



DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

Untersuchung des Populationswachstums von *Caenorhabditis elegans* RB 755 nach Modifizierung des Nährstoffgehaltes von Folsäure und Methionin

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Naturwissenschaften (Mag. rer. nat.)

Verfasserin / Verfasser:	Schimmer Claudia
Matrikelnummer:	0302668
Studienrichtung/Studienzweig	A 474 Diplomstudium
(lt. Studienblatt):	Ernährungswissenschaften
Betreuerin / Betreuer:	Univ.-Prof. Dr. Jürgen König

Wien, am 01.06.2011



Eidesstattliche Erklärung

Ich, Schimmer Claudia, geboren am 07.08.1984 in Eisenstadt erkläre,

1. dass ich meine Diplomarbeit selbständig verfasst, andere als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und mich auch sonst keiner unerlaubten Hilfen bedient habe,
2. dass ich meine Diplomarbeit bisher weder im In- noch im Ausland in irgendeiner Form als Prüfungsarbeit vorgelegt habe,
3. dass ich, falls die Arbeit mein Unternehmen betrifft, meinen Arbeitgeber über Titel, Form und Inhalt der Master Thesis unterrichtet und sein Einverständnis eingeholt habe.

Wien am 01.06.2011

Schimmer Claudia

Danksagung

Ich möchte all den Menschen danken, die mir während dem Erstellen dieser Arbeit mit Rat und Tat zur Seite standen. Es war bestimmt nicht immer leicht. Besonderer Dank gilt hierbei meiner Familie.

Ich möchte Dr. König danken, dass er mir die Chance gegeben hat, diese Arbeit zu schreiben und all die Erfahrungen im Labor zu machen. Es war eine schöne und auch aufregende Zeit.

Großer Dank auch an Doris Freistetter, die sehr hilfsbereit versucht hat, mich auf dem richtigen Kurs zu halten und immer die richtigen Worte fand. Auch Martina Köberl, die immer ein offenes Ohr für mich und mindestens genauso viel Mitgefühl für die Würmer, wie ich hatte. Ebenso wie Christina Stiegler und Alexandra Maringer. Vielen Dank für die witzigen Stunden.

Weiters möchte ich meinen Freunden danken: K. und M. L., J. T., S.-M. W., C. V., S. R. und M. F., sowie T. J.

Ich habe euch bestimmt oft mit meinen Ausführungen gelangweilt. Danke, dass ihr trotzdem zugehört habt.

Inhaltsverzeichnis

1	Einführung	1
1.1	Einleitung und Fragestellung	1
2	<i>Caenorhabditis elegans</i>	3
3	Methionin	5
3.1	Chemie.....	5
3.2	Abbau von Methionin.....	6
3.2.1	Remethylierung von Homocystein (Methionin-Synthase).....	6
3.3	Nährstoffempfehlungen für Methionin in diversen Spezies	8
4	<i>C. elegans</i> und Methionin	10
4.1	<i>C. elegans</i> und die Haltung im Labor.....	14
4.1.1	Diätrestriktionen.....	16
5	Methionin bei anderen Modellorganismen.....	19
5.1	<i>Drosophila melanogaster</i>	20
5.2	Mäuse und Ratten	22
5.3	Schweine.....	24
6	Material	26
6.1	Chemikalien	26
6.2	Geräte	29
6.3	Verbrauchsmaterialien.....	29
6.4	Organismen.....	30
6.5	Unterschiede <i>C. elegans</i> N ₂ und RB 755.....	30
7	Methoden.....	32
7.1	Kultivierung von <i>Caenorhabditis elegans</i>	32
7.2	Herstellung des CeHRFD- Mediums (Caenorhabditis elegans Habitation and Reproduction Medium Folate Depletion), variiert nach HAMZA.....	33
7.3	Herstellung der Folsäurestammlösung	37
7.4	Herstellung der Methioninstammlösung.....	37
7.5	Mediumwechsel.....	38
7.6	Synchronisieren/ Bleachen der <i>C. elegans</i>	38
7.7	Auszählen der Würmer.....	40
7.8	Populationsversuch:	41
	Versuchsablauf mit den Folsäurekonzentrationen 1x, 2,5x, 5x und 10x	41
7.8.1	Mediumwechsel der Wells bei Populationsversuchen.....	42

7.8.2	Populationsversuch mit Folsäure	43
7.8.3	Populationsversuch mit Methionin.....	44
7.9	Populationsversuch:	44
	Versuchsablauf mit den Folsäurekonzentrationen 1x, 1/10x und 0/6 1x	44
7.9.1	Auswertung der Populationsversuche	46
7.10	Brood Size und Life Span	47
7.11	Vermessung der Larvenstadien	48
8	Ergebnisse und Diskussion	49
8.1	Populationswachstum.....	49
8.1.1	Populationswachstum mit Folsäure.....	49
8.1.2	Populationswachstum mit Folsäure und Methionin	53
8.2	Brood Size.....	60
8.2.1	Auswertung des Brood Size.....	61
8.3	Life Span	64
8.4	Vermessung der Larvenstadien	68
8.4.1	Vergleich von C. elegans N ₂ zu RB 755.....	70
9	Schlussbetrachtung.....	71
10	Abstract (Kurzbeschreibung)	73
11	Literaturverzeichnis	76
12	Abbildungsverzeichnis.....	81
13	Tabellenverzeichnis.....	82
14	Anhang – Lebenslauf	83

1 Einführung

1.1 Einleitung und Fragestellung

Caenorhabditis elegans ist ein frei lebender Nematode, welcher in der Natur im Erdboden anzutreffen ist. Je nach Temperatur entwickeln sich zwei Geschlechter, Hermaphroditen und Männchen. Die Hermaphroditen sind in der Lage Sperma und Oozyten zu produzieren und sich somit selbst zu befruchten, während die Männchen nur Sperma produzieren. Durch diese Fortpflanzungsmethoden können sich die Würmer schnell und in großer Anzahl reproduzieren [HOPE; 1999].

Im Labor können die Würmer auf Nematode Growth Medium-Agar-Platten (NGM-Platten) oder im Flüssigmedium, hier *C. elegans* Habitation and Reproduction-Medium (kurz CeHR-Medium), welches sich aus verschiedenen Chemikalien zusammensetzt, gezüchtet werden. Hierbei dient als Nahrung auf den Platten der Bakterienstamm *E. coli* OP50, im Medium hingegen diverse Nährstoffe, wie z.B. Aminosäuren. Das Medium kann für die unterschiedlichen Versuche modifiziert werden, indem der eine oder andere Nährstoff reduziert oder erhöht wird.

Der Wurm dient als Modellorganismus für Untersuchungen in Genetik und Entwicklung, da bereits das gesamte Genom von *C. elegans* entschlüsselt wurde [WOOD; 1988]. Es ist möglich, verschiedene Gene des Organismus *C. elegans* gezielt auszuschalten, um deren Funktion einzuschränken. Dies dient unter anderem der Untersuchung verschiedener Aufnahme- und Synthesewege.

In dieser Arbeit wurde der Stamm *C. elegans* RB 755 verwendet, bei welchem das Gen 521 ausgeschaltet wurde. Dieses Gen codiert die Methionin-Synthase. Ziel war, die Methionin-Synthese des Wurms einzustellen, um herauszufinden, inwiefern dies die Lebensweise der *C. elegans* beeinflusst.

Da das CeHR Medium für ernährungsbezogene Fragestellungen diverse Vorteile bietet, wurde dieses modifiziert (Folsäuredepletion) und für die

Durchführung, der für die Diplomarbeit relevanten Versuche, verwendet. Die für die Arbeit interessanten Folsäurekonzentrationen wurden anschließend separat hinzugefügt, um gezielt festzustellen, welche Auswirkungen diese auf das Populationswachstum bzw. Brood Size sowie Life Span von *C. elegans* haben. Da bei den *C. elegans* *RB 755* die Methionin-Synthase ausgeknockt ist, wurden weiters auch Versuche mit Methionin durchgeführt.

2 *Caenorhabditis elegans*

C. elegans hat einen schnellen Lebenszyklus. Ungeachtet dessen, ob der Wurm sich als Hermaphrodit selbst befruchtet oder die Eier von einem Männchen befruchtet werden, beginnt der Embryo sein Leben im Inneren des Mutterwurms. Dieser Embryo besteht aus 28-30 Zellen und wird durch die Labien an die Umwelt abgegeben. Die Embryogenese erfolgt anschließend außerhalb des Mutterwurmes im Ei in einer Periode, die etwa 13 Stunden benötigt. Beim Schlüpfvorgang ist der Embryo eine bereits vollständige Larve mit 558 Zellen, welche im Ei sichtbar ist und meistens in einer, eine Bretzel darstellende Form, im Ei liegt. Ist ausreichend Nahrung zur Verfügung, durchläuft *C. elegans* vier Larvenstadien, während derer der Wurm im Zuge des Wachstums mehrmals seine Kutikula abwirft. Während des Wachstums entwickeln sich diverse Zellen, welche entscheiden, ob aus dem Wurm ein Hermaphrodit oder ein Männchen entsteht, indem sich Oozyten und Spermathek sowie der, vom Weibchen unterscheidbare, Schwanzteil bilden. Diese Entwicklung ist jedoch auch temperaturabhängig [CORSI, 2006].

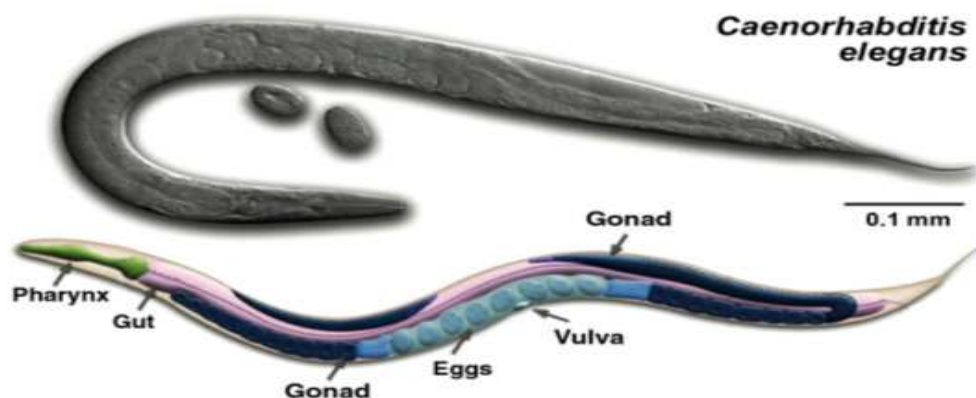


Abbildung 1: *C. elegans*, Hermaphrodit in linker Lateralansicht; (A) zu erkennen ist ein adulter Wurm mit 2 ovalförmigen Embryos nahe der Vulvaöffnung. (B) Diagramm der Anatomie des Wurmes; übernommen von Wormatlas (www.wormatlas.org)

Eine alternative Entwicklung findet statt, wenn *C. elegans* während dem L1/L2-Stadium unzureichende Umweltbedingungen, wie zu wenig Nahrung, vorfindet.

In diesem Fall entwickelt sich, anstatt des L3-Larvenstadiums, eine Dauerlarve. Diese ist sehr resistent gegen Stress und kann auf diese Weise, auch bei schlechten Bedingungen, 3-6 Monate überleben. Verbessern sich die Umweltbedingungen, entwickelt sich aus der Dauerlarve eine L4-Larve und der Lebenszyklus verläuft weiter [CORSI, 2006].

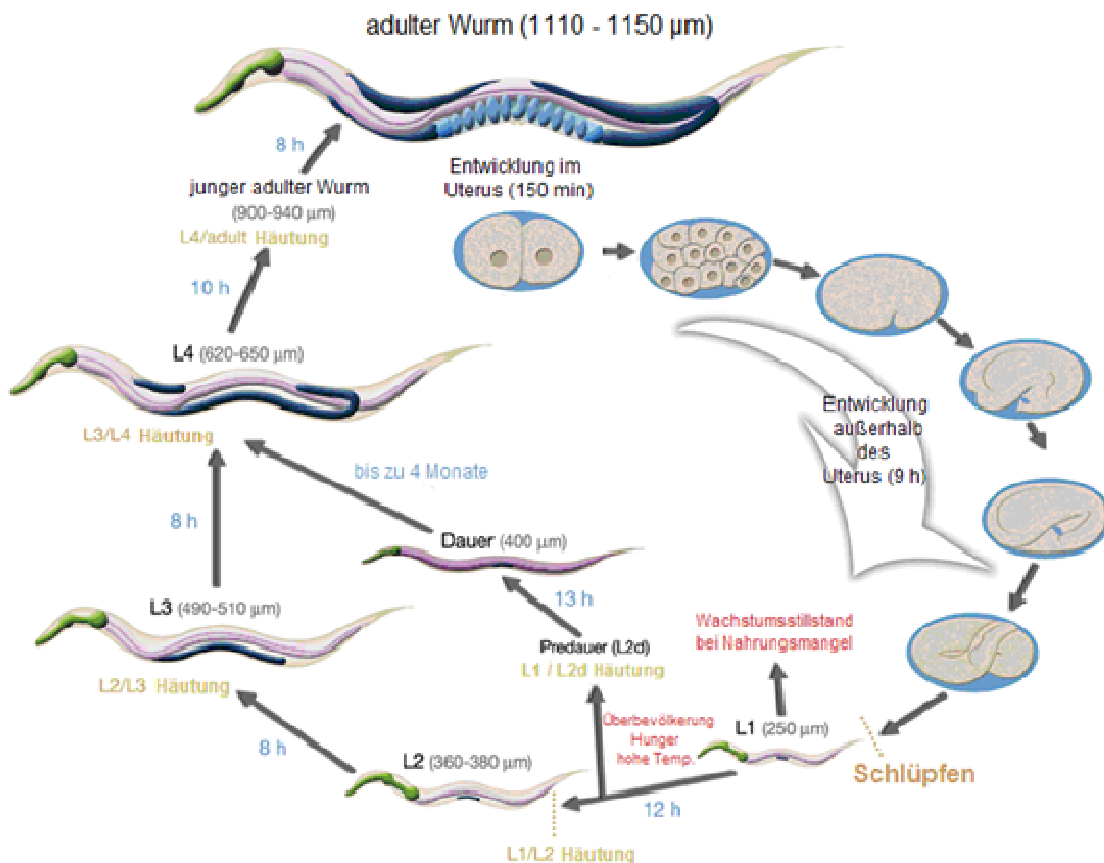


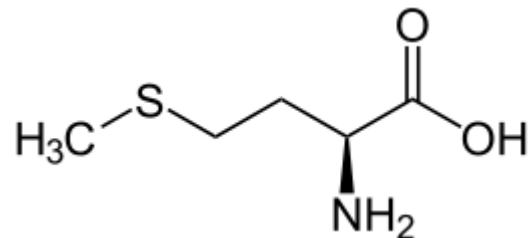
Abbildung 2: Lebenszyklus eines *C. elegans*-Hermaphroditen bei 22°C. Zu Beginn des Lebenszyklus ist ein adulte Hermaphrodit, mit ovalförmigen Embryos im Körper, zu sehen. Haben die Embryos 28-30 Zellen ausgebildet, werden sie an die Umwelt abgegeben und beginnen ihre Entwicklung. Ist die Embryogenese vollständig, schlüpfen die L1-Larven aus den Eiern. Anschließend, sofern die Bedingungen günstig sind, durchläuft der Wurm die Stadien L2-L4 bis er sich zum adulten Wurm entwickelt. Ist zu wenig Nahrung vorzufinden, oder es kommt zu einer Überbevölkerung oder zu hohen Temperaturen, tritt der Wurm in ein alternatives Stadium, dem Dauerstadium, ein und verweilt in diesem Stadium, bis sich die Umweltbedingungen bessern. Zu erkennen ist weiters die Größe bzw. die Dauer der Entwicklung der jeweiligen Stadien. [Übernommen von CORSI, 2006]

3 Methionin

3.1 Chemie

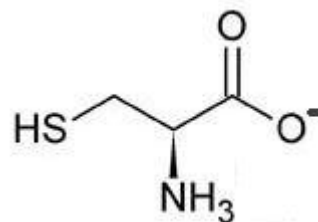
Methionin ist eine proteinogene Aminosäure mit aliphatischer Seitenkette. Beim Menschen und auch bei anderen Lebewesen kommt ausschließlich die L-Form, also L-Methionin, vor. Es ist eine essentielle Aminosäure. Dies bedeutet, dass der Mensch sie nicht selbst synthetisieren kann, sie muss mit der Nahrung aufgenommen werden [LÖFFLER et al.; 2007].

Chemische Strukturformel:



Methionin enthält, wie die Strukturformel zeigt, ein Schwefelatom. Neben Methionin gibt es noch eine weitere schwefelhaltige, proteinogene Aminosäure, das Cystein. Diese ist nur bedingt essentiell und kann aus Methionin über diverse Stoffwechselschritte synthetisiert werden.

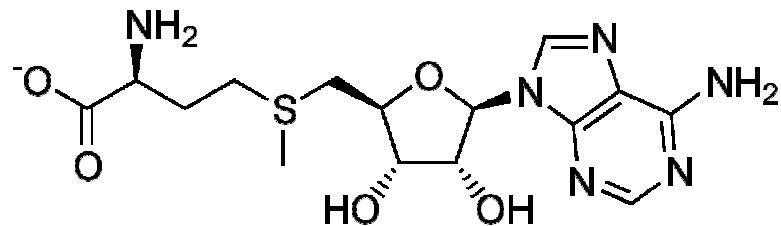
Chemische Strukturformel von Cystein:



Die Empfehlungen zur Aufnahme für sulfatische Aminosäuren, diese beinhalten sowohl Methionin, als auch Cystein, liegen bei 13-21 mg/kg Körpergewicht/Tag. Die Empfehlungen zur Methioninaufnahme liegen bei 5-13 mg/kg Körpergewicht/Tag. Dies resultiert daraus, dass der Körper bei hoher Cysteinanwesenheit Methionin einsparen kann. Das Ausmaß dieses Effekts ist abhängig vom Alter, Ernährungsstatus und Gesundheit [FUKAGAWA, 2006].

Im Stoffwechsel dient Methionin hauptsächlich als Methylgruppenlieferant für diverse Biosynthesen und ist wichtig für Transmethylierungen, z.B. von Glutathion. Die im Stoffwechsel aktive Form ist S-Adenosylmethionin, das wichtigste methylierende Coenzym. [LÖFFLER et al.; 2007]

Chemische Strukturformel von S-Adenosylmethionin:

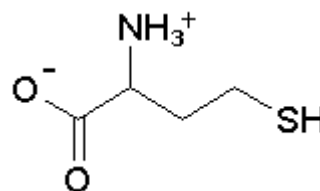


3.2 Abbau von Methionin

Der Abbauweg von Methionin durchläuft Teile des Methioninzyklus. Dabei wird die S-Methylgruppe entfernt. Hierbei entsteht Homocystein, welches weiters durch die Pyridoxalphosphat-abhängige Cystathionin-β-Synthase auf Serin übertragen wird. Dadurch entsteht Cystathionin, dessen Spaltung Cystein und α-Ketobutyrat liefert. Dieses α-Ketobutyrat wird entweder zu Succinyl-CoA oder zu α-Aminobutyrat abgebaut, welches weiter verstoffwechselt wird [LÖFFLER et al.; 2007].

3.2.1 Remethylierung von Homocystein (Methionin-Synthase)

Chemische Strukturformel von Homocystein:



Beim Methioninzyklus wird durch eine Transferase der Adenosylrest von Adenosintriphosphat (ATP) auf das Schwefelatom von Methionin übertragen, wodurch S-Adenosylmethionin (SAM) gebildet wird. Aufgrund der folgenden Transmethylierung geht SAM in S-Adenosylhomocystein über. S-Adenosylhomocystein hemmt Methylierungsvorgänge, weshalb der Abbau zu

Homocystein notwendig ist. Daher wird es im weiteren Verlauf hydrolytisch zu Adenosin und Homocystein gespalten. Adenosin wird wieder zu ATP rephosphoryliert und kann erneut Methionin aktivieren [LÖFFLER et al.; 2007].

Die Remethylierung von Homocystein zu Methionin kann in zwei Schritten erfolgen:

- Durch die Betain-Homocysteinmethylase, wobei die Methylgruppe vom Betain stammt, welche in Dimethylglycerin gewandelt wird. Dieser Weg ist unabhängig von Folsäure und Cobalamin.
- Durch die Methionin-Synthase. Diese enthält als Cofaktor Methylcobalamin, also ein Vitamin B₁₂-Coenzym, und dient der Bildung von Methionin sowie der Regeneration von S-Adenosylmethionin (SAM). Als Methylgruppen-donator fungiert hierbei N⁵-Methyl-Tetrahydrofolat (5-CH₃-THF), das durch die Methylen-THF-Reduktase (MTHFR) unter NADPH-Verbrauch aus N⁵,N¹⁰-Methylen-THF hergestellt wird [LÖFFLER et al.; 2007].

Die Methionin-Synthase katalysiert die Remethylierung von Homocystein zu Methionin und die parallele Demethylierung von 5-Methyltetrahydrofolat zu Tetrahydrofolat. Bei Vitamin B12-Depletion kann es zur Methylfalle kommen. Das bedeutet, dass trotz Folsäurezufuhr ein Folsäuremangel besteht, da das Tetrahydrofolat nicht verstoffwechselt werden kann. Der Mangel an Folat-Coenzymen kann im schlimmsten Fall zu defekter DNA-Synthese und der Ausbildung einer megaloblastären Anämie führen [CHEN L.H. et al., 1997].

Da die Reaktionen der Methionin-Synthase Folsäure- und Cobalamin-abhängig sind, kann es, bei Abwesenheit von einem dieser Nährstoffe, zur Anhäufung von Homocystein im Körper kommen. Das steht mit erhöhtem Arterioskleroserisiko in Zusammenhang. Außerdem kommt es zu hyperchromer makrozytärer Anämie.

Verringerte Folsäurezufuhr äußert sich auch in verringerter Methionin-Synthase-Aktivität. Dies führt wieder zu Homocysteinakkumulation mit

reduzierten Konzentrationen an Methionin, S-Adenosylmethionin und S-Adenosylhomocystein
[RAMAEKERS, 2003].

