



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

Untersuchung der Expression spezifischer Gene bei
C. elegans zur Studie des Folsäuremetabolismus

Verfasserin

Alexandra Maringer

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Naturwissenschaften (Mag.rer.nat.)

Wien, 2011

Studienkennzahl lt. Studienblatt:

A 474

Studienrichtung lt. Studienblatt:

Diplomstudium Ernährungswissenschaften

Betreuer:

Univ.-Prof. Dr. Jürgen König

Danksagung

Univ.-Prof. Dr. Jürgen König möchte ich aufrichtig für die Möglichkeit die dargelegte Arbeit in seiner Forschungsgruppe durchführen zu können danken.

Herzlich bedanken möchte ich mich auch bei Mag. Doris Freistetter für die tolle Unterstützung während der gesamten Arbeit und die stets aufmunternden und bekräftigenden Worte. Vielen Dank auch an Mag. Martina Köberl, die mir im Labor immer mit Rat und Tat zur Seite gestanden hat. Meinen Laborkolleginnen Christina und Claudia danke ich für das stets heitere Arbeitsklima und die tolle Zusammenarbeit im Labor.

Ich danke meinen lieben StudienkollegInnen für die aufregende gemeinsame Studienzeit, insbesondere meiner Freundin Christiane, mit der ich so viele Prüfungen gemeinsam durchgestanden habe und die mich immer mit guten Ratschlägen aufgebaut hat.

Großer Dank gilt meinem Freund Daniel, der mir sowohl bei der Formatierung und Korrektur der Arbeit als auch bei wissenschaftlichen Fragen eine große Hilfe war. Während des gesamten Studiums hat er mich stets ermutigt, aufgemuntert und unterstützt und mir dadurch starken Rückhalt gegeben. Ich danke dir!

Vielen Dank auch an Marianne und Familie Lumpi, die mich durch ihr großes Interesse an meinem Studium immer motiviert haben.

Ich danke auch meinen Schwestern, die stets ein offenes Ohr für mich hatten und meinen Großeltern, die mir durch finanzielle Zuschüsse die Studienzeit versüßt und so manche Reise ermöglicht haben.

Besonders bedanken möchte ich mich aber bei meinen Eltern, die mir dieses Studium überhaupt erst ermöglicht und mich immer mit großem Verständnis unterstützt haben. Dank euch durfte ich eine unbeschwerte Studienzeit genießen!

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS	I
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	III
TABELLENVERZEICHNIS	IV
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	V
1) Einleitung und Fragestellung	- 1 -
2) Literaturübersicht	- 3 -
2.1. Folsäure - Metabolismus und Funktion	- 3 -
2.1.1. Folsäuremetabolismus	- 4 -
2.1.1.1. Absorption und Transport	- 4 -
2.1.1.2. Speicherung	- 9 -
2.1.1.3. Ausscheidung	- 10 -
2.1.2. Biochemische Funktionen	- 10 -
2.1.2.1. Ein-Kohlenstoff (C ₁)-Transfer	- 10 -
Purin- und Pyrimidin-Biosynthese	- 11 -
Methylierungszyklus	- 12 -
2.2. <i>Caenorhabditis elegans</i> als Modellorganismus	- 14 -
2.2.1. Lebenszyklus von <i>C. elegans</i>	- 15 -
2.2.2. Folataufnahme bei <i>C. elegans</i>	- 16 -
2.2.3. Orthologe von MTHFR, MS und hRFC bei <i>C. elegans</i>	- 18 -
2.3. Quantitative Real-Time RT-PCR	- 19 -
2.3.1. Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	- 19 -
2.3.2. TaqMan Technologie	- 21 -
2.3.3. Relative Quantifizierung	- 23 -
2.3.3.1. Vergleichende $\Delta\Delta C_T$ -Methode	- 25 -
2.3.3.2. Validierungsexperiment	- 28 -
2.3.3.3. Referenzgene	- 29 -
3) Material und Methoden	- 30 -
3.1. Untersuchungsmaterial	- 30 -
3.1.1. Kultivierung von <i>C. elegans</i>	- 30 -
3.1.2. Synchronisation von <i>C. elegans</i>	- 31 -

3.2. Probengewinnung	- 32 -
3.2.1. Trennung der Entwicklungsstadien	- 32 -
3.2.1.1. Lebenszyklus im Flüssigmedium	- 32 -
3.2.1.2. Gewinnung von Larvenstadien L3-L4	- 33 -
3.2.1.3. Gewinnung von adulten Würmern	- 33 -
3.2.2. Fütterung unterschiedlicher Folat-Mengen	- 34 -
3.2.2.1. Herstellung der Folsäure-Konzentrationen	- 34 -
3.3. Molekularbiologische Methoden	- 35 -
3.3.1. Extraktion der mRNA	- 35 -
3.3.2. Quantifizierung der extrahierten mRNA	- 36 -
3.3.3. Synthese der komplementären DNA (cDNA)	- 37 -
3.3.4. Durchführung der Real-Time RT-PCR (TaqMan®-PCR)	- 38 -
3.3.4.1. Validierungsexperiment	- 39 -
3.3.4.2. Relative Quantifizierungen	- 40 -
3.3.5. Genspezifische Primer und Sonden	- 41 -
3.3.6. Auswahl der Referenzgene	- 41 -
4) Ergebnisse und Diskussion	- 43 -
4.1. Lebenszyklus von <i>C. elegans</i> im Flüssigmedium	- 43 -
4.2. Quantitative Bestimmung der extrahierten mRNA	- 44 -
4.3. Quantitative Real-Time PCR	- 46 -
4.3.1. Validierungsexperiment	- 46 -
4.3.2. Relative Quantifizierung der Genexpression	- 54 -
4.3.2.1. Entwicklungsbedingte Regulation der Genexpression	- 54 -
4.3.2.2. Regulation der Genexpression durch exogene Folatlevels	- 58 -
5) Schlussbetrachtung	- 62 -
6) Kurzfassung	- 64 -
7) Abstract	- 65 -
8) Literaturverzeichnis	- 66 -
9) Appendix	- 72 -

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Chemische Strukturformel der Folsäure	- 3 -
Abbildung 2: Schematische Übersicht über die Aufnahme und den Transport der Folate	- 8 -
Abbildung 3: Folsäure, MTHFR und MS im Metabolismus der C1-Einheiten	- 11 -
Abbildung 4: Lebenszyklus von <i>C. elegans</i> bei 25 °C auf Agar Platten	- 16 -
Abbildung 5: Schematische Darstellung des PCR-Prinzips	- 20 -
Abbildung 6: Schematische Darstellung der TaqMan-PCR	- 22 -
Abbildung 7: R_n versus Zyklen-Anzahl	- 24 -
Abbildung 8: Standardkurve des Referenzgens <i>csq-1</i>	- 46 -
Abbildung 9: Standardkurve des Referenzgens <i>pmp-3</i>	- 47 -
Abbildung 10: Standardkurve des Zielgens <i>fol-1</i>	- 47 -
Abbildung 11: Standardkurve des Zielgens <i>C06A8.1</i>	- 48 -
Abbildung 12: Standardkurve des Zielgens <i>R03D7.1</i>	- 48 -
Abbildung 13: Darstellung der relativen Effizienz von <i>fol-1</i> und <i>pmp-3</i>	- 49 -
Abbildung 14: Darstellung der relativen Effizienz von <i>fol-1</i> und <i>csq-1</i>	- 50 -
Abbildung 15: Darstellung der relativen Effizienz von <i>C06A8.1</i> und <i>pmp-3</i>	- 50 -
Abbildung 16: Darstellung der relativen Effizienz von <i>C06A8.1</i> und <i>csq-1</i>	- 51 -
Abbildung 17: Darstellung der relativen Effizienz von <i>C06A8.1</i> und <i>csq-1</i> nach Elimination von $-1 \log$ cDNA	- 52 -
Abbildung 18: Darstellung der relativen Effizienz von <i>R03D7.1</i> und <i>pmp-3</i>	- 51 -
Abbildung 19: Darstellung der relativen Effizienz von <i>R03D7.1</i> und <i>csq-1</i>	- 52 -
Abbildung 20: Entwicklungsbedingte Regulation der <i>fol-1</i> Expression bei N2	- 54 -
Abbildung 21: Entwicklungsbedingte Regulation der <i>C06A8.1</i> Expression bei N2	- 55 -
Abbildung 22: Entwicklungsbedingte Regulation der <i>R03D7.1</i> Expression bei N2	- 55 -
Abbildung 23: Regulation der <i>fol-1</i> Expression durch exogene Folatlevels bei N2	- 58 -
Abbildung 24: Regulation der <i>C06A8.1</i> Expression durch exogene Folatlevels bei N2	- 59 -
Abbildung 25: Regulation der <i>R03D7.1</i> Expression durch exogene Folatlevels bei N2	- 59 -

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Herstellung eines PCR-Reaktions-Mix für eine Reaktion	- 38 -
Tabelle 2: Herstellung eines PCR-Reaktions-Mix für 20 Reaktionen	- 38 -
Tabelle 3: Temperaturprogramm der PCR	- 39 -
Tabelle 4: Übersicht der eingesetzten cDNA-Mengen	- 40 -
Tabelle 5: Übersicht der Made to Order Assays der Ziel- und Referenzgene.	- 41 -
Tabelle 6: Ergebnis der Lebenszyklus-Beobachtung	- 43 -
Tabelle 7: mRNA Konzentration einer Mischkultur-Probe	- 44 -
Tabelle 8: mRNA Konzentrationen der Entwicklungsstadien und exogenen Folatlevels	- 45 -
Tabelle 9: PCR Effizienzen der Ziel- und Referenzgene	- 49 -
Tabelle 10: Ergebnisse der absoluten Quantifizierung (Validierungsexperiment)	- 72 -
Tabelle 11: Ergebnisse der relativen Quantifizierung, Normalisiert mit pmp-3	- 73 -
Tabelle 12: Ergebnisse der relativen Quantifizierung, Normalisiert mit csq-1	- 75 -

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Neben gebräuchlichen Abkürzungen der deutschen Sprache sowie den chemischen Elementsymbolen werden unten angeführte Kurzformen verwendet. Einmalig vorkommende Akronyme sind üblicherweise bei deren Verwendung erwähnt.

THF	Tetrahydrofolat
RFC	reduzierter Folat-Transporter
hRFC	humaner reduzierter Folat-Transporter
PCFT	Protonen gekoppelten Folat-Transporter
SAM	S-Adenosylmethionin
MS	Methioninsynthase
MTHFR	Methylentetrahydrofolatreduktase
NGM	Nematode growth medium
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction)
RT-qPCR	Real-Time Reverse Transkription Polymerase-Kettenreaktion
CeHR	<i>C. elegans</i> Habitation and Reproduction Medium
CeHRFD	CeHR Folate Depletion
FS	Folsäure

1) Einleitung und Fragestellung

Folate sind Coenzyme welche durch ihre Funktion als Akzeptoren und Überträger von Kohlenstoff-Einheiten bei vielen Stoffwechselwegen eine Schlüsselfunktion einnehmen. Die Kohlenstoffreste werden etwa für die Synthese von Purin und Pyrimidin und somit für die DNA-Biosynthese, sowie für die Methylierung von Homocystein zu Methionin benötigt [STANGER 2004]. Teilweise sind jedoch die genauen Mechanismen der Stoffwechselprozesse, wie etwa die intestinale Folatabsorption, nicht vollständig geklärt und die Auswirkungen eines Folatmangels werfen noch Fragen auf. Auch die Auswirkungen einer Überversorgung sind durch die Verwendung der Folsäure als Nahrungsergänzungsmittel von großem Interesse.

Es wird ersichtlich, dass es in diesem Forschungsgebiet noch einiger Untersuchungen bedarf um offene Fragen zu klären und Unklarheiten zu beseitigen. Nutrigenomics, eine Wissenschaft welche sich mit genomweiten Einflüssen der Ernährung befasst, weist dafür großes Potential auf.

Dieser neue Zweig der Genomforschung liefert Erkenntnisse, wie Nahrungsmittelbestandteile durch die Veränderung der Struktur und Expression von Genen die Gesundheit eines Individuums beeinflussen können [KAPUT und RODRIGUEZ 2003].

Zum Zweck nutrigenomischer Forschung können Modellorganismen, wie etwa der Fadenwurm *Caenorhabditis elegans*, zur Untersuchung herangezogen werden.

Als im Jahr 1998 das Genom von *C. elegans* vollständig entschlüsselt wurde, konnte eine bemerkenswerte Ähnlichkeit der Gene dieser Nematode und jenen des Menschen festgestellt werden. Seither wurden viele Bemühungen

unternommen die Funktion, Regulation, Interaktion sowie Expression der gesamten Gene des *C. elegans*-Genoms zu erläutern [CORSI 2006].

Durch all diese Informationen stellt *C. elegans* ein attraktives System zur Untersuchung einer stetig wachsenden Vielfalt biologischer Fragestellungen, besonders im Hinblick auf den menschlichen Stoffwechsel, dar.

Auch für essentielle Enzyme des humanen Folsäurestoffwechsels, wie etwa die MTHFR, die MS oder den hRFC, existieren orthologe Gene bei *C. elegans*, wodurch dieser zur Studie des Folsäuremetabolismus von besonderem Interesse ist.

Mit Hilfe von *C. elegans* sollte in dieser Arbeit der Einfluss von Folsäure auf die Veränderung der Genexpression essentieller Enzyme des Folsäuremetabolismus untersucht werden. Weiters wurde geprüft ob die Expressionen dieser Gene bei *C. elegans* einer entwicklungsbedingten Regulation unterliegen. Dabei kam die Methode der relativen Quantifizierung mittels RT-qPCR unter Verwendung zweier Referenzgene zum Einsatz.

2) Literaturübersicht

2.1. Folsäure - Metabolismus und Funktion

Folsäure, ein Vitamin der B-Gruppe, stellt im Allgemeinen eine Gruppe zahlreicher Derivate dar, welche sich von einem gemeinsamen Grundgerüst ableiten. Dieses Grundgerüst setzt sich wie in Abbildung 1 ersichtlich aus einem Pteridinring, einer p-Aminobenzoessäure sowie aus Glutaminsäure zusammen [STANGER 2004].

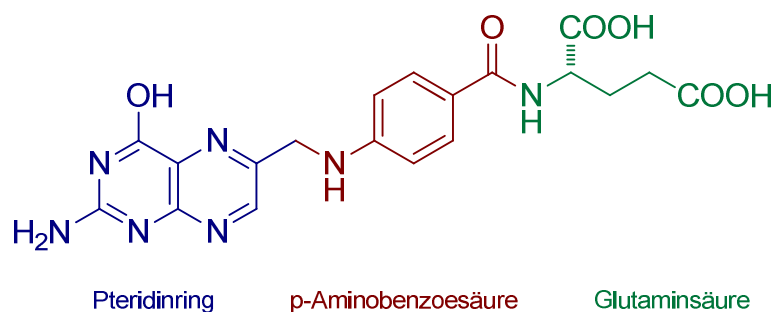


Abbildung 1: Chemische Strukturformel der Folsäure.

Neueren Begriffsdefinitionen zufolge werden diese Derivate mit gleichem Grundgerüst nunmehr als Folate bezeichnet. Der Begriff Folsäure wird nur für die Pteroylmonoglutaminsäure (PGA) verwendet welche die stabilste Form des Vitamins darstellt, jedoch ausschließlich in synthetischer Form vorkommt. Die natürlich vorkommenden Folate können sich durch die Anzahl der Wasserstoffatome am Pteridinring, durch gebundene Kohlenstoffeinheiten sowie durch die Länge der Glutaminsäurekette unterscheiden [PIETRZIK und PRINZ-LANGENOHL 2000]. Folatmoleküle mit mehr als einem Glutamatrest werden als Polyglutamat, jene mit einem Glutamatrest als Monoglutamat bezeichnet. Da sowohl Poly- als auch Monoglutamat mit der Nahrung

aufgenommen werden, können sie gemeinsam als Nahrungsfolate bezeichnet werden.

Die biologisch aktive Form der Folate stellen 5,6,7,8-Tetrahydrofolat (THF) und seine Derivate dar, welche durch eine stufenweise Reduktion aus inaktivem Polyglutamat gebildet werden. Als Coenzyme üben sie im menschlichen Stoffwechsel wesentliche Funktionen aus indem sie als Akzeptoren und Überträger von Kohlenstoff-Einheiten fungieren [PIETRZIK et al. 2008].

Säugetiere können zwar den Pteridinring synthetisieren, ihn jedoch nicht mit den beiden anderen Einheiten verknüpfen [STANGER 2004]. Aus diesem Grund ist es notwendig das Vitamin mittels exogener Quellen über intestinale Absorption aufzunehmen [SUBRAMANIAN et al. 2003].

Ein Folatmangel führt unter anderem zu megaloblastischer Anämie sowie zur Wachstumsverzögerung. Optimale Folatmengen hingegen können das Risiko von Neuralrohrdefekten senken und möglicherweise vor gewissen Krebsarten wie Kolonkrebs schützen. Eine intestinale Malabsorption von Folat kann durch Erkrankungen des Intestinaltrakts, durch Interaktionen mit Arzneimitteln sowie durch chronischen Alkoholkonsum hervorgerufen werden [SAID und MOHAMMED 2006].

Eine Beeinträchtigung der intestinalen Folsäureabsorption kann häufig zu einem Mangel an Folsäure führen [SUBRAMANIAN et al. 2003]. In westlichen Industrieländern stellt der Folsäuremangel, trotz Aufnahme ausreichender Kalorienmengen und scheinbarer Ausgewogenheit, den am häufigsten auftretenden Vitaminmangel dar [STANGER 2004].

2.1.1. Folsäurematabolismus

2.1.1.1. Absorption und Transport

Da die Mukosazelle Folate ausschließlich in Form von Monoglutamaten aufnehmen kann, müssen die in der Nahrung vorliegenden Polyglutamate

zunächst hydrolisiert werden. Die Abspaltung der terminalen γ -Glutamatreste wird durch eine, an der Bürstensaummembran des Duodenums und oberen Jejunums lokalisierte Konjugase (γ -Glutamyl-Carboxypeptidase) mit Exopeptidaseaktivität bewerkstelligt. Intrazellulär liegt weiters eine Endopeptidase in der Jejunummukosa vor. Die resorbierten Monoglutamate werden intrazellulär wieder zu Polyglutamaten konjugiert und in dieser Form gespeichert oder im intrazellulären Stoffwechsel umgesetzt. Um die basolaterale Membran passieren zu können, werden die Polyglutamate wiederum zu Monoglutamaten hydrolisiert welche nun mit dem Pfortaderkreislauf in die Leber gelangen können. Der Transport im Serum erfolgt hauptsächlich als 5-Methyl-THF welches unspezifisch an Albumin, α -Makroglobulin und Transferrin gebunden ist. Weiters wird ein kleiner Teil mittels eines spezifisch Folat-bindenden Proteins transportiert. [STANGER 2004].

Der transmembranöse Transport der gebildeten Monoglutamate kann sowohl durch aktiven Transport als auch durch passive Diffusion erfolgen, wobei die passive Diffusion unabhängig von der Folatkonzentration etwa 20-30 % beträgt [PIETRZIK et al. 2008]. Am aktiven Transport sind sowohl membranständige Rezeptoren als auch transmembranöse Transportproteine (Carrier) beteiligt. Diese spezifischen Transportsysteme sind durch unterschiedliche Affinität für Folatverbindungen sowie durch spezifische Temperatur- und pH-Empfindlichkeiten charakterisiert [STANGER 2004].

Der Transport durch das intestinale Epithel wird über einen pH-abhängigen Transporter durch die Bürstensaummembran sowie durch einen Carrier vermittelten Prozess durch die basolaterale Membran bewerkstelligt. Im Säugetier-Organismus existieren für den Folat-Transport drei unterschiedliche Transportsysteme die sich aus dem reduzierten Folat-Transporter (RFC), dem Folatrezeptor und dem Protonen gekoppelten Folat-Transporter (PCFT) zusammensetzen [COLLINS 2008]. Das Vorkommen und die Verteilung dieser Systeme weist starke gewebsspezifische Unterschiede auf [STANGER 2004].

Der Protonen gekoppelte Folat-Transporter dient der Absorption von Monoglutamaten im Duodenum und oberen Jejunum [BLOM und SMULDERS 2011]. Dieser hochaffine Transporter ist ein in der apikalen Bürstensaummembran von Epithelzellen lokalisiertes Membranprotein, dessen pH-Optimum im sauren Bereich liegt. Im Falle einer Funktionsstörung des PCFT durch genetische Mutation kommt es zu einer hereditären Folat-Malabsorption, wodurch die essentielle Rolle des PCFT als intestinaler Folat-Transporter verdeutlicht wird [QUI et al. 2006]. Über die intestinale Absorption hinaus ist PCFT eventuell auch bei der renalen Rückresorption von Folat involviert [COLLINS 2008].

Die Folatrezeptoren, von denen drei Isoformen existieren, weisen sehr hohe Affinität für Folsäure und reduzierte Folate (THF) auf und transportieren diese über Fluid-Phase-Endozytose ins Cytosol [DOUCETTE und STEVENS 2001]. Sie stellen eine spezielle Form Folat-bindender Proteine dar, welche über Glykosylphosphatidylinositol (GPI) – Anker in die Plasmamembran eingebaut sind [BRZEZIŃSKA et al. 2000].

Folatrezeptor α wird nur bei einer beschränkten Anzahl von Epithelzellen exprimiert, so etwa in den proximalen Tubuli der Niere, im Plexus choroideus sowie in der Plazenta. Im Vergleich zu Folatrezeptor β und γ weist Folatrezeptor α die höchste Affinität für 5-Methyl-THF, die Hauptform der im Plasma zirkulierenden Folate, auf [BLOM und SMULDERS 2011].

Bei sehr niedrigen extrazellulären Folat-Levels steigen sowohl die Levels an Folatrezeptor-Protein als auch an α -mRNA an. Dies führt zu der Annahme, dass Zellen regulatorisch die Expression des Rezeptors erhöhen wenn die Menge des verfügbaren Folats eine Grenze erreicht, bei welcher der Rezeptor die einzig effektive Transportform darstellt. Eine erhöhte Funktion des Rezeptors kann damit hingegen nicht in Zusammenhang gebracht werden, diese wird vielmehr über den zellulären Folatbedarf reguliert [DOUCETTE und STEVENS 2001].

Der reduzierte Folat-Transporter (Reduced Folat Carrier, RFC) ist ein transmembranöses Transportprotein welches eine geringe Affinität für Folsäure aber große Kapazität für 5-Methyl-THF aufweist [STANGER 2004]. Dieses Transportprotein ist ein Anionenaustauscher mit pH-Optimum im physiologischen Bereich, welches im normalen Gewebe sowie in Tumoren von Säugetieren ubiquitär exprimiert ist [ZHAO et al. 2008]. Der RFC ist der am besten charakterisierte Folattransporter und stellt vermutlich einen Haupttransportweg für Folate in Säugetierzellen dar [JING et al. 2009].

Früheren Untersuchungen zufolge wurde dem RFC eine bedeutende Rolle in der renalen und intestinalen Folatabsorption zugeschrieben. Die Expression des Transporters konnte sowohl in der intestinalen Bürstensaummembran von Mäusen und Ratten gefunden werden, wo er vermutlich an der Absorption von Folat involviert ist, als auch an der basolateralen Membran renaler Epithelzellen und an der Plasmamembran von *Xenopus* Eizellen festgestellt werden [COLLINS 2008].

Gewisse Merkmale des RFC, wie etwa das pH-Optimum im neutralen Bereich sowie die höhere Affinität zu reduzierten Folaten als zu Folat, weichen jedoch von den bekannten Eigenschaften des intestinalen Folattransports ab. Weiters konnte durch Untersuchungen an HeLa Zellen gezeigt werden, dass durch Elimination des RFC Genes aus dem Genom keine signifikante Änderung der Aktivität des Folattransports auftritt. Aus diesem Grund wurde die Beteiligung des RFC am intestinalen Folattransport stark in Frage gestellt und nach anderen Transportern, welche nun wohl im PCFT auch gefunden wurden, gesucht [NAKAI et al. 2007].

