



DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

Einfluss des RNAi Knockdowns von
ausgewählten Genen des
Folsäuremetabolismus auf Reproduktion,
Lebensspanne und Genexpression von
Caenorhabditis elegans

Verfasser

Alexander Eder

angestrebter akademischer Grad

Magister der Naturwissenschaften (Mag.rer.nat.)

Wien, 2012

Studienkennzahl lt. Studienblatt:

A 474

Studienrichtung lt. Studienblatt:

Diplomstudium Ernährungswissenschaften

Betreuerin / Betreuer:

Mag. Dr Elisabeth Rudolph-König

INHALTSVERZEICHNIS

ABBILDUNGSVERZEICHNIS	IV
TABELLENVERZEICHNIS.....	V
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	VI
1 EINLEITUNG	1
2 LITERATURÜBERSICHT	2
2.1 Allgemeines über <i>Caenorhabditis elegans</i>	2
2.1.1 Lebenszyklus	3
2.1.2 Geschlechterdifferenzierung	6
2.1.3 <i>C. elegans</i> als Modellorganismus	8
2.2 RNA Interferenz allgemein	9
2.2.1 RNAi bei <i>C. elegans</i> durch Verfüttern dsRNA-produzierender Bakterien.....	10
2.3 Folsäure und Folat	13
2.3.1 Folsäuremetabolismus.....	14
2.3.2 Folsäuremetabolismus bei <i>C. elegans</i>	16
3 MATERIAL UND METHODEN	18
3.1 Materialien.....	18
3.1.1 Instrumente.....	18
3.1.2 Chemikalien	19
3.1.3 Verbrauchsmaterialien	21
3.1.4 Kits und Primer	22
3.1.5 <i>E. coli</i> Bakterien und Plasmide	23
3.1.5.1 Einfriermedium der Bakterien	23
3.1.6 Nematoden	24
3.1.7 Einfriermedium für <i>C. elegans</i>	25
3.1.8 Nährmedien und Lösungen.....	25
3.1.8.1 NGM (Nematode Growth Medium)–Agar Herstellung	25
3.1.8.2 NGM–Agar für RNAi Herstellung.....	26
3.1.8.3 Nystatin Herstellung	26
3.1.8.4 Cholesterin Herstellung	27
3.1.8.5 Kaliumphosphatpuffer Herstellung	27

3.1.8.6	MgSO ₄ und CaCl ₂ Herstellung	27
3.1.8.7	IPTG Herstellung.....	27
3.1.8.8	Carbenicillin Herstellung.....	28
3.1.8.9	Ampicillin Herstellung	28
3.1.8.10	DYT-Medium	28
3.1.8.11	LB-Medium.....	28
3.1.8.12	M9-Puffer	29
3.1.8.13	Lösung zur Präparation der Eier	29
3.2	Methoden	29
3.2.1	Kultivierung der Bakterien.....	29
3.2.1.1	Herstellung der Übernachtskultur.....	30
3.2.2	Kultivierung von <i>C. elegans</i>	31
3.2.2.1	Umsetzungsmethoden von <i>C. elegans</i>	31
3.2.2.2	Einfrieren von <i>C. elegans</i>	32
3.2.2.3	Synchronisierung der Nematoden (Egg prep).....	32
3.2.2.4	Untersuchung der Anzahl der Nachkommen bei <i>C. elegans</i> (Brood size).....	33
3.2.2.5	Untersuchung der Lebensspanne bei <i>C. elegans</i> (Life span)...	34
3.2.3	Messung der Genexpression	34
3.2.3.1	RNA Extraktion.....	34
3.2.3.2	Reverse Transkription der RNA	35
3.2.3.3	Analyse mit realtime RT-PCR	37
4	ERGEBNISSE UND DISKUSSION	40
4.1	Auswirkung des Genknockdowns <i>fol-1</i> bei Wildtyp und NL2099 <i>C. elegans</i> auf Genexpression, Reproduktion und Lebensspanne	40
4.1.1	Genexpression.....	40
4.1.2	Reproduktion	44
4.1.3	Lebensspanne	45
4.2	Auswirkung des Genknockdowns Y4C6B.5 bei Wildtyp und NL2099 <i>C. elegans</i> auf Genexpression, Reproduktion und Lebensspanne	46
4.2.1	Genexpression.....	47

4.3	Auswirkung des Genknockdowns <i>dhfr-1</i> bei Wildtyp und NL2099 <i>C. elegans</i> auf Genexpression, Reproduktion und Lebensspanne	48
4.3.1	Genexpression.....	48
4.3.2	Reproduktion	50
4.3.3	Lebensspanne	52
4.4	Auswirkung des Genknockdowns <i>mthf-1</i> bei Wildtyp und NL2099 <i>C. elegans</i> auf Genexpression, Reproduktion und Lebensspanne	53
4.4.1	Genexpression.....	53
4.5	Auswirkung des Genknockdowns <i>metr-1</i> bei Wildtyp und NL2099 <i>C. elegans</i> auf Genexpression, Reproduktion und Lebensspanne	54
4.5.1	Genexpression.....	55
4.5.2	Reproduktion	57
4.5.3	Lebensspanne	57
5	ZUSAMMENFASSUNG.....	59
6	SUMMARY	61
	LITERATURVERZEICHNIS.....	62

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: <i>C. elegans</i> Vorkommen	2
Abbildung 2: Lebenszyklus von <i>C. elegans</i>	4
Abbildung 3: Geschlechtsunterschiede bei <i>C. elegans</i>	8
Abbildung 4: Prinzip der Ziel dsRNA Herstellung im <i>E. coli</i> Plasmid	11
Abbildung 5: RNAi Mechanismus in <i>C. elegans</i>	13
Abbildung 6: Strukturformel von Folsäure (Pteroylmonoglutamat)	14
Abbildung 7: Folsäuremetabolismus in <i>C. elegans</i>	16
Abbildung 8: Expression der Gene des Folsäuremetabolismus in N2 und NL2099 mit <i>fol-1</i> RNAi	41
Abbildung 9: Unterschied der Anzahl an Nachkommen bei Wildtyp und NL2099 <i>C. elegans</i> mit <i>fol-1</i> RNAi	44
Abbildung 10: Unterschied der Lebensspanne bei Wildtyp und NL2099 <i>C. elegans</i> mit <i>fol-1</i> RNAi	45
Abbildung 11: Überprüfung des Genknockdowns Y4C6B.5 bei Wildtyp und NL2099 <i>C. elegans</i>	47
Abbildung 12: Expression der Gene des Folsäuremetabolismus in N2 und NL2099 mit <i>dhfr-1</i> RNAi	49
Abbildung 13: Unterschied der Anzahl an Nachkommen bei Wildtyp und NL2099 <i>C. elegans</i> mit <i>dhfr-1</i> RNAi	51
Abbildung 14: Unterschied der Lebensspanne bei Wildtyp und NL2099 <i>C. elegans</i> mit <i>dhfr-1</i> RNAi	52
Abbildung 15: Überprüfung des Genknockdowns <i>mthf-1</i> bei Wildtyp und NL2099 <i>C. elegans</i>	54
Abbildung 16: Überprüfung des Genknockdowns <i>metr-1</i> bei Wildtyp und NL2099 <i>C. elegans</i>	55
Abbildung 17: Unterschied der Anzahl an Nachkommen bei NL2099 <i>C. elegans</i> mit <i>metr-1</i> RNAi	57
Abbildung 18: Unterschied der Lebensspanne bei NL2099 <i>C. elegans</i> mit <i>metr-1</i> RNAi	58

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Liste der verwendeten Instrumente	18
Tabelle 2: Liste der verwendeten Chemikalien	20
Tabelle 3: Verbrauchsmaterialien	21
Tabelle 4: Kits	22
Tabelle 5: Primer.....	22
Tabelle 6: Bakterien und HT115(DE) Plasmide	23
Tabelle 7: Einfriermedium OP50 Bakterien.....	23
Tabelle 8: Einfriermedium RNAi Bakterien.....	24
Tabelle 9: Nematoden.....	24
Tabelle 10: Einfriermedium <i>C. elegans</i>	25
Tabelle 11: NGM–Agar	25
Tabelle 12: NGM–Agar RNAi	26
Tabelle 13: Nystatin	26
Tabelle 14: Cholesterin	27
Tabelle 15: Kaliumphosphatpuffer	27
Tabelle 16: MgSO ₄ und CaCl ₂	27
Tabelle 17: IPTG.....	27
Tabelle 18: Carbenicillin.....	28
Tabelle 19: Ampicillin	28
Tabelle 20: DYT-Medium	28
Tabelle 21: LB-Medium.....	28
Tabelle 22: LB-Medium für RNAi	29
Tabelle 23: M9-Puffer	29
Tabelle 24: Bleichlösung	29
Tabelle 25: Übernachtskultur der OP50 Bakterien.....	30
Tabelle 26: Übernachtskultur der RNAi-Bakterien	30
Tabelle 27: Bakterienvolumen für unterschiedliche Agar-Platten.....	31
Tabelle 28: gDNA Elimination	36
Tabelle 29: Reverse Transkription Master Mix.....	36
Tabelle 30: Primer Master Mix Herstellung	37
Tabelle 31: RT-PCR Einstellungen für die Primer.....	38

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Ø	Durchmesser
°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
ca.	cica
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
CaCl ₂	Calziumchlorid
cDNA	Komplementäre DNA
CGC	Caenorhabditis Genetics Center, Universität Minnesota
cm	Zentimeter
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dH ₂ O	Destilliertes Wasser
dsRNA	double-stranded RNA, doppelsträngige RNA
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EtOH	Ethanol
g	Gramm
gDNA	genomische DNA
h	hour, Stunde
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
K ₂ HPO ₄	di-Kaliumhydrogenphosphat
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
KOH	Kaliumhydroxid
l	Liter
LAF	Laminar-Air-Flow
M	Molar
Max.	Maximum
MEK	Methylethylketon
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
min.	Minuten
Min.	Minimum
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mRNA	messenger RNA
NaCl	Natriumchlorid

Na_2HPO_4	Dinatriumhydrogenphosphat
NaOCl	Natriumhypochlorid
NGM	Nematode Growth Medium
NH_4Cl	Ammoniumchlorid
PCR	Polymerase Chain Reaction, Polymerase Kettenreaktion
pH	Negative dekadische Logarithmus der Wasserstoffionen-Aktivität
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA Interferenz
rpm	rounds per minute, Umdrehung pro Minute
RT-PCR	Reverse Transkription-PCR
siRNA	small interfering RNA
ssRNA	single-stranded RNA, einzelsträngige RNA
Temp.	Temperatur
u.	und
z.B.	zum Beispiel

1 EINLEITUNG

Die vorliegende Arbeit wurde in der Gruppe Emerging Focus Nutrigenomics durchgeführt, welche sich auf die Erforschung des Folsäurestoffwechsels spezialisiert.

Folsäure ist ein essentielles wasserlösliches B-Vitamin und führt bei Mangel nachweislich zu verschiedenen menschlichen Erkrankungen: Arteriosklerose, Neuralrohrdefekten, megaloblastäre Anämie, Alzheimer, Down-Syndrom, Präeklampsie und verschiedene Krebsarten.

Da die genauen Stoffwechselprozesse von Folsäure und die Auswirkungen im Falle von Mangel beziehungsweise Überangebot noch nicht vollständig erforscht sind, wird an Hand des Modellorganismus *Caenorhabditis elegans* der Metabolismus von Folsäure näher untersucht.

C. elegans wurde von Sydney Brenner 1960 als Modellorganismus eingeführt, da etwa 40% der Gene, die mit menschlichen Krankheiten assoziiert sind, im *C. elegans* Genom homolog sind.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Untersuchung verschiedener Gene des Folsäuremetabolismus in *C. elegans*. Hierfür wird die Expression von fünf Genen (*folr-1*, Y4C6B.5, *dhfr-1*, *mthf-1* und *metr-1*) mit Hilfe der RNA Interferenz verringert und der phänotypische Effekt auf Reproduktion und Lebensspanne untersucht. Ebenso wird der Einfluss des Mangels eines Enzyms auf die Expression der anderen Enzyme des Folsäurestoffwechsels untersucht.

2 LITERATURÜBERSICHT

2.1 Allgemeines über *Caenorhabditis elegans*

Caenorhabditis elegans (*C. elegans*) wurde zuerst von Maupas (1900) beschrieben und als *Rhabditis elegans* benannt und durch Ochse (1952) wurde er in die Untergattung *Caenorhabditis* gestellt. Der Name ist eine Mischung aus Griechisch und Latein:

Caeno (griechisch): neu, jüngst, kürzlich

rhabditis (griechisch): Rute, Stab

elegans (lateinisch): elegant [Riddle et al., 1997]

C. elegans ist ein kleiner (1 mm), in der Erde freilebender Nematode [Wood, 1988] und kommt meist in anthropogenen Lebensräumen wie Kompost, Pilzbeeten und Gartenerde in Europa, Madeira, Algerien, Australien, Nordamerika und Hawaii vor (siehe Abbildung 1) [Barrière und Félix, 2005].

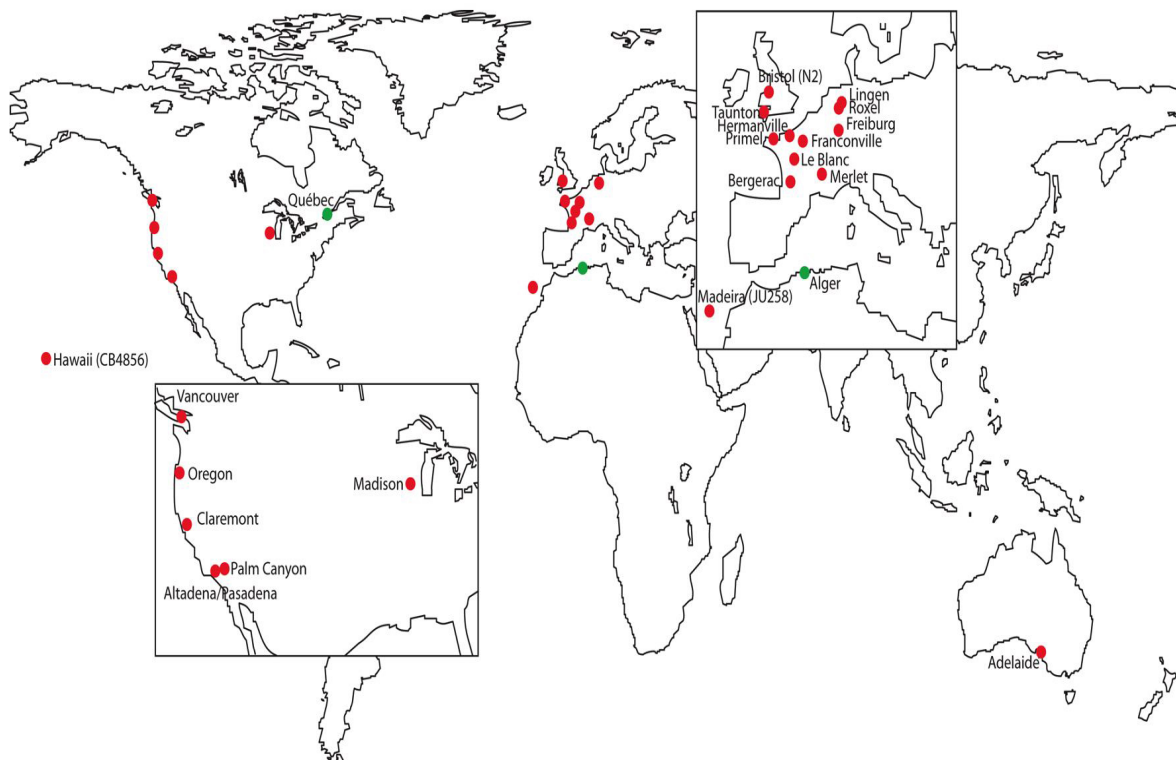


Abbildung 1: *C. elegans* Vorkommen

Rote Punkte: Herkunft der zur Verfügung stehenden wild isolierten *C. elegans* Stämme
Grüne Punkte: Orte an denen *C. elegans* auch gefunden wurde (Algerien, Québec), jedoch nicht zur Verfügung steht [Barrière und Félix, 2005]

C. elegans ist gut an das Überleben im Boden angepasst, obwohl sich die Bedingungen wie Temperatur sowie die Verfügbarkeit von Nahrung und Wasser schnell verändern können [Strange, 2006]. Von welchen Mikroorganismen sich die Nematoden in der Natur ernähren, ist unbekannt. Auch sein natürlicher Lebensraum ist noch nicht vollständig erforscht, jedoch können alle in Kultur lebenden *Caenorhabditis* Spezies mehr oder weniger gut von dem Bakterium *Escherichia coli* leben [Barrière und Félix, 2005; Kiontke et al., 2006].

Die neueste Studie über die natürlichen Lebensräume von *C. elegans* (und *Caenorhabditis briggsae*), eine vierjährige Studie (2008-20011) in Obstgärten in Frankreich, wurde von Marie-Anne Félix und Fabien Duveau durchgeführt. Sie fanden *C. elegans* in an Bäumen hängenden faulenden Früchten (Äpfel, Birnen, Pflaumen, Pfirsiche, Tomaten und Feigen) und in Pflanzenstängeln (Aronstab, Bärenkraut, Gewöhnliche Pestwurz und verschiedene Beinwellarten) an mehreren Standorten auf dem französischen Festland. Das Entscheidende an ihrer Studie ist, dass sie zum ersten Mal frei lebende Würmer in einer großen Anzahl (von 1 bis über 10000) fanden und keine Dauerlarven (Erklärung der Dauerlarve siehe Kapitel 2.1.1) wie sonst üblich (in Kompost, Pilzbeeten und Gartenerde). Des Weiteren haben sie den natürlichen Lebensraum von *C. elegans* gefunden, in dem er sich ernähren und vermehren kann. Anscheinend ist *C. elegans* doch kein im Erdboden lebender Nematode wie bisher angenommen [Blaxter und Denver, 2012; Félix und Duveau, 2012].

2.1.1 Lebenszyklus

Nach der Entwicklung im Ei (Embryonalentwicklung) und dem Schlüpfen (Hatching) durchläuft *C. elegans* vier juvenile Stadien - L1 bis L4 (postembryonale Entwicklung) - bis zum erwachsenen Wurm (Adult), der wiederum Eier legt (siehe Abbildung 2).

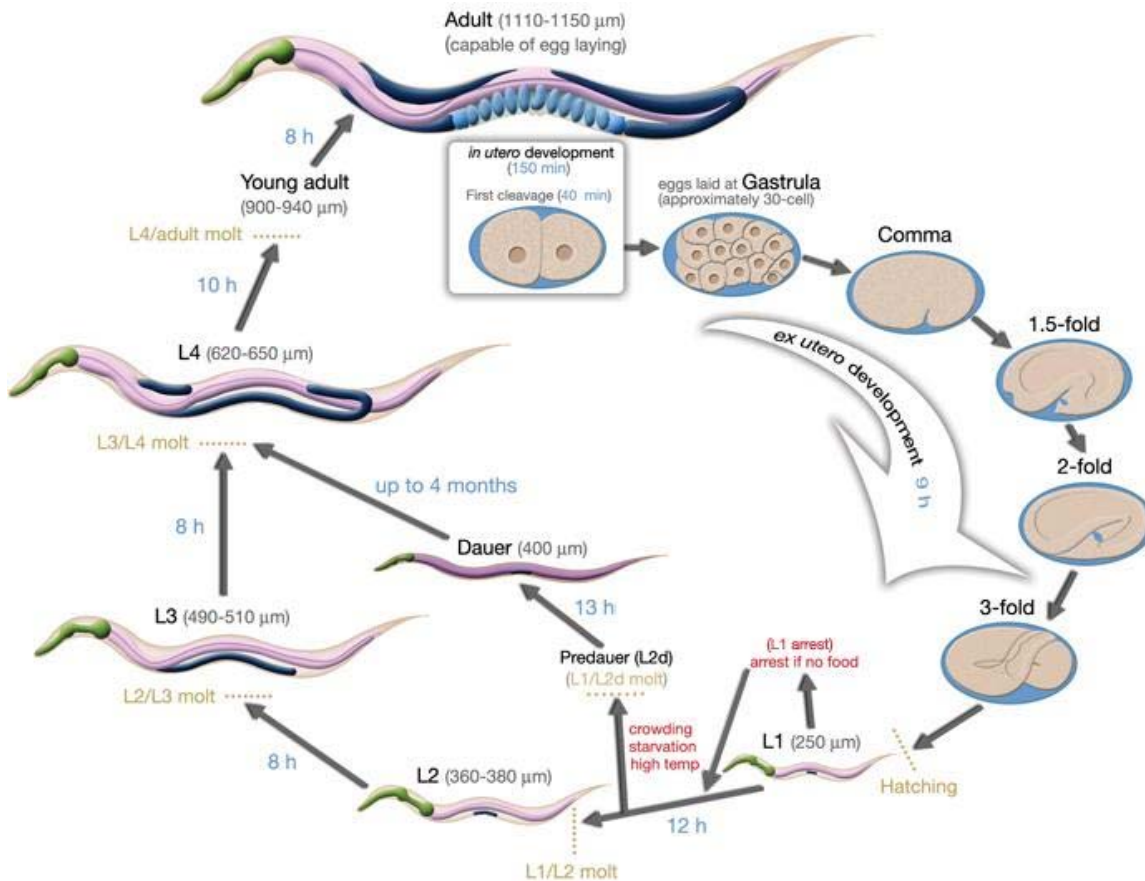


Abbildung 2: Lebenszyklus von *C. elegans*

Das Bild zeigt die Entwicklung vom Ei bis zum erwachsenen Hermaphroditen bei 22°C. Blaue Zahlen geben die Zeit (h) von einem zum nächsten Stadium an [Altun und Hall, 2009].