3.3 Nährstoffempfehlungen für Methionin in diversen Spezies

In der menschlichen Ernährung ist, bei einem Proteingehalt von 10 bis 15 En%, ein Anteil von 1,7% Methionin an der Gesamteinmenge als adäquat anzusehen. Methionin ist nicht nur für den Menschen, sondern auch für Hunde, Schweine, Truthähne und Ratten essentiell. Der Bedarf für die diversen Spezies ist in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

Tabelle 1: Methioninempfehlungen in diversen Spezies; übernommen von FENG, 2003; ersichtlich sind Prozentanteil des Proteins in der Ernährung, sowie die Empfehlungen für Methionin in mg Aminosäure/g Protein; C.elegans wurde in C. elegans Maintenance Medium gehalten

Spezies	% Protein in der Ernährung	Empfehlung (mg AS/g Protein)	Kriterium
Erwachsener Mensch	10-15	17	Maintenance
Erwachsener Hund	9	17	Maintenance
Erwachsenes Schwein	12	19	Maintenance
Truthahn (0-4 Wochen)	28	38	Optimales Wachstum
Ratte	12	50	Optimales Wachstum
<i>C. elegans</i>	28	25	<i>Optimales Wachstum</i>

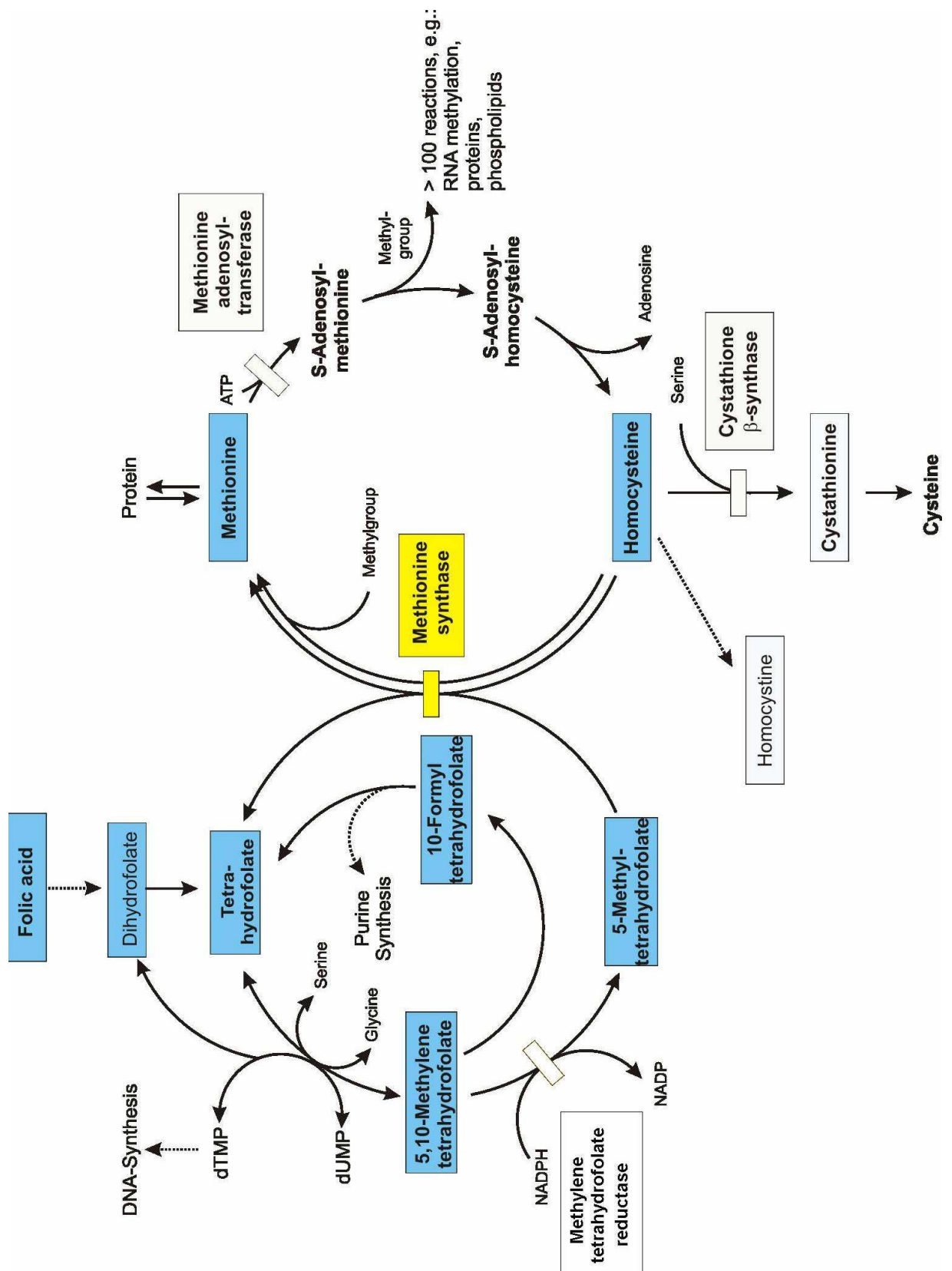


Abbildung 3: Methionin-Synthese-Zyklus modifiziert nach BLAU et al

4 *C. elegans* und Methionin

Methionin ist für Säugetiere eine essentielle Aminosäure und wird von vielen Bakterien, Pilzen und Pflanzen synthetisiert. Es ist wichtig für die Biosynthese von diversen Zellkomponenten wie Kreatin, Epinephrin, Karnitin, Phospholipide, Protein, DNA (Desoxyribonukleinsäure) und RNA (Ribonukleinsäure). Außerdem hat es metabolische Funktionen bei der Synthese von S-Adenosylmethionin (SAM) und Homocystein. Es wurde beobachtet, dass Homocystein 3 Formen aufweist: eine reduzierte Form, eine Thiolacton-Form und eine Disulfid-Form (auch oxidierte Form) [FENG, 2003. Zu beachten ist, dass die reduzierte Form hoch toxisch für alle Zellen ist] [DJURHUUS et al, 1988].

Nancy Lu et al haben festgestellt, dass Vitamin B₁₂ und Folsäure für die Biosynthese von Methionin aus Homocystein bei dem Nematoden *C. briggsae* notwendig sind [LU et al, 1976]. *Caenorhabditis briggsae* unterscheidet sich von *C. elegans* nur geringfügig in der genetischen Zusammensetzung [FENG, 2003].

Verwendet wurde bei Lu et al das chemisch definierte *Caenorhabditis briggsae* Maintenance Medium (CbMM). Das Standard-CbMM beinhaltet für gewöhnlich 3750 ng/ml Vitamin B₁₂ und 7500 ng/ml Folsäure. Einige der verwendeten Chemikalien, die normalerweise in CbMM enthalten sind, wurden für die Versuche depletiert und erst später in verschiedenen Konzentrationen zugefügt: Vitamin B₁₂, Folsäure, Calcium-Folinat, L-Methionin, Cholindihydrogencitrat, Para-Aminobenzoesäure und Nukleinsäurekomponenten. Diese Komponenten wurden getrennt hergestellt, sterilfiltriert und in den Versuchen dem Medium einzeln zugegeben. Als Testvariablen wurden in dieser Studie Vitamin B₁₂, Folsäure, Methionin, Homocystein und Cholindihydrogencitrat verwendet. Das Verhalten von *C. briggsae* wurde bei Anwesenheit unterschiedlicher Konzentrationen dieser Nährstoffe untersucht.

Eingesetzt wurden 3 frisch geschlüpfte Würmer pro 10x75 mm Tube, welches 0,25 ml des Mediums beinhaltet. Diese wurden bei 20°C inkubiert. Das Medium, zu welchem behandelte *E. coli*-Zellbestandteile sowie 100 ng/ml Folsäure hinzugefügt wurden, zeigte nahezu maximales Populationswachstum bei *C. briggsae* und stellte sich somit als optimal heraus. Jenes Medium, welches mit *E.coli*-Zellbestandteilen und 12, 20 oder 60 ng/ml Folsäure angereichert wurde, zeigte Folsäure-Unterversorgung, während Folsäurekonzentrationen von 1500 ng/ml bis 7500 ng/ml supraoptimale Versorgung zeigten [LU et al, 1976].

Im Medium, das supraoptimale Levels an Folsäure (7500 ng/ml) und Vitamin B₁₂ (3750 ng/ml) beinhaltete, wurde durch Methionindepletion ein um 80% geringeres Populationswachstum beobachtet. In weiteren Versuchen wurde Methionin durch Homocystein ersetzt. Beobachtet wurde annähernd gleiches Wachstum wie bei Methioninanwesenheit. Dies deutete darauf hin, dass *C. briggsae* Homocystein anstelle von Methionin verwerten kann, sofern supraoptimale Gehalte von Vitamin B₁₂ und Folsäure zur Verfügung stehen [LU et al, 1976].

In den Studien von Lu et al wurde beobachtet, dass Methionin durch die Thiolacton-Form des Homocysteins bei *C. briggsae* ersetzt werden kann [LU et al, 1976]. Diese Thiolacton-Form unterstützt auch das Wachstum von nicht-transformierten und malignen Zellen von Mausembryo-Fibroblasten bei Methioninmangel oder Methioninabwesenheit [DJURHUUS, 1988].

Für einige Experimente wurden Subkulturen gezüchtet, um alle Spuren an Vitamin B₁₂ aus den Organismen zu entfernen und auf diese Weise absoluten Vitamin B₁₂ Mangel zu erzielen. Wurde Vitamin B₁₂ im CbMM depletiert, trat moderates Populationswachstum in der Originalkultur auf. Dieses verringerte sich aber annähernd zu Null in der zweiten Subkultur. Basierend auf den Ergebnissen der Subkultur wurde vermutet, dass 0,04 ng/ml Vitamin B₁₂ notwendig sind, um erkennbares Wachstum zu erzielen und 6 ng/ml um maximales Wachstum zu beobachten. Zu erwähnen ist hier, dass der niedrige

Level an zugesetztem Vitamin B₁₂ sich mit den 0,11 ng/ml Vitamin B₁₂, welche sich bereits im Basalmedium befanden, auf 0,15 ng/ml addierte. Auch Sojapepton, welches dem Medium zugefügt wurde, beinhaltet Vitamin B₁₂, jedoch in vernachlässigbarer Menge (1 pg/mg Trockenmasse), sowie eine geringe Menge an Methionin (8,2 µg/mg Trockenmasse) [LU et al, 1976].

Die Versuche an der Subkultur zeigten deutlich, dass sowohl Vitamin B₁₂, als auch Folsäure notwendig für das Populationswachstum von *C. briggsae* im Medium, das Homocystein beinhaltet, sind. Lu et al vermuteten, dass diese beiden Nährstoffe für die Biosynthese von Methionin aus Homocystein wichtig sind, da die Wirkungen der beiden Stoffe additiv sind. Bei hohen Konzentrationen an Folsäure bewirkte eine Elimination von Vitamin B₁₂ eine Reduktion des Populationswachstums um 36 bis 50%. Folsäurekonzentrationen, die unter dem Optimum lagen, bewirkten in Zusammenhang mit Vitamin B₁₂-Elimination einen Rückgang des Wachstums um 82 bis 95% sowie einen schwereren Vitamin B₁₂-Mangel. Dies zeigte, dass supraoptimale Levels an Folsäure den Bedarf an Vitamin B₁₂ schmälern können und umgekehrt, supraoptimale Levels an Vitamin B₁₂ den Bedarf an Folsäure reduzieren [LU et al, 1976].

Lu et al bewiesen, dass Methionin eine essentielle Aminosäure für *C. briggsae* darstellt und deren Abwesenheit zu einer Reduktion des Populationswachstums um 80% führt. Jedoch konnte Methionin auch durch Homocystein ersetzt und die Wachstumsreduktion ausgeglichen werden, sofern supraoptimale Konzentrationen an Vitamin B₁₂ und Folsäure zugefügt wurden. Dieses Ergebnis zeigte, dass, wie auch schon in höheren Organismen und Mikroorganismen, der Nematode einen Mechanismus für die Biosynthese von Methionin aus Homocystein aufweist. Weiters wurde beobachtet, dass die Biosynthese von Methionin aus Homocystein sowohl Vitamin B₁₂-, als auch Folsäure-abhängig ist und diese beiden Nährstoffe additiv sind [LU et al, 1976].

Beobachtet wurde, dass entweder supraoptimale Folsäure (2000 ng/ml) oder supraoptimales Vitamin B₁₂ (3750 ng/ml) zusammen mit Homocystein lediglich geringes Populationswachstum bei *C. briggsae* bewirkt. Supraoptimale Konzentrationen an Folsäure gemeinsam mit Vitamin B₁₂ ergaben maximales Populationswachstum [LU et al, 1976].

Bei *C. elegans* wurden ähnliche Studien in keimfreiem Flüssigmedium, hier *C. elegans* Maintenance Medium (CeMM), welches die gleiche Zusammensetzung wie CbMM aufweist und zusätzlich Cytochrom C, β -Sitosterol und eine Energiequelle (Acetat oder Glucose) enthält, durchgeführt. Ziel war es, herauszufinden, welche Konzentrationen an Methionin für den Wurm positiv oder negativ sind. Dabei wurde beobachtet, dass sich optimales Populationswachstum im Flüssigmedium bei Konzentrationen von 0,19 und 0,39 mg Methionin pro ml Medium ergab. Bei Konzentrationen von 0,0 oder 0,097 mg Methionin pro ml Medium, war das Populationswachstum deutlich geringer und wies auf einen Methioninmangel hin. Bei hohen Konzentrationen wie 0,78 und 1,6 mg Methionin pro ml Medium war, vermutlich aufgrund der Methionintoxizität, ebenfalls eine deutliche Reduktion der Populationsrate erkennbar [FENG, 2003].

C. elegans entwickelte während der ersten 14 Tage des Versuchs ein logarithmisches Wachstumsverhalten mit Methionin, danach nahm das Wachstum ab. Methioninfreies Medium zeigte nur inadäquates Wachstum. Außerdem wurden viele kleinwüchsige adulte Würmer sowie tote Nematoden beobachtet. Auch die Substitution von Methionin mit Homocystein bewirkte geringeres Populationswachstum und zeigte, im Vergleich mit Methionin, nur 46% der Wachstumsrate [FENG, 2003].

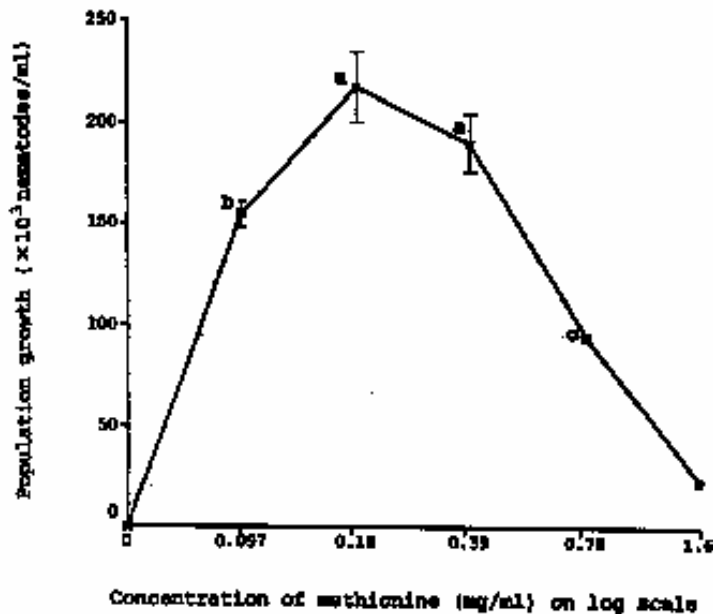


Abbildung 4: Dosiswirkung von *C. elegans* bei den verschiedenen Konzentrationen von Methionin in *C. elegans* Maintenance Medium. Erkennbar ist das logarithmische Wachstumsverhalten. Jede Tube wurde mit 520 Nematoden beimpft und das Populationswachstum nach 23 Tagen ermittelt. Die Punkte zeigen die $\pm$ Standardabweichung des Mittels von 4 Replikaten. Übernommen von FENG, 2003

4.1 *C. elegans* und die Haltung im Labor

C. elegans wird hauptsächlich auf Platten mit Bakterien als Nahrungsquelle gezogen. Diese Art lässt aber keine Schlüsse auf die Nahrungsaufnahme zu, da nicht festgestellt werden kann, wie viel der Wurm aufnimmt. Flüssiges axenisches Medium hingegen erlaubt eine Standardisierung, da das Medium je nach Untersuchungszweck modifiziert werden kann und Nährstoffe anschließend auch separat hinzugefügt werden können. Die bekannten, zugefügten Nährstoffkonzentrationen und das daraus resultierende Verhalten der Würmer, lassen Aussagen über die Nahrungsaufnahme zu.

Es gibt jedoch Unterschiede in der Entwicklung der Würmer, die im Flüssigmedium kultiviert werden, im Gegensatz zu jenen, welche auf Platten

gezogen werden. Frühere Ergebnisse zeigten, dass axenische, also keimfreie, Diäten im Flüssigmedium zu erhöhter Life Span, erniedrigter Körpermasse, verminderter Fruchtbarkeit und gesteigerter Stoffwechselrate, im Gegensatz zu Würmern, welche mit Bakterien versorgt wurden, führen. Dies erweckt den Eindruck, dass keimfreie Entwicklung „ungesund“ für *C. elegans* ist [SZEWCZYK et al, 2006].

Doch nicht nur Diäten, sondern auch definiertes axenisches Medium, welches Nährstoffe enthält, in diesem Fall *C. elegans* Maintenance Medium (CeMM) bei 20°C, zeigte verlangsamte Entwicklung [SZEWCZYK et al, 2003] sowie verlängerte Reproduktionsphasen [SZEWCZYK et al, 2006] und höhere Life Span [WALKER et al, 2005]. Dadurch ist erkennbar, dass die Abwesenheit von *E. coli* die Fruchtbarkeit reduziert und die Lebensspanne in CeMM erhöht [WALKER et al, 2005].

Eine Beifügung von toten *E. coli* zu *C. elegans* auf Platten kann die langsame Entwicklung und erniedrigte Fruchtbarkeit wieder aufheben. Dies könnte bedeuten, dass *E. coli* Nährstoffe für *C. elegans* beinhalten, welche in axenischen Platten nicht vorhanden sind. Später, bei adulten Würmern, scheint dieser Nährstoff oder eventuell auch andere Komponenten der *E. coli* jedoch nachteilig für die Lebensspanne zu sein. Daraus resultiert, dass die kritische Zeit für die Effekte der Nahrung, und somit den Auswirkungen für die Life Span, im Erwachsenenalter von *C. elegans* und nicht während der Entwicklung stattfindet [LENAERTS et al, 2008].

Ein weiteres standardisiertes axenisches Medium, welches bei Versuchen mit *C. elegans* eingesetzt wird, besteht aus 3% Sojapepton, 3% Hefeextrakt, 0,5 mg/ml Hämoglobin und geringe Mengen an Sterolen, da diese von *C. elegans* nicht synthetisiert werden können. In diesem axenischen Medium kommt es zu einer Erhöhung der Life Span um 50-80% im Vergleich zu monoxenischer Kultivierung. Es wird vermutet, dass dieses Ergebnis durch Nahrungsrestriktion zustande kommt, obwohl das Medium reich an Proteinen, Kohlenhydraten,

Vitaminen und Mineralstoffen ist. Möglicherweise kommt es durch das axenische Medium auch zu einem Defekt bei der Nahrungsaufnahme oder Endozytose der Nahrungsbestandteile [WALKER et al, 2005] oder *C. elegans* benötigt aktive Mikroben, wie z.B. *E. coli*, um vollständig mit Nährstoffen versorgt zu sein [LENAERTS et al, 2008].

4.1.1 Diätrestriktionen

Es wurden verschiedene Methoden von Diätrestriktionen an *C. elegans* erforscht, welche in drei Klassen eingeteilt werden können:

1. Reduktion der *E. coli*-Aufnahme
2. Reduktion einiger spezifischer Nährstoffe
3. Ersatz der Bakterien als Nahrungsquelle durch synthetisches Medium

Die meisten der durchgeführten Versuche führten zu Life Span-Erhöhung [HOUTHOOFD et al, 2006].

Durchgeführt wurden z. B. Methoden der Nahrungsrestriktion wie:

- Verwendung von so genannten *eat-2* Mutationen, welche die Bewegungen des Pharynx reduzieren
- Verminderung der Bakterien in flüssigen Kulturen
- Komplette Abwesenheit von Bakterien in flüssigen Kulturen (axenisches Medium)
- Verwendung von chemisch definiertem axenischen Flüssigmedium
- Reduktion von Pepton in den verwendeten Platten
- Komplette Abwesenheit von Nahrung auf Platten
- Zugabe von Bakterien erst im L4-Stadium von *C. elegans* auf Platten [GREER et al, 2007]

Axenisch gezogene Würmer zeigen diverse Eigenschaften, welche bei Tieren unter Diätrestriktion nachgewiesen wurden: sie sind kleiner und zeigen verzögerte Entwicklung und Reproduktion sowie verminderte Brood Size und erhöhte Life Span [HOUTHOOFD et al, 2002]. Nachgewiesen wurde dies in

CbMM, welches Aminosäuren, Vitamine und Wachstumsfaktoren, Glukose, sowie Nukleotide, insgesamt 54 Komponenten, beinhaltet. Zu diesem wurden noch Sterole, Eisen und 20% Magermilch hinzugefügt. Dieses Medium zeigt bei *C. elegans*, trotz der reichhaltigen Inhaltsstoffe, Mangelercheinungen.

Mögliche Gründe, welche zu den Nahrungsmängeln führen können und in Folge die Life Span erhöhen:

- Eine oder mehrere Komponenten, welche für die Entwicklung und maximale Reproduktion wichtig sind, fehlen oder sind in zu geringer Konzentration enthalten [HOUTHOOFD et al, 2006].
- Der Wurm gibt bei der Nahrungsaufnahme zu viel des Mediums wieder ab, da die Würmer ihre Nahrung durch Filtrierung aufnehmen [HOUTHOOFD et al, 2006].
- Die Stoffwechselraten und das Ausmaß der oxidativen Schäden sind reduziert [HOUTHOOFD et al, 2002].

Fakt ist, dass axenisches Medium definitiv Einfluss auf die Lebensspanne hat. Ob dies jedoch aus der Abwesenheit der bakteriellen Toxizität oder der Nährstoffrestriktion resultiert, muss erst noch validiert werden [HOUTHOOFD et al, 2006].

Die Modifikation der Life Span bei *C. elegans* wurde auf genetischer Ebene untersucht. Dabei wurde eine große Anzahl an Genen beobachtet, welche, wenn sie mutieren, zu einer Erhöhung der Life Span führen. Man nennt dieses Phänomen auch Age-Phänotyp. Die Anzahl dieser Gene liegt bereits deutlich über 100 und repräsentiert rund 1% des Genoms von *C. elegans*. In dieser Hinsicht ist die Erforschung der Dauerlarven der Würmer wichtig. *C. elegans* kann unter bestimmten Umweltbedingungen während der Entwicklung in ein alternatives L3-Stadium treten, das so genannte Dauerstadium. In diesem Stadium ist es dem Wurm möglich 3-6 Monate, und somit 4-8 mal länger, zu überleben. Dieses Dauerstadium wird von drei parallelen Stoffwechselwegen kontrolliert, welche alle sensorische Informationen zum DAF-12 Protein leiten.

Wichtig zu erwähnen ist hier der IGF-1 Stoffwechselweg, welcher Gene wie *age-1*, *daf-2*, *daf-16* oder *daf-18* beinhaltet. Wird dieser Stoffwechselweg inaktiviert, geht der Wurm in seiner Entwicklung in das Dauerstadium über [REA and JOHNSON, 2003].

Kommt es zu einer Überbevölkerung von *C. elegans* oder, eventuell infolge dessen, zu einer Nahrungsknappheit, tritt der *daf-2* Stoffwechselweg in den Vordergrund. Dieser ist maßgeblich daran beteiligt, in die Dauerform über zu gehen. Die Aktivität des *daf-2* Stoffwechsels wird möglicherweise durch sensorische Determinanten beeinflusst [LIN et al, 2001].

5 Methionin bei anderen Modellorganismen

In diversen Studien wurde bereits festgestellt, dass sowohl Methioninaufnahme als auch Methioninmetabolismus Einfluss auf die Life Span diverser Organismen haben. Der stärkste Beweis hierfür stammt aus Studien an Ratten und Mäusen, welchen Aminosäuren anstatt Protein verabreicht wurden. Hier zeigte eine Restriktion von Methionin allein, eine Life Span-Erhöhung um 10-45% [MILLER et al, 2005]. Weiters hemmt eine Restriktion von Methionin den Einfluss der IGF-1 Expression bei Wachstumshormonen in Schweine-Hepatozyten [STUBBS et al, 2002] bezüglich der regulatorischen Interaktion des Methioninmetabolismus mit dem IGF-1-Signalweg. Vermutlich hat eine Methioninrestriktion auch Einfluss auf den Aminosäuren-TOR-Stoffwechselweg, wenn auch nur indirekt als Effekt auf den Aminosäurenmetabolismus.