Es wird vermutet, dass die intestinale Folatabsorption sowohl über den PCFT als auch über den RFC vermittelt wird [ASHOKKUMAR et al. 2007].

In Abbildung 2 ist der Folattransport durch die drei verschiedenen Transportsysteme schematisch dargestellt.

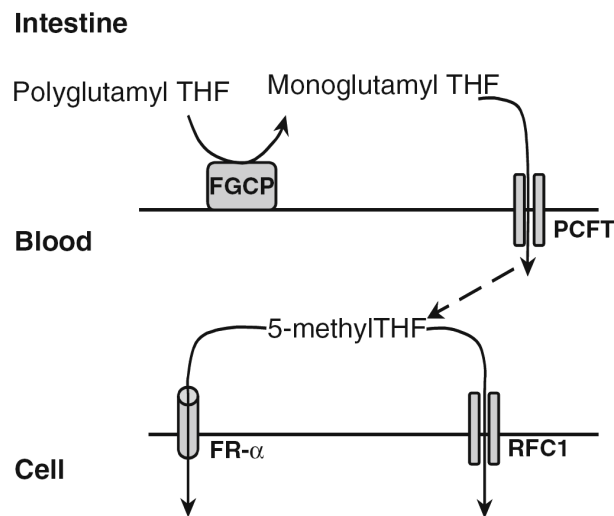


Abbildung 2: Schematische Übersicht über die Aufnahme und den Transport der Folate. *THF* Tetrahydrofolat, *FGCP* Foly[poly-γ-Glutamylcarboxypeptidase, *PCFT* Protonen gekoppelte Folat-Transporter, *FR-α* Folatrezeptor α, *RFC1* Reduzierter Folat-Transporter [BLOM und SMULDERS 2011].

In diversen Untersuchungen konnten Parallelen zwischen Änderungen in der intestinalen Folatabsorption und dem Expressionslevel von RFC unter verschiedenen Bedingungen aufgezeigt werden [JING et al. 2009].

So wurde etwa bei einer Langzeit-Übersupplementation mit Folat bei intestinalen Caco-2 Zellen und renalen HK-2-Epithelzellen eine signifikante, spezifische Reduktion der Folataufnahme festgestellt. Dies konnte mit verminderten Protein und mRNA Levels des hRFC (humaner RFC) sowie mit einer Abnahme der hRFC Promotoraktivität in Zusammenhang gebracht werden. Die verminderte Folataufnahme ist weiters mit der Abnahme der mRNA Levels von PCFT und bei den renalen HK-2-Zellen ebenso mit jenen des Folatrezeptors verbunden [ASHOKKUMAR et al. 2007].

Weitere Untersuchungen kamen zu dem Ergebnis, dass ein Folsäuremangel bei Ratten zu einer signifikanten Erhöhung des transepithelialen Folattransports führt. Dies konnte auf einen Anstieg der mRNA Levels von RFC und des Levels des exprimierten Proteins in der Bürstensaummembran zurückgeführt werden [SAID et al. 2000].

Untersuchungen bei denen intestinale Caco-2 Epithelzellen als Modellsystem herangezogen wurden, konnten eine ähnliche Regulation der Folataufnahme im menschlichen Darm bestätigen. Diese Zellen zeigten unter Folsäuremangel-Bedingungen ebenso eine signifikante Zunahme der Folataufnahme welche mit einer Steigerung der Protein und mRNA Levels des hRFC in Verbindung steht [SUBRAMANIAN et al. 2003].

Laut Balamurugan und Said, welche Untersuchungen an Ratten vornahmen, konnte gezeigt werden, dass der RFC einer entwicklungsbedingten Regulation unterliegt. Unter anderem wurden die mRNA Levels der jejunalen Bürstensaummembran von Ratten dreier verschiedener Altersgruppen (60 Tage, 25-27 Tage und 13 Tage alt) mittels Real-Time PCR untersucht. Das Ergebnis zeigte signifikant höhere RFC mRNA Levels der beiden jüngeren Altersgruppen im Gegensatz zur Altersgruppe der erwachsenen Ratten (60 Tage). Auch zwischen den beiden jüngeren Altersgruppen konnte ein signifikanter Unterschied der RFC Expression festgestellt werden. Die RFC Protein- und mRNA Levels waren bei den 13 Tage alten Ratten höher als bei den 25-27 Tage alten.

Dieser Effekt führt zu einer erhöhten Folataufnahme während der frühen Lebensphasen bei Ratten. Er dient höchstwahrscheinlich der Sicherstellung einer ausreichenden Folatversorgung der jungen Tiere zur Synthese essentieller DNA-, RNA und Protein-Bausteine [BALAMURUGAN und SAID 2003].

2.1.1.2. Speicherung

Das Hauptspeicherorgan der Folate stellt die Leber dar, welche als solches die Versorgung anderer Organe reguliert [PIETRZIK et al. 2008]. In den Hepatozyten werden etwa 10-20 % der Folate gespeichert, wobei der größte Teil nach Metabolisierung, insbesondere an die Galle, wieder abgegeben wird. Dort unterliegen die Folate dem enterohepatischen Kreislauf mit einem täglichen Umsatz von etwa 90 µg. Mit einer Folatkonzentration die etwa das 10-fache des Serumspiegels beträgt, stellt die Galle eine Quelle schnell verfügbarer Monoglutamatverbindungen dar, welche kurzfristige Aufnahmepausen

ausgleichen kann [STANGER 2004]. Im menschlichen Organismus betragen die Folatspeicher etwa 5-10 mg, welche zur Hälfte in der Leber, vorwiegend als 5-Methyl-THF und 10-Formyl-THF, vorliegen [PIETRZIK et al. 2008].

2.1.1.3. Ausscheidung

In der Niere kommt es zur Filterung von Folat, welches jedoch zum Großteil mittels im proximalen Tubulus lokalisierten Folatrezeptoren rückresorbiert wird [STANGER 2004].

Die Ausscheidung mit dem Harn erfolgt in Form von Folsäure, 5-Methyl-THF, 10-Formyl-THF und inaktiver Abbauprodukte. Sie beträgt bei normaler Folatzufuhr etwa 1-12 µg. Aufgrund mikrobieller Folatbiosynthese in distalen Darmabschnitten können die Folatmengen im Fäzes 5- 10-fach höher sein als in der aufgenommenen Nahrung [PIETRZIK et al. 2008].

2.1.2. Biochemische Funktionen

2.1.2.1. Ein-Kohlenstoff (C₁)-Transfer

5,6,7,8-THF stellt die biologisch aktive Form der Folate dar, welche durch Reduktion von Folsäure über Dihydrofolsäure mit Hilfe der Enzyme Folat-Reduktase und Dihydrofolatreduktase gebildet wird.

THF und seine Derivate sind Coenzyme welche als Akzeptor und Überträger von Methyl-, Formyl-, Formiat- oder Hydroxymethylresten fungieren [LÖFFLER et al. 2007]. Diese gemeinsam als C₁-Einheiten bezeichneten Kohlenstoffreste stammen aus unterschiedlichen Stoffwechselreaktionen. Sie werden an THF gebunden und an geeignete Akzeptoren wieder abgegeben [PIETRZIK et al. 2008] wobei die Bindung dieser C₁-Einheiten an die N-Atome in Position 5 bzw. 10 des Pteroylrests erfolgt [LÖFFLER et al. 2007]. Die verschiedenen THF-C₁-Verbindungen unterscheiden sich in ihrer Oxidationsstufe, können jedoch ineinander überführt werden.

Die Übertragung der C₁-Reste nimmt bei vielen Stoffwechselwegen eine Schlüsselfunktion ein. So werden diese Kohlenstoffreste etwa für die

Purinsynthese, für die Pyrimidinsynthese und für die Methylierung von Homocystein zu Methionin benötigt [PIETRZIK et al. 2008].

In Abbildung 3 sind sowohl Purin- und Pyrimidin-Synthese als auch Methylierungszyklus schematisch dargestellt.

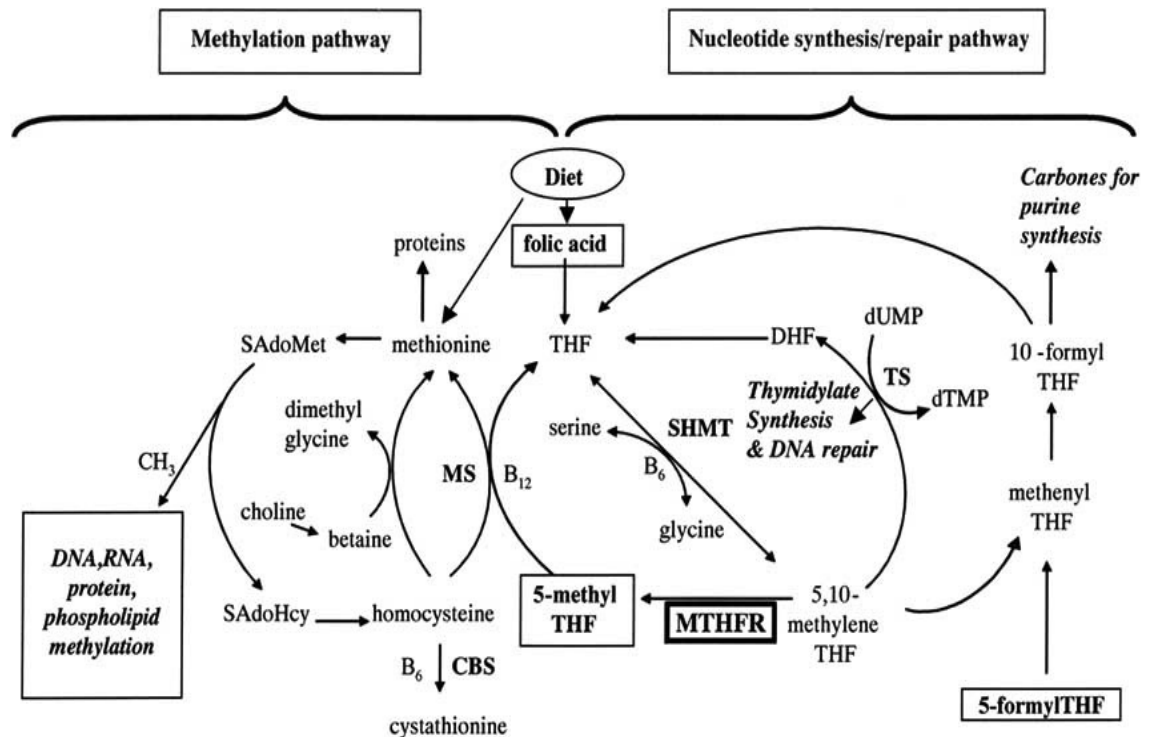


Abbildung 3: Folsäure, MTHFR und MS im Metabolismus der C₁-Einheiten
[FRISO und CHOI 2005]

Purin- und Pyrimidin-Biosynthese

Das besonders reaktionsfreudige 5,10-Methylen-THF, dessen Bildung durch Übertragung einer C₁-Einheit von Serin auf THF erfolgt [BAILEY und GREGORY 1999], liefert die C₁-Einheit für die Thyminsynthese. Desoxyuridylat wird dabei durch Methylierung, katalysiert durch die Thymidylatsynthase, in Thymidylat überführt.

10-Formyl-THF liefert die Kohlenstoffatome in Position C₂ und C₈ zur Synthese der Purine Adenin und Guanin deren Einbau durch Enzyme bewerkstelligt wird, welche die C₁-Einheit vom Coenzym entnehmen.

Folate liefern somit essentielle Kohlenstoffatome für die Synthese von Purinen und Pyrimidinen und stellen dadurch einen limitierenden Schritt in der DNA-Synthese dar [STANGER 2004].

Methylierungszyklus

Folate werden im Methylierungszyklus als Substrate für die Remethylierung von Homocystein zu Methionin und S-Adenosylmethionin (SAM) eingesetzt. SAM dient der Bereitstellung energiereicher Methylgruppen für wichtige Stoffwechselreaktionen wie etwa der Methylierung von DNA, Proteinen und Hormonen [STANGER 2002]. Weiters ist SAM ein wichtiger Methylondonator in der Cholinsynthese, wodurch Folat auch in den Nervenstoffwechsel eingreift [PIETRZIK et al. 2008].

5,10-Methylen-THF wird durch das Enzym Methylentetrahydrofolatreduktase (MTHFR) irreversibel zu 5-Methyl-THF reduziert, wodurch C₁-Einheiten irreversibel dem Methylierungszyklus zugeführt werden. Die Methylgruppe des 5-Methyl-THF wird für die Remethylierung von Homocystein zu Methionin verwendet, wobei diese Reaktion durch die Cobalamin-abhängige Methioninsynthase (MS) katalysiert wird [STANGER 2002]. Die MS regeneriert bei dieser Reaktion THF, welches dadurch wieder für die Thymidylat- und Purinsynthese zur Verfügung steht [BAILEY und GREGORY 1999].

Die Bildung von 5-Methyl-THF aus 5,10-Methylen-THF wird über eine Feedback-Kontrolle von Methionin über SAM auf die MTHFR reguliert [PIETRZIK et al. 2008]. Diese Hemmung durch SAM führt jedoch gleichzeitig zur Aktivierung der Cystathionin-β-Synthase (CBS), einem wichtigen Mechanismus zur Regulation des Homocysteinstoffwechsels [STANGER 2002].

Da Cobalamin bei der Methylierung von Homocystein als Akzeptor der Methylgruppe fungiert, führt ein Mangel dieses Vitamins zur sogenannten „Folsäurefalle“ [FÖDINGER et al. 2000], bei der es zu einer Anhäufung von 5-Methyl-THF und zu einem intrazellulären Mangel an biologisch aktivem THF kommt [STANGER 2004]. Die eingeschränkte Bildung von Methionin führt weiters zum Ausfall der Feedback-Kontrolle von SAM auf die MTHFR, wodurch es zur

irreversiblen Umwandlung von 5,10-Methylen-THF zu 5-Methyl-THF kommt. Dies begünstigt wiederum eine Anhäufung von Desoxyuridylat und einen Einbau von Uracil in die DNA. Ein Mangel an Folat und Cobalamin kann dadurch zu erhöhten DNA-Schäden sowie zu Veränderungen der DNA-Methylierung führen, zwei Faktoren welche ein erhöhtes Krebsrisiko darstellen. Weiters kommt es bei einem solchen Mangel zu einer Hyperhomocysteinämie, einem Risikofaktor für kardiovaskuläre Erkrankungen [FENECH 2001].

Eine einwandfreie Funktion des Folatzyklus hängt somit von einer normalen Funktion der beteiligten Enzyme, einer adäquaten Versorgung mit Folat und Cobalamin sowie ihrer korrekten Verteilung im Körper ab. Sowohl MTHFR als auch MS stellen daher wichtige Enzyme zur Regulation des Folatzyklus dar [STANGER 2002].

Zwei häufig auftretende genetische Mutationen, 1298A>C und 677C>T, des MTHFR-Gens führen beide zu einer verringerten Aktivität des Enzyms. Die homozygote Form des 677C>T Polymorphismus steht dabei, im Gegensatz zu 1298A>C, im direkten Zusammenhang mit erniedrigten Folatkonzentrationen sowie erhöhten Homocysteinlevels im Plasma. Weiters konnte gezeigt werden, dass eine Gen-Nährstoff-Wechselwirkung von Folat und dem MTHFR 677C>T Polymorphismus zu einer Änderung der DNA-Methylierung und dadurch zu einer veränderten Genexpression sowie Genintegrität führen kann [FRISO und CHOI 2005].

Swanson et al. beschrieben im Jahr 2001 einen Defekt der 5-Methyl-THF abhängigen Remethylierung durch Unterbrechung des MS-Gens bei der Maus. Heterozygote Knockout-Mäuse zeigten dabei leicht erhöhte Plasma-homocystein- und -methioninwerte im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen. Der homozygote Verlust dieses Gens war hingegen Embryonal letal. Dies konnte auch durch Supplementation von Folsäure, Methionin, Betain, oder Cholin während der Schwangerschaft nicht verhindert werden. Die Expression der MS setzt laut dieser Untersuchung bereits sehr früh, jedenfalls am intrauterinen 9,5.

Tag ein. Dies verdeutlicht die entscheidende Rolle der MS in der Embryonalentwicklung von Mäusen. Ungeklärt ist, ob beim Menschen ein Methionin-Synthase-Mangel zu einem vollständigen Erliegen der Enzymaktivität führen kann. Es wird jedoch vermutet, dass Menschen entweder Restaktivitäten der MS oder einen Kompensationsmechanismus aufweisen, welcher bei Mäusen fehlt [SWANSON et al. 2001].

Untersuchungen von Kacprzak et al. an *Aspergillus nidulans* konnten eine Regulation der Transkription des MS-Gens durch Homocystein und Cholin aufzeigen. Im Gegensatz zu *Saccharomyces cerevisiae* wurde bei *A. nidulans* jedoch keine Regulation durch Methionin festgestellt.

Die mRNA-Levels des Enzyms wurden durch Supplementation des Wachstumsmediums mit Homocystein erhöht, durch Supplementation mit Cholin hingegen erniedrigt. Die Regulation der MS-Expression durch Homocystein welche bereits bei *S. typhimurium* und *E. coli* beobachtet wurde, konnte weiters bei *S. cerevisiae* und *Schizosaccharomyces pombe* bestätigt werden. Die Homocystein-abhängige Erhöhung und die Cholin-abhängige Hemmung der MS-Expression stellen eine Regulationsmöglichkeit des metabolischen Netzwerks von Schwefel bei *A. nidulans* dar. Ob solch komplexe Regulationen des MS-Gens auch bei anderen Organismen stattfinden bedarf jedoch noch weiterer Forschungsarbeit [KACPRZAK et al. 2003].

2.2. *Caenorhabditis elegans* als Modellorganismus

Der Fadenwurm *C. elegans* ist ein genetisch überschaubarer Modellorganismus dessen Genom im Jahr 1998 als erstes aller vielzelligen Organismen komplett sequenziert wurde [STRANGE 2003].

Sein Genom sowie seine Biosynthese- und Stoffwechselwege sind in Vertebraten hochkonserviert [NASS und HAMZA 2007]. Viele physiologische Funktionen beim Menschen scheinen Analoga bei *C. elegans* zu haben und viele menschliche Gene haben Orthologe im Genom dieses Fadenwurms

[BALAMURUGAN et al. 2007]. *C. elegans* stellt daher ein hervorragendes genetisches Modell zur Aufklärung toxikologischer und biologischer Mechanismen beim Menschen dar.

C. elegans kann im Labor entweder auf Agar Platten mit *Escherichia coli* als Nahrungsquelle oder in Flüssigkulturen, mit oder ohne Bakterien, gehalten werden. Durch seine kleine Größe, hohe Nachkommenzahl und kurze Generationszeit zeichnet sich *C. elegans* als schnell wachsender, einfach zu kultivierender Modellorganismus im Labor aus [NASS und HAMZA 2007].

Die überwiegende Mehrheit der adulten Würmer stellen Hermaphroditen dar, Männchen machen nur etwa 0,1 % der Wildtyp-Populationen aus [STRANGE 2003]. Hermaphroditen sind im wesentlichen Weibchen, welche sowohl Eizellen als auch Sperma produzieren und speichern, wodurch sie zur Selbstbefruchtung fähig sind [CORSI 2006]. Durch Selbstbefruchtung können etwa 300 Nachkommen produziert werden, wohingegen Befruchtung durch Männchen zur Produktion von über 1000 Nachkommen führt [STRANGE 2003].

2.2.1. Lebenszyklus von *C. elegans*

C. elegans zeichnet sich durch einen schnellen Lebenszyklus aus, welcher, wie in Abbildung 4 ersichtlich, in unterschiedliche Stadien gegliedert ist.

Die embryonale Entwicklung beginnt im Uterus des Hermaphroditen und wird nach Abgabe über die Vulvaöffnung außerhalb des Hermaphroditen fortgesetzt [CORSI 2006]. Der Embryogenese, welche bei 25 °C in einem Zeitraum von etwa 14 Stunden abgeschlossen ist, folgt die postembryonale Entwicklung mit einer Dauer von etwa 35 Stunden. Diese setzt sich aus vier verschiedenen Larvenstadien (L1-L4) zusammen. Steht keine Nahrung zur Verfügung treten die Larven nach dem zweiten Larvenstadium (L2) in ein Dauerstadium über [STRANGE 2003]. Diese Dauerlarven weisen eine äußerst hohe Resistenz gegen Belastungen auf und können bei besseren Bedingungen, wie etwa dem Vorhandensein von Nahrung, in das L4 Stadium übergehen, wodurch sie wieder in den normalen Lebenszyklus eintreten [CORSI 2006].

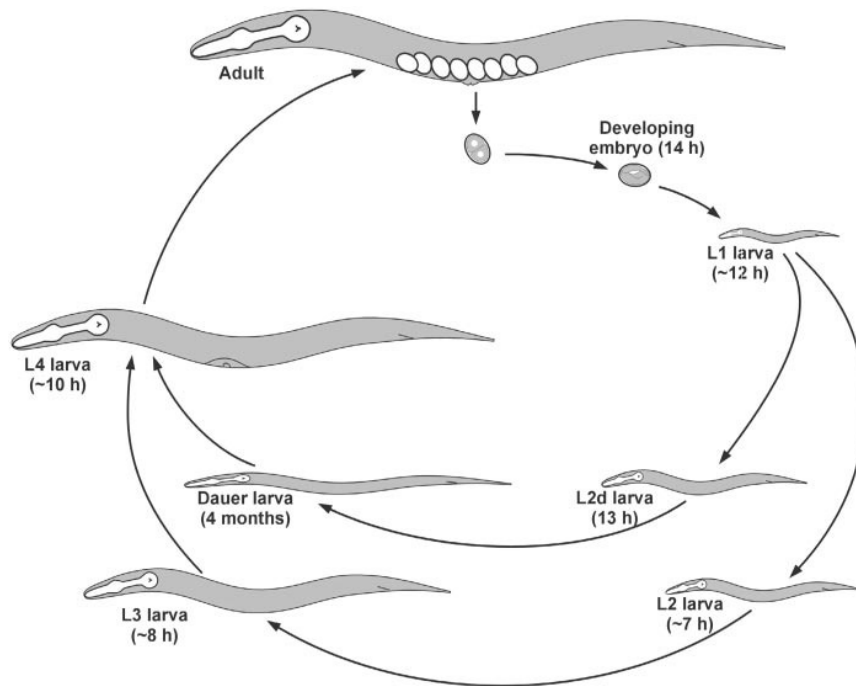


Abbildung 4: Lebenszyklus von *C. elegans* bei 25 °C auf Agar Platten

[STRANGE 2003]

Dieser Lebenszyklus von *C. elegans* bezieht sich auf Würmer welche auf NGM (nematode growth medium) Agar Platten wachsen und mit *E. coli* gefüttert werden [STRANGE 2003].

Untersuchungen konnten belegen, dass *C. elegans* je nach Art der Haltung, Unterschiede im Lebenszyklus aufweist. So zeigen Würmer welche auf NGM Agar Platten mit bakterieller Nahrungsquelle wachsen eine schnelle Entwicklung mit hoher Nachkommenschaft. Würmer welche in chemisch definierten Medien oder anderen komplexen axenischen Medien wachsen, benötigen hingegen mehr Zeit für ihre Entwicklung und weisen eine verlängerte Reproduktionsphase auf [SPRANDO et al. 2009].

2.2.2. Folataufnahme bei *C. elegans*

Im Genom von *C. elegans* wurden zwei mutmaßliche Orthologe des hRFC identifiziert. Diese beiden Carrier, *fol-1* und *fol-2*, weisen eine Ähnlichkeit zur

hRFC Sequenz von 40 bzw. 31 % auf. Balamurugan et al. konnten jedoch durch funktionelle Charakterisierung aufzeigen, dass ausschließlich *fol-1* als spezifischer Folattransporter im Organismus von *C. elegans* fungiert und somit das orthologe Gen zu hRFC darstellt.

Das System der Folataufnahme bei *C. elegans* weist große Ähnlichkeit zur Folatabsorption im menschlichen Darm auf. Es zeigt eine höhere Aktivität im sauren im Vergleich zum alkalischen Milieu und hat die gleichen Affinitäten zu reduzierten, oxidierten und substituierten Folatderivaten.

