Kultivierung ungesund sein könnte. Alternativ könnte man vermuten, dass diese einfach zu einem veränderten Lebensablauf, als Reaktion auf eine veränderte Ernährung, führt [SZEWCZYK et al., 2006].

Theoretisch gibt es für eine Spezies, dessen Umwelt sich verändert, mehrere Möglichkeiten, sich auf die neuen Umstände anzupassen und weiterhin gute Entwicklung zu gewährleisten.

Auf der einen Seite kann die intrinsische Populationswachstumsrate erhöht werden, indem auf Kosten der Umwelt der Ressourcenverbrauch maximiert wird. Es kommt dabei zu einer Veränderung der Lebensgeschichte, die durch eine rasche Entwicklung und große Anzahl an Nachkommen gekennzeichnet ist. Dieser Umstand ist bei der Kultivierung von *C. elegans* mit bakterieller Nahrung zu beobachten.

Auf der anderen Seite kann der Organismus den Ressourcenverbrauch verringern und die Kapazitäten der Umwelt effizienter nutzen, indem er seine Entwicklung verzögert und die reproduktive Phase verlängert.

Durch Studien konnte belegt werden, dass *C. elegans*, wenn in chemisch definiertem Medium gezüchtet, tatsächlich eine Veränderung der Lebensgeschichte erfährt. Würmer, die in CeMM kultiviert werden, brauchen länger in ihrer Entwicklung und zeigen einer Verlängerung der reproduktiven Phase [SZEWCZYK et al, 2006].

Um die Wachstumsrate von *C. elegans* auf NGM Platten genauer imitieren und den Nährstoffgehalt besser kontrollieren zu können, wurde das ursprüngliche CeHR-Medium (*C. elegans* Habitation and Reproduction), das für toxikologische Studien am U.S. Army Center für Umwelt- und Gesundheitsforschung entwickelt wurde, umformuliert.

In den letzten Jahren wurden systemisch verschiedenen Komponenten des Mediums getestet und die Konzentrationen der einzelnen Chemikalien fein abgestimmt, um eine maximale Wachstumsrate für *C. elegans* zu erreichen, die vergleichbar mit der für NGM Platten ist.

Dieses mCeHR-1 Medium wird nun auch für die Kultivierung anderer Wurmarten verwendet [HAMZA, NASS, 2007].

Das in dieser Arbeit eingesetzte Medium ist eine Modifikation des original CeHR-Mediums.

Die chemisch definierte Art des CeMM bzw. CeHR bietet einige Vorteile:

- Nebenwirkungen des Stoffwechsels von *E. coli*, die nicht nur in der pharmazeutischen Forschung sondern auch in Toxizitätstests

Störvariable sein können, können vermieden werden [SZEWCZYK et al, 2006].

- Die Zusammensetzung kann systematisch verändert werden wodurch die Anwendung in einer Reihe von Studien (Stoffwechsel-, Alterungsstudien) ermöglicht wird [SZEWCZYK et al., 2003].
- CeMM kann für die Züchtung einer großen Anzahl von Tieren für Genom- oder Proteom-Studien sowie in der Entwicklung von *C. elegans*-Biosensoren nützlich sein [SZEWCZYK et al., 2003].
- Es steht eine Vielzahl an Laborgeräten zur Verfügung, die eine leichte Anwendung des CeMM ermöglichen [SZEWCZYK et al., 2003].
- In CeMM gehaltene, ausgewachsene Tiere benötigen weniger Pflege als Tiere, die auf NGM-Platten wachsen [SZEWCZYK et al., 2003].

Demgegenüber können aber auch einige Schwierigkeiten bei der Anwendung des CeMM auftreten.

Oft können Klumpen von Eiern im Medium festgestellt werden. Diese entstehen durch Zusammenlagerung von toten Tieren, in denen sich die Eier verfangen können, oder durch eine eigene Aggregation der Eier. Auch beides gleichzeitig ist möglich. 80% dieser Eier entwickeln sich nicht wenn die Klumpen in frisches, flüssiges CeMM überführt werden [SZEWCZYK et al., 2003].

Daher ist es besonders wichtig, regelmäßig einen Mediumwechsel durchzuführen und immer darauf zu achten, dass nicht zu viele Würmer im CeMM enthalten sind.

Das Wachstum sowie die Entwicklung der Würmer sollte darüber hinaus täglich kontrolliert und der pH-Wert des Mediums während der Kultivierung aufrecht erhalten werden, da es zu einem Niederschlag der Komponenten kommen kann wenn die pH-Änderung zu gravierend wird [HAMZA, NASS, 2007].

3. Folsäure

3.1. Chemische Struktur und Eigenschaften

Folsäure (syn. Pteroylmonoglutaminsäure) ist ein wasserlösliches Vitamin der B-Gruppe, welches für den Menschen essentiell ist und über die Nahrung aufgenommen werden muss [BLOM, SMULDERS, 2010].

Allgemein versteht man unter Folsäure eine Gruppe zahlreicher Derivate, die sich von einem Grundskelett ableiten aber unterschiedliche metabolische Eigenschaften besitzen [STANGER, 2004].

Bereits 1930 entdeckte man einen „Antianämie-„ und Wachstumsfaktor, der vor allem in Leber, Hefen und Spinat enthalten war. Es zeigte sich, dass dieser Faktor für das Wachstum von *Lactobacillus casei* essenziell ist und jenes von *Streptococcus faecalis* und *L. casei* stimuliert [PIETRZIK et al., 2008].

Darüber hinaus konnte beobachtet werden, dass einige Formen der megaloblastischen Anämie durch Extrakte aus Leber und Hefe günstig beeinflusst werden können.

Der dafür verantwortliche Wirkstoff wurde schließlich 1941 aus vier Tonnen Spinatblättern isoliert [STANGER, 2004].

Vom lateinischen Wort folium (=Blatt) abgeleitet, erhielt er den Namen „Folsäure“ [PIETRZIK et al., 2008].

Man weiß heute, dass es sich bei dieser Isolierung um ein Kunstprodukt handelte, welches auf natürliche Weise in biologischen Systemen als solches nicht vorkommt. Folsäure ist somit eine voll synthetische Vitaminform.

Um Fehlinterpretationen vorzubeugen, wird heute klar zwischen Folsäure und den Folaten unterschieden [PIETRZIK et al., 2008]

Folsäure ist aus einem Pteridinringsystem, p-Aminobenzoesäure und L-Glutamat aufgebaut. Ausgehend von diesem Grundskelett leiten sich von ihr verschiedenen Derivate ab, die als Folate bezeichnet werden [STANGER, 2004].

An den Pteridinring der Folate ist über die Methylengruppen an C6 die Amniogruppe der p-Aminobenzoesäure gebunden, an deren Carboxylgruppe über eine Amidbindung die Glutaminsäure gebunden ist, die an ihrer γ -Carboxylgruppe mit weiteren Glutamatresten konjugiert sein kann [PIETRZIK et al., 2008].

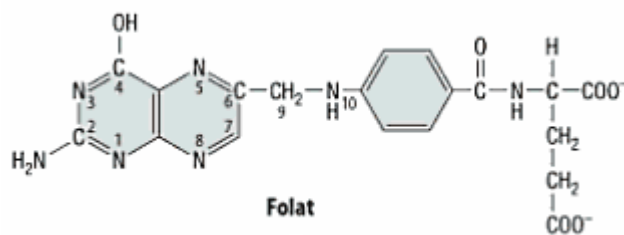


Abb. 6: Strukturformel Folat, Quelle: LÖFFLER et al., 2006

Entsprechend der Anzahl der Glutamyreste unterscheidet man zwischen Pteroylmonoglutamate, -triglutamate, -heptaglutamate bzw. -polyglutamate [BÄSSLER et al., 2002].

Folsäure selbst ist biologisch nicht aktiv [STANGER, 2004], die biochemisch aktive Form ist die Tetrahydrofolsäure (THF). Diese entsteht durch Reduktion der Folsäure zu Dihydrofolsäure und anschließend zu Tetrahydrofolsäure mit Hilfe der NADPH/H⁺-abhängigen Folatreduktase bzw. Dihydrofolatreduktase [LÖFFLER et al., 2006]

3.2. Vorkommen

Folate kommen sowohl in pflanzlichen als auch in tierischen Lebensmitteln vor und sind in praktisch allen Blattgemüsen vorhanden.

Besonders reichlich findet man sie in Spinat, Salat, Spargel, Tomaten, Gurken, Getreide und Leber. Rindfleisch, Fisch und Obst sind hingegen relativ folatarm. Insbesondere Leber stellt für die Folsäureversorgung eine wichtige Quelle dar, da Folate aus tierischen Nahrungsmitteln weitaus besser resorbiert werden können als aus pflanzlichen [BÄSSLER et al., 2002].

Daraus ergeben sich unterschiedliche Absorptionsraten von Mono- und Polyglutamaten, die bei ersteren nahezu 90% beträgt [PIETRZIK et al., 2008]. Die der Polyglutamate ist aufgrund einer vorhergehenden Umwandlung weitaus geringer, sie sind nur zu ca. 20% verfügbar [BÄSSLER et al., 2002]

3.3. Bedarf

Da die Bioverfügbarkeit von Nahrungsfolaten keine konstante Größe ist, sondern in Abhängigkeit vom Verhältnis von Mono- zu Polyglutamaten variiert, wurde der Begriff „Folatäquivalent“ eingeführt [BÄSSLER et al., 2002].

1 µg Folsäureäquivalent entspricht 1 µg Nahrungsfolat oder 0,6 µg synthetischer Folsäure [DGE et al., 2001].

Alter	Nahrungsfolat µl-Äquivalent / Tag
Säuglinge 0 – unter 4 Monate	60
Säuglinge 4 – unter 12 Monate	80
Kinder 1 – unter 4 Jahre	200
Kinder 4 – unter 10 Jahre	300
Kinder 10 – unter 15 Jahre	400
Jugendliche und Erwachsene	400
Schwangere	600
Stillende	600

Tab. 1: D-A-CH Zufuhrempfehlungen für Folsäure, modifiziert nach: DGE et al., 2001

3.4. Folsäuremangel und Fehlbildungen

Es gibt eine Reihe Folat-abhängiger Stoffwechselprozesse, die eine ausreichende Folsäurezufuhr unerlässlich machen.

Folat-Coenzyme spielen eine wesentliche Rolle bei der Nukleinsäuresynthese, Methionin-Regeneration und Übertragung, Oxidation und Reduktion von Ein-Kohlenstoff-Einheiten (C1-Gruppen wie Methyl-, Formyl-, Formiat-, Hydroxymethylreste), die für den normalen Stoffwechsel benötigt werden.

Wenn Reaktionen des Ein-Kohlenstoff-Metabolismus von Folatmangel betroffen sind, häufen sich verschiedene Substrate und metabolische Zwischenprodukte an. Ein erhöhter Plasmahomocysteinspiegel, der mit einem erhöhten Risiko für zahlreiche vaskuläre Erkrankungen in Verbindung gebracht wird, ist nur ein Beispiel für die zahlreichen negativen Folgen [BAILEY, GREGORY, 1999].

Auf Zellebene kann ein Mangel an Folsäure eine Erhöhung der DNA-Schäden und veränderte DNA-Methylierung hervorrufen, die beide wichtige Risikofaktoren für Krebs darstellen [FENECH, 2000].

Insbesondere beim Wachstum und bei der Zellteilung wird die Essentialität der Folsäure für die Biosynthese von Purinen und Pyrimidinen deutlich.

Da die blutbildenden Zellen des Knochenmarks eine sehr hohe Teilungsrate haben, lassen Störungen des Blutbilds schon früh einen Folsäuremangel erkennen [LÖFFLER et al., 2006].

Diese Störungen umfassen ein vergrößertes Erythrozytenvolumen sowie einen verringerten Hämoglobingehalt in den Erythrozyten und äußern sich in einer hyperchromen, makrozytären Anämie.

Ein länger dauernder Mangel hat eine generelle Störung des Zellstoffwechsels zur Folge. Es ist nicht nur die Nucleinsynthese, sondern auch der Phospholipidstoffwechsel und der Aminosäurestoffwechsel beeinträchtigt [LÖFFLER et al., 2006].

Klinisch verursacht starker Folsäuremangel einen speziellen Typ der Anämie, die megaloblastäre Anämie. Diese entsteht vor allem durch Malabsorptionszustände oder mangelnde Zufuhr, die besonders in Entwicklungsländern häufig vorkommt [BIESALSKI, GRIMM, 2007].

Während der Schwangerschaft auftretender Folsäuremangel wird mit einer Reihe von Komplikationen in Verbindung gebracht. Neben Aborten, kongenitalen Missbildungen und Entwicklungsstörungen treten vor allem Neuralrohrdefekte auf. Zumindest für Letztere gilt es inzwischen als erwiesen, dass eine Folsäuresupplementation die Neuralrohrdefekte zwar nicht verhindern, das Risiko jedoch deutlich vermindern kann. [BIESALSKI, GRIMM, 2007].

Darüber hinaus wird eine unzureichende Folatzufuhr mit der Entwicklung oder Verstärkung bestimmter Arten von Krebs in Verbindung gebracht [BAILEY, GREGORY, 1999].

3.5. Aufnahme, Transport und Speicherung

Menschen und andere Säugetiere haben die Fähigkeit zur Synthese von Folsäure verloren und müssen somit ihren Bedarf aus exogenen Quellen über intestinale Absorption decken [HAMID et al., 2000].

Dies erfordert einen effizienten Darmabsorptionsmechanismus [GOLDMAN, QUI, 2008].

Nahrungsfolate kommen in allen Bindungsformen vor. Die Strukturmodifikationen betreffen den Hydrierungsgrad des Pteridin, die Substitution an den N-Atomen 5 und 10 sowie die Zahl der Glutamylreste [BÄSSLER et al., 2002].

Größtenteils findet man in der Nahrung aber Polyglutamate, die in dieser Form nicht transportiert und resorbiert werden können [STANGER, 2004].

Sie müssen zuvor zu Monoglutamaten hydrolysiert werden, wofür das im Darm lokalisierte Enzym γ -Glutamylcarboxypeptidase zuständig ist [BLOM, SMULDERS, 2010].

Die Folsäureabsorption findet vor allem im Duodenum und oberen Jejunum statt und beinhaltet einen Carrier-vermittelten Prozess mit einem niedrigen pH Optimum [GOLDMAN, QUI, 2008].

An der Bürstensaummembran dieser eben genannten Darmabschnitte werden Glutamyreste durch γ -Glutamylcarboxypeptidasen abgespalten, sodass Folsäure v.a. im proximalen Dünndarm leicht resorbiert werden kann [STANGER, 2004].

Für den Transport der daraus resultierenden Monoglutamate durch die Mukosamembran gibt es mehrere Möglichkeiten.

Hauptsächlich geschieht dies über einen aktiven Transport, der durch Glucose und Na^+ stimuliert wird und einer Sättigungskinetik folgt [PIETRZIK et al., 2008]. Darüber hinaus können Folate auch durch passive Diffusion aufgenommen werden, dies ist aber nur zu 20 – 30% der Fall [STANGER, 2004].

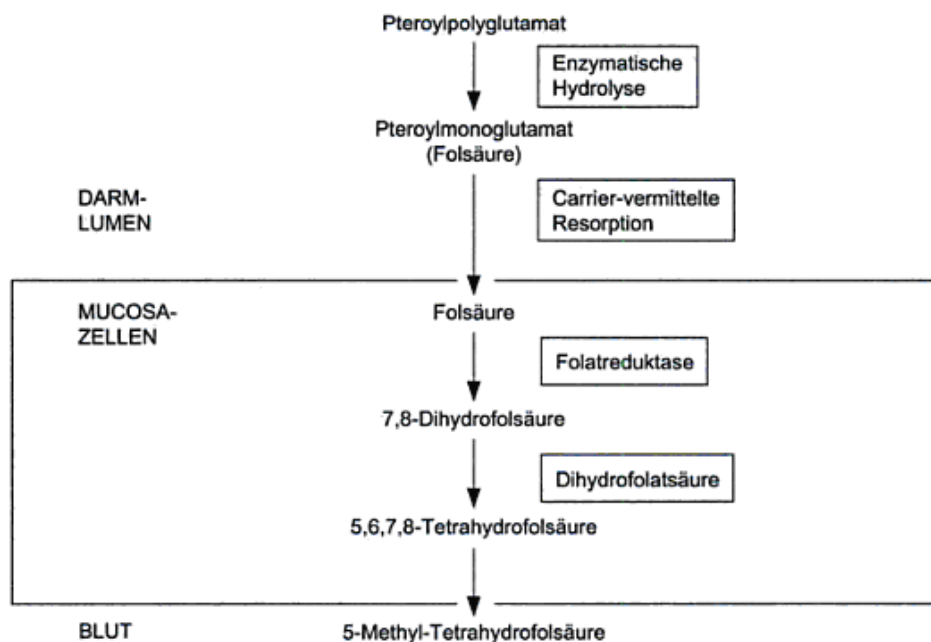


Abb. 7: Resorption von Folat, Quelle: PIETRZIK et al., 2008

Für den aktiven Transport der Monoglutamate durch die Membran stehen mehrere Rezeptoren und Carrier zur Verfügung. Diese sind durch eine unterschiedliche Affinität für Folsäure sowie ein unterschiedliches pH-Optimum gekennzeichnet.

Rezeptoren:

- Protonen gekoppelter Rezeptor (proton-coupled folate receptor, PCFT):
Dabei handelt es sich um einen hochaffinen Folat-Transporter, dessen Transportaktivität bei einem niedrigen pH am effizientesten ist [QUI et al., 2008].
- Folat-Rezeptor α , β und γ :
Dabei handelt es sich um Glykoproteine mit einer hohen Affinität für 5-Methyl-THF. Folat-Rezeptor α wird in einer begrenzten Anzahl in Epithelzellen exprimiert, vorwiegend in den proximalen Tubuli der Niere, dem Plexus choroideus und der Plazenta. Die anderen Folat-Rezeptoren β und γ haben eine viel geringere Affinität für 5-Methyl-THF als Folat-Rezeptor α [BLOM, SMULDER, 2010]. Die Inaktivierung von Folat-Rezeptor α führt zu einer embryonalen Sterblichkeit wohingegen die Ausschaltung von Folat-Rezeptor β keine Veränderung des Phänotyps bewirkt [ZHAO et al., 2008].

Carrier:

- Reduzierter Folat-Transporter (reduced folate carrier, RFC):
Dabei handelt es sich um einen Anionenaustauscher mit einer hohen Affinität für reduzierte Folate [ZHAO et al., 2008]. Dieser Carrier ist überall im Körper verbreitet, seine Affinität für 5-Methyl-THF ist ebenfalls beträchtlich niedriger als die von Folat-Rezeptor α [BLOM, SMULDER, 2010]. Für eine optimale Aktivität benötigt er einen physiologischen pH-Wert [ZHAO et al., 2008].

Im Blut findet man neben THF und 10-Formyl-THF vor allem 5-Methyl-THF, das durch Bindung an Albumin, α -Makroglobulin und Transferrin transportiert wird [PIETRZIK et al., 2008].

Das wichtigste Speicherorgan für Folate ist die Leber. Allerdings werden nur 10 – 20% in den Hepatozyten zurückbehalten, der größere Teil wird nach Metabolisierung wieder abgegeben, insbesondere in die Galle. Dort unterliegen die Folate dem enterohepatischen Kreislauf, über den täglich normalerweise etwa 90 μ g Folat umgesetzt werden [STANGER, 2004].