Methionin ist eine essentielle schwefelhaltige Aminosäure und inadäquate Aufnahme verlangsamt das Wachstum bei jungen Säugetieren. Zu hohe Zufuhr von Methionin ist jedoch hochgradig toxisch für junge und alte Säugetiere. Diese Toxizität übersteigt bei weitem jene, welche durch andere Aminosäuren produziert werden, könnte. Schon das Doppelte der normalen Methioninaufnahme äußert sich in diversen negativen Symptomen, wie Wachstumsretardation, Anämie, vaskuläre Schäden, Nierenschäden und Hypertrophie der Tubuli, Veränderungen von azinen Pankreaszellen sowie Eisenakkumulation in Leber und Milz. Ähnliche Symptome bei Leber, Niere und Milz wurden bei Menschen mit Methioninämie ebenfalls beobachtet [TROEN et al, 2006].

Einige dieser Beschwerden sind auf das aus Methionin entstehende Homocystein zurückzuführen, andere hingegen stehen direkt mit einem Ungleichgewicht im Methioninmetabolismus in Zusammenhang. Homocysteinlevels steigen mit dem Alter an, ebenso wie einige Enzyme des Methioninstoffwechsels. Dies beweist einen Zusammenhang von Alter und

Methioninmetabolismus und dem Effekt von suboptimaler oder exzessiver Methioninaufnahme [TROEN et al, 2006].

5.1 *Drosophila melanogaster*

Drosophila melanogaster, auch Taufliege oder Fruchtfliege genannt, ist einer der bestuntersuchten Organismen. Wie bei *C. elegans* wurde auch hier bereits das gesamte Genom entschlüsselt. Diese Art besitzt vier verschiedene Chromosomen, welche in den Zellen paarweise vorkommen. Die Zucht der Taufliege ist einfach, da sie relativ anspruchslos und die Generationsfolge kurz ist (9-14 Tage). Ein Weibchen legt bis zu 400 Eier. Dadurch kann eine große Anzahl der Taufliege für Experimente herangezogen werden. Bei der Entwicklung durchläuft *D. melanogaster* drei Larvenstadien und ein Puppenstadium. Sie ist nach etwa 9 Tagen vollständig entwickelt [BROOKES, 2002].

Als Nahrung dienen Mikroorganismen, wie Hefen und Bakterien, die organisches Material zersetzen, aber auch zuckerhaltiges organisches Material, wie Obst [BROOKES, 2002].

In einigen Fällen hängt die Dauer der Lebenszeit von der Qualität der Energiequellen ab. Bei *Drosophila* bewirkt eine Restriktion der Hefe eine beträchtliche Verlängerung der Life Span. Eine isokalorische Restriktion von Zucker zeigt nur eine moderate Verlängerung, unter Berücksichtigung, dass auch andere nahrungsabhängige Stoffwechselwege die Life Span bei dieser Spezies beeinflussen können. Bei Nagern beispielsweise bewirkt eine Beschränkung der Aufnahme an Methionin eine erhöhte Life Span [TROEN et al, 2006].

Wie sich Nahrungsrestriktion auf die Stoffwechselwege diverser Spezies auswirkt, ist noch nicht ausreichend erforscht. Bei *Drosophila* besteht die Vermutung, dass für diese Stoffwechselwege der Insulin-like growth factor 1

(IGF-1) und das aminosäuren- und nahrungssensitive Rapamycin (TOR, Target of Rapamycin) ausschlaggebend sind [TROEN et al, 2006].

Wichtig ist zu erwähnen, dass hier Restriktion nicht die Bedeutung hat, Kalorien zu senken, da eine Verlängerung der Life Span oft aus der Reduktion des Nahrungsenergieinhaltes resultiert und unabhängig von der Kalorienquelle ist. Frühere Studien von Nährstoffrestriktionen in Bezug zum Alter zeigten bei *Drosophila* eine immense Life Span-Erhöhung. Eine Verringerung von Hefe und Zucker um 10% im Medium zeigte hier eine Verlängerung der durchschnittlichen Life Span um 82%. Die Erhöhung der Life Span durch Restriktion des Nahrungsproteins weist diesbezüglich auf Aminosäuren als bestimmende Faktoren hin [TROEN et al, 2006].

In der Studie von Troen et al wurden vier verschiedene Diäten untersucht, ersichtlich in der folgenden Tabelle.

Tabelle 2: Diätvariationen in der Studie „Lifespan modification by glucose and methionine in *Drosophila melanogaster* fed a chemically defined diet“ von Troen et al, 2006

Glucose	Methionin	
15%	0,135%	15% Hefe-Zucker-Kontrollgruppe
5%	0,135%	Kalorienrestriktion des Zuckers um 1/3
15%	0,045%	Restriktion des Methionins um 1/3; keine Kalorienrestriktion
15%	0,405%	3x höhere Methioninkonzentration im Gegensatz zur Kontrolle

Troen et al fanden heraus, dass die Veränderung der Methionindosis alleine die Life Span modifizieren kann. Die vier Diäten zeigten, dass die Methioninkonzentration von 0,135% und die Konstanthaltung aller anderen

Aminosäuren sowie Nährstoffe bezüglich der Life Span optimal sind. Eine Restriktion von Methionin um 1/3 bewirkte keine Erhöhung der Life Span. Die Erhöhung der Methioninkonzentration auf 0,405% verkürzte die Lebensspanne und zeigte Effekte einer Methioninüberernährung [TROEN et al, 2006].

Obwohl die Methioninaufnahme Einfluss auf die Lebenserwartung bei *Drosophila* zeigt, so ist es nicht nur der Nährstoff Methionin allein, der diesen Effekt bewirkt, sondern auch die Variation der Hefe- und Proteinrestriktion, wie in anderen Studien gezeigt wurde [TROEN et al, 2006].

5.2 Mäuse und Ratten

Swanson et al versuchten bei Mäusen das gezielte Ausschalten der Methionin-Synthase. Dabei zeigten heterozygote Knockout-Mäuse aus nicht gekreuzten Linien im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen leicht erhöhte Plasmahomocystein- und -methioninwerte, jedoch keine weiteren Unterschiede. Homozygote Knockout-Mausembryos überlebten zunächst die Transplantation, starben aber bald darauf. Nahrungsergänzung während der Schwangerschaft zeigte bei Mausembryos mit absolutem Methionin-Synthasemangel keine Wirkung. Bezogen auf den Menschen ist nicht geklärt, ob bei Patienten mit Methionin-Synthase-Defizienz eine vollständige Abwesenheit des Enzyms besteht. Diese Studie zeigte jedoch die Wichtigkeit des Enzyms für die frühe Entwicklung bei Mäusen und lässt vermuten, dass Menschen entweder Restaktivität von Methionin-Synthase oder einen Kompensationsmechanismus aufweisen, der bei Mäusen fehlt.

Es gibt mehrere Mechanismen, die zu Letalität bei Mausembryos durch den Mangel an Methionin-Synthase führen können. Diese beinhalten Toxizität (z.B. bei der Homocystein-Synthese), Defizite (z.B. Methioninmangel) oder die Folat-Falle, bei welcher die Folsäure nur zu 5-MTHF (5-Methyltetrahydrofolat) verstoffwechselt wird. Folsäure wird für gewöhnlich katalytisch verwendet und aktive Coenzymformen werden für andere Stoffwechselvorgänge regeneriert.

Bei vollständiger Abwesenheit der Methionin-Synthase wird diese Reaktion blockiert. Swanson et al versuchten diese Probleme mit Supplementierung verschiedener Nährstoffe während der Schwangerschaft zu umgehen. Vor allem Methionin in höheren Dosen kann die Folat-Falle verringern [SWANSON, 2001].

Betain kann Homocystein durch die Betain-Homocystein-Methyltransferase (BHMT) zu Methionin verarbeiten. Dies würde den Homocysteinlevel senken und gleichzeitig den Methioninlevel erhöhen. Bei Mäusen wird die BHMT nicht gebildet, solange die Leber noch nicht entwickelt ist. In den Experimenten starben die Methionin-Synthase-Knockout-Mausembryos jedoch vor der Entwicklung der Leber. Der Ernährung der Mutter wurde Methionin hinzugefügt, um auf diesem Weg die Methioninlevels zu erhöhen. Hohe Dosen an Methionin waren aber toxisch für die Mutter, weshalb die verabreichten Konzentrationen unzureichend für die Entwicklung der Embryos gewesen sein könnte [SWANSON, 2001].

Yamada et al untersuchten schweren Vitamin B₁₂-Mangel in Zusammenhang mit Methionin-Synthase an Ratten. Dabei wurde den Ratten eine stark Vitamin B₁₂ defiziente Nahrung verabreicht und der Vitamin B₁₂ Status anhand des Anstiegs der Harnmethylmalonat-Ausscheidung, der Verminderung der Vitamin B₁₂-Konzentration in der Leber sowie der cobalaminabhängigen Methionin-Synthaseaktivität gemessen [YAMADA, 2000].

Die Vitamin B₁₂ defizienten Ratten zeigten ein hohes Level an Harnmethylmalonat sowie Wachstumsretardierungen im Gegensatz zu den Kontrollratten. Weiters wurden extrem niedrige hepatische Vitamin B₁₂ Konzentrationen und Methionin-Synthaseaktivität beobachtet. All diese Indikatoren beweisen den schweren Vitamin B₁₂-Mangel. Trotzdem zeigten die Ratten keine Megaloblasten oder neurologische Abnormalitäten. Die Gewichtszunahme der Vitamin B₁₂ defizienten Ratten wurde auf nahezu die Hälfte der von Kontrollratten gesenkt. Die Wachstumshemmung der Vitamin B₁₂

defizienten Ratten wurde nicht nur durch die verringerte Nahrungsaufnahme bedingt, sondern auch durch die verringerte Verstoffwechselung von Nahrungsprotein, durch die defekte Methionin-Synthase und die geringere Effizienz des Energiemetabolismus. Die Umkehrung der Wachstumsretardation durch die Verabreichung von injiziertem Methylcobalamin bewirkte eine Besserung der Nahrungsaufnahme sowie die Verbesserung der Nahrungsverstoffwechselung durch die Erhöhung der Vitamin B12 abhängigen Enzymaktivitäten. Durch wiederholte Injektionen von Methylcobalamin konnte die Wachstumshemmung kurzfristig rückgängig gemacht werden. Die Gründe, warum Methylcobalamin für die Wiederherstellungsexperimente verwendet wurde, waren die Stabilität bei der Injektion, und dass Methylcobalamin die Coenzymform für die Methionin-Synthase ist [YAMADA, 2000].

Yamada et al zeigten somit, dass die extrem niedrige Aktivität der Methionin-Synthase in Vitamin B₁₂ defizienten Ratten eher mit Coenzymstabilisierung, also der Stabilisierung des Enzyms durch Cobalaminbindung, als durch Veränderungen der Coenzyminduktion in Verbindung steht [YAMADA, 2000].

5.3 Schweine

Chung et al verabreichten 14 kg-schweren Schweinen 18 Tage lang eine chemisch definierte Aminosäuren-Basaldiät (147,7 g Protein/kg, 14,43 MJ Energie/kg, 4000 mg L-Cystein/kg) mit zusätzlich 1150, 1725 oder 2300 mg L-Methionin/kg Futter. Beobachtet wurden dabei Erhöhungen der Tageszunahme an Gewicht, der täglichen Nahrungsaufnahme, der täglichen Methioninaufnahme, Aufnahme:Futter-Ratio und Gewichtszunahme steigend mit zunehmender Methioninzufuhr. Sowohl am Beginn, als auch am Ende der Studie, wurden einige der Schweine geschlachtet, um die Ganzkörperzusammensetzung und die Methioninretention zu untersuchen. Untersucht wurde außerdem die Bereitschaft der Schweine, mit diversen Aminosäuren angereicherte Futtermischungen aufzunehmen, wobei Futtermischungen mit Methionin bevorzugt verzehrt wurden [CHUNG, 1992].

Die Anteile an Körperprotein, Körperwasser und Körperfett wurden durch die höheren Methioningaben nur wenig beeinflusst, während die Konzentration der Körperasche zurückging. Der Bedarf an bioverfügbarem Methionin für Schweine mit 10-20 kg Körpergewicht beträgt bei einem Überschuss an Cystein 2550 mg/kg. Dies zeigte, dass die verwendeten Methioningaben 45,1%, 67,6% und 90,1% der Verfügbarkeit repräsentierten. Die Steigung der Retentionsgeraden zeigte, dass 71,7% des absorbierten Methionins im Gesamtkörperprotein abgelagert wurde. Der tägliche Bedarf für Methionin wurde in dieser Studie als 57 mg, bei einem durchschnittlichen Körpergewicht von 14 kg, ermittelt. Dies sind 4 mg/kg Körpergewicht und zeigte einen niedrigeren Wert, als bei früheren Studien ermittelt wurde [CHUNG, 1992].

Chung et al ermittelten, dass Cystein bei wachsenden Schweinen bis zu 80% des Bedarfs an schwefelhaltigen Aminosäuren liefern kann, bei weiblichen Schweinen sogar über 90% [CHUNG, 1992].

Zusammenfassend zeigte die Studie also, dass mit Erhöhung der Methioninaufnahme die freiwillige Futteraufnahme erhöht wurde. Daraus resultierte die Erhöhung sowohl der Methioninspeicherung, als auch der Protein-, Wasser- und Fettaufnahme. Daher zeigten die Schweine auch erhöhte Gewichtszunahme. Es wurde demonstriert, dass die chemisch definierte und mit schwefelhaltigen Aminosäuren angereicherte Diät im Vergleich zur verwendeten Kontrolldiät, die 200 g Protein/kg Futter beinhaltete, die Gewichtszunahme sowie die Bereitschaft, Futter aufzunehmen und die Stickstoff- und Energieretention verbesserte [CHUNG, 1992].

6 Material

6.1 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
Bleiche	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, NewYork
Folinat (Ca)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Folsäure (Pteroylglutaminsäure)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Glucose	Roth, Karlsruhe
Guanosin 5'-PO ₄	Sigma-Aldrich, Steinheim
Glycerin	Roth, Karlsruhe
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
Methionin	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, NewYork
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 5PO ₄ (Na)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Salzsäure 25%	Roth, Karlsruhe
Tetracyclin-Hydrochlorid	Roth, Karlsruhe
Thiamin HCl	Roth, Karlsruhe
Thymin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Uridin 5'-PO ₄	Sigma-Aldrich, Steinheim
Zink Dichlorid	Sigma-Aldrich, Steinheim

6.2 Geräte

Autoklav Varioklav, Dampfsterilisator 500	H+P Labortechnik, Oberschleissheim
Kühlbrutschrank	Selecta, Barcelona
Laminar Flow	ESCO Ehret, Tulln
Magnetrührer RCT basic, beheizbar	IKA, Staufen
Millipore-Anlage	Seven Easy, Mettler Toledo
pH-Meter	Esco, Ehret Labor/ Pharmatechnik
Pipettierhilfe Easypet	Eppendorf, Wien
Spiritusbrenner	Roth, Karlsruhe
Stereomikroskop Wild Heerbrugg	Kern, Aarau
Waage MC 41059	Sartorius AG, Göttingen
Unterlicht intralux 6000	Volpi, Schlieren
Vortex MS1Minishaker	IKA, Staufen
Zentrifuge Jouan BR4i, multifunction	Thermo Scientific, USA

6.3 Verbrauchsmaterialien

Cellstar Tissue Culture Flasks	Greiner Bio-one, Frickenhausen
Cellstar Suspension Culture Plate, 6 Wells	Greiner Bio-one, Frickenhausen
Gummisauger	Roth, Karlsruhe
Impfösen	VWR, Wien

Pasteurpipetten	Roth, Karlsruhe
Petrischalen (3,6,9 cm)	Greiner Bio-one, Frickenhausen
Pipetten, serologisch (10-50 ml)	Greiner Bio-one, Frickenhausen
Pipettenspitzen (0,05/ 1 ml)	Greiner Bio-one, Frickenhausen
Platindraht	Roth, Karlsruhe
Zentrifugenröhrchen	Greiner Bio-one, Frickenhausen

6.4 Organismen

<i>Escherichia coli</i> OP50	Caenorhabditis Genetics Center, Minnesota
<i>Caenorhabditis elegans</i> RB 755	Caenorhabditis Genetics Center, Minnesota
<i>Caenorhabditis elegans</i> N ₂	Caenorhabditis Genetics Center, Minnesota

6.5 Unterschiede *C. elegans* N₂ und RB 755

Untenstehend ist die genetische Konstellation von *C. elegans* N₂ und RB 755 angeführt, aus der erkennbar ist, welche Genabschnitte ausgeknockt wurden.

```
...ctgtaggattgaattgtgctc [1973 BP DELETION] aaagtctgttgtagtgctc... -- Wild
type
...ctgtaggattgaattgtgctc ----- aaagtctgttgtagtgctc... -- ok521
```

> Wild type N2, with 250 bp flanks

```
cggagccattggacctacgaacagaactctctcaatttcgccatctgtggagaagccggattttcgtaacgtagtga
gtaaattttaattggcttgaagatttcaataatcgaaatttcgaatcgattccgaaaattttcaaaactataatttt
taaataaattaattacgtggaaaagttaaacaaataaattatcccaattttatttcagcattccaagagctcgtgaa
agcatacggagatcaagctcgtcacttattcaaggaggagtcgacgtgcttctcgtggaaactgttttcgattcagc
caacgccaagctgctcttttcgcgattcgcacacttttcgaggatgaaggagttccagaaatgccagttttctttc
tggaactattgttgatatgtctggacgtacgctttctgggtcaaaactgggtgaagcttttccttggtgccaccaagcaagg
aaaaccaattggtctgtaggattgaattgtgctcTTGGAGCCAAAGATATGAGACAATTTGTGGATAATATGTCGAAGTG
GTCTGATTCTTTTCATCATCTGTTATCCAAATGCTGGTAGTTAGAGAAAAAATAAAATTTATTCTAATTTCTTCCAT
TTCCAGGTCTTTCCCAATGCACTCGGAGGCTACGACGAAACTCCTGAAGAGATGGCTGATGTTCTTCGAGAATTCGCTA
GAGACGGACTTGTGAATATCATTGGTGGATGCTGTGGTACTACTCCAGATCACATTAATGCCATGTACAAGGCTGTGC
AAGGAATCACACCACGTGTCCACCACAAGATCCTCATGCTGGAAAAATGCTGCTCTCGGACTTGAGCCATCTATCG
TCGGGCCCCGAAACCAATTTGTGAACATCGGGGAGCGCTGTAACTCGCAGGATCTCGTCGATTCTGTAACCTTATTA
AAAATGAGAATTACGATACGGCGATTGACGTGGCTCGTGTGCAAGTCGACAGTGGAGCTCAAATCTAGATGTGAATA
TGGATGATGGTCTTCTTGATGGTCCATATGCAATGTCAAAGTTCCTTCGTCTCATATCCTCGGAGCCAGATGTCGCCA
AAATTCAGTTTTCGATTGATTCTTCGGATTTCGATGTTATTATTGCTGGCCTCGAGTCTGCTGAGGAAATGTGTAG
TCAACTCGATTTTCGTGAAGGAAGGAGAAGAAAAGTTCAAGGAACGTGCTCGAATCATCAAGCGATACGGTGTCTGTG
TGGTCTGTGATGGCGTTTCGATGAACAAGGGCAAGCTGCGGAGACGGATCCGAAGTTCGAGATTTGCGAAAGATCCTACA
GAATTTCTACGGAAGAGGTTGGATTCAATCCAAATGATATCATTTTTGACGCCAACATTCTCACTATTGCAACTGGAA
TGGAAGAGCATTCGAACTATGGAATGTATTTTATTGAGGCAGCTCGTATGATAAGAGAGAATCTGCCAGGAGCTCATG
TGTCTGGAGGTGTATCCAATATTTTATTCTCATTCCTGGAATGGAAGCGATTTCGTGAAGCTATGCATTCCTGTGTTT
TGTTCTACGCAATCAAAGCTGGAATGGACATGGGAATCGTGAACGCTGGAGCTCTTCCAGTTTACGAGGATATTGATA
AGCCACTTCTGCAACTTCTAGAAGATCTTCTTTTCAATCGGGATCCAGAAGCGACCGAAAAAGCTTCTTGTGCTGCTG
AAGAAATGAAGAAGGACGGAAAGAAGGCTGACACGAAGACTGATGAATGGAGATCATTTGAGACCATGGGGCTGGA
AGTTTGCTCTCGTGAAGGGAGTTGATCAGTTTGTGTGCTGATACCGAAGAAGCTAGACAGAATACTGCCAAATATC
CAAGGTGTGTACCGATTCTGATATCCATAATTAATTACTTTCTTTCAGACCTTTGAACGTTATTGAACGACCATTTGA
TGGATGGAATGGCAGTCGTTGGAGAGCTGTTTCGGAGCCGGAAAAATGTTCTCCACAAAGTTATCAAAATCAGCCAGAG
TTATGAAGAAAGCAGTTGCTCATCTTCTTCCATTTATGGAAATTGAACGACAAGCTAATATTGAGACCATGGGGCTGG
CTGAAGATGAAAGTCCATATCAGGGTACTGTAGTTATTGCTACAGTCAAAGGAGATGTTTATGACATTGGAAAAGAATA
TTGTGTCTGTTGTGTTGGGATGCAATAATTTCAAAGTTGTGCGATCTTGGCGTCATGACTCCCTGCGAAAACATCATCA
AGGCTGCAATTGAGGAGAAGGCTGACTTTATCGGACTCTCTGGACTCATTACACCTTCTCTCGATGAAATGGTATATG
TTGCCAAAGAGATGAACAGAGTTGGATTGAATATTCATTGCTCATTGGCGGAGCTACAACCTTCCAAAACCCATACTG
CTGTCAAGATCTCTCCAAGATATCCTCATCCAGTTGTACATTGTTTGGATGCTTCaaagctctgtttagtgtgctctt
cgctgtctgatatgtctgttcgtgatgctttcttgcaagatttgaatgaagattatgaagatgaagtttatagcttt
tgaagttactcatgacttacctaaaacattttcaggtgcgccaagaacattacgcttactgaaagatcgccgcttc
actgatctcaataaaaaccgcgagaagaattcaagatcgactgggacaagtttacagccgtcaagccttctttgtc
ggacgccgtgaatatcaaaactttgatctcaacgaattgattccctacattgattggaagccgttcttcgatgtttgg
caactgagaggaaaatacccgaaatcgagttatccgaagatctttgatgacgcggatgttgggtgctgaggccaagaag
gttttcgatgtaagtttttagctcattattttttcaatttttgaaattcaggatgctcaaacatgggtcaagaagct
tatcgatga
```

> WBVar00091808 with 250 bp flanks

```
cggagccattggacctacgaacagaactctctcaatttcgccatctgtggagaagccggattttcgtaacgtagtga
gtaaattttaattggcttgaagatttcaataatcgaaatttcgaatcgattccgaaaattttcaaaactataatttt
taaataaattaattacgtggaaaagttaaacaaataaattatcccaattttatttcagcattccaagagctcgtgaa
agcatacggagatcaagctcgtcacttattcaaggaggagtcgacgtgcttctcgtggaaactgttttcgattcagc
caacgccaagctgctcttttcgcgattcgcacacttttcgaggatgaaggagttccagaaatgccagttttctttc
tggaactattgttgatatgtctggacgtacgctttctgggtcaaaactgggtgaagcttttccttggtgccaccaagcaagg
aaaaccaattggtctgtaggattgaattgtgctcaaagctctgtttagtgtgctcttcgctgtctgatatgtctgttcgt
gatgctttcttgcaagatttgaatgaagattatgaagatgaagtttatagctttttgaagttactcatgacttacct
aaaacattttcaggtgcgccaagaacattacgcttactgaaagatcgccgcttactgatctcaataaaaaccgcga
gaagaaattcaagatcgactgggacaagtttacagccgtcaagccttctttgtcggacgccgtgaatatcaaaactt
tgatctcaacgaattgattccctacattgattggaagccgttcttcgatgtttggcaactgagaggaaaatacccgaa
tcgcagttatccgaagatctttgatgacgcggatgttgggtgctgaggccaagaaggttttcgatgtaagtttttagctc
attattttttcaaattttggaattcaggatgctcaaacatggctcaagaagcttatcgatga
```

(Auszug aus www.wormbase.org)

7 Methoden

7.1 Kultivierung von *Caenorhabditis elegans*

C. elegans wird vorrangig auf NGM-Platten gehalten. Diese werden mit *E. coli* OP50 beimpft, welche als Nahrung für die Würmer dienen. Die Umsetzung der Würmer von Platte zu Platte erfolgt mit einem Platinpick, mit welchem einzelne Würmer übertragen werden können. Auf diese Weise können unterschiedliche Würmer oder auch nur einzelne Stadien, je nach Gebrauch, auf neue NGM-Platten gepickt werden.