Embryo:

Die Embryogenese in *C. elegans* ist geteilt in zwei Stadien: die Proliferation und die Organogenese/Morphogenese. Die Proliferation umfasst im Wesentlichen die Zellteilung, die aus einer einzigen Zelle ca. 550 undifferenzierte Zellen bildet. In der Organogenese/Morphogenese wächst der Embryo durch mehrere Zellteilungen [Altun und Hall, 2009]. Nach dem Schlüpfen beginnt die postembryonale Entwicklung, welche durch das Vorhandensein von Nahrung aktiviert wird [Ambros, 2000].

L1-Larvenstadium (L1):

Ab diesem Stadium kommt es zu einer weiteren Entwicklung des Nervensystems und des reproduktiven Systems. Steht nach dem Schlüpfen (Hatching) kein Futter zur Verfügung, können die L1-Larven sechs bis zehn

Tage ohne Nahrung auskommen. Ist nach dieser Zeit wieder Nahrung verfügbar, können die Larven, die in einem arrest L1-Stadium verweilen, ihre Entwicklung fortsetzen. Die vollständige Differenzierung zwischen Männchen und Hermaphroditen ist ab dem L1-Stadium möglich [Altun und Hall, 2009].

Dauer-Larvenstadium (Dauer):

Die Dauerlarve ist eine Entwicklungsvariante, die vor dem L2-Stadium entsteht. Die Entscheidung zur Dauerlarvenentwicklung tritt erst am Ende des L1-Larvenstadiums aufgrund von drei Umweltparametern ein: Populationsdichte, Nahrungsmittelversorgung und Umgebungstemperatur [Hu, 2007]. Dauer-Larven nehmen keine Nahrung auf, weisen eine andere Struktur und einen anderen Stoffwechsel, sowie ein anderes Verhalten auf, wodurch sie eine bis zu 10mal höhere Lebensdauer erreichen können [Strange, 2006]. Im Dauerstadium sind die Würmer über mehrere Monate überlebensfähig, was die Ausbreitung auf neue Lebensräume erleichtert [Hope, 1999; Strange, 2006]. Sobald Nahrung zur Verfügung steht, entwickeln sie sich normal weiter bis zum erwachsenen Wurm (Adult) [Strange, 2006].

L2-Larvestadium (L2):

Die allgemeine Organisation der zukünftigen Gonade wird durch Neuordnung von somatischen Zellen und Keimzellen während dem L2/L3-Stadium umgesetzt [Altun und Hall, 2009].

L3-Larvenstadium (L3):

Während des L3-Larvenstadiums liefern somatische Zellen insgesamt 143 Zellen, die die vorderen und hinteren Gonaden-Scheiden, die Spermathecae, die Vulva, die Gebärmutter und 16 Sex-Muskelzellen bilden. Bei den Männchen werden 53 somatische Gonadenzellen gebildet, aus denen die Samenleiter und die Samenblase entstehen [Altun und Hall, 2009].

L4-Larvenstadium (L4):

Im L4-Stadium sind die auch als "jungfräuliche junge Erwachsene" bezeichneten Würmer voll ausgewachsen und haben sich noch nicht fortgepflanzt [Hodgkin, 1999]. *C. elegans* Hermaphroditen können sich selbst befruchten und produzieren zuerst Spermien, welche sie in den Spermathecae lagern. Anschließend beginnen sie mit der Oogenese im Erwachsenenstadium (Adult) [Hubbard und Greenstein, 2005; Schafer, 2005]. Jeder Hermaphrodit speichert das Sperma und nutzt es, um die eigenen Eizellen zu befruchten [L'Hernault, 2006].

Erwachsenenstadium (Adult):

Junge erwachsene Hermaphroditen lagern 10-15 Eier im Uterus. Die Eiablage erfolgt durch spezielle Muskelzellen (16 Muskelzellen sind involviert), welche bei Kontraktion die Vulva öffnen und den Uterus komprimieren, sodass die Eier in die Umgebung abgegeben werden können [Schafer, 2005]. Hermaphroditen produzieren über 250 reife Nachkommen und weniger als 1% unbefruchtete Eier während der viertägigen fruchtbaren Periode [Hodgkin 1999; Hope, 1999]. Wenn sich Hermaphroditen mit Männchen paaren, erzeugen sie mehr als 1.000 Nachkommen [Strange, 2006].

Während der Entwicklung zum ausgewachsenen Wurm produzieren Hermaphroditen 1.090 somatische Zellen, wobei 131 davon durch den programmierten Zelltod (Apoptose) absterben. Somit hat ein adulter Hermaphrodit 959 somatische Zellen. Ein adultes Männchen hat dahingegen insgesamt 1.031 somatische Zellen. Für die gesamte Entwicklung eines Wurmes vom Ei bis zum Erwachsen, welcher wiederum Eier legt, benötigt ein Wildtyp *C. elegans* ca. drei bis vier Tage [Altun und Hall, 2009].

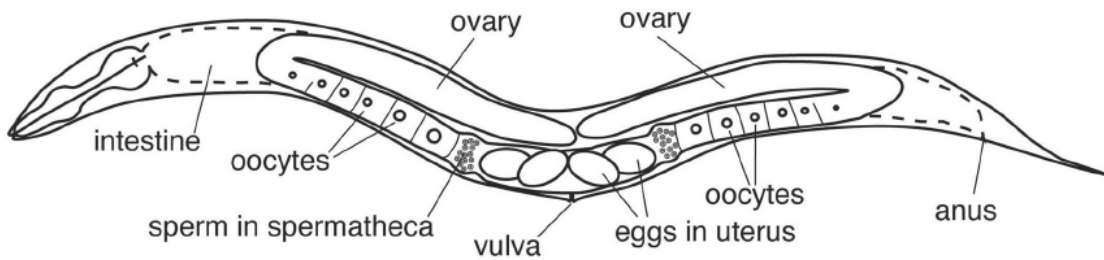
2.1.2 Geschlechterdifferenzierung

Es gibt zwei natürliche Geschlechter bei *C. elegans*, die Hermaphroditen und die Männchen (siehe Abbildung 3) [Zarkower, 2006]. Hermaphroditen sind in der Regel diploid, mit fünf Paaren von Autosomen und zwei X Chromosomen

(XX). Männchen haben die gleichen Paare von Autosomen, aber nur ein X Chromosom (XO) [Herman, 2005]. Hermaphroditen sind grundsätzlich Weibchen, die eine kleine Anzahl von Spermien produzieren um ihre eigenen Eizellen zu befruchten, oder sie paaren sich zu diesem Zweck mit Männchen [Herman, 2006; Zarkower, 2006]. Diese modifizierten Weibchen sind daher in der Lage, sich in Abwesenheit von einem anderen Individuum zu reproduzieren (Meyer 1997: 210). Die Männchen sind kleiner als die Hermaphroditen und produzieren nur Spermien [Herman, 2005; Strange, 2006].

Von den 959 somatischen Zellen in Hermaphroditen und den 1.031 somatischen Zellen in den Männchen sind aber lediglich 650 Zellen bei beiden Geschlechtern gleich [Herman, 2006]. Das bedeutet, dass mindestens 40% der männlichen und 30% der hermaphroditischen Zellen sexuell spezialisiert sind. So ist zum Beispiel der Schwanz der Hermaphroditen relativ unspezialisiert und verjüngt sich zu einem dünnen Punkt. Bei den Männchen hingegen ist der Schwanz hochspezialisiert, um die Vulva der Hermaphroditen lokalisieren zu können und ihr Sperma zu deponieren [Meyer, 1997]. Weiters haben die Gonaden von beiden Geschlechtern eine unterschiedliche Struktur und Funktion. Die Geschlechtsunterschiede entstehen während der Larvenentwicklung [Herman, 2006].

XX hermaphrodite



XO male

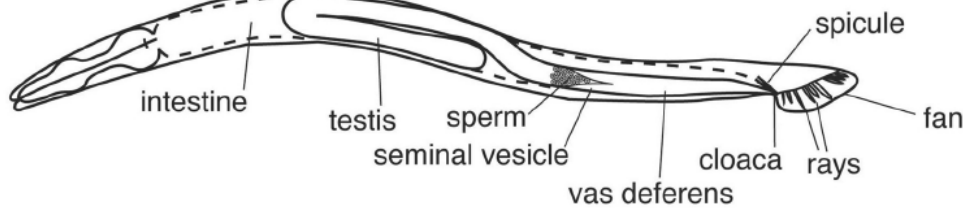


Abbildung 3: Geschlechtsunterschiede bei *C. elegans*

Geschlechtsunterschiede bei adulten Hermaphroditen (XX) und Männchen (XO) [Zarkower, 2006].

C. elegans der Wildtyp-Population bestehen überwiegend aus Hermaphroditen (99,9%) und zu 0,1% aus Männchen [Strange, 2006]. Männchen werden nur selten in Populationen von selbst befruchtenden Hermaphroditen als Folge eines spontanen Verlusts des X-Chromosoms gefunden [Hodgkin, 1999; Strange, 2006].

2.1.3 *C. elegans* als Modellorganismus

Im Jahr 1965 führte Sydney Brenner *C. elegans* als Modellorganismus für die Erforschung tierischer Entwicklung und tierischen Verhaltens ein [Riddle et al., 1997]. Brenners Schwerpunkt war es, ein geeignetes Tiermodell für die Anwendung von genetischen Analysen zu finden, um molekulare Mechanismen der Entwicklung und Funktion des Nervensystems zu definieren [Strange, 2006].

C. elegans hat aufgrund bestimmter Faktoren ein großes Potenzial für genetische Analysen:

- schnelle Larvenentwicklung (3 Tage)

- geringe Größe (1 mm)
- die komplette Zellentwicklung ist bekannt
- konstante Zellzahl (= Eutelie)
- große Zahl von Nachkommen
- vollständige Transparenz in jeder Phase des Lebens
- das komplette Genom ist bekannt: 100 Mb (Megabase) - das sind bis heute 19.735 Gene
- etwa 40 % der Gene, die mit menschlichen Krankheiten assoziiert sind, haben homologe Gene im *C. elegans* Genom
- preisgünstige Kultivierung
- einfache Laborhaltung

[Coghlan et al., 2006; Corsi, 2006; Hope, 1999; Riddle et al., 1997; Strange, 2006; Wood, 1988]

Sydney Brenner erhielt 2002 den Nobelpreis für Medizin oder Physiologie für die Entdeckungen betreffend: "genetische Regulierung der Organentwicklung und des programmierten Zelltods".¹

2.2 RNA Interferenz allgemein

RNA Interferenz (RNAi) ist eine Form von Gen-Silencing, die durch doppelsträngige RNA (dsRNA) induziert wird und diese in short interfering RNAs (siRNA) abbaut. Der RNAi Mechanismus funktioniert systemisch und ist auch vererbbar (über mehrere Generationen) in *C. elegans* [Grishok, 2005b]. RNA Interferenz (RNAi) wurde zuerst in *C. elegans* entdeckt [Wang und Barr, 2005], wofür Andrew Z. Fire und Craig C. Mello den Nobelpreis in Physiologie oder Medizin im Jahre 2006 erhielten.²

Der grundlegende RNAi Prozess lässt sich in drei Schritte unterteilen:

1. Eine lange doppelsträngige RNA (dsRNA) wird in die Zelle eingebracht.
In der Zelle wird diese in kleine doppelsträngige RNA Fragmente mittels

¹ http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2002/press.html [6.08.2012].

² http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2006/ [17.08.2012].

eines Ribonuklease III Enzyms (RNaseIII) geschnitten, welches als Dicer bekannt ist.

2. Diese Fragmente werden aufgetrennt in einzelsträngige RNA (single-stranded RNA, ssRNA). Ein Strang, auch Leitstrang genannt, wird in den Protein-Komplex namens RISC (RNA-induced silencing complex) aufgenommen.
3. Die im RISC Komplex gebundene ssRNA bindet an einen komplementären Strang der Ziel-RNA und leitet dadurch den Abbau dieser spezifischen RNA ein.

[Siomi und Siomi, 2009]

Es gibt vier Methoden, um die doppelsträngige RNA (dsRNA) in den Organismus von *C. elegans* einzubringen:

1. Injektion der dsRNA in eine Körperregion (z.B. in die Gonaden oder in Körperhöhlen) von *C. elegans*
2. Füttern der Würmer mit Bakterien, welche dsRNA produzieren (entwickelt von Timmons und Fire) [Timmons und Fire, 1998]
3. Inkubieren der Würmer in dsRNA (entwickelt von Tabara und Mello)
4. *in vivo* Expression von vererbaren Inverted-Repeat (IR)-Genen (eine *in vivo* Produktion von dsRNA, die Transgene codiert)

[Grishok, 2005b; Wang und Barr, 2005]

In der hier beschriebenen Untersuchung wird ausschließlich mit der 2. Methode gearbeitet, daher wird nur auf diese detaillierter eingegangen.

2.2.1 RNAi bei *C. elegans* durch Verfüttern dsRNA-produzierender Bakterien

C. elegans ernährt sich von Bakterien, die sie in den Rachen aufnehmen, mechanisch zerkleinern und anschließend deren Nährstoffe im Darm absorbieren. Lisa Timmons und Andrew Fire fanden heraus, dass *E. coli* Bakterien dsRNA produzieren können und dass diese, wenn sie von den Nematodenlarven gefressen werden, bestimmte Auswirkungen übertragen können [Timmons und Fire, 1998].

Um die Expression einzelner Gene mit Hilfe von RNAi zu reduzieren werden Bakterien benötigt, die RNase III defizient sind. RNase III ist ein Enzym, das normalerweise dsRNAs in der Bakterienzelle abbaut. Der *E. coli* Mutantenstamm HT115(DE) hat eine RNase III Defizienz [Timmons et al., 2001].

Eine Teilsequenz des Zielgens wird mit Hilfe einer PCR vervielfältigt. Dabei werden bestimmte Primer verwendet, die eine spezifische Sequenz enthalten, an der ein Restriktionsenzym ansetzen kann. Dieses mit den entsprechenden Endonukleasen verdaute PCR-Fragment wird in die Multiklonierungsstelle des Vektors L4440 (siehe Abbildung 4) ligiert. Die Multiklonierungsstelle, die die Ziel-DNA enthält, ist flankiert von zwei T7-Polymerase-Bindungsstellen. Der Vektor L4440 wird in den *E. coli* Stamm HT115 transfiziert. HT115 besitzt ein zweites Plasmid, welches, induziert durch IPTG, eine T7-Polymerase exprimiert, die wiederum an den Vektor L4440 binden kann und dadurch die Produktion der dsRNA bewirkt [Corsi, 2006; Timmons et al., 2001]. Für jedes *C. elegans* Gen, dessen Expression reduziert werden soll, muss ein eigenes Plasmid mit der jeweiligen Ziel-DNA in *E. coli* transfiziert werden [Timmons und Fire, 1998].

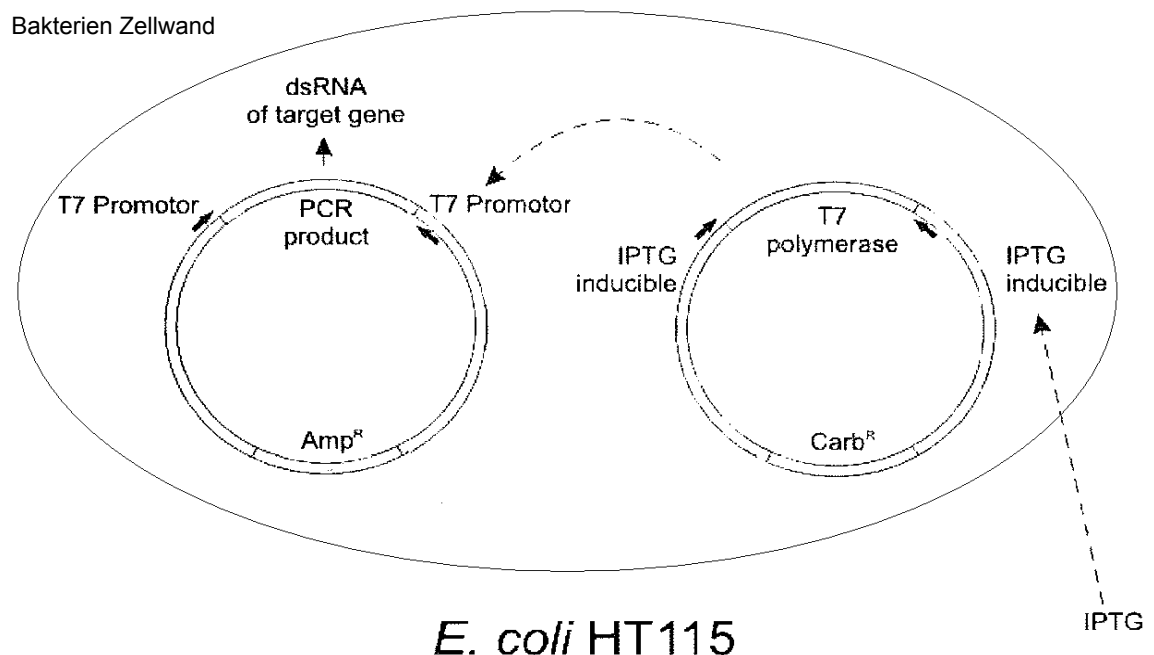


Abbildung 4: Prinzip der Ziel dsRNA Herstellung im *E. coli* Plasmid
(Zur Verfügung gestellt von Benner, Jacqueline)

Die HT115 *E. coli* Bakterien mit dem gewünschten Plasmid, welches ein bestimmtes Gen stilllegt (dsRNA), werden von RNAi sensitiven *C. elegans* Würmern (NL2099) gefressen. RNAi sensitive Würmer haben einen Knockout im Gen *rff-3*. *Rrf-3* kodiert eines von vier (*ego-1*, *rff-1*, *rff-2*, *rff-3*) RNA-directed RNA Polymerasen (RdRP) und ein Stamm mit diesem Genknockout weist eine größere Empfindlichkeit gegenüber RNAi auf, besitzt jedoch keine morphologischen Defekte [Simmer et al., 2002; Simmer et al., 2003].

Nachdem *C. elegans* die entsprechende dsRNA gefressen hat, wird die dsRNA intestinal durch ein transmembranes Transportprotein *SID-1* in die Zelle aufgenommen (siehe Abbildung 5). Im Zytoplasma wird die dsRNA vom Dicer (*DCR-1*) in 21 bis 23 nukleotide (nt) siRNAs geschnitten. Der Dicer ist ein RNase III Enzym und besteht aus einem Komplex von RDE-4, RDE-1 und DRH-1. Die entstehenden siRNAs binden an RDE-1, welches ein Argonaut Protein ist. Die Helicase trennt die doppelsträngige siRNA in Sense siRNA und Antisense siRNA auf, damit sie nur mehr einsträngig ist und somit an den RISC-Komplex gebunden werden kann. Es wird vermutet, dass RDE-2 und MUT-7 beim Zusammenführen und Binden von der gewünschten Ziel-mRNA und Antisense siRNA zum RISC beteiligt sind. Dieser RISC-Komplex fügt den Antisense Strang der siRNA zur gewünschten Ziel-mRNA hinzu, um diese abzubauen [Grishok, 2005a; Schepers, 2005; Timmons und Fire, 1998; Wang und Barr, 2005].

Antisense siRNA dient als Primer für RdRp (RNA-dependent RNA polymerase) - ein Enzym, um die Ziel-mRNA als Template zu verwenden, damit mehrere Antisense siRNAs entstehen. Dadurch akkumulieren die Antisense siRNAs und die einsträngigen siRNAs, im Gegensatz zu den Sense siRNAs, wodurch die gewünschte Ziel-mRNA in der Zelle abgebaut wird [Grishok, 2005a; Schepers, 2005; Timmons und Fire, 1998; Wang und Barr, 2005].

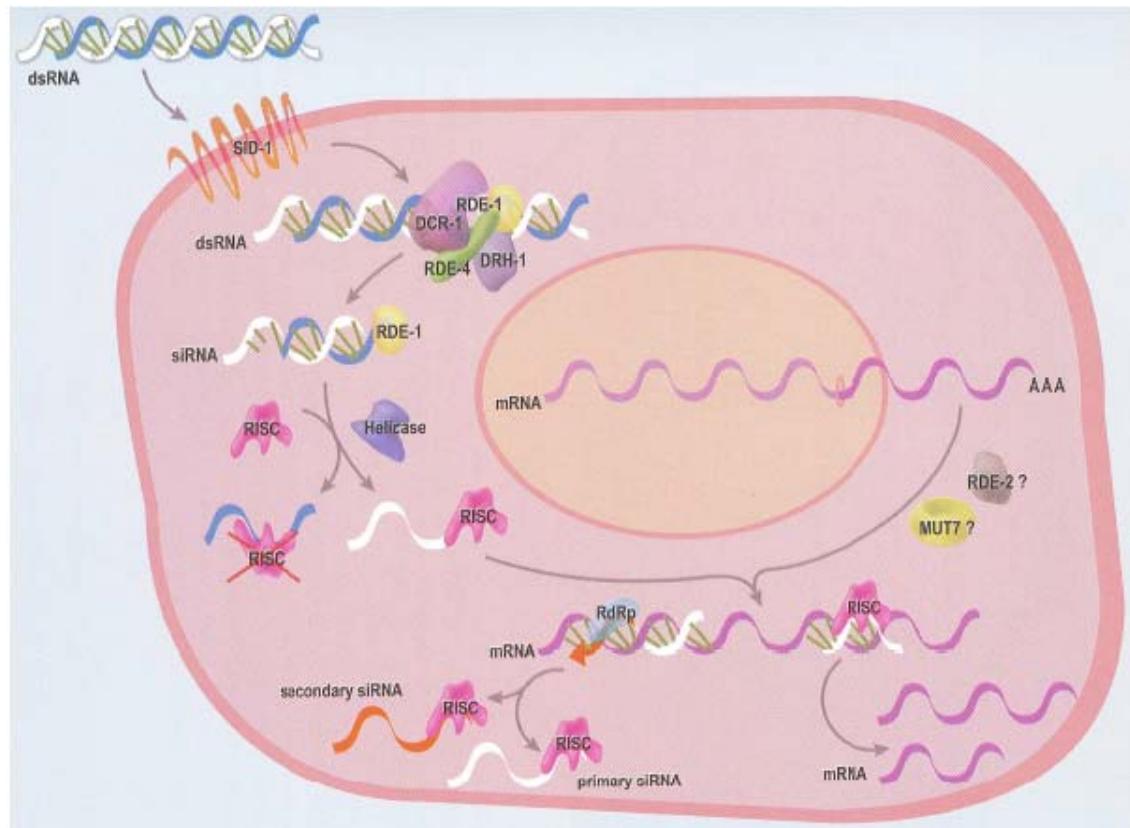


Abbildung 5: RNAi Mechanismus in *C. elegans*

Ein Modell des RNAi Mechanismus nach der Aufnahme der dsRNA in die Zelle von *C. elegans*. siRNA ist weiß; Antisense siRNA ist orange und Sense siRNA ist blau dargestellt [Grishok, 2005a].