3.6. Biochemische Funktion und Folsäurestoffwechsel beim Menschen

Die Vitamine der Folsäuregruppe sind Coenzyme, die als Akzeptor und Überträger von C1-Gruppen fungieren.

Träger der C1-Gruppen sind die N-Atome in Position 5 bzw. 10 des Pteroylrestes. Durch Dehydrogenase- bzw. Isomerasereaktionen können die 1-Kohlenstoffreste ineinander überführt werden [LÖFFLER et al., 2006].

Die C1-Reste stammen aus verschiedenen Stoffwechselreaktionen. Sie werden an THF gebunden und schließlich wieder an geeignete Akzeptoren abgegeben [PIETRZIK et al. 2008].

Die Bedeutung dieser Eigenschaft der Folsäure wird besonders bei der Synthese von Purinen und Pyrimidinen deutlich, denn diese bildet die Basis für die DNA- Synthese. Folsäure spielt somit eine wichtige Rolle im DNA-Stoffwechsel.

Sie wird für die Synthese von dTMP aus dUMP benötigt.

Bei Folsäuremangel häuft sich dUMP an und als Resultat wird Uracil statt Thymin in die DNA eingebaut. Es ist erwiesen, dass ein übermäßiger Einbau von Uracil nicht nur zu Punktmutationen führt, sondern auch die Bildung von einzel- und doppelsträngigen DNA-Brüchen zur Folge hat.

Des Weiteren wird Folsäure für die Synthese von Methionin und S-adenosylmethionin (SAM) benötigt. Letzteres ist der häufigste Methyl-Donor und wird für die Aufrechterhaltung der DNA-Methylierung benötigt, welche die Genexpression und DNA-Bildung bestimmt [FENECH, 2000].

Daneben spielen Methylierungsreaktionen auch in vielen anderen Stoffwechselvorgängen eine wichtige Rolle. Eine Störung dieser Reaktionen kann die Entwicklung des Nervensystems beeinträchtigen und ein erhöhtes Krebsrisiko zur Folge haben [BÄSSLER et al., 2002].

Eine wichtige Methylierungsreaktion und somit Beteiligung von Folsäure betrifft den Homocysteinestoffwechsel. Homocystein entsteht durch Übertragung von Methylgruppen aus Methionin. Es wird in einem Vitamin B₁₂-abhängigen Schritt (Homocystein-Methyltransferase) remethyliert und auf diese Weise regeneriert [BIESALSKI, GRIMM, 2007].

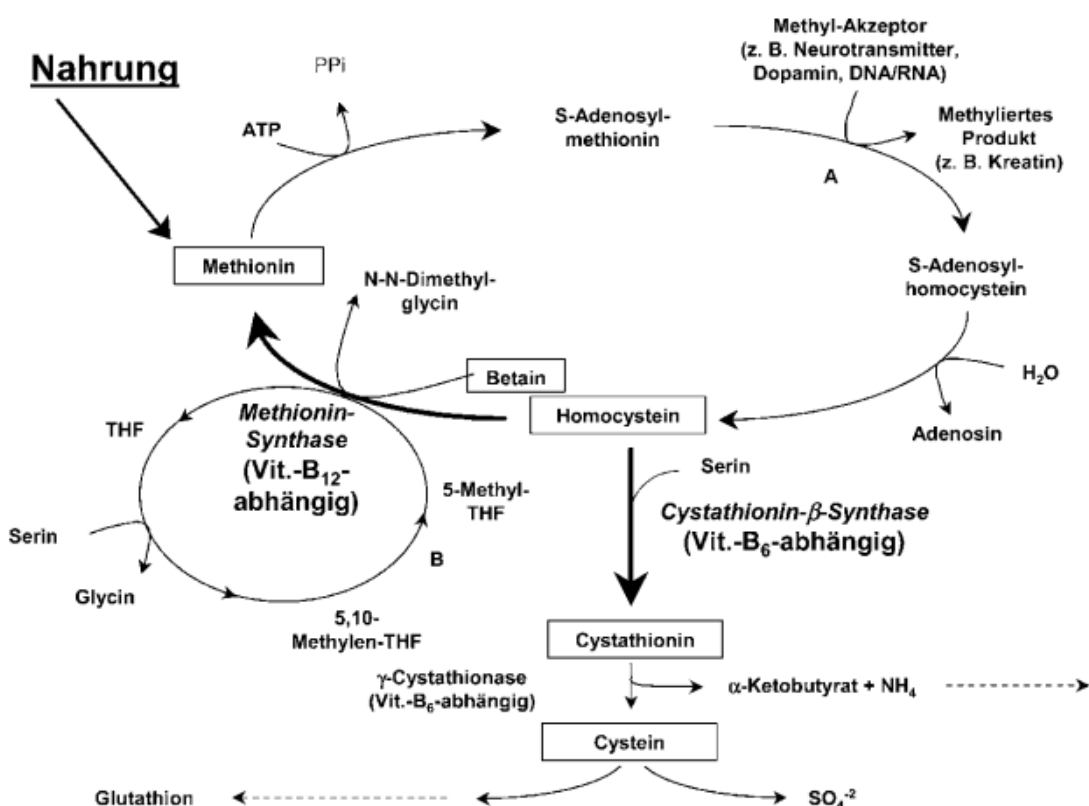


Abb. 8: Stoffwechsel von Homocystein, Quelle: STANGER et al., 2003

Dadurch wird eine Erhöhung des Homocysteinspiegels im Blut vermieden, der als Risikofaktor für Atherosklerose gilt [BÄSSLER et al., 2002].

Am gesamten Metabolismus sind die wasserlöslichen B-Vitamine Folsäure, B₁₂ und B₆ beteiligt. Ein Mangel an einem oder mehreren dieser Vitamine äußert sich in erhöhten Blut-Homocysteinspiegeln, welche daher als Marker für die Versorgung mit Folsäure, Vitamin B₁₂ bzw. B₆ herangezogen werden können [BIESALSKI, GRIMM, 2007].

3.7. Folsäuremetabolismus bei *C. elegans*

Der Folsäurestoffwechsel von *C. elegans* ist dem des Menschen sehr ähnlich. Lu et al. (1976) konnten dies anhand von Studien mit *C. briggsae* beweisen.

C. briggsae ist einer der engsten Verwandten von *C. elegans*, sie haben nur wenige, kaum merkbare morphologische Unterschiede.

Ihre Genome wurde vollständig sequenziert und ca. 62% der Gene von *C. briggsae* sind eins-zu-eins Orthologe in *C. elegans*. Daher können die meisten Untersuchungsergebnisse von *C. briggsae* auch auf *C. elegans* übertragen werden [BRAECKMAN et al., 2008].

Lu et al. (1976) stellten fest, dass *C. briggsae* ebenfalls Vitamin B₁₂ und Folsäure für die Biosynthese von Methionin aus Homocystein benötigt.

Methionin ist für *C. briggsae* und *C. elegans* eine essentielle Aminosäure, die erforderlich ist um das Populationswachstum zu erhalten [BRAECKMAN et al., 2008]. Sie ist ein Substrat für die DNA-Methylierung, die einen wichtigen regulatorischen Mechanismus für die Genexpression während der Entwicklung darstellt [AUSTIN et al., 2010].

Für ihre Untersuchungen verwendeten Lu et al. (1976) Medium mit Homocystein und einem Mangel an Vitamin B₁₂ und Folsäure. Dabei kam es zu keiner Zunahme der Population von *C. briggsae* [LU et al., 1976].

Andere Untersuchungen des Nematoden *C. elegans* zeigten, dass ein gezieltes Abschalten des Folattransporters *fol-1* zu einer Unfruchtbarkeit der Hermaphroditen führt. Sie weisen eine reduzierte Proliferation der Keimbahn sowie fehlerhafte Oogenese auf und produzieren eine kleinere Anzahl an Spermien [AUSTIN et al., 2010].

All diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die embryonale Entwicklung sehr stark von der Folsäurebereitstellung abhängt [AUSTIN et al., 2010].

3.8. Aufnahme von Folsäure bei *C. elegans*

Bis heute wurden 2 Gene in *C. elegans* identifiziert, die dem „human Reduced Folate Carrier“ (hRFC), dem Folattransporter des Menschen, ähnlich sind.

Diese beiden Gene, *fol-1* und *fol-2*, sind zu 40 bzw. 31% mit dem hRFC ident. Allerdings konnte nur für *fol-1* ein aktiver Folattransport festgestellt werden [BALAMURUGAN et al., 2007].

Dieses System scheint in vielerlei Hinsicht dem Folat-Aufnahme-Prozess im menschlichen Darm ähnlich zu sein.

Folgende Gemeinsamkeiten wurden beobachtet:

- Höhere Aktivität bei saurem (pH 5,5) als bei alkalischem (pH 7,4) pH.
- Ähnliche Affinität für oxidierte, reduzierte und substituierte Derivate der Folsäure.
- Empfindlichkeit gegenüber dem antiinflammatorischen Wirkstoff Sulfasalazin [BALAMURUGAN et al., 2007].

Folt-1 wird vor allem im Pharynx und im hinteren Teil des Darms exprimiert. Er kann aber auch in den Muskeln der Körperwand, des Kopfes und der Vulva vorkommen.

Die Expression des *fol-1* wird während der Entwicklung von *C. elegans* und durch die Substratmenge (Folsäure) im Medium geregelt [BALAMURUGAN et al., 2007].

3.9. Folsäure und andere Modellorganismen

Neben *C. elegans* wurden auch andere Organismen in der Folsäureforschung eingesetzt wodurch gezeigt werden konnte, dass starker Folsäuremangel bei einer Vielzahl von Säugetieren eine Störung der embryonalen Entwicklung zur Folge haben kann [AUSTIN et. al, 2010].

Untersuchungen mit Mäusen, bei denen die Folat-Rezeptoren α und β inaktiviert wurden zeigten, dass der Verlust des Folat-Rezeptors α zu einem frühen embryonalen Tod der Mäuse führt, der mit einem Scheitern des Neuralrohrschlusses in Verbindung gebracht wird [ZAHO et. al, 2001].

Darüber hinaus sterben Mäuseembryos frühzeitig während der Entwicklung wenn sie homozygot für ein RFC1 Knockout-Allel sind [AUSTIN et. al, 2010].

Ein weiteres beliebtes Forschungsmodell sind Fliegen der Gattung *Drosophila*. Sie besitzen viele Genfunktionen, von denen man zahlreiche Homologe in Säugetieren findet.

Zu diesen Genfunktionen zählen unter anderem Gene des Folsäuremetabolismus, einschließlich des Dehydrofolatreduktase-Gens, welches homolog zum menschlichen DHFR ist [AFFLECK, WALKER, 2008].

Untersuchungen an weiblichen Tieren der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster*, die dem Antifolat Methotrexat ausgesetzt wurden zeigen, dass

diese unfruchtbar auf Grund reduzierter Oogenese und embryonaler Sterblichkeit sind [AUSTIN et al., 2010].

Bei einigen überlebenden Nachkommen konnten Entwicklungsstörungen wie Augen- und Flügel-Missbildungen beobachtet werden [AFFLECK, WALKER, 2008]

Methotrexat ist ein häufig verschriebenes Arzneimittel, welches die Dihydrofolatreduktase und daher den Folatmetabolismus hemmt und bekannt ist, teratogene Effekte in menschlichen Föten zu verursachen [AFFLECK, WALKER, 2008]

Darüber hinaus zeigen Fliegen, die einer steigenden Konzentrationen von Methotrexat ausgesetzt sind, eine dosis- und zeitabhängig Verringerung der Eiproduktion, welches eine vorembryonale Sterblichkeit widerspiegelt [AFFLECK, WALKER, 2008].

4. Material

4.1. Chemikalien

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

Folsäure (Pteroylglutaminsäure)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Glucose	Roth, Karlsruhe
Guanosin 5'-PO ₄	Sigma-Aldrich, Steinheim
Glycerin	Roth, Karlsruhe
Haushaltsbleiche	
Hemin Chlorid	Roth, Karlsruhe
Hepes Na Salz	Roth, Karlsruhe
i-Inositol	Sigma-Aldrich, Steinheim
Kalium Citrat	Roth, Karlsruhe
Kaliumdihydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe
Kaliumhydroxid	Roth, Karlsruhe
Kupferdichlorid Dihydrat	Roth, Karlsruhe
Lactalbumin	Roth, Karlsruhe
LB Agar	Roth, Karlsruhe
LB Medium	Roth, Karlsruhe
Magnesiumdichlorid- Hexahydrat	Roth, Karlsruhe
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	Roth, Karlsruhe
Mangandichlorid-Tetrahydrat	Roth, Karlsruhe
Milch, ultra hoch erhitzt „Die Leichte 0,1%“	Maresi, 1131 Wien
N-Acetylglucosamin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natrium-Azid	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natrium Citrat	Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxid	Roth, Karlsruhe
Niacin	Roth, Karlsruhe
Niacinamid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Nicht-Essential Aminosäure- Mix	Invitrogen-Gibco, New York

Nystatin	Roth, Karlsruhe
p-Aminobenzsäure	Sigma-Aldrich, Steinheim
Pantethein	Sigma-Aldrich, Steinheim
Pantothenat Ca	Roth, Karlsruhe
Pepton aus Casein, tryptisch verdaut	Roth, Karlsruhe
Pyridoxal 5P	Sigma-Aldrich, Steinheim
Pyridoxamin 2HCl	Sigma-Aldrich, Steinheim
Pyridoxin HCl	Roth, Karlsruhe
Riboflavin 5PO4 (Na)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Salzsäure 25%	Roth, Karlsruhe
Tetracyclin-Hydrochlorid	Roth, Karlsruhe
Thiamin HCl	Roth, Karlsruhe
Thymin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Uridin 5'-PO4	Sigma-Aldrich, Steinheim
Zink Dichlorid	Sigma-Aldrich, Steinheim

4.2. Geräte

<u>Name:</u>	<u>Bezugsfirma:</u>
Laminar Flow ESCO	Ehret, Tulln
Kühlbrutschrank	Selecta, Barcelona
Plattformshaker	
Zentrifuge Jouan BR4i, multifunction	Thermo Scientific, USA
Stereomikroskop Wild Heerbrugg	Kern, Aarau

4.3. Verbrauchsmaterialien

Cellstar Tissue Culture Flasks	Greiner Bio-one, Frickenhausen
Cellstar Suspension Culture Plate, 6-	Greiner Bio-one, Frickenhausen

Wells und 24-Wells	
Zentrifugenröhrchen	Greiner Bio-one, Frickenhausen
Pipetten, serologisch (10-50 ml)	Greiner Bio-one, Frickenhausen
Pipettenspitzen (0,05/ 1 ml)	Greiner Bio-one, Frickenhausen

4.4. *C. elegans*-Stamm

Für die gesamten Versuche wurde der Wildtyp N2 var. Bristol verwendet, der vom *Caenorhabditis* Genetics Center (CGC), University of Minnesota, St. Paul, USA bestellt wurde.

4.5. *Escherichia coli* OP 50

E. coli OP50 wurde ebenfalls über das CGC bestellt. Dieser Stamm ist Uracil auxotroph und hat ein eingeschränktes Wachstum, wodurch ein Überwuchern der NGM-Platten verhindert werden kann.

4.6. Zusammensetzung der Lösungen

4.6.1. NGM-Agar

3 g NaCl

17 g Agar

2,5 g Pepton

werden eingewogen, in eine Flasche, die einen Rührfisch enthält, transferiert und in 1 L Aqua dest. gelöst.

Die Lösung wird bei 121 °C autoklaviert.

Nach dem Abkühlen auf einem beheizbaren Magnetrührer auf ca. 65 °C werden 1 ml 1 M CaCl₂

1 ml 5 mg/ml Cholesterin in Ethanol

1 ml 1M MgSO_4

25 ml 1 M KPO_4 -Puffer

5 ml Nystatinlösung (optional)

unter ständigem Rühren hinzugefügt.

Der flüssige und noch warme NGM-Agar wird in Petrischalen pipettiert (25ml für 100mm, 12ml für 60mm und 4ml für 35mm Platten) wobei eventuell entstehende Luftblasen sofort entfernt werden sollten, da dadurch später Würmer in den Agar gelangen können.

Die Petrischalen kopfüber 2 – 3 Tage bei Raumtemperatur trocknen lassen.

Luftdicht verschlossen und bei 4 °C gelagert sind sie für einige Wochen haltbar.

4.6.1.1. KPO_4 -Puffer für den NGM-Agar

Zuerst werden 250ml 1M KH_2PO_4 hergestellt. Dazu wiegt man

34g KH_2PO_4

ein und fügt 250ml Aqua dest. hinzu. Weiters benötigt man 200ml 1M K_2HPO_4 wofür

34,8g K_2HPO_4

eingewogen und in 200ml Aqua dest. gelöst werden.

Die KH_2PO_4 -Lösung hat einen pH von 4, die nun durch Zugabe der K_2HPO_4 -Lösung auf pH 6 gebracht wird (ca. 100 ml werden dazu benötigt). Die fertige Lösung wird autoklaviert und bei Raumtemperatur gelagert.

4.6.1.2. Cholesterin für den NGM-Agar

0,5 g Cholesterin

werden eingewogen und in 100 ml absolutem Ethanol gelöst. Lagerung bei -20 °C.

4.6.1.3. Nystatin-Lösung für den NGM-Agar

Lösung 1: 58 g Ammoniumacetat werden in 100 ml Aqua dest. vorsichtig gelöst (zuerst in wenig Wasser anlösen, es löst sich erst komplett im Endvolumen).

Lösung 2: 100 ml 96 % Ethanol.

2 g Nystatin

einwiegen und Lösungen 1 und 2 nach und nach dazugeben. Zum vollständigen Auflösen wird die Lösung auf 55 °C erhitzt. Anschließend wird die fertige Lösung sterilfiltriert und bei – 20 °C gelagert.

4.6.2. LB-Bouillon

20 g LB-Medium

werden eingewogen und in 1 L Aqua dest. gelöst. Die Lösung wird anschließend autoklaviert und ist kühl gelagert einige Monate haltbar.

4.6.3. LB-Agar

35 g LB-Agar

werden eingewogen und in 1 Liter Aqua dest. gelöst. Anschließend wird die Lösung autoklaviert. Den noch warmen Agar in Petrischalen pipettieren (25ml für 100mm, 12ml für 60mm und 4ml für 35mm Platten), die man über Kopf bei Raumtemperatur bis zum nächsten Tag trocknen lässt. Die fertigen Platten werden luftdicht aufbewahrt und sind kühl gelagert einige Monate haltbar.

4.6.4. Bleach-Lösung

5 N NaOH

5 % Bleiche

4.6.5. M9-Puffer

3 g KH_2PO_4

6 g Na_2HPO_4

5 g NaCl

einwiegen und in 1 L Aqua dest. lösen. Anschließend wird die Lösung für 30 min. autoklaviert und danach

1 ml 1 M MgSO_4

hinzugefügt.

Bei 4°C ist der Puffer ein Jahr haltbar.

4.6.6. CeHRFD-Medium

Das CeHRFD (*Caenorhabditis elegans* Habitation and Reproduction Medium Folate Depletion) wurde nach dem Rezept für das CeHR-Medium von HAMZA hergestellt, das Folsäure bzw. Ca-Folinat enthält.