C. elegans RB 755 wurden für die Versuche ins Flüssigmedium überführt. Da es keine Literatur zu diesem Stamm diesbezüglich gibt, war nicht abzusehen, wie die Würmer darauf reagieren.

Um die gesamte Population einer Platte ins Flüssigmedium zu übertragen, wird eine Platte, mit vielen Würmern und möglichst wenig Bakterien, mit M9-Puffer gespült. Dazu werden etwa 5 ml M9-Puffer auf die Platte mit den Würmern pipettiert und die gesamte Flüssigkeit wieder aufgesaugt. Dies wird zweimal wiederholt. Würmer, die dabei am Agar hängen bleiben, können vorsichtig mit einer Impföse gelöst werden. Diese Flüssigkeit beinhaltet jedoch auch die *E. coli* OP50, weshalb die übertragenen Würmer mehrmals gebleached – gebleicht - (Methode ersichtlich unter Punkt 7.6, Synchronisation) werden sollten, um sicher zu gehen, dass die Bakterien vollständig entfernt wurden. Aus diesem Grund wird den Würmern nach den beiden Bleaching-Vorgängen 100µl des Antibiotikum Tetracyclin, Konzentration 100µg/ml, hinzugefügt. Dies soll die Würmer vor Bakterien und Verunreinigungen schützen. Die Würmer werden nach dem bleachen nicht in M9-Puffer, sondern in CeHRFD-Medium (*Caenorhabditis elegans* Habitation and Reproduction Medium Folate Depletion) mit Folsäurezufuhr gezogen. Anfangs sind das Wachstum und die Entwicklung der Würmer stark reduziert. Es dauert ca. 7-10 Tage bis die Würmer an das neue Medium angepasst sind. Bei *C. elegans* N₂ reduziert sich die Zeit der Entwicklung späterer Generationen auf 4 Tage [HAMZA].

7.2 Herstellung des CeHRFD- Mediums (Caenorhabditis elegans Habitation and Reproduction Medium Folate Depletion), variiert nach HAMZA

Die Herstellung erfolgt laut Hamza et al. mit diversen Veränderungen, um das Medium für die Untersuchungszwecke zu modifizieren. So wird keine Folsäure zugesetzt, um Versuche mit verschiedenen Folsäurekonzentrationen durchführen zu können. Die Folsäure wird separat zugesetzt. Zu beachten ist, dass es sich bei dem CeHRFD-Medium um keine vollständige Folsäure-Depletion handelt, da in der im Medium vorkommenden 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 von Hamza entspricht, dem Medium zugefügt wurde.

A) Herstellung der Stocklösungen

1) Salzlösung (hergestellt in 250ml):

In 200 ml ultra-purem Wasser werden gelöst:

	250ml
CaCl ₂ x 2H ₂ O	0,05 g
MgCl ₂ x 6H ₂ O	1,025 g
Na Citrat	0,725 g
K Citrat x H ₂ O	1,225 g
CuCl ₂ X2H ₂ O	0,0175 g
MnCl ₂ x 4H ₂ O	0,05 g
ZnCl ₂	0,025 g
Fe (NH ₄) ₂ (SO ₄) x 6H ₂ O	0,15 g

Diese Lösung wird auf 250 ml aufgefüllt, sterilfiltriert und bei 4°C gelagert.

2) Vitamin und Wachstumsfaktoren (hergestellt in 50ml)

In 30ml ultra-purem Wasser werden gelöst:

	50 ml
N- Acetylglucosamin	0,075 g
Alanin	0,075 g
Niacinamid	0,0375 g
Pantethein	0,0187 g
Pantothenat Ca	0,0375 g
Pyridoxamin 2HCl	0,0187 g
Pyridoxin HCl	0,0375 g
Riboflavin 5 PO4 Na	0,0375 g
Thiamin HCl	0,0375 g

Weiters werden zu je 2,5ml einer 1N KOH hinzugefügt:

	2,5 ml
p-Aminobenzoessäure	0,0375 g
Biotin	0,0187 g
Cyanocobalamin	0,0187 g
Niacin	0,0375 g
Pyridoxal 5- phosphaht	0,0187 g

Somit werden insgesamt 12,5ml KOH-Lösung gewonnen. Diese Mischung wird zu den vorherigen 30 ml hinzugefügt.

Nun werden 0,0187 g DL-6,8- Thioctic Säure in 0,5 ml Ethanol gelöst und ebenfalls beigefügt.

Die Stocklösung wird nun auf 50 ml mit ultra-purem Wasser aufgefüllt, durch Filtration sterilisiert und kann bei -20°C gelagert werden.

3) Nukleinsäure Mix (hergestellt in 50ml)

Zu 30ml ultra-purem Wasser werden hinzugefügt:

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

Diese Lösung wird auf 50 ml aufgefüllt und, nach vollständigem Lösen der Komponenten, 30 Minuten bei 121°C autoklaviert. Anschließend wird der Mix bei Raumtemperatur gelagert, da bei Kühlung einige Komponenten ausfallen.

4) Weitere Komponenten (jede einzeln als Stocklösung zubereitet)

	Konzentration	hergestellt	Einwaage
KH ₂ PO ₄	61,3g/L	50 ml	3,065 g
Cholin	5,9g/100ml	50 ml	2,95 g
Inositol	4,32g/100ml	50 ml	2,16 g
Glucose	263g/L	200 ml	52,6 g
Cytochrom C	0,1g/20ml	25 ml	0,125 g
Hemin Chlorid	1mg/ml in 0,1 N NaOH	25 ml	0,025 g
HEPES	1M Stock	50 ml	13,015 g
Cholesterol	5mg/ml in Ethanol	50 ml	0,25 g
Lactalbumin	17g/100ml	50 ml	8,5 g

Hemin Chlorid muss mittels verdünnter HCl auf pH 8 eingestellt werden. Wird es zu sauer, d.h. unter pH 6, fällt es aus.

Jede einzelne Stocklösung wird separat durch Filtration sterilisiert.

B) Herstellung des Mediums (800ml):

Die Herstellung des Mediums erfolgt unter sterilen Bedingungen. Die folgenden Schritte werden unter dem Laminar-Flow durchgeführt.

Die Sterilisation erfolgt mittels Bottletop-Filter (Porengröße 0,2 µm) unter Zuhilfenahme der Vakuumpumpe.

Folgende Lösungen werden nacheinander auf den Filter überführt:

- 10 ml Wasser (MilliQ)
- 10 ml Cholin
- 10 ml Vitamin und Wachstumslösung
- 10 ml Inositol
- 10 ml Cytochrom C

Nun werden 240 ml Wasser (MilliQ) hinzugefügt und die Lösung mittels Vakuumpumpe abgesaugt. Weiters füllt man in den Bottletop-Filter:

- 20 ml Nucleinmix
- 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 (250ml) wird hinzugefügt

Wieder wird die Flüssigkeit abgefiltert. Nun erfolgt noch die Zugabe von

- 10 ml Hemin Chlorid,

welches separat durch den Filter gesogen wird, um zu vermeiden, dass die Lösung ausfällt und im Filter hängen bleibt. Schließlich wird noch

- 1 ml Cholesterol hinzugefügt.

Von dem fertigen Medium wird der pH-Wert bestimmt, welcher, ohne Zugabe von Milch, zwischen 6,0 und 6,5 liegen sollte. Das pH-Optimum liegt bei ca. 6,3.

Verwendet wird dieses Medium unter Zugabe von 20% Milch. Bevor *C. elegans* in das Medium überführt wird, wird die Milch hinzugefügt, welche vor Verwendung durch Auftragen auf BHI-Agar-Platten auf bakterielle Verunreinigungen überprüft wird. Dazu wird 1 ml der Milch auf die Platten geträufelt und diese über 48 Stunden inkubiert, eine Platte bei Raumtemperatur und eine Platte bei 37°C im Brutschrank. Sind diese Platten frei von Bakterien, kann die Milch aliquotiert und verwendet werden. Die Lagerung erfolgt eingefroren bei -20°C.

7.3 Herstellung der Folsäurestammlösung

Die verwendete Folsäure besteht aus einer Mischung aus Folsäure und Calcium-Folinat ((2S)-2-[[4-[(2-amino-5-formyl-4-oxo-5,6,7,8-tetrahydro-1H-pteridin-6-yl)methylamino]benzoyl]amino}pentanedioic acid calcium salt). Um 10 ml einer 10x Folsäuremischung, das heißt die 10fache Menge, die sich im CeHR-Medium von Hamza befindet, herzustellen, werden 37,5 mg Calcium-Folinat in maximal 5 ml KOH gelöst. Anschließend werden 75 mg Folsäure (die in wenig destilliertem Wasser gelöst wurde) hinzugefügt und mit destilliertem Wasser auf 10 ml aufgefüllt. Diese wird in Cryoröhrchen aliquotiert und bei -20°C gelagert.

Für diese Arbeit wurden, außer der 10x FS, zusätzlich 1x FS, 2,5x FS, 5x FS, sowie 1/10x FS verwendet, welche durch Verdünnung der 10x FS mit M9-Puffer hergestellt wurden. Bei der 1x FS sind pro ml (Well) 7,5 µg Folsäure und 3,75 µg Ca-Folinat enthalten (die Menge an Folsäure, die durch die im Medium enthaltene Milch zugefügt wurde, wurde nicht berücksichtigt).

7.4 Herstellung der Methioninstammlösung

Für diese Arbeit wurde eine 10x konzentrierte Methioninlösung hergestellt, welche anschließend für die jeweiligen Versuche, je nach Gebrauch, verdünnt wurde. Dazu werden 151 mg Methionin eingewogen und auf 10 ml mit destilliertem Wasser aufgefüllt. Diese Lösung wird sterilfiltriert, in Cryoröhrchen

aliquotiert und bei -20°C gelagert. In den Versuchen ist pro ml (Well) die Menge von 30,2 µg Methionin enthalten. Dies ergibt sich aus der Menge an Methionin im CeHRFD-Medium und der zusätzlich zugegebenen Menge an Methionin (die Menge an Methionin, die durch die im Medium enthaltene Milch zugefügt wurde, wurde nicht berücksichtigt).

7.5 Mediumwechsel

Der Mediumwechsel dient dazu, die Würmer optimal mit Nährstoffen zu versorgen. Hierbei wird das Medium abgenommen und frisches Medium hinzugefügt. Die Arbeitsschritte sind wie folgt:

- Die Arbeiten werden steril unter dem Laminar-Flow durchgeführt.
- In ein 25 cm² Zellkultur-Flask werden 8 ml CeHRFD-Medium, 2 ml Milch (0,1% Fett) und Folsäure vorgelegt.
- Der Inhalt des alten Flasks wird in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen pipettiert und bei 4°C und 800 g für eine Minute zentrifugiert.
- Der Überstand wird nun mittels Vakuumpumpe und Pasteurpipette abgesaugt, sodass nur noch das Wurm-Pellet im Zentrifugenröhrchen verbleibt.
- Aus diesem Pellet werden mit Hilfe einer Pasteurpipette ca. 3 – 4 Tropfen der Wurmsuspension in das neue 25 cm² Zellkultur-Flask mit frischem Medium überführt.

7.6 Synchronisieren/ Bleachen der *C. elegans*

Der Sinn dieser Methode ist es, ein annähernd gleiches Wachstumsstadium der Würmer zu erzielen, indem eine gemischte Wurmpopulation mit Chemikalien behandelt wird, sodass die Würmer aufbrechen und die Eier, welche sich in den Körpern der Würmer befinden, heraustreten. Die Eier weisen eine Schutzhülle auf, die sie eine kurze Zeit, etwa 10 Minuten, vor den aggressiven Chemikalien schützt [NASS, 2007]. Die auf diese Weise isolierten Eier, deren

Schlüpfvorgang einen zeitlichen Unterschied von bis zu 8 Stunden aufweisen, können aufgrund der Überführung in M9-Puffer synchronisiert werden. Die geschlüpften L1-Larven entwickeln sich im M9-Puffer nicht weiter, da die dazu erforderlichen Nährstoffe nicht vorhanden sind. Synchronisierte L1-Larven in M9-Puffer sollten nach spätestens drei Tagen ins Medium überführt oder der Puffer gewechselt werden.

- Die Lösung mit der gemischten Wurmpopulation wird in ein steriles Zentrifugenröhrchen pipettiert und bei 4°C und 800 g für 4 Minuten zentrifugiert.
- Der Überstand wird entfernt, das Pellet mit 10 ml 0,1N NaCl-Lösung resuspendiert und 5 Minuten lang auf Eis inkubiert.
- Der Überstand wird erneut abgesaugt und je nach Pelletgröße mit 1,5 ml, 3 ml, 6 ml, 9 ml usw. 0,1N NaCl-Lösung resuspendiert.
- 5N NaOH und 5%ige Bleiche im Verhältnis 1:2:6 (z.B. 1 ml NaOH, 2 ml 5%ige Bleiche und 6 ml NaCl-Lösung) werden hinzugefügt.
- Diese Mischung wird nun für 8 – 10 Minuten geschüttelt bzw. am Vortex gemischt, damit die Würmer durch die Chemikalien aufbrechen und die Eier frei werden. Das Aufbrechen beginnt nach ca. 6 Minuten.
- Anschließend wird bei 4°C und 800 g für 1 Minute zentrifugiert und der Überstand abgenommen.
- Die Eier werden 2 Mal mit 10 ml sterilem Wasser gewaschen. Dabei wird beide Male 1 Minute bei 4°C und 800 g zentrifugiert und der Überstand abgesaugt.
- Nach dem zweiten Waschvorgang fügt man 10 ml M9-Puffer zu den Eiern und überführt die gesamte Lösung in ein 25 cm² Zellkultur-Flask.
- Die Eier werden über Nacht auf einem Plattformshaker bei 70 RPM und 20°C inkubiert. Am darauf folgenden Tag schlüpfen die synchronisierten L1-Larven.

7.7 Auszählen der Würmer

Um einen Populationsversuch ansetzen zu können, müssen vorher die Würmer gezählt werden. Dies wird im Doppelansatz ausgeführt.

- Die im M9-Puffer synchronisierten L1-Larven werden bei 800 g für 5 Minuten zentrifugiert, anschließend wird das Pellet mit ca. 2 ml M9-Puffer resuspendiert. Dabei wird mittels Pipette überprüft, wie viel Flüssigkeit sich insgesamt im Zentrifugenröhrchen befindet.
- Die Lösung wird gut gemischt und 2x 50 µl werden entnommen und in ein Vial überführt.
- Es wird dieselbe Menge Natriumazid hinzugefügt, um die Würmer zu immobilisieren.
- Davon werden nun 2x 40 µl mittels eines Objektträgers mit Raster ausgezählt, welche je 50 – 150 Würmer enthalten sollten. Liegt die Anzahl der Würmer unter 20, sollte die Auszählung wiederholt werden, da die Fehlerquote zu hoch ist. Die Anzahl der Würmer ist zu gering, um verlässliche Ergebnisse zu erzielen.
- Anschließend wird die Anzahl der Würmer in der Ausgangslösung errechnet und mit M9-Puffer auf 1 Wurm/ µl verdünnt.
- Bei einem Populationsversuch werden 100 µl dieser Lösung in jedes Well pipettiert, wodurch sich theoretisch 100 Würmer in einem Well mit 1 ml Medium befinden.

Um Fehler zu vermeiden, wird von den ausgezählten Wurmern der Variationskoeffizient berechnet.

$$v_r = \frac{s}{\bar{x}} * 100\%$$

Dieser sollte unter 10% betragen, damit der Versuch angesetzt werden kann, da sonst die Fehlerquelle zu hoch ist und die Auszählung wiederholt werden

muss. Liegt der Variationskoeffizient unter 10%, je niedriger desto besser, kann der Versuch gestartet werden.

7.8 Populationsversuch:

Versuchsablauf mit den Folsäurekonzentrationen 1x, 2,5x, 5x und 10x

Die unten stehende Abbildung 5 zeigt die Methode des Ansatzes. Jeder Populationsversuch wurde mit 3 biologischen Replikaten durchgeführt. Dabei beinhaltet jedes 24-Well für jede Auszählung pro Konzentration einen Doppelansatz. In einem 24-Well wurde je eine Reihe für eine Folsäurekonzentration verwendet. Die 1x FS diente bei diesem Versuch als Kontrolle. Als niedrigste Konzentration wurde hier auch die geringste Vermehrung erwartet. Weiters wurden 2,5x FS, 5x FS und 10x FS angesetzt, um herauszufinden, wie hoch die Vermehrung bei diesen Konzentrationen liegt bzw. um eventuell erkennen zu können, bei welcher dieser Konzentrationen eine optimale Versorgung mit Folsäure besteht.

						1x FS
						2,5x FS
						5x FS
						10x FS

Abbildung 5: 24-Well grafisch dargestellt: 6 Wells werden pro Konzentration angesetzt.

Zur besseren Veranschaulichung hier auch tabellarisch dargestellt:

Tabelle 3: Populationsversuch von *C. elegans* RB 755 mit Folsäure; Ansätze tabellarisch dargestellt; ersichtlich ist das Schema der Ansätze und wie viele Wells pro Auszählungstag erneut für die weiteren Auszählungen angesetzt werden

24-Well		
Dreifachansatz		
Tag der Auszählung & Medium-wechsel	FS-Konzentration	Anzahl der Wells (im Doppelansatz)
0	1x	6
	2,5x	6
	5x	6
	10x	6
3	1x	4
	2,5x	4
	5x	4
	10x	4
6	1x	2
	2,5x	2
	5x	2
	10x	2
6-Well		
9	1x	2
	2,5x	2
	5x	2
	10x	2

Vorgangsweise:

7.8.1 Mediumwechsel der Wells bei Populationsversuchen

Dieser wird an den Tagen der Auszählung, also an Tag 3, 6 und 9 durchgeführt. Am Tag 13 ist kein Mediumwechsel mehr notwendig, da dieser Tag das Ende des Versuchs darstellt.

- Die Gesamtflüssigkeit der Wells je Konzentrationsansatz wird in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Anschließend erfolgt die Zentrifugation bei 4°C und 800 g für 1,5 Minuten.
- Der Überstand wird, wie oben beschrieben, abgenommen und frisches Medium, bestehend aus 80% CeHRFD-Medium, 20% Milch und der gewünschten Folsäure- bzw. Methioninkonzentration, zu den Würmern hinzugefügt.

Nach gutem Vermischen am Vortex wird wieder je 1 ml pro 24-Well angesetzt, wobei je 2 ml für die Auszählung im Zentrifugenröhrchen belassen werden, das heißt, dass 2 Wells weniger angesetzt werden.

Die Wells werden, zwischen den Auszählungen, bei 20°C im Kühlbrutschrank auf einem Plattformshaker inkubiert

7.8.2 Populationsversuch mit Folsäure

- Am Tag 0, werden die Würmer ausgezählt und der Versuch in CeHRFD-Medium, angereichert mit 10 µl der diversen Folsäurekonzentrationen/ 1 ml Medium, wie oben ersichtlich, mit den Konzentrationen 1x FS (dient als Kontrolle), 2,5x FS, 5x FS und 10x FS angesetzt. Dazu werden 100 µl der *C. elegans* RB 755 zu je einem Well mit Medium pipettiert.
- Am Tag 3 werden die *C. elegans* RB 755 zum ersten Mal ausgezählt.
- Zur Auszählung wird 1 ml der Wurmlösung und 500 µl Natriumazid in eine Zählchale mit Raster pipettiert. Der Versuch wird im Doppelansatz durchgeführt. Die Würmer werden unter dem Lichtmikroskop gezählt.
- Die nächste Auszählung erfolgt am Tag 6.
- Bei der 1x Folsäure wird erneut der gesamte ml, im Doppelansatz mit je 500 µl Natriumazid, ausgezählt. Von den Folsäurekonzentrationen 2,5x, 5x und 10x werden 300 µl Wurmlösung in ein Vial überführt und die Würmer mit 150 µl Natriumazid immobilisiert. Aus dieser Mischung werden nun 100 µl auf einem Objektträger mit Raster unter dem Lichtmikroskop ausgezählt.
- Die nächste Auszählung erfolgt am Tag 9. Diesmal werden beim Mediumwechsel 6 ml frisches Medium hinzugefügt.
- Aus der Wurmlösung werden je Konzentration im Doppelansatz 200 µl entnommen und zu diesen 100 µl Natriumazid zugegeben. Daraus

werden anschließend 60 µl auf einem Objektträger mit Raster ausgezählt.

- Die verbleibenden 5,6 ml Wurmlösung werden im Doppelansatz in eine 6-Well Platte überführt, also 2,8 ml pro Well.
- Der letzte Zählvorgang erfolgt am Tag 13. Die verschiedenen Ansätze werden in Zentrifugenröhrchen pipettiert, woraus 200 µl im Doppelansatz entnommen werden und in ein Vial pipettiert werden. Zu diesem werden 100 µl Natriumazid hinzugefügt und 20 µl daraus auf einem Objektträger mit Raster unter einem Lichtmikroskop ausgezählt.
- Für die Berechnungen wurden die entnommenen µl berücksichtigt und auf die gesamte Menge hochgerechnet.

7.8.3 Populationsversuch mit Methionin

Der Versuch mit Methionin erfolgt auf gleiche Weise wie der Versuch mit den Folsäurekonzentrationen 1x, 2,5x, 5x und 10x. Jedoch wird zusätzlich zu der Folsäure Methionin hinzugefügt. In diesem Fall wird die Menge Methionin verdoppelt, welche sich im CeHRFD-Medium aufgrund des Aminosäurenmixes bereits befindet. Somit erfolgt der Versuch mit der zweifachen Methioninmenge. Der Versuch wird mit einer einfach konzentrierten Methioninlösung durchgeführt, von welcher pro ml 10 µl hinzugefügt werden. Auch dieser Versuch erstreckt sich über 13 Tage und wird auf dieselbe Art, wie unter Punkt 7.8 beschrieben, ausgezählt.