2.3 Folsäure und Folat

Folsäure (lateinisch *folium* = Blatt) wurde 1931 entdeckt, aber erst 1945 konnte es erstmals aus Spinatblättern isoliert werden [Lucock, 2000]. Die Grundstruktur der Folsäure (siehe Abbildung 6) besteht aus einem stickstoffhaltigen Pteridinring und para-Aminobezoensäure. An deren Carboxylende unterscheidet man je nach Anzahl der Glutamatreste Pteroylmonoglutamat (Folsäure) oder Pteroylpolyglutamate (Folate) [Bässler et al., 2002].

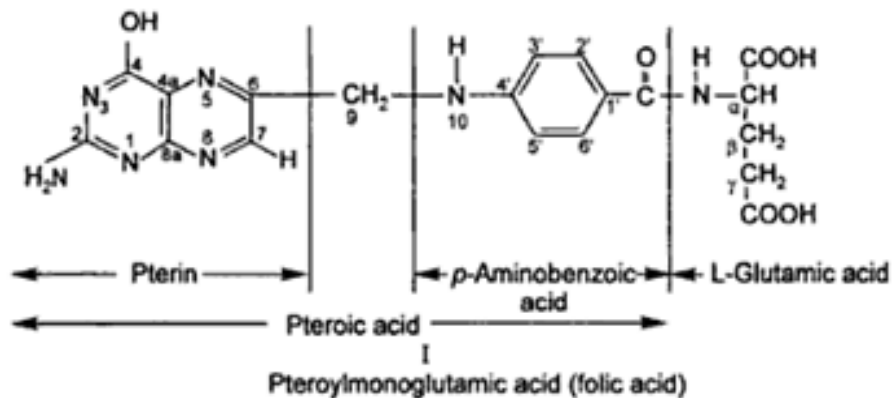


Abbildung 6: Strukturformel von Folsäure (Pteroylmonoglutamat)
[Ball, 1998]

Folsäure ist ein wasserlösliches B-Vitamin (manchmal auch als Vitamin B₉ bezeichnet) und ist die synthetische und stabile Form der natürlich vorkommenden Folate in Lebensmitteln [Taparia et al., 2007]. Es handelt sich um ein essentielles Vitamin, welches der menschliche Organismus nicht selbst synthetisieren kann. Daher muss auf die tägliche Aufnahme von natürlichen folsäurereichen Lebensmitteln (Folate) wie grünes Blattgemüse, Niere, Leber, Hefeextrakte, Zitrusfrüchte oder durch Supplemente (Folsäure) geachtet werden. Folsäuremangel wird mit verschiedenen menschlichen Erkrankungen in Zusammenhang gebracht wie beispielsweise Arteriosklerose, Neuralrohrdefekten, megaloblastäre Anämie, Alzheimer, Down-Syndrom, Präeklampsie und verschiedene Krebsarten [Bailey und Gregory III, 1999; Lucock, 2000]. Ausreichende Folataufnahme ist wichtig, da Folsäure für die Zellteilung, die Methionin Regeneration, die Synthese von Purinen und Pyrimidinen, sowie für die Übertragung von C₁-Körpern erforderlich ist [Bailey und Gregory III, 1999].

2.3.1 Folsäuremetabolismus

Das natürlich aufgenommene Folat (Polyglutamat) muss zur Resorption durch eine γ -Glutamyl-Carboxypeptidase im Bürstensaum der Mucosazellen des Duodenums und des oberen Jejunums zu Monoglutamat hydrolysiert werden,

da nur Monoglutamate effektiv in die Zellen transportiert werden können [Stover, 2004].

Es existieren drei Mechanismen für Folsäure, um in die Zelle zu gelangen:

1. Es gibt zwei Folat-Rezeptoren ($FR\alpha$ und $FR\beta$), die sich in der Zellmembran (apical) befinden und den Folat-Transport über rezeptorvermittelte Endozytose bei neutralem bis leicht saurem pH-Wert steuern.
2. Der Reduced Folat Carrier (RFC; offizielles Gensymbol: SLC19A1) ist ein Folat-Transportsystem in der Zelle und spielt eine wichtige Rolle bei Zellwachstum und Zellentwicklung.
3. Der Proton-Coupled Folat-Transporter (PCFT; SLC46A1) ist für die Absorption von Folat bei niedrigem pH-Wert verantwortlich und ein Großteil der Folataufnahme findet intestinal durch PCFT statt.

[Austin et al., 2010; Zhao et al., 2009]

In der Zelle von *C. elegans* wird Folsäure (siehe Abbildung 7) durch die Dihydrofolatreduktase (DHFR-1) zu Dihydrofolat (DHF) reduziert, welches weiter reduziert wird zu Tetrahydrofolat (THF). 5-Methyltetrahydrofolsäure (5-methyl-THF) wird durch die Reduktion von 5,10-Methylen-Tetrahydrofolsäure (5,10-methylene-THF) endogen gebildet. 5,10-methylene-THF wird durch eine irreversible Reaktion mittels der Methylene-THF-Reduktase (MTHFR) zu 5-methyl-THF reduziert. Tetrahydrofolat (THF) wird unter Verwendung von 5-methyl-THF aus der Methioninsynthese (METR-1) und der 10-formal-THF aus der Purinsynthese generiert [Zhao et al., 2009].

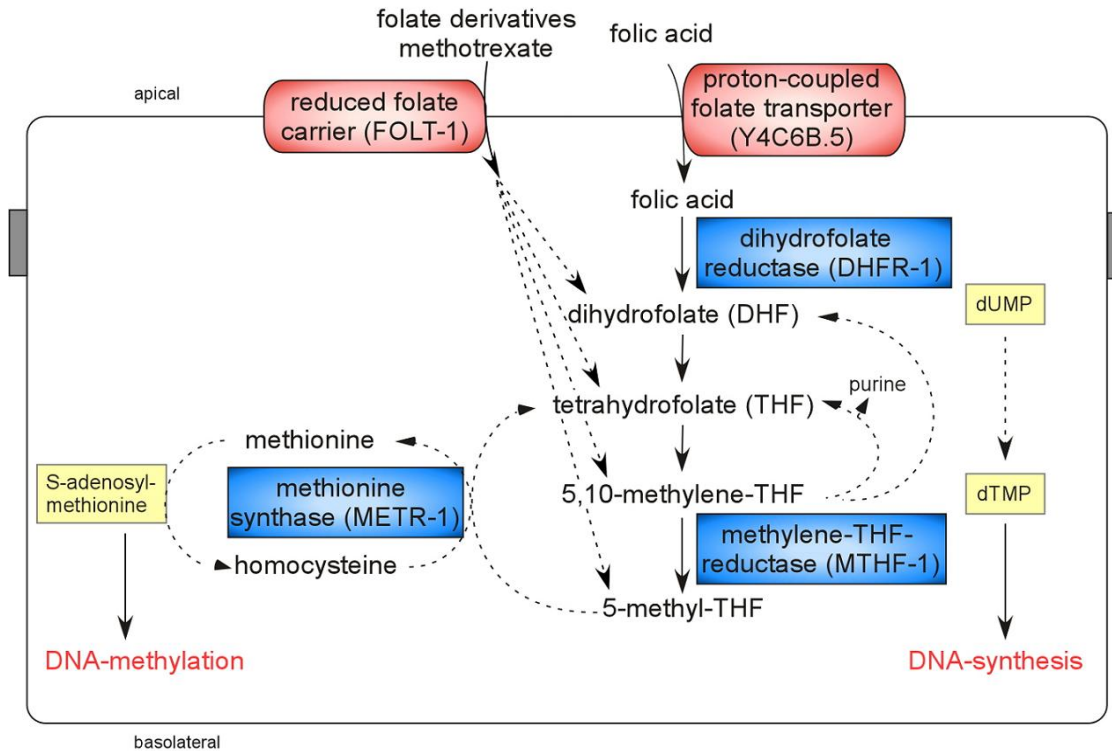


Abbildung 7: Folsäuremetabolismus in *C. elegans*

dUMP = Desoxyuridinmonophosphat; dTMP = Desoxythymidinmonophosphat
 (Zur Verfügung gestellt von Benner, Jacqueline)

2.3.2 Folsäuremetabolismus bei *C. elegans*

C. elegans besitzt drei Gene, die homolog zum humanen Reduced Folate Carrier (RFC) exprimieren: *fol-1*, *fol-2* und *fol-3*.

FOLT-1 (C6H2.4) ist ein Folat-Transporter und zu den menschlichen SLC19A1, SLC19A2 (Mutation führt zu einer Thiamin-responsive megaloblastären Anämie) und SLC19A3 (Mutation führt zu einer Biotin-responsive Basalganglien Krankheit - BBGD) ortholog. Nur für FOLT-1 wurde bisher eine Aktivität als Folat-Transporter nachgewiesen. Es besitzt eine 40%ige Übereinstimmung mit dem menschlichen RFC. *C. elegans* mit einem Knockout des *fol-1* Gens zeigen eine deutlich gesenkte Folataufnahme, welche auch durch eine Folatsupplementation nicht erhöht werden kann. *Folt-1* Mutanten sind träge und steril, was darauf hindeuten könnte, dass *fol-1* für die Fortbewegung und die

Fortpflanzungsfähigkeit erforderlich ist [Austin et al., 2010; Balamurugan et al., 2007].¹

FOLT-2 (F37B4.7) und **FOLT-3** (C50E3.16) sind ebenso wie FOLT-1 mit den menschlichen SLC19A1, SLC19A2 und SLC19A3 ortholog. Jedoch konnte für die Homologie dieser beiden Gene bisher keine Folat-Transportfunktion nachgewiesen werden. Ihre Bedeutung ist somit noch weitgehend ungeklärt [Balamurugan et al., 2007].²³

Mthf-1 (C06A8.1) kodiert ein Protein, welches mit der menschlichen Methylentetrahydrofolatreduktase (MTHFR) ortholog ist (basierend auf Sequenzvergleich). MTHFR ist bei der Umwandlung von 5,10-methylene-THF zu 5-methyl-THF beteiligt. Mutationen im MTHFR sind mit Homocystinurie, Anenzephalie und Spina bifida assoziiert.⁴

Mettr-1 (R03D7.1) ist zu dem menschlichen Gen Methioninsynthase (MTR oder MS) ortholog.⁵

Y4C6B.5 ist ein Gen in *C. elegans*, welches auf Proteinebene zum menschlichen Proton-Coupled Folat-Transporter (PCFT; SLC46A1) homolog sein könnte.⁶

Für **DHFR-1** (C36B1.7) gibt es noch keine Studien bei *C. elegans*. Es besteht die Annahme, dass es sich dabei um eine Homologie der Dihydrofolatreduktase (DHFR-1) handelt.⁷

¹ http://www.wormbase.org/species/c_elegans/gene/WBGene00007388#04-9e-10 [22.08.2012].

² http://www.wormbase.org/species/c_elegans/gene/WBGene00018138#04-9e-10 [22.08.2012].

³ http://www.wormbase.org/species/c_elegans/gene/WBGene00044738#04-9e-10 [22.08.2012].

⁴ http://www.wormbase.org/species/c_elegans/gene/WBGene00015512#04-9e-10 [22.08.2012].

⁵ http://www.wormbase.org/species/c_elegans/gene/WBGene00010988#04-9e-10 [22.08.2012].

⁶ http://www.wormbase.org/species/c_elegans/protein/WP:CE31741#04--10 [22.08.2012].

⁷ http://www.wormbase.org/species/c_elegans/gene/WBGene00007974#04-9e-10 [22.08.2012].

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Materialien

3.1.1 Instrumente

Name	Beschreibung	Firma
Autoklav	Tisch Autoklav 1h 121°C	CERTOclav
Brutschrank	Kühlbrutschrank, +20°C; J. P. Selectra, s.a.	Ehret
Bottle Top Filter	Steril Filter	Nalgene
Easypet® Pipettierhilfe	Pipettierhilfe für Auslaufpipette	Eppendorf AG
Heizblock	Block heater SBH200D	Stuart
Inkubator	Vakuumtrockenschrank VTS70, +37°C	Ehret
Magnetrührer	RCT basic, beheizbar	IKA Werke GmbH u. Co. KG
Mikroskop	M3C Switzerland	Wild Heerbrugg
PicoDrop	PICOPET01	Biozym
PCR	7300 Real Time PCR System	Applied Biosystems
pH-Meter	Seven Easy TM, pH-Meter S20 mit Glaselektrode	Mettler Toledo GmbH
Pipetten	Eppendorf Pipetten (10 µl, 100 µl, 200 µl, 1.000 µl)	Eppendorf AG
Tiefkühlschrank	-20°C	Privileg
Kühlraum	+4°C	Europa Dagard
Sterilarbeitsbank	Laminar Flow ESCO	Ehret
Eiswürfelmaschine	AF 10 ASB 0600	Scotsman
Vortex	MS 1 Minishaker	IKA Werke GmbH u. Co. KG
Wasserbad	GFL-Inkubations- /Inaktivierungsbad 1002	Gesellschaft für Labortechnik GmbH
Wippschüttler	PMR-30	Guant
Zentrifuge	Jouan BR4i multifunction centrifuge	Thermo Electron Corporation Key Write DTM

Tabelle 1: Liste der verwendeten Instrumente

3.1.2 Chemikalien

Name	Firma
Agar	Roth
Ammoniumacetat	Roth
Ampicillin Natriumsalz	Roth
Bacto Yeast Extract	Fluka Analytical
Buffer RLT	Qiagen
Buffer RPE	Qiagen
Buffer RW1	Qiagen
CaCl ₂	Roth
Carbenicillin Dinatriumsalz	Roth
Cholesterin	Roth
DEPC H ₂ O	Ambion INC.
dH ₂ O	WEK intern
Ethanol (70%)	Austr. Alco Österreich
Ethanol (96% Absolut)	Lactan
Ethanol (100%)	Austr. Alco Österreich
gDNA Wipeout-Buffer 7x	Qiagen
Glukose	Roth
Glycerin	Roth
IPTG	Roth
K ₂ HPO ₄	Roth
KH ₂ PO ₄	Roth
KOH	Roth
LB-Broth	Roth
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich
Methanol	Roth
MgSO ₄	Roth
Na ₂ HPO ₄	Roth
NaCl	Roth
NaOCl	Roth
NH ₄ Cl	Roth
Nystatin	Roth
Pepton	Roth
RLT-Buffer	Qiagen

RNase-free water	Qiagen
RPE-Buffer	Qiagen
RT-Buffer 5x	Qiagen
RT Primer Mix	Qiagen
RT Quantiscript Reverse Transcriptase	Qiagen
RW1-Buffer	Qiagen
TaqMan® Genotyping Master Mix	Applied Biosystem

Tabelle 2: Liste der verwendeten Chemikalien

3.1.3 Verbrauchsmaterialien

Name	Beschreibung	Firma
Auslaufpipetten	10 ml, 25 ml, 50 ml, steril	Sarstedt
Autoklavierpapier	Autoklavier Temp. erreicht wurde	Lactan
Bechergläser	Verschiedene Größen von 15-500 ml	Roth
Kulturplatte	Cellstar Suspension Kulturplatte 12 Well	Greiner Bio-One
Kryoröhrchen	Mit Außengewinde 2 ml	Roth
Einmal Impfösen	Impfschlingen 10 µl	Sarstedt
Einmal Mundschutz		B. Braun
Einmalhandschuhe	Latex, puderfrei	Roth
Falcon	15 und 50 ml, steril	Sarstedt
Flaschen	50-1000 ml	Roth
Gestelle	Diverse Arten	Lactan
Glass Beads	Ø 325-600 µm	Sigma-Aldrich
Magnetstäbchen	PTFE-ummantelt	Roth
Pasteurpipetten	150 mm Kalksoda-Klarglas	Roth
Petrischalen	3 cm Durchmesser	Sarstedt
Petrischalen	9 cm Durchmesser	Greiner Bio-One
pH Indikatorpapier	pH 1-14 mit Farbskala	Merck
qPCR Stripes	Tube Stripes 0,2 ml	Peqlab
Reaktionsgefäß	1,5 ml mit angehängtem Deckel	Greiner Bio-One
RNeasy Mini Spin Column	1,5 ml u. 2 ml, RNase-frei	Qiagen
Sekuroka®-Entsorgungsbeutel	Biohazard, PP40 µm	Roth
Skalpell	Chirurgisches Einmal-Skalpell	B. Braun
Spiritusbrenner	Kalk-Soda Glas mit EtOH 70% vergällt	Duran Group
Spitzen	Verschiedene Volumina für Pipetten	Greiner Bio-One
Desinfektionsmittel	Beschreibung	Firma
Aceton	≥ 99,5% zur Synthese	Roth
Bacillol	Desinfektion von Oberflächen	Lactan
EtOH 70% vergällt	≥ 70% mit ca. 1% MEK	Roth
RNaseZap	Desinfektion von Oberflächen	Applied Biosystem

Tabelle 3: Verbrauchsmaterialien

3.1.4 Kits und Primer

Name	Methode	Firma
RNeasy®MiniKit (50)	RNA Extraktion	Qiagen
Lagerung: Raumtemperatur		
TaqMan® Genotyping Master Mix	PCR	Applied Biosystems
Lagerung: +4°C		
QuantiTect® Reverse Transcription Kit	cDNA Transkription	Qiagen
Lagerung: -20°C		

Tabelle 4: Kits

Cosmid Nummer	Genname	Kontroll- / Zielgen	Funktion	Firma / ID Bestellnummer
C06A8.1	<i>mthf-1</i>	Zielgen	Methylentetrahydrofolat-Reduktase (NADPH) Aktivität	Applied Biosystems / Ce02406738_g1
C06H2.4	<i>folt-1</i>	Zielgen	Reduced Folat Carrier	Applied Biosystems / Ce02481435_g1
C36B1.7	<i>dhfr-1</i>	Zielgen	Dihydrofolatreduktase	Applied Biosystems / Ce02411259_g1
C54G10.3	<i>pmp-3</i>	Kontrollgen	Acyl-CoA Transporter	Applied Biosystems / Ce02485188_m1
R03D7.1	<i>metr-1</i>	Zielgen	Homocystein S-methyltransferase Aktivität, Methionin-Synthase Aktivität; Bindet an: Cobalamin, Eisenionen, Zinkionen	Applied Biosystems / Ce02467252_g1
Y45F10.D4	---	Kontrollgen	Eisen bindendes Protein	Applied Biosystems / Ce02467252_g1
Y4C6B.5	---	Zielgen	Vermuteter Proton-Coupled Folat-Transporter	Applied Biosystems / Ce02463760_g1
Lagerung: -20°C				

Tabelle 5: Primer

3.1.5 *E. coli* Bakterien und Plasmide

Bakterien	Genotyp	Firma	
OP50	<i>ura⁻</i>	CGC	
HT115(DE3)	<i>F⁻, mcrA, mcrB, IN(rrnD-rrnE)1, lambda⁻, rnc14::Tn10(DE3 lysogen:lacUV5 promoter-T7 polymerase, RNase III minus</i>	CGC	
Lagerung: -20°C			
Plasmid ID	Beeinflusstes Gen	Beschreibung/Katalognummer	Firma
C06A8.1	<i>mthf-1</i>	Ortholog zu MTHFR /PCE1182-9371494	Open Biosystems
C06H2.4	<i>folr-1</i>	Ortholog zu SLC19A1, SLC19A2 und SLC19A3 (RFC) /OCE1182-7245668	Open Biosystems
C36B1.7	<i>dhfr-1</i>	Ortholog zu DHFR /OCE1182-7247300	Open Biosystems
R03D7.1	<i>metr-1</i>	Ortholog zu MTR /OCE1182-7242696	Open Biosystems
Y4C6B.5	Y4C6B.5	Ortholog zur SLC46A1 (PCFT) /OCE1182-7241061	Open Biosystems
Leervektor	Kontrolle	L4440 Plasmid	Open Biosystems
Lagerung: -20°C			

Tabelle 6: Bakterien und HT115(DE) Plasmide

3.1.5.1 Einfriermedium der Bakterien

Abend:
10 ml DYT-Medium in ein 50 ml Falcon geben
OP50 Bakterien mittels Impföse überführen
Bei +37°C inkubieren
Früh:
2,5 ml Kultur
2,5 ml Glycerin
Zusammenmischen und in Kryoröhrchen füllen
Lagerung: -20°C