Um bei den Versuchen das Folsäureangebot variieren zu können, wurde bei der Herstellung auf die Zugabe der 2 Komponenten Folsäure und Ca-Folinat verzichtet und diese Folsäurelösung separat hergestellt (siehe 4.6.7.).

Das bei den Versuchen verwendete Medium setzt sich zu 80 % aus CeHRFD-Medium und 20 % Milch zusammen, die Folsäure wurde separat dazugegeben.

Ultrahocherhitzte Milch mit einem geringen Fettanteil eignet sich am besten, da zu viel Fett die Beobachtung der Würmer erschwert.

Um sicher zu gehen, dass die Milch nicht kontaminiert ist, wird sie vor der Verwendung auf BHI-Agar-Platten ausgestrichen und im Brutschrank bei 37 °C sowie bei Raumtemperatur für 3 Tage inkubiert.

Zu beachten ist, dass es sich bei der Verwendung von CeHRFD-Medium plus Milch um keine vollständige Folsäure-Depletion handelt, da in der Milch immer etwas Folsäure enthalten ist.

Wenn in Folge von CeHR gesprochen wird, wird davon ausgegangen, dass 1 x FS, sprich die Konzentration, die dem CeHR-Medium nach HAMZA entspricht, dem Medium zugefügt wurde.

Für das Medium müssen mehrere Stocklösungen separat hergestellt werden.

– Salz-Lösung (250 ml):

0,05 g $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$

1,025 g $\text{MgCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$

0,725 g Na Citrat

1,225 g K Citrat $\times \text{H}_2\text{O}$

0,0175 g $\text{CuCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$

0,05 g $\text{MnCl}_2 \times 4 \text{H}_2\text{O}$

0,025 g ZnCl_2

0,15 g $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4) \times 6 \text{H}_2\text{O}$

werden eingewogen und in 250 ml Millipore-Wasser gelöst.

Die fertige Lösung wird steril filtriert und danach bei 4 °C gelagert.

– Vitamine und Wachstumsfaktoren (50 ml):

0,075 g N-Acetylglucosamin

0,075 g Alanin

0,0375 g Niacinamid

0,0187 g Pantethein

0,0375 g Pantothenat Ca

0,0187 g Pyridoxamin 2HCl

0,0375 g Pyridoxin HCl

0,0375 g Riboflavin 5 PO_4 Na

0,0375 g Thiamin HCl

werden eingewogen und in 30 ml Millipore-Wasser gelöst.

Die folgenden Substanzen werden extra eingewogen und jeweils in 2,5 ml 1 N KOH gelöst.

0,0375 g p-Aminobenzoessäure
0,0187 g Biotin
0,0187 g Cyanocobalamin
0,0375 g Niacin
0,0187 g Pyridoxal 5-phospat

Diese Lösungen werden vereinigt und zu den vorherigen 30 ml hinzugefügt.

0,0187 g DL-6,8-Thioctic Säure
werden eingewogen, in 0,5 ml Ethanol gelöst und zu der obigen Mischung hinzugefügt.

Diese Lösung wird nun mit Millipore-Wasser auf 50 ml aufgefüllt, steril filtriert und zu 10 ml in 15 ml Zentrifugenröhrchen aliquotiert.

Die fertige Lösung wird bei -20 °C gelagert.

– Nukleinsäure Mix (50 ml):

0,875 g Adenosin 5PO₄
0,92 g Cytidin 5PO₄
1,02 g Guanosin 5PO₄
0,92 g Uridin 5PO₄
0,315 g Thymin

werden eingewogen und in 50 ml Millipore-Wasser gelöst.

Zu beachten ist, dass Thymin schlecht löslich ist. Dem kann durch Erhitzen und ständiges Rühren Abhilfe geschaffen werden.

Die fertige Lösung wird 30 min. bei 121 °C autoklaviert und bei 4 °C gelagert.

– Weitere Komponenten (jede wird einzeln als Stocklösung zubereitet):

3,065 g KH₂PO₄
2,95 g Cholin
2,16 g Inositol
13,015 g HEPES

0,25 g Cholesterol

8,5 g Lactalbumin

werden separat eingewogen und jeweils in 50 ml Millipore-Wasser gelöst.

52,6 g Glucose

werden in 200 ml Millipore-Wasser gelöst. Um den Vorgang zu beschleunigen, sollte es in ein Wasserbad gestellt werden.

0,125 g Cytochrom C

werden in 25 ml Millipore-Wasser gelöst.

0,025 g Hemin Chlorid

werden in 25 ml 0,1 N NaOH gelöst.

Jede einzelne Stocklösung, außer Cholesterol, wird separat durch Filtration sterilisiert.

Da Cholesterol in absolutem Ethanol gelöst wird, kann man davon ausgehen, dass die Lösung steril ist, weshalb keine Sterilfiltration nötig ist.

Alle Lösungen sind bei 4 °C zu lagern.

Für die Herstellung von 1 L Medium werden 2 sterile 1 L Flaschen und 1 L Millipore-Wasser bereitgestellt.

Ein 500 ml, 75 mm Bottle Top Filter mit 0,2 µm Porengröße wird auf die Flasche aufgesetzt, mit etwas Wasser befeuchtet und dann folgende Lösungen in genau dieser Reihenfolge hineinpipetiert:

10 ml Cholin

10 ml Vitamine und Wachstumsfaktoren

10 ml Inositol

10 ml Cytochrom C

Nun werden 250 ml Wasser hinzugefügt und der gesamte Inhalt mittels Vakuumpumpe durch den Filter gesaugt. Es folgen:

20 ml Nucleinsäuremix
100 ml Salzlösung
20 ml Lactalbumin
20 ml Essential Amino Mix
10 ml Nonessential Amino Mix
20 ml KH_2PO_4
50 ml Glucose
10 ml HEPES

Das restliche Wasser wird hinzugefügt und der Inhalt erneut mit der Vakuumpumpe durch die Filtereinheit gesaugt. Sobald alles durchgelaufen ist, wird diese vom Vakuum getrennt und entfernt.

Anschließend fügt man

10 ml Hemin Chlorid

hinzu und saugt die Lösung separat durch die Filtereinheit. Damit wird ein Ausfallen von Hemin Chlorid verhindert, das in Folge den Filter verstopfen und das Durchsaugen der verschiedenen Lösungen behindern kann.

Zum Schluss fügt man unter sterilen Bedingungen 1 ml Cholesterol hinzu.

Die Flasche wird gut verschlossen und ist bei 4 °C gelagert.

Für 1 L Medium wird dieser Vorgang mit einer frischen Flasche ein zweites Mal durchgeführt.

4.6.7. Herstellung der Folsäurestammlösung (10 x konzentriert)

Um auch die Auswirkungen eines Überangebotes an Folsäure zu überprüfen und das spätere Arbeiten zu erleichtern, wurde die Folsäurelösung 10 mal konzentrierter als laut HAMZA beschrieben hergestellt (im Folgenden mit 10 x FS bezeichnet).

37,5 mg Ca-Folinat

werden eingewogen und in max. 5 ml 1 N KOH gelöst (zuerst 3 ml KOH in einem 10 ml Kolben vorlegen und Ca-Folinat mit Milli-Q-Wasser hineinspülen. Löst es sich nicht, kann noch weiter KOH dazugeben bis 5 ml erreicht sind).

75 mg Folsäure

einwiegen und in einem Becherglas in 3 ml Milli-Q-Wasser lösen.

Beide Lösungen werden in einem 10 ml Messkolben vereinigt und anschließend mit Milli-Q-Wasser bis zur Marke aufgefüllt. Die fertige Lösung wird sterilfiltriert und in Cryoröhrchen zu je 1 ml aliquotiert.

Lagerung bei – 20 °C.

5. Methoden

5.1. *C. elegans* auf NGM-Platten

Obwohl *C. elegans* axenisch gehalten werden kann, werden für gewöhnlich NGM-Platten zur Haltung und Kultivierung verwendet. *E. coli* OP50 dient dabei als Nahrungsquelle.

Dazu wird zuerst eine Einzelkolonie der Startkultur von *E. coli* OP50 auf sterilem LB-Agar fraktioniert ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C bebrütet. Eine Einzelkolonie dieser Platte wird am nächsten Tag zur Beimpfung einer Flasche mit LB-Bouillon verwendet, die erneut über Nacht bei 37 °C bebrütet wird.

Mit dieser Bouillon werden schließlich NGM-Platten beimpft und über Nacht bei Raumtemperatur kopfüber inkubiert.

Ungefähr jeden dritten Tag werden mittels Wormpick- oder Agarstück-Methode 5 Würmer des L4-Stadiums auf eine frische, mit OP50 beimpfte Platte überführt, um den Fortbestand des Stammes zu gewährleisten.

5.2. *C. elegans* im Flüssigmedium

5.2.1. Basistechniken mit *C. elegans*

Alle Methoden müssen unter sterilen Bedingungen durchgeführt werden, daher wurde bei sämtlichen Tätigkeiten unter einem Laminar Air Flow gearbeitet.

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

Ca. 10 NGM-Platten mit möglichst vielen Würmern und wenig Bakterien werden mit M9-Puffer gewaschen und die Wurmlösung in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt.

Die Lösung wird für 5 – 10 min. stehen gelassen, damit sich die Würmer absetzen können. Ein großer Teil der Bakterien, die noch in der Wurmlösung enthalten sind, kann so durch Absaugen des Überstands entfernt werden.

Das Pellet wird erneut in M9-Puffer resuspendiert und dieser „Waschvorgang“ zweimal wiederholt.

Danach wird die Wurmlösung gebleached (siehe 5.2.1.3).

In einer 25 cm² Zellkulturflasche wird eine Mischung aus 8 ml CeHR-Medium und 2 ml Milch vorbereitet in die das Pellet (also die Eier) nach dem Bleachen schließlich überführt wird.

Um eine Verschleppung von Bakterien zu vermeiden und sicher zu gehen, dass sich die Wurmkultur gut entwickelt, wird das Medium zusätzlich mit 100 µl/ml Tetracycline versetzt werden.

Nach zwei Bleachvorgängen kann aber jede bakterielle Verunreinigung ausgeschlossen werden und es ist kein Zusatz von Tetracycline mehr nötig.

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

C. elegans wird in 25 cm² Zellkulturflaschen bei einer Temperatur von 20 °C in einem Kühlbrutschrank gehalten.

Ein Platform-Shaker, der die Zellkulturflaschen bei 70 rpm ständig bewegt, sorgt für eine bessere Sauerstoffversorgung der Würmer im Medium.

5.2.1.3. Synchronisieren von *C. elegans*

Das Bleachen bzw. Synchronisieren dient dazu, eine Population mit Würmern des gleichen Stadiums bzw. Alters zu erhalten.

Dafür wird der gesamte Inhalt einer Zellkulturflasche (mit einer gemischten Population *C. elegans*) in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt und bei 4 °C und 800 g für 5 min. zentrifugiert.

Danach wird der Überstand mittels Vakuumpumpe und Pasteurpipette abgenommen, das zurückbleibende Wurmpellet in 10 ml 0,1 M NaCl-Lösung resuspendiert und für 5 min. auf Eis inkubiert.

Dadurch sinken die Würmer zu Boden und der Überstand wird abermals abgenommen (inklusive Würmer, die sich nicht als Pellet am Boden abgesetzt haben).

Danach fügt man 9 ml 0,1 M NaCl, 3 ml 5 % Bleiche und 1,5 ml 5 N NaOH hinzu und mischt die Lösung so lange am Vortex, bis sich die Embryos aus den Würmern herausgelöst haben.

Dies darf max. 8 min. dauern und wird immer wieder unter dem Mikroskop kontrolliert.

Wenn die meisten Würmer aufgeplatzt sind und sich schon viele Eier herausgelöst haben, lässt man die Würmer noch 30 – 40 sec. ruhen um sie noch weiter auflösen zu lassen. Danach werden sie unverzüglich bei 4 °C und 800 g für 1 min. zentrifugiert.

Es bildet sich erneut ein Pellet und der Überstand wird wie zuvor abgenommen.

Um die Reaktion zu stoppen gibt man nun 10 ml steriles Wasser auf das Pellet.

Die Lösung wird am Vortex gut gemischt und dann wieder bei 4 °C und 800 g für 1 min. zentrifugiert. Der Überstand wird nochmals abgenommen und dieser „Waschvorgang“ ein zweites Mal wiederholt.

Es bleibt nun ein Pellet aus Eiern zurück, welches man in 10 ml M9-Puffer löst. Die gesamte Lösung wird in eine 24 cm² Zellkulturflasche überführt und über Nacht im Kühlbrutschrank bei 20 °C auf einem Plattform-Shaker inkubiert.

Die Embryos schlüpfen über Nacht zu synchronisierten L1-Larven.

In M9-Puffer sind die Larven 2 Tage lebensfähig. Danach müssen sie entweder in Medium überführt oder der M9-Puffer jeden dritten Tag gewechselt werden.

5.2.1.4. Mediumwechsel

Nach 3 – 4 Tagen haben die Würmer alle Nährstoffe des CeHR-Mediums verbraucht und es muss ein Mediumwechsel durchgeführt werden.

Dazu wird der gesamte Inhalt der Zellkulturflasche in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen pipettiert und die Wurmlösung bei 4 °C und 800 g für 5 min. zentrifugiert.

Danach nimmt man den Überstand mittels Vakuumpumpe und Pasteurpipette ab, sodass nur das Wurm-pellet zurückbleibt.

Diese Wurm-suspension saugt man mit einer neuen Pasteurpipette auf und überführt 1 – 2 Tropfen davon in eine mit frischem Medium gefüllte Zellkulturflasche.

5.3. Versuche

5.3.1. Populationswachstum

Mit diesem Versuch soll gezeigt werden, dass sich das Folsäureangebot auf das Wachstum und die Reproduktivität der Würmer auswirkt.

Dieser Versuch verläuft über 13 Tage, wobei an Tag 3, 6 und 9 ein Mediumwechsel durchgeführt sowie das Wachstum und die Vermehrung der Würmer überprüft wird.

Der erste Schritt ist die Synchronisierung einer gemischten Wurm-population (siehe 5.2.1.3.).

Am nächsten Tag ist der eigentliche Start des Versuches, Tag 0, an dem je 100 dieser synchronisierten und über Nacht in M9 geschlüpften L1-Larven in Wells eingesetzt werden.

Dazu überführt man die L1-Larven in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen und zentrifugiert bei 4 °C und 800 g für 5 min.

Der Überstand wird mittels Vakuumpumpe und Pasteurpipette abgenommen und das Pellet mit 2 ml M9-Puffer resuspendiert.

Die gesamte Lösung wird mit einer Pipette aufgesogen, die genaue Flüssigkeitsmenge notiert und wieder zurück in das Zentrifugenröhrchen gegeben.

Nun mischt man die Lösung mit einem Vortex gut durch, bevor zweimal 100 µl Wurmlösung entnommen und in je ein Vial überführt werden.

Dieselbe Menge 10 mM Natriumazid hinzufügen um die Würmer zu immobilisieren und für 5 – 10 min. inkubieren lassen.

Danach wird jedes Vial mit dem Vortex gut durchgemischt, bevor 2 x 50 µl entnommen und auf einen Objektträger mit Raster pipettiert werden.

Unter dem Mikroskop wird nun gezählt, wie viele Würmer sich auf dem Objektträger befinden. Es sollten ca. 50 – 150 Würmer vorhanden sein. Ein Ergebnis von < 20 führt in der Folge meist zu Fehlern warum in diesem Fall der Versuch neu begonnen werden sollte.

Aus den beiden Ergebnissen wird der Variationskoeffizient mit folgender Formel errechnet:

$$\text{Variationskoeffizient (Vk)} = \frac{\text{Standardabweichung (s)}}{\text{Mittelwert } (\bar{x})}$$

Abb. 9: Formel Variationskoeffizient
modifiziert nach: KUCKARTZ et. al, 2010

Dieser sollte < 10 sein da sonst keine statistisch sichere Aussage gemacht werden kann. In diesem Fall sollte der Versuch ebenfalls neu begonnen werden.

Danach wird die Anzahl der Würmer in der originalen 2 ml Lösung errechnet und auf 1 Wurm / µl verdünnt.

Anschließend pipettiert man je 100 µl dieser verdünnten Endlösung in 6 Wells einer 24-Well-Platte, die zuvor mit 1 ml Medium (CeHRFD plus Milch) und 10 µl der gewünschten Folsäurelösung (bzw. M9 Puffer) befüllt worden sind.

Pro Versuchsansatz werden 3 Wells verwendet. Da jeder Versuch im Doppelansatz durchgeführt wird befüllt man an Tag 0 6 Wells.

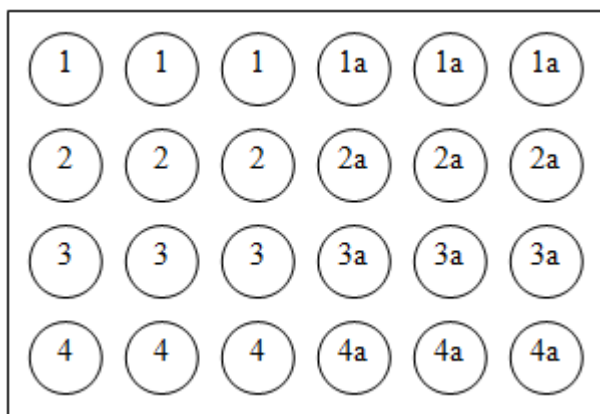


Abb. 10: 6-Well

Nun sollten in jedem Well 100 Würmer enthalten sein, welches an Tag 3 überprüft wird.

Die Würmer sind zu diesem Zeitpunkt im L4-Stadium bzw. Adult, haben aber noch keine Eier gelegt. Durch Zählen der Würmer an Tag 3 kann nun ermittelt werden, wie viele Würmer man tatsächlich an Tag 0 in jedes Well eingesetzt hat.

Dazu wird als erstes ein Mediumwechsel durchgeführt. Alle 6 Wells werden in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt, für 5 min. bei 4 °C und 800 g zentrifugiert und der Überstand mittels Vakuumpumpe und Pasteurpipette abgenommen.

Anschließend resuspendiert man das zurückgebliebene Wurmpellet in 6 ml frischem Medium, mischt die Lösung mit dem Vortex gut durch, entnimmt 2 ml Probe und teilt die restliche Lösung in einer frischen 24-Well-Platte auf.

Für den nächsten „Zähltag“ sind nun nur mehr 4 Wells pro Versuchsansatz vorhanden.

Je 1 ml der Probe wird in eine Zählchale mit Raster pipettiert und mit 500 µl 10 mM Natriumazid versetzt. Nach 5 – 10 min. Inkubationszeit bestimmt man die Anzahl der Würmer unter dem Mikroskop wodurch man schließlich die Anzahl der Würmer im Ausgangswell errechnen kann.

Auf diesen Wert wird an den folgenden Tagen die Anzahl der ermittelten Würmer zurückgerechnet.

Der Mediumwechsel wird neben Tag 3 auch an Tag 6 und 9 durchgeführt.

An Tag 13 entnimmt man nur mehr die entsprechende Probenmenge und ermittelt die Anzahl der Würmer. Danach ist der Versuch beendet.

Da der Versuch über 13 Tage verläuft, kann beobachtet werden, wie sich ein Folsäuremangel oder –überangebot auf mehrere Generationen auswirkt.

