



MASTERARBEIT

Titel der Masterarbeit

Fruktose-induzierte Veränderungen im Kohlenhydrat- und Lipidstoffwechsel von *C.elegans*

verfasst von

Manuel Aichert, Bakk. rer. nat.

angestrebter akademischer Grad

Master of Science (MSc)

Wien, 2014

Studienkennzahl lt. Studienblatt: A 066 838

Studienrichtung lt. Studienblatt: Masterstudium Ernährungswissenschaften

Betreut von: Mag. Dr. Martina Ortbauer

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Martina Ortbauer, die mir als Betreuerin eine große Hilfe bei der Verfassung meiner Masterarbeit war. Sowohl bei den praktischen Arbeiten im Labor als auch bei der Ausarbeitung des theoretischen Teils meiner Masterarbeit stand sie mir stets mit Rat und Tat zur Seite. Selbst während ihrer Freizeit konnte ich mich immer mit dringenden Fragen an Sie wenden und bekam stets eine schnelle und fachkundige Antwort. Ihre positive Einstellung war mir eine zusätzliche Motivation und half mir sehr, die schwierigen Seiten des Laboralltags zu meistern.

Ein herzliches Dankeschön auch an Univ. Prof. Dr. Jürgen König, der meine Begeisterung für das Forschungsgebiet der Nutrigenomik durch seine Vorlesungen entfacht hat. Die Lehrveranstaltungen vermittelten nicht nur Fachwissen, sondern auch Hintergrundwissen aus dem angewandten Bereich der Ernährungswissenschaften und förderten stets das wissenschaftlich-kritische Denken.

Danke auch an Maximilian Lassi der mich durch seine Vorarbeit im Labor und beim Erlernen der Methoden unterstützt hat.

Vielen Dank auch an die gesamte Arbeitsgruppe. Die gute Stimmung und der freundliche Umgang in der Gruppe machten das Arbeiten im Labor sehr angenehm.

Inhaltsverzeichnis

1. Grundlagen und Literaturüberblick	4
1.1 Einleitung und Fragestellung.....	4
1.2 Zucker im Überblick	5
1.3 Fruktose.....	8
1.4 Fruktoseabsorption und -stoffwechsel im Menschen.....	8
1.5 Pathomechanismen durch erhöhten Fruktosekonsum	11
1.5.1 Einfluss auf den Fettstoffwechsel	11
1.5.2 Einfluss auf den Zuckerstoffwechsel	13
1.6 <i>C.elegans</i> als Modellorganismus.....	15
1.7 Orthologie der untersuchten Gene.....	18
1.7.1 Der Insulinsignalweg.....	19
1.7.2 Aktivierung von Stressgenen über DAF-16/FOXO	22
1.7.3 Aktivierung von Genen der Glukoneogenese über DAF-16/FOXO ...	22
1.7.4 Aufnahme von Zucker über Transportproteine	24
1.7.5 Aktivierung von Genen der Lipogenese	25
2. Materialien und Methoden	27
2.1 Chemikalien und Wasser	27
2.1.1 Chemikalien	27
2.1.2 Lösungen	27
2.1.3 Verbrauchsmaterialien.....	30
2.1.4 Kits	31
2.1.5 RT-qPCR Sonden	31
2.1.6 Bakterien	32
2.1.7 Nematoden.....	32
2.2 Methoden.....	32
2.2.1 Bakterienhandling.....	32
2.2.2 <i>C. elegans</i> wildtype N2 Bristol.....	33
2.2.3 EggPrep	34
2.2.4 Synchronisierte <i>C. elegans</i> Larven	35
2.2.5 Supplementation mit Zucker	35
2.2.6 RNA Extraktion und Reinigung	36
2.2.7 Reverse Transkription	38