Durch Untersuchungen von Balamurugan et al. konnte gezeigt werden, dass die Expression von *fol-1* bei *C. elegans* Wildtypen einer entwicklungsbedingten Regulation unterliegt. Vergleiche unterschiedlicher Lebensstadien der Würmer (L1, L2, junge Adulte und adulte Würmer) konnten eine graduelle Abnahme der *fol-1* Expression mit zunehmender Reife der Würmer belegen. Die Analyse wurde mittels quantitativer Real-Time PCR, unter Verwendung von β -Actin als endogene Kontrolle, durchgeführt.

Weiters wurden Effekte exogener Folatlevel auf die *fol-1* Expression von *C. elegans* untersucht. Zu diesem Zweck wurde *C. elegans* für 24 Stunden in einem Nährmedium mit hohen Folatkonzentrationen (1 mM) gehalten und zusätzlich mit *E. coli* OP50 gefüttert. Verglichen wurden die so kultivierten Würmer mit *C. elegans* welche in regulären Nährmedien (ohne Folatsupplementation) gehalten und mit *E. coli* K12 MH828 und MH829, zwei Stämme denen die Fähigkeit zur Folatsynthese fehlt, gefüttert wurden. Diese Würmer stellten den Kalibrator für die quantitative Real-Time PCR dar. Als endogene Kontrolle wurde dabei β -Actin herangezogen.

Die Ergebnisse der quantitativen PCR-Analyse zeigten eine signifikante Abnahme der *fol-1* mRNA-Levels bei jenen Würmern, welche im Folat-übersupplementierten Nährmedium gehalten wurden, im Vergleich zum Kalibrator. Dies konnte in weiteren Untersuchungen mit einer Reduktion der Folataufnahme bei *C. elegans* in Verbindung gebracht werden.

Orthologe Gene für die beiden weiteren Folattransportsysteme des Menschen, den FR sowie den PCFT, konnten bei *C. elegans* nicht gefunden werden [BALAMURUGAN et al. 2007].

2.2.3. Orthologe von MTHFR, MS und hRFC bei *C. elegans*

Die folgenden Angaben über die orthologen Gene von MTHFR, MS und hRFC bei *C. elegans* wurden von der WormBase Plattform (www.wormbase.org) bezogen. WormBase ist eine Datenbank, welche sämtliche Informationen über die Gene und deren Funktionen von *C. elegans* und anderen verwandten Nematoden enthält.

- **MTHFR**

Das orthologe Gen von *C. elegans* zum menschlichen MTHFR-Gen (MSH HOMEO BOX HOMO-LOG 1) trägt den Sequenznamen C06A8.1. Die Expression dieses Gens erfolgt sowohl im Larvenstadium als auch bei adulten Würmern, wobei sich die Expressionsmuster teilweise unterscheiden.

- **MS**

Das Orthologe zum menschlichen MS-Gen bei *C. elegans* stellt das Gen R03D7.1 dar. Die Expression erfolgt im Larvenstadium und im adulten Stadium, jedoch mit unterschiedlichen anatomischen Expressionsmustern.

- **hRFC**

Folt-1 ist ortholog zum humanen SLC19A1-, SLC19A2- und SLC19A3-Gen welche für den hRFC kodieren. Das folt-1 Gen trägt auch den Sequenznamen C06H2.4. Es wird in mehreren Geweben, hauptsächlich aber im Pharynx und den hinteren Darmabschnitten, exprimiert. Das Ausmaß der Expression ist sowohl vom Stadium des Lebenszyklus, als auch von der Folatkonzentration des Nährmediums abhängig [WORMBASE].

2.3. Quantitative Real-Time RT-PCR

Die Real-Time Reverse Transkription Polymerase-Kettenreaktion (RT-qPCR) ist ein Verfahren welches zur Messung amplifizierender PCR-Produkte in Echtzeit dient [MEDHURST et al. 2000]. Sie kann zum quantitativen Nachweis von mRNA eingesetzt werden und stellt ein Routinewerkzeug der Molekularbiologie dar. Die Methode der RT-qPCR ist eine Kombination dreier unterschiedlicher Schritte, wobei zunächst die Umwandlung von RNA in cDNA mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase erfolgt. Anschließend kommt es zur Vervielfältigung dieser cDNA mittels PCR, worauf die Detektion und Quantifizierung dieser Amplifikate in Echtzeit folgen [NOLAN et al. 2006].

2.3.1. Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction – PCR) ist eine *in-vitro*-Technik zur gezielten Anreicherung von spezifischen Nukleinsäurebereichen aus einem Nukleinsäuregemisch. Die wesentlichen Komponenten der PCR-Reaktion setzen sich aus zwei passenden Oligonukleotidprimern, dem Template (Ziel-DNA), einer thermostabilen DNA-Polymerase und allen vier Desoxynukleotiden zusammen. Ausgehend von diesen Substanzen können in mehreren Zyklen DNA-Einzelstränge zu Doppelsträngen polymerisiert werden [KLÄMBT et al. 2005]. Als thermostabile DNA-Polymerase wird die sogenannte Taq-Polymerase, isoliert aus dem Bakterium *Thermus aquaticus*, eingesetzt [RYCHLIK et al. 1990].

Die sich wiederholenden Zyklen der PCR bestehen aus drei Schritten, dem Denaturierungsschritt, dem Annealingschritt und dem Elongationsschritt. Beim ersten Schritt, der Denaturierung, werden bei 94 °C die beiden Stränge der Template-DNA gespalten. Im Annealingschritt erfolgt eine Senkung der Temperatur auf 55 °C um eine Hybridisierung der im massiven Überschuss eingesetzten Oligonukleotidprimer an die vorliegenden Einzelstränge zu ermöglichen [MÜLHARD 2009]. Die Annealingtemperatur richtet sich dabei hauptsächlich nach den eingesetzten Primern aber auch nach dem zu amplifizierenden Fragment [RYCHLIK et al. 1990]. Bei der Elongation, dem dritten

Schritt eines PCR-Zyklus, wird die Temperatur auf 72 °C, dem Temperaturoptimum der Taq-Polymerase, erhöht. Dadurch kommt es zu einer Verlängerung der beiden Primer und somit zur komplementären Strangsynthese durch die Taq-Polymerase. Die Anzahl der Template-DNA wird somit am Ende eines jeden Zyklus im Idealfall verdoppelt [MÜLHARD 2009].

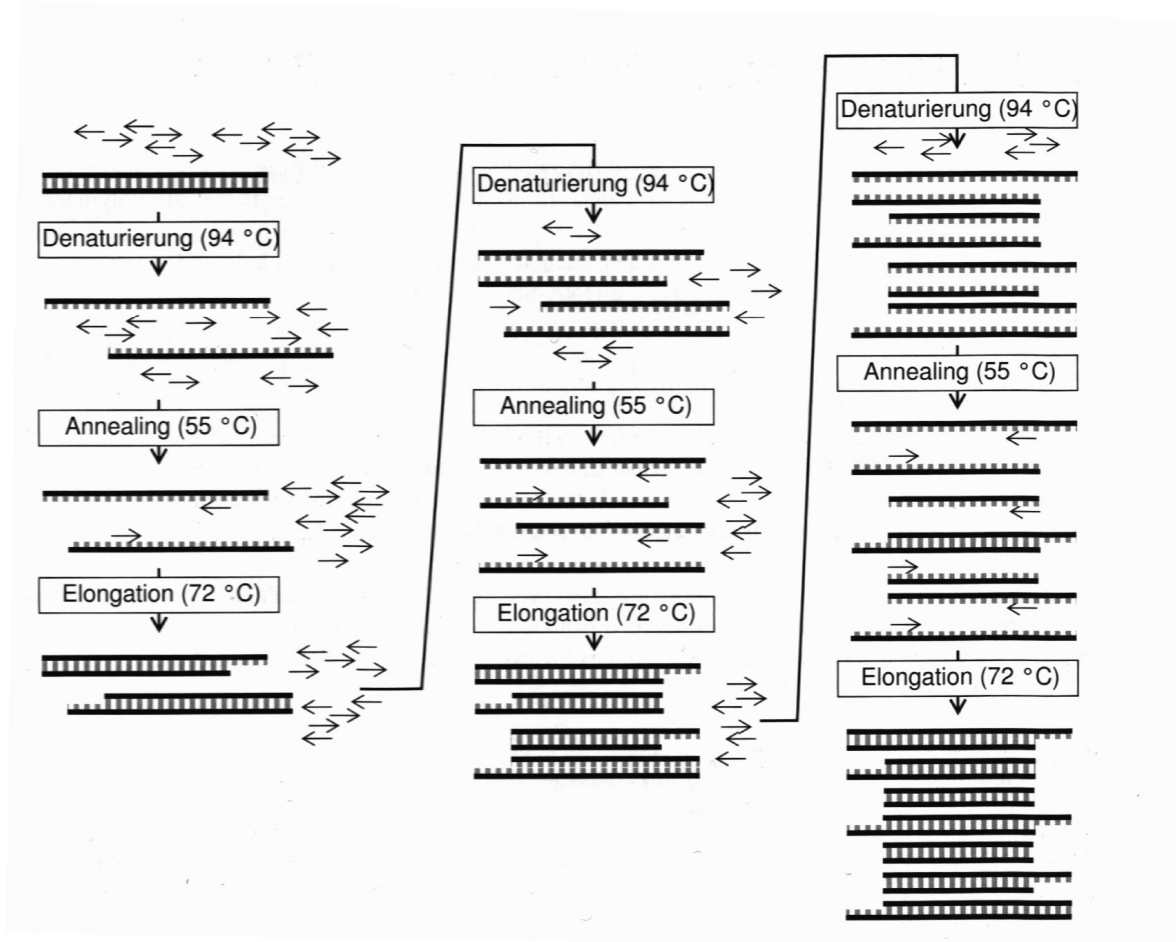


Abbildung 5: Schematische Darstellung des PCR-Prinzips [MÜLHARDT 2009]

Beim ersten Zyklus entstehen durch Primerverlängerung längere DNA-Stränge als ursprünglich gewünscht. Die im ersten Zyklus erzeugten DNA-Fragmente dienen nun im zweiten Zyklus ebenfalls als Template wobei die Reaktion am 5'-Ende dieser Templates abbricht. Somit werden ab dem zweiten Zyklus Fragmente gewünschter Länge erzeugt. In jedem weiteren Zyklus erfolgt eine exponentielle Zunahme der gewünschten Produkte, die Zunahme der längeren Fragmente erfolgt hingegen linear [KLÄMBT et al. 2005].

Die genannten Temperaturangaben der PCR-Zyklen entsprechen dem typischen Programm einer Standard-PCR. Um speziellen Anforderungen besser gerecht werden zu können, wurden bereits viele Abwandlungen dieses Protokolls entwickelt. So wird bei der Real-Time PCR häufig der Annealing- und der Elongationsschritt zu einem Schritt bei der Annealingtemperatur zusammengefasst [APPLIED BIOSYSTEMS 2007]. Dies wird dadurch ermöglicht dass die Taq-Polymerase auch unterhalb ihres Temperaturoptimums noch genügend Restaktivität aufweist [MÜLHARD 2009].

2.3.2. TaqMan Technologie

Die TaqMan RT-PCR ist eine Technik welche durch den Einsatz zweifach markierter fluorogener Sonden die Bestimmung akkumulierender PCR-Produkte in Echtzeit ermöglicht. Das Verfahren beruht auf der 5'-3'-Exonuklease-Aktivität der Taq-Polymerase. Das Enzym ist durch diese in der Lage die fluorogenen TaqMan Sonden, welche während der PCR spezifisch an die Target-Nukleotidsequenz hybridisieren, abzubauen [MEDHURST et al. 2000]. Die eingesetzten TaqMan Sonden bestehen aus einem Oligonukleotid dessen 5'-Ende mit einem Reporter- und dessen 3'-Ende mit einem Quencher-Farbstoff markiert ist [APPLIED BIOSYSTEMS 2007]. Als Quencher-Farbstoff wird dabei TAMRA (6-Carboxy-tetramethylrhodamin) eingesetzt, als Reporter kommt standardmäßig der Farbstoff FAM (6-Carboxy-Fluorescein) zum Einsatz, wobei auch noch weitere Reporter-Farbstoffoptionen existieren [SCHILD K.A.]. Bei intakten Proben kommt es durch die räumliche Nähe von Reporter und Quencher zu einem Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) zwischen den beiden Farbstoffen und somit zu einer Unterdrückung der Fluoreszenz des Reporter-Farbstoffs [MÜLHARD 2009].

Während des PCR-Prozesses hybridisieren nun die Sonden und Primer an die Ziel-Sequenz. In der Elongationsphase kommt es durch die 5'-3'-Exonuklease-Aktivität der Taq-Polymerase zum Abbau der Sonde deren Fragmente dadurch freigesetzt werden. Durch Dissoziation der TaqMan Sonde kann die Polymerase-Reaktion fortlaufen [APPLIED BIOSYSTEMS 2007]. Frei vorliegende, nicht hybridisierte Sonden werden von der Taq-Polymerase nicht geschnitten.

Kommt es jedoch zu einer Sondenhydrolyse führt die Trennung des Reporter- und des Quencher-Farbstoffs zu einer Unterbrechung des FRET und somit zu einer gesteigerten Reporter-Fluoreszenz. Die Zahl der Reportermoleküle und somit die Fluoreszenzintensität steigen entsprechend der Akkumulation der PCR-Produkte mit jedem Zyklus an. Mittels geeigneter Detektoren kann nun die Veränderung der Fluoreszenz im geschlossenen Reaktionsgefäß nach jedem Zyklus erfasst werden. Da nicht exakt bindende Sonden verdrängt werden bevor die 5'-3'-Exonuklease-Aktivität der Taq-Polymerase einsetzen kann, ist das gebildete Signal strikt sequenzspezifisch. [SCHILD K.A.].

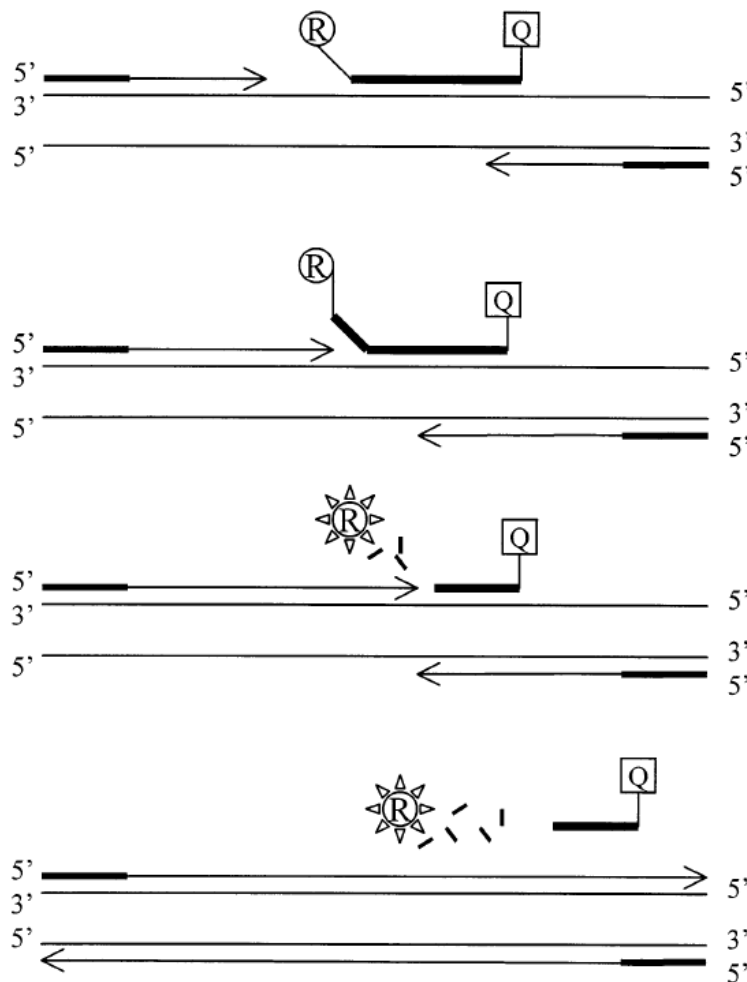


Abbildung 6: Schematische Darstellung der TaqMan-PCR [MEDHURST et al. 2000]

2.3.3. Relative Quantifizierung

Reverse Transkription (RT) in Kombination mit PCR stellt ein leistungsfähiges Instrument zur quantitativen Analyse der Genexpression dar. Die Methode der Real-Time PCR konnte für die Durchführung der quantitativen RT-PCR adaptiert werden [LIVAK und SCHMITTGEN 2001]. Generell kommen bei der Real-Time RT-PCR zwei unterschiedliche Quantifizierungsstrategien, die absolute - und die relative Quantifizierung, zum Einsatz [PFAFFL 2004]. Bei der absoluten Quantifizierung wird die Menge an Targetmolekülen (untersuchte Nukleotidsequenz) bestimmt. Dies erfolgt meist durch Bezug des PCR-Signals auf eine Standardkurve [LIVAK und SCHMITTGEN 2001]. Bei der relativen Quantifizierung hingegen wird die Veränderung der Target-Expression einer Probe relativ zu jener eines Kalibrators bestimmt. Als Kalibrator kann etwa eine unbehandelte Probe zum Einsatz kommen. Im Gegensatz zur absoluten Quantifizierung kann bei der relativen Quantifizierung ohne den Gebrauch von Standardkurven gearbeitet werden [APPLIED BIOSYSTEMS 2005].

Bei der Relativen Quantifizierung werden passive und aktive Referenzen zur Normalisierung der experimentellen Ergebnisse herangezogen.

Als aktive Referenz werden sogenannte Referenzgene, auch bezeichnet als „Housekeeping Gene“, eingesetzt [APPLIED BIOSYSTEMS 1997 (2001)]. Auf diese ubiquitär und homogen exprimierten Gene wird die Expression des zu untersuchenden Gens bezogen. Da Gewebe- und Matrixeffekte, unterschiedliche Effizienzen bei der RNA Extraktion sowie Fehler bei der reversen Transkription, Referenzgen und Zielgen in gleichem Ausmaß betreffen, kommt es durch die Normalisierung zu einer geringeren Varianz der Expressionsergebnisse [PFAFFL 2004].

Passive Referenzen werden hingegen verwendet um nicht-PCR-abhängige Schwankungen des Fluoreszenzsignals zu normalisieren [APPLIED BIOSYSTEMS 1997 (2001)]. Bei der empfohlenen Durchführung der TaqMan PCR ist stets der Farbstoff ROX als passive Referenz enthalten [SCHILD k.A.]. Die Normalisierung mittels passiver Referenz (ROX) erfolgt durch die Division der Reporterfluoreszenz durch die ROX-Fluoreszenz. Der dadurch erhaltene Wert

wird als R_n (normalisierter Reporter) bezeichnet. Der ΔR_n stellt das Ausmaß des durch die PCR generierten Signals dar (Abbildung 7). Er errechnet sich durch die Differenz aus R_n^+ und R_n^- ($\Delta R_n = R_n^+ - R_n^-$). Wobei R_n^+ den R_n Wert einer Reaktion mit Template und R_n^- den R_n Wert einer Reaktion ohne Template oder früher, nicht detektierbarer PCR-Zyklen darstellt [APPLIED BIOSYSTEMS 2007].

Da bei der Real-Time PCR die Menge des amplifizierenden Fragments nach jedem PCR-Zyklus bestimmt wird, kann sie als Kurve abhängig von der Zyklen-Anzahl dargestellt werden. Die Quantifizierung kann nur innerhalb jenes Bereiches erfolgen indem die Produkte der PCR exponentiell zunehmen. In der linearen Phase sowie in der Plateauphase dieser Kurve ist somit keine Quantifizierung möglich [KLÄMBT et al. 2005].

Als Maß für die Quantifizierung der eingesetzten Zielsequenz wird der sogenannten „Threshold Cycle“ oder C_T -Wert herangezogen (siehe Abbildung 7). Dieser entspricht der Anzahl der für die Erreichung eines definierten Fluoreszenzniveaus (Threshold, Schwellenwert) nötigen PCR-Zyklen [PFAFFL 2004]. Der Threshold ist definiert als die mittlere Standardabweichung des R_n früher PCR-Zyklen multipliziert mit einem regulierbaren Faktor [APPLIED BIOSYSTEMS 2007].

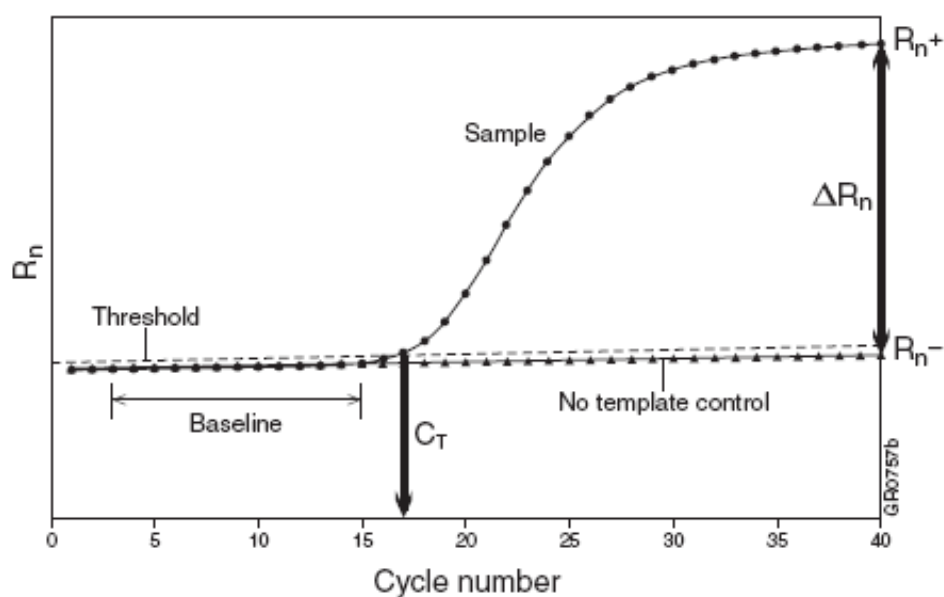


Abbildung 7: R_n versus Zyklen-Anzahl [APPLIED BIOSYSTEMS 2007].

Der Zahlenwert des C_T -Werts ist indirekt proportional der Menge an Amplifikat in der Reaktion [SCHMITTGEN und LIVAK 2008]. Umsomehr Target in der eingesetzten cDNA und somit in der mRNA vorhanden ist, desto niedriger ist der C_T Wert [NOLAN et al. 2006]. Die Expression der Gene kann über das sogenannte „delta-delta C_T “ ($\Delta\Delta C_T$) Berechnungsmodell oder über effizienzkorrigierte Modelle erfasst werden [PFAFFL und MEYER 2006].

Diese Methode setzt den Einsatz gleicher Mengen an Nukleinsäuren und eine identische Effizienz der Amplifikation voraus [HEID et al. 1996].

Die Effizienz der Amplifikation eines Gens lässt sich auf unterschiedliche Weise bestimmen. Häufig erfolgt die Erstellung einer Standardkurve aus unterschiedlichen Verdünnungsstufen, aus deren Steigung die Real-Time PCR Effizienz berechnet werden kann. Dazu wird die eingesetzte Menge an cDNA in einer logarithmischen Funktion gegen die Zyklenzahl am Threshold Cycle dargestellt. Die Effizienz lässt sich nach Gleichung 1 errechnen.

Gleichung 1

$$E = 10^{-1/\text{Steigung}} - 1$$

[PFAFFL 2004]

2.3.3.1. Vergleichende $\Delta\Delta C_T$ -Methode

Die vergleichende $\Delta\Delta C_T$ -Methode kann zu Berechnung relativer Unterschiede der Genexpression aus experimentellen Daten der RT-qPCR eingesetzt werden [LIVAK und SCHMITTGEN 2001]. Zunächst erfolgt bei dieser Methode die Normalisierung durch Subtraktion des C_T -Werts des Referenzgens vom C_T -Wert des untersuchten Zielgens für jede untersuchte Probe ($\Delta C_T = C_{T\text{Zielgen}} - C_{T\text{Referenzgen}}$). Anschließend wird von diesem ΔC_T -

Wert der experimentell behandelten Probe der ΔC_T -Wert des Kalibrators (unbehandelte Kontrolle) abgezogen [PFAFFL und MEYER 2006].