Für alle Versuche wurde das CeHRFD-Medium plus Milch verwendet.

Ausgehend von der 10-fach konzentrierten Folsäurestammlösung wurden durch Verdünnung mit M9-Puffer Folsäurelösungen in unterschiedlichen Konzentrationen erhalten, die dann dem Medium zugefügt wurden. Pro ml Medium bzw. pro Well wurden 10 µl Folsäurelösung hinzugefügt.

Folgende Folsäurekonzentrationen wurden verwendet:

10 x Folsäure, 1 x Folsäure (entspricht der Konzentration, wie sie laut HAMZA im Medium enthalten ist, im Folgenden mit 1 x FS bezeichnet), 1/10, 1/100, 1/500, 1/1000 sowie 1/2000 verdünnte Folsäure.

Zusätzlich wurde noch die Reproduktivität bei vollständiger Abwesenheit von Folsäure (im Folgenden mit 0 FS bezeichnet) sowie das Verhalten der Würmer bei Zugabe von 1 x FS an Tag 3 untersucht (im Folgenden mit 0/3 FS bezeichnet).

Zu beachten ist, dass bei 0 und 0/3 FS statt Folsäure die gleiche Menge, also 10 µl, M9 Puffer dazugegeben wurde, um in jedem Well die gleiche Flüssigkeitsmenge zu haben.

Alle Untersuchungen wurden bei 20 °C durchgeführt.

Um eine bessere Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten, wurde davon ausgegangen, dass man an Tag 0 genau 100 Würmer in jedes Well eingesetzt hat, die Ergebnisse wurden dementsprechend adaptiert.

Für jede Folsäurekonzentration wurden 3 biologische Replikate untersucht und jeder Versuch im Doppelansatz durchgeführt.

Die Ergebnisse von jedem „Zähltag“ wurden auf die Kontrolle bezogen und schließlich aus den Werten aller 3 Versuche der Mittelwert sowie die Standardabweichung (SEM) errechnet.

5.3.2. Broodsize

Der Broodsize-Versuch dient dazu, die Nachkommenschaft eines einzelnen Wurmes zu ermitteln.

Nach der Synchronisierung einer gemischten Wurmpopulation werden die geschlüpften L1-Larven in eine Zellkulturflasche mit Medium überführt, wo sie bis zum L4-Stadium heranwachsen sollen. Dies dauert 3 – 4 Tage.

Adulte Würmer dürfen für den Versuch nicht verwendet werden, da sonst nicht sicher davon ausgegangen werden kann, dass sie noch keine Eier gelegt haben.

Eine 24-Well-Platte wird vorbereitet wobei pro Wurm je 1 Well mit 1 ml Medium befüllt wird.

Danach werden 1 – 2 ml aus der Zellkulturflasche mit den L4-Larven in ein 6-Well überführt, in dem man 500 µl M9 vorgelegt hat, um die Würmer besser sehen zu können.

Nun saugt man mit der Pipette (Einstellung 10 µl) einen einzelnen Wurm auf.

Um sicher zu gehen, dass auch wirklich nur einen Wurm aufgesaugt wurde, kann man die 10 µl in ein weiteres 6-Well mit 500 µl M9 pipettieren.

Wurden aus Versehen doch 2 oder mehrere Würmer entnommen, können diese nun leichter erkannt und schließlich wirklich nur ein Wurm aufgesaugt werden.

Dieser Wurm wird in das vorbereitete 24-Well pipettiert.

Nun beginnt die Eierlegperiode und jeder Wurm wird jeden Tag in ein neues 24-Well mit frischem Medium überführt.

Das Medium des „alten“ Wells wird in eine Zählchale mit Raster pipettiert und mit 500 µl 10 mM Natriumazid versetzt, um die geschlüpften Würmer zu immobilisieren.

Die geschlüpften Würmer werden mit Hilfe des Rasters unter dem Mikroskop gezählt.

Der Broodsize Versuch ist beendet sobald der Wurm keine Eier mehr legt.

Da der Lifespan-Versuch direkt mit dem Broodsize-Versuch zusammenhängt, gilt Folgendes für beide Versuche:

Die in dieser Arbeit durchgeführten Broodsize- und Lifespan-Versuche dienten der Etablierung einer Technik zur Ermittlung des Broodsize bzw. Lifespan von *C. elegans* im Flüssigmedium.

Pro Versuch wurden 6 Würmer untersucht und jeder Versuch 3 Mal wiederholt. Diese geringe Stückzahl wurde deshalb gewählt, da es sich nur um einen Vorversuch handelte.

Alle Versuche wurden bei 20 °C durchgeführt.

In Vorversuchen mit einzelnen L4-Würmern wurde die oben beschriebene Umsetztechnik untersucht und optimiert.

Des Weiteren wurde die Zählbarkeit der Eier bzw. geschlüpften Würmer unter dem Mikroskop überprüft.

Es zeigte sich, dass sich die Eier nur schwer zählen lassen und leicht übersehen werden können.

Aus diesem Grund wurde für die Bestimmung des Broodsize das Schlüpfen der Eier abgewartet und nur die Zahl der geschlüpften Würmer ermittelt.

Es stellte sich heraus, dass diese Technik durchaus für die Ermittlung des Broodsize von *C. elegans* im Flüssigmedium geeignet ist, allerdings etwas Übung erfordert.

Im Laufe der Versuche gingen immer wieder einzelne Würmer während des Mediumwechsels verloren oder wurden beim Aufsaugen mit der Pipette verletzt.

Mit Voranschreiten der Versuche konnte dies aber immer häufiger vermieden werden.

Für alle Versuche wurde das CeHRFD-Medium plus Milch verwendet.

Wie bei den Populationswachstumsversuchen wurden ausgehend von der 10-fach konzentrierten Folsäurestammlösung durch Verdünnung mit M9-Puffer Folsäurelösungen in unterschiedlichen Konzentrationen erhalten, die dann dem Medium zugefügt wurden. Pro ml Medium bzw. pro Well wurden 10 µl Folsäurelösung bzw. M9-Puffer hinzugefügt.

Es wurde der Broodsize und Lifespan von Würmern in Medium mit 1 x FS und 1/1000 FS untersucht.

1 x FS diente dabei als Kontrolle.

Pro Well sind bei 1 x FS 7,5 µg Folsäure und 3,75 µg Ca-Folinat, bei 1/1000 FS 0,0075 µg Folsäure und 0,00375 µg Ca-Folinat enthalten.

5.3.3. Lifespan

Der Lifespan-Versuch schließt direkt an den Broodsize an und dient dazu, die genaue Lebensdauer eines einzelnen Wurms zu bestimmen.

Sobald die reproduktive Phase des Wurms beendet ist, wird das Well jeden Tag unter dem Mikroskop untersucht und überprüft, ob der Wurm noch am Leben ist. Er muss nun aber nicht jeden Tag in ein neues Well überführt werden, es reicht aus alle 3 Tage einen Mediumwechsel durchzuführen.

Der Versuch ist beendet sobald der Wurm tot ist.

Da für den Broodsize-Versuch die Würmer bereits einzeln in Wells gehalten wurden, schien es sinnvoll den Lifespan-Versuch direkt an den Broodsize anzuschließen.

Es stellte sich heraus, dass dies durchaus möglich, allerdings bei einer höheren Stückzahl aus Zeitgründen schwer durchführbar ist.

Darauf wird in 6.2.3. sowie 6.3.3. genauer eingegangen.

Die protokollierten Daten wurden anschließend mit Hilfe des Statistikprogrammes GraphPad Prism 5 ausgewertet.

6. Ergebnisse und Diskussion

6.1. Populationswachstums-Versuch

Bei diesem Versuch wurden das Wachstum und die Reproduktivität der Würmer bei unterschiedlichem Folsäureangebot überprüft.

Nu et al. (1976) konnten in Populationswachstumsversuchen mit *C. briggsae* zeigen, dass der Wurm bei fehlender Folsäure im Medium keine Eier legt.

Die genaue Mindestdosis, die für die Reproduktion erforderlich ist, ist allerdings nicht bekannt.

Ziel dieser Arbeit war es ein Level zu finden, bei dem der Wurm keine Eier mehr legt und somit die minimale Folsäuremenge zu ermitteln, die *C. elegans* für die Reproduktion benötigt.

6.1.1. Vergleich der verschiedenen Folsäurekonzentrationen

Abb. 11 zeigt die Ergebnisse der verschiedenen Folsäurekonzentrationen des Populationswachstums-Versuches.

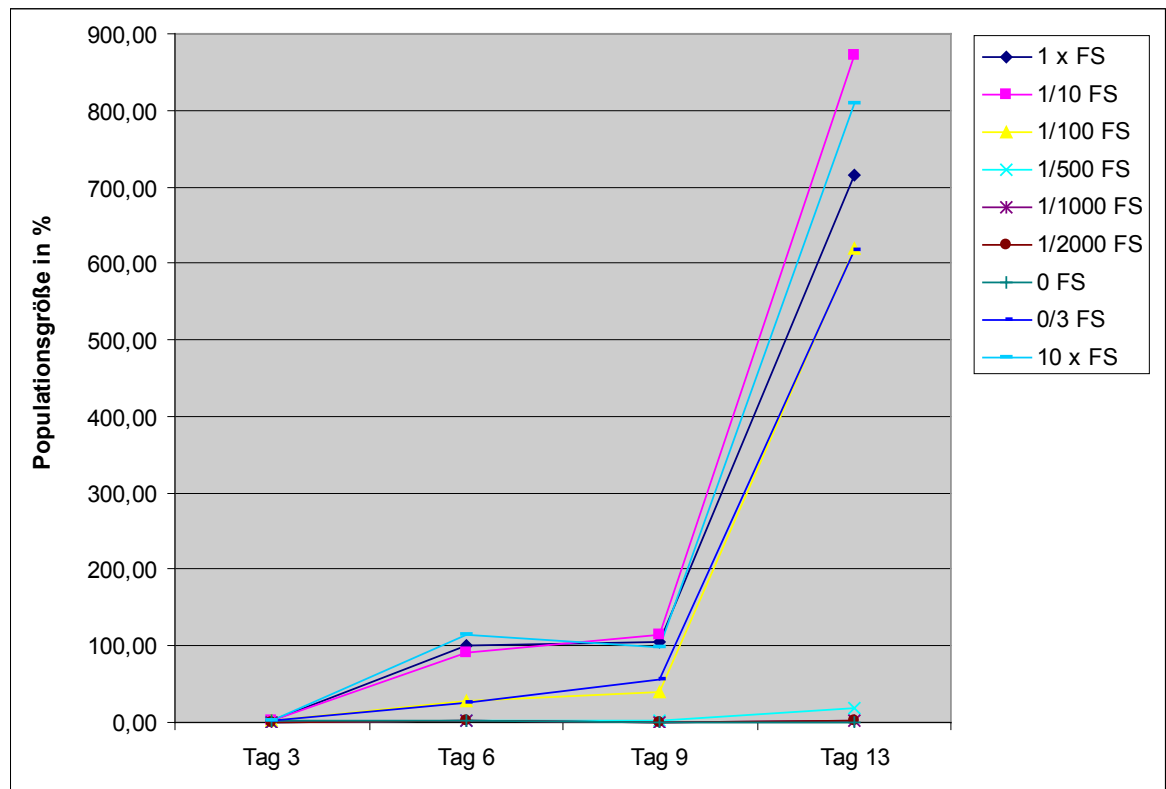


Abb. 11: Ergebnisse des Populationswachstums-Versuches.

Es werden die Populationsgrößen von *C. elegans* N2 an allen Zähltagen in % angegeben.

Untersucht wurde das Wachstum in CeHRFD-Medium plus Milch mit unterschiedlichem Folsäureangebot (10 x Folsäure, 1 x, 1/10, 1/100, 1/500, 1/1000 sowie 1/2000 - entspricht der vielfachen Folsäurekonzentration des CeHR-Mediums (HAMZA)). Von jeder Folsäurekonzentration wurden 3 biologische Replikate untersucht und jeder Versuch im Doppelansatz durchgeführt. Aus den Ergebnissen wurde der Mittelwert sowie die Standardabweichung (SEM) ermittelt. Bei jedem Versuch wurde 1 x FS als Kontrolle mitgeführt. Alle Werte wurden auf die Ergebnisse von 1 x FS an Tag 6 bezogen. Sämtliche Untersuchungen wurden bei 20 °C durchgeführt.

Es ist deutlich zu erkennen, dass das Populationswachstum mit abnehmender Folsäurekonzentration im Medium geringer wird.

Abb. 12 zeigt zur besseren Veranschaulichung die Ergebnisse des Populationswachstumsversuches von Tag 6 und Tag 9.

Es werden die Populationsgrößen aller Folsäurekonzentrationen in % angegeben.

Da die Ergebnisse von 1/500 FS, 1/1000 FS, 1/2000 FS und 0 FS im großen Diagramm schwer zu erkennen sind, wurden die Daten in einem zusätzlichen Diagramm mit kleinerer Skalierung dargestellt.

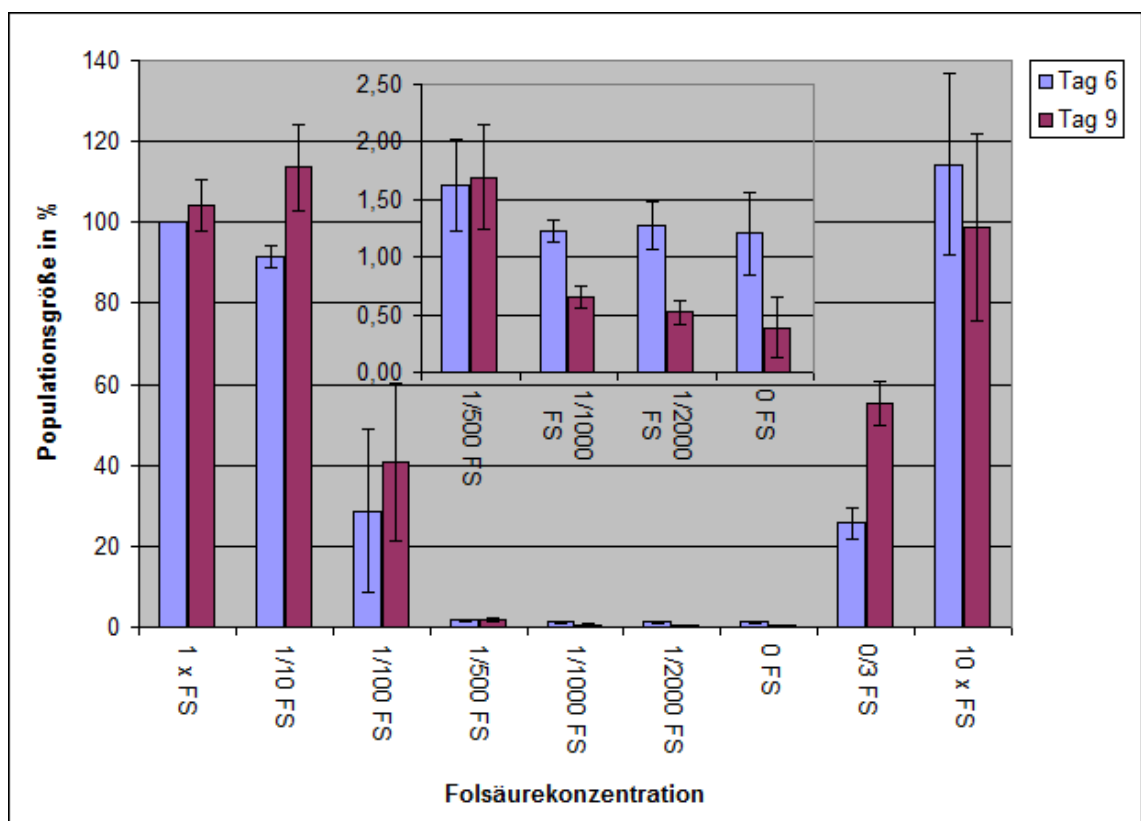


Abb. 12: Populationsgrößen von *C. elegans* N2 an Tag 6 und 9 in %.

Untersucht wurde das Wachstum in CeHRFD-Medium plus Milch mit unterschiedlichem Folsäureangebot (10 x Folsäure, 1 x, 1/10, 1/100, 1/500, 1/1000 sowie 1/2000 - entspricht der vielfachen Folsäurekonzentration des CeHR-Mediums (HAMZA)). Von jeder Folsäurekonzentration wurden 3 biologische Replikate untersucht und jeder Versuch im Doppelansatz durchgeführt. Aus den Ergebnissen wurde der Mittelwert sowie die Standardabweichung (SEM) ermittelt, die im Diagramm angegeben wird. Bei jedem Versuch wurde 1 x FS als Kontrolle mitgeführt. Alle Werte wurden auf die Ergebnisse von 1 x FS an Tag 6 bezogen. Sämtliche Untersuchungen wurden bei 20 °C durchgeführt.

Das veränderte Wachstum in Abhängigkeit von der Folsäurekonzentration im Vergleich zu 1 x FS ist an Tag 6 bei fast allen Konzentrationen signifikant.

Nur bei der Konzentration 10 x FS, bei welcher an Tag 6 die größte Population beobachtet werden kann (114,32 %), ist das größere Wachstum im Vergleich zur Kontrolle nicht signifikant.

Die erste bemerkenswerte Abnahme der Populationsgröße an Tag 6 ist bei 1/100 FS sowie 0/3 FS zu erkennen. Diese Populationen erreichen annähernd die gleiche Größe und betragen nur mehr 28,64 % bzw. 25,60 % im Vergleich zu 1 x FS (100 %).

Mit 1,62 %, 1,22 % sowie 1,27 % sind die Populationsgrößen von 1/500 FS, 1/1000 FS und 1/2000 FS an Tag 6 im Vergleich zur Kontrolle äußerst gering.

Des Weiteren ist in Abb. 12 zu erkennen, dass die Population von 10 x FS an Tag 9 kleiner ist als an Tag 6. Gleiches kann bei den Konzentrationen 1/1000 FS, 1/2000 FS und 0 FS beobachtet werden.

Bei den Konzentrationen 1 x FS und 1/10 FS ist mit 4,23 % sowie 22,05 % von Tag 6 auf Tag 9 nur ein geringes Populationswachstum zu beobachten. Das geringste Wachstum tritt bei 1/500 FS (0,07 %) auf.

Darüber hinaus ist in Abb. 12 zu sehen, dass sich die Populationen von 1/100 FS und 0/3 FS vom anfänglichen Folsäuremangel erholen und an Tag 9 etwa die Hälfte der Populationsgröße von 1 x FS (104,23 %) erreichen (40,61 % bei 1/100 FS und 55,35 % bei 0/3 FS).

Abb. 13 zeigt die Ergebnisse des Populationswachstumsversuches aller 3 Zähltag.

Es werden die Populationsgrößen an Tag 6, 9 und 13 aller Folsäurekonzentrationen in % angegeben.

Da die Ergebnisse von 1/500 FS, 1/1000 FS, 1/2000 FS und 0 FS im großen Diagramm wiederum schwer zu erkennen sind, wurden die Daten in einem zusätzlichen Diagramm mit kleinerer Skalierung dargestellt.