2.2.8	RT-qPCR	39
2.2.9	RT-qPCR Handling	41
3.	Ergebnisse	43
3.1	Messung der Genexpression mittels RT- qPCR	43
3.1.1	Der Insulinrezeptor - <i>daf-2</i>	43
3.1.2	Protein Deacetylase - <i>sir 2.1</i>	44
3.1.3	Transkriptionsfaktor - <i>daf-16/FoxO</i>	45
3.1.4	Superoxiddismutase - <i>sod-3</i>	46
3.1.5	Pyruvat Carboxylase - <i>pyc-1</i>	47
3.1.6	Phosphoenolpyruvat Carboxykinase - <i>pck-1</i>	48
3.1.7	Glukosetransporter - <i>fgt-1</i>	49
3.1.8	Transkriptionsfaktor - <i>sbp-1</i>	49
3.1.9	Acetyl-CoA Carboxylase - <i>pod-2</i>	50
3.2	Ergebnisse Stress Assay	51
4.	Diskussion	52
4.1	Regulation der Genexpression über SIR 2.1 und DAF-16	52
4.2	Auswirkungen auf die Gene der Glukoneogenese (<i>pck-1, pyc-1</i>).....	53
4.3	Auswirkungen auf Gene der Stressantwort (<i>sod-3</i>)	54
4.4	Auswirkungen auf den Insulinrezeptor (<i>daf-2</i>).....	55
4.5	Auswirkungen auf den Glukosetransporter (<i>fgt-1</i>)	56
4.6	Auswirkungen auf Gene der Lipogenese (<i>sbp-1 , pod-2</i>).....	56
5.	Zusammenfassung.....	57
6.	Literaturverzeichnis	59
7.	Anhang	66
7.1	Abbildungsverzeichnis.....	66
7.2	Messdaten.....	67
7.3	Abkürzungen	70

1. Grundlagen und Literaturüberblick

1.1 Einleitung und Fragestellung

Diese Masterarbeit beschäftigt sich mit den Auswirkungen eines erhöhten Fruktosekonsums auf die molekularen Regulationsmechanismen des Kohlenhydrat- und Lipidstoffwechsels sowie der Stressantwort des Modellorganismus *Caenorhabditis elegans*. Im Fokus steht dabei die Aktivierung von Zielgenen über den Insulinsignalweg durch den Transkriptionsfaktor DAF-16/FOXO. Der Literaturteil gibt einen Überblick über die allgemeine Problematik und die gesundheitlichen Folgen eines überhöhten Zuckerkonsums für den Menschen. Darüber hinaus werden die bereits bekannten Pathomechanismen, die im Zusammenhang mit einem erhöhten Fruktosekonsum stehen, genauer erläutert, um die Brisanz des Themas zu verdeutlichen. Im Mittelpunkt steht die Frage, wie sich die Expressionsmuster der zu untersuchenden Genen nach dem Konsum von Fruktose im Vergleich zu anderen Zuckern unterscheiden und welche Auswirkungen das auf die Lebenszeit bzw. die Stressresistenz des *C.elegans* hat. Darüber hinaus stellt sich die Frage, ob es einen Unterschied macht, ob Fruktose und Glukose in gebundener (Saccharose) oder ungebundener Form (z.B. HFCS) aufgenommen werden. Zahlreiche wichtige Mechanismen (z.B. Insulinsignalweg, Glukoneogenese) sind innerhalb der Eukaryoten evolutionär hoch konserviert. Daher eignet sich *C.elegans* sehr gut, um die grundlegenden Regulationsmechanismen auf molekularer Ebene zu untersuchen und bildet eine ethisch unbedenkliche Alternative zu Tierversuchen. Alle Gene, die in dieser Arbeit untersucht werden, kommen in homologer Form auch im Menschen vor und haben dort sehr ähnliche Funktionen. Natürlich können die Ergebnisse nicht direkt auf den Menschen übertragen werden, da die Komplexität des menschlichen Organismus die des *C.elegans* bei weitem übersteigt. Ziel dieser Masterarbeit ist es, den Einfluss von unterschiedlichen Zuckern auf die Expression von Genen des Kohlenhydratstoffwechsels, des Lipidstoffwechsels und der Stressantwort aufzuzeigen und die möglichen Auswirkungen auf den Stoffwechsel zu diskutieren. Die Ergebnisse dieser Arbeit könnten interessante Ansätze für weiterführende Studien an