Die relative, bezüglich des Referenzgens normalisierte Menge an Zielgen (Target) in Abhängigkeit des Kalibrators ergibt sich aus dem arithmetischen Term:

$$2^{-\Delta\Delta C_T}$$

Diese lässt sich mit Hilfe von Gleichung 2, welche die Anzahl der Target-Moleküle beim Zyklus n über die exponentielle Amplifikation der PCR beschreibt, herleiten:

Gleichung 2

$$X_n = X_0 \times (1 + E_X)^n$$

X_n = Anzahl an Zielsequenzen beim Zyklus n der Reaktion

X_0 = Ursprüngliche Anzahl der Eingesetzten Zielsequenzen

E_X = Effizienz der Target – Amplifikation

n = Anzahl der Zyklen

Der C_T -Wert gibt die Anzahl der Zyklen wieder, welche zur Erreichung eines definierten Fluoreszenzniveaus benötigt werden. Somit ergibt sich bei C_T für die Anzahl an Target-Molekülen Gleichung 3.

Gleichung 3

$$X_T = X_0 \times (1 + E_X)^{C_{T,X}} = K_X$$

X_T = Anzahl der Targemoleküle beim Threshold

$C_{T,X}$ = Threshold Cycle der Target – Amplifikation

K_X = Konstante

In gleicher Weise lässt sich bei endogener Kontrolle für die Anzahl an Referenzmolekülen am Threshold Cycle Gleichung 4 ableiten.

Gleichung 4

$$R_T = R_0 \times (1 + E_R)^{C_{T,R}} = K_R$$

R_T = Anzahl der Referenzmoleküle beim Threshold

R_0 = Ursprüngliche Anzahl an Referenzmolekülen

E_R = Effizienz der Referenz – Amplifikation

$C_{T,R}$ = Threshold Cycle der Referenz – Amplifikation

K_R = Konstante

Für die Targetmolekül- im Bezug auf die Referenzmolekül-Anzahl kann laut Gleichung 5 die Konstante K ermittelt werden.

Gleichung 5

$$\frac{X_T}{R_T} = \frac{X_0 \times (1 + E_X)^{C_{T,X}}}{R_0 \times (1 + E_R)^{C_{T,R}}} = \frac{K_X}{K_R} = K$$

Da die exakten Werte von X_T und R_T bei der RT-qPCR auf vielen verschiedenen Faktoren beruhen, ist die Konstante K nicht unbedingt gleich Eins. Bei Annahme identer Effizienzen von Target- und Referenz-Amplifikation ($E_X = E_R = E$) ergibt sich Gleichung 6.

Gleichung 6

$$X_N \times (1 + E)^{\Delta C_T} = K$$

$X_N = \frac{X_0}{R_0}$, Normalisierte Menge an Target

$\Delta C_T = C_{T,K} - C_{T,R}$, Differenz der Threshold Cycles des Targets und der Referenz

Durch Umformung ergibt sich für X_N nach Gleichung 7:

Gleichung 7

$$X_N = K \times (1 + E)^{-\Delta C_T}$$

Im letzten Schritt erfolgt, wie in Gleichung 8 dargestellt, die Division von X_N der Probe (q) durch jenes X_N des Kalibrators (cb), um den relativen Bezug zu selbigem herzustellen.

Gleichung 8

$$\frac{X_{N,q}}{X_{N,cb}} = \frac{K \times (1+E)^{-\Delta C_{T,q}}}{K \times (1+E)^{-\Delta C_{T,cb}}} = (1+E)^{-\Delta \Delta C_T}$$

$$\Delta \Delta C_T = \Delta C_{T,q} - \Delta C_{T,cb}$$

Unter der Annahme einer Effizienz von gleich oder nahezu Eins, ergibt sich als Menge an Target, normalisiert auf die endogene Kontrolle sowie bezogen auf den Kalibrator, Gleichung 9.

Gleichung 9

$$\text{Menge an Target} = 2^{-\Delta \Delta C_T}$$

[LIVAK und SCHMITTGEN 2001]

2.3.3.2. Validierungsexperiment

Um bei RT-qPCR Experimenten die vergleichende $\Delta \Delta C_T$ -Methode verwenden zu können, müssen die Effizienzen der Target- und der Referenz-Amplifikation annähernd ident sein. Um diese Übereinstimmung der Effizienzen zu überprüfen ist es daher notwendig ein Validierungsexperiment durchzuführen

bevor die vergleichende $\Delta\Delta C_T$ -Methode zur Anwendung kommt. Bei diesem Experiment erfolgt eine Betrachtung wie sich der ΔC_T -Wert in Abhängigkeit zur Template-Verdünnung verändert. Dazu wird in einer grafischen Darstellung die logarithmische Template-Menge ($\log$ cDNA) gegen den ΔC_T -Wert aufgetragen. Ist die Steigung der dadurch ermittelten Geraden annähernd Null, so sind die Effizienzen von Target und Referenz einander ähnlich. Bei einer Steigung der Geraden kleiner 0,1 kann die vergleichende $\Delta\Delta C_T$ -Methode zur relativen Quantifizierung herangezogen werden [APPLIED BIOSYSTEMS 1997 (2001)].

2.3.3.3. Referenzgene

Durch die unterschiedlichen Verarbeitungsschritte der mRNA, wie Extraktion und reverse Transkription, kann es zu Variationen der in die Real-Time PCR eingesetzten cDNA-Mengen kommen. Zur Elimination dieser Variationen müssen Referenzgene als endogene Kontrollen eingesetzt werden.

Um reproduzierbare und zuverlässige Ergebnisse zu erhalten, ist die Wahl passender Referenzgene, speziell bei geringen Expressionsunterschieden, für die Analyse der Genexpression von entscheidender Bedeutung. Geeignete Referenzgene zeichnen sich durch geringe Empfindlichkeit gegenüber experimentellen Behandlungen sowie durch eine konstante Expression in allen zu untersuchenden Proben aus. Die Notwendigkeit einer korrekten Normalisierung mittels Referenzgenen stellt bis heute eines der Hauptprobleme der RT-qPCR dar.

Die zur Genexpressionsanalyse bei *C. elegans* weitläufig eingesetzten Referenzgene *act-1* und *ama-1* können unter den unterschiedlichen experimentellen Gegebenheiten in ihrer Expression stark reguliert werden. Dennoch werden sie häufig ohne zuvorige Validierung verwendet, wodurch es zu Fehlinterpretationen der Target-Expressionslevels kommen kann. Die Methode der Wahl sollte in der Verwendung mehrerer, stabil exprimierter Referenzgene liegen [HOOGEWIJS et al. 2008].

3) Material und Methoden

3.1. Untersuchungsmaterial

Zur Untersuchung der mRNA-Expression von C06A8.1, R03D7.1 und folt-1 wurde der *C. elegans* Stamm mit der Bezeichnung Bristol N2 verwendet. Dieser Wildtyp wurde vom Caenorhabditis Genetics Center (CGC) erhalten.

Generelle Arbeitsschritte bei der Kultivierung und Synchronisation von *C. elegans* sowie die Herstellung des CeHR Mediums und des M9 Puffers erfolgten in Anlehnung an Hamza [HAMZA k. A.]. Details zur Durchführung sowie Abweichungen vom Protokoll werden im Folgenden erläutert.

3.1.1. Kultivierung von *C. elegans*

Die Haltung von *C. elegans* erfolgte in einem chemisch definierten Flüssigmedium, dem sogenannten CeHR Medium (*C. elegans* Habitation and Reproduction Medium). Bei der Herstellung wurde die Reihenfolge der Zugabe der Stocklösungen modifiziert. So wurde Hemin-Chlorid erst nach allen anderen Lösungen über den Filter zugegeben da es bei laut Literatur gegebener Reihenfolge zu Löslichkeitsproblemen desselben kam.

Weiters wurde bei der Herstellung des Mediums auf die Zugabe der Folsäure (Pteroylglutamic Acid, Folate (Ca)) verzichtet um diese später für die Fütterung verschiedener Folat-Mengen (siehe 3.2.2.) gezielt variieren zu können. Daher wurde das Medium als CeHR Folate Depletion (CeHRFD) Medium bezeichnet. Für die gewöhnliche Haltung von *C. elegans* wurde das CeHRFD Medium mit der vorgegebenen Menge an Folsäure (16,99 µmol Pteroylglutamic Acid und 7,33 µmol Ca-Folate pro Liter Medium) versetzt (im Folgenden wird diese Menge als 1 FS bezeichnet) und entsprach somit wieder dem CeHR Medium.

Alle bei der Herstellung des Mediums verwendeten Chemikalien stammen aus kommerziellen Quellen und wurden ohne weitere Vorbereitung eingesetzt. Das Milli-Q-Wasser wurde durch eine Millipore-Anlage (Seven Easy, Mettler Toledo) bereitgestellt.

Gehalten wurde *C. elegans* in einem Inkubator bei 20 °C in 25 cm² Filter-Top-Zellkulturflaschen welche mittels Plattform-Shaker in ständiger Bewegung gehalten wurden um eine ausreichende Sauerstoffversorgung zu gewährleisten. Das in den Zellkulturflaschen enthaltene Medium (10 ml) setzte sich aus 80 % CeHR Medium und 20 % frei im Handel erhältlicher, fettarmer UHT Milch zusammen.

Um eine ausreichende Nährstoffversorgung der Würmer sicher zu stellen und eine Überpopulation zu vermeiden, musste nach je 3-4 Tagen ein Wechsel des Mediums durchgeführt werden. Zu diesem Zweck wurde die Wurmkultur in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt, bei 800 × g zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Anschließend wurden etwa 1-2 Tropfen des verbleibenden Wurmpellets in eine neue Zellkulturflasche mit 10 ml frischem Medium (8 ml CeHR Medium + 2 ml Milch) überführt.

Alle bei der Kultivierung von *C. elegans* durchgeführten Arbeitsschritte wurden unter Verwendung von Steriltechnik in einer Laminar-Flow-Werkbank (ESCO; Ehret) durchgeführt.

3.1.2. Synchronisation von *C. elegans*

Um Würmer selben Alters bzw. gleichen Entwicklungsstadiums zu erhalten, wurden diese einer Synchronisation, auch "Bleachen" genannt, unterzogen. Dieser Vorgang wird durch die Tatsache ermöglicht, dass die Eier der Würmer durch ihre Schale vor der Bleach-Lösung geschützt werden. Die Würmer selbst hingegen werden von dieser Lösung abgetötet und lösen sich auf. Werden die Eier anschließend in ein nährstoffreies Medium (M9 Puffer) überführt, entwickeln sie sich innerhalb eines Tages zu L1 Larven. Aus diesem Larvenstadium können sie sich aufgrund der fehlenden Nährstoffe nichtmehr weiter entwickeln und sind somit synchronisiert. Nach Überführung der L1

Larven in ein nährstoffhaltiges Medium (CeHR) erfolgt wieder ein Wachstum der Würmer.

3.2. Probengewinnung

3.2.1. Trennung der Entwicklungsstadien

Durch vorausgehende Untersuchungen am Emerging Focus Nutrigenomics, Department für Ernährungswissenschaften, konnte bereits festgestellt werden, dass Folsäure für die Reproduktion von *C. elegans* von essentieller Bedeutung ist. So konnten Würmer welche ohne die Zugabe von Folsäure kultiviert wurden kaum Eier ablegen bzw. aus den abgelegten Eiern keine Würmer schlüpfen. In einer solchen Probe wären somit nur adulte Würmer und keine Larvenstadien vorhanden. Aus diesem Grund sollte untersucht werden ob Unterschiede in der Genexpression bei C06A8.1, R03D7.1 und *fol-1* zwischen Larvenstadien (gewählt wurden L3-L4) und adulten Wurmern vorliegen.

3.2.1.1. Lebenszyklus im Flüssigmedium

Der Lebenszyklus von *C. elegans* welcher in der einschlägigen Literatur [CORSI 2006, STRANGE 2003] zu finden ist, bezieht sich auf die Entwicklung der Würmer auf NGM Agar Platten. Da jedoch bekannt ist, dass sich die Nematoden im Flüssigmedium langsamer entwickeln als auf Platten [HAMZA k. A., SPRANDO 2009], musste zunächst eine Abschätzung des Lebenszyklus in diesem Medium erfolgen. Dazu wurden die Würmer synchronisiert (siehe 3.1.2.) und als solche in das Flüssigmedium überführt, dieser Tag wird als Tag 0 bezeichnet. Es folgte eine Beobachtung der Entwicklung der Würmer in den folgenden vier Tagen (Tag 1-Tag 4) welche 3-mal täglich durchgeführt wurde. Dazu wurden ein paar Würmer auf ein Deckglas pipettiert, durch ein Stereomikroskop (Wild Heerbrugg; Kern) betrachtet und auf spezielle Merkmale der unterschiedlichen Larvenstadien untersucht. Der so erhaltene Überblick über das Wachstum von *C. elegans* im Flüssigmedium ermöglichte die folgende Trennung der Entwicklungsstadien.

3.2.1.2. Gewinnung von Larvenstadien L3-L4

Zur Gewinnung der L3-L4 Larven wurden synchronisierte Würmer (L1) in eine Zellkulturflasche mit Flüssigmedium überführt. An Tag 2 konnten die zu L3-L4 herangewachsenen Larven in ein Zentrifugenröhrchen überführt, der Überstand nach Zentrifugation (2 min, 800 × g) abgenommen und das verbleibende Wurmpellet (etwa 60 µl) nach zweimaligem Waschen mit sterilem Milli-Q-Wasser in 600 µl RLT-Puffer (siehe 3.3.1.) bei -20 °C eingefroren werden.

3.2.1.3. Gewinnung von adulten Würmern

Um adulte Würmer zu erhalten wurde die Technik der Saccharose-Sedimentation [COPASTM Protocol #SP-04] für *C. elegans* eingesetzt. Dazu wurden synchronisierte L1 ins Flüssigmedium überführt, an Tag 4 die adulten Würmer inklusive wenigen Nachkommen in einem Zentrifugenröhrchen abzentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Pellet in 3 ml M9 Puffer resuspendiert. Aus einer 70 % Saccharose-Stocklösung (23,33 g Saccharose + 10 ml Destilliertes Wasser) wurden je 10 ml einer 7 % und einer 3,5 % Saccharose-Lösung durch Verdünnung mit destilliertem Wasser hergestellt. Nach Abkühlung der Lösungen auf etwa 15 °C um die Beweglichkeit der Würmer einzuschränken, erfolgte die Herstellung eines Stufengradienten der beiden Saccharose-Lösungen in einem 15 ml Zentrifugenröhrchen. Dazu wurden zunächst 6 ml der 3,5 %igen Lösung in das Röhrchen überführt und anschließend 3 ml der 7 %igen Lösung mit Hilfe einer Pasteur-Pipette unter die 3,5 %ige Lösung geschichtet. Danach wurden die 3 ml Würmer in M9 Puffer vorsichtig, um Vermischungen zu vermeiden, auf die 3,5 %ige Lösung pipettiert. Nun können sich die Würmer je nach Größe in die unterschiedlichen Schichten absetzen wobei adulte, große Würmer in der 7 %igen Saccharose-Lösung ein Pellet formen. Dieser Vorgang dauert etwa 15 min und sollte bei Raumtemperatur erfolgen. Nach Abnahme der oberen Schichten mittels Pipette wurde das Pellet der adulten Würmer in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und 2-mal mit sterilem Wasser gewaschen. Der Überstand wurde abgenommen, das Pellet mit 600 µl RLT-Puffer versetzt und bei -20 °C eingefroren.

Sowohl die Gewinnung der L3-L4 Larven als auch jene der adulten Würmer wurde 3-mal durchgeführt um drei biologische Replikate zu erhalten.

3.2.2. Fütterung unterschiedlicher Folat-Mengen

Für die Untersuchung der Genexpression bei Fütterung von *C. elegans* mit variablen Mengen an Folat wurden die Würmer in Medien definierter Folat-Konzentrationen gehalten. Dazu wurde das hergestellte Medium (CeHRFD) mit den unterschiedlichen Folsäure (FS)-Konzentrationen versetzt. Als die zu untersuchenden Konzentrationen wurden 0 FS (keine Zugabe von Folat), 10 FS (zehnfache Menge an Folsäure jener bei Hamza beschriebenen) und 1:1000 FS (ein-tausendstelfache Menge an Folsäure) gewählt. Würmer welche mit der einfachen Menge an Folsäure (1 FS; siehe Hamza) gehalten wurden, werden bei der mRNA-Quantifizierung als Kalibrator (siehe 3.3.4.2.) verwendet.

3.2.2.1. Herstellung der Folsäure-Konzentrationen

- 10 FS: In einen 10 ml Messkolben wurden 37,5 mg Ca-Folinat eingewogen und mit maximal 5 ml 1,0 N KOH gelöst. In ein weiteres Gefäß wurden 75 mg Folsäure eingewogen, mit destilliertem Wasser gelöst und in den Messkolben überführt. Dieser wurde anschließend mit destilliertem Wasser bis zur Markierung aufgefüllt. 100 µl dieser Lösung wurden nun zu 10 ml eines Mediums zugesetzt um somit die Konzentration von 10 FS zu erhalten.
- 1 FS: Ausgehend von der 10 FS konnte durch Verdünnung mit M9 Puffer eine 5 FS hergestellt werden: 50 ml der 10 FS wurden mit 50 ml M9 Puffer verdünnt. Danach wurden 20 µl dieser Konzentration sowie 80 µl M9 Puffer in 10 ml Medium eingesetzt wodurch eine einfache Folsäure-Konzentration (1 FS) erhalten wurde.
- 1:1000 FS: Diese Konzentration wurde ebenfalls durch Verdünnung von 10 FS mit M9 Puffer hergestellt: 10 µl der 10 FS wurden entnommen und mit 990 µl M9 Puffer versetzt. Nach gutem Mischen am

Vortex wurden aus dieser Verdünnung erneut 10 µl entnommen und mit 990 µl M9 Puffer verdünnt. Nach Zugabe von 100 µl dieser Lösung zu 10 ml Medium wurde die Konzentration von 1:1000 FS erhalten.

0 FS: Um das Volumen des Mediums in der Zellkulturflasche konstant zu halten wurde bei 0 FS 100 µl M9 Puffer zugesetzt

Zur Gewinnung der Proben wurden die entsprechenden Mengen an Folsäure – Lösungen gemeinsam mit 10 ml Medium (8 ml CeHRFD Medium + 2 ml Milch) in eine Filter-Top-Zellkulturflasche überführt und ein Pellet synchronisierter L1 Larven eingesetzt. Dieser Tag wurde als Tag 0 bezeichnet. An Tag 6 wurde die Probe in ein Zentrifugenröhrchen überführt, der Überstand nach Zentrifugation abgenommen und das Wurmpellet 2-mal mit sterilem Milli-Q-Wasser gewaschen. Das verbleibende Pellet wurde anschließend in 600 µl RLT Puffer bei -20 °C eingefroren. Dieser Vorgang wurde mit allen zu untersuchenden Folsäure-Konzentrationen 3-mal wiederholt um drei verschiedene biologische Replikate zu erhalten.

3.3. Molekularbiologische Methoden

Die Durchführung der molekularbiologischen Methoden erfolgte unter DNase bzw. RNase freien Bedingungen an speziellen DNA- und RNA-Arbeitsplätzen. Alle Arbeitsschritte wurden mit entsprechend DNase und RNase freien Materialien sowie mit Handschuhen vorgenommen. Weiters wurde ausschließlich RNase freies Wasser verwendet.

3.3.1. Extraktion der mRNA

Die Extraktion von mRNA wurde mit Hilfe des RNeasy Mini Kit (Qiagen) durchgeführt. Zur Vorbereitung wurde der RLT-Puffer des Kits mit β-Mercaptoethanol (10 µl / ml Puffer) versetzt. Dieser ist anschließend bei Raumtemperatur für ein Monat haltbar. Weiters wurde das RPE-Puffer

Konzentrat vor dem ersten Gebrauch mit der vierfachen Menge an 96-100 %igem Ethanol verdünnt. Mit Hilfe eines Spatels wurden eine definierte Menge (etwa 300 mg) Glasperlen (Glass beads, 425-600 µm; SIGMA) in Gewindefläschchen (greiner bio-one) überführt. Zu diesen wurde nun die aufgetaute Probe (600 µl RLT-Puffer + Wurmpellet, siehe Probengewinnung) zugegeben. Anschließend erfolgte die Homogenisierung des Materials mittels Shaker (Mini-Beadbeater; Biospec Products): 1 min rütteln; 1 min auf Eis kühlen; erneut 1 min rütteln. Danach wurde die Probe bei maximalem Tempo für 3 min zentrifugiert und der Überstand mittels Kanüle (Myjector U-100 Insulin, 0,5 ml; TERUMO) abgenommen. Dieser Überstand wurde nun mit 70 %igem Ethanol im Verhältnis 1:1 versetzt und durch mehrmaliges Aufziehen in die Pipettenspitze vermischt. 700 µl dieses Gemisches wurden nun auf die RNeasy Säule aufgebracht welche in ein 2 ml Sammelröhrchen platziert wurde. Nach Zentrifugation bei $8\,000 \times g$ für 30 sec wurde die abzentrifugierte Flüssigkeit im Sammelröhrchen verworfen. Da vom Probengemisch mehr als 700 µl vorhanden waren wurde der Vorgang mit der gleichen RNeasy Säule wiederholt. Danach wurden 700 µl RW1-Puffer auf die RNeasy Säule aufgebracht und 30 sec bei $8\,000 \times g$ zentrifugiert. Das Sammelröhrchen wurde abgenommen und der Inhalt verworfen. Anschließend wurden 500 µl RPE-Puffer auf die RNeasy Säule aufgebracht 30 sec bei $8\,000 \times g$ zentrifugiert und die abzentrifugierte Flüssigkeit im Sammelröhrchen verworfen. Daraufhin wurden erneut 500 µl RPE-Puffer auf die RNeasy Säule aufgebracht und für 2 min bei $8\,000 \times g$ zentrifugiert. Das gesamte Sammelröhrchen wurde verworfen und die RNeasy Säule in ein neues 1,5 ml Sammelröhrchen platziert. Nun wurden 30 µl Wasser direkt auf die Säulenmembran aufgebracht und 1 min bei $8\,000 \times g$ zentrifugiert wodurch die Elution der RNA erfolgte. Von den erhaltenen 30 µl wurden 10 µl für die Quantifizierung der RNA aliquotiert. Die restliche RNA-Probe (Template-RNA) wurde bei $-20\,^{\circ}\text{C}$ eingefroren.

3.3.2. Quantifizierung der extrahierten mRNA

Die Quantifizierung der RNA erfolgte durch spektrophotometrische Messung mittels NanoDrop (ND 1000, peqlab). Das Gerät wurde mit 1,5 µl RNase freiem

Wasser initialisiert und mit derselben Menge an RNase freiem Wasser der Nullabgleich getätigt. Daraufhin erfolgte die Vermessung der Probe bei einer Wellenlänge von 260 nm, dem Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren, und bei 280 nm, dem Absorptionsmaximum von Proteinen. Die Quantifizierung der RNA erfolgte im NanoDrop bei 260 nm. Eine mögliche Verunreinigung durch Protein wurde durch den Quotienten Optische Dichte (OD) 260/280 nm bestimmt, welcher idealerweise zwischen 1,8 und 2 liegen sollte.