Tabelle 7: Einfriermedium OP50 Bakterien

Abend:
10 ml LB-Medium in ein 50 ml Falcon geben
Pro ml LB-Medium 1 µl Ampicillin
RNAi Bakterien mittels Impföse überführen
Bei +37°C inkubieren
Früh:
5 ml LB-Medium
5 µl Ampicillin
100 µl aus dem inkubierten LB-Medium in ein 15 ml Falcon geben (1:50 Verdünnung)
4 h bei +37°C inkubieren
2,5 ml der 4 h inkubierten Kultur
2,5 ml Glycerin
Zusammenmischen und in Kryoröhrchen füllen
Lagerung: -20°C

Tabelle 8: Einfriermedium RNAi Bakterien

3.1.6 Nematoden

Name	Genotyp	Beschreibung	Firma
N2 var. Bristol	Wildtyp	Wildtyp	CGC
NL2099	rrf3(pk1426) II	Homozygot rrf-3 Deletionsallel; verstärkt Sensitivität zu RNAi	CGC
Lagerung: +20°C			

Tabelle 9: Nematoden

N2 var. Bristol ist einer von 65 Wildtypen von *C. elegans* und wird als Standard *C. elegans* im Labor verwendet [Kiontke und Sudhaus, 2006; Strange, 2006]. Die Generationsdauer beträgt drei Tage und die Nachkommengröße macht etwa 200 aus.¹

NL2099 ist einer von über 3.000 Knockout-Stämmen von *C. elegans* [Stiernagle, 2006]. 2002 wurde NL2099 von F. Simmer entwickelt. NL2099

¹ <http://www.cgc.cbs.umn.edu/strain.php?id=10570> [8.8.2012]

besitzt eine homozygote Deletion im Gen *rrf-3*, welches ihm eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber RNAi verschafft [Simmer et al., 2002].¹

3.1.7 Einfriermedium für *C. elegans*

60 ml Glycerin
20 ml 1 M NaCl
10 ml 1 M KH ₂ PO ₄ pH=6
110 ml dH ₂ O
1 h bei 121°C autoklavieren und anschließend
0,6 ml 0,1 M MgSO ₄
Lagerung: +4°C

Tabelle 10: Einfriermedium *C. elegans*

3.1.8 Nährmedien und Lösungen

3.1.8.1 NGM (Nematode Growth Medium)–Agar Herstellung

3 g NaCl
2,5 g Pepton
17 g Agar
Einwiegen (1 l Flasche) und auffüllen mit dH ₂ O auf 1 l und 1 h bei 121°C autoklavieren. Nach dem Autoklavieren stellt man den Agar in ein 50°C warmes Wasserbad und fügt folgende Chemikalien hinzu:
0,5 ml 1 M CaCl ₂
1 ml 1M MgSO ₄
25 ml Kaliumphosphatpuffer pH = 6.0
3 ml Nystatin
1 ml Cholesterin (0,5g/100ml)
Der fertige Agar wird im warmen, flüssigen Zustand in die Petrischalen (z.B. 9 cm) gegossen. Wenn der Agar in den Petrischalen fest geworden ist, werden diese luftdicht, kopfüber bei +4°C gelagert.
Lagerung: +4°C

Tabelle 11: NGM–Agar

¹ <http://www.cgc.cbs.umn.edu/strain.php?id=10766> [8.8.2012].

3.1.8.2 NGM–Agar für RNAi Herstellung

3 g NaCl
2,5 g Pepton
17 g Agar
Einwiegen (1 l Flasche) und auffüllen mit dH ₂ O auf 1 l und 1 h bei 121°C autoklavieren. Nach dem Autoklavieren stellt man den Agar in ein 50°C warmes Wasserbad und fügt folgende Chemikalien hinzu:
0,5 ml 1 M CaCl ₂
1 ml 1M MgSO ₄
25 ml Kaliumphosphatpuffer pH=6
3 ml Nystatin
1 ml Cholesterin (0,5g/100ml)
1 ml IPTG (1 M)
1 ml Carbenicillin
Der fertige Agar wird im warmen, flüssigen Zustand in die Petrischalen (z.B. 9 cm) gegossen. Wenn der Agar in den Petrischalen fest geworden ist, werden diese luftdicht, kopfüber bei +4°C gelagert.
Lagerung: +4°C

Tabelle 12: NGM–Agar RNAi

In allen Versuchen (Genexpression, Reproduktion und Lebensspanne) werden beide Wurmstämme (N2 und NL2099) auf NGM-Agar RNAi Platten (Kulturplatten und Petrischalen mit 3 cm und 9 cm Ø) gehalten.

3.1.8.3 Nystatin Herstellung

Lösung A:	115,62 g Ammoniumacetat einwiegen und auf 200 ml mit dH ₂ O auffüllen
Lösung B:	200 ml EtOH (96% Absolut)
4 g Nystatin in einer 500 ml Flasche abwechselnd Lösung A und B zugeben, bei gleichzeitiger Verwendung eines Magnetrührers bei 50°C. Nach vollständiger Lösung des Nystatins wird mittels eines Bottel Top Filters steril filtriert.	
Lagerung: -20°C	

Tabelle 13: Nystatin

3.1.8.4 Cholesterin Herstellung

0,5 g Cholesterin
In 100 ml EtOH (100%) gelöst
Lagerung: -20°C

Tabelle 14: Cholesterin

3.1.8.5 Kaliumphosphatpuffer Herstellung

108,6 g KH_2PO_4
35,28 g K_2HPO_4
Einwiegen und auf 1 l mit dH_2O auffüllen und 1 h bei 121°C autoklavieren
pH-Wert soll bei 6 liegen, kann mit KOH eingestellt werden
Lagerung: Raumtemperatur

Tabelle 15: Kaliumphosphatpuffer

3.1.8.6 MgSO_4 und CaCl_2 Herstellung

1 M MgSO_4	24,648 g MgSO_4
	Einwiegen und auf 100 ml mit dH_2O auffüllen
	Lagerung: Raumtemperatur
1 M CaCl_2	14,702 g CaCl_2
	Einwiegen und auf 100 ml mit dH_2O auffüllen
	Lagerung: Raumtemperatur

Tabelle 16: MgSO_4 und CaCl_2

3.1.8.7 IPTG Herstellung

2,382 g IPTG
In 10 ml dH_2O gelöst (1 M Stocklösung)
Lagerung: -20°C

Tabelle 17: IPTG

3.1.8.8 Carbenicillin Herstellung

0,5 g Carbenicillin
In 10 ml EtOH (50%) gelöst (50 mg/ml Carbenicillin) EtOH: 100% EtOH 1:2 verdünnt mit dH ₂ O
Lagerung: -20°C

Tabelle 18: Carbenicillin

3.1.8.9 Ampicillin Herstellung

0,5 g Ampicillin Natriumsalz
In 10 ml EtOH (50%) gelöst (100 mg/ml Ampicillin) EtOH: 100% EtOH 1:2 verdünnt mit dH ₂ O
Lagerung: -20°C

Tabelle 19: Ampicillin

3.1.8.10 DYT-Medium

16 g Pepton
10 g Bacto Yeast Extract
5 g NaCl
Einwiegen und auf 1 l mit dH ₂ O auffüllen und 1 h bei 121°C autoklavieren
Lagerung: +4°C

Tabelle 20: DYT-Medium

3.1.8.11 LB-Medium

20 g LB-Broth
Einwiegen und auf 1 l mit dH ₂ O auffüllen und 1 h bei 121°C autoklavieren
Lagerung: +4°C

Tabelle 21: LB-Medium

20 g LB-Broth
Einwiegen und auf 1 l mit dH ₂ O auffüllen und 1h bei 121°C autoklavieren
Pro ml LB-Medium ein µl Ampicillin hinzufügen
Lagerung: +4°C

Tabelle 22: LB-Medium für RNAi

3.1.8.12 M9-Puffer

6 g Na ₂ HPO ₄
5 g NaCl
3 g KH ₂ PO ₄
Einwiegen und auf 1 l mit dH ₂ O auffüllen und 1h bei 121°C autoklavieren
1 ml 1 M MgSO ₄
Lagerung: Raumtemperatur

Tabelle 23: M9-Puffer

3.1.8.13 Lösung zur Präparation der Eier

3 ml NaOCl
2 ml 5 M KOH
Auffüllen auf 25 ml mit dH ₂ O
Lagerung: +4°C

Tabelle 24: Bleichlösung

3.2 Methoden

3.2.1 Kultivierung der Bakterien

Die Bakterien dienen *C. elegans* als Nahrungsquelle. Der Bakterienstamm *E. coli* OP50 wird als Standardfutter für *C. elegans* verwendet, da dieser eine Uracildefizienz besitzt, was dazu führt, dass er nicht so schnell wächst und daher die Würmer nicht überwuchert. Beide Wurmstämme (N2 und NL2099) werden mit OP50 gefüttert, um den Fortbestand der Würmer zu gewährleisten.

Die RNAi-Bakterien, die die Expression einzelner Gene des Folsäuremetabolismus (*folT-1*, Y4C6B.5, *dhfr-1*, *mthf-1* und *metr-1*) in *C. elegans* verringern, werden für Experimente wie Genexpression, Reproduktion und Lebensspanne verwendet.

3.2.1.1 Herstellung der Übernachtskultur

Abend:
25 ml DYT-Medium in ein 50 ml Falcon geben
Eingefrorene OP50 Bakterien mittels Impföse überführen
Bei +37°C inkubieren
Früh:
herausnehmen
Lagerung: +4°C
Haltbarkeit: 1 Monat

Tabelle 25: Übernachtskultur der OP50 Bakterien

Abend:
10 ml LB-Medium in ein 50 ml Falcon geben
Pro ml LB-Medium 1 µl Ampicillin
RNAi Bakterien mittels Impföse überführen
Bei +37°C inkubieren
Früh:
25 ml LB-Medium in ein 50 ml Falcon geben
25 µl Ampicillin
0,5 ml aus dem inkubierten LB-Medium in ein 15 ml Falcon geben (1:50 Verdünnung)
4 h bei +37°C inkubieren
Lagerung: +4°C
Haltbarkeit: 6 Tage

Tabelle 26: Übernachtskultur der RNAi-Bakterien

Agar-Platten	Agar-Volumen	Bakterienvolumen
12 Well	3 ml	150 µl
3 cm Petrischale	4 ml	200 µl
9 cm Petrischale	~ 20 ml (per Hand gegossen)	~800 µl

Tabelle 27: Bakterienvolumen für unterschiedliche Agar-Platten

Die beimpften Agar-Platten werden leicht geschwenkt, damit die Bakterien gleichmäßig in der Petrischale verteilt sind und einen Tag bei Raumtemperatur stehengelassen, um anzuwachsen. Am nächsten Tag werden die Würmer auf die Platten gesetzt, oder sie werden kopfüber und luftdicht bei +4°C gelagert. Zu beachten ist, dass die OP50 Bakterien auf die NGM-Agar-Platten und die RNAi-Bakterien auf die NGM-Agar RNAi Platten aufgetragen werden.

3.2.2 Kultivierung von *C. elegans*

In diesem Kapitel wird die generelle Handhabung der Nematoden, N2 und NL2099, auf NGM-Agar-Platten erklärt, welche bei +20°C gehalten werden.

3.2.2.1 Umsetzungsmethoden von *C. elegans*

Die Fadenwürmer werden mehrmals in der Woche auf neue Agar-Platten, welche mit den gewünschten Bakterien einen Tag zuvor hergestellt wurden, umgesetzt. Durch das Umsetzen erreicht man, dass sich die Würmer schneller vermehren, um so eine hohe Anzahl an Wurmern für die weiteren Analysen zu erhalten. Weiters wird verhindert, dass die Platten durch bakterielle Verunreinigungen verschmutzen.

- Agar Methode

Mit einem Skalpell, welches durch Abflammen sterilisiert wurde, wird eine Agar-Platte, auf der sich viele Würmer befinden, in kleine Stücke zerteilt. Diese Teile werden mit der Oberfläche, worauf sich die Nematoden befinden, nach unten auf neue angeimpfte Platten gesetzt.

- Wurmpick Methode

Mit der Hilfe eines Wurmpicks werden einzelne Würmer von einer Platte auf neue angeimpfte Platten umgesetzt. Der Wurmpick besteht aus einer Pasteurpipette, in deren Pipettenhals ein Stück eines 2-3 cm langen Platindrahtes eingeführt wird. Um den Draht zu fixieren, wird die Spitze des Pipettenhalses, an der der Platindraht herausragt, zum Schmelzen gebracht. Das Ende des Drahtes wird mit einer Zange abgeflacht, um die Würmer leichter aufnehmen zu können. Vor und nach einer Wurmumsetzung wird der Draht durch Abflammen sterilisiert.

- Abwaschen mit Puffer

Von vollen Platten werden die Nematoden mit ca. 4 ml eines M9-Puffers abgespült und in ein 15 ml Falcon überführt, welches zentrifugiert (2.500 rpm, 2 min., 20°C) wird. Die Würmer werden so lange gewaschen bis der Überstand klar ist und die sauberen Würmer (Wurm pellet) zurückbleiben, welche mit einer Pipette tröpfchenweise auf neue angeimpfte Platten verteilt werden.

3.2.2.2 Einfrieren von *C. elegans*

Zum Einfrieren eignen sich am besten L1 Larven (nicht direkt nach einer Egg prep). Die Platten mit diesen Würmern werden mit einem M9-Puffer abgewaschen, 1:1 mit dem Einfriermedium vermischt und daraufhin schnell mithilfe einer Styroporbox langsam auf -20°C eingefroren. Bei Bedarf werden die eingefrorenen Würmer direkt auf angeimpfte Agar-Platten gesetzt.

3.2.2.3 Synchronisierung der Nematoden (Egg prep)

Die Synchronisierung einer gemischten Population wird angewandt, um bei Experimenten wie Genexpression, Reproduktion und Lebensspanne, zuverlässige und reproduzierbare Ergebnisse eines Larvenstadiums zu erhalten.

Agar-Platten mit gemischter Wurmpopulation werden mit M9-Puffer, in 15 ml Falcons, abgespült. Anschließend werden sie 2 min. bei 2.500 rpm zentrifugiert und der Überstand so lange verworfen, bis er klar ist. Nach dem letzten Waschgang wird das Falcon, in dem sich die Nematoden befinden, mit 3 ml M9-Puffer aufgefüllt. Anschließend kommen 4 ml Bleichlösung hinzu und das Falcon wird 5 min. intensiv geschüttelt. Nach Ablauf dieser Zeit wird unter dem Mikroskop überprüft, ob alle Würmer abgestorben sind. Falls nicht, wird minutenweise nachkontrolliert. Nach erfolgreicher Kontrolle wird das Falcon bei 2.500 rpm 2 min. lang zentrifugiert und der Überstand verworfen. Um die Bleichlösung wieder zu entfernen, werden die toten Würmer 4-5 Mal mit M9-Puffer gewaschen. Nach dem letzten Waschgang wird das Falcon mit 6 ml M9-Puffer aufgefüllt und auf den Wippschüttler gelegt, der sich im Brutschrank befindet. Durch die Bleichlösung und das Zentrifugieren werden die Nematoden getötet und die Zellen werden aufgebrochen, damit die Eier freigesetzt werden. Die Bleichlösung sollte nicht länger als 10 min. in den Falcons verweilen, da sie sonst auch die Eier zerstört. Am nächsten Tag werden die Falcons wieder 2 min. bei 2.500 rpm zentrifugiert und sowohl die geschlüpften L1 Larven, als auch die toten Würmer werden auf die am vorherigen Tag mit den entsprechenden RNAi Bakterien angeimpften NGM-Agar RNAi Platten gegeben, bis sie zu L4 Larven herangewachsen sind. In diesem Stadium werden sie für die folgenden Versuche verwendet: Genexpression, Reproduktion und Lebensspanne.

3.2.2.4 Untersuchung der Anzahl der Nachkommen bei *C. elegans* (Brood size)

Im Reproduktionsversuch wird untersucht, welche Auswirkung der RNAi Genknockdown auf die Leistungsfähigkeit der Nematoden N2 und NL2099 hat, Nachkommen zu produzieren. Für diesen Versuch werden 36 Würmer, die nach der Synchronisierung das L4 Stadium erreicht haben, auf 12-Well Kulturplatten mit den entsprechenden Bakterien platziert. Nach drei Tagen werden die 36 Würmer wieder auf neue 12-Well Kulturplatten gesetzt. Die Nachkommenschaft wird von jedem einzelnen Wurm, ab dem L4 Stadium bis zum 7. Tag,

ausgezählt. Jeder Versuch wird im biologischen Replikat angesetzt und mit dem Programm GraphPad Prism 5 mit Hilfe eines ungepaarten *t*-Tests ausgewertet.¹

3.2.2.5 Untersuchung der Lebensspanne bei *C. elegans* (Life span)

Um die Auswirkung des entsprechenden RNAi Knockdowns auf die Lebensdauer des Wildtyps, als auch der NL2099 Würmer zu untersuchen, werden jeweils 40-45 L4 Larven auf drei 3 cm Petrischalen mit den entsprechenden Bakterien gegeben. Jeden Tag werden die lebenden Würmer auf neue Platten umgesetzt und die lebenden und toten Würmer gezählt. Jeder Versuch wird im biologischen Replikat angesetzt und mit Hilfe von GraphPad Prism 5 ausgewertet. Die graphische Darstellung erfolgt über die Kaplan-Meier Überlebenskurve, die mittlere Lebensdauer wird mit $\pm$ SEM (standard error of the mean, Standardabweichung der Mittelwerte) angegeben und die statistische Auswertung über einen Log-rank (Mantel-Cox) Test.

3.2.3 Messung der Genexpression

In diesem Versuch wird mittels realtime RT-PCR überprüft, welchen Einfluss der Knockdown von einzelnen Genen im Folsäuremetabolismus (*fol-1*, *Y4C6B.5*, *dhfr-1*, *mthf-1* und *metr-1*) auf die Expression der jeweils anderen Gene, sowohl beim Wildtyp, als auch beim RNAi sensitiven Stamm NL2099, hat.

3.2.3.1 RNA Extraktion

Um mit der RNA Extraktion zu beginnen, braucht man 200 μ l von eingefrorenen, synchronisierten L4 Wurmern mit dem gewünschten Genknockdown.

Für die Extraktion wird der RNeasy[®]MiniKit (50) verwendet, die gesamte Durchführung erfolgt bei Raumtemperatur. Zu dem 200 μ l Wurmpellet gibt man

¹ Download GraphPad Prism 5: <http://www.graphpad.com/demos/>

1.000 µl einer Mischung, die aus 12 µl 2-Mercaptoethanol und 1,2 ml RLT-Buffer (1:100 Verdünnung) besteht. Diese Probe wird gut gemischt und 600 µl davon werden in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß gefüllt. In jedes Gefäß werden Glass Beads hinzugefügt und anschließend 5 Mal bei 1,5 min. gevortext. Zwischen dem 5-maligen Vortexen werden die Proben auf Eis gekühlt. Das Reaktionsgefäß wird im Deckel und im Boden mit einer sterilen Nadel durchstoßen und anschließend auf ein 15 ml Falcon platziert. Danach wird 1,5 min. lang bei 2.500 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert. 100 µl der Mischung (2-Mercaptoethanol und RLT-Puffer, 1:100 Verdünnung) werden in jedem Reaktionsgefäß hinzugefügt, um die Glass Beads zu waschen. Daraufhin wird wieder zentrifugiert. Danach werden die 1,5 ml Reaktionsgefäße verworfen und die Falcons mit Höchstgeschwindigkeit 3 min. lang zentrifugiert. Die Überstände (ca. 700 µl) werden in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß gemeinsam mit 700 µl von 70%-igem Ethanol gegeben. Von 1,4 ml Gemisch werden 700 µl in ein RNeasy Mini Spin Column gefüllt und 1,5 min. mit Höchstgeschwindigkeit zentrifugiert. Die RNA bindet an die Säule, der Durchfluss wird verworfen und mit den restlichen 700 µl wird der Prozess wiederholt. Zum Waschen anschließend 700 µl RW1-Buffer zugeben und 1 min. mit Höchstgeschwindigkeit zentrifugieren und den Durchfluss verwerfen. Dann zwei Mal 500 µl RPE-Buffer zugeben und wiederum 1 min. mit Höchstgeschwindigkeit zentrifugieren und den Durchfluss verwerfen. Um den Filter zu trocknen, wird noch einmal 1 min. mit Höchstgeschwindigkeit zentrifugiert. Danach wird der Teil des Column, auf dem der Filter angebracht ist, auf ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß platziert. 30 µl von RNase-freiem Wasser werden direkt auf die Filtermembran aufgetragen und 1 min. stehengelassen. Der Durchfluss, der nach der 1-minütigen Zentrifugation mit Höchstgeschwindigkeit entsteht, ist die gewünschte RNA.

3.2.3.2 Reverse Transkription der RNA

Die isolierte RNA wird sofort weiterverarbeitet und zu cDNA umgeschrieben, da diese bei der Lagerung auf -20°C besser haltbar ist.

Von der RNA wird 1 µg für die Reverse Transkription zu cDNA benötigt. Die Konzentration der RNA wird mehrmals am PicoDrop gemessen (Min.: 100 ng/µl, Max.: 500 ng/µl). Bei sehr unterschiedlichen RNA-Konzentrationen werden diese durch Verdünnung mit RNase-freiem Wasser angeglichen.