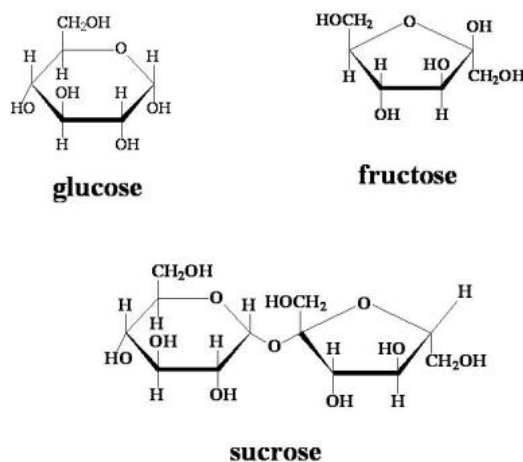
Tiermodellen oder am Menschen liefern und das Verständnis für die grundlegenden Regulationsmechanismen auf molekularer Ebene weiter verbessern.

1.2 Zucker im Überblick

In den letzten Jahrzehnten kam es zu einem stetigen Anstieg der Prävalenz von nicht-übertragbaren Krankheiten wie dem metabolischen Syndrom. Seit 1980 hat sich die Prävalenz von Übergewicht weltweit verdoppelt (WHO 2013). Ein erhöhter BMI zählt dabei zu den Hauptrisikofaktoren für die Entstehung von nicht-übertragbaren Krankheiten wie Typ 2 Diabetes mellitus, Hypertonie und koronaren Herzerkrankungen. Als Ursache für diesen Anstieg gelten neben genetische Faktoren (Yamada et al. 2006, Scott et al. 2008) eine unausgewogene Ernährung im Zusammenhang mit verminderter körperlicher Aktivität (WHO 2013). Die Balance zwischen der Energieaufnahme durch die Ernährung und dem Energieverbrauch für die Erhaltung der Vitalfunktionen und für körperliche Aktivität spielt eine grundlegende Rolle bei der Aufrechterhaltung eines gesundheitlich unbedenklichen Körpergewichts. Auf Grund der hohen kalorischen Dichte wird der Einfluss von Lebensmitteln die einen hohen Gehalt an Zucker und insbesondere zugesetztem Zucker aufweisen, in Bezug auf die Entstehung von nicht-übertragbaren Krankheiten bereits seit längerem kontrovers diskutiert (Drewnowski und Specter 2004, Stanhope et al. 2009, Welsh et al. 2011, Appelhans et al. 2013). Ein Grund dafür ist der steigende Zuckerkonsum in Österreich (Elmadfa et al. 2012) und anderen westlich orientierten Ländern (Sun et al. 2011), der in den letzten Jahrzehnten parallel zur steigenden Zahl an Übergewichtigen verlief. Eine weit verbreitete Annahme ist sogar, dass Zucker süchtig machen kann, da die Veränderung im Verhalten und in der Neurochemie des limbischen Systems, die entstehen, wenn Zucker nur zeitweise zur Verfügung steht, ähnlich ausfallen wie nach dem Missbrauch von Drogen (Avena et al. 2008). Studien an Ratten zeigen z.B. dass die Versuchsgruppen, die eine Zuckerlösung angeboten bekommen, bei weitem mehr trinken als die Kontrollgruppe, die lediglich Wasser zur Verfügung hat (Lindqvist et al. 2008). Der Konsum von zuckergesüßten Getränken nahm in