7.9 Populationsversuch:

Versuchsablauf mit den Folsäurekonzentrationen 1x, 1/10x und 0/6 1x

Jeder Populationsversuch wird mit 3 biologischen Replikaten im Doppelansatz durchgeführt, wobei auch hier die 1x konzentrierte Folsäure als Kontrolle dient. Die Konzentration 0/6 1x Folsäure, dies bedeutet, dass die 1x konzentrierte Folsäure erst an Tag 6 hinzugefügt wird, wurde gewählt, um festzustellen, wie hoch die Reproduktion nach anfänglicher Folsäureabwesenheit ist. Da ohne

Folsäure keine Eiablage stattfindet [STIEGLER, 2010 und LU, 1976], wurde untersucht, ob in einem späteren Stadium bei Folsäurezugabe wieder Eier gelegt werden.

- Die Würmer werden synchronisiert und am folgenden Tag (Tag 0) auf 1 Wurm/ μ l verdünnt. Es muss beachtet werden, dass für die Konzentrationen 1/10x und 0/6 1x jeweils 8 Wells einer 24-Well Platte benötigt werden, da bei jeder Auszählung ein gesamter ml entnommen werden muss. Von der 1x Folsäurekonzentration müssen nur 6 Wells angesetzt werden, da hier, wie oben beschrieben, am Tag 9 und 13 nicht der gesamte ml ausgezählt wird. Hier wird entsprechend rückgerechnet.

Die Ansätze sind tabellarisch untenstehend angeführt.

Tabelle 4: Populationsversuch von *C. elegans* RB 755 mit Folsäure; Ansätze tabellarisch dargestellt; ersichtlich ist das Schema der Ansätze und wie viele Wells pro Auszählungstag erneut für die weiteren Auszählungen angesetzt werden

24-Well Dreifachansatz		
Tag der Auszählung & Medium-wechsel	FS- Konzentration	Anzahl der Wells (im Doppel-ansatz)
0	1x	6
	1/10x	8
	0/6 1x	8
3	1x	4
	1/10x	6
	0/6 1x	6
6	1x	2
	1/10x	4
	0/6 1x	4
9	1x	2 im 6-Well
	1/10x	2 im 24-Well
	0/6 1x	2 im 24- Well

Die Auszählungen erfolgen an den Tagen 3, 6, 9 und 13, wobei an jedem dieser Tage ein Mediumwechsel, wie oben beschrieben, stattfindet. Von den Folsäurekonzentrationen 1/10x und 0/6 1x wird an diesen Tagen je 1 ml (im Doppelansatz) der Wurmlösung mit Hilfe von 500 μ l Natriumazid, einem Zehlschälchen mit Raster und einem Lichtmikroskop ausgezählt. Die verbleibenden ml werden erneut in eine 24-Well Platte pipettiert.

- Die Auszählung der 1x Folsäurekonzentration verläuft wie folgt (im Doppelansatz):

Am Tag 3 und Tag 6 wird 1 ml der Wurmlösung mit 500 µl Natriumazid zum Immobilisieren der Würmer in einem Zählschälchen mit Raster mittels Lichtmikroskop gezählt. Die restlichen ml werden in eine neue 24-Well Platte transferiert.

Am Tag 9 werden 200 µl von der Wurmlösung entnommen und mit 100 µl Natriumazid vermischt. Ausgezählt werden anschließend 60 µl auf einem Objektträger mit Raster. Die verbleibenden 5,6 ml Wurmlösung werden auf 2 6-Well aufgeteilt.

Am Tag 13 werden erneut 200 µl der Wurmlösung mit 100 µl Natriumazid vermengt. Davon werden 20 µl auf einem Objektträger mit Raster unter einem Lichtmikroskop gezählt.

7.9.1 Auswertung der Populationsversuche

Am Tag 0 befinden sich theoretisch in jedem Well 100 Würmer, auf die die Auszählungen hochgerechnet werden müssen. Von den Würmern werden Anzahl des Zuwachses in Zahl und Prozent angegeben. Mit dem t-Test wird anhand der Kontrolle (1x Folsäure) auf Signifikanz überprüft. Dabei wird die Anzahl der Würmer am Tag 6 bei der 1x Folsäure (Kontrolle) als 100% berechnet und die weiteren errechneten prozentuellen Werte auf diese Kontrolle bezogen. Es wird aus den Werten aller 3 Versuche (der 3 biologischen Replikate) der Mittelwert sowie der Standarderror of mean (SEM) errechnet.

7.10 Brood Size und Life Span

Um herauszufinden, welche Lebensdauer bei *C. elegans* RB 755 zu erwarten ist, bzw. wie hoch die Eiablage eines einzelnen Wurmes ist, werden Life Span und Brood Size Versuche durchgeführt.

Diese Versuche finden mit synchronisierten *C. elegans* in 24-Well Platten statt. Dazu wird ein einzelner Wurm im Stadium L4 in 1 ml CeHRFD-Medium mit Milch und Folsäure in ein Well eingesetzt. Dieser Wurm wird, solange die Eiablage stattfindet, täglich umgesetzt und die Eier werden gezählt. Das tägliche Umsetzen erleichtert die Auszählung der Eier bzw. bereits geschlüpfter L1-Würmer. Dazu wird der gesamte ml mit dem Wurm in ein 6-Well transferiert und mit 500 µl M9-Puffer verdünnt, damit der Wurm deutlicher erkennbar wird. Mit einer Eppendorfpipette, eingestellt auf 10 µl, wird der einzelne Wurm aufgesaugt und in ein neues 24-Well mit frischem Medium überführt.

Um erkennen zu können, wie viele Würmer tatsächlich schlüpfen, sollte mit der Auszählung noch einen Tag gewartet werden. Zur Auszählung wird die Flüssigkeit mit den Würmern in eine Zählchale mit Raster pipettiert und mit Natriumazid versetzt, um bereits geschlüpfte Würmer zu immobilisieren. Anschließend kann man die L1-Larven auszählen. Die Zugabe von Natriumazid führt dazu, dass Würmer in Eiern, die eventuell noch schlüpfen könnten, absterben. Dies könnte einen Fehler in der Arbeitsweise darstellen.

Dieser Vorgang wird solange durchgeführt, bis die Würmer keine Eier mehr legen. Danach wird täglich kontrolliert, ob die Würmer noch leben und jeden dritten Tag werden sie umgesetzt, um die Würmer mit frischem Medium und Nährstoffen zu versorgen. Der Versuch schließt mit dem Tod der Würmer ab.

Der Versuch wird mit 3 biologischen Replikaten mit jeweils 6 Würmern durchgeführt. Dies stellt lediglich einen Vorversuch dar, um für weitere Versuche, mit einer größeren Anzahl an Würmern, Richtwerte für Brood Size und Life Span geben zu können.

Zur Auswertung wird die durchschnittliche Anzahl der Würmer bzw. Larven errechnet und auch die Lebensstage der Versuchswürmer vermerkt. Die Life Span kann anschließend mit einer Kaplan-Meier-Kurve anschaulich dargestellt werden (siehe Ergebnisse Punkt 8.2)

7.11 Vermessung der Larvenstadien

Um die Würmer vermessen zu können, werden sie auf einem Objektträger mit Trypanblau gefärbt und kurz über eine Flamme gehalten. Dies bewirkt, dass sich die Würmer ausstrecken, wodurch sie unter dem Mikroskop mit Hilfe eines Lineals vermessen werden können. Zu beachten ist, dass die L1-Larven das Trypanblau nicht so gut aufnehmen, wie ältere Larvenstadien. Dies erschwert die Vermessung geringfügig.

8 Ergebnisse und Diskussion

8.1 Populationswachstum

Dieser Versuch dient dem Zweck, herauszufinden, wie sich *C. elegans* bezüglich Reproduktion und Wachstum, unter Zugabe verschiedener Folsäurekonzentrationen bzw. Methioninkonzentrationen, verhält. Ohne Folsäure stellt der Wurm die Fortpflanzung im Flüssigmedium ein, wie bei *Caenorhabditis briggsae* gezeigt wurde [LU et al; 1976].

Es wurde versucht festzustellen, bei welchen Konzentrationen an Folsäure *C. elegans* *RB 755* optimal versorgt ist bzw. wie der Wurm auf Zugabe von Methionin reagiert.

8.1.1 Populationswachstum mit Folsäure

Im Vergleich zum Wildtyp *N₂* benötigt der *C. elegans* Stamm *RB 755*, aufgrund der ausgeknockten Methionin-Synthase, für die Ausbildung zum adulten Wurm 2-3 Tage länger. Dies wurde im Labor beobachtet. Außerdem wird vermutet, dass die Reproduktionsrate nicht so hoch wie beim Wildtyp ist. Dies bedeutet, dass wesentlich weniger Eier gelegt werden, vor allem bei niedrigen Folsäurekonzentrationen. Beim Wildtyp liegt die minimale Konzentration an Folsäure, bei der die Würmer gerade noch Eier legen, unter der Konzentration 1/2000 [STIEGLER; 2010]. Diese Konzentration ist, wie man in der unten stehenden Abbildung erkennen kann, bereits um ein Vielfaches zu wenig für den Stamm *RB 755*, da dieser Typ bereits bei der Konzentration 1/10 unterversorgt ist.

In folgender Abbildung ist das Wachstum der Nematoden bei den verschiedenen Folsäurekonzentrationen erkennbar. Untersucht wurden die Würmer in CeHRFD-Medium mit Milch und Zusatz der Folsäurekonzentrationen 1x (diente als Kontrolle); 2,5x; 5x; 10x und 1/10x. Weiters wurde untersucht, wie sich der Wurm verhält, wenn die Folsäure, in diesem Fall einfach konzentriert, erst am Tag 6 seiner Lebensdauer hinzugefügt wird (im späteren 0/6 1x).

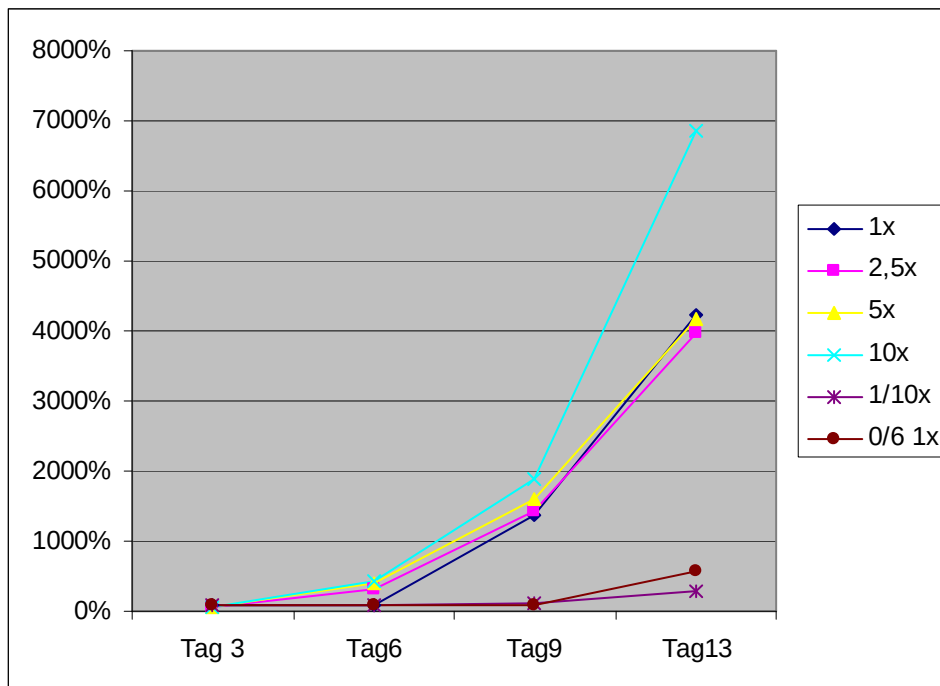


Abbildung 6: Populationswachstum von *C. elegans* RB 755 unter Folsäuregabe (1x FS, 2,5x FS, 5x FS, 10x FS, 1/10x FS und 0/6 1x FS) in CeHRFD-Medium bei 20°C; die 1x FS ist hier die Konzentration, die bei der Mediumherstellung laut Hamza enthalten ist (2,5x etc bedeutet ein Vielfaches dieser Konzentration): erkennbar sind die untersuchten Konzentrationen und das prozentuelle Wachstum der Würmer bei diesen an den diversen Auszählungstagen; die Unterschiede zwischen den Konzentrationen sind ersichtlich, so beträgt der prozentuelle Anteil am Tag 13 bei Konzentration 1/10x FS 273%, bei 0/6 1x FS 573%, bei 1x FS 4221%, bei 2,5x FS 3979%, bei 5x 4185% und bei 10x 6861% (bezogen auf die Kontrolle (1x FS) am Tag 6, welche als 100% gelten)

Wie bei den Versuchsmethoden ersichtlich, wird als Tag 0 der Tag des Versuchsansatzes bezeichnet. Bis Tag 3 findet keine Vermehrung statt, da die Würmer noch nicht geschlechtsreif sind. Aus diesem Grund ist die Anzahl der Würmer am Tag 3 mit jener am Tag 0, 100 Würmer pro Well, gleichzusetzen. Am Tag 6 ist bereits die erste Vermehrung wahrzunehmen, jedoch ist sie noch nicht so ausgeprägt. Am 9. Tag steigt die Reproduktionsrate bereits höher an und findet am Tag 13, dem letzten Tag der Auszählung, ihren Höhepunkt. Zwischen Tag 9 und 13 ist die Fortpflanzung am höchsten. Vermutlich steigt sie danach noch weiter an, jedoch stellt Tag 13 das Versuchsende dar.

Erkennbar ist der oben erwähnte Effekt auch bei der Konzentration 1/10, wobei hier die Vermehrung nur sehr gering ausfällt. Dies ist auch in Abbildung 7, einem Detailausschnitt von Abbildung 6 zu erkennen.

Bei den Konzentrationen 1x, 2,5x und 5x sind die Unterschiede im Gegensatz zu der 1/10x Folsäure und der 10x Folsäurekonzentration gering. Beträgt das Wachstum vom Tag 9 auf Tag 13 bei der einfachen Folsäure etwa 2862% (entspricht 4049 Würmern), so ist bei der Konzentration 1/10 lediglich ein Zuwachs von etwa 164% (entspricht 164 Würmern) ersichtlich. Im Vergleich dazu nimmt das Wachstum vom Tag 9 auf Tag 13 bei der 10x Folsäure den Wert 4985% (9871 Würmer) an. Dies zeigt, dass unter den verwendeten Konzentrationen die zehnfache Dosis an Folsäure als die optimale angesehen werden kann, da hier das größte Wachstum stattfindet.

Bei der 0/6 1x Folsäure wurde, wie oben bereits erwähnt, die Folsäure erst am Tag 6 hinzugefügt. Zu dieser Zeit ist der Wurm bereits geschlechtsreif und in der Lage Eier zu legen. Da ohne Folsäure keine Eiablage stattfindet [STIEGLER; 2010; LU, 1976], ist die Anzahl von *C. elegans* RB 755 auch hier bis zum 6. Tag gleich bleibend (siehe Abbildung 7 – Detailausschnitt).

Nach Zugabe von Folsäure beginnt der Nematode jedoch Eier zu legen, ein Zustand, der bis zum Tag 13, trotz des Alters, noch enorm ansteigt. Es scheint, als versuche der Wurm die vorherigen Defizite auszugleichen. Der Anstieg ist hier erst zwischen Tag 9 und Tag 13 ersichtlich. Grund dafür ist wahrscheinlich, dass der Wurm einige Zeit benötigt, um die eingestellte Reproduktion bei Folsäureabwesenheit bei Folsäurezufuhr wieder auf zu nehmen.

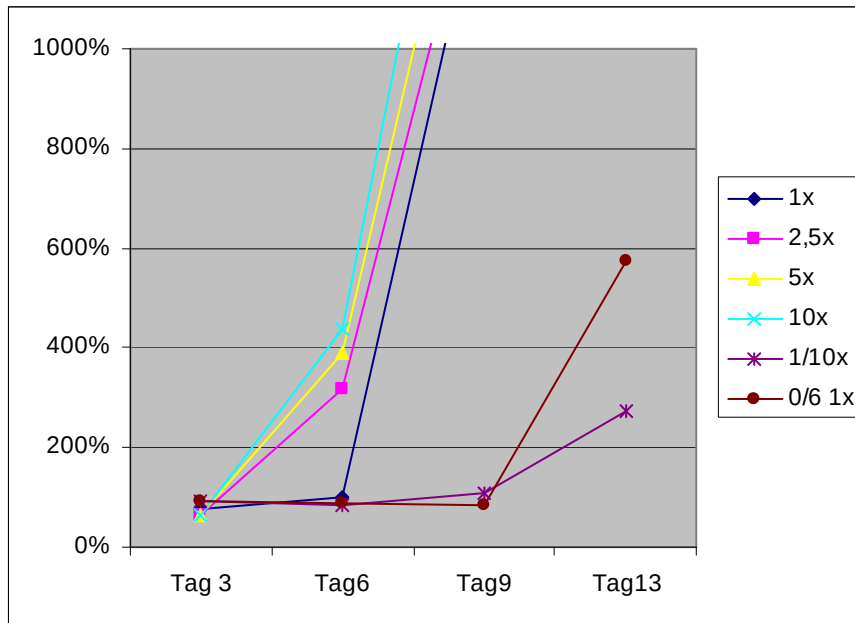


Abbildung 7: Detailausschnitt des Populationsversuches von *C. elegans* RB 755 mit Folsäure in CeHRFD-Medium bei 20°C; die 1x FS ist hier die Konzentration, die bei der Mediumherstellung laut Hamza enthalten ist (2,5x etc bedeutet ein Vielfaches dieser Konzentration); ersichtlich sind die Folsäurekonzentrationen 1/10x und 0/6 1x und die Vermehrungen am Tag 9 und Tag 13; zwischen diesen Tagen findet bei der 1/10x Folsäure ein Anstieg von 164% und bei der 0/6 1x Folsäure ein Anstieg von 488% statt (bezogen auf die Kontrolle (1x FS) am Tag 6, welche als 100% gelten)

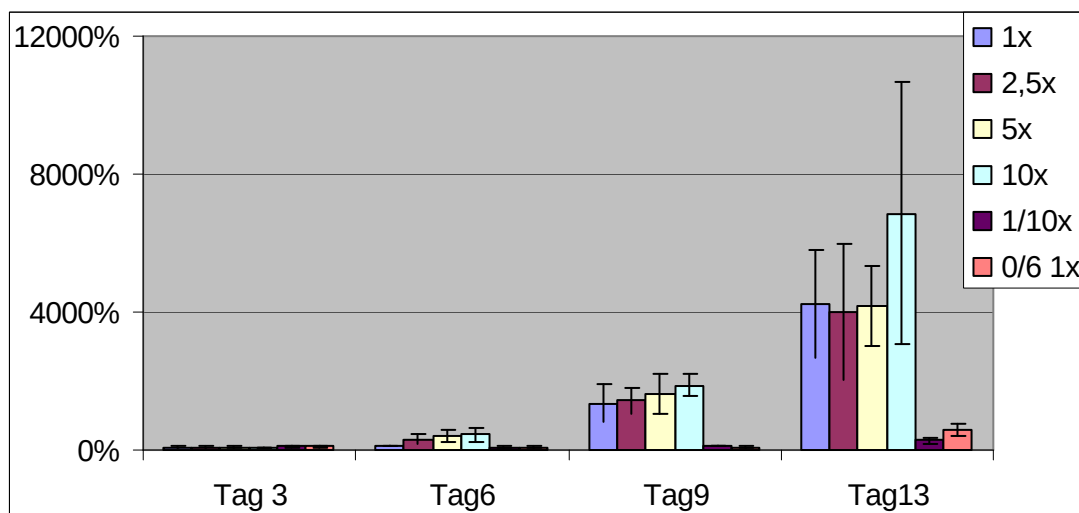


Abbildung 8: Balkendiagramm des Populationsversuch von *C. elegans* RB755 mit Folsäure in CeHRFD-Medium bei 20°C , die 1x FS ist hier die Konzentration, die bei der Mediumherstellung laut Hamza enthalten ist (2,5x etc bedeutet ein Vielfaches dieser Konzentration); inklusive Standardabweichung: zu sehen ist die Reproduktionsrate an den diversen Tagen der Auszählung, sowie die Standardabweichung der Mittelwerte (SEM).

In der obigen Abbildung 7, einem Detailausschnitt, ist zwischen Tag 3 und Tag 9 bei der 0/6 1x Folsäure eine leichte Abnahme der Population erkennbar. Diese Entwicklung könnte auf Fehler in der Arbeitsweise zurückzuführen sein, oder es könnten bereits Würmer verstorben sein. Dies kommt dadurch zu Stande, dass einzelne Würmer an Pipettenspitzen oder im Well hängen bleiben können. Einen weiteren Grund könnte die Höhe der Standardabweichung darstellen, da dies darauf hindeuten könnte, dass Fehler bei der Auszählung unterlaufen sind. Dadurch kann es ebenfalls zu einem Absinken der Kurve vor Tag 13 kommen. Am Tag 13 ist jedoch ein enormer Anstieg zu vermerken. Dies bedeutet, dass eine deutliche Vermehrung durch die Folsäurezufuhr stattfindet.

Wie in Abbildung 8 ersichtlich kommt es zu großen Unterschieden der Populationsgrößen von *C. elegans* RB 755 bei der Gabe von normalen bzw. höheren Folsäuremengen und niedrigen Folsäurekonzentrationen. Die Unterschiede der Populationsgrößen zwischen den Konzentrationen 1x, 2,5x, 5x, 10x FS und der 1/10x 0/6 1x FS sind an den Tagen 9 und 13 signifikant ($<0,05$). Am Tag 13 ergibt sich knapp kein signifikanter Unterschied ($<0,056$) zwischen dem Populationswachstum des Ansatzes mit 1/10 FS und dem Wachstum von *C. elegans* RB 755 bei 0/6 1x FS - Gabe. Es zeigt sich aber eine deutliche Tendenz, dass sich eine spätere Supplementation von Folsäure positiv auf das Populationswachstum auswirkt.

8.1.2 Populationswachstum mit Folsäure und Methionin

Dieser Versuch wurde durchgeführt, um herauszufinden, ob sich durch Zugabe von Methionin das Populationswachstum verändern lässt. In diesem Falle wurde die Menge an Methionin, welche bereits aufgrund der Zugabe des Aminosäuremixes im CeHRFD-Medium enthalten ist, erneut hinzugefügt. Dies bedeutet, dass die Würmer mit doppelt soviel Methionin versorgt sind wie zuvor. *C. elegans* wurde mit 1x (diente auch als Kontrolle), 2,5x, 5x, und 10x Folsäure sowie doppelt mit Methionin versorgt.

In der folgenden Abbildung ist das Populationswachstum bei Zugabe von Folsäure und der doppelten Menge an Methionin ersichtlich.