In den nächsten 5 Schritten folgen die Reverse Transkription und die Elimination von gDNA bis zur fertigen cDNA:

- Schritt 1: gDNA Elimination auf Eis ansetzen

Reagenzien	Volumen
gDNA Wipeout-Buffer 7x	2 µl
Template RNA (berechnet am PicoDrop)	10 pg - 1 µg (Min.: 2 µl einsetzen)
RNase-free water	variabel
Gesamtvolumen:	14 µl

Tabelle 28: gDNA Elimination

Das Gesamtvolumen wird in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß hinein pipettiert, gut gemischt und auf Eis gelagert.

Die gDNA Elimination wird 2 min. bei 42°C in einem Heizblock inkubiert und anschließend wieder auf Eis gelagert.

- Schritt 2: Reverse Transkription Master Mix auf Eis ansetzen

Reagenzien	Volumen
RT Quantiscript Reverse Transcriptase	1 µl
RT-Buffer 5x	4 µl
RT Primer Mix	1 µl
Gesamtvolumen:	6 µl

Tabelle 29: Reverse Transkription Master Mix

Das Gesamtvolumen wird in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß hinein pipettiert, gut gemischt und auf Eis gelagert.

- Schritt 3:

Dem gesamten gDNA Eliminationsvolumen von Schritt 1 (14 µl) wird nun 6 µl vom Reverse Transkription Master Mix aus Schritt 2 zugefügt und gut gemischt. Das Endvolumen misst 20 µl und wird auf Eis gelagert.

- Schritt 4:

Diese 20 µl werden 15 min. bei 42°C am Heizblock inkubiert und anschließend 5 min. bei 95°C inkubiert, um die Reverse Transkriptase zu inaktivieren. Die cDNA ist jetzt für die Analyse fertiggestellt.

- Schritt 5:

Falls anschließend direkt mit der realtime RT-PCR Messung begonnen wird, lagert man die fertige Reaktion inzwischen auf Eis. Zur längerfristigen Lagerung muss die cDNA bei mindestens -20°C aufbewahrt werden.

3.2.3.3 Analyse mit realtime RT-PCR

Bevor man die cDNA mit der realtime RT-PCR messen kann, muss ein Mix für jeden Primer hergestellt werden, der auf Eis gelagert wird.

Reagenzien	Volumen
TaqMan® Genotyping Master Mix	12,5 µl
DEPC H2O	8,75 µl
Primer	1,25 µl
Gesamtvolumen:	22,5 µl

Tabelle 30: Primer Master Mix Herstellung

In allen realtime RT-PCR Messungen wird dem Primer Master Mix (22,5 µl) noch 2,5 µl der jeweiligen cDNA in die qPCR Stripes hinein pipettiert (Gesamtvolumen: 25 µl). Für jede Probe wird eine Doppelbestimmung durchgeführt und um die Qualität der Primer zu kontrollieren, wird ebenfalls eine Wasserprobe mitgemessen. Folgende Zielgene (oder target genes): C06A8.1 (*mthf-1*), C06H2.4 (*fol-1*), C36B1.7 (*dhfr-1*), R03D7.1 (*metr-1*), Y4C6B.5 und

Kontrollgene (oder housekeeping genes, HKG): C54G10.3 (*pmp-3*), Y45F10D.4 werden mit der 7300 Real Time PCR gemessen.

Da nicht alle Primer ihr volles Potenzial bei den gleichen RT-PCR Einstellungen entfalten können, sind unterschiedliche Temperatureinstellungen nötig.

Minuten	Temperatur	Zyklen	Primer
2 min.	50°C	50 Zyklen	C54G10.3 (<i>pmp-3</i>)
10 min.	95°C		
0,15 min.	95°C		
1 min.	60°C		
Minuten	Temperatur	Zyklen	Primer
2 min.	50°C	45 Zyklen	C06A8.1 (<i>mthf-1</i>)
5 min.	93°C		C06H2.4 (<i>fol-1</i>)
0,15 min.	93°C		C35B1.7 (<i>dhfr-1</i>)
1 min.	60°C		R03D7.1 (<i>metr-1</i>) Y4C6B.5 Y45F10D.4

Tabelle 31: RT-PCR Einstellungen für die Primer

Nach jedem erfolgreich abgeschlossenen PCR-Lauf werden die CT-Werte (CT threshold cycle oder auch CP crossing points genannt) notiert und in das Programm BestKeeper¹, welches eine auf Microsoft® Excel basierende Software ist, transferiert. Dieses Programm ermöglicht die Bestimmung von stabilen Housekeeping Genen (Kontrollgene) über paarweise Korrelationen [Pfaffl et al., 2004]. Die Analyse der Proben erfolgt mit Hilfe des Programms Q-Gene², welches ebenfalls eine auf Microsoft® Excel basierende Software ist.

¹ Download BestKeeper Software Version 1:

<http://www.gene-quantification.de/bestkeeper.html#download>

² Download Q-Gene Software:

<http://www.gene-quantification.de/download.html#qgene>

Dies ermöglicht die statistische Auswertung mittels eines ungepaarten *t*-Tests und die graphische Darstellung der realtime RT-PCR Daten [Muller et al., 2002].

Die Temperatureinstellungen für die Primer und die Findung der stabilen Houskeeping Gene, C54G10.3 (pmp-3) und Y45F10D.4, wurde von Helen Fichtner im Zuge ihrer Masterarbeit (Influence of dietary folate uptake on the metabolic profile and gene expression of the model organism *Caenorhabditis elegans*) entwickelt.

4 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

In dieser Arbeit wird untersucht, ob die Verringerung der Expression mittels RNAi von fünf Genen (*fol-1*, Y4C6B.5, *dhfr-1*, *mthf-1* und *metr-1*) des Folsäuremetabolismus eine Auswirkung auf die Nachkommenschaft (Reproduktion) und auf die Überlebensrate (Lebensspanne) des Wildtyps und NL2099 *C. elegans* hat. Ebenso wird ihre Genexpression unter verschiedenen RNAi Knockdown-Bedingungen untersucht.

In allen Versuchen (Genexpression, Reproduktion und Lebensspanne) wird die Kontrollgruppe bei beiden Wurmstämmen (N2 und NL2099) mit dem Bakterium *E. coli* HT115(DE) gefüttert, welcher einen Leervektor (Vektorkontrolle = vc) enthält und somit keine dsRNA produzieren kann. Die Versuchsgruppen bei beiden Wurmstämmen (N2 und NL2099) werden ebenfalls mit *E. coli* HT115(DE), welcher dsRNA der fünf Gene (*fol-1*, Y4C6B.5, *dhfr-1*, *mthf-1* und *metr-1*) exprimiert, gefüttert.

4.1 Auswirkung des Genknockdowns *fol-1* bei Wildtyp und NL2099 *C. elegans* auf Genexpression, Reproduktion und Lebensspanne

Das Zielgen *fol-1* kodiert ein Protein, das ortholog zu den menschlichen SLC19A1, SLC19A2 und SLC19A3 (Solute Carrier Family 19) ist.¹ Das Gen SLC19A1 wird auch Reduced Folate Carrier (RFC) genannt und stellt einen Folat-Transporter dar, der für die Absorption von Folat verantwortlich ist (siehe Abbildung 7) [Zhao et al., 2009].

4.1.1 Genexpression

Mittels realtime RT-PCR wird untersucht, ob die Expression des Gens *fol-1* durch RNAi tatsächlich verringert wurde. Dies dient als Kontrolle für den Reproduktions- und Lebensspanneversuch und die damit zusammenhängenden Auswirkungen des Genknockdowns *fol-1* auf die

¹ http://www.wormbase.org/species/c_elegans/gene/WBGene00007388#04-9e-10 [22.08.2012].

Expression der anderen Gene des Folsäuremetabolismus (Y4C6B.5, *dhfr-1*, *mthf-1* und *metr-1*).

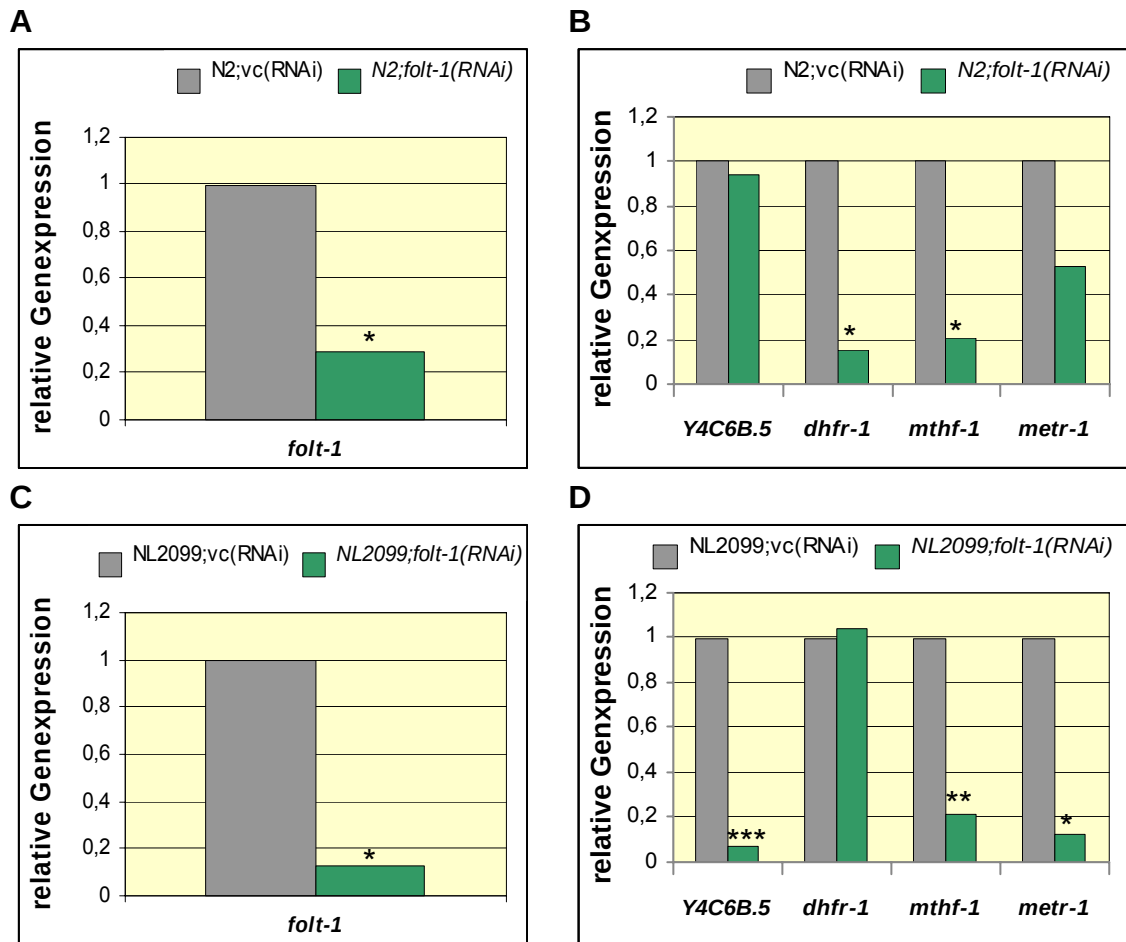


Abbildung 8: Expression der Gene des Folsäuremetabolismus in N2 und NL2099 mit *folt-1* RNAi

(A) Überprüfung der *folt-1* Genexpression in N2;vc(RNAi) und N2;*folt-1*(RNAi) Würmern. (B) Auswirkungen des *folt-1* RNAi Knockdowns bei Wildtyp *C. elegans* auf die Genexpression 4 weiterer Gene im Folsäuremetabolismus relativ zur Kontrolle. (C) Überprüfung der *folt-1* Genexpression in NL2099;vc(RNAi) und NL2099;*folt-1*(RNAi) Würmern. (D) Auswirkungen des *folt-1* RNAi Knockdowns bei NL2099 *C. elegans* auf die Genexpression 4 weiterer Gene im Folsäuremetabolismus relativ zur Kontrolle. Bei allen Experimenten werden biologische Replikate in Doppelbestimmung gemessen und mit Hilfe von qgene ausgewertet. Die statistische Auswertung erfolgt mit Hilfe eines ungepaarten *t*-Tests, mit Signifikanzen von * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Die Untersuchung der Genexpression (siehe Abbildung 8A/8C) ergibt, dass die Expression des Gens *folt-1* bei N2;*folt-1*(RNAi) zu 71% reduziert und bei NL2099;*folt-1*(RNAi) sogar zu 87% verringert ist. NL2099 hat eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber RNAi als N2, da das *folt-1* Gen nur mehr zu 13% vorliegt, während bei N2 noch zu 29% [Simmer et al., 2002]. Eine 100%ige

Reduzierung der mRNA ist meistens nicht möglich, da es sich um einen RNAi Knockdown und nicht um einen Knockout handelt [Corsi, 2006; Grishok, 2005].

C. elegans besitzt drei Gene, FOLT-1, FOLT-2 und FOLT-3, die zum humanen Reduced Folate Carrier (RFC - SLC19A1, SLC19A2 und SLC19A3) homolog sind.¹ In dieser Arbeit wird nur auf die Funktion von FOLT-1 eingegangen, da Balamurugan et al. herausgefunden haben, dass nur dieses Gen ein aktiver Folat-Transporter ist und eine 40%ige Ähnlichkeit mit dem menschlichen RFC besitzt [Balamurugan et al., 2007].

Durch die Messung der mRNA Level der anderen Gene (Y4C6B.5, *dhfr-1*, *mthf-1* und *metr-1*) des Folsäurestoffwechsels (siehe Abbildung 8B) ist ersichtlich, dass die Gene *dhfr-1*, *mthf-1* und *metr-1* durch den Knockdown von *fol-1* eine deutlich niedrigere Genexpression aufweisen, da vermutlich weniger dieser Enzyme notwendig sind, weil auch weniger Substrate durchgeleitet werden. Durch den *fol-1* Knockdown werden die Gene bei N2;*fol-1*(RNAi) für *dhfr-1* zu 85%, *mthf-1* zu 80% und *metr-1* zu 47% reduziert. Die einzige Ausnahme ist das Gen Y4C6B.5, welches ortholog zum menschlichen Proton-Coupled Folate-Transporter (PCFT; SLC46A1) ist, der fast dieselbe Expression wie die Kontrolle aufweist [Zhao et al., 2009]. PCFT wurde 2006 als der primäre Transporter für die intestinale Absorption von Nahrungsfolat identifiziert. Mutationen im PCFT äußern sich in einer hereditären Folat-Malabsorption (HFM), welche eine autosomal-rezessiv vererbte Erkrankung ist. PCFT hat ein niedriges pH-Optimum, wodurch die effiziente Übertragung von Folaten im sauren Mikroklima des Duodenum und Jejunum möglich ist [Zhao et al., 2007]. Anscheinend kann dieser Folat-Transporter den Verlust des *fol-1* Genes nicht kompensieren, um die Zellen ausreichend mit Folsäure zu versorgen, da auch die Gene *dhfr-1*, *mthf-1* und *metr-1* eine niedrigere Expression aufweisen. Vielleicht fungiert das Gen Y4C6B.5 bei *C. elegans* N2 nicht als Folsäuretransporter und nur FOLT-1 ist für den intestinalen Folsäuretransport in die Zelle verantwortlich. Diese Erkenntnisse stimmen auch mit Balamurugan et

¹ http://www.wormbase.org/species/c_elegans/gene/WBGene00007388#04-9e-10 [22.08.2012].

al. überein, die in ihren Studien orthologe Gene für PCFT in *C. elegans* suchten, jedoch keine weiteren gefunden haben [Balamurugan et al., 2007]. Laut BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) jedoch ist Y4C6B.5 auf Proteinebene homolog zum PCFT. Ausgehend vom momentanen Forschungsstand ist noch nicht vollständig nachgewiesen, was Y4C6B.5 bewirkt. Einerseits besteht die Möglichkeit, dass Y4C6B.5 nicht intestinal exprimiert wird und daher ein *fol-1* Knockdown keinen Einfluss auf die Expression hat. Andererseits kann Y4C6B.5 andere Substrate (wie in Säugern auch) transportieren und daher nicht kompensieren und wird deswegen nicht vermehrt exprimiert. Um genaue Aussagen treffen zu können, muss die Substratspezifität und die Lokalisation von Y4C6B.5 in weiteren Studien genauer untersucht werden.

Bei *C. elegans* NL2099;*fol-1*(RNAi) (siehe Abbildung 8D) ist ebenfalls die Expression von *mthf-1* und *metr-1* verringert wie bei N2;*fol-1*(RNAi). Durch den *fol-1* Knockdown werden die Gene bei NL2099;*fol-1*(RNAi) für *mthf-1* zu 79% und *metr-1* zu 88% reduziert. Im Gegensatz zu N2;*fol-1*(RNAi) ist bei NL2099;*fol-1*(RNAi) auch noch Y4C6B.5 verringert und die Expression der *dhfr-1* gleicht der Kontrolle.

4.1.2 Reproduktion

In diesem Experiment wird untersucht, ob sich durch *fol-1* RNAi die Anzahl der Nachkommenschaft gegenüber der Kontrolle verändert.

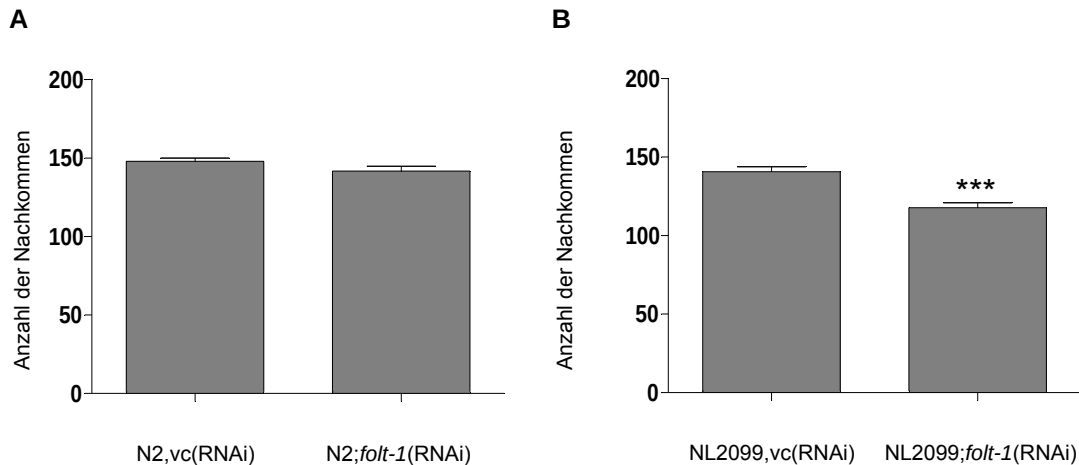


Abbildung 9: Unterschied der Anzahl an Nachkommen bei Wildtyp und NL2099 *C. elegans* mit *fol-1* RNAi

Unterschied der Anzahl an Nachkommen bei (A) N2;vc(RNAi) und N2;fol-1(RNAi) und (B) NL2099;vc(RNAi) und NL2099;fol-1(RNAi). Die Experimente werden mit zwei biologischen Replikaten, welche 24-36 Würmer enthalten, durchgeführt und die statistische Auswertung erfolgt mit Hilfe eines ungepaarten *t*-Tests, mit einer Signifikanz von *** $p < 0.001$.

Die Anzahl der Nachkommen von *C. elegans* N2 (siehe Abbildung 9A), welche mit der Vektorkontrolle gefüttert wurden, beläuft sich durchschnittlich auf $148 \pm 2,5$ und bei N2;fol-1(RNAi) auf 142 ± 2 Larven. Im Gegensatz dazu legen NL2099;fol-1(RNAi) Würmer (siehe Abbildung 9B) im Vergleich zur Kontrolle (140 ± 3) signifikant weniger Eier ($117 \pm 2,5$). Das könnte daran liegen, dass der Wurmstamm NL2099 sensibler auf das RNAi Knockdown reagiert als die Wildtyp Würmer [Simmer et al., 2002]. Diese Ergebnisse sind konform mit den publizierten Ergebnissen von Austin et al. [Austin et al., 2010]. Sie konnten zeigen, dass ein *fol-1* Knockout aufgrund von fehlenden Keimbahnen zu einer Sterilität führt. In der vorliegenden Arbeit wird kein Knockout verwendet, sondern lediglich *fol-1* RNAi, weshalb ein signifikanter Einfluss auf die Reproduktion beobachtet, aber keine Sterilität festgestellt werden kann.

4.1.3 Lebensspanne

In einem weiteren Experiment wird die Auswirkung des Knockdowns von *fol-1* auf die Lebensspanne im Vergleich zur Kontrolle untersucht.