den letzten Jahrzehnten beim Menschen stark zu (Wang et al. 2008). Obwohl dieser Trend in den letzten Jahren etwas rückläufig war (Delpier et al. 2013, Hert et al. 2014), stieg die Zahl derer, die große Mengen konsumieren, vor allem bei Kindern (Han und Powell 2013) gleichzeitig an. Sowohl bei Kindern (Ludwig et al. 2001) als auch bei Erwachsenen (Malik et al. 2006) besteht ein klarer Zusammenhang zwischen dem Konsum von zuckergesüßten Getränken und der Entstehung von Adipositas. Darüber hinaus führte eine Meta-Analyse der *American Diabetes Organisation* zu dem Ergebnis, dass der tägliche Genuss von Soft Drinks das relative Risiko für die Entstehung von Diabetes (+26%) und dem metabolischen Syndrom (+20%) deutlich steigert (Malik et al. 2010). Eine weitere Meta-Analyse kommt zu dem Ergebnis, dass das Risiko für die Entstehung einer koronaren Herzkrankheit pro zuckergesüßtem Getränk am Tag um 16% zunimmt (Huang et al. 2014). Da die Entstehung von Übergewicht und den genannten Krankheiten durch zahlreiche Faktoren beeinflusst werden, ist es jedoch sehr schwierig zu bestimmen, welchen Anteil der Zuckerkonsum tatsächlich an dieser Entwicklung hat. In jedem Fall sollte entsprechend der derzeitigen Empfehlungen die zugeführte Menge an Zucker nicht mehr als 10% der Gesamtenergie pro Tag betragen. Neben der Diskussion um eine unbedenkliche Zufuhrmenge an Zucker gibt es jedoch auch wachsende Bedenken in Bezug auf die Zusammensetzung des Zuckers. Der in Österreich

Abbildung 1: Struktur von Fruktose, Glukose und Saccharose



übliche Haushaltszucker (Saccharose) ist ein Disaccharid bestehend aus den beiden Einfachzuckern Glukose und Fruktose, die in glykosidischer Bindung vorliegen (Abbildung 1). In den USA wird jedoch vermehrt ein Sirup zum Süßen verwendet der kostengünstig durch die enzymatische Spaltung von Maisstärke (high fructose corn syrup - HFCS) gewonnen wird. Dabei wird die Maisstärke extrahiert und durch hydrolytische Enzyme in Glukose aufgespaltet, die im weiteren Verlauf durch eine Isomerase in Fruktose umgewandelt wird. Der dabei entstehende HFCS hat einen Fruktosegehalt von 42%. Durch die chromatographische Anreicherung der Fruktose kann ein 90%iger HFCS gewonnen werden, der mit dem 42%igen HFCS vermischt wird, um ein Endprodukt mit einem Fruktosegehalt von 55% zu erhalten. Im Gegensatz zur Saccharose besteht HFCS daher aus einer Lösung von 42 bis 55% Fruktose und Glukose in ungebundener Form. Da die Fruktose eine höhere Süßkraft als Glukose besitzt, kann so die Süßkraft des Endprodukts je nach Bedarf über den Fruktosegehalt modifiziert werden (Hanover und White 1993). Die Auswirkungen eines vermehrten Fruktosekonsums auf den Stoffwechsel werden derzeit intensiv diskutiert (Ouyang et al. 2008, Stanhope et al. 2009, Tappy et al. 2010) und bilden den zentralen Teil dieser Arbeit. Da die beiden Einfachzucker Fruktose und Glukose fast immer zusammen konsumiert werden, ist es sehr schwierig, den jeweiligen Einfluss auf die Entstehung von Krankheiten auseinander zu dividieren (Sun et al. 2011). Bei prospektiven Studien an Menschen werden oftmals nur sehr kleine Gruppen (unter 15 Teilnehmer) über einen sehr kurzen Zeitraum (unter 12 Wochen) untersucht. Darüber hinaus kommt es oft zu methodischen Einschränkungen und die Qualität der Studien weist oftmals Mängel auf (Sievenpiper et al. 2012). Die Auswirkungen eines erhöhten Konsums über einen langen Zeitraum können anhand solcher Studien nur erahnt werden. Die retrospektive Auswertung von großen Kohorten führt zu gegensätzlichen Ergebnissen (Sun et al. 2011, Welsh et al. 2011) und eignet sich nicht für die Untersuchung von Effekten, die nur der Fruktose bzw. der Glukose zugeschrieben werden können, da es keine Gruppen gibt, die lediglich einen der beiden Zucker in hohen Mengen konsumiert.