3.3.3. Synthese der komplementären DNA (cDNA)

Die Reverse Transkription der RNA in cDNA wurde mit Hilfe des QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen) durchgeführt. Dieser mußte bei -20 °C gelagert werden. Zunächst erfolgte das Auftauen der Template-RNA auf Eis. Bei sehr unterschiedlichen RNA-Konzentrationen der Templates wurden diese durch Verdünnung mit RNase freiem Wasser angeglichen. Die Reagenzien des Kits wie gDNA Wipeout-Puffer, Quantiscript Reverse Transcriptase, Quantiscript RT-Puffer, RT-Primer Mix und RNase freies Wasser wurden bei Raumtemperatur aufgetaut und anschließend auf Eis gelagert. Um Kontaminationen genomischer DNA zu beseitigen wurde zunächst eine gDNA Elimination auf Eis angesetzt. Dazu wurden 2 µl gDNA Wipeout-Puffer und ein Volumen an Template-RNA welches einer RNA Menge von etwa 1 µg entspricht (aber mindestens 2 µl) in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß vereinigt. Weiters wurde Wasser zugegeben um ein Gesamtvolumen von 14 µl zu erhalten. Es folgte eine Inkubation bei 42 °C für 2 min (mittels PCR) wonach die Proben sofort wieder auf Eis gelagert wurden. Anschließend wurde der Reverse Transcription Master Mix auf Eis angesetzt. Dazu wurden je Probe (Reaktion) 1 µl Quantiscript Reverse Transcriptase, 4 µl Quantiscript RT-Puffer und 1 µl RT-Primer-Mix vereinigt und am Vortex gut geschüttelt. Nun wurden je 6 µl dieses RT-Master Mix der gesamten gDNA Eliminations-Reaktion (14 µl) zugefügt wodurch ein Endvolumen von 20 µl erhalten wurde. Mittels PCR wurden die Proben erst 15 min bei 42 °C und anschließend, um die Reverse Transcriptase zu inaktivieren 3 min bei 95 °C inkubiert. Die Lagerung der cDNA Templates erfolgte bei -20 °C im Tiefkühlschrank.

3.3.4. Durchführung der Real-Time RT-PCR (TaqMan®-PCR)

Für die Amplifikation der Templates mittels Real-Time PCR (7300 Real-Time PCR System; Applied Biosystem) wurden TaqMan Gene Expression Assays (Applied Biosystems, siehe 3.3.5.) und ein TaqMan Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems) eingesetzt. Für jede Reaktion der zu untersuchenden Gene und der Referenzgene wurde anschließend laut Pipettierschema in Tabelle 1, ein 25 µl PCR-Reaktions-Mix hergestellt.

Tabelle 1: Herstellung eines PCR-Reaktions-Mix für eine Reaktion

	Volumen (µl)/Reaktion
Gene Expression Master Mix	12,5
Gene Expression Assay	1,25
cDNA Template	2
Wasser	9,25
Endvolumen	25

Dazu wurden zunächst der Gene Expression Master Mix, das Gene Expression Assay und Wasser für alle Reaktionen eines Gens vereinigt. Bei 20 benötigten Reaktionen pro Gen resultierten daraus die in Tabelle 2 angeführten Volumina.

Tabelle 2: Herstellung eines PCR-Reaktions-Mix für 20 Reaktionen

	Volumen (µl)/20 Reaktionen
Gene Expression Master Mix	250
Gene Expression Assay	25
Wasser	185
Endvolumen	460

Nach gutem Mischen am Vortex wurden je 23 µl dieses vorbereiteten PCR-Mix in PCR-Reaktionsgefäße (QPCR Tube Strips, 0,2 ml; peqlab) vorgelegt und je 2 µl des jeweiligen cDNA Templates hinzugefügt.

Die PCR-Reaktionsgefäße wurden am Vortex kurz geschüttelt, abzentrifugiert um eventuell gebildete Luftblasen zu eliminieren und anschließend in das PCR-Gerät überführt in welchem der Lauf gestartet wurde. Die Temperatur-Bedingungen der PCR-Zyklen sind in Tabelle 3 ersichtlich. Sie wurden von den Voreinstellungen der 7300 Sequence Detection Software übernommen. Lediglich die Anzahl der Zyklen wurde von 40 auf 45 erhöht.

Tabelle 3: Temperaturprogramm der PCR

	Step 1	Step 2	Step 3	
Step-Typ	HOLD	HOLD	CYCLE (45 Zyklen)	
Zeit	2 min	10 min	15 sec	1 min
Temperatur	50 °C	95 °C	95 °C	60 °C

Die amplifizierten Proben wurden nach dem PCR-Lauf sofort entsorgt um Verunreinigungen am DNA-Arbeitsplatz zu vermeiden.

3.3.4.1. Validierungsexperiment

Bei diesem Experiment wurden 4 verschiedene cDNA-Mengen, (100, 10, 1 und 0,1 ng) bei jedem zu untersuchenden Ziel- und Referenzgen eingesetzt.

Zunächst erfolgte die Herstellung des PCR-Reaktions-Mix für jedes Gen (siehe Tabelle 2) sowie die Verdünnung der cDNA mit RNase freiem Wasser.

Anschließend wurden je 23 µl dieses PCR-Reaktions-Mixes in die PCR-Reaktionsgefäße überführt und wie in Tabelle 4 ersichtlich, mit 2 µl der jeweiligen cDNA- Verdünnung versetzt. Jede cDNA-Menge wurde bei jedem Gen im dreifach-Ansatz untersucht.

Tabelle 4: Übersicht der eingesetzten cDNA-Mengen

Verdünnung	Volumen [µl]	Konzentration [ng/µl]	cDNA Menge [ng]
1	2	50	100
2	2	5	10
3	2	0,5	1
4	2	0,05	0,1

Die weiteren Arbeitsschritte wurden wie in 3.3.4. beschrieben vorgenommen. Für das Validierungsexperiment wurde eine absolute Quantifikation zur Analyse herangezogen.

3.3.4.2. Relative Quantifizierungen

Bei diesen Experimenten wurden die unterschiedlichen Entwicklungsstadien (L3-L4, adulte Würmer) und die Effekte exogener Folatlevels (10 FS, 1:1000 FS, 0 FS) auf die Expression der Zielgene (R03D7.1, *fol-1*, C06A8.1) untersucht. Jede dieser Untersuchungen wurde mit drei biologischen Replikaten und im doppel-Ansatz bestimmt. Weiters wurden bei jedem PCR-Experiment auch die Referenzgene *pmp-3* und *csq-1* als endogene Kontrolle, sowie ein Kalibrator (1 FS) zum relativen Vergleich eingesetzt.

Zunächst erfolgte die Verdünnung der cDNA Templates auf eine Endkonzentration von 5 ng/µl mit RNase freiem Wasser.

Für jedes Ziel- und Referenzgen wurde daraufhin der PCR-Reaktions-Mix hergestellt. Zu 23 µl dieses Mixes folgte die Zugabe von 2 µl der jeweiligen Template DNA. Die Menge der eingesetzten cDNA muss bei diesen Experimenten immer genau gleich sein um eine relative Quantifizierung der mRNA Levels durchführen zu können.

Bei einer Konzentration von 5 ng/µl der Templates und einem Einsatz von 2 µl betrug die untersuchte Menge an cDNA jeweils 10 ng pro Reaktion.

Nach Erstellung eines "Relative Quantification (RQ) Plate document", in welchem die Positionen der jeweiligen Proben, Referenzen und Kalibratoren auf

der Platte definiert wurden, konnte der PCR-Lauf wie in 3.3.4. beschrieben, gestartet werden.

Die Resultate der einzelnen PCR-Experimente, welche sich auf den jeweiligen RQ Plattendokumenten befinden, konnten am Ende der Untersuchungen zu einer RQ Studie (RQ Study document) zusammengefasst und die Ergebnisse somit verglichen werden.

3.3.5. Genspezifische Primer und Sonden

Als genspezifische Primer bzw. Sonden wurden TaqMan Gene Expression Assays gewählt. Diese bestehen aus einer Mischung unmarkierter PCR-Primer und einer TaqMan MGB Sonde. Die bereits fertigen “Made to Order Assays” wurden bei Applied Biosystems erworben und nach dem Auftauen ohne weitere Aufbereitung wie beschrieben (siehe 3.3.4.) eingesetzt.

Tabelle 5: Übersicht der Made to Order Assays der Ziel- und Referenzgene.

	Gene Symbol	Assay ID	Amplicon Length
Zielgene	R03D7.1	Ce02438802_g1	84
	fol-1	Ce02481435_g1	91
	C06A8.1	Ce02406138_g1	71
Referenzgene	csq-1	Ce02402596_m1	72
	pmp-3	Ce02485188_m1	81

3.3.6. Auswahl der Referenzgene

Die Auswahl der Referenzgene für die hier durchgeführten Untersuchungen orientierte sich an einer Publikation von Hoogewijs et al. deren Ziel die Etablierung einer Reihe von Referenzgenen zur Genexpressionsanalyse bei *C. elegans* war. Dazu wurden 12 Referenzgene auf ihre Expressionsstabilität mittels RT-qPCR untersucht. Als Referenzgene mit den stabilsten

Expressionsmustern konnten dabei cdc-42, pmp-3 und Y45F10D.4 ermittelt werden.

Bei den Genen Y45F10D.4 und cdc-42 wurde jedoch aufgrund ihrer Funktion bei *C.elegans* vermutet, dass durch eine experimentelle Behandlung mit Folsäure eine Regulation der Expression auftritt. Daher fiel die Auswahl der Referenzgene auf pmp-3, dessen Funktion im Transport von Acyl-CoA besteht, sowie auf csq-1, ein Calcium bindendes Protein welches bei Hoogewijs et al. ebenfalls einer guten Bewertung unterlag.

4) Ergebnisse und Diskussion

4.1. Lebenszyklus von *C. elegans* im Flüssigmedium

Bekannt ist, dass *C. elegans* im Flüssigmedium einer langsameren Entwicklung unterliegt [SPRANDO et al. 2009]. Genauere Informationen bezüglich des Zeitraums dieser Entwicklung stehen bis dato jedoch noch nicht zur Verfügung. Ziel der Arbeit war, eine grobe Abschätzung des Lebenszyklus von *C. elegans* im Flüssigmedium zu tätigen. Tabelle 6 zeigt sowohl Zeitraum als auch Ergebnisse der Beobachtungen.

Tabelle 6: Ergebnis der Lebenszyklus-Beobachtung. N2 in Flüssigmedium bei 20 °C

Tag	Zeitpunkt der Beobachtung	Entwicklungsstadium der Würmer
T0	12:00	START: synchronisierte L1
T1	09:00	L2
	12:00	L2
	15:00	L2
T2	09:00	L3
	12:00	L3-L4
	15:00	junge L4
T3	09:00	L4
	12:00	L4-junge Adulte
	15:00	L4-junge Adulte
T4	09:00	adulte Würmer; Eier im Hermaphroditen
	12:00	adulte Würmer; Eier in der Umgebung
	15:00	adulte Würmer; wenige L1

Durch die Untersuchung wurde ersichtlich, dass sich L3-L4 Larven in einem Zeitraum von etwa 48 Stunden ab dem Einsatz der synchronisierten L1 Larven in das Nährmedium entwickeln. Diese Erkenntnis diene im Weiteren zur Probengewinnung von L3-L4 Larven.

Durch die Beobachtung wurde weiters deutlich, dass speziell die Reifung der Würmer bis zum L3 Stadium einer langsameren Entwicklung als auf NGM Agar Platten unterliegt. Dies ist vermutlich auf die notwendige Synchronisierung der Würmer zurückzuführen, welche eventuell eine gewisse Erholungs- bzw. Gewöhnungsphase der L1 Larven im Nährmedium bedingt.

Bezüglich einer detaillierten Abschätzung des Lebenszyklus von *C. elegans* im Flüssigmedium bedarf es noch weiteren Untersuchungen.

4.2. Quantitative Bestimmung der extrahierten mRNA

Die Resultate der mRNA-Quantifizierung mittels Nanodrop sind in Tabelle 7 und 8 dargestellt.

- **Validierungsexperiment**

Tabelle 7: mRNA Konzentration einer Mischkultur-Probe

Sample	A260	Ratio 260/280	ng/ μ l
Mischkultur	19,680	2,37	787,00

- **Relative Quantifizierungen**

Tabelle 8: mRNA Konzentrationen der Entwicklungsstadien und exogenen Folatlevels

Sample	A260	Ratio 260/280	ng/ μ l
L3-L4 WH1	23,532	2,17	941,30
L3-L4 WH2	41,456	2,17	1658,24
L3-L4 WH3	61,343	2,13	2453,73
Adult WH1	11,295	2,18	451,78
Adult WH2	11,704	2,14	468,15
Adult WH3	3,782	2,19	151,28
0 FS WH1	6,492	2,25	259,68
0 FS WH2	8,664	2,17	285,92
0 FS WH3	7,877	2,22	315,08
1:1000 FS WH1	9,082	2,15	299,70
1:1000 FS WH2	9,276	2,05	306,10
1:1000 FS WH3	15,561	2,18	513,52
10 FS WH1	34,784	2,31	1391,34
10 FS WH2	22,404	2,38	896,15
10 FS WH3	10,700	2,12	428,01
Mischkultur (Kalibrator)	7,467	2,16	298,66
Mischkultur 2 (Kalibrator)	9,125	2,16	301,13

4.3. Quantitative Real-Time PCR

4.3.1. Validierungsexperiment

Im Validierungsexperiment wurde eine absolute Quantifizierung zur Bestimmung der Effizienzen von Ziel- und Referenzgenen und deren Relation zueinander durchgeführt. Die Standardkurven der untersuchten Verdünnungsstufen sind in Abbildung 8-12 dargestellt. Dazu wurde die eingesetzte Menge an cDNA (als log cDNA) gegen den C_T-Wert aufgetragen.

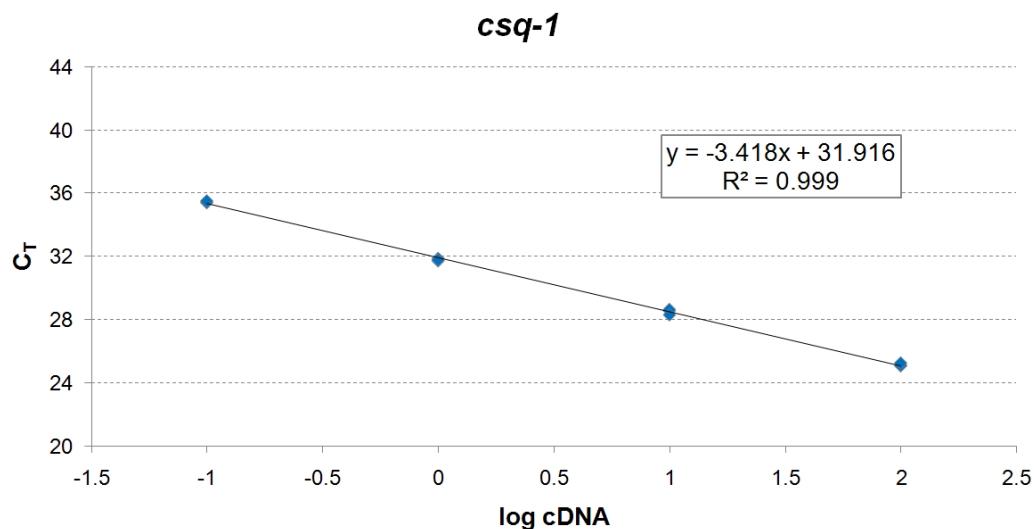


Abbildung 8: Standardkurve des Referenzgens csq-1.

Absolute Quantifizierung der csq-1 mRNA Levels mittels RT-qPCR unter Verwendung der mRNA von N2, inkubiert in Flüssigmedium mit 1 FS bei 20 °C

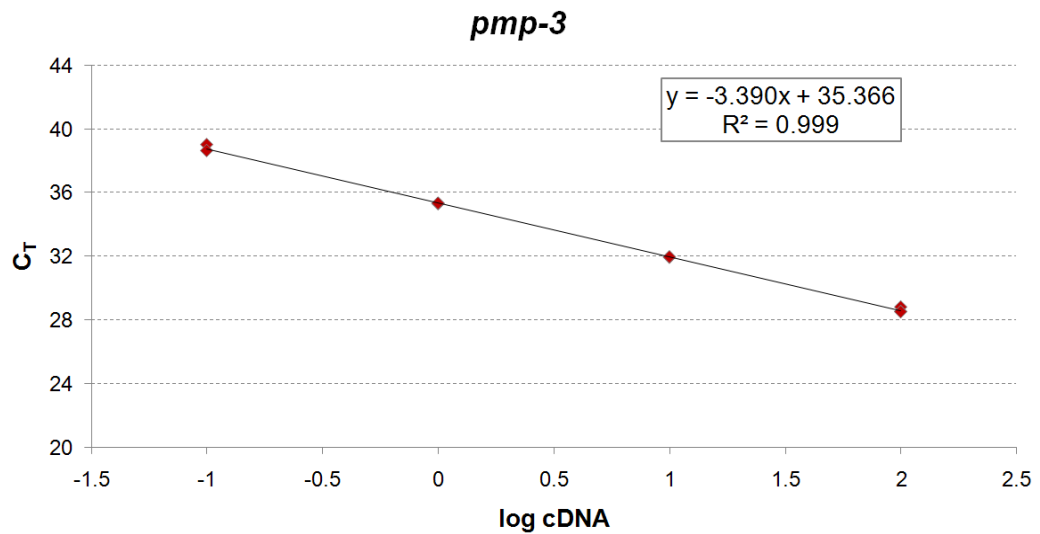


Abbildung 9: Standardkurve des Referenzgens *pmp-3*.

Absolute Quantifizierung der *pmp-3* mRNA Levels mittels RT-qPCR unter Verwendung der mRNA von N2, inkubiert in Flüssigmedium mit 1 FS bei 20 °C

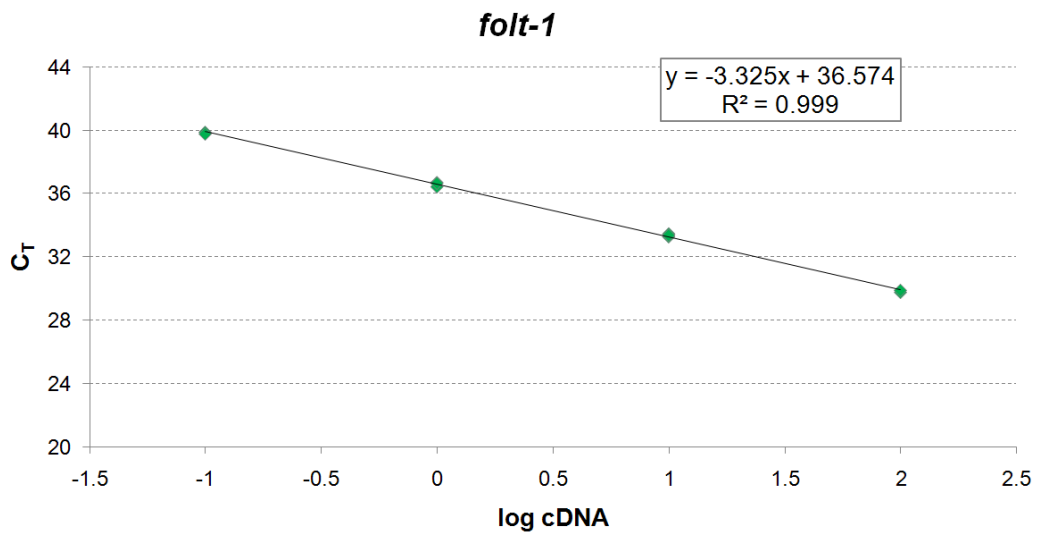


Abbildung 10: Standardkurve des Zielgens *fol-1*.

Absolute Quantifizierung der *fol-1* mRNA Levels mittels RT-qPCR unter Verwendung der mRNA von N2, inkubiert in Flüssigmedium mit 1 FS bei 20 °C

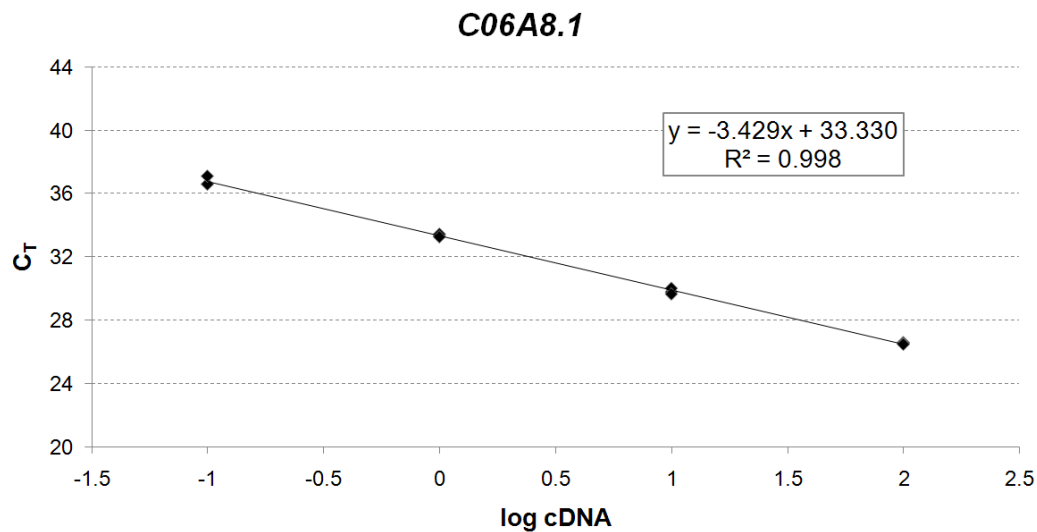


Abbildung 11: Standardkurve des Zielgens C06A8.1

Absolute Quantifizierung der C06A8.1 mRNA Levels mittels RT-qPCR unter Verwendung der mRNA von N2, inkubiert in Flüssigmedium mit 1 FS bei 20 °C

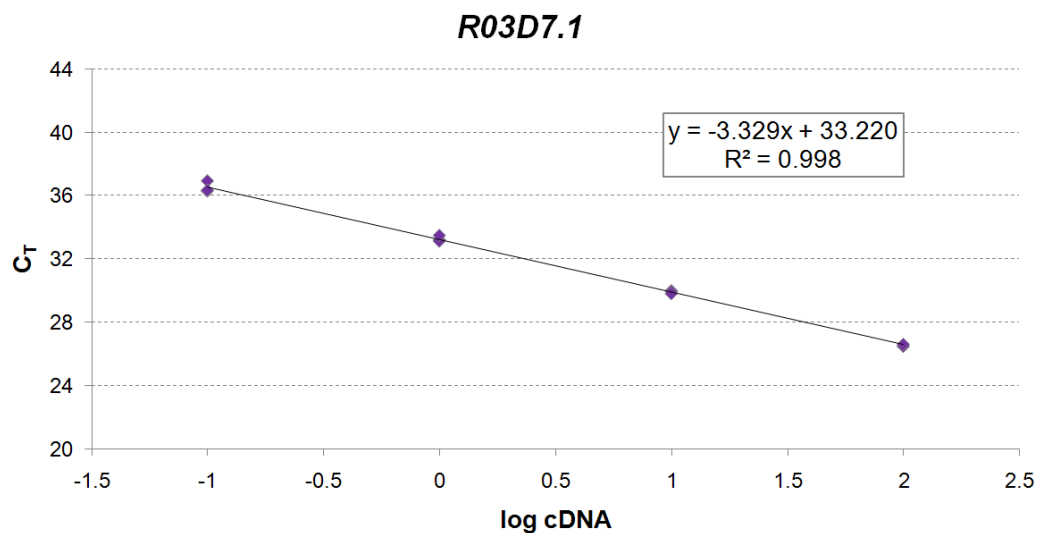


Abbildung 12: Standardkurve des Zielgens R03D7.1

Absolute Quantifizierung der R03D7.1 mRNA Levels mittels RT-qPCR unter Verwendung der mRNA von N2, inkubiert in Flüssigmedium mit 1 FS bei 20 °C

Aus den Steigungen dieser Standardkurven wurde anschließend die Effizienz der Reaktionen von Ziel- und Referenzgenen über Gleichung 1 berechnet.

Tabelle 9 zeigt die Steigungen sowie die errechneten Effizienzen, angeführt in Prozent, dieser Gene.

Tabelle 9: PCR Effizienzen der Ziel- und Referenzgene

Gen	Steigung	PCR Effizienz [%]
csq-1	-3,418	96,14
pmp-3	-3,390	97,24
R03D7.1	-3,329	99,71
fol-1	-3,325	99,87
C06A8.1	-3,429	95,72

In Abbildung 13-19 sind die ΔC_T -Werte ($\Delta C_T = C_{T\text{Zielgen}} - C_{T\text{Referenzgen}}$) in Abhängigkeit zur logarithmischen Template-Menge (log cDNA) und die daraus resultierende Regressionsgerade dargestellt. Die Effizienzen des jeweiligen Ziel- und Referenzgens können dadurch relativ zueinander betrachtet werden. Der Betrag der Steigung, welcher unter 0,1 liegen muss, wird als Kriterium zur Verwendung der $\Delta\Delta C_T$ -Methode herangezogen (vergleiche 2.3.3.2.).