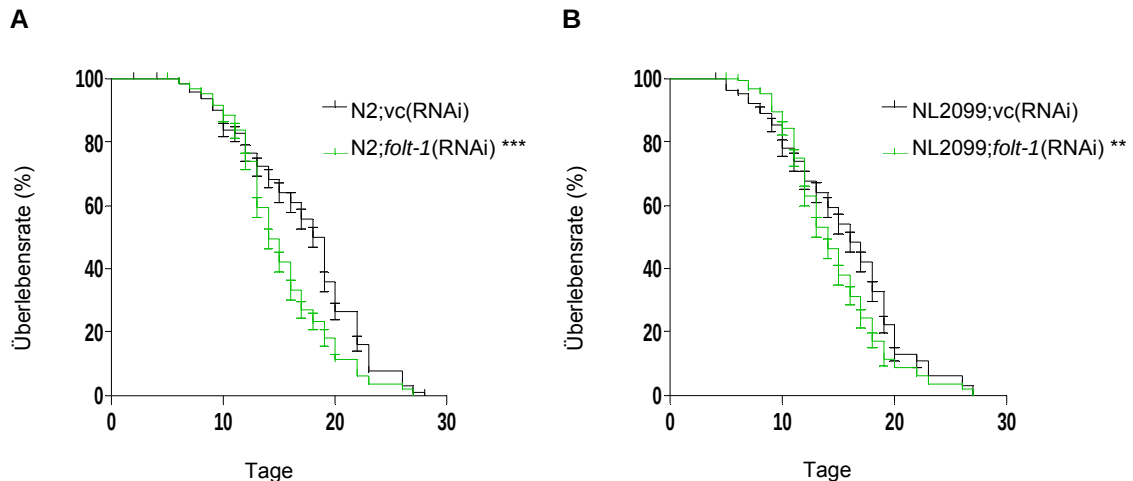


Abbildung 10: Unterschied der Lebensspanne bei Wildtyp und NL2099 *C. elegans* mit *fol-1* RNAi

Unterschied der Lebensspanne zwischen (A) N2;vc(RNAi) und N2;fol-1(RNAi) und (B) NL2099;vc(RNAi) und NL2099;fol-1(RNAi). Die Experimente werden mit zwei biologischen Replikaten, welche 111-138 Würmer enthalten, durchgeführt. Die graphische Darstellung erfolgt über die Kaplan-Meier Überlebenskurve und die statistische Auswertung über einen Log-rank (Mantel-Cox) Test, mit einer Signifikanz von *** $p < 0.001$ und ** $p < 0.01$.

Das Ergebnis aus dem Lebensspanneversuch zeigt deutlich, dass Hermaphroditen die einen Mangel an *fol-1* besitzen, eine signifikant kürzere Lebensdauer aufweisen. Beide Wurmstämme (N2 und NL2099), die mit *fol-1* RNAi *E. coli* Bakterien gefüttert wurden, haben eine mittlere Überlebensrate von 14 Tagen und eine maximale von 27 Tagen (siehe Abbildung 10). Bei Austin et al. hatten die *fol-1* knockout Hermaphroditen ein signifikant ($p < 0.001$) kürzeres Leben, mit einer Lebensspanne von $9,4 \pm 0,7$ (SEM) Tagen, verglichen zum Wildtyp mit $16,9 \pm 0,7$ Tagen [Austin et al., 2010]. Warum die *fol-1*(RNAi) behandelten Würmer in der hier dargestellten Untersuchung deutlich länger leben als bei Austin et al., ist nicht nachzuvollziehen. Es könnte aber daran liegen, dass Austin et al. einen *fol-1* knockout (ok1460) Wurmstamm (VC959) verwendet haben [Austin et al., 2010]. Die Kontrolle bei NL2099 Würmern hat eine mittlere Lebensspanne von 16 Tagen und bei Wildtyp von 19 Tagen und die maximale Überlebensrate beträgt 27

beziehungsweise 28 Tage (NL2099/N2). Dass die Lebensspanne von *C. elegans* durch das Verfüttern der HT115 deutlich verlängert ist, als im Vergleich zu mit OP50 gefütterten Würmern mit einer maximalen Überlebensrate von 20 Tagen [Wood, 1988], wurde auch von Reinke et al. beschrieben. Reinke et al. untersuchten bei *C. elegans*, ob sich durch die Fütterung mit unterschiedlichen Futtermitteln (*E. coli* OP50 und HT115) die Lebensspanne, die Nachkommenschaft und das metabolische Profil verändern. Bei Reinke et al. lebten die Hermaphroditen, die mit HT115 ernährt wurden signifikant länger als Würmer, die mit OP50 Bakterien gefüttert wurden [Reinke et al., 2010]. Derselbe lebensverlängernde Effekt kann auch in diesen Versuchen gezeigt werden.

Anscheinend hat ein Fehlen des Genes *folT-1* und ein damit einhergehender Folsäuremangel Auswirkungen auf die Nachkommenschaft und die Lebensspanne. Um jedoch genauere Aussagen dazu treffen zu können, müsste die Folataufnahme des Wurmes gemessen werden, um Rückschlüsse auf dessen Folatstatus und den tatsächlichen Folsäuremangel zu ermöglichen.

4.2 Auswirkung des Genknockdowns Y4C6B.5 bei Wildtyp und NL2099 *C. elegans* auf Genexpression, Reproduktion und Lebensspanne

Das Gen Y4C6B.5 in *C. elegans* ist zum menschlichen Proton-Coupled Folat-Transporter (PCFT; *SLC46A1*) ortholog¹ und für die Aufnahme von Folsäure in die Zelle verantwortlich (siehe Abbildung 7). Es gibt noch zwei weitere Mitglieder dieser Familie (*SLC46A2* und *SLC46A3*), jedoch ist ihre Funktion noch nicht bekannt (Zhao et al 2009: 2-19).

¹ http://www.wormbase.org/species/c_elegans/protein/WP:CE31741#04--10 [22.08.2012].

4.2.1 Genexpression

Um die Verringerung der Genexpression von Y4C6B.5 durch RNAi nachzuweisen, wird eine realtime RT-PCR durchgeführt. Dadurch können einerseits Auswirkungen des Genknockdowns Y4C6B.5 auf die Expression der anderen Gene des Folsäuremetabolismus (*fol-1*, *dhfr-1*, *methf-1* und *metr-1*) festgestellt werden, andererseits erfolgt damit die Kontrolle für den Reproduktions- und Lebensspanneversuch.

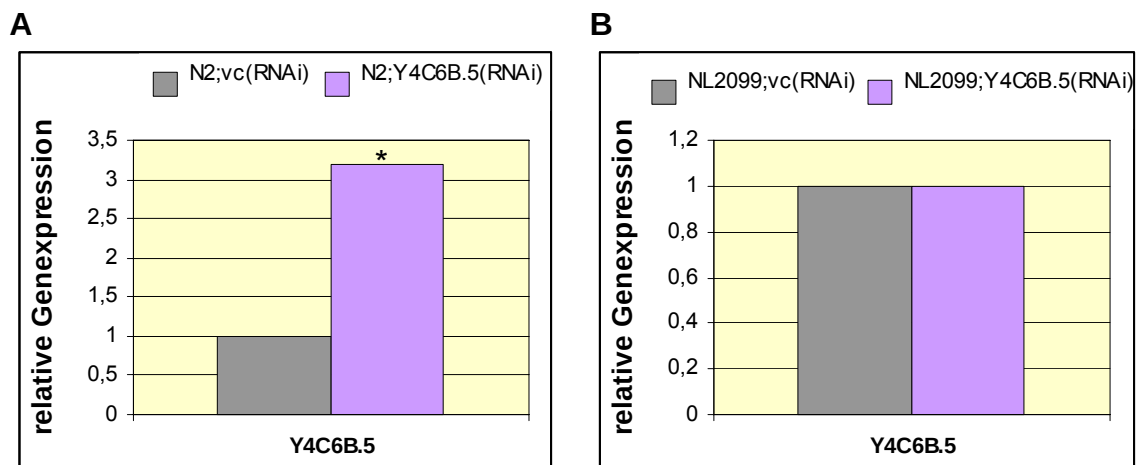


Abbildung 11: Überprüfung des Genknockdowns Y4C6B.5 bei Wildtyp und NL2099 *C. elegans*

Überprüfung der Y4C6B.5 Genexpression in **(A)** N2;vc(RNAi) und N2;Y4C6B.5(RNAi), sowie in **(B)** NL2099;vc(RNAi) und NL2099;Y4C6B.5(RNAi) Würmern. Bei allen Experimenten werden biologische Replikate in Doppelbestimmung gemessen und mit Hilfe von qgene ausgewertet. Die statistische Auswertung erfolgt mit Hilfe eines ungepaarten *t*-Tests, mit einer Signifikanz von * $p < 0.05$.

Da die Expressionslevel von Y4C6B.5 bei beiden mit Y4C6B.5(RNAi) Bakterien gefütterten Wurmstämmen entweder der Kontrolle entsprechen (NL2099) oder dreifach erhöht sind (N2), hat der Genknockdown allem Anschein nach nicht funktioniert. Deshalb können die für Y4C6B.5(RNAi) generierten Werte und die Auswirkungen auf die vier anderen Gene (*fol-1*, *dhfr-1*, *methf-1* und *metr-1*) des Folsäuremetabolismus nicht weiter diskutiert werden. Daher werden die Ergebnisse aus dem Reproduktions- und Lebensspanneversuch nicht in diese Arbeit hineingenommen.

Warum die Verringerung der Expression des Gens durch RNAi nicht funktioniert hat, kann nicht genau belegt werden. Es ist bekannt, dass beispielsweise in

Nervenzellen RNAi nicht funktioniert und dass manche Gene generell schlechter bis gar nicht auf RNAi ansprechen. Des Weiteren besteht die Möglichkeit einer Kreuzkontamination mit den Kontrollbakterien, die keine dsRNA produzieren. Um sicherstellen zu können, dass der RNAi Knockdown des jeweiligen Gens tatsächlich funktioniert, sollten daher vor jedem Versuch, wie es auch in dieser Arbeit erfolgt, die mRNA Level gemessen werden. Sofern kein RNAi Effekt zu sehen ist, sollte das entsprechende Plasmid sequenziert werden, um ausschließen zu können, dass das fehlende Ansprechen auf ein falsches Plasmid zurückzuführen ist.

4.3 Auswirkung des Genknockdowns *dhfr-1* bei Wildtyp und NL2099 *C. elegans* auf Genexpression, Reproduktion und Lebensspanne

Bei dem Gen *dhfr-1* in *C. elegans* besteht die Annahme, dass es sich um eine Homologie der Dihydrofolatreduktase (DHFR-1) handelt.¹ Die Dihydrofolatreduktase reduziert die Folsäure in der Zelle zu Dihydrofolat, welches weiter reduziert wird zu Tetrahydrofolat (THF). Tetrahydrofolat (THF) wird unter Verwendung von 5-methyl-THF (aus der methylene-THF-reductase, MTHFR) aus der Methioninsynthese (METR-1) und der 10-formal-THF aus der Purinsynthese generiert (siehe Abbildung 7) [Zhao et al., 2009].

4.3.1 Genexpression

Zum Zweck der Überprüfung einer verringerten Expression des Gens *dhfr-1* mittels RNAi wird eine realtime RT-PCR vorgenommen. Diese Methode fungiert als Kontrolle für den Reproduktions- und Lebensspanneversuch. Weiters können etwaige Auswirkungen des Genknockdowns *dhfr-1* auf die anderen Gene des Folsäurestoffwechsels (*fol-1*, Y4C6B.5, *mthf-1* und *metr-1*) eruiert werden.

¹ http://www.wormbase.org/species/c_elegans/gene/WBGene00007974#04-9e-10 [22.08.2012].

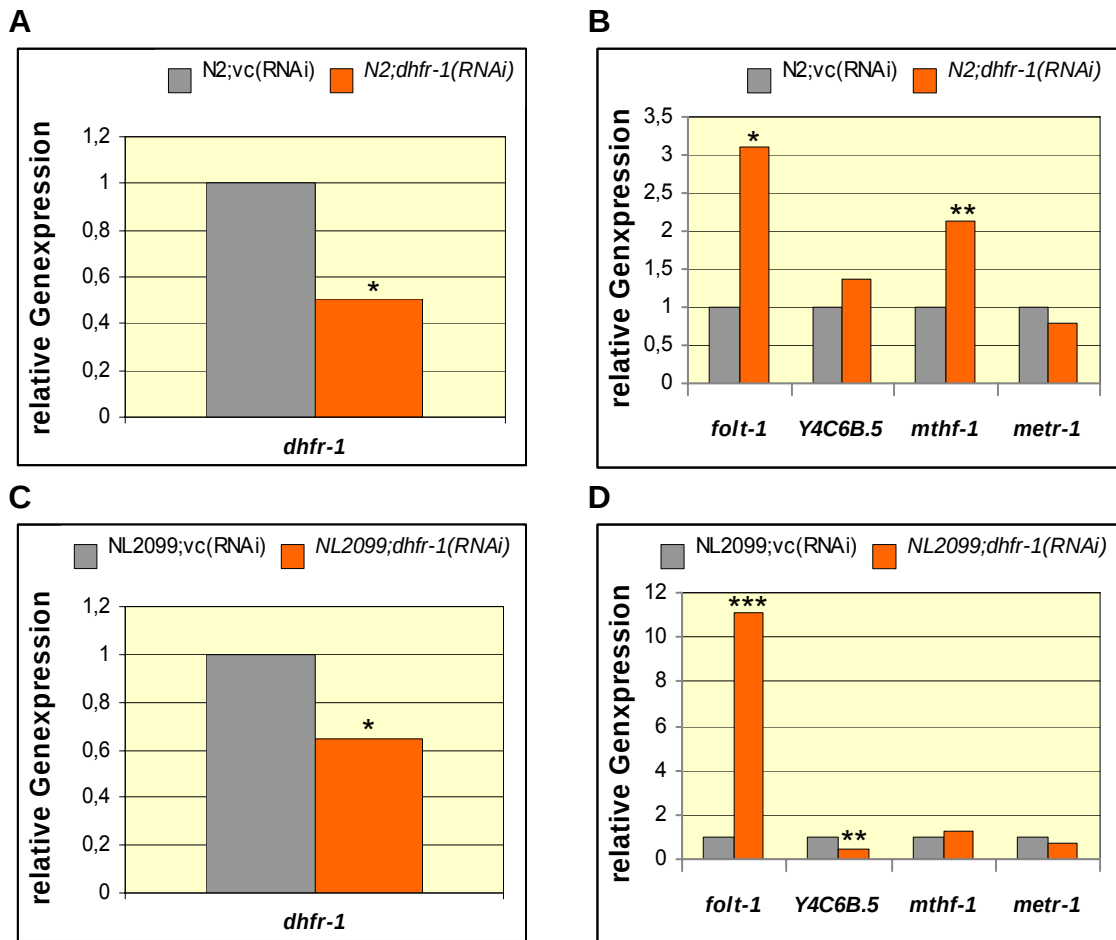


Abbildung 12: Expression der Gene des Folsäuremetabolismus in N2 und NL2099 mit *dhfr-1* RNAi

(A) Überprüfung der *dhfr-1* Genexpression in N2;vc(RNAi) und N2;*dhfr-1*(RNAi) Würmern. (B) Auswirkungen des *dhfr-1* RNAi Knockdowns bei Wildtyp *C. elegans* auf die Genexpression 4 weiterer Gene im Folsäuremetabolismus relativ zur Kontrolle. (C) Überprüfung der *dhfr-1* Genexpression in NL2099;vc(RNAi) und NL2099;*dhfr-1*(RNAi) Würmern. (D) Auswirkungen des *dhfr-1* RNAi Knockdowns bei NL2099 *C. elegans* auf die Genexpression 4 weiterer Gene im Folsäuremetabolismus relativ zur Kontrolle. Bei allen Experimenten werden biologische Replikate in Doppelbestimmung gemessen und mit Hilfe von qgene ausgewertet. Die statistische Auswertung erfolgt mit Hilfe eines ungepaarten *t*-Tests, mit Signifikanzen von * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Die Auswertung der Genexpression für *dhfr-1* (siehe Abbildung 12A/12C) ergibt, dass bei N2;*dhfr-1*(RNAi) noch 50% und bei NL2099;*dhfr-1*(RNAi) noch über 60 % der *dhfr-1* mRNA vorhanden ist. Somit ist der Effekt von RNAi nicht so stark wie bei *fol-1* RNAi und es ist von einer Restaktivität des Enzyms *dhfr-1* auszugehen.

Bei N2;*dhfr-1*(RNAi) und bei NL2099;*dhfr-1*(RNAi) (siehe Abbildung 12B) sind die Expressionswerte der Gene im Folsäuremetabolismus höher (*fol-1*: 3,1;

11,1 und *mthf-1*: 2,1; 1,3) beziehungsweise nahe (*metr-1*: 0,8; 0,7) am relativen Genexpressionswert. Eine Erklärung, warum die Expression von *folr-1* in Würmern, mit einem Mangel an DHFR-1 drastisch erhöht ist, könnte die mögliche Substratspezifität von FOLT-1 sein. Es wird vermutet, dass FOLT-1 Folatderivate in die Zelle transportiert. Wenn nun durch *dhfr-1* RNAi ein Mangel an DHFR-1 vorliegt, kann die erhöhte Expression von *folr-1* dazu führen, dass nicht mehr so viel Folsäure, die nicht weiter verstoffwechselt werden kann, sondern vermehrt Folatderivate (wie z.B. Tetrahydrofolat, 5-methyl-Tetrahydrofolat, 5,10-methylen-Tetrahydrofolat) in die Zelle aufgenommen werden, die keine funktionsfähige DHFR benötigen, um biologisch aktiv wirksam zu sein. Dieser kompensatorische Effekt ist bei NL2099 Würmern noch deutlicher um das 11 fache zu beobachten.

Die Genexpression bei Y4C6B.5 ist bei N2 auf 140% erhöht und bei NL2099 auf 40% verringert. Warum sich Y4C6B.5 so unterschiedlich bei den Wurmstämmen verhält, lässt sich zu diesem Zeitpunkt nicht feststellen. Deshalb sollten weitere Versuche gemacht werden, um diese Ergebnisse diskutieren zu können.

4.3.2 Reproduktion

In der Studie von Zhao et al. wurde der Neuralrohrdefekt bei schwangeren Mäusen, welche mit Methotrexat (ist ein Folatantagonist und inhibiert kompetitiv das Enzym DHFR) behandelt wurden, untersucht und dabei kam es zur Verringerung der Konzentration von 5-methylen-Tetrahydrofolat und Entwicklungsstörungen bei den Embryos [Zhao et al., 2012]. Ob ein DHFR-1 Mangel einen Einfluss auf die Reproduktion hat, wird in der vorliegenden Arbeit ebenfalls untersucht.

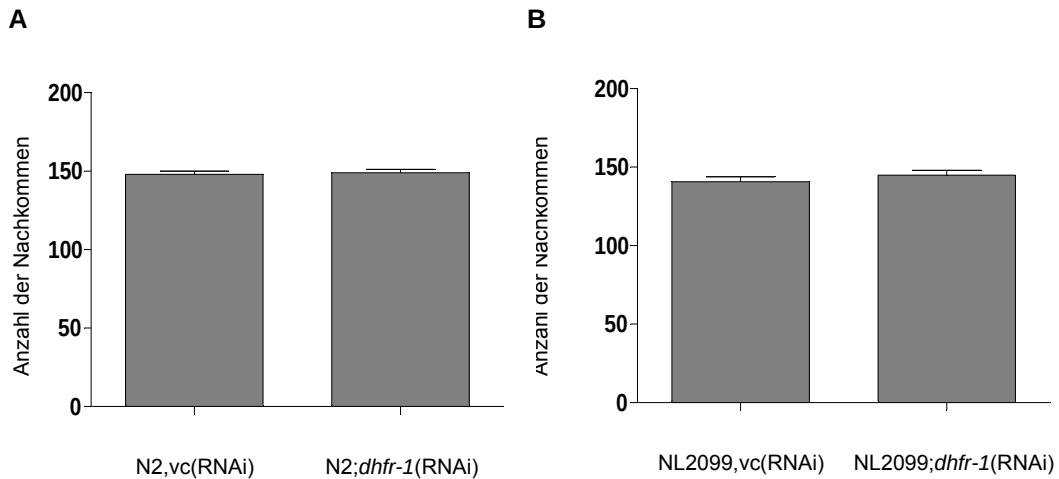


Abbildung 13: Unterschied der Anzahl an Nachkommen bei Wildtyp und NL2099 *C. elegans* mit *dhfr-1* RNAi

Unterschied der Anzahl an Nachkommen bei **(A)** N2;vc(RNAi) und N2;*dhfr-1*(RNAi) und **(B)** NL2099;vc(RNAi) und NL2099;*dhfr-1*(RNAi). Die Experimente werden mit zwei biologischen Replikaten, welche 24-36 Würmer enthalten, durchgeführt und die statistische Auswertung erfolgt mit Hilfe eines ungepaarten *t*-Tests, welcher keine Signifikanz nachweist.

Die Anzahl der Nachkommen von N2 (siehe Abbildung 13A), welche mit der Vektorkontrolle gefüttert werden, beläuft sich auf $148 \pm 2,5$ Larven, vergleichbar mit N2;*dhfr-1*(RNAi) mit 149 ± 2 Larven. Auch der Vergleich der Reproduktionsrate von NL2099;vc(RNAi) (140 ± 3 Larven) und NL2099;*dhfr-1*(RNAi) ($145 \pm 2,5$ Larven) zeigt keinen signifikanten Unterschied (Abbildung 13B).

Affleck et al. zeigten in ihrer Studie bei *Drosophila melanogaster*, die mit Methotrexat behandelt wurden, dass diese eine reduzierte Eiablage, gekoppelt mit anomalen Ei-Morphologien bis hin zur Sterilität aufweisen [Affleck et al., 2005]. Dieser Effekt wird mit einer Anzahl von über 140 Wurm-Larven nicht nachgewiesen, wobei möglicherweise der inhibierende Effekt von Methotrexat auf die Funktion des DHFR größer ist, als der vorhandene, nicht gleichermaßen starke RNAi Knockdown.

4.3.3 Lebensspanne

In diesem Versuch wird untersucht, ob sich durch die Verringerung des Genes *dhfr-1* die Lebensspanne gegenüber der Kontrolle verändert.