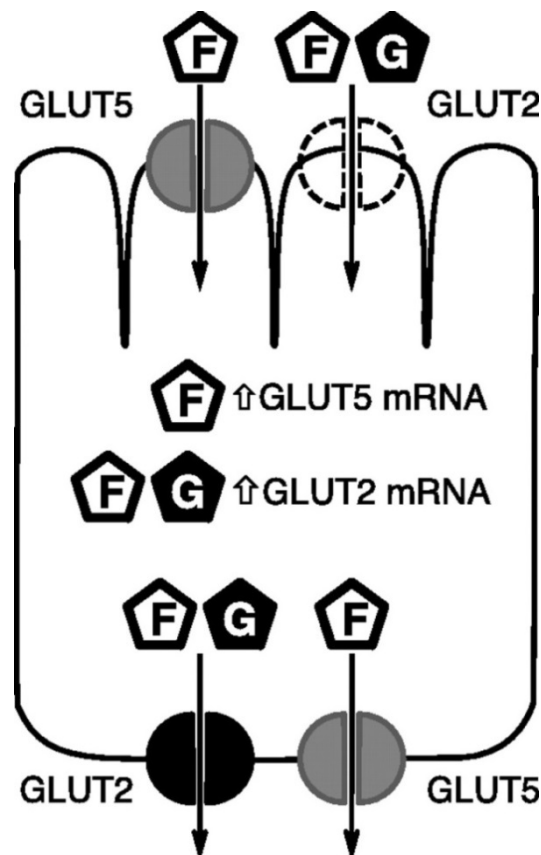
1.3 Fruktose

Fruktose ist eine Hexose mit der gleichen Summenformel ($C_6H_{12}O_6$) wie Glukose (Abbildung 1). Die beiden Einfachzucker unterscheiden sich jedoch in ihrer Struktur, da es sich bei der Fruktose um eine Ketose und bei der Glukose um eine Aldose handelt. In der Natur kommt die Fruktose nie in reiner Form vor, sondern entweder in Kombination mit Glukose, oder gebunden in Form von Saccharose oder Polysacchariden wie z.B. Inulin. Der Mensch nimmt Fruktose durch den Verzehr von Honig, Gemüse und Früchten bzw. Fruchtsäften auf. Die Aufnahme von Fruktose aus natürlichen Quellen stellt für den gesunden Menschen kein Problem dar und wird sogar teilweise in Verbindung mit positiven Effekten auf die Gesundheit gebracht (Muir et al. 2007). Ein großer Teil der Fruktose stammt jedoch auch aus Lebensmitteln, die durch Zuckerzusatz gesüßt werden. Zu diesen Lebensmitteln zählen z.B. Limonaden und weitere Getränke, Süßwaren, Backwaren und Milchprodukte, die mit Saccharose oder HFCS gesüßt werden. Der übermäßige Konsum dieser Lebensmittel führt zu einer vermehrten Aufnahme von Fruktose und zu einer daraus resultierenden Aktivierung von Stoffwechselwegen, die sich in weiterer Folge negativ auf die Gesundheit auswirken könnten (Tappy et al. 2010, Kelishadi et al. 2014). In den USA ist seit der Einführung von HFCS der durchschnittliche Fruktosekonsum von 37 g/Tag im Jahr 1978 auf 49 g/Tag im Jahr 2005 angestiegen (Marriott et al. 2009). Momentan gibt es noch keine Zufuhrempfehlung für Fruktose, es konnte jedoch gezeigt werden, dass bereits eine Fruktoseaufnahme von über 50 g/Tag zur Entstehung des metabolischen Syndroms beiträgt (Kelishadi et al. 2014).