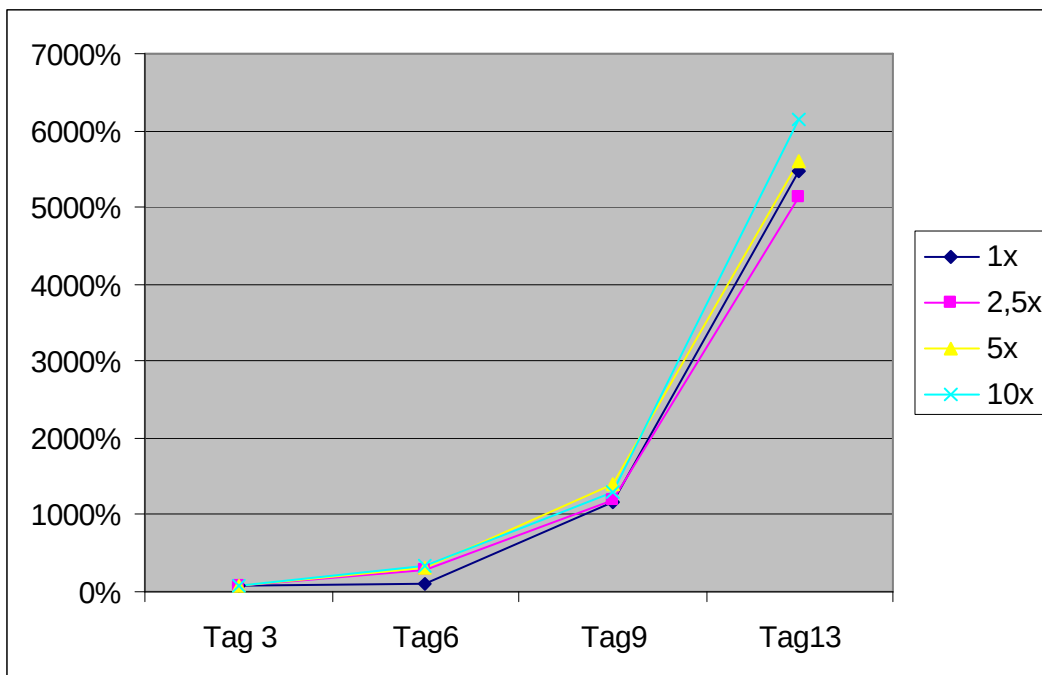


Abbildung 9: Populationswachstum von *C. elegans* RB 755 mit Folsäure und Methionin in CeHRFD-Medium modifiziert nach Hamza bei 20°C; die 1x FS entspricht der Menge, die in Medium nach Hamza enthalten ist (2,5x etc bedeutet ein Vielfaches dieser Konzentration); erkennbar sind alle Konzentrationen und das prozentuelle Wachstum der Würmer bei diesen an den diversen Auszählungstagen. Der Anstieg verläuft gleichmäßiger als bei Versuchen ohne Methionin. Am Tag 13 beträgt der prozentuelle Anteil der 1x FS 5481%, der 2,5x FS 5127%, der 5x FS 5606% und der 10x FS 6150%. Der Anteil der 2,5x FS ist geringer, da hier beim letzten Replikat am Tag 13 Verunreinigungen die Auszählung beeinträchtigt hatten (bezogen auf die Kontrolle (1x FS) am Tag 6, welche als 100% gelten)

Im Vergleich zu den Populationsversuchen ohne zusätzliche Gabe von Methionin ist eine gleichmäßigere Vermehrung bei den Versuchen mit doppelter Methioninmenge erkennbar. Die Vermehrung bei hohen Folsäurekonzentrationen ist jedoch geringer. Dies lässt vermuten, dass sich eine höhere Dosis an Folsäure mit der Gabe von doppeltem Methionin nicht so stark auf das Populationswachstum auswirkt.

Erkennbar ist dies in der folgenden Abbildung 10:

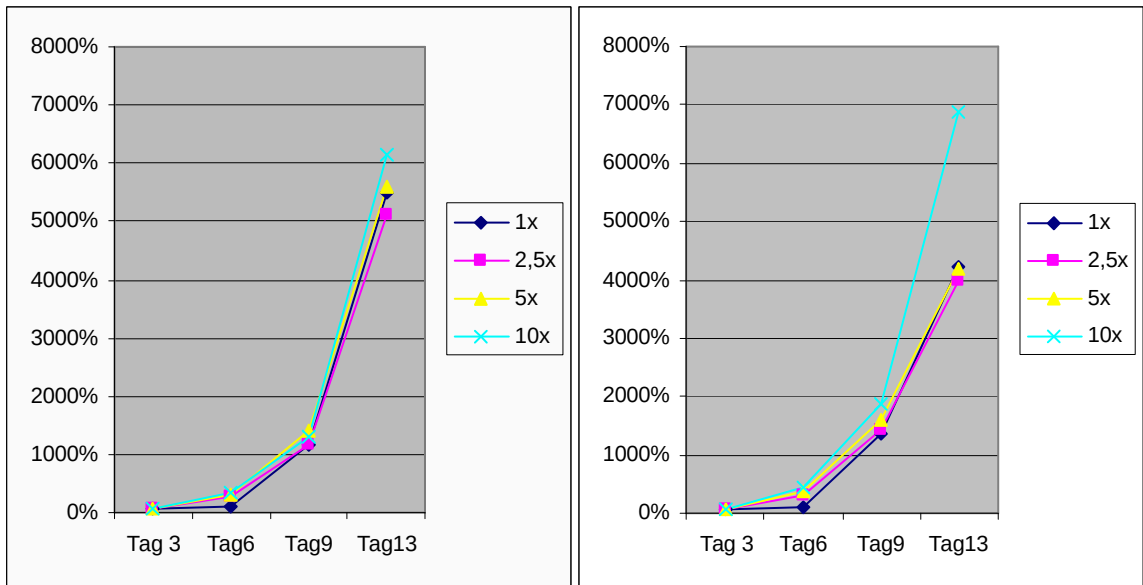


Abbildung 10: Vergleich der Populationsversuche von *C. elegans* RB 755 mit doppelter Menge an Methionin (links) und mit einfacher Menge an Methionin (rechts) in CeHRFD-Medium modifiziert nach Hamza bei 20°C; die 1x FS entspricht der Menge, die in Medium nach Hamza enthalten ist (2,5x etc bedeutet ein Vielfaches dieser Konzentration): erkennbar sind die Konzentrationen 1x FS, 2,5x FS, 5x FS und 10x FS; die Werte sind bezogen auf die Kontrolle; bei Zugabe von Methionin erfolgt eine gleichmäßigere, jedoch niedrigere Reproduktion. Es besteht daher die Vermutung, dass sich höhere Konzentrationen an Folsäure, in Verbindung mit doppelter Menge Methionin, nicht so stark auf das Populationswachstum auswirken.

Die gleichmäßige Vermehrung ist im Detailausschnitt gut ersichtlich.

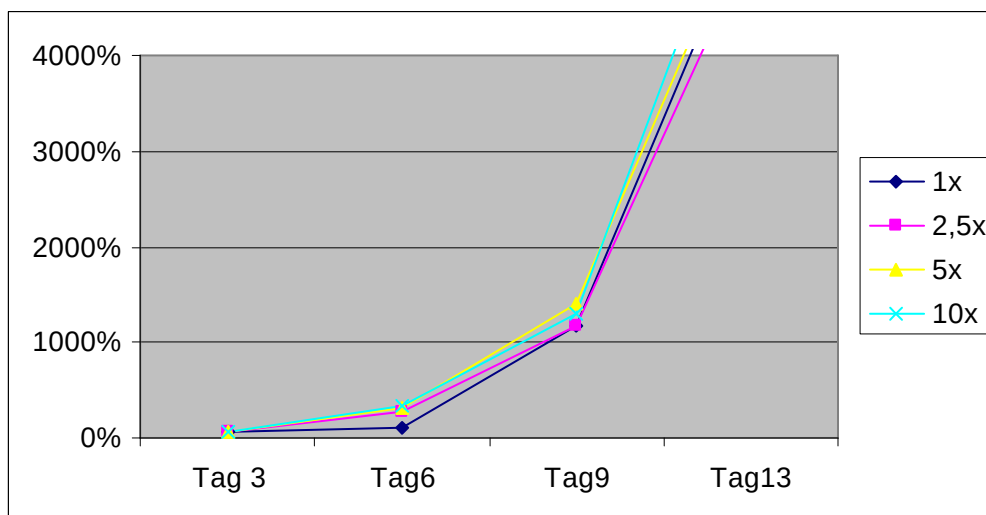


Abbildung 11: Detailausschnitt der Populationsversuche von *C. elegans* RB 755 mit Folsäure UND Methionin in CeHRFD-Medium modifiziert nach Hamza bei 20°C; die 1x FS entspricht der Menge, die in Medium nach Hamza enthalten ist (2,5x etc bedeutet ein Vielfaches dieser Konzentration): zu erkennen sind 1x FS, 2,5x FS, 5x FS und 10x FS mit jeweils doppelter Menge Methionin; die Werte sind bezogen auf die Kontrolle; die gleichmäßige Vermehrung ist im Detailausschnitt besonders gut ersichtlich. Die Kurven der Konzentrationen liegen näher beieinander und verlaufen ähnlich. Methionin zeigt bei *C. elegans* also die Tendenz, in Verbindung mit Folsäure die Vermehrung zu „standardisieren“. Das Methionin verringert bei hohen Folsäurekonzentrationen jedoch das Wachstum.

Untenstehend sind die Daten der Auswertungen von den Populationsversuchen mit doppelter Methioninmenge mit der Standardabweichung erkennbar. Diese ist relativ hoch. Die Werte ergeben sich anhand der Mittelwerte aus den prozentuellen Berechnungen. Die Berechnungen der Signifikanz ergeben nur Werte über 5%, woraus geschlussfolgert wird, dass keine Signifikanz vorhanden ist. Berechnet wurden die SEM Werte (standard error of the mean), also die Standardabweichung der Mittelwerte.

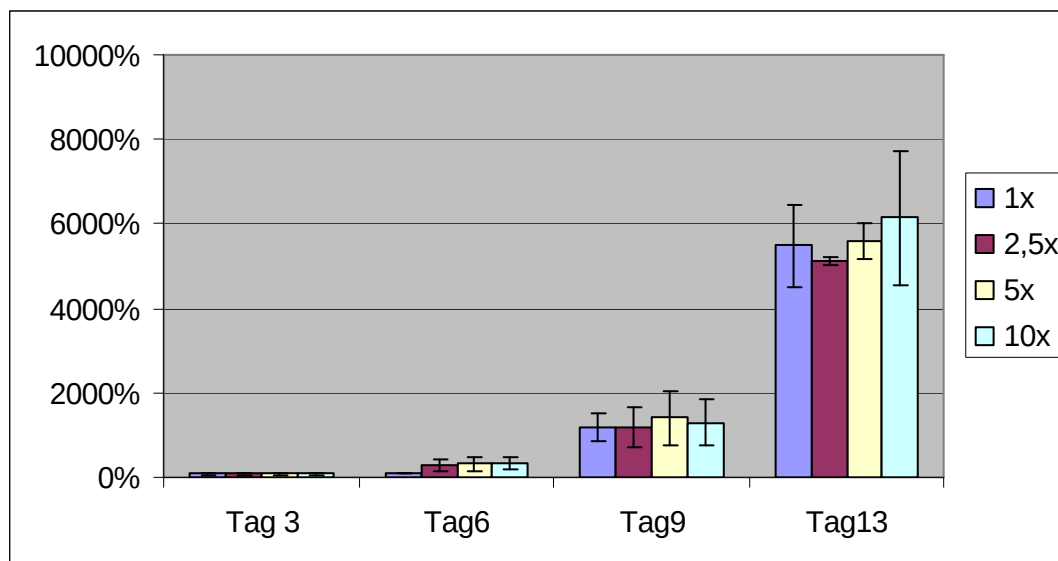


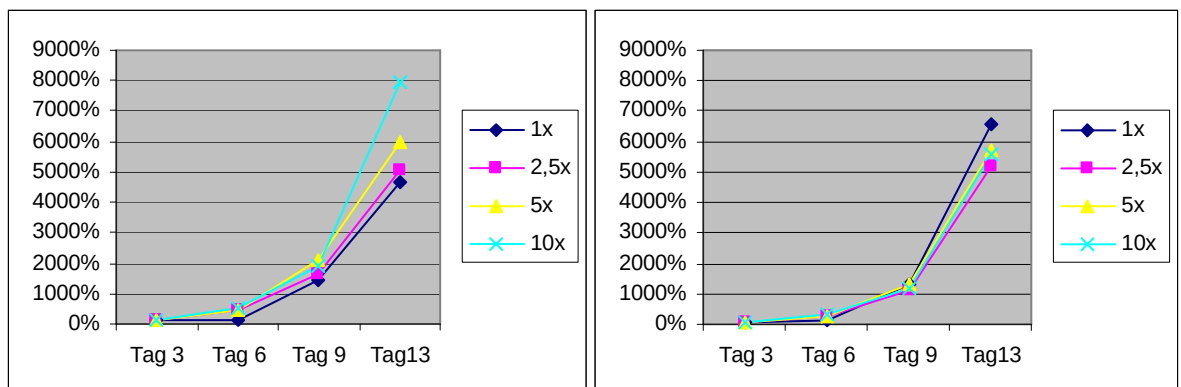
Abbildung 12: Balkendiagramm der Populationsversuche von *C. elegans* RB 755 mit Methionin in CeHRFD-Medium modifiziert nach Hamza bei 20°C; die 1x FS entspricht der Menge, die in Medium nach Hamza enthalten ist; die Werte sind bezogen auf die Kontrolle: die Standardabweichungen sind erkennbar. Diese ergibt sich aus den Berechnungen der Mittelwerte der Ansätze. Ebenfalls ersichtlich ist die Höhe der Reproduktionsrate der Auszählungstage. Die Standardabweichung ist bei diesen Replikaten nicht so hoch wie bei den Versuchen ohne Methionin. Dies ergibt sich vermutlich aus der gleichmäßigeren Wachstumsrate von *C. elegans*.

Die gleichmäßigere Vermehrung kann ein Indiz dafür sein, dass *C. elegans* auf die Methioningabe gut anspricht. Ob durch höhere Methioninzufuhr die Reproduktionsrate der *C. elegans* RB 755 an die des Wildtyps *N₂* angeglichen werden kann, muss noch untersucht werden. Andererseits verringert die Verabreichung von Methionin in Verbindung mit hohen Folsäurekonzentrationen das Wachstum. Bei niedrigeren Folsäurekonzentrationen verläuft auch das Wachstum besser. Dies könnte daran liegen, dass die hohen Dosen an Folsäure nicht verstoffwechselt werden können. Dieser Effekt wird auch Folat-trap oder Folsäure-Falle genannt.

Es könnte jedoch auch einen anderen Grund für die gleichmäßige Fortpflanzung geben, wie weiter unten diskutiert wird.

Feng et al fanden heraus, dass *C. elegans* N₂ bei Methioningabe (untersucht wurden die Konzentrationen 0,097, 0,19, 0,39, 0,78 und 1,6 mg/ml) in CeMM-Medium einem logarithmischen Wachstum folgt. Danach sank die Wachstumskurve wieder ab. Das größte Wachstum war am 23. Tag erkennbar. Methionin-freies Medium zeigte kein adäquates Wachstum [FENG, 2003]. In den hier durchgeführten Versuchen wurden 0,03 mg/ml Methionin (Dies ist jene Menge, die zugeführt wurde. Die im Medium enthaltene Milch enthält jedoch ebenfalls geringe Mengen an Methionin) verwendet. Laut der Studie von Feng et al ist diese Menge noch zu gering um eine Veränderung zu erkennen. Um herauszufinden, ob derartiges Wachstum auch bei *C. elegans* RB 755 erfolgt, muss der Versuch über längere Zeit durchgeführt werden, da die letzte Auszählung in den hier durchgeführten Versuchen Tag 13 war. Das in diesen Versuchen verwendete Medium ist CeHRFD-Medium. Feng et al verwendeten CeMM-Medium, weshalb auch hier Unterschiede im Ergebnis entstehen können.

In der Abbildung 9 ist ersichtlich, dass das Populationswachstum der 2,5x Folsäurekonzentration am Tag 13 niedriger ist, als das Populationswachstum der anderen Konzentrationen. Dies resultiert daraus, dass am Tag 13 des dritten Ansatzes bei dieser Konzentration Verunreinigungen in den Wells vorhanden waren und dies eine letzte Auszählung unmöglich machte. Der niedrigere Wert ergab sich aus den Mittelwerten der beiden anderen Ansätze. Diese zeigten niedrigere Werte, wie aus den folgenden einzelnen Diagrammen der Versuchsansätze erkennbar ist.



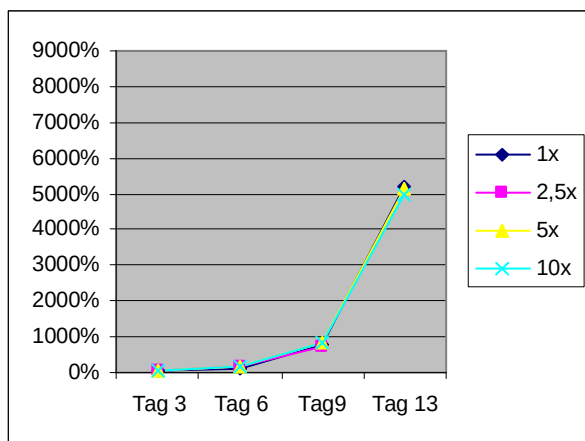


Abbildung 13: Populationsversuche *C. elegans* RB 755 mit Methionin in CeHRFD-Medium modifiziert nach Hamza bei 20°C; die 1x FS entspricht der Menge, die in Medium nach Hamza enthalten ist (2,5x etc bedeutet ein Vielfaches dieser Konzentration); die Werte sind bezogen auf die Kontrolle; Replik 1 (oben links), 2 (oben rechts) und 3 (unten links): Replik 1: die Streuung ist relativ groß am Tag 13; Replik 2: die Streuung am Tag 13 ist geringer, die Wachstumsrate niedriger, als bei Replik 1; Replik 3: es ist kaum Streuung der Daten am Tag 13 zu erkennen, die Werte nähern sich an; die Wachstumsrate ist wieder geringer. Konzentration 2,5x wurde nur bis Tag 9 geführt, am Tag 13 befanden sich Verunreinigungen in den Wells dieser Konzentration, dies machte eine Auszählung am Tag 13 unmöglich.

Wie zu erkennen ist, verringerte sich die Streuung der Werte mit jedem weiteren Ansatz. Zur besseren Veranschaulichung sind die oben dargestellten Grafiken in Werten untenstehend tabellarisch dargestellt:

Tabelle 5: Die prozentuellen Werte aus den 3 Replikaten der Populationsversuche von *C. elegans* RB 755; erkennbar ist, dass die Höhe der Werte von Replik 1 zu Replik 3 abnimmt. Ein möglicher Grund könnte eine fortschreitende Mutation sein.

Prozentueller Wert von Tag 13	Ansatz 1	Ansatz 2	Ansatz 3
1x FS	4683%	6569%	5190%
2,5x FS	5059%	5194%	---
5x FS	5959%	5736%	5122%
10x FS	7937%	5563%	4950%

Ein Grund für diese immer gleichmäßigere Reproduktion könnte eine fortschreitende Mutation der Methionin-Synthase sein, da das verwendete genetische Material der *C. elegans* immer weitergeführt wurde. Um diese These

zu untermauern, müssten die Versuche erneut mit jeweils neuen Würmern durchgeführt werden. Dies kann bewerkstelligt werden, indem zu Beginn der Versuche eine große Menge des genetischen Materials aliquotiert eingefroren wird, welches für jedes neue Replikat aufgetaut werden kann. Ist dann eine gleich bleibende Streuung bzw. ein gleich bleibender Anstieg der Werte in den Populationsversuchen zu verzeichnen, kann auf eine fortschreitende Mutation geschlossen werden.

Jedoch ist dieser Populationsversuch lediglich als Vorversuch anzusehen, da mehrere Untersuchungen notwendig sind, um genauere Aussagen hinsichtlich einer optimalen Versorgung mit Methionin treffen zu können.

8.2 Brood Size

Brood Size bei *C. elegans* RB 755 ist noch weitgehend unerforscht, vor allem im Flüssigmedium. Diese Versuche werden hauptsächlich auf NGM-Agarplatten, mit *E. coli* OP50 als Nahrung, durchgeführt. Beobachtet wurde, dass sich die Würmer bezüglich Wachstum, Reproduktion und Lebenszyklus wie der Wildtyp N_2 von *C. elegans* auf den NGM-Platten verhalten. Grund dafür könnte sein, dass die *E. coli* ausreichend Methionin produzieren, um *C. elegans* RB 755 optimal zu versorgen und dadurch das Defizit der fehlenden Methionin-Synthase ausgeglichen wird. Aus Beobachtungen im Labor geht hervor, dass *C. elegans* RB 755 im Flüssigmedium mindestens einen Tag länger für das Wachstum und die Ausbildung der Eier brauchen als *C. elegans* N_2 im Flüssigmedium und *C. elegans* RB 755, welche auf NGM-Platten mit *E. coli* OP50 gezüchtet werden. Weiters legten *C. elegans* RB 755 im Flüssigmedium weitaus weniger Eier als jene auf NGM-Platten oder der Wildtyp N_2 im Flüssigmedium.

Hier wurde der Brood Size-Versuch im CeHRFD-Flüssigmedium mit insgesamt 18 Wurmern unter Zugabe von Folsäure durchgeführt. Dokumentiert wurden die Summe der Eier und die Anzahl der daraus geschlüpften Würmer, da laut Muschiol et al. die Summe der gelegten Eier allein nicht ausreicht. Da *C. elegans* bei 20°C hauptsächlich Hermaphroditen ausbildet, welche sowohl Eier als auch Spermien produzieren, aber nicht jedes Ei mit dem Sperma befruchtet wird, müssen auch die geschlüpften Würmer gezählt werden, um genau festzustellen, wie hoch die Befruchtung definitiv ist [MUSCHIOL et al; 2009].

Zu erwähnen ist, dass die Würmer beim Umsetzen unter Stress stehen und es dadurch zum „Abwerfen“ der Eier, welche sich im Uterus befinden, kommen kann. Nun besteht die Möglichkeit, dass davon eine erhöhte Anzahl an Eiern noch nicht befruchtet ist. Diese Stressreaktion kann dadurch zu einem Fehler bei der Auswertung führen [MUSCHIOL et al; 2009]. Dieses Phänomen wurde auch bei den Versuchen mit *C. elegans* RB 755 beobachtet.

8.2.1 Auswertung des Brood Size

Für diesen Brood Size-Versuch wurde eine einfach konzentrierte Folsäure verwendet, um zu erkennen, wie sich *C. elegans RB 755* verhalten. Die Menge an einfach konzentrierter Folsäure betrug hierbei 10 µl/ml verdünnte Stammlösung (7,5µg/ml Folsäure und 3,75µg/ml Ca-Folinat). Inkubiert wurden die Würmer bei 20°C. Ausgewertet wurden drei Ansätze mit jeweils 6 Würmern. In der folgenden Tabelle ist ersichtlich, wie viele Eier jeder einzelne Wurm legte und wie viele L1-Larven daraus schlüpften.

Tabelle 6: Brood Size Versuch mit *C. elegans RB 755*; der Versuch wurde mit 18 Würmern in 3 Ansätzen (6 Würmer pro Ansatz) durchgeführt. In der Tabelle ist die Menge an Eiern bzw. geschlüpften Würmern pro Wurm ersichtlich. Die meisten Eier und auch geschlüpften Würmer weist Wurm Nr. 18 auf (71 Eier und 67 daraus geschlüpfte Würmer); die geringste Anzahl an Eiern und geschlüpften Würmern zeigten Wurm Nr.8, 12 und 13 mit jeweils 7 gelegten Eiern und 7 daraus geschlüpften Würmern; Wurm Nr. 2 und 14 werden aus der Auswertung ausgeschlossen, da die geringe Anzahl an Eiern und geschlüpften Würmern aus dem frühen Tod des Mutterwurmes resultiert.