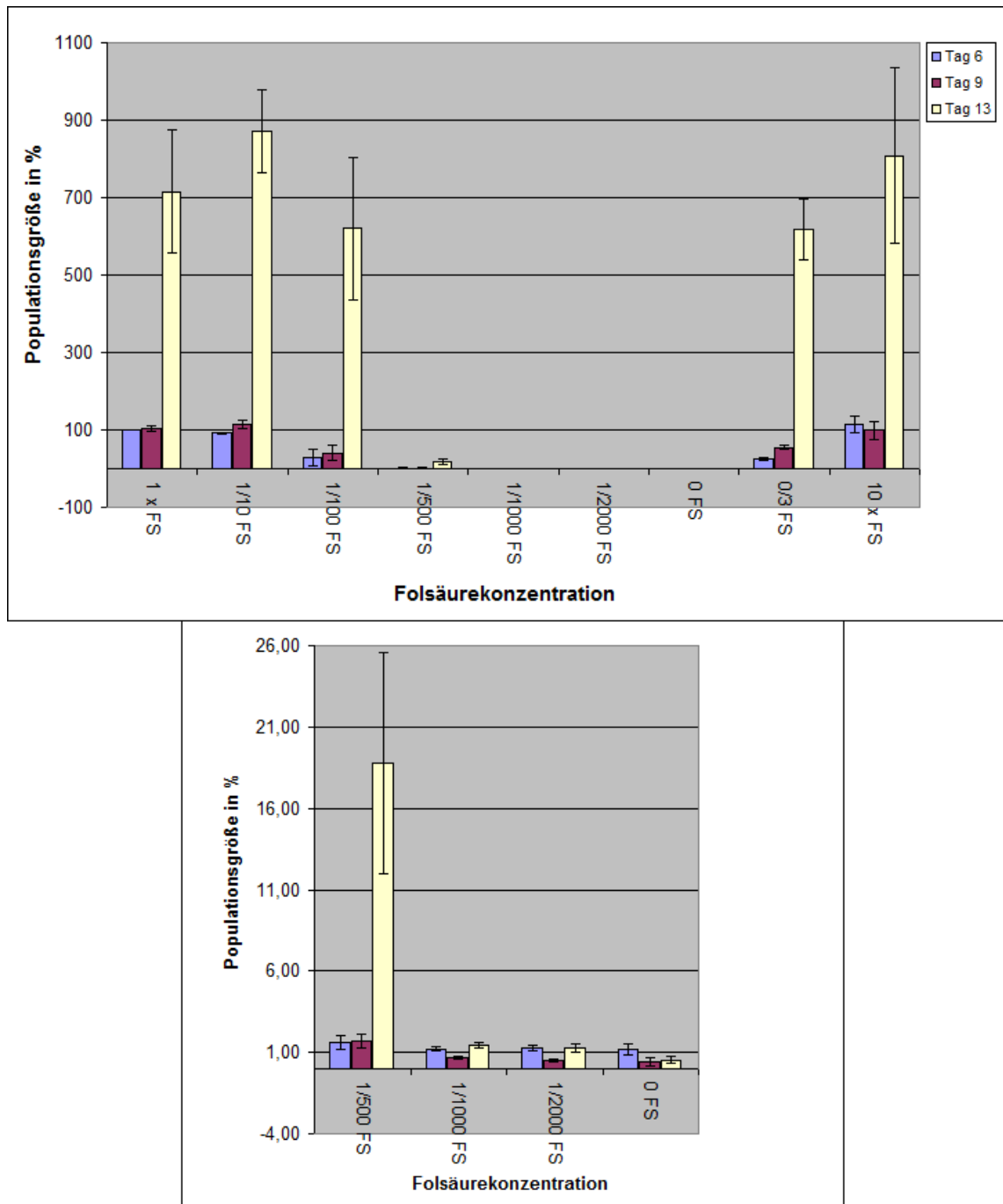


Abb. 13: Populationsgrößen von *C. elegans* N2 an Tag 6, 9 und 13 in %.

Untersucht wurde das Wachstum in CeHRFD-Medium plus Milch mit unterschiedlichem Folsäureangebot (10 x Folsäure, 1 x, 1/10, 1/100, 1/500, 1/1000 sowie 1/2000 - entspricht der vielfachen Folsäurekonzentration des CeHR-Mediums (HAMZA)). Von jeder Folsäurekonzentration wurden 3 biologische Replikate untersucht und jeder Versuch im Doppelansatz durchgeführt. Aus den Ergebnissen wurde der Mittelwert sowie die Standardabweichung (SEM) ermittelt, die im Diagramm angegeben wird. Bei jedem Versuch wurde 1 x FS als Kontrolle mitgeführt. Alle Werte wurden auf die Ergebnisse von 1 x FS an Tag 6 bezogen. Sämtliche Untersuchungen wurden bei 20 °C durchgeführt.

Auch hier treten einige Besonderheiten auf.

Zum einen sind die Populationen von 1 x FS sowie 10 x FS an Tag 13 kleiner als jene von 1/10 FS. Die geringere Populationsgröße von 1 x FS bzw. 10 x FS ist in Bezug auf 1/10 FS allerdings nicht signifikant.

Zum anderen wird hier noch einmal deutlich, dass sich die Populationen von 1/100 FS und 0/3 FS vom anfänglichen Folsäuremangel erholen. Sie erreichen an Tag 13 mit 620,21 % bzw. 617,35 % annähernd die gleiche Größe wie 1 x FS (714,89 %).

Weiters ist in Abb. 13 zu erkennen, dass bei den Konzentrationen 1/1000 FS und 1/2000 FS noch ein geringes Populationswachstum stattfindet und die Populationen an allen 3 Zähltagen annähernd gleich sind.

Die Tatsache, dass die Populationen von 10 x FS an Tag 9 kleiner sind als an Tag 6, lässt sich unter anderem durch die verhältnismäßig hohen Standardabweichungen erklären (22,34 an Tag 6 und 23,21 an Tag 9).

Gleiches gilt für die geringeren Populationsgrößen von 1 x FS und 10 x FS im Vergleich zu 1/10 FS an Tag 13 (1 x FS: 158,69; 10 x FS: 226,99; 1/10 FS: 107,78).

Bei 1/1000 FS, 1/2000 FS sowie 0 FS spielt die Standardabweichung nur eine geringe Rolle, hier gibt es noch andere Faktoren, die für die Populationsabnahme von Tag 6 auf Tag 9 verantwortlich sein können.

Zum einen könnte es sich um ein Problem bei der Probenentnahme handeln.

Es wird immer nur eine kleine Probe entnommen, in der man die Anzahl der Würmer ermittelt. Aus diesem Wert wird anschließend auf die Gesamtzahl der Würmer im Well hochgerechnet.

Wenn vor der Probennahme nicht gut genug durchgemischt wird, kann dies dazu führen, dass in der Probe zu wenige Würmer enthalten sind. Der hochgerechnete Wert ist dann geringer und spiegelt die eigentlich im Well enthaltene Wurmmenge nicht wieder.

Dies führt vor allem bei den geringen Konzentrationen 1/1000 FS, 1/2000 FS sowie 0 FS zu einem fehlerhaften Ergebnis, da hier nur eine sehr geringe Anzahl an Würmern vorhanden ist und sich ein Zählfehler gravierender auswirkt als bei Konzentrationen, bei denen sehr viele Würmer vorhanden sind.

Dieser Fehler lässt sich auch trotz genauem Arbeiten nicht immer vermeiden.

Zum anderen kann die Abnahme der Population auf Unterschiede der Wurmindividuen zurückzuführen sein bzw. kann es vorkommen, dass beim Mediumwechsel Würmer verloren gehen.

Das geringe Wachstum bei 1 x FS und 1/10 FS von Tag 6 auf Tag 9 und das daraus resultierende „Plateau“ in der Wachstumskurve lässt sich dadurch erklären, dass die Würmer, die nach dem ersten Anstieg aus der synchronisierten Kultur geschlüpft sind, erst wieder geschlechtsreif werden müssen. Danach (von Tag 9 auf Tag 13) ist wieder ein deutlicher Anstieg der Populationsgrößen zu beobachten.

Aus Abb. 13 ist ersichtlich, dass an Tag 13 bei 1/1000 FS sowie 1/2000 FS noch ein geringes Wachstum vorhanden ist.

Allerdings konnte im nachstehend beschriebenen Broodsize-Versuch herausgefunden werden, dass für manche Würmer bereits 1/1000 FS eine zu geringe Folsäurekonzentration darstellt und keine Eiproduktion mehr stattfindet. Daher ist es schwierig eine allgemein gültige, minimale Folsäurekonzentration für die Reproduktion anzugeben.

Es scheint von Wurm zu Wurm unterschiedlich zu sein, wie viel Folsäure benötigt wird.

Um eine genaue Aussage treffen zu können ist es notwendig, weitere Versuche mit einer größeren Stückzahl sowie verschiedenen Folsäurekonzentrationen durchzuführen.

Man kann allerdings sagen, dass die minimale Folsäurekonzentration, die *C. elegans* für die Reproduktion benötigt im Bereich von 1/1000 FS und 1/2000 FS liegt.

6.2. Broodsize-Versuch

Für einen Broodsize-Versuch wurden 6 Würmer verwendet und jeder Versuch 3 Mal wiederholt.

Um auch bei diesen Versuchen die Abhängigkeit der Reproduktivität von der Folsäureaufnahme aufzuzeigen, wurde wiederum Medium mit unterschiedlichem Folsäuregehalt verwendet.

Es wurden die Konzentrationen 1 x FS und 1/1000 FS untersucht.

Somit wurde die Anzahl der Nachkommen bei insgesamt 36 Würmern ermittelt (pro Folsäurekonzentration 18 Würmer).

Alle Untersuchungen wurden bei 20 °C durchgeführt.

Es wurde die Anzahl der bereits geschlüpften Würmer erhoben, da es laut Literatur nicht ausreichend ist, die Nachkommenschaft nur aufgrund der produzierten Eier zu bestimmen.

Denn die produzierten Eizellen werden unbefruchtet aus der Spermathek entlassen und müssen befruchtet werden bevor aus ihnen Würmer schlüpfen können. Daher wird die Nachkommenschaft aus einer Selbstbefruchtung nicht durch die gelegten Eier, sondern durch die Anzahl der selbst produzierten Spermien bestimmt.

Man muss zwischen unfruchtbaren und fruchtbaren Eiern unterscheiden, weshalb die Zahl der gelegten Eier nichts über die Nachkommenschaft aussagt [MUSCHIOLE et al., 2009].

Darüber hinaus sind die Eier unter dem Mikroskop nicht gut sichtbar und lassen sich nur sehr schwer zählen.

Daher könnte das alleinige Zählen der Eier das Ergebnis stark verfälschen, da nicht vollständig ausgeschlossen werden kann, dass keine Eier übersehen werden.

In der Literatur findet man nur wenige Angaben zum Broodsize von *C. elegans* im Flüssigmedium. Die Meisten Untersuchungen wurden auf NGM-Platten durchgeführt.

Tabelle 2 gibt einen Überblick über die in der Literatur vorkommenden Angaben zum Broodsize.

Es wird die gesamte Anzahl der Nachkommen pro Wurm während der Eierlegperiode sowie deren Dauer angegeben.

Da der Broodsize bei *C. elegans* temperaturabhängig ist [SZEWCZYK et al., 2006], muss man die unterschiedlichen Temperaturen beachten, bei denen die Untersuchungen durchgeführt wurden.

Quelle	NGM-Platten	Flüssigmedium (axenisch)	Halbflüssiges Medium (monoxenisch)	Dauer der Eierlegperiode	Temp.
STRANGE, 2006	ca. 300			3 Tage	
SZEWCZYK et al., 2006		81 ± 31		7 – 14 Tage	20 °C
		42 ± 18		5 – 9 Tage	25 °C
GEMS, RIDDLE, 2000	267 ± 8,6				20 °C
MUSCHIOL et al., 2009			291		20 °C

Tab. 2: Auflistung der Angaben zum Broodsize von *C. elegans* in der Literatur

Muschiol et al. führten Life cycle- und Populationswachstums-Versuche von *C. elegans* in halbflüssigem Medium durch. Dieses enthielt jedoch gewaschene *E. coli* OP50 Zellen als Nahrungsquelle, die in halbflüssigem NGM-Agar resuspendiert wurden. Somit handelt es sich bei dieser Methode um keine axenische Kultivierung und erlaubt keinen direkten Vergleich mit den in dieser Arbeit durchgeführten Versuchen.

6.2.1. Versuch mit 1 x Folsäure

Abb. 14 zeigt die durchschnittliche Anzahl der geschlüpften Würmer pro Tag bei 1 x FS aller untersuchten Würmer.

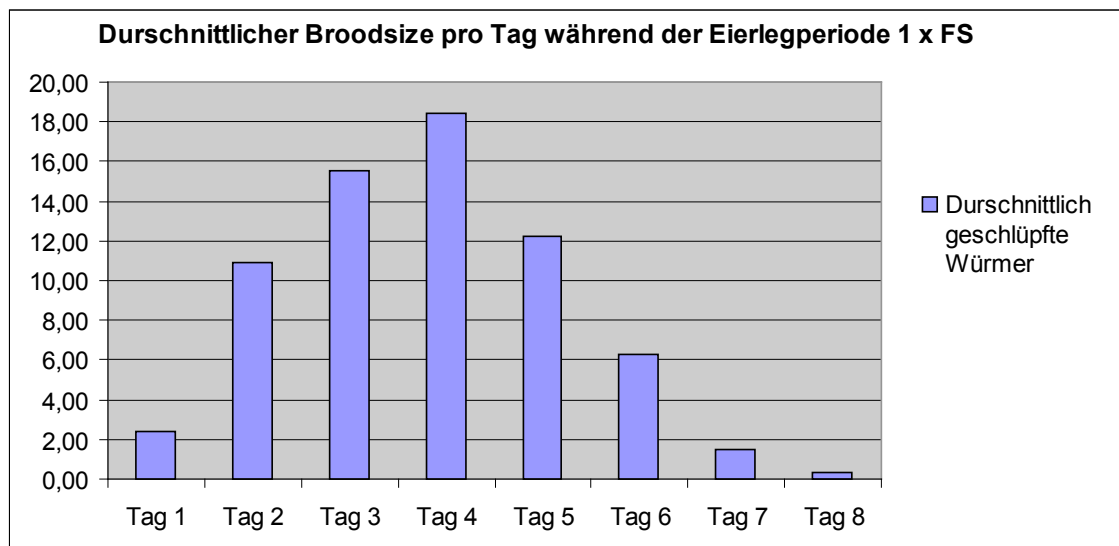


Abb. 14: durchschnittlicher Broodsize von *C. elegans* N2 pro Tag während der Eierlegperiode bei 1 x FS. Es wurde der Broodsize in CeHRFD-Medium plus Milch bei dem Folsäureangebot von 1 x FS ermittelt (entspricht der Folsäurekonzentration des CeHR-Mediums (HAMZA)). Pro Versuch wurden 6 Würmer untersucht und jeder Versuch 3 Mal wiederholt. Da einige Würmer frühzeitig verstorben sind, wurden nicht alle 18, sonder nur 12 Würmer in die Auswertung miteinbezogen. Sämtliche Untersuchungen wurden bei 20 °C durchgeführt.

Die ersten beiden Würmer (Wurm 6 und 12) verstarben an Tag 2 bzw. gingen beim Mediumwechsel (Wurm 12) verloren.

Die Würmer 7 und 13 (Tag 3) sowie 11 und 17 (Tag 4) verstarben schon sehr bald, weshalb sie in die Auswertungen ebenfalls nicht mit einbezogen wurden.

Die Dauer der Eiablage reichte von 5 (Wurm 9) bis maximal 8 Tage (Wurm 16) wobei die meisten geschlüpften Würmer (221) an Tag 4 gezählt wurden.

Insgesamt konnte bei den 12 Würmern (6 Würmer wurde aus oben genannten Gründen nicht in die Auswertung miteinbezogen) innerhalb der 8 Tage eine Nachkommenschaft von 795 Würmern beobachtet werden. Dies entspricht einer durchschnittlich produzierten Nachkommenschaft von 66 +/- 22 Würmern

pro Wurm und liegt in dem in der Literatur angegeben Bereich für den Broodsize von *C. elegans* im Flüssigmedium.

Tabelle 3 zeigt die gesamte Anzahl der geschlüpften Würmer pro Tag während der Eierlegperiode bei 1 x FS.

Tag	geschlüpfte Würmer
1	29
2	131
3	186
4	221
5	147
6	63
7	15
8	3
Gesamt:	795

Tab. 3: Broodsize gesamt pro Tag während der Eierlegperiode bei 1 x FS.

Es wurde der Broodsize von *C. elegans* N2 in CeHRFD-Medium plus Milch bei dem Folsäureangebot von 1 x FS ermittelt (entspricht der Folsäurekonzentration des CeHR-Mediums (HAMZA)). Pro Versuch wurden 6 Würmer untersucht und jeder Versuch 3 Mal wiederholt. Da einige Würmer frühzeitig verstorben sind, wurden nicht alle 18, sondern nur 12 Würmer in die Auswertung miteinbezogen. Sämtliche Untersuchungen wurden bei 20 °C durchgeführt.

Abb. 15 zeigt die Anzahl der geschlüpften Würmer pro Wurm bei 1 x FS.

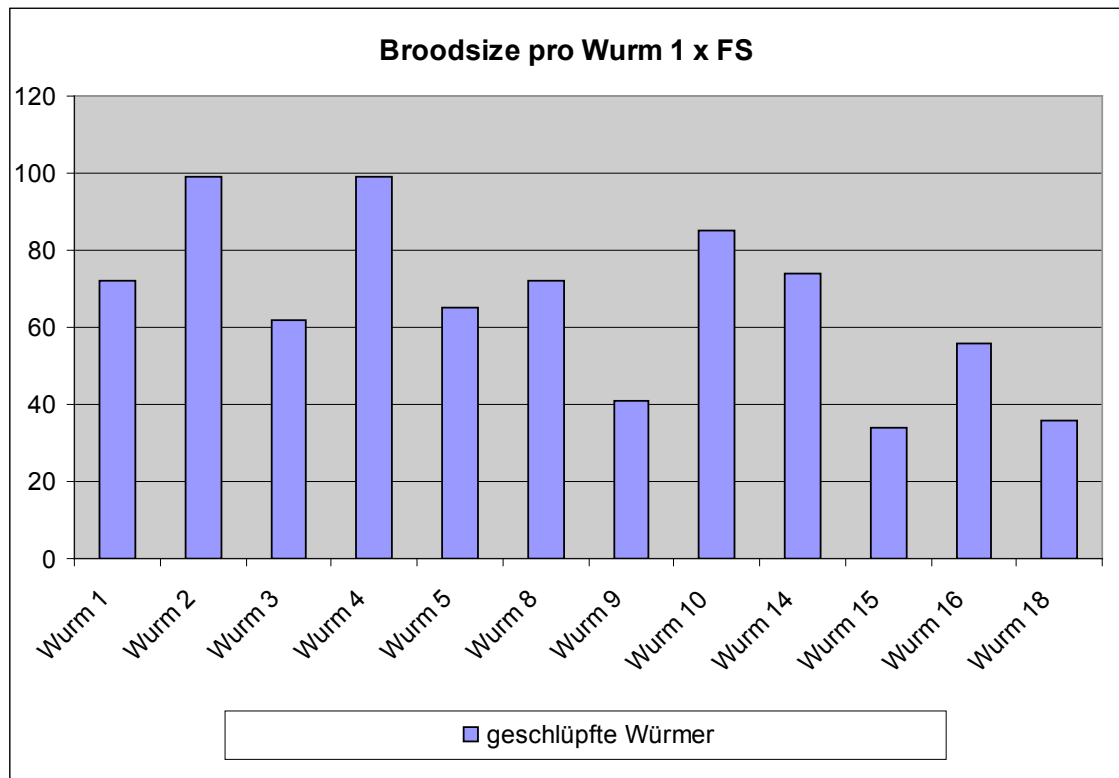


Abb. 15: Broodsize pro Wurm bei 1 x FS.