1.4 Fruktoseabsorption und -stoffwechsel im Menschen

Die Aufnahme von Fruktose aus dem Darm in die Enterozyten erfolgt über eine

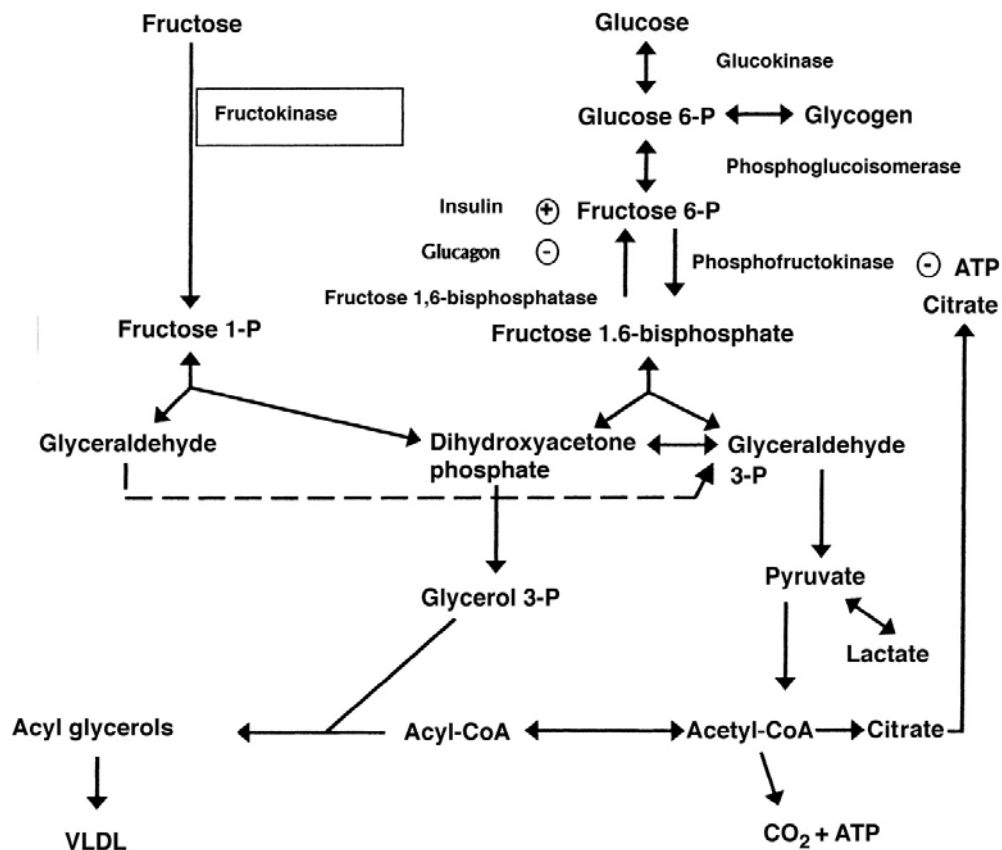
Abbildung 2: Fruktoseaufnahme im Darm und Abgabe in den Blutkreislauf (Ouyang et al. 2008)



erleichterte Diffusion (Uniport) durch den Fruktosetransporter GLUT5 (Abbildung 2). Die Abgabe in den Blutkreislauf erfolgt ebenfalls über den GLUT5-Transporter. Jedoch kann die Fruktose auch zusammen mit Glukose (Symport) über den GLUT2 Transporter ins Blut abgegeben werden (Jones et al. 2011). Sowohl die Anwesenheit von Fruktose als auch von Glukose führt dabei zu einem Anstieg der mRNA-Level von GLUT5 und GLUT2. Über die Pfortader wird die Fruktose dann zur Leber transportiert und dort ebenfalls über den GLUT5 Transporter aufgenommen. Der Abbau der Fruktose in der Leber erfolgt auf einem Nebenweg der Glycolyse, der in Abbildung 3 dargestellt ist. Die Fruktose wird zuerst durch eine ATP-abhängige Fruktokinase in Fruktose-1-Phosphat umgewandelt und dann durch die Aldolase B weiter in Glycerinaldehyd und Dihydroxyacetonphosphat aufgespalten. Beide Zwischenprodukte werden im weiteren Verlauf zu Pyruvat abgebaut. Das Glycerinaldehyd kann außerdem