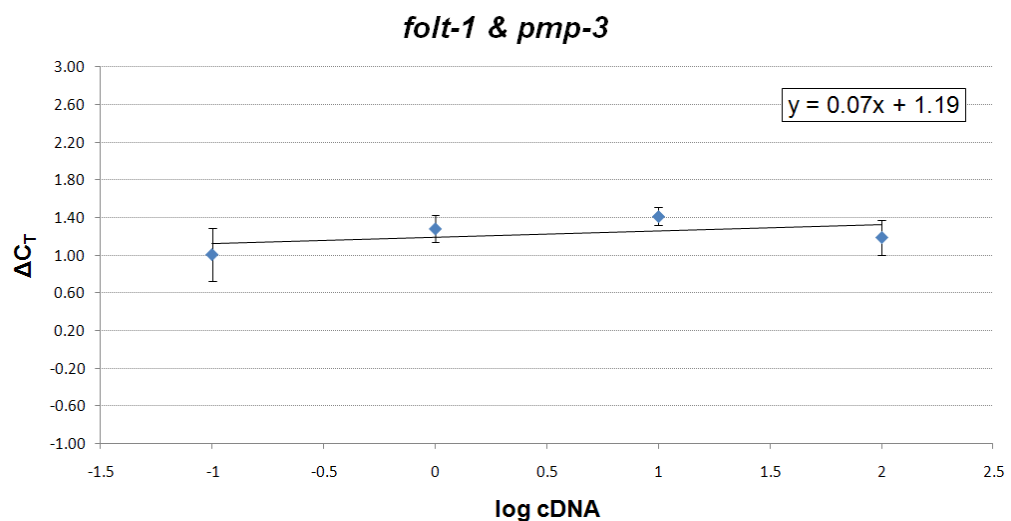


Abbildung 13: Darstellung der relativen Effizienz von fol-1 und pmp-3.

Absolute Quantifizierung der fol-1 und pmp-3 mRNA Levels mittels RT-qPCR unter Verwendung der mRNA von N2, inkubiert in Flüssigmedium mit 1 FS bei 20 °C

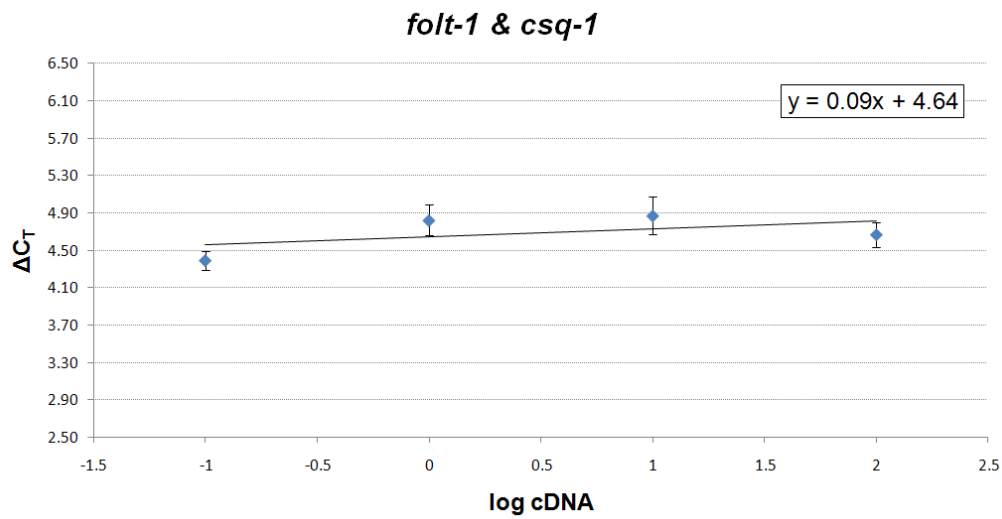


Abbildung 14: Darstellung der relativen Effizienz von *fol-1* und *csq-1*.

Absolute Quantifizierung der *fol-1* und *csq-1* mRNA Levels mittels RT-qPCR unter Verwendung der mRNA von N2, inkubiert in Flüssigmedium mit 1 FS bei 20 °C

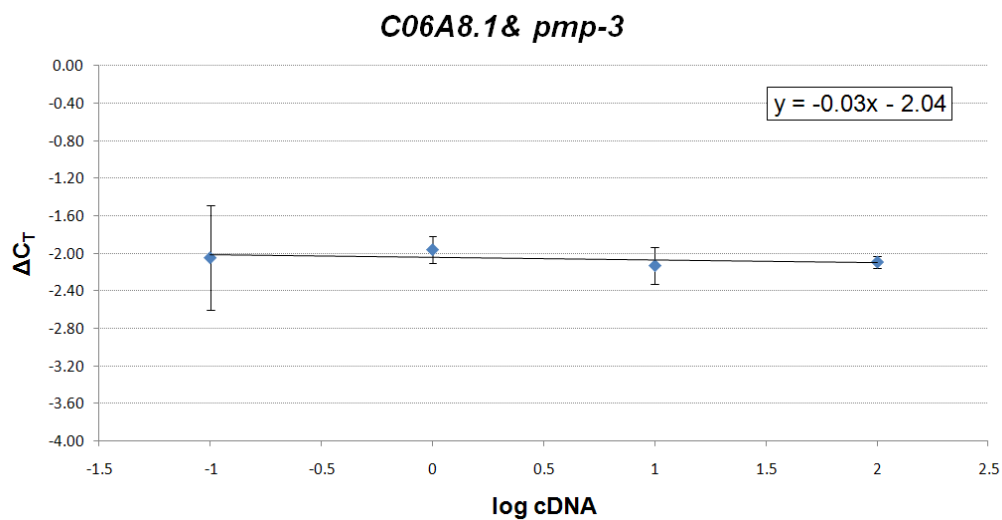


Abbildung 15: Darstellung der relativen Effizienz von *C06A8.1* und *pmp-3*.

Absolute Quantifizierung der *C06A8.1* und *pmp-3* mRNA Levels mittels RT-qPCR unter Verwendung der mRNA von N2, inkubiert in Flüssigmedium mit 1 FS bei 20 °C

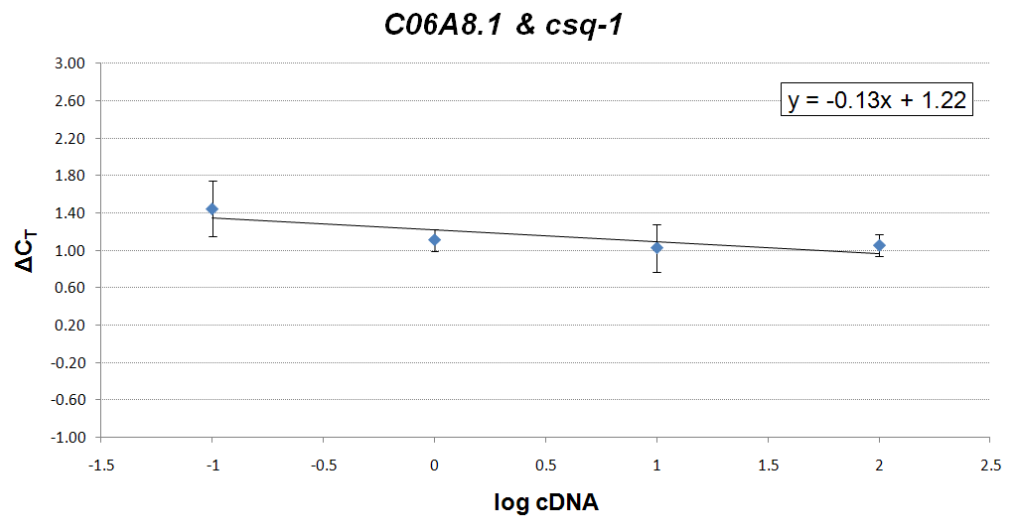


Abbildung 16: Darstellung der relativen Effizienz von C06A8.1 und csq-1.
Absolute Quantifizierung der C06A8.1 und csq-1 mRNA Levels mittels RT-qPCR unter Verwendung der mRNA von N2, inkubiert in Flüssigmedium mit 1 FS bei 20 °C

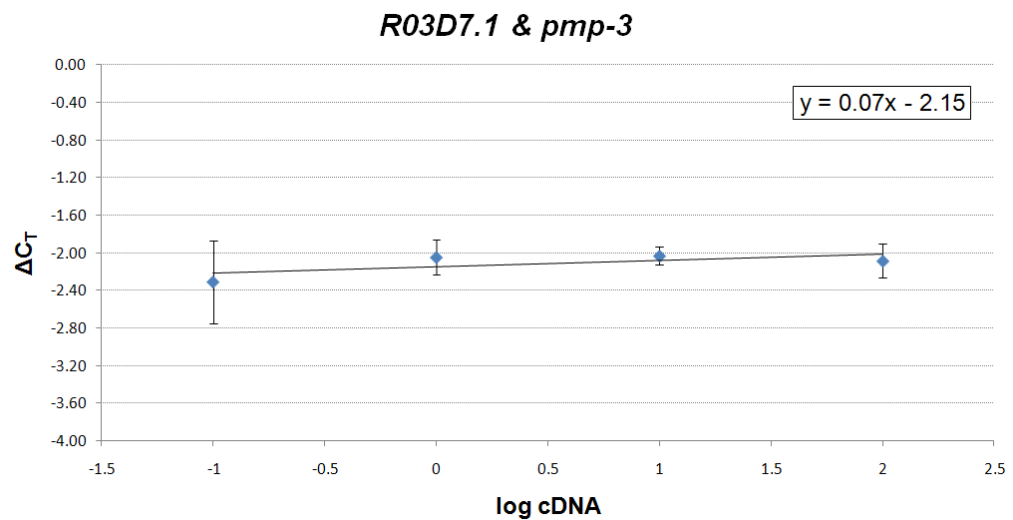


Abbildung 17: Darstellung der relativen Effizienz von R03D7.1 und pmp-3.
Absolute Quantifizierung der R03D7.1 und pmp-3 mRNA Levels mittels RT-qPCR unter Verwendung der mRNA von N2, inkubiert in Flüssigmedium mit 1 FS bei 20 °C

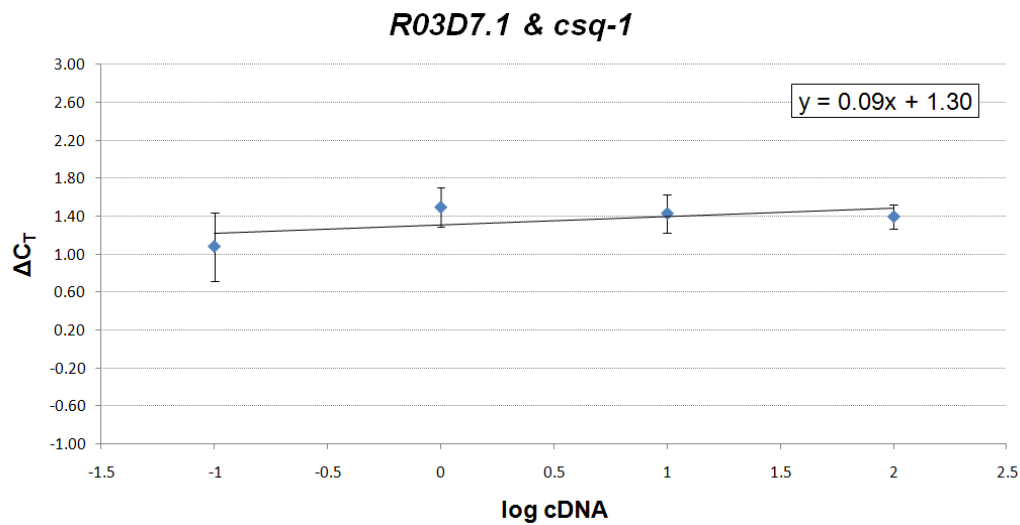


Abbildung 18: Darstellung der relativen Effizienz von R03D7.1 und csq-1.

Absolute Quantifizierung der R03D7.1 und csq-1 mRNA Levels mittels RT-qPCR unter Verwendung der mRNA von N2, inkubiert in Flüssigmedium mit 1 FS bei 20 °C

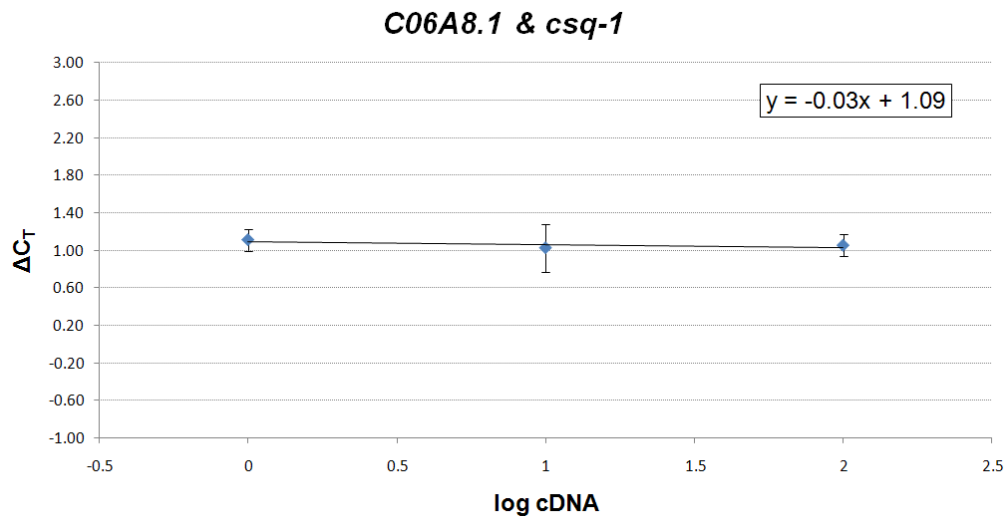


Abbildung 19: Darstellung der relativen Effizienz von C06A8.1 und csq-1 nach

Elimination von -1 log cDNA. Absolute Quantifizierung der C06A8.1 und csq-1 mRNA Levels mittels RT-qPCR unter Verwendung der mRNA von N2, inkubiert in Flüssigmedium mit 1 FS bei 20 °C

Das $\Delta\Delta C_T$ -Berechnungsschema geht von einer Verdopplung der cDNA-Menge in jedem Zyklus aus. Dies entspricht einer Real-Time PCR Effizienz von 1 oder 100 %, welche für jede Probe angenommen wird, jedoch in der Praxis nicht vorkommt [PFAFFL 2004].

Die wahren Real-Time PCR Effizienzen in diesem Experiment liegen, wie in Tabelle 9 ersichtlich, zwischen 95,72 % (für C06A8.1) und 99,87 % (für *fol-1*). Trotz dieser Unterschiede zwischen theoretischer und wahrer Effizienz kann die $\Delta\Delta C_T$ -Methode verwendet werden, wenn die Effizienzen von Ziel- und Referenzgenen annähernd ident sind. Dies konnte mit der Darstellung der relativen Effizienzen von Ziel- und Referenzgen in Abbildung 13-19, bewiesen werden.

Abbildung 13 und 14 zeigen die relative Effizienz von *fol-1* und der beiden Referenzgene *pmp-3* und *csq-1*. Die Steigung der Regressionsgeraden weist in beiden Fällen einen Wert von unter 0,1 auf (0,07 bzw. 0,09), wodurch eine annähernde Gleichheit der Effizienzen von *fol-1* und der beiden Referenzgenen erwiesen ist.

Abbildung 15 und 16 zeigen die relative Effizienz von C06A8.1 und den beiden Referenzgenen. In Abbildung 15 ist der Betrag der Steigung 0,03, eine annähernde Gleichheit der Effizienzen von *pmp-3* und C06A8.1 beweisend.

Die Steigung der Regressionsgeraden in Abbildung 16 liegt mit dem Betrag von 0,13 jedoch über 0,1, wodurch das Kriterium zur Anwendung der $\Delta\Delta C_T$ -Methode bei C06A8.1 und *csq-1* nicht erfüllt ist. Wie in Abbildung 19 ersichtlich, konnte jedoch durch Elimination des Messpunkts bei -1 log cDNA (0,1 ng cDNA) eine Steigung mit Betrag unter 0,1 erzielt werden. Da die, zur relativen Quantifizierung eingesetzte Menge an cDNA 10 ng (1 log cDNA) beträgt, kann der Messpunkt bei -1 log cDNA vernachlässigt werden. Somit erfüllen auch C06A8.1 und *csq-1* das Kriterium zur Verwendung der $\Delta\Delta C_T$ -Methode.

Abbildung 17 und 18 stellen die relative Effizienz von R03D7.1 und den beiden Referenzgenen dar. Die Steigungen der Regressionsgeraden liegen mit einem Betrag von 0,07 bzw. 0,09 unter 0,1. *pmp-3* und *csq-1* können somit ebenso für

die relative Quantifizierung von R03D7.1 mittels $\Delta\Delta C_T$ -Methode herangezogen werden.

Durch dieses Validierungsexperiment konnte somit gezeigt werden, dass die Effizienzen der zu untersuchenden Zielgene *fol-1*, *C06A8.1* und *R03D7.1* mit jenen der Referenzgene *pmp-3* und *csq-1* annähernd übereinstimmen. Dies ermöglicht die Anwendung der $\Delta\Delta C_T$ -Methode zur relativen Quantifizierung der Genexpression.

4.3.2. Relative Quantifizierung der Genexpression

4.3.2.1. Entwicklungsbedingte Regulation der Genexpression

Der Einfluss des Entwicklungsstadiums von *C. elegans* auf die Expression der Gene *fol-1*, *C06A8.1* und *R03D7.1* sollte untersucht werden.

Abbildung 20-22 zeigen die relativen Expressionslevel der untersuchten Gene als Vielfaches des Kalibrators, normalisiert mit dem Referenzgen *pmp-3* bzw. *csq-1*.

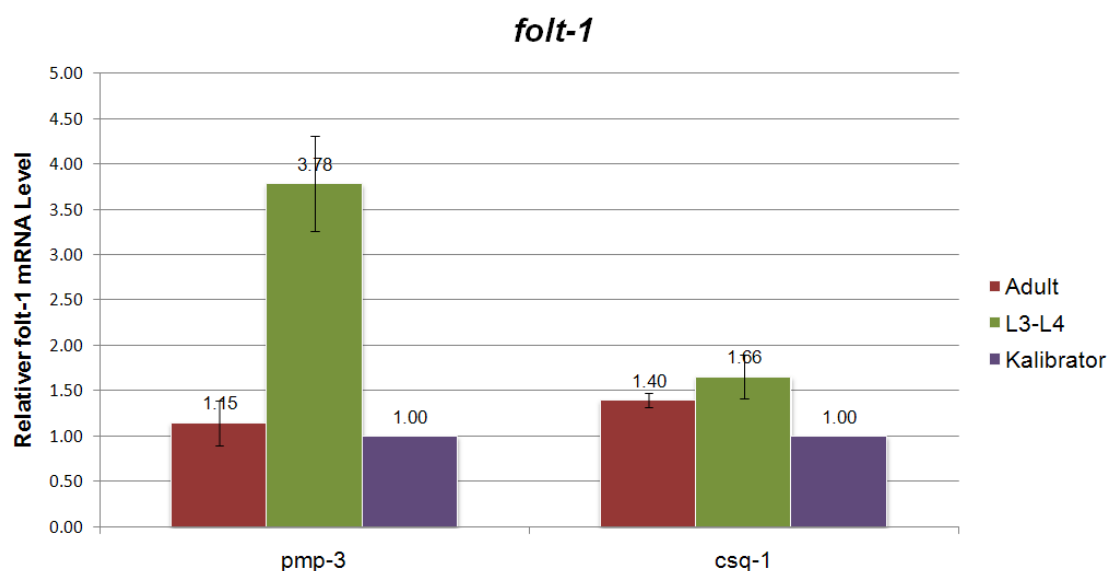


Abbildung 20: Entwicklungsbedingte Regulation der *fol-1* Expression bei N2.

Relative Quantifizierung der *fol-1* mRNA Level mittels RT-qPCR von Adulten, L3-L4 und einer Mischkultur (Kalibrator) gehalten in Flüssigmedium mit 1 FS bei 20 °C

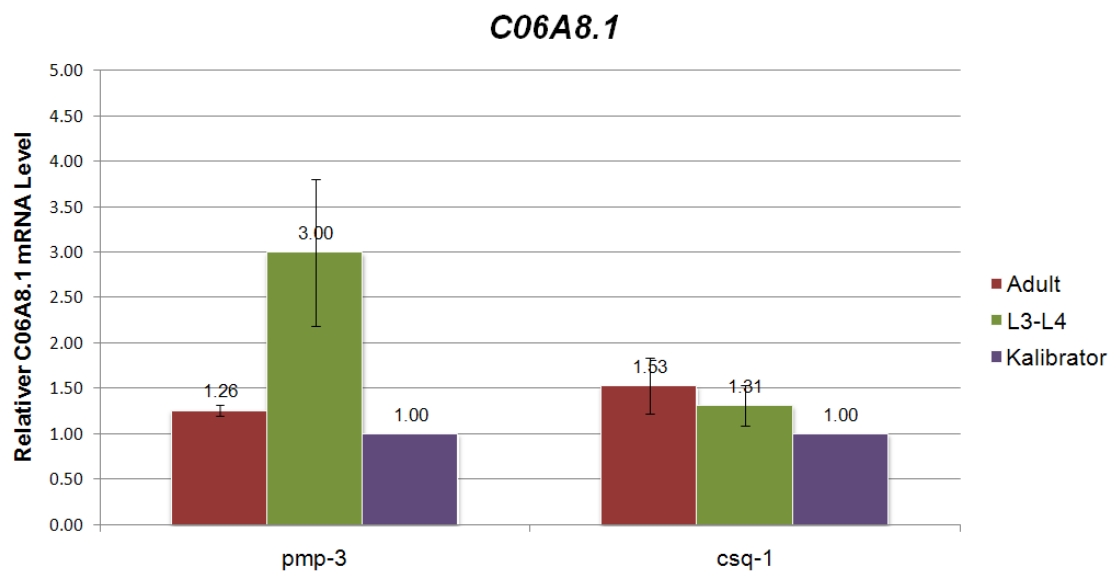


Abbildung 21: Entwicklungsbedingte Regulation der C06A8.1 Expression bei N2. Relative Quantifizierung der C06A8.1 mRNA Level mittels RT-qPCR von Adulten, L3-L4 und einer Mischkultur (Kalibrator) gehalten in Flüssigmedium mit 1 FS bei 20 °C

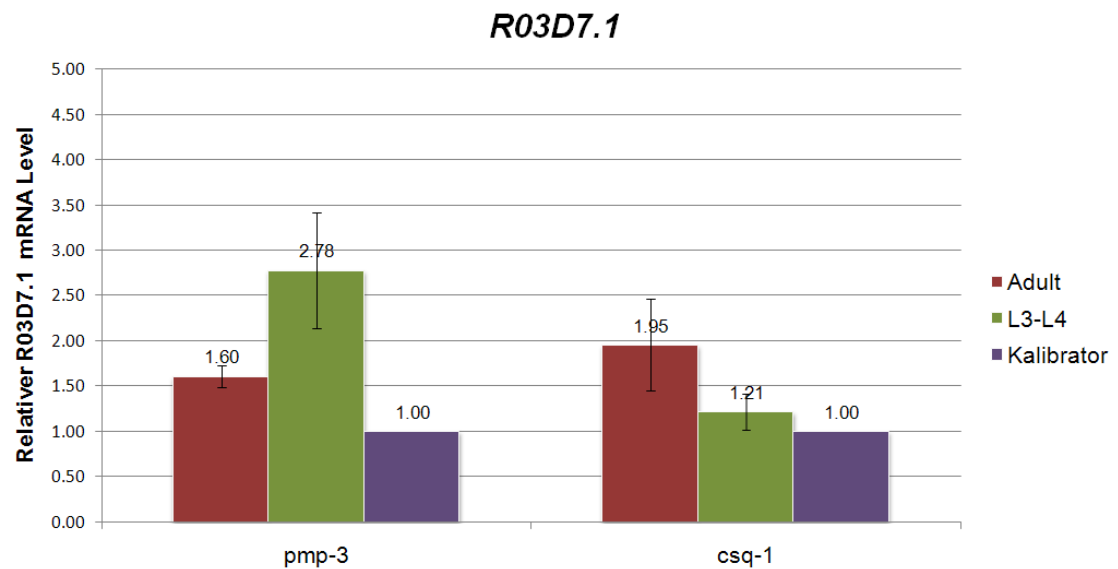


Abbildung 22: Entwicklungsbedingte Regulation der R03D7.1 Expression bei N2: Relative Quantifizierung der R03D7.1 mRNA Level mittels RT-qPCR von Adulten, L3-L4 und einer Mischkultur (Kalibrator) gehalten in Flüssigmedium mit 1 FS bei 20 °C

In Abbildung 20 ist der mittlere *fol-1* mRNA Level adulter Würmer sowie jener der L3-L4 Larven dargestellt.