Es wurde der Broodsize von *C. elegans* N2 in CeHRFD-Medium plus Milch bei dem Folsäureangebot von 1 x FS ermittelt (entspricht der Folsäurekonzentration des CeHR-Mediums (HAMZA)). Pro Versuch wurden 6 Würmer untersucht und jeder Versuch 3 Mal wiederholt. Da einige Würmer frühzeitig verstorben sind, wurden nicht alle 18, sondern nur 12 Würmer in die Auswertung miteinbezogen. Sämtliche Untersuchungen wurden bei 20 °C durchgeführt.

Die meisten geschlüpften Würmer (jeweils 99) konnten bei Wurm 2 und 4 gezählt werden. Nur 34 kleine Würmer wurden bei Wurm 15 beobachtet, der somit die kleinste Nachkommenschaft produziert hat.

Es sind große Schwankungen im Broodsize der verschiedenen Würmer zu erkennen.

Dies kann mehrere Ursachen haben:

- Während der Eierlegperiode müssen die Würmer täglich in ein neues Well überführt werden. Dies geschieht durch Aufsaugen der Würmer mit der Pipette welches allerdings etwas Übung erfordert.
Durch fehlende Routine kann es vor allem in der Anfangsphase zu einer Verletzung der Würmer und somit zum Tod der Würmer kommen, welches den Broodsize-Versuch frühzeitig beendet.
- Der Wurm kann in der Pipettenspitze hängen bleiben und somit beim Mediumwechsel verloren gehen.

6.2.2. Versuch mit 1/1000 Folsäure

Abb. 17 zeigt die durchschnittliche Anzahl der geschlüpften Würmer pro Tag bei 1/1000 FS aller untersuchten Würmer.

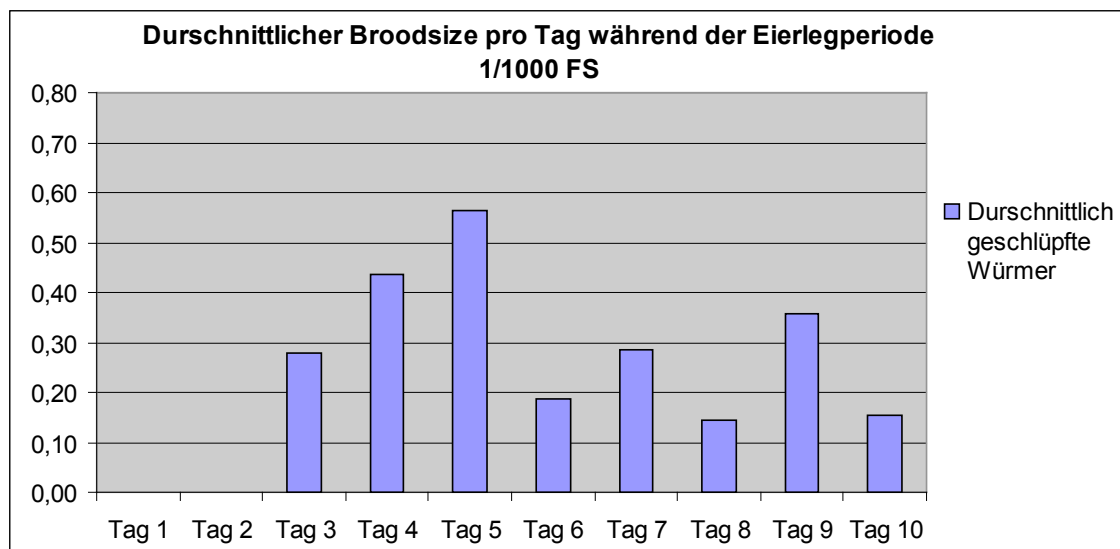


Abb. 16: durchschnittlicher Broodsize von *C. elegans* N2 pro Tag während der Eierlegperiode bei 1/1000 FS. Es wurde der Broodsize in CeHRFD-Medium plus Milch bei dem Folsäureangebot von 1/1000 FS ermittelt (entspricht der vielfachen Folsäurekonzentration des CeHR-Mediums (HAMZA)). Pro Versuch wurden 6 Würmer untersucht und jeder Versuch 3 Mal wiederholt. Da einige Würmer frühzeitig verstorben sind, wurden nicht alle 18, sondern nur 16 Würmer in die Auswertung miteinbezogen. Sämtliche Untersuchungen wurden bei 20 °C durchgeführt.

Bei 1/1000 FS kam es nicht bei allen Würmern zu einer Eiablage. 5 von 18 Würmern zeigten gar keine Reproduktivität, bei 3 konnten nur Eier aber keine geschlüpften Würmer beobachtet werden.

Da Wurm 1 (an Tag 3) und Wurm 13 (an Tag 5) nach dem Mediumwechsel nicht mehr am Leben waren und somit frühzeitig verstorben sind, wurden sie in die Auswertungen nicht miteinbezogen.

Bei den Eierlegenden Würmern reichte die Dauer der Eiablage von 3 (Wurm 2) bis maximal 10 Tage (Wurm 3 und 4), wobei die meisten geschlüpften Würmer (9) an Tag 5 gezählt wurden.

Insgesamt konnten bei den 16 Würmern innerhalb der 10 Tage nur 37 geschlüpfte Würmer beobachtet werden. Dies entspricht einer durchschnittlich produzierten Nachkommenschaft von 2 ± 4 Würmern pro Wurm.

Besonders auffallend war, dass nach einigen Tagen bei den meisten Würmern eine prolabierte Vulva beobachtet werden konnte.

Abb. 16 zeigt einen Vergleich zwischen der Vulva beim Wild-Typ und einer prolabierten Vulva.



Abb. 17: prolabierte Vulva, modifiziert nach: LONGMAN et al., 2000, Vulva beim Wild-Typ, modifiziert nach THOMPSON et al, 2006

Tabelle 4 zeigt die gesamte Anzahl der geschlüpften Würmer pro Tag während der Eierlegperiode.

Tag	geschlüpfte Würmer
1	0
2	0
3	5
4	7
5	9
6	3
7	4
8	2
9	5
10	2
Gesamt:	37

Tab. 4: Broodsize gesamt pro Tag während der Eierlegperiode bei 1/1000 FS.

Es wurde der Broodsize von *C. elegans* N2 in CeHRFD-Medium plus Milch bei dem Folsäureangebot von 1/1000 FS ermittelt (entspricht der vielfachen Folsäurekonzentration des CeHR-Mediums (HAMZA)). Pro Versuch wurden 6 Würmer untersucht und jeder Versuch 3 Mal wiederholt. Da einige Würmer frühzeitig verstorben sind, wurden nicht alle 18, sondern nur 16 Würmer in die Auswertung miteinbezogen. Sämtliche Untersuchungen wurden bei 20 °C durchgeführt.

Abb. 18 zeigt die Anzahl der geschlüpften Würmer pro Wurm bei 1/1000 FS.

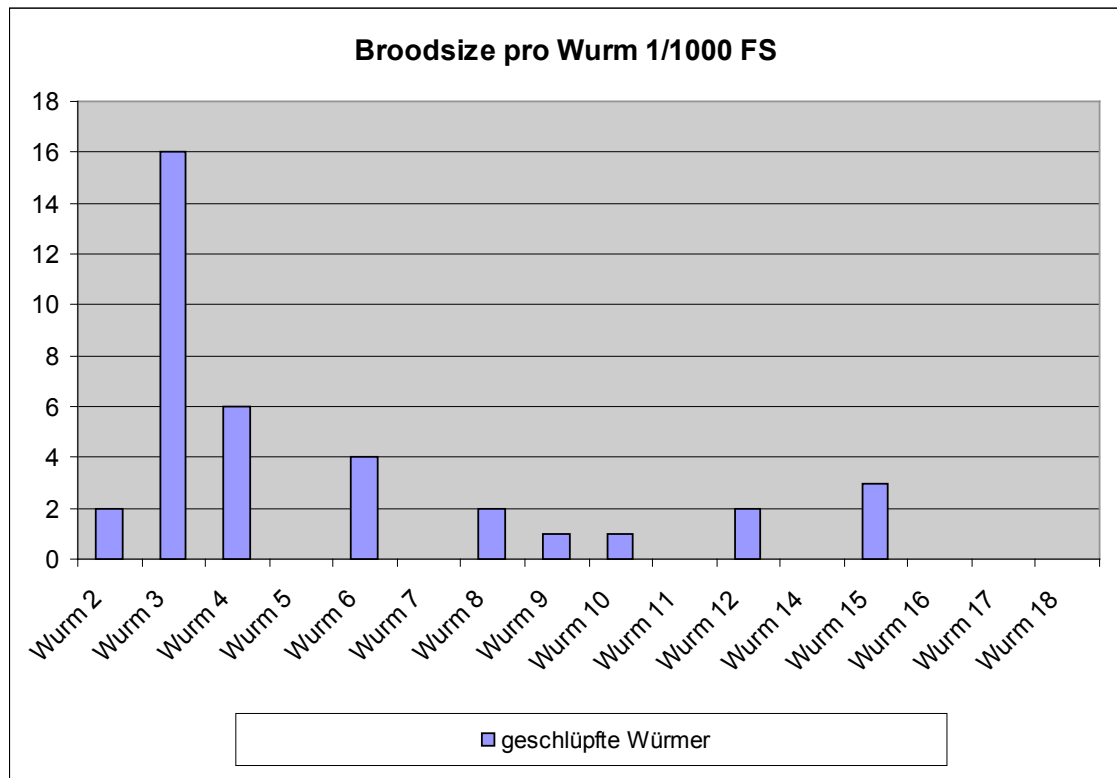


Abb. 18: Broodsize pro Wurm bei 1/1000 FS.

Es wurde der Broodsize von *C. elegans* N2 in CeHRFD-Medium plus Milch bei dem Folsäureangebot von 1/1000 FS ermittelt (entspricht der vielfachen Folsäurekonzentration des CeHR-Mediums (HAMZA)). Pro Versuch wurden 6 Würmer untersucht und jeder Versuch 3 Mal wiederholt. Da einige Würmer frühzeitig verstorben sind, wurden nicht alle 18, sondern nur 16 Würmer in die Auswertung miteinbezogen. Sämtliche Untersuchungen wurden bei 20 °C durchgeführt.

Die meisten geschlüpften Würmer (16) wurden bei Wurm 3 gezählt. Nur 1 Wurm konnte bei den Würmern 9 und 10 beobachtet werden. Bei den Würmern 5, 7, 11, 14, 16, 17 und 18 wurde kein einziger Wurm gezählt, sie produzierten somit keine Nachkommenschaft.

Auch hier sind große Schwankungen im Broodsize der verschiedenen Würmer zu erkennen.

Dies ist allerdings nicht auf die fehlende Übung der Umsetztechnik zurückzuführen (bei 1/1000 gingen viel weniger Würmer während des

Mediumwechsels verloren oder wurden verletzt), sondern ist das Resultat der geringen Folsäurekonzentration, die die Reproduktivität der Würmer vermindert.

6.2.3. Vergleich der Broodsize-Versuche

Tab. 8 zeigt einen Vergleich der Ergebnisse der durchgeführten Broodsize-Versuche mit 1 x FS sowie mit 1/1000.

	1 x FS	1/1000 FS
Dauer der Eiablage	5 – 8 Tage	1 – 8 Tage
Beginn der Eiablage	Tag 1	Tag 3
Ende der Eiablage	Tag 8	Tag 10
Gesamte Nachkommenschaft der untersuchten Würmer	795	37
Durchschnittliche Nachkommenschaft pro Wurm	66 +/- 22	2 +/- 4

Tab. 5: Vergleich der Broodsize-Versuche von 1 x FS und 1/1000 FS.

. Es wurde der Broodsize von *C. elegans* N2 in CeHRFD-Medium plus Milch bei dem Folsäureangebot von 1 x FS sowie 1/1000 FS ermittelt (entspricht der vielfachen Folsäurekonzentration des CeHR-Mediums (HAMZA)). Pro Folsäurekonzentration wurden 6 Würmer untersucht und jeder Versuch 3 Mal wiederholt. Da einige Würmer frühzeitig verstorben sind, wurden nicht alle 36 Würmer in die Auswertung miteinbezogen (12 Würmer bei 1 x FS und 16 Würmer bei 1/1000 FS). Sämtliche Untersuchungen wurden bei 20 °C durchgeführt.

Die Ergebnisse werden in Abb. 19 noch einmal graphisch veranschaulicht.

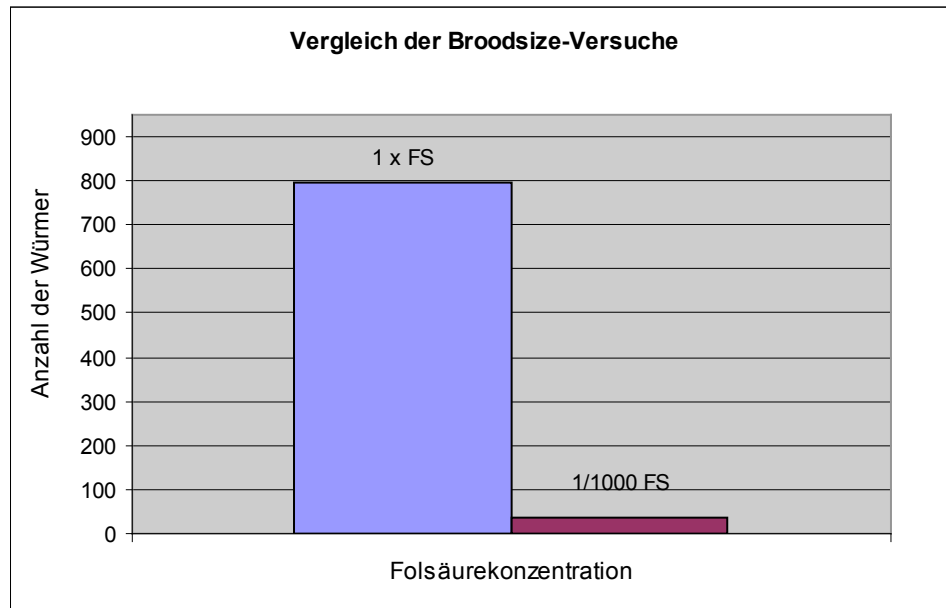


Abb. 19: Vergleich der Broodsize-Versuche von *C. elegans* N2 bei 1 x FS und 1/1000 FS. Es wird die gesamte Anzahl der geschlüpften Würmer je Folsäurekonzentration angegeben. Der Broodsize wurde in CeHRFD-Medium plus Milch bei dem Folsäureangebot von 1 x FS sowie 1/1000 FS ermittelt (entspricht der vielfachen Folsäurekonzentration des CeHR-Mediums (HAMZA)). Pro Folsäurekonzentration wurden 6 Würmer untersucht und jeder Versuch 3 Mal wiederholt. Da einige Würmer frühzeitig verstorben sind, wurden nicht alle 36 Würmer in die Auswertung miteinbezogen (12 Würmer bei 1 x FS und 16 Würmer bei 1/1000 FS). Sämtliche Untersuchungen wurden bei 20 °C durchgeführt.

Es ist deutlich zu erkennen, dass *C. elegans* bei der Folsäurekonzentration 1/1000 erheblich weniger Eier legt im Vergleich zu 1 x FS.

Für manche Würmer ist diese Menge an Folsäure für eine Reproduktion bereits nicht mehr ausreichend.

Die aufgenommene Folsäuremenge ist offenbar zu gering, welches zu einer Sterilität der Würmer führt.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass für eine bessere Aussage über den Broodsize von *C. elegans* im Flüssigmedium in jedem Fall weitere Untersuchungen mit einer höheren Stückzahl durchzuführen sind.

Zum einen aufgrund der geringen Anzahl an untersuchten Würmern, zum anderen wegen der oben beschriebenen Schwankungen, die durch ausreichendes Üben der Umsetztechnik der Würmer in weiteren Untersuchungen vermieden werden sollten.

Da es sich um einen Vorversuche handelt, wurde nur eine geringe Anzahl an Würmern eingesetzt.

Pro Versuch wurden 6 Würmer untersucht und jeder Versuch 3 Mal wiederholt. Um statistisch eindeutige Aussagen zu liefern ist eine Untersuchung von mind. 36 Würmern und 2 Wiederholungen notwendig. Dies soll in folgenden Untersuchungen durchgeführt werden.

Aus den ersten durchgeführten Populationswachstumsversuchen war ersichtlich, dass die Reproduktivität von *C. elegans* bei 1/1000 FS bereits stark eingeschränkt ist.

Um die genaue Minimale-Folsäurekonzentration zu ermitteln, die *C. elegans* für die Reproduktivität benötigt, wurde zuerst der Broodsize in Medium mit 1 x FS (als Kontrolle) und später mit 1/1000 FS untersucht.

Um die Mindest-Folsäurekonzentration zu ermitteln, bei der noch alle Würmer eine Reproduktion zeigen, sind ebenfalls weitere Untersuchungen notwendig.

Dabei ist allerdings Folgendes zu berücksichtigen:

Wird eine größere Anzahl an Würmern untersucht, nimmt die Ermittlung des Broodsize sehr viel Zeit in Anspruch, sodass diese nur mit einer guten Zeit- und Arbeitseinteilung möglich ist. Vielleicht sollte für aussagekräftigere Untersuchungen des Broodsize von *C. elegans* im Flüssigmedium eventuell eine andere Methode etabliert werden.

6.3. Lifespan-Versuch

Die Würmer, bei denen die Nachkommenschaft ermittelt wurde, wurden gleichzeitig auf ihre Lebenserwartung getestet.

Insgesamt wurde also der Lifespan von 36 Würmern überprüft.

Für einen Lifespan-Versuch wurden ebenfalls 6 Würmer verwendet und jeder Versuch 3 Mal wiederholt sowie die 2 Konzentrationen 1 x FS und 1/1000 FS untersucht.

Alle Untersuchungen wurden bei 20 °C durchgeführt.

Nach der Eierlegperiode wurden die Würmer solange einzeln in Wells gehalten, bis sie gestorben sind.

Mit Hilfe des Statistikprogrammes GraphPad Prism 5 wurden die protokollierten Daten anschließend ausgewertet.

Die Würmer, die frühzeitig verstorben bzw. beim Mediumwechsel verloren gegangen sind wurden nicht berücksichtigt.

In der Literatur findet man unterschiedliche Angaben zur Lebenserwartung von *C. elegans*.

Diese wird teils in Wochen, teils in Tagen angegeben und unterscheidet sich v.a. in den Temperaturbereichen, bei denen die Lebenserwartung überprüft wurde. Dies ist insbesondere deswegen von Bedeutung, da der Lifespan von *C. elegans* temperaturabhängig ist [SZEWCYK et al., 2006]. Bei niedrigen Temperaturen ist dieser erhöht [GERSHON, GERSHON, 2002].

Tabelle 5 zeigt eine Auflistung der verschiedenen Angaben in der Literatur.