über die Alkoholdehydrogenase zu Glycerin aufgespalten werden, welches dann zur Lipogenese verwendet werden kann (Löffler 2008)

Abbildung 3: Abbau der Fruktose in der Leber (Elliott et al. 2002)



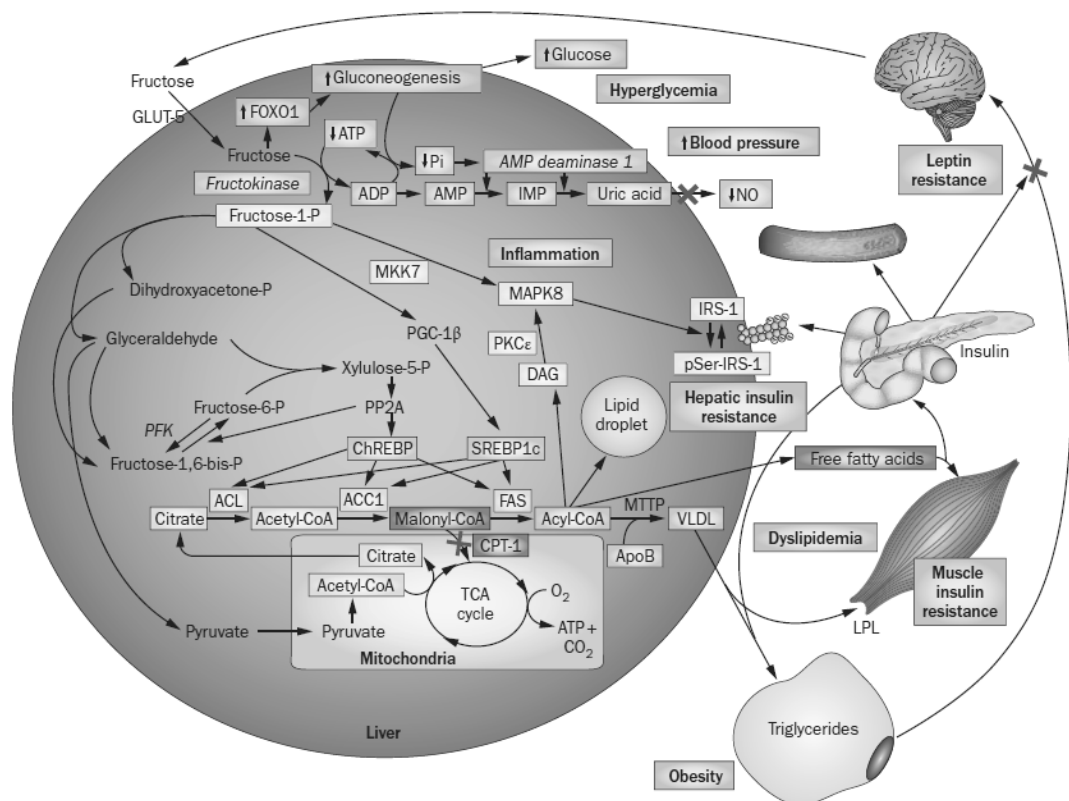
Auch die Glukose wird durch die Glykolyse zu Triosephosphaten abgebaut. Der große Unterschied besteht jedoch darin, dass die Fruktose dabei nicht über die Phosphofruktokinase abgebaut wird, die als Hauptkontrollpunkt die Rate der Glykolyse reguliert (Mayes 1993). Außerdem kann die Glukose auch in anderen Organen wie z.B. der Muskulatur und dem Gehirn verwertet werden, während die Fruktose vollständig in der Leber verstoffwechselt wird. Da die Aufnahme von Fruktose im Vergleich zur Glukose insulinunabhängig verläuft, galt die Fruktose lange Zeit als geeignetes Süßungsmittel für Diabetiker (Koivisto 1978). Im Laufe der Zeit wurden jedoch immer mehr negative Effekte in

Zusammenhang mit dem erhöhten Konsum von Fruktose gebracht, die im folgenden Abschnitt genauer beleuchtet werden.