Bei einer Normalisierung mittels *pmp-3* ergibt sich für L3-L4 Larven ein signifikant ($P < 0,01$) höherer *fol-1* mRNA Level im Vergleich zu den adulten Würmern. Die *fol-1* Expression der L3-L4 Larven ist im Mittel 3,78-fach gegenüber jener des Kalibrators (Mischkultur) gesteigert.

Die Normalisierung mittels *csq-1* ergibt hingegen nur eine 1,66-fache Erhöhung der *fol-1* Expression von L3-L4 gegenüber dem Kalibrator. Ein tendenzieller Anstieg der mRNA Level von L3-L4 gegenüber den adulten Würmern ist zu erkennen, dieser ist jedoch nicht signifikant.

Es wird ersichtlich, dass die Normalisierung mittels der beiden Referenzgene *pmp-3* und *csq-1* zu unterschiedlichen Expressionslevels von *fol-1* bei L3-L4 und adulten Würmern führt. Speziell L3-L4 weisen starke Unterschiede im Expressionslevel auf, mit einer signifikanten ($P < 0,01$) Erhöhung des Levels bei *pmp-3*. Dies resultiert möglicherweise aus einer Regulation dieser Referenzgene in den Entwicklungsstadien von *C. elegans*.

Dennoch lässt sich, sowohl bei *pmp-3* als auch bei *csq-1*, eine tendenzielle Abnahme der *fol-1* Expression mit zunehmender Reife der Würmer erkennen. Es wird vermutet, dass die erhöhte *fol-1* Expression der frühen Entwicklungsstadien zu einer gesteigerten Folataufnahme und somit zu einer bedarfsgerechten Folatversorgung der jungen Würmer führt.

Die Ergebnisse sind mit Erkenntnissen von Balamurugan et al. vergleichbar, welche bei Untersuchungen an L1, L2, jungen Adulten und adulten Würmern eine graduelle Abnahme der *fol-1* Expression mit zunehmender Reife der Würmer feststellen konnten [BALAMURUGAN et al. 2007].

Im Weiteren zeigen diese Ergebnisse auch Ähnlichkeit zu Untersuchungen des RFC von Säugetieren. Balamurugan und Said konnten eine entwicklungsbedingte Regulation des RFC im Darm von Ratten feststellen. So zeigten zwei junge Altersgruppen im Vergleich zur Altersgruppe der erwachsenen Ratten signifikant höhere RFC mRNA Levels. Auch zwischen den beiden jüngeren Altersgruppen konnte ein signifikanter Unterschied der RFC Expression festgestellt werden [BALAMURUGAN und SAID 2003].

In Abbildung 21 ist der mittlere C06A8.1 mRNA Level adulter Würmer sowie jener der L3-L4 Larven dargestellt.

Durch Normalisierung mit pmp-3 ergibt sich für L3-L4 eine mittlerer C06A8.1 Expression welche das 3,00-fache des Kalibrators beträgt. Auch verglichen mit den adulten Würmern besteht bei L3-L4 eine signifikant ($P < 0,05$) erhöhte Expression.

Im Gegensatz dazu zeigen L3-L4, normalisiert mit csq-1, eine tendenzielle Abnahme der C06A8.1 mRNA Level gegenüber adulten Würmern. Der Unterschied ist jedoch nicht signifikant.

Wie auch bei *fol-1* weisen L3-L4 einen signifikanten ($P < 0,01$) Unterschied im C06A8.1 Expressionslevel durch die Normalisierung mit pmp-3 und csq-1 auf. Bei den adulten Würmern ist diese Variation der C06A8.1 Expression nicht signifikant. Es wird ersichtlich, dass die Referenzgen pmp-3 und csq-1 einer entwicklungsbedingten Regulation unterliegen. Da bei den Expressionslevels von adulten Würmern und L3-L4 keine allgemeine Tendenz festzustellen ist, lässt sich über die entwicklungsbedingte Regulation von C06A8.1 keine Aussage treffen.

Abbildung 22 zeigt den mittleren R03D7.1 mRNA Level von L3-L4 Larven und adulten Würmern.

Normalisiert mit pmp-3 zeigen L3-L4 signifikant ($P < 0,05$) höhere R03D7.1 mRNA Level als adulte Würmer.

Normalisiert mit csq-1 zeigt sich hingegen eine tendenzielle Abnahme der R03D7.1 bei L3-L4 gegenüber den Adulten. Wie zuvor bei *fol-1* und C06A8.1 wird wieder die signifikante ($P < 0,05$) Variation der Expressionslevels bei L3-L4 durch die Normalisierung mit pmp-3 bzw. csq-1 ersichtlich. Daraus lässt sich schließen, dass ein- oder beide Referenzgene speziell in diesem Stadium des Lebenszyklus einer Regulation unterliegen.

Aufgrund der nicht erkennbaren Tendenzen der C06A8.1 Expressionslevels von adulten Würmern und L3-L4, lässt sich auch für dieses Gen keine Aussage bezüglich der entwicklungsbedingten Regulation treffen.

4.3.2.2. Regulation der Genexpression durch exogene Folatlevels

Der Einfluss exogener Folatlevel auf die Expression der Gene *fol-1*, *C06A8.1* und *R03D7.1* bei *C.elegans* war Gegenstand der Untersuchung.

Abbildung 23-25 zeigen die relativen Expressionslevel der untersuchten Gene als Vielfaches des Kalibrators, normalisiert mit dem Referenzgen *pmp-3* bzw. *csq-1*.

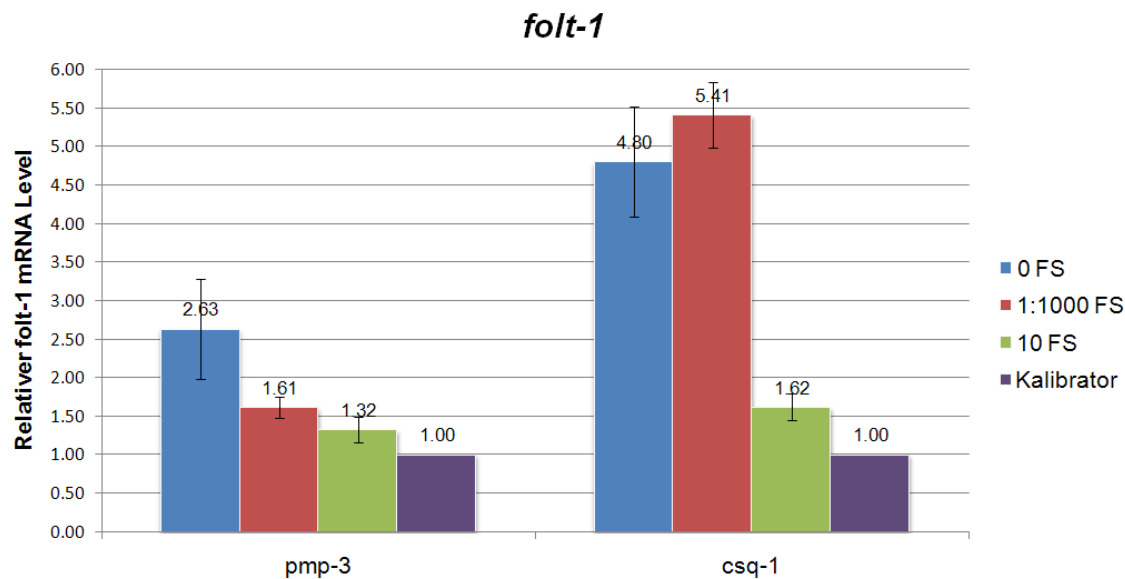


Abbildung 23: Regulation der *fol-1* Expression durch exogene Folatlevels bei N2.

Die relative Quantifizierung der *fol-1* mRNA Level wurde mittels RT-qPCR durchgeführt. Dabei wurde mRNA von N2, gehalten im Flüssigmedium mit 0 FS, 1:1000 FS und 10 FS bei 20 °C, eingesetzt. Der Kalibrator ist eine N2 Mischkultur gehalten im Flüssigmedium mit 1 FS bei 20 °C.

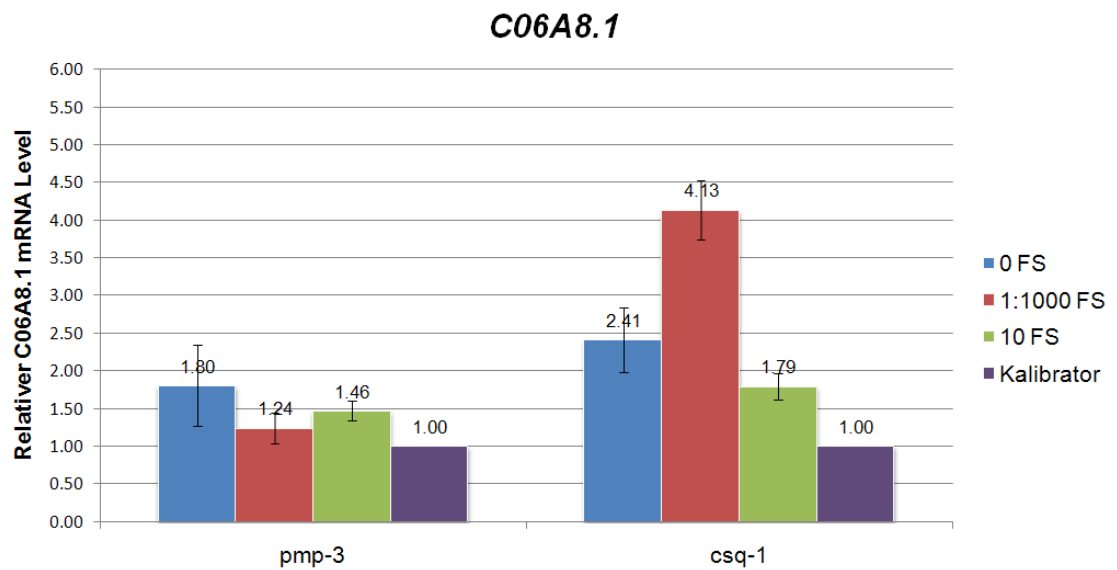


Abbildung 24: Regulation der C06A8.1 Expression durch exogene Folatlevels bei N2.

Die relative Quantifizierung der C06A8.1 mRNA Level wurde mittels RT-qPCR durchgeführt. Dabei wurde mRNA von N2, gehalten im Flüssigmedium mit 0 FS, 1:1000 FS und 10 FS bei 20 °C, eingesetzt. Der Kalibrator ist eine N2 Mischkultur gehalten im Flüssigmedium mit 1 FS bei 20 °C.

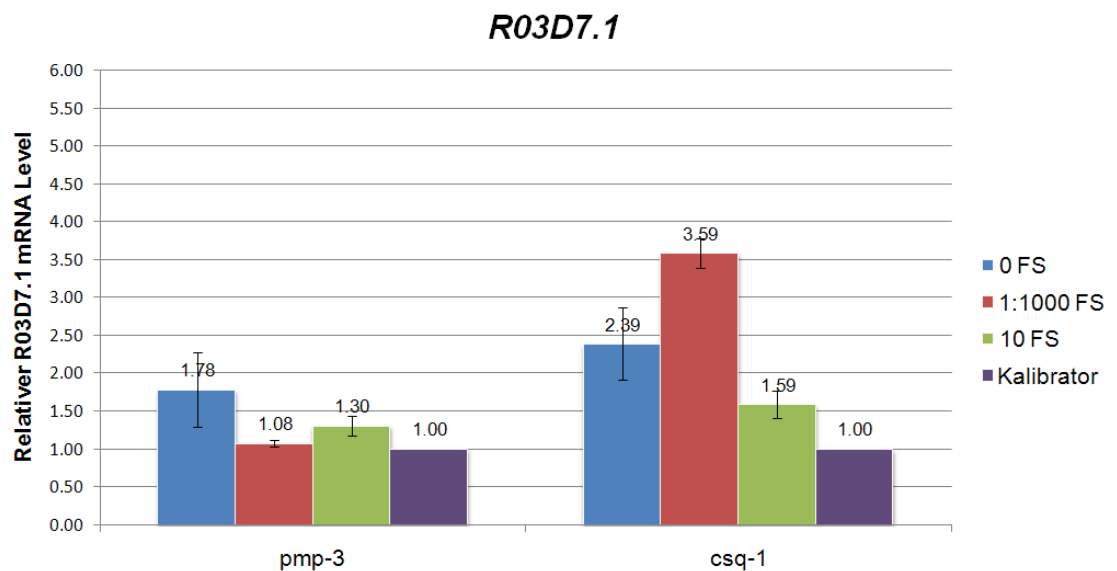


Abbildung 25: Regulation der R03D7.1 Expression durch exogene Folatlevels bei N2.

Die relative Quantifizierung der R03D7.1 mRNA Level wurde mittels RT-qPCR durchgeführt. Dabei wurde mRNA von N2, gehalten im Flüssigmedium mit 0 FS, 1:1000 FS und 10 FS bei 20 °C, eingesetzt. Der Kalibrator ist eine N2 Mischkultur gehalten im Flüssigmedium mit 1 FS bei 20 °C.

Abbildung 23 zeigt den mittleren *fol-1* mRNA Level der exogenen Folatlevel 0 FS, 1:1000 FS und 10 FS als Vielfaches des Kalibrators.

Normalisiert mit *pmp-3* ergibt sich für 0 FS eine 2,63-fache Erhöhung der *fol-1* mRNA Level im Vergleich zum Kalibrator, normalisiert mit *csq-1* eine 4,80-fache. Dies stellt einen signifikanten ($P < 0,05$) Unterschied in der Normalisierung dar. Auch bei 1:1000 FS ist der Unterschied der Normalisierung mit *pmp-3* bzw. *csq-1* signifikant ($P < 0,01$). Lediglich bei 10 FS weisen die Normalisierungsergebnisse keine signifikante Abweichung auf. Dies führt zu der Annahme, dass die Referenzgene im Folsäuremangel eine Regulation der Expression erfahren. Trotz dieser Regulation der Referenzgene lässt sich eine tendenzielle Steigerung der *fol-1* Expression bei 0 FS und 1:1000 FS gegenüber 10 FS feststellen. Bei 0 FS ist diese Erhöhung sowohl durch Normalisierung mit *pmp-3* als auch mit *csq-1* signifikant ($P < 0,05$ bzw. $P < 0,01$).

Dies lässt sich mit Ergebnissen von Balamurugan et. al. vergleichen, welche eine signifikante Abnahme der *fol-1* mRNA Levels bei Würmern im Folat-übersupplementierten Nährmedium gegenüber jenen im untersupplementierten Medium feststellten [BALAMURUGAN et al. 2007].

Weiters weisen diese Ergebnisse Ähnlichkeiten zu Beobachtungen des RFC Expressionslevel bei Folsäuremangel bzw. -Übersupplementation auf. So konnten Untersuchungen an Ratten [SAID et al. 2000] sowie an Caco-2 Epithelzellen [SUBRAMANIAN et al. 2003] einen Anstieg der RFC mRNA Levels unter Folsäuremangel-Bedingungen aufzeigen. Bei einer Langzeit-Übersupplementation mit Folat bei intestinalen Caco-2 Zellen und renalen HK-2-Epithelzellen konnten ein verminderter mRNA Level des hRFC und des PCFT festgestellt werden [ASHOKKUMAR et al. 2007].

In Abbildung 24 ist der mittlere *C06A8.1* mRNA Level der exogenen Folatlevel 0 FS, 1:1000 FS und 10 FS als Vielfaches des Kalibrators dargestellt.

Normalisiert mit *pmp-3* ergibt sich für 1:1000 FS eine 1,24-fache Erhöhung der *C06A8.1* mRNA Level im Vergleich zum Kalibrator, normalisiert mit *csq-1* eine 4,13-fache. Dies stellt einen signifikanten ($P < 0,01$) Unterschied in der

Normalisierung dar und deutet auf eine starke Regulation der Referenzgene bei 1:1000 FS hin.

0 FS und 10 FS weisen zwar ebenfalls durch die Normalisierung bedingte Unterschiede in der Genexpression auf, diese sind jedoch nicht signifikant. Weiters lässt sich für 10 FS sowohl bei pmp-3 als auch bei csq-1 eine tendenzielle Abnahme der C06A8.1 mRNA Level gegenüber 0 FS erkennen. Auch gegenüber 1:1000 FS weist 10 FS, normalisiert mit csq-1, eine signifikante ($P < 0,01$) Abnahme des C06A8.1 mRNA Level auf. Dies gibt Hinweis darauf, dass ein exogener Mangel an Folsäure zu einer erhöhten C06A8.1 Expression führt.

Abbildung 25 zeigt den mittleren R03D7.1 mRNA Level der exogenen Folatlevel 0 FS, 1:1000 FS und 10 FS als Vielfaches des Kalibrators.

Normalisiert mit pmp-3 ergibt sich für 1:1000 FS eine 1,08-fache Erhöhung der R03D7.1 mRNA Level im Vergleich zum Kalibrator, normalisiert mit csq-1 eine 3,59-fache. Dies stellt einen signifikanten ($P < 0,01$) Unterschied in der Normalisierung dar und deutet auf eine starke Regulation der Referenzgene bei 1:1000 FS hin. So kommt es durch Normalisierung mit pmp-3 zu einer signifikanten Erhöhung der R03D7.1 mRNA Level von 10 FS im Vergleich zu 1:1000 FS. Normalisiert mit csq-1 hingegen, kommt es zu einer signifikanten Abnahme der R03D7.1 mRNA Level im Vergleich zu 1:1000 FS. Diese konträren Ergebnisse erschweren eine Abschätzung des Expressionsverhaltens von R03D7.1 im Folsäuremangel bzw. -überfluss. Für 10 FS lässt sich jedoch sowohl bei pmp-3 als auch bei csq-1 eine tendenzielle Abnahme der C06A8.1 mRNA Level gegenüber 0 FS erkennen. Dies gibt Hinweis darauf, dass durch exogenen Folsäuremangel eine erhöhte Expression von R03D7.1 besteht.

5) Schlussbetrachtung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Regulation der Expression dreier, für den Folsäuremetabolismus essentieller, Gene durch unterschiedliche exogene Folatlevels (0 FS, 1:1000 FS und 10 FS) zu prüfen. Durch vorausgehende Untersuchungen am Emerging Focus Nutrigenomics, Department für Ernährungswissenschaften, konnte bereits festgestellt werden, dass Würmer welche ohne die Zugabe von Folsäure kultiviert wurden kaum Nachkommen produzieren. In einer mit 0 FS kultivierten Probe sind somit hauptsächlich adulte Würmer und kaum Larvenstadien vorhanden. Aus diesem Grund sollte weiters untersucht werden ob Unterschiede in der Expression von C06A8.1, R03D7.1 und *fol-1* zwischen Larvenstadien (L3-L4) und adulten Würmern vorliegen. Die Analyse der Expressionslevels erfolgte mittels relativer Quantifizierung durch Real-Time PCR unter Einsatz zweier zuvor validierter Referenzgene. Diese lieferten jedoch teilweise sehr unterschiedliche Ergebnisse, woraus gefolgert wurde, dass eines oder beide Referenzgene eine Regulation der Expression unter den jeweiligen experimentellen Bedingungen erfahren.

Dennoch konnte eine tendenzielle Abnahme der *fol-1* Expression mit zunehmender Reife der Würmer festgestellt werden. Diese Ergebnisse können mit Untersuchungen von Balamurugan et al. verglichen werden, welche bereits zeigten, dass die Expression von *fol-1* bei *C. elegans* einer entwicklungsbedingten Regulation unterliegt [BALAMURUGAN et al. 2007]. Die erhöhte *fol-1* Expression früher Entwicklungsstadien führt vermutlich zu einer gesteigerten Folataufnahme und somit zu einer bedarfsgerechten Folatversorgung der jungen Würmer. Auch Untersuchungen des RFC von Säugetieren konnten ähnliche Ergebnisse aufzeigen [BALAMURUGAN und SAID 2003].

Weiters konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass ein exogener Folsäuremangel gegenüber erhöhten Konzentrationen zu einem tendenziellen

Anstieg der Expression von *folr-1* führt. Dies lässt sich sowohl mit Untersuchungsergebnissen an *C. elegans* [BALAMURUGAN et al. 2007] als auch mit Beobachtungen des RFC Expressionslevels von Säugetieren [SAID et al. 2000] und humanen Zellen [SUBRAMANIAN et al. 2003, ASHOKKUMAR et al. 2007] bei Folsäuremangel bzw. -übersupplementation vergleichen.

Auch für C06A8.1 und R03D7.1 deuten die Ergebnisse darauf hin, dass ein exogener Mangel an Folsäure zu einer erhöhten Expression führt.

6) Kurzfassung

Folat, ein Vitamin des B-Komplexes, ist essentiell für die normale Zellfunktion und Zellentwicklung. Durch ihre Funktion Kohlenstoff-Einheiten zu übertragen, nehmen die Coenzyme Tetrahydrofolsäure und seine Derivate eine entscheidende Stellung im Nukleotidstoffwechsel und somit in der DNA-Synthese sowie im Metabolismus verschiedener Aminosäuren ein. Da der genaue Mechanismus des Folsäuremetabolismus beim Menschen nicht vollständig geklärt ist und die Auswirkungen eines Mangels noch Fragen aufwerfen, bedarf es in diesem Feld noch einiger Forschungsarbeit. In der dargelegte Arbeit wurde aus diesem Grund bei dem Modellorganismus *C. elegans*, welcher einen hohen Grad an Sequenzhomologien zum menschlichen Genom aufweist, die Expression der Gene C06A8.1, R03D7.1 und *fol-1* bei unterschiedlichen exogenen Folatlevels untersucht. Dies sind die orthologen Gene der MTHFR, MS und des hRFC des Menschen, welche im Metabolismus der Folsäure eine Schlüsselfunktion einnehmen. Weiters war auch die entwicklungsbedingte Regulation dieser Gene Gegenstand der Untersuchung. Mit Hilfe von Real-Time PCR, unter Verwendung zweier zuvor validierter Referenzgene, konnte eine relative Quantifizierung der zu prüfenden Gene durchgeführt und somit eine etwaige Änderung in der Expression aufgezeigt werden.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass ein exogener Folsäuremangel gegenüber erhöhten Konzentrationen zu einem tendenziellen Anstieg der Expression von C06A8.1, R03D7.1 und *fol-1* führt. Da die beiden Referenzgene im Folsäuremangel jedoch eine Regulation in der Expression erfahren, konnte das Ausmaß dieser Steigerung nicht bestimmt werden. Auch in der Entwicklung von *C. elegans* unterliegen die Referenzgene einer Regulation, wodurch keine Aussage bezüglich der entwicklungsbedingten Expression von C06A8.1 und R03D7.1 getroffen werden konnte. Lediglich für *fol-1* konnte eine tendenzielle Abnahme der Expression mit zunehmender Reife der Würmer festgestellt werden.