Quelle	NGM-Platten	Flüssigmedium (axenisch)	Halbflüssiges Medium (monoxenisch)	Temperatur
STRANGE, 2006	2 – 3 Wochen			
HAMZA, Unit 1.9		18 Tage		20 °C
GERSHON, GERSHON, 2002	25 – 30 Tage			
	20 Tage			20 °C
	11 – 14 Tage			25 °C
		38 Tage		22 – 23 °C
		30 Tage		25 °C
MUSCHIOLE et al., 2009			16,7 Tage	20 °C

Tab. 6: Auflistung der Angaben zum Lifespan von *C. elegans* in der Literatur

Um Vergleiche mit den in dieser Arbeit durchgeführten Versuchen zu machen, sind insbesondere 2 Angaben aus der Literatur von Interesse.

HAMZA gibt eine Lebenserwartung von rund 18 Tagen bei 20 °C im Flüssigmedium an.

Bei Gershon et al. beträgt diese auf NGM Platten 38 Tage bei 22 – 23 °C sowie 30 Tage bei 25 °C.

6.3.1. Versuch mit 1 x Folsäure

Mit einer durchschnittlichen Überlebensdauer von 17,3 Tagen bei 20 °C liegt das Ergebnis des durchgeführten Lifespan-Versuches mit 1 x FS im Bereich der in der Literatur angegebenen Werte.

Abb. 20 zeigt den Lifespan der 12 Würmer, die in Medium mit 1 x FS gezüchtet wurden.

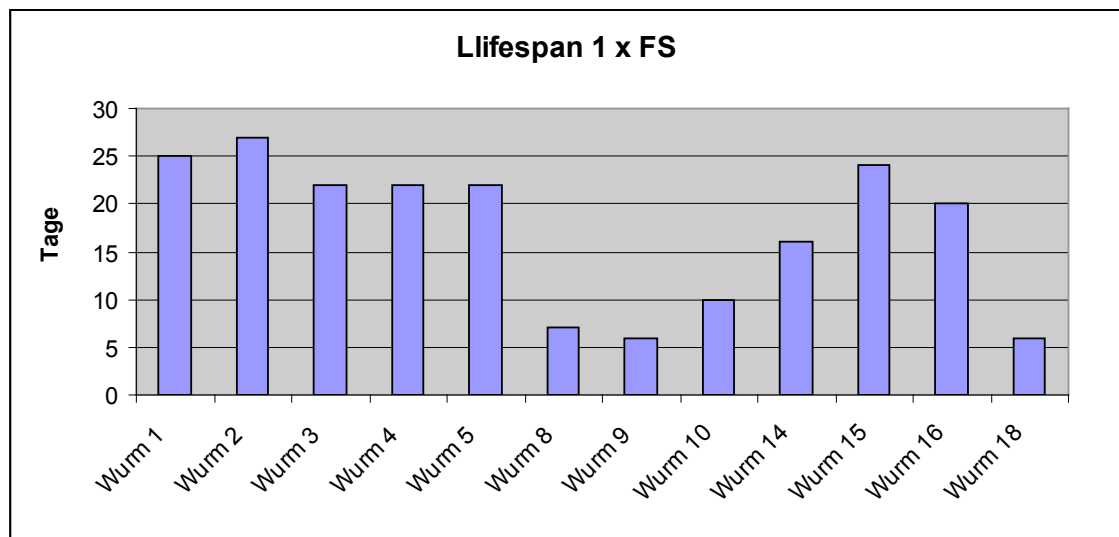


Abb. 20: Lifespan von *C. elegans* N2 bei 1 x FS.

Es wurde der Lifespan von *C. elegans* N2 in CeHRFD-Medium plus Milch bei dem Folsäureangebot von 1 x FS ermittelt (entspricht der Folsäurekonzentration des CeHR-Mediums (HAMZA)). Pro Versuch wurden 6 Würmer untersucht und jeder Versuch 3 Mal wiederholt.

Nach der Eierlegperiode wurden die Würmer solange einzeln in Wells gehalten, bis sie gestorben sind. Da einige Würmer frühzeitig verstarben, wurden nicht alle 18, sondern nur 12 Würmer in die Auswertung miteinbezogen. Sämtliche Untersuchungen wurden bei 20 °C durchgeführt.

Die ersten beiden Würmer (Wurm 6 und 12) verstarben an Tag 2 bzw. gingen beim Mediumwechsel (Wurm 12) verloren.

Die Würmer 7 und 13 (Tag 3) sowie 11 und 17 (Tag 4) verstarben schon sehr bald, weshalb sie in die Auswertungen nicht mit einbezogen wurden.

Die maximale Lebensdauer hatte Wurm 2 mit 27 Tagen.

Abb. 21 zeigt die Kaplan-Meier-Überlebenskurve mit der Lebenswahrscheinlichkeit der Würmer des Lifespanversuches mit 1 x FS (Mean Lifespan: 17,3 Tage).

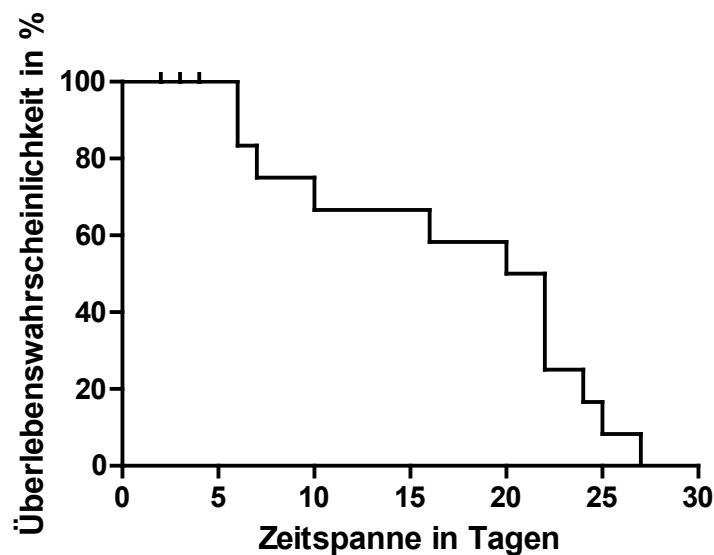


Abb. 21: Kaplan-Meier-Überlebenskurve von *C. elegans* bei 1 x FS.

Es wurde der Lifespan von *C. elegans* N2 in CeHRFD-Medium plus Milch bei dem Folsäureangebot von 1 x FS ermittelt (entspricht der Folsäurekonzentration des CeHR-Mediums (HAMZA)). Pro Versuch wurden 6 Würmer untersucht und jeder Versuch 3 Mal wiederholt.

Nach der Eierlegperiode wurden die Würmer solange einzeln in Wells gehalten, bis sie gestorben sind. Da einige Würmer frühzeitig verstorben sind, wurden nicht alle 18, sondern nur 12 Würmer in die Auswertung miteinbezogen. Der Mean-Lifespan wurde mit Hilfe des Statistikprogrammes GraphPad Prism 5 ermittelt. Sämtliche Untersuchungen wurden bei 20 °C durchgeführt.

Für die großen Schwankungen im Lifespan gelten die gleichen Ursachen, die bereits beim Broodsize von 1 x FS in 6.2.1. erwähnt wurden.

Darüber hinaus ist beim Lifespan noch ein weiterer Aspekt zu beachten.

- Mit zunehmendem Alter der Würmer verringert sich sowohl die Motorik als auch die Stressresistenz.

Ein Mediumwechsel stellt einen besonders hohen Stressfaktor für sie dar. Daher kommt es mit zunehmender Dauer der Broodsize-Versuche immer öfter dazu, dass die Würmer einen Mediumwechsel nicht überleben.

Darüber hinaus kann die verringerte Beweglichkeit der Würmer, die das Aufsaugen mit der Pipette erschwert, dafür verantwortlich sein. Manchmal werden mehrere Anläufe benötigt, die zu einer Verletzung des Wurms führen können, der daraufhin tot oder verknotet im Well aufgefunden werden kann.

6.3.2. Versuch mit 1/1000 Folsäure

Die durchschnittliche Überlebensdauer betrug 20,3 Tage bei 20 °C. Da in der Literatur keine Angaben zum Lifespan bei Folsäuremangel zu finden sind, können die Ergebnisse nicht mit der Literatur verglichen werden.

Abb. 22 zeigt den Lifespan der 16 Würmer, die in Medium mit 1/1000 FS gezüchtet wurden.

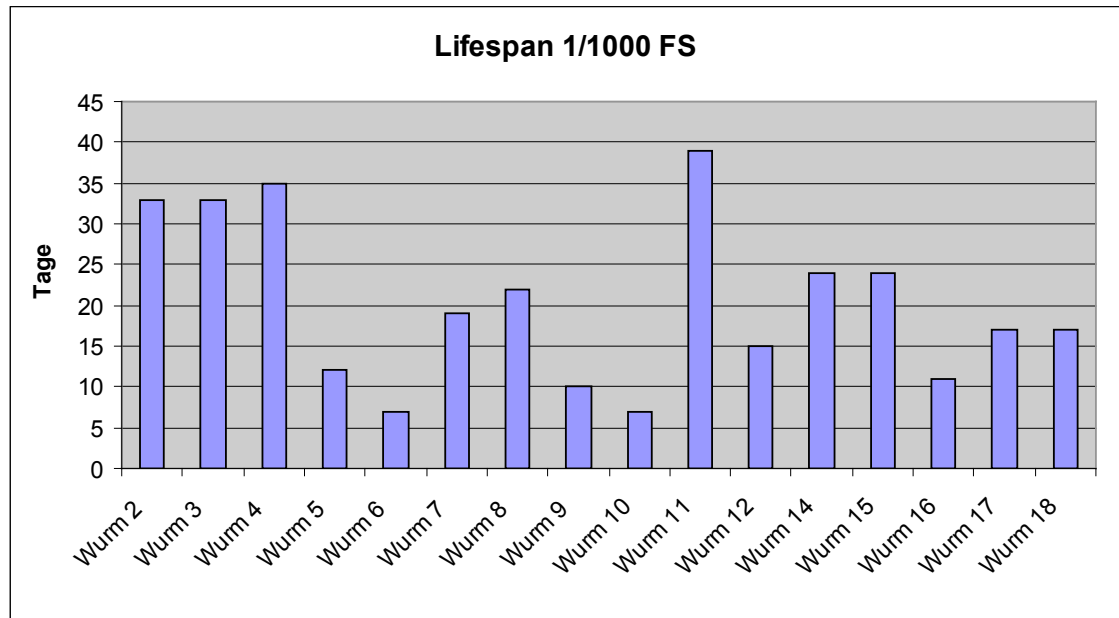


Abb. 22: Lifespan von *C. elegans* bei 1/1000 FS.

Es wurde der Lifespan von *C. elegans* N2 in CeHRFD-Medium plus Milch bei dem Folsäureangebot von 1/1000 FS ermittelt (entspricht der vielfachen Folsäurekonzentration des CeHR-Mediums (HAMZA)). Pro Versuch wurden 6 Würmer untersucht und jeder Versuch 3 Mal wiederholt. Nach der Eierlegperiode wurden die Würmer solange einzeln in Wells gehalten, bis sie gestorben sind. Da einige Würmer frühzeitig verstorben sind, wurden nicht alle 18, sondern nur 16 Würmer in die Auswertung miteinbezogen. Sämtliche Untersuchungen wurden bei 20 °C durchgeführt.

Die kürzeste Lebensdauer hatten Wurm 1 (3 Tage) und Wurm 13 (5 Tage), wobei diese nach dem Mediumwechsel an Tag 3 bzw. 5 nicht mehr am Leben waren und deshalb nicht in die Auswertungen mit einbezogen wurden.

Die längste Lebensdauer hatte Wurm 11 mit 39 Tagen.

Abb. 23 zeigt die Kaplan-Meier-Überlebenskurve mit der Lebenswahrscheinlichkeit der Würmer des Lifespanversuches mit 1/1000 FS (Mean Lifespan: 20,3 Tage).

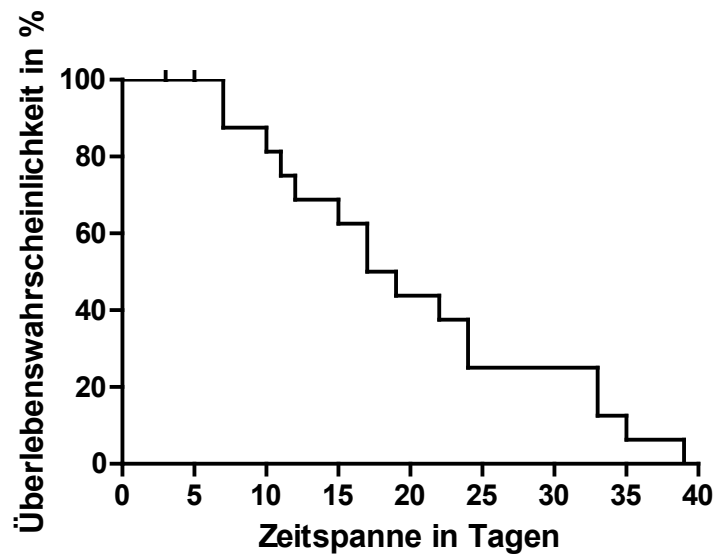


Abb. 23: Kaplan-Meier-Überlebenskurve von *C. elegans* bei 1/1000 FS.

Es wurde der Lifespan von *C. elegans* N2 in CeHRFD-Medium plus Milch bei dem Folsäureangebot von 1/1000 FS ermittelt (entspricht der vielfachen Folsäurekonzentration des CeHR-Mediums (HAMZA)). Pro Versuch wurden 6 Würmer untersucht und jeder Versuch 3 Mal wiederholt. Nach der Eierlegperiode wurden die Würmer solange einzeln in Wells gehalten, bis sie gestorben sind. Da einige Würmer frühzeitig verstorben sind, wurden nicht alle 18, sondern nur 16 Würmer in die Auswertung miteinbezogen. Der Mean-Lifespan wurde mit Hilfe des Statistikprogrammes GraphPad Prism 5 ermittelt. Sämtliche Untersuchungen wurden bei 20 °C durchgeführt.

Neben den beim Lifespan-Versuch mit 1 x FS erwähnten Ursachen für einen frühzeitigen Tod der Würmer und daraus resultierenden Schwankungen im Lifespan gibt es bei diesem Versuch eine weitere:

- Bei den Versuchen mit 1/1000 FS konnte nach einigen Tagen fast immer eine prolabierte Vulva beobachtet werden. Dies kann einen frühzeitigen Tod der Würmer zur Folge haben.

6.3.3. Vergleich der Lifespan-Versuche

Abb. 24 zeigt den Vergleich der Kaplan-Meier-Überlebenskurven der beiden Lifespanversuche mit unterschiedlichen Folsäurekonzentrationen.

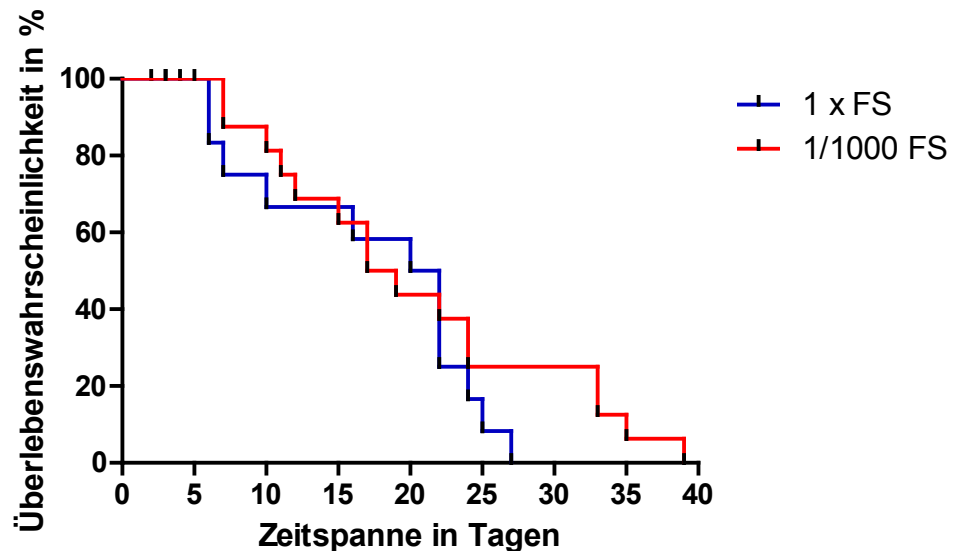


Abb. 24: Kaplan-Meier-Überlebenskurve von *C. elegans* bei 1 x FS und 1/1000 FS.

Es wurde der Lifespan von *C. elegans* N2 in CeHRFD-Medium plus Milch bei dem Folsäureangebot von 1 x FS sowie 1/1000 FS ermittelt (entspricht der vielfachen Folsäurekonzentration des CeHR-Mediums (HAMZA)). Pro Folsäurekonzentration wurden 6 Würmer untersucht und jeder Versuch 3 Mal wiederholt. Nach der Eierlegperiode wurden die Würmer solange einzeln in Wells gehalten, bis sie gestorben sind. Da einige Würmer frühzeitig verstorben sind, wurden nicht alle 36 Würmer in die Auswertung miteinbezogen (12 Würmer bei 1 x FS und 16 Würmer bei 1/1000 FS). Der Mean-Lifespan wurde mit Hilfe des Statistikprogrammes GraphPad Prism 5 ermittelt. Sämtliche Untersuchungen wurden bei 20 °C durchgeführt.

Es ist deutlich zu erkennen, dass der Lifespan der Würmer, die in Medium mit 1/1000 FS gehalten wurden, erheblich länger ist im Vergleich zu den Würmern in 1 x FS.

Dies wird in Abb. 21 noch einmal graphisch veranschaulicht.

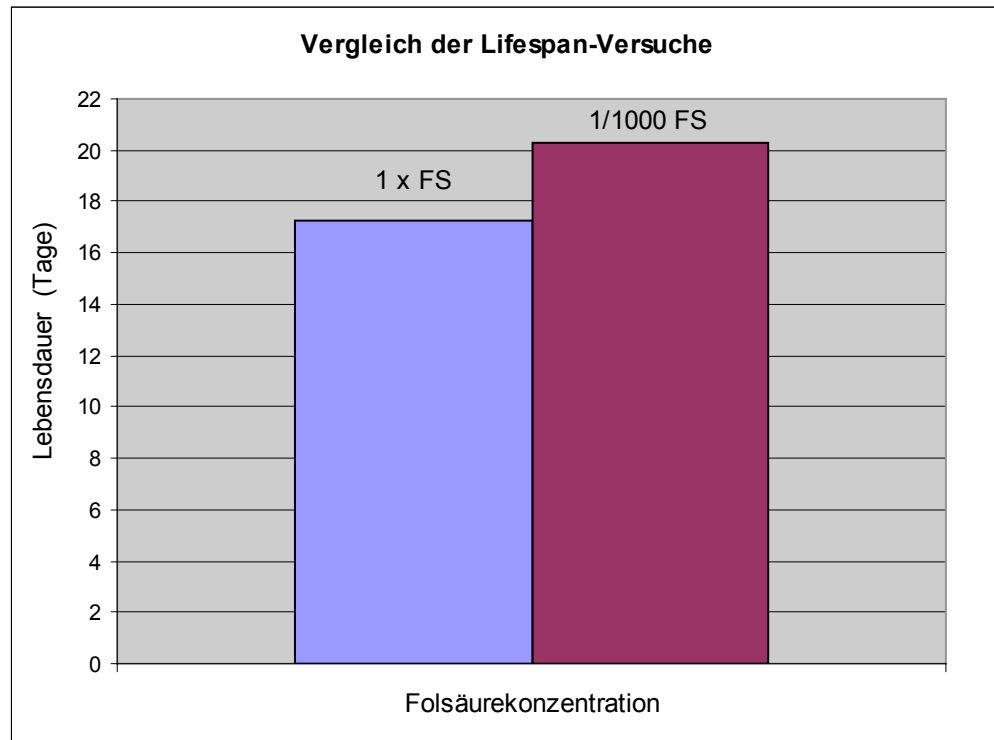


Abb. 25: Vergleich der Lifespanversuche (Mean Lifespan) von *C. elegans* bei 1 x FS und 1/1000 FS.