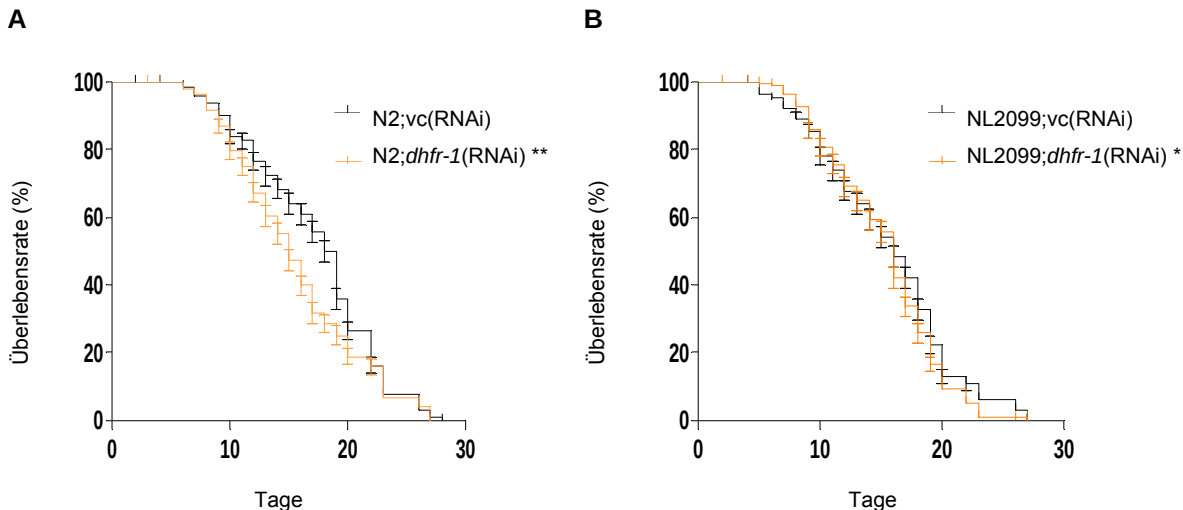


Abbildung 14: Unterschied der Lebensspanne bei Wildtyp und NL2099 *C. elegans* mit *dhfr-1* RNAi

Unterschied der Lebensspanne zwischen (A) N2;vc(RNAi) und N2;*dhfr-1*(RNAi) und (B) NL2099;vc(RNAi) und NL2099;*dhfr-1*(RNAi). Die Experimente werden mit zwei biologischen Replikaten, welche 111-138 Würmer enthalten, durchgeführt. Die graphische Darstellung erfolgt über die Kaplan-Meier Überlebenskurve und die statistische Auswertung über einen Log-rank (Mantel-Cox) Test, mit einer Signifikanz von ** $p < 0.007$ und * $p < 0.05$.

Die Kontrolle (siehe Abbildung 14A) von Wildtyp *C. elegans* hat eine mittlere Überlebensrate von 19 Tagen (maximal 28 Tage), die von NL2099 beträgt 16 Tage (maximal 27 Tage). Die Würmer, die mit *dhfr-1* RNAi *E. coli* Bakterien gefüttert werden, haben dahingegen eine signifikant verringerte mittlere Überlebensrate von 15 Tagen (N2) und 16 Tagen (NL2099). Die maximale Lebensspanne beläuft sich hierbei auf 27 Tage bei beiden Wurmstämmen (N2 und NL2099).

Aus diesem Versuch geht hervor, dass die Lebensspanne von *C. elegans*, durch das Verfüttern der HT115 im Vergleich zu den Literaturwerten von mit OP50 gefütterten Wurmern, mit einer maximalen Überlebensrate von 20 Tagen, deutlich verlängert ist [Wood, 1988]. Wie weiter oben bereits erwähnt, wurde dieser Effekt auch von Reinke et al. beschrieben [Reinke et al., 2010]. Allerdings zeigten Affleck et al. in ihrer Studie, dass durch die Auswirkung von Methotrexat die Lebensdauer bei *Drosophila melanogaster* Fliegen verkürzt ist,

dasselbe Resultat, welches hier durch einen Mangel an DHFR-1 auf *C. elegans* erzeugt wird [Affleck et al., 2005].

Das Ergebnis aus dem Lebensspanneversuch (Abbildung 14A/B) zeigt, dass Hermaphroditen, die ein Knockdown am Gen *dhfr-1* haben, ein signifikant kürzeres Leben aufweisen. Im Reproduktionsversuch (Abbildung 13A/B) wird dahingegen keine Auswirkung auf die Nachkommenschaft nachgewiesen.

4.4 Auswirkung des Genknockdowns *mthf-1* bei Wildtyp und NL2099 *C. elegans* auf Genexpression, Reproduktion und Lebensspanne

Das Gen *mthf-1* bei *C. elegans* codiert ein Protein, welches mit der humanen Methylenetetrahydrofolatreduktase (MTHFR) ortholog ist. MTHFR ist bei der Umwandlung von 5,10-methylene-Tetrahydrofolat zu 5-methyl-Tetrahydrofolat beteiligt (siehe Abbildung 7). Mutationen im MTHFR sind mit Homocystinurie, Anenzephalie und Spina bifida assoziiert [Zhao et al., 2009; Bishop et al., 2008].¹

4.4.1 Genexpression

Das folgende Experiment dient der Überprüfung, ob die Expression des Gens *mthf-1* durch RNAi verringert wurde und daher tatsächlich von einem Gen-Knockdown auszugehen ist.

¹ http://www.wormbase.org/species/c_elegans/gene/WBGene00015512#04-9e-10 [22.08.2012].

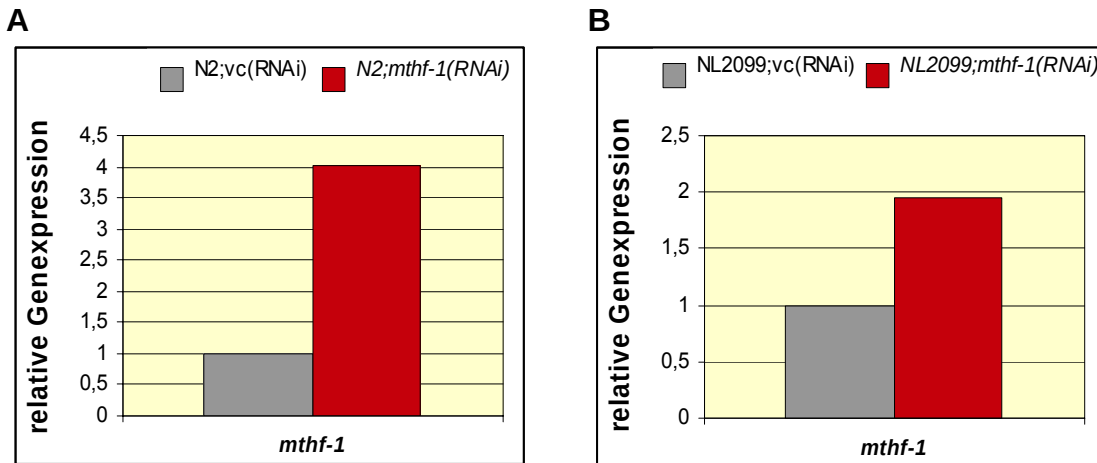


Abbildung 15: Überprüfung des Genknockdowns *mthf-1* bei Wildtyp und NL2099 *C. elegans*

Überprüfung der *mthf-1* Genexpression in (A) N2;vc(RNAi) und N2;*mthf-1*(RNAi), sowie in (B) NL2099;vc(RNAi) und NL2099;*mthf-1*(RNAi) Würmern. Bei allen Experimenten werden biologische Replikate in Doppelbestimmung gemessen und mit Hilfe von qgene ausgewertet. Die statistische Auswertung erfolgt mit Hilfe eines ungepaarten *t*-Tests, welcher keine Signifikanz nachweist.

Die Expressionswerte von *mthf-1* bei beiden Wurmstämmen (N2 und NL2099) sind um ein Vielfaches höher als die relative Genexpression der Kontrolle und somit hat das Genknockdown nicht funktioniert. Die möglichen Gründe hierfür werden bereits weiter oben beschrieben.

4.5 Auswirkung des Genknockdowns *metr-1* bei Wildtyp und NL2099 *C. elegans* auf Genexpression, Reproduktion und Lebensspanne

Metr-1 ist zu dem menschlichen Gen Methioninsynthase (MTR oder MS genannt) ortholog.¹ Das Gen *metr-1* (siehe Abbildung 7), welches bei einem Nebenzweig des Folsäuremetabolismus beteiligt ist, wird für die Remethylierung von Homocystein zu Methionin und für Tetrahydrofolat, das im gleichen Schritt aus 5-Methylentetrahydrofolat entsteht, benötigt [Zhao et al., 2009].

¹ http://www.wormbase.org/species/c_elegans/gene/WBGene00010988#04-9e-10 [22.08.2012].

4.5.1 Genexpression

Der nachfolgende Versuch zeigt die Verringerung der Genexpression von *metr-1* mittels RNAi in Wildtyp und NL2099 Würmern.

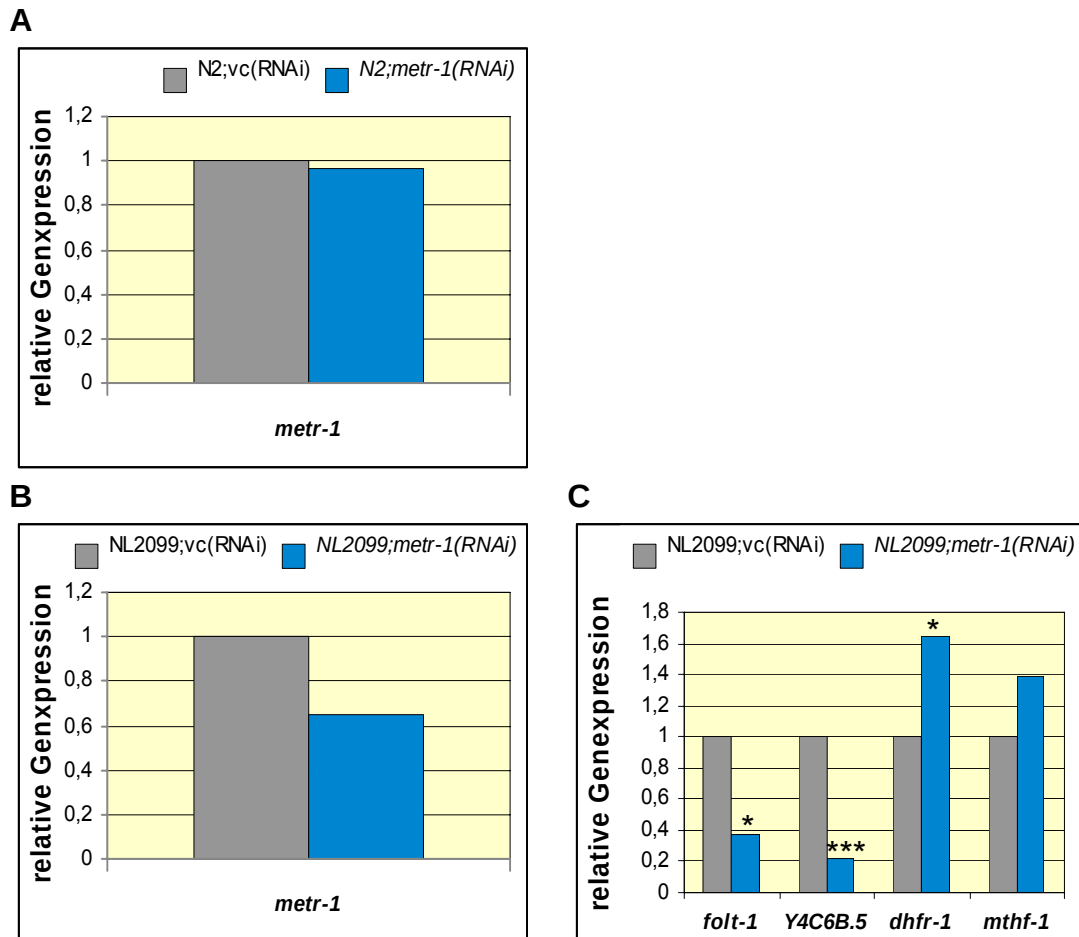


Abbildung 16: Überprüfung des Genknockdowns *metr-1* bei Wildtyp und NL2099 *C. elegans*

Überprüfung der *metr-1* Genexpression in **(A)** N2;vc(RNAi) und N2;*metr-1*(RNAi), sowie in **(B)** NL2099;vc(RNAi) und NL2099;*metr-1*(RNAi) Würmern. **(C)** Auswirkungen des *metr-1* RNAi Knockdowns bei NL2099 *C. elegans* auf die Genexpression 4 weiterer Gene im Folsäuremetabolismus relativ zur Kontrolle. Bei allen Experimenten werden biologische Replikate in Doppelbestimmung gemessen und mit Hilfe von qgene ausgewertet. Die statistische Auswertung erfolgt mit Hilfe eines ungepaarten *t*-Tests, mit Signifikanzen von * $p < 0.05$ und *** $p < 0.001$.

Bei N2;*metr-1*(RNAi) (siehe Abbildung 16A) hat das Genknockdown *metr-1* nicht funktioniert, da die Expression fast der Kontrolle gleicht. Deswegen werden die Werte des N2;*metr-1*(RNAi) bezüglich der Auswirkung auf die vier anderen Gene (*folt-1*, *Y4C6B.5*, *dhfr-1* und *mthf-1*) des Folsäurestoffwechsels,

sowie die Daten zur Reproduktion und Lebensspanne, nicht in diese Arbeit hineingenommen und nicht weiter diskutiert. Es ist davon auszugehen, dass der RNAi Effekt beim Wurmstamm N2 im Gegensatz zu NL2099 Würmern geringer ist beziehungsweise grundsätzlich beim Gen *metr-1* des Wildtyps keinen Effekt bewirkt. Erklärungshintergrund könnte die RNAi Sensitivität der NL2099 Würmer sein [Simmer et al., 2002]. Deshalb wird dieser Wurmstamm bevorzugt für Experimente in Bezug auf RNAi verwendet, da man hier auch die Effekte sichtbar macht, die bei N2 Würmern nicht eintreten.

Die Untersuchung der Genexpression des Genes *metr-1* bei NL2099;*metr-1*(RNAi) (siehe Abbildung 16B) ergibt eine Reduktion um ca. 35% und somit ist noch von einer Restaktivität des Enzyms METR-1 auszugehen. Der Wurmstamm NL2099 reagiert sensibler auf RNAi [Simmer et al., 2002], was den Unterschied zwischen dem Effekt auf die mRNA zwischen Wildtyp und RNase III defizienten Würmern erklären könnte. Der Mangel an *metr-1* (Abbildung 16C) bewirkt eine Verringerung der Expression von *folt-1* (0,38) und Y4C6B.5 (0,21), jedoch eine Erhöhung bei *dhfr-1* (1,64) und *mthf-1* (1,39). Gleichzeitig wird die Remethylierung von Homocystein zu Methionin und die Umwandlung von 5-Methyl-Tetrahydrofolat zu Tetrahydrofolat verringert. Hierdurch könnte es zu einem "intrazellulären Stau", das heißt zu einer intrazellulären Erhöhung der Konzentration von 5-MTHF und Homocystein kommen. *Mthf-1* ist bei der Umwandlung von 5,10-methylen-Tetrahydrofolat zu 5-methyl-Tetrahydrofolat beteiligt [Zhao et al., 2009]. Dadurch, dass weniger 5-methyl-Tetrahydrofolat gebraucht wird, wird aus 5,10-methylen-Tetrahydrofolat durch die Thymidylat-Synthase wieder Dihydrofolat. Dihydrofolat entsteht mit Hilfe der Dihydrofolatreduktase (*dhfr-1*) aus Folsäure, was erklärt, warum *dhfr-1* bei NL2099;*metr-1*(RNAi) auch erhöht ist. *Folt-1* und Y4C6B.5 sind massiv reduziert, weil anscheinend die intrazelluläre Folsäureversorgung abgedeckt ist. Jedoch sollte auch die Folataufnahme der Würmer untersucht werden, um die Ergebnisse besser im Hinblick auf den Folatstatus des Wurmes interpretieren zu können.

4.5.2 Reproduktion

Ein weiterer Versuch zielt darauf ab, die Veränderung in der Zahl der Nachkommenschaft im Vergleich zur Kontrolle mithilfe des Knockdowns von *metr-1* nachzuweisen.

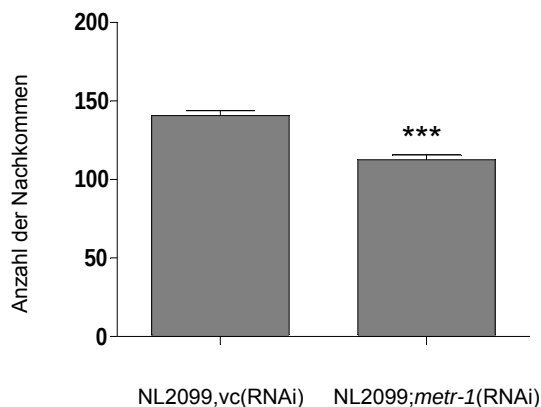


Abbildung 17: Unterschied der Anzahl an Nachkommen bei NL2099 *C. elegans* mit *metr-1* RNAi

Unterschied der Anzahl an Nachkommen bei NL2099;vc(RNAi) und NL2099;metr-1(RNAi). Das Experiment wird mit zwei biologischen Replikaten, welche 24-36 Würmer enthalten, durchgeführt und die statistische Auswertung erfolgt mit Hilfe eines ungepaarten *t*-Tests, mit einer Signifikanz von *** $p < 0.001$.

Die Nachkommen von NL2099;vc(RNAi) (siehe Abbildung 17) belaufen sich durchschnittlich auf 140 ± 3 Larven. Im Gegensatz dazu legen NL2099;metr-1(RNAi) Würmer signifikant weniger Eier (113 ± 3).

4.5.3 Lebensspanne

Das im Folgenden geschilderte Experiment dient der Überprüfung, ob sich mittels des Knockdowns von *metr-1* die Lebensspanne gegenüber der Kontrolle verändert.

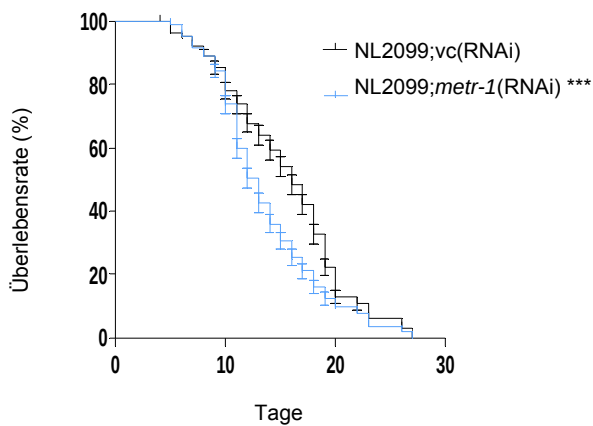


Abbildung 18: Unterschied der Lebensspanne bei NL2099 *C. elegans* mit *metr-1* RNAi

Unterschied der Lebensspanne zwischen NL2099;vc(RNAi) und NL2099;*metr-1*(RNAi). Das Experiment wird mit zwei biologischen Replikaten, welche 111-138 Würmer enthalten, durchgeführt. Die graphische Darstellung erfolgt über die Kaplan-Meier Überlebenskurve und die statistische Auswertung über einen Log-rank (Mantel-Cox) Test, mit einer Signifikanz von *** $p < 0.001$.

Die Kontrolle von *C. elegans* Typ NL2099 (siehe Abbildung 18) hat eine mittlere Überlebensrate von 16 Tagen, wohingegen die Würmer NL2099;*metr-1*(RNAi) eine signifikant verringerte mittlere Überlebensrate von 13 Tagen haben. Die maximale Überlebensrate bei der Kontrolle und bei NL2099;*metr-1*(RNAi) beläuft sich auf 27 Tage.

Das Ergebnis aus dem Lebensspanneversuch zeigt, dass Hermaphroditen bei denen das Gen *metr-1* stillgelegt wurde, ein signifikant kürzeres Leben aufweisen und dass die Reproduktion bei NL2099;*metr-1*(RNAi) auch signifikant verringert ist. Das deutet darauf hin, dass *metr-1* einen Einfluss auf die Nachkommenschaft und auf die Lebensdauer hat.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Folsäure ist ein essentielles wasserlösliches B-Vitamin und führt bei Mangel nachweislich zu gravierenden Erkrankungen beim Menschen. Innerhalb dieser Arbeit wird an Hand des Modellorganismus *C. elegans* der Metabolismus von Folsäure untersucht. Hierfür wird jeweils die Expression eines von fünf Genen (*folt-1*, *Y4C6B.5*, *dhfr-1*, *mthf-1* und *metr-1*) des Folsäurestoffwechsels mittels RNAi verringert und die Auswirkungen auf die Genexpression der vier übrigen Gene, die Lebensspanne und die Reproduktion untersucht.

Zunächst wird die mRNA Expression der RNAi behandelten Würmer mittels realtime RT-PCR gemessen, um die Funktionsfähigkeit des RNAi-Mechanismus sicherzustellen. Das Verfüttern von *folt-1*, *dhfr-1* und *metr-1* RNAi Bakterien führt grundsätzlich zu einer Verringerung der mRNA, allerdings ist der Effekt bei *Y4C6B.5* und *mthf-1* nicht zu sehen.