7) Abstract

Folate, a water soluble B vitamin, is essential for normal cellular function and development. Tetrahydrofolate and its derivatives are important cofactors in the transfer of one-carbon-groups and have a key function in metabolism of various amino acids as well as in the production of precursors for DNA synthesis. As the exact function of folate metabolism is not completely understood and effects of folate deficiency remain partly unresolved, this subject requires further investigation. Therefore this thesis contributes to the exploration of the gene expression of C06A8.1, R03D7.1 and *fol-1* in the model organism *C. elegans*, which shows remarkable similarity to the human genome, at different exogenous folate levels. The investigated genes are the orthologs of the human MTHFR, MS and hRFC, which play an essential role in folic acid metabolism. Furthermore the effect of *C. elegans* development on the regulation of expression of the mentioned genes was subject of this study.

Real-time PCR, applying two different reference genes, was used to perform relative quantification of the genes to determine the level of expression under the different conditions.

In this thesis it could be demonstrated that exogenous deficiencies of folate compared to oversupplemented folate levels incline to result in a higher expression of C06A8.1, R03D7.1 and *fol-1*. However the extent of this alteration can not be determined as the expression of both of the reference genes is regulated in the case of folate deficiency. Because the two reference genes appear to be also regulated in their expression at different developmental stages no statement can be made if C06A8.1 and R03D7.1 are developmentally regulated. Only *fol-1* was shown to tend to a lower expression with age.

8) Literaturverzeichnis

APPLIED BIOSYSTEMS (1997, aktualisiert 2001): User Bulletin #2. ABI PRISM 7700 Sequence Detection System

APPLIED BIOSYSTEMS (2005): Relative Quantification Getting Started Guide

APPLIED BIOSYSTEMS (2007): TaqMan Gene Expression Master Mix; Protocol

ASHOKKUMAR, B.; MOHAMMED, Z. M.; VAZIRI, N. D.; SAID, H. M. (2007): Effect of folate oversupplementation on folate uptake by human intestinal and renal epithelial cells; American Journal of Clinical Nutrition, 86, 159-166

BAILEY, L. B.; GREGORY, J. F. (1999): Folate Metabolism and Requirements; Journal of Nutrition, 129, 779-782

BALAMURUGAN, K.; SAID, H. M. (2003): Ontogenic regulation of folate transport across rat jejunal brush-border membrane; American Journal of Physiology – Gastrointestinal and Liver Physiology, 285, G1068-G1073

BALAMURUGAN, K.; ASHOKKUMAR, B.; MOUSSAIF, M.; SZE, J. Y.; SAID, H. M. (2007): Cloning and functional characterization of folate transporter from the nematode *Caenorhabditis elegans*; American Journal of Physiology - Cell Physiology, 293, C670-C681

BLOM, H. J.; SMULDERS, Y. (2011): Overview of homocystein and folate metabolism. With special references to cardiovascular disease and neural tube defects; Journal of Inherited Metabolic Disease, 34, 75-81

BRZEZIŃSKA, A.; WIŃSKA, P.; BALIŃSKA, M. (2000): Cellular aspects of folate and antifolate membrane transport; Acta Biochimica Polonica, 47, 3, 735-749

COLLINS J. F. (2008): *Novel insights into intestinal and renal folate transport*. Focus on "Apical membrane targeting and trafficking of the human proton-coupled folate transporter in polarized epithelia"; American Journal of Physiology - Cell Physiology, 294, 2, C381-C382

COPASTM Protocol #SP-04, Sample Preparation Protocol SP-04 Sucrose Sedimentation Technique for *C. elegans*, Union Biometrica, Inc

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

DOUCETTE, M. M.; STEVENS, V. L. (2001): Folate Receptor Function Is Regulated in Response to Different Cellular Growth rates in Cultured Mammalian Cells; Journal of Nutrition, 131, 2819-2825

FENECH, M. (2001): The role of folic acid and Vitamin B12 in genomic stability of human cells, Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 475, 57-67

FÖDINGER, M.; HÖRL, W. H.; SUNDER-PLASSMANN, G. (2000): Molecular biology of 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase; Journal of Nephrology, 13, 20-33

FRISO, S.; CHOI, S. W. (2005): Gene-Nutrient Interactions in One-Carbon Metabolism; Current Drug Metabolism, 6, 37-46

HAMZA I. (k. A.): Maintenance of *C. elegans* in axenic growth cultures and generation of large numbers for biochemical studies

HEID, C. A.; STEVENS, J.; LIVAK, K. J.; WILLIAMS, P. M. (1996): Real time quantitative PCR; Genome Research, 6, 986-994

HOOGEWIJS, D.; HOUTHOOFD, K.; MATTHIJSSENS, F.; VANDESOMPELE, J.; VANFLETEREN, J. R. (2008): selection and validation of a set of reliable reference genes for quantitative gene expression analysis in *C. elegans*; BMC Molecular Biology, 9, 9

JING, M.; TACTACAN, G. B.; RODRIGUEZ-LECOMPTE, J. C.; KROEKER, A.; HOUSE, J. D. (2009): Molecular cloning and tissue distribution of reduced folate carrier and effect of dietary folate supplementation on the expression of reduced folate carrier in laying hens; *Poultry Science*, 88, 1939–1947

KACPRZAK, M. M.; LEWANDOWSKA, I.; MATTHEWS, R. G.; PASZEWSKI, A. (2003): Transcriptional regulation of methionine synthase by homocysteine and choline in *Aspergillus nidulans*; *Biochemical Journal*, 376, 517-524

KLÄMBT, C.; KUBIGSTELTIG, I.; NOWROUSIOAN, M.. (2005): „PCR-Analytik“ in: *Praktikum der Molekulargenetik*; (Hrsg.: Kück U.) Springer-Verlag Berlin Heidelberg

LIVAK, L. J.; SCHMITTGEN, T. D. (2001): Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ Method; *Methods*, 25, 402-408

LÖFFLER, G.; PETRIDES, P. E.; HEINRICH, P. C. (2007): *Biochemie und Pathobiochemie*; Springer Medizin Verlag, Heidelberg

MÜLHARD, C. (2009): *Der Experimentator. Molekularbiologie / Genomics*; Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg

MEDHURST, A. D.; HARRISON, D. C.; READ, S. J.; CAMPBELL, C. A.; ROBBINS, M. J.; PANGALOS, M. N. (2000): The use of TaqMan RT-PCR assays for semiquantitative analysis of gene expression in CNS tissues and disease models; *Journal of Neuroscience Methods*, 98, 9-20

NAKAI, Y.; INOUE, K.; ABE, N.; HATAKEYAMA, M.; OHTA, K.; OTAGIRI, M.; HAYASHI, Y.; YUASA, H. (2007): Functional Characterization of Human Proton-Coupled Folate Transporter/Heme Carrier Protein 1 Heterologously Expressed in Mammalian Cells as a Folate Transporter; *Journal of Pharmacology and experimental Therapeutics*, 322, 2, 469-476

- NASS, R.; HAMZA, I. (2007): 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*, 1.9., 1-18
- NOLAN, T.; HANDS, R. E.; BUSTIN, S. A. (2006): Quantification of mRNA using Real-Time RT-PCR; *Nature protocols*, Vol. 1, No. 3, 1559-1582
- PFAFFL, M. W. (2004): Real-Time RT-PCR: Neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung; *BIOspektrum, Sonderausgabe PCR*, 10, 92-95
- PFAFFL, M. W.; MEYER, H. H. D. (2006): Quantifizierung der mRNA-Expression von Kandidatengenen in Nutztieren mittels qRT-PCR; *Züchtungskunde*, 78, 6, 440-450
- PIETRZIK, K.; PRINZ-LANGENOHL, R. (2000): Wissenschaftliche Ernährungsinformation. Folsäure/Folat; *Forum Ernährungsmedizin* (Hrsg.)
- PIETRZIK, K.; GOLLY, I.; LOEW, D. (2008): „Folsäure“ in: *Handbuch Vitamine. Für Prophylaxe, Therapie und Beratung*; Elsevier Urban & Fischer Verlag, München
- QUI, A.; JANSEN, M.; SAKARIS A.; MIN, S. H.; CHATTOPADHYAY, S.; TSAI, E.; SANDOVAL, C.; ZHAO, R.; AKABAS, M. H.; GOLDMAN I. D. (2006): Identification of an Intestinal Folate Transporter and the Molecular Basis for Hereditary Folate Malabsorption; *Cell*, 127, 917–928
- RYCHLIK, W.; SPENCER, W.J.; RHOADS, R.E. (1990): Optimization of the annealing temperature for DNA amplification in vitro; *Nucleic Acids Research*, Vol. 18, No. 21, 6409-6412
- SAID, H. M.; CHATTERJEE, N.; HAQ, R. U.; SUBRAMANIAN, V. S.; ORTIZ, A.; MATHERLY, L. H.; SIROTNAK, F. M.; HALSTED, C.; RUBIN, S. A. (2000): Adaptive regulation of intestinal folate uptake: effect of dietary folate deficiency; *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 279, C1889-C1895

SAID, H. M.; MOHAMMED, Z. M. (2006): Intestinal absorption of water-soluble vitamins: an update; *Current Opinion in Gastroenterology*, 22, 140-146

SCHILD, T. A. (K. A.): Einführung in die Real-Time TaqMan PCR-Technologie, 7700 SDS Workshop; Applied Biosystems

SCHMITTGEN, T. D.; LIVAK, J. L. (2008): Analyzing Real-Time PCR data by the comparative C_T method; *Nature Protocols*, Vol. 3, No. 6, 1101-1108

SPRANDO, R. L.; OLEJNIK, N.; CINAR, H. N.; FERGUSON, M. (2009): A method to rank order water soluble compounds according to their toxicity using *Caenorhabditis elegans*, a Complex Object Parametric Analyzer and Sorter, and axenic liquid media; *Food and Chemical Toxicology*, 47, 4, 722-728

STANGER, O. (2002): Physiologie of Folic Acid in Health and Disease; *Current Drug Metabolism*, 3, 211-223

STANGER, O. (2004): „Folsäure“ in: Homocystein. Grundlagen, Klinik, Therapie, Prävention; Verlag Wilhelm Maudrich, Wien München Bern

STRANGE, K. (2003): From Genes to Integrative Physiology: Ion Channel and Transporter Biology in *Caenorhabditis elegans*; *Physiological Reviews*, 83, 377-415

SUBRAMANIAN, V. S.; CHATTERJEE, N.; SAID, H.M. (2003): Folate Uptake in Human Intestine: Promotor Activity and Effect of Folate Deficiency; *Journal of Cellular Physiology*, 196, 403-408

SWANSON, D. A.; LIU, M. L.; BAKER, P. J.; GARRETT, L.; STITZEL, M.; WU, J.; HARRIS, M.; BANERJEE, R.; SHANE, B.; BRODY, L. C. (2001): Targeted Disruption of the Methionine Synthase Gene in Mice; *Molecular and Cellular Biology*, 21, 4, 1058-1065

WORMBASE: www.wormbase.org; 27.3.2011

ZHAO, R.; QIU, A.; TSAI, E.; JANSEN, M.; AKABAS, M. H.; GOLDMAN, I. D. (2008): The Proton-Coupled Folate Transporter: Impact on Pemetrexed Transport and on Antifolates Activities Compared with the Reduced Folate Carrier; *Molecular Pharmacology*, 74, 3, 854-862

9) Appendix

Tabelle 10: Ergebnisse der absoluten Quantifizierung (Validierungsexperiment)

Detector	Sample Name	Ct	Mittelwert	StdDev Ct
csq1 c.elegans	100	25.06	25.14	0.10
csq1 c.elegans	100	25.1		
csq1 c.elegans	100	25.25		
csq1 c.elegans	10	28.54	28.49	0.18
csq1 c.elegans	10	28.63		
csq1 c.elegans	10	28.29		
csq1 c.elegans	1	31.7	31.77	0.08
csq1 c.elegans	1	31.86		
csq1 c.elegans	1	31.76		
csq1 c.elegans	0.1	35.42	35.43	0.06
csq1 c.elegans	0.1	35.38		
csq1 c.elegans	0.1	35.5		
FOLT1 c.elegans	100	29.74	29.81	0.09
FOLT1 c.elegans	100	29.87		
FOLT1 c.elegans	10	33.45		
FOLT1 c.elegans	10	33.26	33.36	0.09
FOLT1 c.elegans	10	33.36		
FOLT1 c.elegans	1	36.43		
FOLT1 c.elegans	1	36.7	36.59	0.14
FOLT1 c.elegans	1	36.65		
FOLT1 c.elegans	0.1	39.88		
FOLT1 c.elegans	0.1	39.77	39.83	0.08
MS c.elegans	100	26.49		
MS c.elegans	100	26.49		
MS c.elegans	100	26.61	26.53	0.07
MS c.elegans	10	29.99		
MS c.elegans	10	29.94		
MS c.elegans	10	29.81	29.91	0.09
MS c.elegans	1	33.2		
MS c.elegans	1	33.12		
MS c.elegans	1	33.48	33.27	0.19
MS c.elegans	0.1	36.92		
MS c.elegans	0.1	36.51		

MS c.elegans	0.1	36.28		
MS c.elegans	0.1	36.33		
MTHFR c. elegans	100	26.58	26.52	0.06
MTHFR c. elegans	100	26.52		
MTHFR c. elegans	100	26.47		
MTHFR c. elegans	10	29.78	29.81	0.18
MTHFR c. elegans	10	30.01		
MTHFR c. elegans	10	29.65		
MTHFR c. elegans	1	33.35	33.35	0.08
MTHFR c. elegans	1	33.44		
MTHFR c. elegans	1	33.27		
MTHFR c. elegans	0.1	36.6	36.77	0.29
MTHFR c. elegans	0.1	36.61		
MTHFR c. elegans	0.1	37.11		
pmp3 c.elegans	100	28.81	28.62	0.17
pmp3 c.elegans	100	28.53		
pmp3 c.elegans	100	28.51		
pmp3 c.elegans	10	31.93	31.95	0.02
pmp3 c.elegans	10	31.96		
pmp3 c.elegans	1	35.31	35.31	0.02
pmp3 c.elegans	1	35.3		
pmp3 c.elegans	1	35.33		
pmp3 c.elegans	0.1	39.01	38.82	0.27
pmp3 c.elegans	0.1	38.63		

Tabelle 11: Ergebnisse der relativen Quantifizierung, Normalisiert mit pmp-3

Sample	Detector	Avg Ct	Avg Δ Ct	Δ Ct StdDev	$\Delta\Delta$ Ct	RQ	Mittelw	StdDev
N1	MS c.elegans	25.937	-2.48	0.045	-1.226	2.339	1.78	0.49
N2	MS c.elegans	25.572	-1.742	0.08	-0.488	1.402		
N3	MS c.elegans	26.181	-1.934	0.056	-0.68	1.602		
T1	MS c.elegans	25.732	-1.407	0.104	-0.153	1.112	1.08	0.04
T2	MS c.elegans	25.462	-1.299	0.09	-0.045	1.032		
T3	MS c.elegans	25.14	-1.371	0.068	-0.117	1.085		
Z1	MS c.elegans	28.789	-1.465	0.094	-0.211	1.158	1.30	0.13
Z2	MS c.elegans	28.91	-1.695	0.103	-0.44	1.357		
Z3	MS c.elegans	29.958	-1.738	0.093	-0.484	1.399		
A_1	MS c.elegans	28.228	-1.94	0.05	-0.686	1.609	1.60	0.12
A_2	MS c.elegans	29.115	-2.04	0.007	-0.786	1.724		
A_3	MS c.elegans	29.468	-1.82	0.117	-0.565	1.48		
L3-L4_1	MS c.elegans	29.456	-2.814	0.056	-1.56	2.949	2.78	0.64

L3-L4_2	MS c.elegans	29.367	-2.3	0.216	-1.046	2.065		
L3-L4_3	MS c.elegans	29.259	-2.984	0.11	-1.73	3.317		
N1	FOLT1 c.elegans	28.944	0.527	0.053	-1.037	2.051	2.63	0.64
N2	FOLT1 c.elegans	27.546	0.232	0.08	-1.331	2.515		
N3	FOLT1 c.elegans	27.946	-0.17	0.112	-1.733	3.324		
T1	FOLT1 c.elegans	27.957	0.819	0.111	-0.744	1.675	1.61	0.14
T2	FOLT1 c.elegans	27.556	0.795	0.022	-0.768	1.703		
T3	FOLT1 c.elegans	27.534	1.023	0.046	-0.54	1.454		
Z1	FOLT1 c.elegans	31.221	0.967	0.074	-0.596	1.512	1.32	0.17
Z2	FOLT1 c.elegans	31.903	1.299	0.082	-0.264	1.201		
Z3	FOLT1 c.elegans	32.939	1.243	0.091	-0.321	1.249		
A_1	FOLT1 c.elegans	32.101	1.774	0.1	0.21	0.864	1.15	0.25
A_2	FOLT1 c.elegans	32.391	1.235	0.076	-0.328	1.255		
A_3	FOLT1 c.elegans	32.449	1.162	0.082	-0.401	1.321		
L3-L4_1	FOLT1 c.elegans	31.766	-0.504	0.073	-2.068	4.192	3.78	0.53
L3-L4_2	FOLT1 c.elegans	31.849	-0.11	0.157	-1.674	3.19		
L3-L4_3	FOLT1 c.elegans	31.819	-0.425	0.052	-1.988	3.967		
N1	MTHFR c.elegans	25.859	-2.558	0.044	-1.268	2.407	1.80	0.54
N2	MTHFR c.elegans	25.558	-1.755	0.086	-0.464	1.38		
N3	MTHFR c.elegans	26.129	-1.986	0.124	-0.695	1.619		
T1	MTHFR c.elegans	25.304	-1.834	0.055	-0.543	1.457	1.24	0.20
T2	MTHFR c.elegans	25.2	-1.56	0.027	-0.269	1.205		
T3	MTHFR c.elegans	25.138	-1.373	0.018	-0.082	1.059		
Z1	MTHFR c.elegans	28.539	-1.715	0.059	-0.424	1.342	1.46	0.13
Z2	MTHFR c.elegans	28.778	-1.826	0.046	-0.535	1.449		
Z3	MTHFR c.elegans	29.725	-1.972	0.088	-0.681	1.603		
A_1	MTHFR c.elegans	28.618	-1.551	0.107	-0.26	1.197	1.26	0.06
A_2	MTHFR c.elegans	29.475	-1.681	0.011	-0.39	1.31		
A_3	MTHFR c.elegans	29.66	-1.628	0.04	-0.337	1.263		
L3-L4_1	MTHFR c.elegans	29.45	-2.82	0.041	-1.53	2.887	3.00	0.81
L3-L4_2	MTHFR c.elegans	29.207	-2.461	0.206	-1.17	2.25		
L3-L4_3	MTHFR c.elegans	29.005	-3.238	0.018	-1.947	3.856		

Tabelle 12: Ergebnisse der relativen Quantifizierung, Normalisiert mit csq-1

Sample	Detector	Avg Ct	Avg Δ Ct	Δ Ct StdDev	$\Delta\Delta$ Ct	RQ	Mittelw	StdDev
N1	FOLT1 c.elegans	28.944	3.812	0.032	-0.944	1.924	4.80	0.71
N2	FOLT1 c.elegans	27.546	2.348	0.021	-2.408	5.308		
N3	FOLT1 c.elegans	27.946	2.652	0.101	-2.104	4.298		
T1	FOLT1 c.elegans	27.957	2.378	0.123	-2.378	5.198	5.41	0.42
T2	FOLT1 c.elegans	27.556	2.196	0.102	-2.56	5.899		
T3	FOLT1 c.elegans	27.534	2.395	0.05	-2.362	5.139		
Z1	FOLT1 c.elegans	31.221	3.896	0.067	-0.86	1.816	1.62	0.17
Z2	FOLT1 c.elegans	31.903	4.16	0.082	-0.596	1.512		
Z3	FOLT1 c.elegans	32.939	4.154	0.109	-0.603	1.518		
A_1	FOLT1 c.elegans	32.101	4.185	0.13	-0.571	1.485	1.40	0.08
A_2	FOLT1 c.elegans	32.391	4.343	0.075	-0.413	1.331		
A_3	FOLT1 c.elegans	32.449	4.296	0.087	-0.46	1.375		
L3-L4_1	FOLT1 c.elegans	31.766	3.812	0.083	-0.944	1.924	1.66	0.24
L3-L4_2	FOLT1 c.elegans	31.849	4.206	0.152	-0.55	1.464		
L3-L4_3	FOLT1 c.elegans	31.819	4.096	0.052	-0.66	1.58		
N1	MS c.elegans	25.937	0.805	0.016	-1.121	2.175	2.39	0.48
N2	MS c.elegans	25.572	0.374	0.02	-1.553	2.934		
N3	MS c.elegans	26.181	0.888	0.027	-1.038	2.054		
T1	MS c.elegans	25.732	0.153	0.118	-1.774	3.42	3.59	0.19
T2	MS c.elegans	25.462	0.102	0.134	-1.825	3.542		
T3	MS c.elegans	25.14	0	0.07	-1.926	3.8		
Z1	MS c.elegans	28.789	1.464	0.088	-0.463	1.378	1.59	0.18
Z2	MS c.elegans	28.91	1.166	0.103	-0.76	1.693		
Z3	MS c.elegans	29.958	1.173	0.111	-0.754	1.686		
A_1	MS c.elegans	28.228	0.594	0.056	-1.332	2.518	1.95	0.51
A_2	MS c.elegans	29.115	1.068	0.005	-0.858	1.813		
A_3	MS c.elegans	29.468	1.315	0.12	-0.611	1.528		
L3-L4_1	MS c.elegans	29.456	1.502	0.068	-0.424	1.342	1.21	0.20
L3-L4_2	MS c.elegans	29.367	1.943		0.017	0.988		
L3-L4_3	MS c.elegans	29.259	1.537	0.11	-0.389	1.31		
N1	MTHFR c.elegans	25.859	0.727	0.012	-1.171	2.251	2.41	0.43
N2	MTHFR c.elegans	25.558	0.36	0.038	-1.537	2.902		
N3	MTHFR c.elegans	26.129	0.836	0.113	-1.061	2.087		
T1	MTHFR c.elegans	25.304	-0.275	0.077	-2.172	4.507	4.13	0.39
T2	MTHFR c.elegans	25.2	-0.16	0.103	-2.057	4.162		
T3	MTHFR c.elegans	25.138	-0.002	0.026	-1.899	3.73		
Z1	MTHFR c.elegans	28.539	1.214	0.05	-0.684	1.606	1.79	0.17
Z2	MTHFR c.elegans	28.778	1.035	0.046	-0.862	1.818		
Z3	MTHFR c.elegans	29.725	0.939	0.106	-0.958	1.943		
A_1	MTHFR c.elegans	28.618	0.983	0.11	-0.914	1.884	1.53	0.31

A_2	MTHFR c.elegans	29.475	1.428	0.009	-0.47	1.385		
A_3	MTHFR c.elegans	29.66	1.507	0.05	-0.391	1.311		
L3-L4_1	MTHFR c.elegans	29.45	1.496	0.057	-0.402	1.321		
L3-L4_2	MTHFR c.elegans	29.207	1.783		-0.115	1.083	1.31	0.22
L3-L4_3	MTHFR c.elegans	29.005	1.283	0.018	-0.615	1.531		

CURRICULUM VITAE

Persönliche Daten

Vor- und Nachname: Alexandra Maringer
Geburtsdatum: 09.01.1986
Geburtsort: Ried im Innkreis
Staatsbürgerschaft: Österreich

Ausbildung

1996 – 2004 Realgymnasium Schloss Wagrain, Vöcklabruck
ab 10/2004 Studium der Ernährungswissenschaften, Universität Wien Schwerpunkt: Ernährung und Umwelt
ab 10/2009 Diplomarbeit am Department für Ernährungswissenschaften, Emerging Focus Nutrigenomics, Universität Wien

Berufliche Praxis

08/2005 Praktikum bei der Österreichischen Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit GmbH (AGES), Kompetenzzentrum für Elemente
09/2005 und 08/2006 Mitarbeit bei der Lenzing AG, Labor für Zellstoff-Forschung
06/2008 Praktikum am Institut für Analytische Chemie und Lebensmittelchemie, Universität Wien
08/2009 Praktikum am Department für Ernährungswissenschaften, Emerging Focus Nutrigenomics, Universität Wien
WS2009 – SS2011 Studentische Mitarbeiterin (Tutorin) bei den Übungen zu Ernährung des Menschen II, Universität Wien