Es wurde der Lifespan von *C. elegans* N2 in CeHRFD-Medium plus Milch bei dem Folsäureangebot von 1 x FS sowie 1/1000 FS ermittelt (entspricht der vielfachen Folsäurekonzentration des CeHR-Mediums (HAMZA)). Pro Folsäurekonzentration wurden 6 Würmer untersucht und jeder Versuch 3 Mal wiederholt. Nach der Eierlegperiode wurden die Würmer solange einzeln in Wells gehalten, bis sie gestorben sind. Da einige Würmer frühzeitig verstorben sind, wurden nicht alle 36 Würmer in die Auswertung miteinbezogen (12 Würmer bei 1 x FS und 16 Würmer bei 1/1000 FS). Der Mean-Lifespan wurde mit Hilfe des Statistikprogrammes GraphPad Prism 5 ermittelt. Sämtliche Untersuchungen wurden bei 20 °C durchgeführt.

Die unterschiedliche Lifespandauer kann mehrere Ursachen haben:

- Die beiden Versuche wurden nicht gleichzeitig durchgeführt. Begonnen wurde mit der Untersuchung von Würmern in Medium mit 1 x FS. Erst nach Abschluss dieses Versuches wurden die Untersuchungen mit 1/1000 FS durchgeführt.

Es könnte sein, dass man daher beim zweiten Versuch schon mehr Übung in der Technik des Mediumwechsels hatte und dabei nicht so viele Würmer verletzt wurden oder verloren gingen.

- In zahlreichen Studien wurde bestätigt, dass eine Nahrungsrestriktion bei *C. elegans* zu einer Verlängerung des Lifespan führt.

Die zur Verfügung gestellte Folsäuremenge könnte für *C. elegans* einen solchen Nahrungsmangel darstellen auf den der Wurm mit einer verlängerten Lebensdauer reagiert.

Um genauere Aussagen über den Lifespan von *C. elegans* im Flüssigmedium zu machen sind weitere Untersuchungen mit einer höheren Stückzahl notwendig.

Die oben beschriebenen Schwankungen im Lifespan sollten dabei durch ausreichendes Üben der Umsetztechnik verringert bzw. vermieden werden und dadurch eine sichere Aussagekraft der Versuchsergebnisse ermöglichen.

Im Gegensatz zum Broodsize ist die Ermittlung des Lifespan einer größeren Anzahl an Würmern leicht durchführbar.

Hierfür müssen die Würmer lediglich jeden Tag, nach Ende der Eierlegperiode sogar nur mehr jeden dritten Tag, umgesetzt werden ohne davor die geschlüpften Würmer unter dem Mikroskop zu zählen.

Der Lifespan sollte daher in weiteren Untersuchungen immer getrennt vom Broodsize untersucht werden.

7. Schlussbetrachtung

Ziel dieser Arbeit war einerseits die Identifizierung der minimal erforderlichen Folsäurekonzentration, die *C. elegans* für die Fortpflanzung benötigt. Andererseits die Etablierung einer Technik zur Bestimmung des Broodsize und Lifespan von *C. elegans* im Flüssigmedium.

Das Erlernen einiger Basistechniken und grundlegenden Handhabungen in seiner Aufzucht wie z.B. Mediumwechsel oder Bleachen war für die Durchführung der Versuche ebenso unerlässlich wie das Üben der Umsetztechnik für die Broodsize- und Lifespan-Versuche.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche zeigen sehr deutlich, dass bei einem Mangel an Folsäure die Reproduktion von *C. elegans* vermindert ist.

Eine genaue Mindestkonzentration an Folsäure, die für die Fortpflanzung benötigt wird, konnte nicht ermittelt werden.

Die Ergebnisse zeigen allerdings sehr wohl eine Tendenz und es konnte festgestellt werden, dass die Mindest-Folsäurekonzentration für die Fortpflanzung im Bereich von 1/1000 FS und 1/2000 FS liegen muss.

Um eine genauere Aussage zu machen sind jedoch weitere Untersuchungen mit einer höheren Stückzahl notwendig.

Mit einem durchschnittlichen Broodsize von 66 +/- 22 Würmern pro Wurm beim Versuch mit 1 x FS liegt der ermittelte Wert in dem in der Literatur angegebenen Bereich für den Broodsize von *C. elegans* im Flüssigmedium.

Der ermittelte durchschnittliche Lifespan von 17,3 Tagen bei 1 x FS liegt im Bereich der in der Literatur angegebenen Werte.

Darüber hinaus traten große Schwankungen im Lifespan bei den untersuchten Würmern auf.

Dies kann dadurch erklärt werden, dass es sich bei diesen Versuchen um „Vorversuche“ handelte, bei denen eine Technik für die Ermittlung des Broodsize und Lifespan etabliert wurde.

Daher wurde für die Versuche auch nur eine geringe Stückzahl an Würmern verwendet.

Es zeigte sich, dass die etablierte Technik durchaus gut geeignet und durchführbar ist, sie allerdings etwas Übung benötigt.

Auch bei den durchgeführten Broodsize- und Lifespan-Versuchen zeigen die Ergebnisse eine Tendenz, aus den oben genannten Gründen (geringe Stückzahl; fehlende Übung, die zu Schwankungen der Ergebnisse führen kann), sind jedoch ebenfalls weitere Untersuchungen mit einer höheren Stückzahl notwendig um eine genauere Aussage zu treffen.

Für den Broodsize und Lifespan mit 1/1000 FS gibt es in der Literatur keine genauen Angaben, die man für direkte Vergleiche mit den Ergebnissen aus dieser Arbeit heranziehen kann.

Allerdings können die Ergebnisse dieser Arbeit durchaus Untersuchungen in anderen Studien bestätigen.

Lu et al. zeigten, dass *C. elegans* bei einem Mangel an Folsäure keine Eier mehr legt.

Der ermittelte durchschnittliche Broodsize von 2 +/- 4 Würmern pro Wurm bestätigt diese Tatsache.

Des Weiteren konnten Austin et al. aufzeigen, dass ein Ausschalten von *fol-1* zu einer signifikanten Hemmung der Folataufnahme führt, welches eine Sterilität der Würmer zur Folge hat.

Der Broodsize-Versuch mit 1/1000 FS zeigte, dass manche Würmer bei dieser Folsäurekonzentration keine Eier legen.

Die aufgenommene Folsäuremenge war für diese Würmer offenbar zu gering, welches zu einer Sterilität führte und die Ergebnisse von Austin et al. bestätigt.

Um genauere Aussagen über die erforderliche Mindest-Folsäurekonzentration zu machen, sollten wie bereits erwähnt, weitere Versuche durchgeführt werden, bei denen allerdings eine größere Zahl an Würmer untersucht wird.

8. Zusammenfassung

Folsäure und ihre Derivate sind an einer Vielzahl von Stoffwechselprozessen beteiligt. Da sie für den Menschen essentiell sind, müssen sie mit der Nahrung aufgenommen werden.

Neben der DNA-Synthese spielen Folat-Coenzyme bei vielen Methylierungsreaktionen eine wichtige Rolle. Insbesondere für die Remethylierung von Homocystein zu Methionin sind sie von großer Bedeutung. Ein länger andauernder Mangel hat eine generelle Störung des Zellstoffwechsels zur Folge, der neben der Nucleinsynthese auch den Phospholipid- und Aminosäurestoffwechsel beeinträchtigt.

Darüber hinaus ist bekannt, dass eine ausreichende Folsäurezufuhr besonders in der Schwangerschaft von großer Bedeutung ist. Ein Mangel wird mit zahlreichen Komplikationen, v. a. aber mit Neuralrohrdefekten, in Verbindung gebracht.

Der Nematode *C. elegans* wurde bereits 1900 entdeckt und seither als Modellorganismus verwendet. Er besitzt eine Vielzahl an homologen Genen des Menschen und findet v. a. in genetischen Untersuchungen Anwendung.

Der Folsäurestoffwechsel von *C. elegans* ist dem des Menschen sehr ähnlich. So benötigt der Wurm ebenfalls Folsäure für die Regeneration von Homocystein und die embryonale Entwicklung scheint gleichfalls stark von der Folsäurebereitstellung beeinträchtigt zu werden.

Im praktischen Teil dieser Arbeit wurden verschiedene Untersuchungen von *C. elegans* im Flüssigmedium durchgeführt und das Populationswachstum in Abhängigkeit von der Folsäurekonzentration sowie der Broodsize und Lifespan ermittelt.

Die Ergebnisse wurden, wenn vorhanden, mit jenen aus der Literatur verglichen und bei Abweichungen auf mögliche Ursachen hingewiesen sowie Verbesserungsmöglichkeiten aufgezeigt.

9. Abstract

Folic acid and its derivatives are involved in a variety of metabolic processes. Since they are essential for humans, they have to be obtained from exogenous sources.

In addition to the DNA synthesis, folate coenzymes play an important role in many methylation reactions. Especially for the remethylation of homocysteine to methionine, they are of great importance.

A prolonged deficiency results in a general disturbance of the cellular metabolism, which affects not only the synthesis of nucleins but also the phospholipid and amino acid metabolism.

It is also known that an adequate folic acid intake during pregnancy is of high importance. A deficiency is associated with numerous complications, especially with neural tube defects.

The nematode *C. elegans* has been discovered in 1900 and since then used as a model organism. It has a large number of homologous genes of humans and finds application particularly in genetic studies.

The folic acid metabolism of *C. elegans* is very similar to that of humans. The worm also needs folic acid for the regeneration of homocysteine and the embryonic development seems to be strongly affected by the folic acid supply as well.

In the practical part of this work, several studies of *C. elegans* in liquid medium were carried out and the population growth as a function of the folic acid concentration as well as the broodsize and life span were determined.

The results were, if present, compared with those from the literature and in case of deviations possible reasons were suggested as well as possibilities for improvement were pointed out.

10. Literaturverzeichnis

AFFLECK J. G., WALKER V. K.: A role for *Drosophila* in understanding drug-induced cytotoxicity and teratogenesis, Springer Science+Business Media B.V. 2008, Cytotechnology (2008) 57:1–9

AUSTIN M. U., LIAU W.-S., BALAMURUGAN K., ASHOKKUMAR B., SAID H. M., LAMUNYON C. W.: Knockout of the folate transporter *fol-1* causes germline and somatic defects in *C. elegans*, BMC Developmental Biology 2010, 10:46

BAILEY L. B., GREGORY J. F.: Folate Metabolism and Requirements, J. Nutr. 129: 779 – 782, 1999

BALAMURUGAN K., ASHOKKUMAR B., MOUSSAIF M., SZE J. Y., SAID H. M.: Cloning and functional characterization of a folate transporter from the nematode *Caenorhabditis elegans*, Am J Physiol Cell Physiol 293:670-681, 2007

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

BIESALSKI H. K., GRIMM P.: Taschenatlas der Ernährung, Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart, 2007

BLOM H. J., SMULDERS Y.: Overview of homocysteine and folate metabolism. With special references to cardiovascular disease and neural tube defects, J Inher Metab Dis, DOI 10.1007/s10545-010-9177-4, 2010

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

DGE, ÖGE, SGE, SVE: Referenzwerte für die Nährstoffzufuhr, Umschau/Braus, Frankfurt am Main, 1. Auflage, 2. korrigierter Nachdruck, 2001

FENECH M.: The role of folic acid and Vitamin B12 in genomic stability of human cells, Elsevier Science B. V., 2000

GOLDMAN D., QUI A.: Intestinal folate Transporter, United States Patent Application Publication, Pub No.: US 2008/0241947 A1, 2008

GEMS D., RIDDLE D. L.: Defining Wild-Type Life Span in *Caenorhabditis elegans*, Journal of Gerontology: *BIOLOGICAL SCIENCES*, Vol. 55A, No. 5. B215 – B219, 2000

HALL D. H., ALTUN Z. F.: Introduction to *C. elegans* Anatomy, in HALL D. H., ALTUN Z. F., *C. elegans* Atlas, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2008

HAMZA I.: Maintenance of *C. elegans* in axenic growth cultures and generation of large numbers for biochemical studies, Department of Animal & Avian Sciences 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, Stand 8.12.2010

HAMZA I., NASS R.: The Nematode *C. elegans* as an Animal Model to Explore Toxicology In Vivo: Solid and Axenic Growth Culture Conditions and Compound Exposure Parameters, Current Protocols in Toxicology (2007) 1.9.1-1.9.18, John Wiley & Sons, Inc., 2007

HOPE I. A.: Background on *C. elegans*, in HOPE I. A., *C. elegans* - A Practical Approach, Oxford University Press, New York, 1999

KAPUT J., RODRIGUEZ R. L.: Nutritional genomics: the next frontier in the postgenomic era, *Physiol Genomics* 16: 166–177, 2004

KIONTKE K., FITSCH D. H. A.: The Phylogenetic relationships of *Caenorhabditis* and other rhabditids, WormBook, ed. The C. elegans Research Community, WormBook, doi/10.1895/wormbook.1.11.1, <http://www.wormbook.org>, 2006

KIONTKE K., SUDHAUS W.: Ecology of *Caenorhabditis* species, *WormBook*, ed. The C. elegans Research Community, WormBook, doi/10.1895/wormbook.1.37.1, <http://www.wormbook.org>, 2006

KUKARTZ U., RÄDIKER S., EBERT T., SCHEHL J.: Statistik – eine verständliche Einführung, VS Verlag für Sozialwissenschaften, Springer Fachmedien Wiesbaden GmbH, 2010

LÖFFLER G., PETRIDES P. E., HEINRICH P. C.: Biochemie und Pathobiochemie, Springer, 2006

LONGMAN D., JOHNSTONE L., CACERES F.: Functional characterization of SR and SR-related genes in *Caenorhabditis elegans*, *The EMBO Journal* Vol.19 No.7 pp.1625–1637, 2000

LU N. C., HIEB W. F., STOCKSTAD 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

MÜLLER M., KERSTEN S.: Nutrigenomics: goals and strategies, 2003 Nature Publishing Group, Volume 4, April 2003

PIETRZIK K., GOLLY I., LOEW D.: Handbuch Vitamine – Für Prophylaxe, Therapie und Beratung, Elsevier Urban & Fischer Verlag, München, 2008

RIDDLE L. D.: Introduction to *C. elegans*, in RIDDLE et al., *C. elegans* II, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1997

SAID H. M., CHATTERJEE N., HAQ R. U., SUBRAMANIAN V. S., ORITZ A., MATHERLY L. H., SIROTNAK F. M., HALSTED CH., RUBIN ST. A.: Adaptive regulation of intestinal folate uptake: effect of dietary folate deficiency, *Am J Physiol Cell Physiol* 279: C1889–C1895, 2000

SOMMER R. J.: Evolution of development in nematodes related to *C. elegans* (December 14, 2005), *WormBook*, ed. The *C. elegans* Research Community, *WormBook*, doi/10.1895/wormbook.1.46.1, <http://www.wormbook.org>

STRANGE K.: An Overview of *C. elegans* Biology, in STRANGE K., *C. elegans* – Methods and Applications, Human Press Inc, Totowa, 2006

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

STANGER O., HERRMANN W., PIETRZIK K., FOWLER B., GEISEL J., DIERKES J., WEGER M.: Konsensuspapier der D.A.CH.-Liga Homocystein über den rationellen klinischen Umgang mit Homocystein, Folsäure und B-Vitaminen bei kardiovaskulären und thrombotischen Erkrankungen – Richtlinien und Empfehlungen, *J Kardiologie* 10 (5), 190 – 199, 2003

STIERNAGLE T.: Maintenance of *C. elegans* (February 11, 2006), *WormBook*, ed. The *C. elegans* Research Community, *WormBook*, doi/10.1895/wormbook.1.101.1, <http://wormbook.org>

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

SZEWCZYK N. J., UDRANZKY 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

THE C. ELEGANS SEQUENCING CONSORTIUM et al.: Genome Sequence of the Nematode *C. elegans*: A Platform for Investigating Biology, Science 282, 2012 (1998), DOI: 10.1126/science.282.5396.2012

THOMPSON B. E., LAMNOT L. B., KIMBLE J.: Germ-line induction of the *Caenorhabditis elegans* vulva, The National Academy of Sciences of the USA, PNAS, 620–625, Vol. 103, No. 3, January 17, 2006

WOOD W. B.: Introduction to *C. elegans* Biology, in WOOD W. B., The Nematode *Caenorhabditis elegans*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1988

QUI A., JANSEN M., SAKARIS A., HEE MIN S., CHATTOPADHYAY S., Tsai TSAI E., SANDOVAL C., ZHAO R., Akabas AKABAS M. H., David Goldman GOLDMAN I. D.: Identification of an Intestinal Folate Transporter and the Molecular Basis for Hereditary Folate Malabsorption, Elsevier Inc., Cell 127, 917–928, 2006

ZHAO R., QUI A., TSAI E., JANSEN M., AKABAS M. H., GOLDMAN I. D.: The Proton-Coupled Folate Transporter: Impact on Pemetrexed Transport and on Antifolates Activities Compared with the Reduced Folate Carrier, Mol Pharmacol 74: 854–862, 2008

ZAHO R., RUSSEL R. G., WANG Y., LIU L., GAO F., KNEITZ B., EDELMANN W., GOLDMAN D.: Rescue of Embryonic Lethality in Reduced Folate Carrier-deficient Mice by Maternal Folic Acid Supplementation Reveals Early Neonatal Failure of Hematopoietic Organs, *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 276, No. 13, Issue of March 30, pp. 10224–10228, 2001

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides Statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Die Arbeit wurde bisher in gleicher oder ähnlicher Form keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt und auch noch nicht veröffentlicht.

Wien, am 02.03.2011

Lebenslauf

Angaben zur Person:

Name: Christina Stiegler

Geburtsdatum: 20.04.1985

Geburtsort: Gmunden

Schulische Ausbildung:

1991 – 1995: Volksschule Ohlsdorf

1995 – 2003: BG/BRG Gmunden

2003 – 2004: Studium der Internationalen Betriebswirtschaft an der WU-Wien

2004 – 2011: Studium der Ernährungswissenschaften an der Uni Wien

Praktika:

August 2007: Gmundner Molkerei, Labor

Mai 2008: Gmundner Molkerei, Labor

Juli 2009: Gmundner Molkerei, Labor

September 2009: Landeskrankenhaus Gmunden, Assistenz im Bereich der Ernährungsmedizin

Jänner 2010: Department für Ernährungswissenschaften in der Abteilung „Emerging Focus Nutrigenomics“