Wurm	Gelegte Eier	Davon geschlüpfte Würmer
1	40	36
2	2	2
3	34	29
4	54	49
5	46	43
6	29	27
7	21	20
8	7	7
9	17	16
10	9	8
11	12	10
12	7	7
13	7	7
14	8	8
15	27	26
16	54	51
17	55	49
18	71	67
Gesamt	500	462

Wie bereits erwähnt, legt der Wurmstamm *RB 755* wesentlich weniger Eier, als der Wildtyp *N₂*. Im Vergleich zu Tabelle 7, legt der Stamm *N₂* der *C. elegans* durchschnittlich 81 ± 31 Eier bei 20°C [SZEWCZYK et al., 2006]. *C. elegans RB 755* hingegen legte durchschnittlich 28 ± 21 Eier bei 20°C.

In diesem Fall könnte die geringe Eianzahl auch in der einfach konzentrierten Folsäure begründet sein.

Die oben stehende Tabelle wird hier graphisch dargestellt:

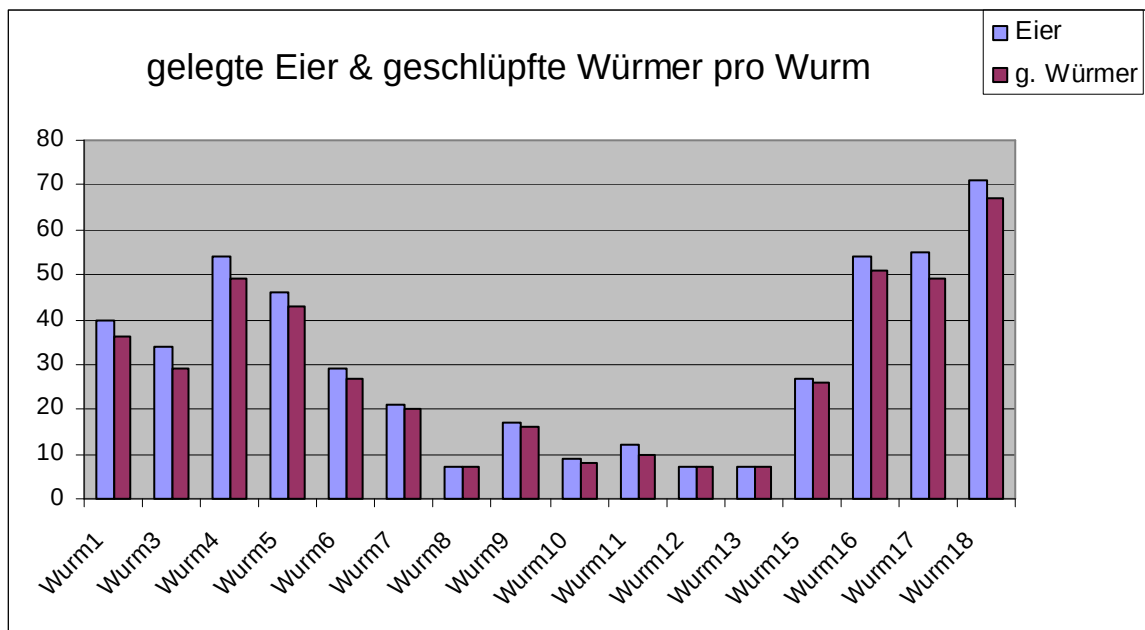


Abbildung 14: *C. elegans RB 755* in CeHRFD-Medium modifiziert nach Hamza mit 2,5x FS bei 20°C; gelegte Eier und geschlüpfte Würmer pro Wurm: Wurm Nr. 18 legte die meisten Eier, nämlich 71, aus denen 67 Würmer schlüpften. Die niedrigste Anzahl an Eiern und daraus geschlüpfte Würmern zeigten Wurm Nr. 8, 12 und 13 mit je 7 Eiern und geschlüpfte Würmern. Wurm Nr. 2 und Nr. 14 wurden aus der Wertung genommen aufgrund eines frühen Todes.

Im Durchschnitt wurden 28 Eier gelegt, wovon 26 Würmer tatsächlich geschlüpft sind. Dies zeigt eine Vitalität von nahezu 93%.

Wurm 2 legte nur 2 Eier, dies ist die geringste Anzahl der gelegten Eier und ist begründet mit dem Tod des Wurmes. Ebenso Wurm 14, welcher nur 8 Eier legte und verfrüht starb. Der Stress, dem die Würmer bei der Umsetzung ausgesetzt waren, führte in einigen Fällen, wie auch in diesen, zum Tode des

Wurmes. Aus diesem Grund wurden die Würmer aus der Bewertung genommen.

Wurm 18 legte hier die meisten Eier, nämlich 71. Davon schlüpften 67 Würmer. Die Eilegeperiode der Würmer betrug 1 bis 6 Tage, in denen die Anzahl der Eier sehr variierte. Oftmals war zu beobachten, dass die Würmer die Eier bei der Umsetzung aufgrund von Stress ablegten. In der unten stehenden Graphik ist die durchschnittliche Abgabe der Eier pro Tag ersichtlich.

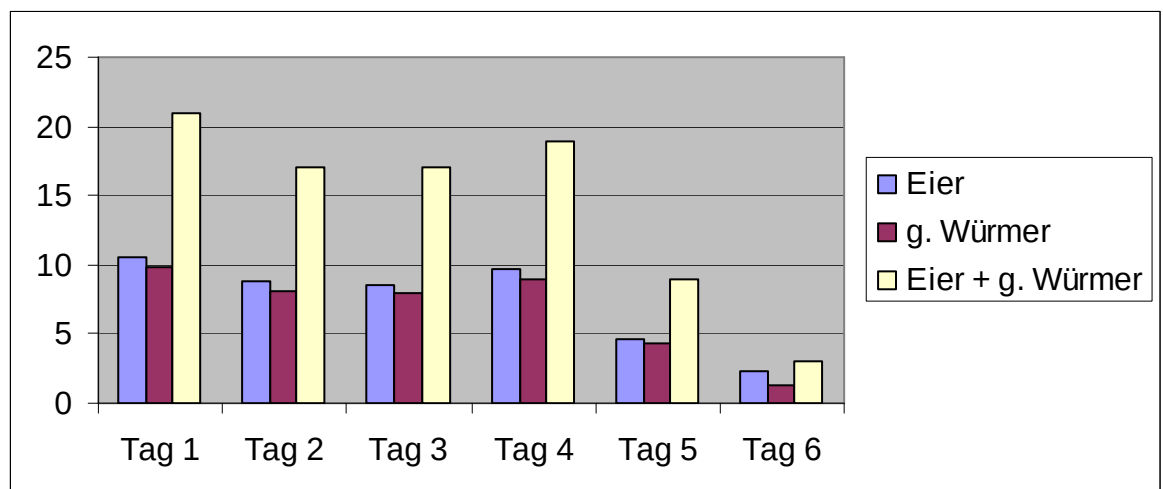


Abbildung 15: Brood Size von *C. elegans* RB 755 in CeHREFD-Medium modifiziert nach Hamza bei 20°C; die Abbildung zeigt die pro Tag gelegten Eier und geschlüpften Würmer, sowie beide Werte gesinglet. Erkennbar ist, dass die Eiablage am Tag 1 am höchsten ist und im Laufe der Eilegeperiode abnimmt. So werden am Tag 1 durchschnittlich 11 Eier gelegt und am Tag 6 durchschnittlich 2 Eier. Tag 4 stellt einen Ausreißer in der Abnahme der Eilegeperiode mit durchschnittlich 10 Eiern dar

Abbildung 15 zeigt sehr gut, dass zu Beginn der Eilegeperiode die meisten Eier produziert werden. Die Eianzahl nahm im Laufe der Zeit ab, bis die Periode abgeschlossen war. Lediglich am Tag 4 wurde eine höhere Eianzahl verzeichnet.

Einige der Würmer legten nur sehr kurze Zeit Eier ab, wodurch die Abnahme bedingt war. Dies resultierte auch aus dem verfrühten Tod mancher Würmer, da *C. elegans* RB 755 vermehrt Ausstülpungen ausbildeten, die in den meisten Fällen zum Tode führten (Diskussion darüber siehe unten stehend).

Wurm 7, 8 und 9 begannen erst am Tag 2 mit der Abgabe der Eier und legten nur eine geringe Anzahl an Eiern.

Wurm 15,16 und 17 gaben mit 6 Tagen am längsten Eier ab, wobei Nr. 16 und 17 auch eine bedeutend hohe Anzahl (54 und 55 Eier) ablegten.

Um herauszufinden, ob sich die Eiproduktion bei vermehrter Zugabe an Folsäure erhöht, sind jedoch noch weitere Studien zur Validierung notwendig.

8.3 Life Span

In Anschluss an den Brood Size-Versuch wurde die Life Span der *C. elegans* RB 755 ermittelt. Auch hier wurden drei Ansätze mit 6 Würmern durchgeführt. Dabei wurden die Würmer nicht mehr täglich, wie in der Eilegeperiode, sondern nur noch jeden dritten Tag umgesetzt.

Über *C. elegans* RB 755 gibt es in der Literatur diesbezüglich keine Angaben, weshalb hier die Life Span mit jener des Wildtyps N_2 verglichen wird, von der sich die Life Span der *C. elegans* RB 755, welche auf NGM-Platten gezüchtet werden, wenig variiert.

Über den Wildtyp N_2 gibt es in der Literatur sehr unterschiedliche Angaben über die Life Span im Flüssigmedium. Diese reichen in axenischem Medium von 18 Tagen bei 20°C [HAMZA] bis zu 38 Tagen bei 22-23°C [GERSHON & GERSHON], da die Life Span temperaturabhängig ist. In der unten stehenden Tabelle ist die Life Span pro Wurm in Tagen ersichtlich. Der Versuch wurde mit einer Temperatur von 20°C durchgeführt.

Tabelle 7: Life Span mit *C. elegans* RB 755; durchgeführt wurde der Versuch mit 18 Würmern in 3 Ansätzen (6 Würmer pro Ansatz). Die längste Lebensspanne weist hier Wurm Nr. 7 mit 61 Tagen auf. Dies ist eine relativ lange Lebensspanne, da die Würmer durchschnittlich nur 14,5 Tage am Leben waren. Die kürzeste Lebensdauer zeigte Wurm Nr. 14, der nur 8 Tage lebte.

Wurm	Tage	Wurm	Tage
1	11	10	11
2	9	11	12
3	10	12	12
4	12	13	16
5	11	14	8
6	11	15	20
7	61	16	28
8	11	17	32
9	13	18	19

Durchschnitt: 17 Tage

Durchschnitt mit Elimination des Ausreißers (Wurm 7): 14,5 Tage

Die Werte aus Tabelle 2 werden hier graphisch dargestellt:

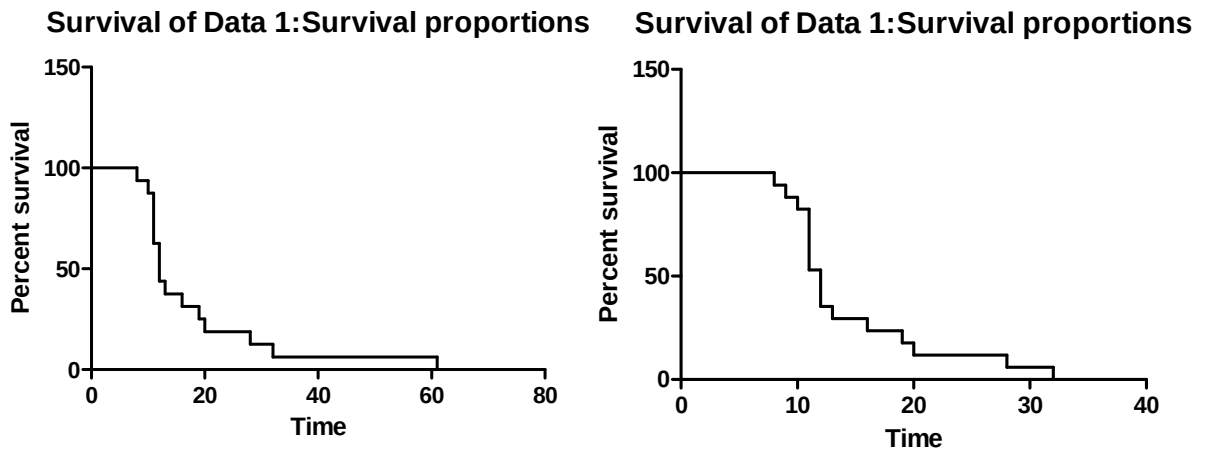


Abbildung 16: Darstellung nach Kaplan-Meier: *C. elegans* RB755 in CeHRFD-Medium modifiziert nach Hamza bei 2,5x FS bei 20°C:

Dargestellt ist die Life Span der Würmer einmal mit dem Ausreißer Wurm 7 (links) und einmal ohne (rechts): Wurm 7 lebte über 60 Tage, während andere Würmer durchschnittlich nur 14,5 Tage lebten. Wird der Ausreißer (Wurm 7) eliminiert, reduziert sich die Life Span der Würmer immens, wie in der Kaplan-Meier Kurve ersichtlich ist.

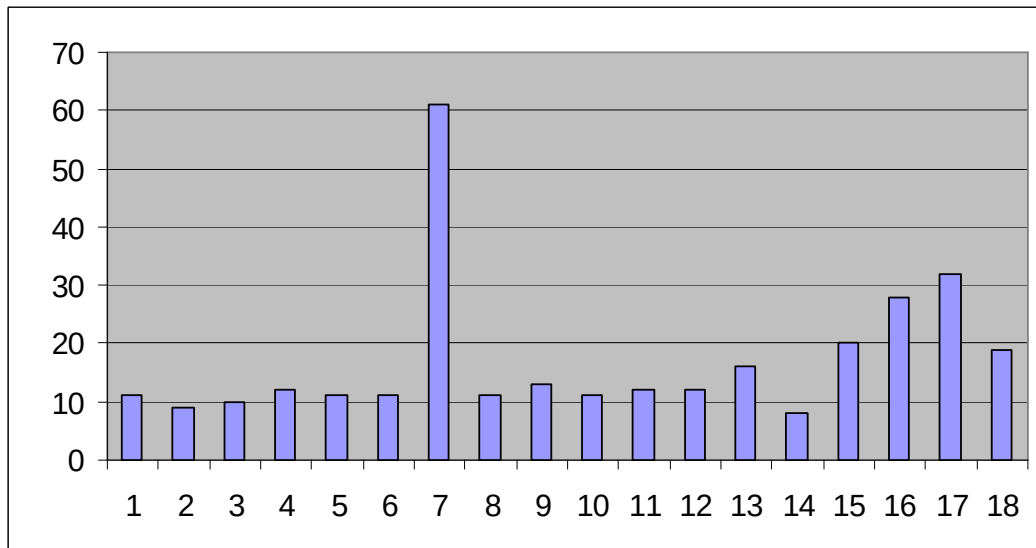


Abbildung 17: Säulendarstellung des Life Span Versuchs mit *C. elegans* RB755 in CeHRFD-Medium modifiziert nach Hamza mit 2,5x FS bei 20°C ; Lebenstage pro Wurm: abgesehen von Wurm 7, zeigte Wurm 17 mit 32 Tagen die höchste Life Span und an 3. Stelle Wurm 16 mit einer Lebensspanne von 28 Tagen. Die kürzeste Lebensdauer zeigte Wurm Nr. 14 mit 8 Tagen, gefolgt von Wurm Nr. 2, der 9 Tage lebte.

Die kürzeste Lebensdauer hatte Wurm 14 mit 8 Tagen, die längste, wie oben ersichtlich, Wurm 7 mit 61 Tagen, was überdurchschnittlich hoch war. Die lange Lebensdauer dieses Wurmes könnte in einer nicht definierten Mutation begründet sein.

Die durchschnittliche Life Span lag deutlich unter den in der Literatur genannten Werten. Gründe dafür könnten sein:

- Die Arbeitsweise benötigt Übung, damit der Wurm gut aufgesaugt werden kann. Bei fehlender Übung, vor allem im Anfangsbereich des Versuches, kann es zu Verletzungen des Wurmes kommen, welche für diesen tödlich verlaufen können.
- *C. elegans* sind beim Umsetzen hohem Stress ausgeliefert. Dies kann zu einer erhöhten Sterberate führen, vor allem mit steigendem Alter, da die Stressresistenz mit der Lebensdauer abnimmt.
- Die längere Lebensdauer der Würmer in den späteren Phasen des Versuches könnte mit einer fortschreitenden Mutation zusammen hängen.
- Auch die ausgeknockte Methionin-Synthase kann einen Grund für die kürzere Lebensdauer darstellen.
- Weiters könnte die Sterblichkeit mit diversen Ausstülpungen in Zusammenhang stehen. Diese Ausstülpungen, welche aussehen als würden Organe aus dem Inneren des Wurmes nach außen gedrückt, können als Phänotyp verstanden werden, da sie sehr häufig auftreten. Treten diese Ausbildungen auf, ist es möglich, dass der Wurm noch einige Tage am Leben bleibt. Wahrscheinlicher ist es jedoch, dass er innerhalb der darauf folgenden Stunden stirbt.

Phänotyp der *C. elegans* RB 755 bei 40facher Vergrößerung bei Raumtemperatur unter dem Lichtmikroskop: dieser Wurmstamm zeigt häufig Verknotungen des Körpers.

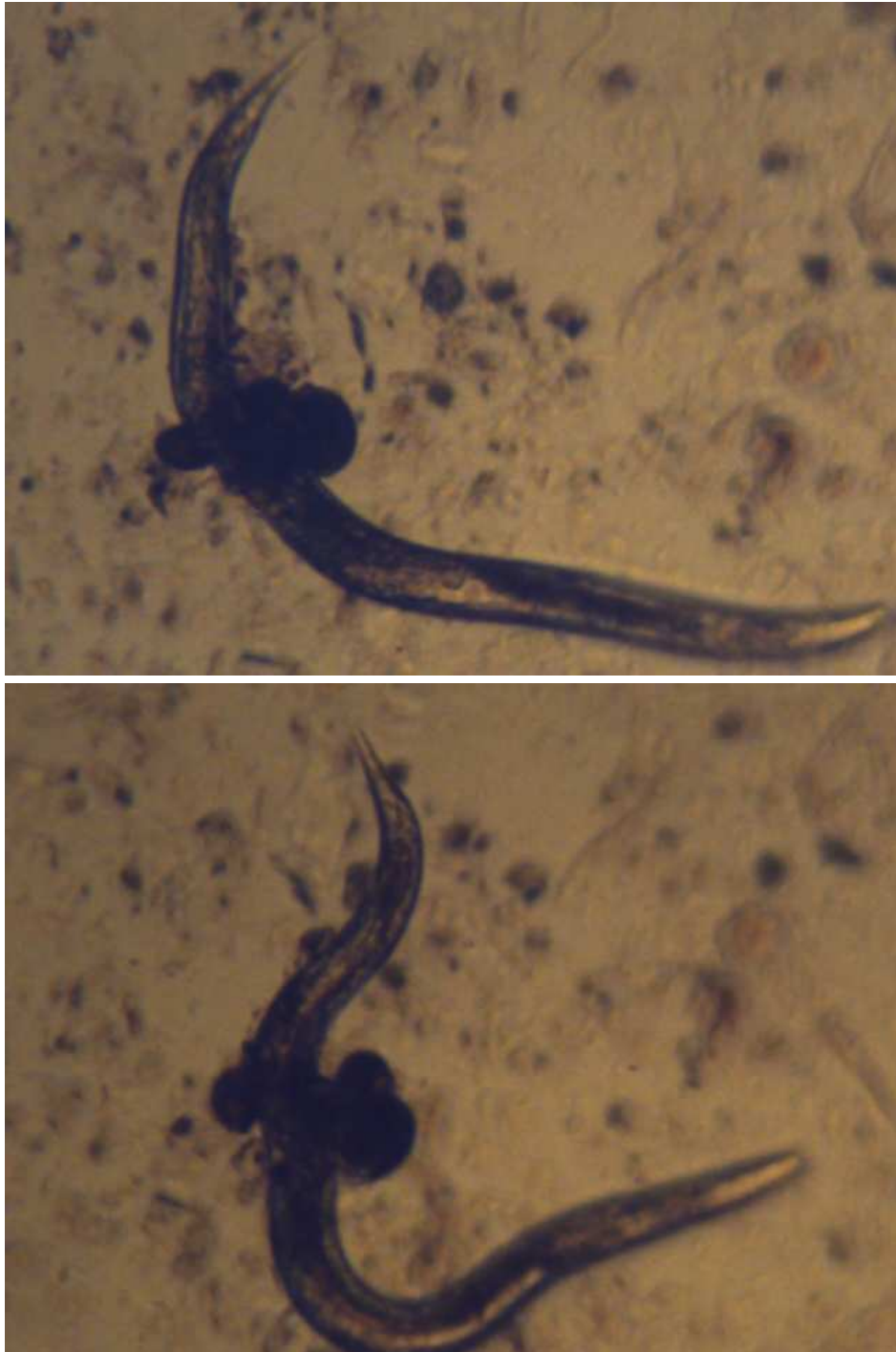


Abbildung 18: Verknotungen der *C. elegans* RB 755 unter dem Lichtmikroskop 40fache Vergrößerung bei Raumtemperatur und in CeHRFD-Medium; diese Verknotungen der Würmer können als Phänotyp verstanden werden, da sie sehr häufig vorkommen und in den meisten Fällen zum Tod des Wurmes innerhalb weniger Stunden führen.

Abgesehen von den Verknotungen der *C. elegans* RB 755 benötigen die Würmer länger für das Wachstum und wirken im Allgemeinen kleiner als der gleiche Stamm auf NGM-Platten mit *E. coli* OP50 als Nahrungsquelle. Dies ist auch bei *C. elegans* N₂ im Flüssigmedium der Fall. Zurückzuführen könnte dies darauf sein, dass *C. elegans* auf NGM-Platten besser mit Methionin, welches ausreichend von den *E. coli* OP50 produziert wird oder anderen Nährstoffen versorgt sind. Die ausgeknockte Methionin-Synthase könnte also einen Effekt auf das Wachstum der *C. elegans* RB 755 haben. Zu diesem Zweck wurden auch Vermessungen durchgeführt, wie unten stehend diskutiert wird.

8.4 Vermessung der Larvenstadien

Die folgende Tabelle zeigt die durchschnittliche Größe der *C. elegans* RB 755 in den verschiedenen Larvenstadien, gemessen an je 10 Würmern in µm bei 40facher Vergrößerung und im Vergleich dazu die Werte von Vermessungen mit *C. elegans* N₂ ebenfalls unter 40facher Vergrößerung gemessen an 10 Würmern in µm.