Ein Mangel an FOLT-1 führt vermutlich zu einer geringeren Folataufnahme und daher zu einer reduzierten Expression der nachfolgenden Enzyme DHFR-1 und MTHF-1. Ebenso kann gezeigt werden, dass der Mangel des Transporters einen negativen Einfluss auf die Reproduktion und Lebensspanne von *C. elegans* hat. Sobald ein RNAi Knockdown der Dihydrofolatreduktase vorliegt, führt das wiederum zu einer Erhöhung der Expression des Folattransporters FOLT-1, vermutlich um die Menge an intrazellulären Folaten, die nicht über die DHFR verstoffwechselt werden müssen, zu erhöhen. Der Mangel an DHFR-1 führt in beiden Wurmstämmen zu einer reduzierten Lebensspanne, hat aber keinen Einfluss auf die Nachkommenschaft. Ein RNAi Knockdown der Methioninsynthase, welche verantwortlich für Tetrahydrofolat aus 5-Methylentetrahydrofolat und die Remethylierung von Homocystein zu Methionin ist, bedingt bei RNAi sensitiven Würmern eine Verringerung der Reproduktionsrate und auch eine verkürzte Lebensspanne.

Wie bereits in anderen Organismen gezeigt, kann auch hier bestätigt werden, dass ein Eingriff in den Folsäurestoffwechsel, sowohl im Bereich der Folataufnahme wie auch im Bereich von Schlüsselenzymen, zum einen durch die veränderte Expression von Genen kompensiert werden kann und zum

anderen aber auch einen negativen Einfluss auf die Reproduktion und Lebensspanne von *C. elegans* hat.

6 SUMMARY

Folic acid is an essential water-soluble B vitamin and deficiency has been shown in more serious medical conditions in humans.

Within this work on hand of the model organism *C. elegans*, the metabolism of folic acid is studied. Therefore respectively were the expression one of the five genes (*fol-1*, Y4C6B.5, *dhfr-1*, *mthf-1* and *metr-1*) of folic acid metabolism, reduced by means of the RNAi mechanism and the effect on the gene expression of the remaining four genes, the life span and the progeny examined.

The mRNA expression of the RNAi treated worms is measured by real time RT-PCR to ensure the functionality of the RNAi mechanism. The feeding of *fol-1*, *dhfr-1* and *metr-1* RNAi bacteria generally leads to a reduction in the mRNA, but not in Y4C6B.5 and *mthf-1*.

A deficiency of FOLT-1 presumably leads to a reduced folate intake and hence to a reduced expression of the following enzymes DHFR-1 and MTHF-1. Also it can be shown that the lack of the transporter has a negative effect on reproduction and life span of *C. elegans*. When a present RNAi knockdown of dihydrofolate reductase, which in turn leads to an increase in the expression of the folate transporter FOLT-1, probably in order to increase the amount intracellular folate, which need not be metabolized via the DHFR. The lack of DHFR-1 reduced life span but has no effect on the offspring into the two worm strains. An RNAi knockdown of methionine synthase, which is responsible for 5-methylenetetrahydrofolate from tetrahydrofolate and the remethylation of homocysteine to methionine, due in RNAi sensitive worms reducing the reproduction rate and a shortened life span.

As already shown in other organisms, which can also be confirmed that an intervention in the folic acid metabolism, both in the field of folate as well as in the range of key enzymes, on the one hand can be compensated by the altered expression of genes and to the other also has a negative influence on the reproduction and life span of *C. elegans*.

LITERATURVERZEICHNIS

Affleck, Joslynn G./Neumann, Katerina/Wong, Lily/Walker, Virginia K. 2006: The Effects of Methotrexate on Drosophila Development, Female Fecundity, and Gene Expression. In: Toxicological Sciences 89 (2), S. 495-503, abrufbar unter: <http://toxsci.oxfordjournals.org/content/89/2/495.full.pdf+html> [17.09.2012].

Altun, Z. F./Hall, D. H. 2009: Inroduction. In: WormAtlas, abrufbar unter: www.wormatlas.org/hermaphrodite/introduction/Introframeset.html [07.08.2012].

Ambros, Victor. 2000: Control of developmental timing in Caenorhabditis elegans. In: Current Opinion in Genetics & Development 10 (4), S. 428-433, abrufbar unter: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0959437X00001088> [07.08.2012].

Austin, Misa U/Liau, Wei-Siang/Balamurugan, Krishnaswamy/Ashokkumar, Balasubramaniam/Said, Harnid M./LaMunyon, Craig W. 2010: Knockout of the folate transporter folt-1 causes germline and somatic defects in C. elegans. In: BMC Developmental Biology 10 (46), S. 1-9, abrufbar unter: <http://www.biomedcentral.com/1471-213X/10/46> [22.08.2012].

Bailey, Lynn B./Gregory III, Jesse F. 1999: Folate Metabolism and Requirements. In: The Journal of Nutrition 129, S. 779-782, abrufbar unter: <http://jn.nutrition.org/content/129/4/779.full.pdf+html> [22.08.2012].

Balamurugan, Krishnaswamy/Ashokkumar, Balasubramaniam/Moussaif, Mustapha/Sze, Ji Ying/Said, Hamid M. 2007: Cloning and functional characterization of a folate transporter from the nematode Caenorhabditis elegans. In: Am J Physiol Cell Physiol 293, S. 670-681, abrufbar unter: <http://ajpcell.physiology.org/content/293/2/C670.full.pdf+html> [22.08.2012].

Ball, George F. M. 1998: Bioavailability and Analysis of Vitamins in Foods. United Kingdom: Chapman and Hall.

Barrière, Antoine/Félix, Marie-Anne 2005: Natural variation and population genetics of *Caenorhabditis elegans*. In: The *C. elegans* Research Community (ed.), WormBook, S.1-19, abrufbar unter: http://www.wormbook.org/chapters/www_naturalvariationgenetics/naturalvariationgenetics.pdf [07.08.2012].

Bässler, Karl-Heinz/Golly, Ines/Loew, Dieter/Pietrzik, Klaus 2002: Vitam-Lexikon für Ärzte, Apotheker und Ernährungswissenschaftler. München: Urban & Fischer Verlag.

Bishop, Lisa/Kanoff, Richard/Charnas, Lawrence/Krenzel, Charles/Berry, Susan A./Schimmenti, Lisa A. 2008: Severe Methylenetetrahydrofolate Reductase (MTHFR) Deficiency: A Case Report of Nonclassical Homocystinuria. In: J Child Neurol (23), S. 823-828, abrufbar unter: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18658082> [16.09.2012].

Blaxter, Mark/Denver, Dee R. 2012: The worm in the world and the world in the worm. In: BMC Developmental Biology 10 (57), S. 1-3, abrufbar unter: <http://www.biomedcentral.com/1741-7007/10/57> [07.08.2012].

Coghlan, Avril/Stajich, Jason E./Harris, Todd W. 2006: Comparative Genomics in *C. elegans*, *C. briggsae*, and Other *Caenorhabditis* Species. In: Kevin Strange (ed.), Methods in Molecular Biology 351, *C. elegans*. Methods and Applications. Totowa, New Jersey: Humana Press Inc., S. 13-29.

Corsi, Ann K. 2006: A biochemist's guide to *Caenorhabditis elegans*. In: Analytical Biochemistry 359, S. 1-17, abrufbar unter: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1855192/pdf/nihms13949.pdf> [07.08.2012].

Félix, Marie-Anne/Duveau, Fabien 2012: Population dynamics and habitat sharing of natural populations of *Caenorhabditis elegans* and *C. briggsae*. In: BMC Biology 10 (59), S. 1-18, abrufbar unter: <http://www.biomedcentral.com/1741-7007/10/59> [16.08.2012].

Grishok, Alla 2005a: RNAi beginnings. Overview of the pathway in *C. elegans*. In: Krishnarao Appasani (ed.), RNA Interference Technology. From Basic Science to Drug Development, United States of America: Cambridge University Press, S. 17-28.

Grishok, Alla 2005b: RNAi mechanisms in *Caenorhabditis elegans*. In: FEBS Letters 579, S. 5932-5939, abrufbar unter: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014579305009385> [16.08.2012].

Herman, Robert K. 2005: Introduction to sex determination. In: The *C. elegans* Research Community (ed.), WormBook, S.1-2, abrufbar unter: http://www.wormbook.org/chapters/www_introsexdetermination/introsexdetermination.pdf [07.08.2012].

Herman, Michael A. 2006: Hermaphrodite cell-fate specification. In: The *C. elegans* Research Community (ed.), WormBook, S.1-16, abrufbar unter: http://www.wormbook.org/chapters/www_hermcellfate/hermcellfate.pdf [07.08.2012].

Hodgkin, Jonathan 1999: Conventional genetics. In: Ian A. Hope (ed.), *C. elegans*. A practical approach. Oxford: Oxford University Press, S. 245-269.

Hope, Ian A. 1999: Background on *Caenorhabditis elegans*. In: Ian A. Hope (ed.), *C. elegans*. A practical approach. Oxford: Oxford University Press, S. 1-15.

Kiontke, Karin/Sudhaus, Walter 2006: Ecology of *Caenorhabditis* species. In: The *C. elegans* Research Community (ed.), WormBook, S.1-14, abrufbar unter: http://www.wormbook.org/chapters/www_ecolCaenorhabditis/ecolCaenorhabditis.pdf [07.08.2012].

Lin, Shyr-Yi/Lee, Woan-Ruoh/Su, Yin-Fan/Hsu, Sung-Po/Lin, Hsu-Chen/Ho, Pei-Yin/Hou, Tien-Chi/Chou, Yu-Pei/Kuo, Chun-Ting/Lee, Wen-Sen 2012: Folic acid inhibits endothelial cell proliferation through activating the cSrc/ERK 2/NF- κ B/p53 pathway mediated by folic acid receptor. In: *Angiogenesis*, abrufbar unter: <http://www.springerlink.com/content/p105051324674h42/?MUD=MP> [22.08.2012].

Lucock, Mark 2000: Folic Acid: Nutritional Biochemistry, Molecular Biology, and Role in Disease Processes. In: *Molecular Genetics and Metabolism* 71, S. 121-138, abrufbar unter: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1096719200930270> [22.08.2012].

Hu, Parick J. 2007: Dauer. In: The *C. elegans* Research Community (ed.), WormBook, S.1-19, abrufbar unter: http://www.wormbook.org/chapters/www_dauer/dauer.pdf [07.08.2012].

Hubbard, E. Jane Alber/Greenstein, David 2005: Introduction to the germ line. In: The *C. elegans* Research Community (ed.), WormBook, S.1-4, abrufbar unter: http://www.wormbook.org/chapters/www_introgermline/introgermline.pdf [07.08.2012].

L'Hernault, S. W. 2006: Spermatogenesis. In: The *C. elegans* Research Community (ed.), WormBook, S.1-4, abrufbar unter: http://www.wormbook.org/chapters/www_spermatogenesis/spermatogenesis.pdf [07.08.2012].

Meyer, Barbara J. 1997: Sex Determination and X Chromosome Dosage Compensation. In: Donald L. Riddle/Thomas Blumenthal/Barbara J. Meyer/James R. Priess (eds.), *C. elegans* II. United States of America: Cold Spring Harbor Laboratory Press, S.209-240.

Muller, Patrick Y./Janovjak, Harald/Miserez, André R./Dobbie, Zuzana 2002: Short Technical Report. Processing of Gene Expression Data Generated by Quantitative Real-Time RT-PCR. In: *BioTechniques* 32 (6), S. 1-7, abrufbar unter: <http://www.gene-quantification.de/muller-2002-qgene.pdf> [29.07.2012].

Pfaffl, Michael W./Tichopad, Ales/Prgomet, Christian/Neuvians, Tanja P. 2004: Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper - Excel-based tool using pair-wise correlations. In: *Biotechnology Letters* 26, Kluwer Academic Publishers, S. 509-515, abrufbar unter: <http://www.gene-quantification.de/pfaffl-bestkeeper-2004.pdf> [29.07.2012].

Pickell, Laura/Li, Deqiang/Brown, Katharine/Mikael, Leonie G./Wang, Xiao-Ling/Wu, Qing/Luo, Li/Jerome-Majewska, Loydie/Rozen, Rima 2009: Methylene tetrahydrofolate Reductase Deficiency and Low Dietary Folate Increase Embryonic Delay and Placental Abnormalities in Mice. In: *Birth Defects Research (Part A): Clinical and Molecular Teratology* 85, S. 531-541, abrufbar unter: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/bdra.20575/abstract> [17.09.2012].

Reinke, S. N./Hu, X./Sykes, B. D./Lemire, B. D. 2010: *Caenorhabditis elegans* diet significantly affects metabolic profile, mitochondrial DNA levels, lifespan and brood size. In: *Molecular Genetics and Metabolism* 100, S. 274-282, abrufbar unter: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1096719210001046> [17.09.2012].

Riddle, Donald L./Blumenthal, Thomas/Meyer, Barbara J./Priess, James R. 1997: Introduction to *C. elegans*. In: Donald L. Riddle/Thomas Blumenthal/Barbara J. Meyer/James R. Priess (eds.), *C. elegans* II. United States of America: Cold Spring Harbor Laboratory Press, S.1-22.

Schafer, William R. 2005: Egg-laying. In: The *C. elegans* Research Community (ed.), WormBook, S.1-7, abrufbar unter:

http://www.wormbook.org/chapters/www_egglaying/egglaying.pdf [07.08.2012].

Schepers, Ute 2005: RNA Interference in Practice. Principles, Basics, and Methods for Gene Silencing in *C. elegans*, *Drosophila*, and Mammals, Weinheim: Wiley-VCH Verlag.

Simmer, Femke/Tijsterman, Marcel/Parrish, Susan/Koushika, Sandhya P./Nonet, Michael L./Fire, Andrew/Ahringer, Julie/Plasterk, Ronald H. A. 2002: Loss of the Putative RNA-Directed RNA Polymerase RRF-3 Makes *C. elegans* Hypersensitive to RNAi. In: *Current Biology* 12, S. 1317-1319, abrufbar unter: http://ac.els-cdn.com/S0960982202010412/1-s2.0-S0960982202010412-main.pdf?_tid=97e9972a5c71b7c6ae75c521d3a9289a&acdnt=1345390400_f6e092236b06e5cd77e4de3802215519 [16.08.2012].

Simmer, Femke/Moorman, Celine/van der Linden, Alexander M./Kuijk, Ewart/van der Berghe, Peter V. E./Kamath, Ravi S./Fraser, Andrew G./Ahringer, Julie/Plasterk, Ronald H. A. 2003: Genome-Wide RNAi of *C. elegans* Using the Hypersensitive *rrf-3* Strain Reveals Novel Gene Functions. In: *PLOS Biology* 1 (1), S. 77-84, abrufbar unter:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC212692/pdf/pbio.0000012.pdf> [16.08.2012].

Siomi, Haruhiko/Siomi, Mikiko C 2009: On the road to reading the RNA-interference code. In: Nature 457, S. 396-404, abrufbar unter: <http://www.nature.com/nature/journal/v457/n7228/full/nature07754.html> [15.8.2012].

Stiernagle, Theresa 2006: Maintenance of *C. elegans*. In: The *C. elegans* Research Community (ed.), WormBook, S.1-6, abrufbar unter: http://www.wormbook.org/chapters/www_strainmaintain/strainmaintain.pdf [07.08.2012].

Stover, Patrick J. 2004: Physiology of Folate and Vitamin B₁₂ in Health and Disease. In: Nutrition Reviews 62 (6), S. 3-12, abrufbar unter: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1753-4887.2004.tb00070.x/pdf> [22.08.2012].

Strange, Kevin 2006: An Overview of *C. elegans* Biology. In: Kevin Strange (ed.), Methods in Molecular Biology 351, *C. elegans*. Methods and Applications. Totowa, New Jersey: Humana Press Inc., S. 1-11.

Taparia, Shveta/Gelineau-van Waes, Janée/Rosenquist, Thomas H./Finnell, Richard H. 2007: Importance of folate-homocysteine homeostasis during early embryonic development. In: Clin Chem Lab Med 45 (12), S. 1717-1727, abrufbar unter: <http://www.degruyter.com/view/j/cclm.2007.45.issue-12/cclm.2007.345/cclm.2007.345.xml;jsessionid=0E90167755C7573F156CFAC8CB60A77C> [22.08.2012].

Timmons, Lisa/Court, Donald L./Fire, Andrew 2001: Ingestion of bacterially expressed dsRNAs can produce specific and potent genetic interference in *Caenorhabditis elegans*. In: Gene 263, S. 103-112, abrufbar unter: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378111900005795> [16.08.2012].

Timmons, Lisa/Fire, Andrew 1998: Specific interference by ingested dsRNA. In: Nature 395, S. 854, abrufbar unter:

<http://www.nature.com/nature/journal/v395/n6705/full/395854a0.html>

[16.08.2012].

Wang, Juan/Barr, Maureen M. 2005: RNA Interference in *Caenorhabditis elegans*. In: David R. Engelke/John J. Rossi (eds.), Methods in Enzymology 392, RNA Interference. United States of America: Elsevier Academic Press, S. 36-54.

Wood, William Barry 1988: Introduction to *C. elegans* Biology. In: William Barry Wood (ed.), The nematode *Caenorhabditis elegans*. Woodbury, New York: Cold Spring Harbor Laboratory, S.1-16.

Zarkower, David 2006: Somatic sex determination. In: The *C. elegans* Research Community (ed.), WormBook, S. 1-12, abrufbar unter: http://www.wormbook.org/chapters/www_somaticsexdeterm/somaticsexdeterm.pdf [07.08.2012].

Zhao, Rongbao/Min, Sang H./Qiu, Andong/Sakaris, Antoinette/Goldberg, Gary L./Sandoval, Claudio/Malatack, J. Jeffrey/Rosenblatt, David S. 2007: The spectrum of mutations in the PCFT gene, coding for an intestinal folate transporter, that are the basis for hereditary folate malabsorption. In: Blood 110 (4), S. 1147-1152, abrufbar unter:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1939898/> [17.09.2012].

Zhao, Rongbao/Matherly, Larry H./Goldman, David I. 2009: Membrane transporters and folate homeostasis: intestinal absorption and transport into systemic compartments and tissues. In: Expert Reviews in Molecular Medicine 11 (e4), S. 1-28, abrufbar unter:

<http://journals.cambridge.org/action/displayAbstract?fromPage=online&aid=3582116> [22.08.2012].

Zhao, Jie/Guan, Tao/Wang, Jianhua/Xiang, Qian/Wang, Mingsheng/Wang, Xiuwei/Guan, Zhen/Xie, Qiu/Niu, Bo/Zhang, Ting 2012: Influence of the antifolate drug Methotrexate on the development of murine neural tube defects and genomic instability. In: Journal of Applied Toxicology, abrufbar unter: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jat.2769/abstract> [17.08.2012].

INTERNETQUELLEN

http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2002/press.html [6.8.2012].

<http://www.cgc.cbs.umn.edu/strain.php?id=10570> [8.8.2012].

<http://www.cgc.cbs.umn.edu/strain.php?id=10766> [8.8.2012].

http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2006/ [17.08.2012].

http://www.wormbase.org/species/c_elegans/gene/WBGene00007388#04-9e-10 [22.08.2012].

http://www.wormbase.org/species/c_elegans/gene/WBGene00018138#04-9e-10 [22.08.2012].

http://www.wormbase.org/species/c_elegans/gene/WBGene00044738#04-9e-10 [22.08.2012].

http://www.wormbase.org/species/c_elegans/gene/WBGene00015512#04-9e-10 [22.08.2012].

http://www.wormbase.org/species/c_elegans/gene/WBGene00010988#04-9e-10 [22.08.2012].

http://www.wormbase.org/species/c_elegans/protein/WP:CE31741#04--10
[22.08.2012].

http://www.wormbase.org/species/c_elegans/gene/WBGene00007974#04-9e-10 [22.08.2012].

<http://celeganskoconsortium.omrf.org/> [15.09.2012].

http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?CMD=Web&PAGE_TYPE=BlastHome
[16.09.2012].

Curriculum Vitae

Persönliche Daten

Name	Alexander Eder
Geboren am	09. April 1986 in Wien
Familienstand	ledig
Staatsbürgerschaft	Österreich

Ausbildung

1992 - 1996	Volksschule Pädagogische Akademie der Erzdiözese Wien Mayerweckstraße 1, 1210 Wien
1996 - 2004	Bundesrealgymnasium Franklinstraße 26, 1210 Wien
17.06.2004	Matura
seit WS 2005	Diplomstudium Ernährungswissenschaften, Universität Wien
seit 2008	Psychotherapeutisches Propädeutikum, ARGE Bildungsmanagement Wien, Friedstraße 23, 1210 Wien
seit WS 2010	Bachelorstudium Lebensmittel- und Biotechnologie, Universität für Bodenkultur, Wien

Praktika

2004 - 2005	12-monatiges Vollzeitpraktikum im Zuge des Zivildienstes beim Österreichischen Hilfswerk für Taubblinde und hochgradig Hör- und Sehbehinderte (ÖHTB)
seit 01.12.2008	Angestellter beim Verein ARGE Bildungsmanagement Wien, Friedstraße 23, 1210 Wien
12.03.09 - 11.03.10	Praktikum, Verein sowhat - Institut für Menschen mit Essstörungen in Wien und Mödling
WS 2011/12	Tutor LV: UE zu Methoden der experimentellen Ernährungsforschung, Institut für Ernährungswissenschaften, Universität Wien
01.09.11 - 30.09.11	Praktikum am Emerging Focus Nutrigenomics am Institut für Ernährungswissenschaften, Universität Wien
SS 2012	Tutor LV: UE zu Methoden der experimentellen Ernährungsforschung, Institut für Ernährungswissenschaften, Universität Wien

Zusatzqualifikationen

EDV-Kenntnisse:	Windows 98/2000/2003/XP/Vista/W7, Apple, MS-Office Software (umfassende Kenntnisse), Maschinenschreiben und computerunterstützte Textverarbeitung, Software: SPSS, GraphPad
Fremdsprachen:	Englisch (sicher in Wort und Schrift), Französisch (Maturaniveau)