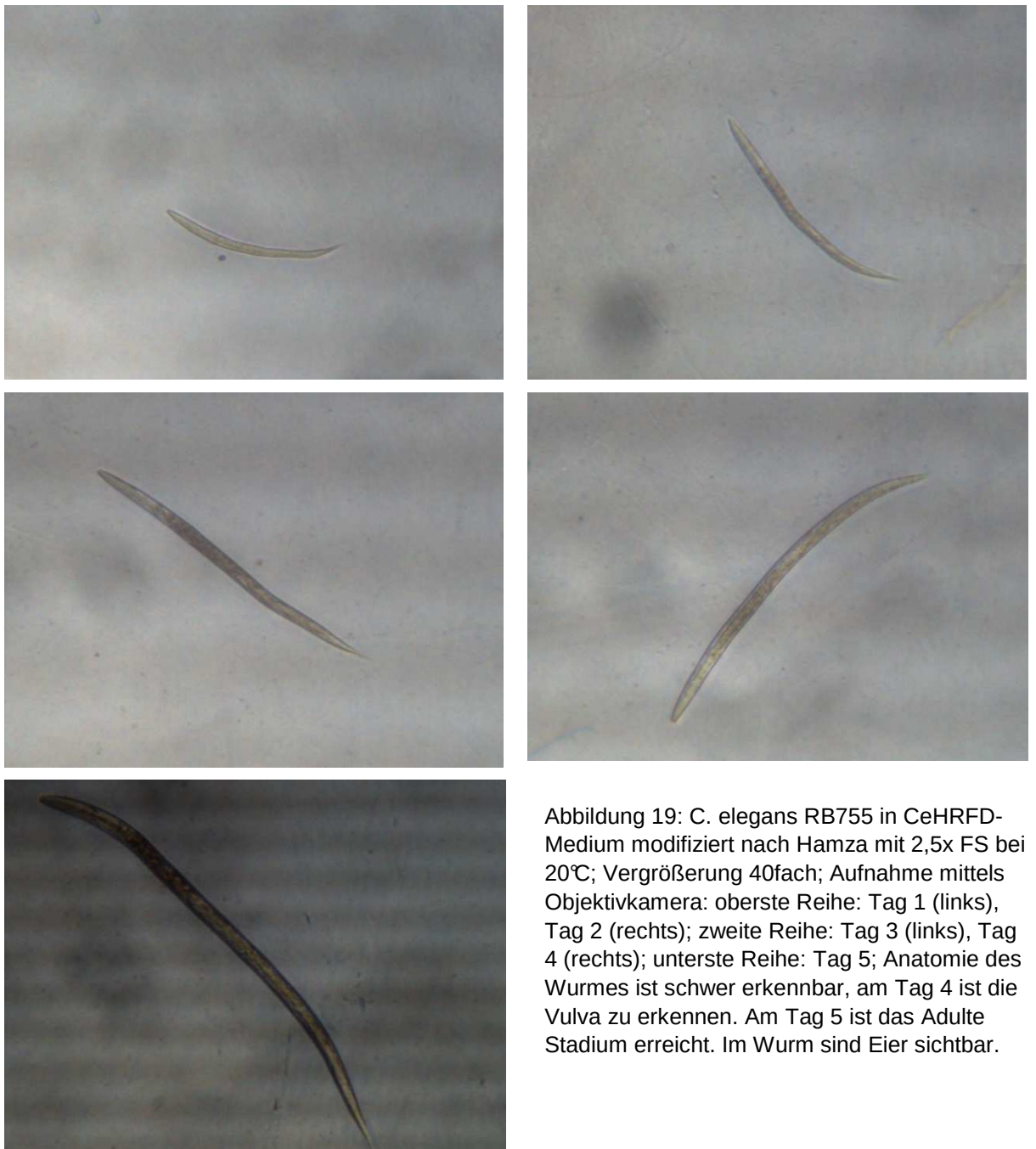
<i>C. elegans</i> RB755		<i>C. elegans</i> N₂	
L1-L2-Larven	362,5 µm	L1-L2-Larven	322,5 µm
L2-L3-Larven	695 µm	L2-L3-Larven	547,5 µm
L3-L4-Larven	807,5 µm	L3-L4-Larven	945 µm
Adulte	1042,5 µm	Adulte	bis zu 1440 µm*

Tabelle 8

*[McCULLOCH and GEMS, 2002]

Der Wert der Adulten von *C. elegans* N₂ wurde aus der Literatur genommen, da in diesem Fall kein Laborwert zugrunde liegt.

Wie die Werte zeigen, sind in den Stadien L1 bis L3 *C. elegans* RB 755 größer als der Wildtyp *N₂*. *C. elegans* RB 755 benötigen auch einige Tage länger zur Entwicklung als die *N₂*. Ob hier ein Zusammenhang besteht muss jedoch durch weitere Versuche validiert werden. Im L4-Stadium zeigen die Werte, dass *C. elegans* RB 755 kleiner ist als *C. elegans* *N₂*. Auch die adulten Würmer von *N₂* sind größer als RB 755. Möglicherweise wirkt die ausgeknockte Methionin-Synthase auch auf das Wachstum ein. Um diese These zu untermauern bedarf es weiterer Studien.



8.4.1 Vergleich von *C. elegans* *N₂* zu *RB 755*

Tabelle 9: Unterschiede von *C. elegans* *N₂* und *RB 755*; Verglichen werden Entwicklung der Generationen in Tagen, Größe von Adulten in μm , Brood Size und Life Span in Tagen; basierend auf Beobachtungen im Labor

	<i>C. elegans</i> <i>N₂</i>	<i>C. elegans</i> <i>RB 755</i>
Entwicklung	4 Tage	5-6 Tage
Größe von Adulten	bis zu 1440 μm	ca. 1043 μm
Brood Size	81 $\pm$ 31 Eier	28 $\pm$ 21
Life Span	ca. 18 Tage	ca. 15 Tage
Genetik		siehe Abbildung

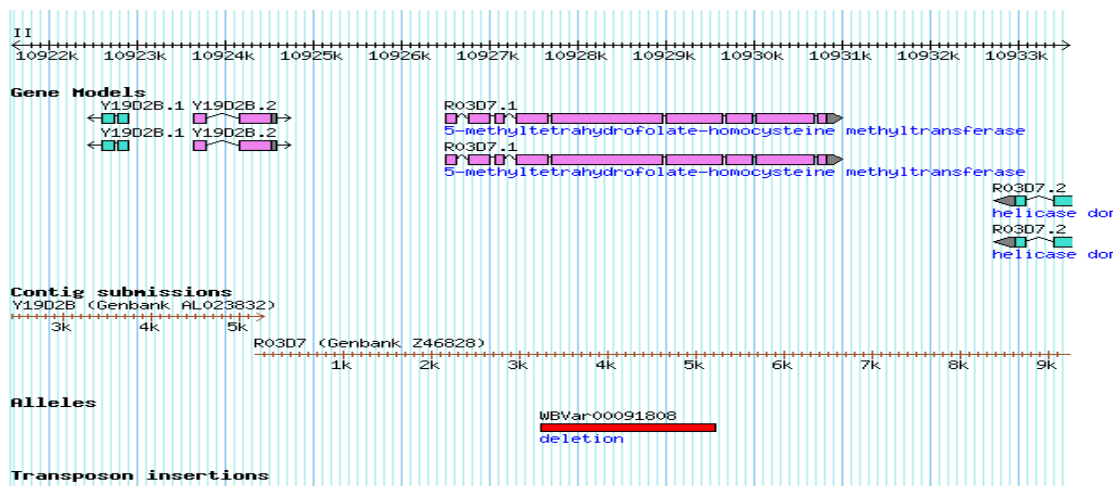


Abbildung 20: Graphische Darstellung als Genetisches Modell des Knockout-Gens von *C. elegans* *RB 755* entnommen aus www.wormbase.org

9 Schlussbetrachtung

Die Populationsversuche an *C. elegans* RB 755 zeigten, dass die Vermehrung bei den verschiedenen Folsäurekonzentrationen und normaler Konzentration von Methionin unterschiedlich war. In den Versuchen war die Wachstumsrate bei der höchsten Konzentration, der 10x Folsäure, im Vergleich zu den anderen verwendeten Folsäurekonzentrationen, am größten. Ob Folsäurekonzentrationen darüber hinaus weitere Effekte zeigen, muss noch untersucht werden.

Bei Erhöhung von Methionin zu zweifacher Dosis glich sich das Wachstum innerhalb der Folsäurekonzentrationen an und war bei den Konzentrationen 1x FS, 2,5x FS und 5x FS deutlich höher als bei den Versuchen mit einfacher Methioninkonzentration. *C. elegans* RB 755 zeigte bei der erhöhten Gabe von Methionin in Verbindung mit hohen Folsäurekonzentrationen, hier 10x Folsäure, eine verringerte Reproduktionsrate im Vergleich zur normalen Methioningabe. Möglicherweise war es dem Wurm mit der ausgeknockten Methionin-Synthase nicht möglich die hohen Dosen an Folsäure in Verbindung mit Methionin zu verwerten oder das Wachstumsoptimum wurde durch die erhöhte Methioningabe bereits erreicht.

Um eine fortschreitende Mutation zu verhindern, sollte zu Beginn der Experimente ein großer Pool an genetischem Material des Wurmes in Form von Aliquoten, eingefroren werden. Bei jedem biologischen Replikat sollte auf das gleiche genetische Material zurückgegriffen werden, um die Unterschiede zu verringern und ein Fortschreiten von Mutationen zu unterbinden.

Die Tests bezüglich Life Span ergaben, dass *C. elegans* RB 755 eine deutlich kürzere Lebensdauer aufwies, als der Wildtyp *C. elegans* N₂. Die Versuche wurden in sehr geringem Umfang durchgeführt und sollten zur Validierung der These mit einer deutlich höheren Anzahl an Würmern durchgeführt werden. Auch die Arbeitsweise sollte überarbeitet werden, da beim Aufsaugen der einzelnen Würmer – diese Technik wurde zum Umsetzen verwendet – die Würmer sehr gestresst werden und ab und zu sterben. Dies stellt eine Fehlerquelle dar. Weiters ist diese Arbeitsweise für einen Versuch in größerem

Umfang nicht effizient. Besser wäre eine Praktik, bei der ein Mediumwechsel möglich ist, ohne den Wurm umsetzen zu müssen, z.B. könnte eine Membran in das Well und somit in das Medium eingebracht werden, auf dem der Wurm leben könnte. Jedoch könnten Abfallprodukte des Wurms, welche durch die Membran nicht entfernt werden können, auch hier zu einem Problem führen.

Der Brood Size Versuch stellte die gleichen Probleme dar, wie der Life Span Versuch. Die Stichprobe war zu gering. Da auch hier die Würmer umgesetzt werden müssen, wäre auch hier eine alternative Arbeitsweise angebracht. Dies ist jedoch schwieriger zu bewerkstelligen, als bei den Life Span Experimenten, da hier der Wurm täglich umgesetzt werden muss, um ihn von den Eiern und bereits geschlüpften Würmern abzusondern.

C. elegans RB 755 legte bei diesem Versuch eine deutlich geringere Anzahl an Eiern als *C. elegans* N₂. Es besteht die Vermutung, dass auch hier höhere Folsäurekonzentrationen benötigt werden bzw. die Reproduktion maßgeblich durch das ausgeknockte Gen der Methionin-Synthase beeinträchtigt wird.



10 Abstract (Kurzbeschreibung)

Caenorhabditis elegans ist ein frei lebender Nematode, der in der Natur im Erdboden anzutreffen ist. Dieser Wurm ist einfach im Labor zu halten, da er relativ anspruchslos ist und eine rasche Generationsfolge aufweist. Dies erlaubt Versuche über das Wachstum der Population, sowie Life Span und Brood Size. Für diese Arbeit wurden diese Versuche mit einem genetisch veränderten *C. elegans*-Stamm, *C. elegans* RB 755 mit ausgeknockter Methionin-Synthase, durchgeführt. Dabei wurden *C. elegans* RB 755 unterschiedliche Konzentrationen an Folsäure und Methionin in einem adaptierten CeHR-Medium verabreicht.

Bei den Populationsversuchen wurde das Ausmaß der Vermehrung erfasst, welches sowohl unterschiedlich zwischen den verschiedenen Folsäurekonzentrationen, als auch unterschiedlich bei den Versuchen mit normaler (0,1 mol/l) und erhöhter (0,2 mol/l) Methioninmenge ausfiel. Das Wachstum stieg bei höheren Folsäurekonzentrationen und normaler Methioninkonzentration und war in diesen Versuchen bei der 10x konzentrierten Folsäure, also 10x höher als die Normalkonzentration von 7,33 µmol Ca-Folinat und 16,99 µmol Folsäure pro Liter Medium, am höchsten. Bei Zugabe von Methionin und hohen Konzentrationen an Folsäure verringerte *C. elegans* die Vermehrung, im Vergleich zu der Vermehrung bei niedrigeren Folsäurekonzentrationen. Möglicherweise lag dies an einer mangelhaften Verwertung der Folsäure, der so genannten Folsäure-Falle.

In den Life Span und Brood Size Versuchen wurden die Lebensdauer in Tagen und die gesamte Eiabgabe, bzw. die daraus geschlüpften Würmer, pro Wurm erfasst. Dabei wurde beobachtet, dass *C. elegans* RB 755 eine kürzere Lebensdauer als *C. elegans* N₂ aufwies und auch deutlich weniger Eier legte. Diese Versuche wurden jedoch nur in geringem Umfang durchgeführt und sollten für eine Validierung in einem größeren Rahmen untersucht werden.



Abstract (Kurzbeschreibung)

Caenorhabditis elegans is a free-living nematode, whose natural habitat is the soil. This worm is easy to keep in the laboratory, since it has relatively modest needs and a rapid succession of generations. This trait allows experiments to be conducted on the growth of the population, as well as life span and brood size. For this work, experiments were performed with a genetically modified strain of *C. elegans*, *C. elegans* RB 755, with a knocked-out methionine synthase. The experiments were carried out with folic acid and methionine in adapted CeHR-medium.

In the population experiments, the reproduction rate was determined. It varies between different folic acid concentrations and in the tests with normal (0,01 μmol) and increased (0,02 μmol) methionine concentrations. Growth increased at higher concentrations of folate and normal concentrations of methionine in these experiments and was the highest in the 10x concentration of folic acid, i.e. 10 times higher than the normal concentration of 7,33 μmol ca-folate und 16,99 μmol folate in one liter medium. With the addition of methionine and high levels of folic acid, *C. elegans* reduced its reproduction rate compared to that at lower folate concentrations. Perhaps this effect is due to a lack of utilization of folic acid, called folate trap.

In the life span and brood size experiments, the lifetime in days and the entire brood size, including the hatched worms, from each worm, were recorded. It was observed that *C. elegans* RB 755 has a shorter lifespan than *C. elegans* N_2 , and lays far fewer eggs. These experiments have been conducted only on a small scale and should be carried out on a larger scale for validation.

11 Literaturverzeichnis

BROOKES M.: *Drosophila*; Rowohlt, Reinbek Verlag, 2002

CHEN L.H., LIU M., HWANG H., CHEN L., KORENBERG J., SHANE B.: Human Methionine Synthase; The Journal of Biological Chemistry; 3628-3634; 1997

CHUNG T. K., BAKER D. H.: Efficiency of dietary methionine utilization by young pigs; Department of Animal Sciences and Division of Nutritional Sciences, University of Illinois at Urbana-Champaign, USA, 1992

CORSI A. K.: A biochemist's guide to *Caenorhabditis elegans*; Department of Biology, the Catholic University of America, Washington, USA; Elsevier, 2006

DJURHUUS R., SVARDAL A. M., UELAND P. M., MALE R., LILLEHAUG J. R.: Growth support and toxicity of homocysteine and its effects on methionine metabolism in non-transformed and chemically transformed C3H/10T1/2 cells; Carcinogenesis, 9, 9-16; 1988

FENG W.: Masterthesis: Methionine and Leucine requirement and their biosynthetic blockage in *C. Elegans*; Department of Nutrition and Food Science, San Jose State University; USA, 2003

FUKAGAWA N. K.: Sparing of Methionine Requirements: Evaluation of Human Data takes Sulfur Amino Acids beyond Protein; Department of Medicine and General Clinical Research Center, University of Vermont College of Medicine, Burlington, Vermont, 2006

GERSHON H., GERSHON D.: *Caenorhabditis elegans* – a paradigm for aging research: advantages and limitations; Department of Immunology, Rappaport Faculty of Medicine, Technion-Israel Institute of Technology, Haifa, Israel; 2001

GREER L. E., DOWLATSHAHI D., BANKO M. R., VILLEN J., HOANG K., BLANCHARD D., GYGI S. P., BRUNET A.: An AMPK-FOXO pathway mediates longevity induced by a novel method of dietary restriction in *C. elegans*; Department of Cell Biology, Harvard Medical School, Boston, USA; Elsevier, 2007

HAMZA I.: Maintenance of *C. elegans* an axenic growth cultures and generation of large numbers for biochemical studies, Department of Animal & Avian Science and Department of Cell Biology & Molecular Genetics, University of Maryland, Collage Park, Maryland 20742, USA,
http://ansc.umd.edu/I_Hamza/mCeHR%20Growth%20Medium_hamza.pdf
30.11.2010

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

HOUTHOOFD K., BRAECKMAN B. P., LENAERTS I., BRYN K., DE VREESE A., VAN EYGEN S., VANFLETEREN J. R.: Axenic growth up-regulates mass-specific metabolic rate, stress resistance, and extends life span in *Caenorhabditis elegans*; Department of Biology, Ghent University, Ghent, Belgium; 2002

HOUTHOOFD K., VANFLETEREN J. R.: The longevity effect of dietary restriction in *Caenorhabditis elegans*; Department of Biology, Ghent University, Ghent, Belgium; 2006

LENAERTS I., WALKER G., VAN HOOREBEKE L., GEMS D., VANFLETEREN J. R.: Dietary restriction of *Caenorhabditis elegans* by axenic culture reflects nutritional requirement for constituents provided by metabolically active microbes; Department of Biology, University of Ghent, Belgium; Journal of Gerontology, 2008

LÖFFLER G., PETRIDES P.E., HEINRICH P.C.: Biochemie und Pathobiochemie, 8. Auflage, Springer Verlag, 2007

LU N. C., HIEB W. F., STOKSTAD L. R.: Effect of Vitamin B12 and Folate on Biosynthesis of Methionine from Homocysteine in the Nematode *Caenorhabditis briggsae*; Department of Nutritional Sciences, University of California, Berkeley, California, USA, 1976

McMULLOCH D., GEMS D.: Body size, insulin/IGF signaling and aging in the nematode *Caenorhabditis elegans*; Department of Biology, University College London, London, UK, Elsevier, 2002

MILLER R. A., BUEHNER G., CHANG Y., HARPER J. M., SIGLER R., SMITH-WHEELOCK M.: Methionine-deficient diet extends mouse lifespan, slows immune and lens aging, alters glucose, T4, IGF-I and insulin levels, and increases hepatocyte MIF levels and stress resistance; Aging Cell; 2005

MUSCHOL D., SCHROEDER F., TRAUNSPURGER W.: Life Cycle and population growth rate of *Caenorhabditis elegans* studied by a new method; BMC Ecology 9:14; 2009

NASS R., HAMZA I.: 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

PIPER M. D. W., BARTKE A.: Diet and aging; UCL Institute of Healthy Aging, University College London, London, UK; Southern Illinois University School of Medicine, Springfield, USA; Elsevier, 2008

RAMAEKERS V. T., HANSEN S.I., HOLM J., OPLADEN T., SENDEREK J., HÄUSLER M., HEINMANN G., FOWLER B., MAIWALD R., BLAU N.: Reduced folate transport to the CNS in female Rett patients; Division of Pediatric Neurology–Department of Pediatrics, University Hospital Aachen, Germany; 2003

STIEGLER C.: Untersuchung des Populationswachstums, Broodsize und Lifespan von *C. elegans* N₂ im Flüssigmedium nach Modifizierung des Nährstoffgehalts von Folsäure; Universität Wien, 2011

STUBBS A. K., WHEELHOUSE N. M., LOMAX M. A., HAZLERIGG D. G.: Nutrient-hormone interaction in the ovine liver: methionine supply selectively modulates growth hormone-induced IGF-I gene expression; J Endocrinol; 2002

SWANSON D. A., LIU M., BAKER P. J., GARRETT L., STITZEL M., WU J., HARRIS M., BANERJEE R., SHANE B., BRODY L. C.: Targeted Disruption of the Methionine Synthase Gene in Mice; Genetics and Molecular Biology Branch and Genetic Disease Research Branch, National Human Genome Research Institute, Bethesda, Maryland, USA, 2001

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

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

TROEN A. M., FRENCH E. E., ROBERTS J. F., SELHUB J., ORDOVAS J. M., PARNELL L. D., LAI C.: Lifespan modification by glucose and methionine in *Drosophila melanogaster* fed a chemically defined diet; Jean Mayer USDA Human Nutrition Research Center on Aging, Tufts University, Boston, USA; 2006

WALKER G., HOUTHOOFD K., VANFLETEREN J. R., GEMS D.: Dietary restriction in *C. elegans*: From rate-of-living effects to nutrient sensing pathways; Department of Biology, University College London; Elsevier Ireland; 2005

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

YAMADA K., KAWATA T., WADA M., ISSHIKI T., ONODA J., KAWANISHI T., KUNOU A., TADOKORO T., TOBIMATSU T., MAEKAWA A., TORAYA T.: Extremely low activity of methionine synthase in vitamin-B12-deficient rats may be related to effects on coenzyme satbilization rather than to changes in coenzyme induction; Faculty of Engineering and Faculty of Education, Okayama University, Okayama, Japan; and Faculty of Applied Bioscience, Tokio University of Agriculture, Tokio, Japan, 2000

12 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.....	3
Abbildung 2.....	4
Abbildung 3.....	9
Abbildung 4.....	14
Abbildung 5.....	41
Abbildung 6.....	50
Abbildung 7.....	52
Abbildung 8.....	52
Abbildung 9.....	54
Abbildung 10.....	55
Abbildung 11.....	55
Abbildung 12.....	56
Abbildung 13.....	57
Abbildung 14.....	62
Abbildung 15.....	63
Abbildung 16.....	65
Abbildung 17.....	65
Abbildung 18.....	67
Abbildung 19.....	69
Abbildung 20.....	70

13 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.....	8
Tabelle 2.....	21
Tabelle 3.....	42
Tabelle 4.....	45
Tabelle 5.....	58
Tabelle 6.....	61
Tabelle 7.....	64
Tabelle 8.....	68
Tabelle 9.....	70

14 Anhang – Lebenslauf

Schimmer Claudia



Persönliche Angaben: Geburtsdatum: 7. August 1984
Geburtsort: Eisenstadt
Staatsbürgerschaft: Österreich

Eltern: Schimmer Bernadette
Beamtin
Schimmer Werner
verstorben

Schulbildung: 1990 - 1994 röm.kath. Volksschule für Mädchen Neusiedl/See
1994 - 1998 röm.kath. Hauptschule für Mädchen Neusiedl/See
1998 - 2003 Theresianum Eisenstadt
seit Oktober 2003 Diplomstudium der
Ernährungswissenschaften an der Universität Wien

**Daten- und Text-
Verarbeitungskenntnisse:** Microsoft Word
Microsoft Excel
Microsoft Power Point
SPSS (Grundkenntnisse)

Berufliche Tätigkeiten:
August 2003 → Ferialpraxis Sparkasse Neusiedl am See
Juli-August 2006 → Seepark Weiden am See → Kinderanimation
Juli-August 2007 → Seepark Weiden am See → Sportanimation
Juli-August 2008 → Seepark Weiden am See → Sport- & Kinderanimation
September 2008 → Praktikum bei der Burgenländischen Landesregierung →
Abteilung 8 – Gesundheit und Sport

Hobbies: Radfahren
Schifahren
Schwimmen
Kanufahren
Lesen

Fremdsprachen: Englisch