1.5 Pathomechanismen durch erhöhten Fruktosekonsum

Abbildung 4 zeigt einen Überblick der Stoffwechselmechanismen die durch den erhöhten Konsum von Fruktose ausgelöst werden. Obwohl eine große Anzahl

Abbildung 4: Fruktose-induzierte Stoffwechselmechanismen (Lim et al. 2010)



an Studien zeigt, dass sich der Stoffwechsel der Fruktose deutlich von dem der Glukose unterscheidet, stellt sich die Frage, welche Konsequenzen sich daraus für die Gesundheit bzw. die Entstehung von Krankheiten ergeben (Sievenpiper et al. 2014).

1.5.1 Einfluss auf den Fettstoffwechsel

Der Abbau von Fruktose in der Leber führt zu einer vermehrten Bildung von Zitraten, die als Substrat für die Fettsäuresynthese gelten. Die Zitrate führen über einen Feedback Mechanismus zur Hemmung der Phosphofruktokinase.

Da die Fruktose im Vergleich zur Glukose jedoch unabhängig von diesem Enzym abgebaut wird, können weiterhin Zitate durch den Abbau von Fruktose gebildet werden (Mayes 1993). Außerdem kommt es zu einer vermehrten Bildung von Malonyl-CoA, was zu einer Hemmung der β -Oxidation führt. Diese Faktoren führen zu einer gesteigerten Bildung von Lipid-Tröpfchen in der Leber, weswegen ein erhöhter Fruktosekonsum als Risikofaktor für die Entstehung der nicht-alkoholischen Fettleber Erkrankung (NAFLD) zählt. Der daraus resultierende Transport von freien Fettsäuren aus der Leber könnte eine vermehrte Bildung von VLDL-Cholesterin zur Folge haben (Lim et al. 2010). Eine weitere Auswirkung eines stark erhöhten Konsums von Fruktose ist die Entstehung einer Insulinresistenz, die in weiterer Folge zu einer Hyperinsulinämie führt (Bezerra et al. 2000). Das Auftreten einer erhöhten Insulinresistenz wird dabei in Zusammenhang mit der Entstehung von zahlreichen Krankheiten wie z.B. Diabetes und Adipositas gebracht. Fruktose wird daher häufig eingesetzt, um in Tiermodellen eine Insulinresistenz auszulösen, um beispielsweise die protektiven Effekte von unterschiedlichen Substanzen zu untersuchen (Chandramohan und Pari 2014).

Ergebnisse aus Tierstudien

Die Fütterung von Fruktose in unterschiedlichen Konzentration (0%, 10%, 20%, 45% der Gesamtenergie) führte bei Ratten zu einer Erhöhung der Gesamtcholesterinspiegel die proportional zum Anteil der Fruktose an der Gesamtenergieaufnahme verläuft. Es konnte jedoch nach 28 Tagen kein Unterschied in Bezug auf das Körpergewicht und nur leicht erhöhte Triglyceridspiegel festgestellt werden (Benado et al. 2004). In einer weiteren Studie an Ratten wurde der Effekt von einer 10%igen Fruktose-Lösung im Vergleich zu einer Kontrollgruppe (Wasser) in Kombination mit einer Standard-Diät getestet. Auch in diesem Fall kam es zu leicht erhöhten Triglyceridspiegeln in der Fruktosegruppe, jedoch zu keinem Unterschied in Bezug auf das Körpergewicht (Francini et al. 2010). Gerade in Bezug auf das Körpergewicht liefern weitere Studien jedoch auch kontroverse Ergebnisse. Die Fütterung von Mäusen mit einer Standarddiät in Kombination mit einer 15%igen Fruktose-

Lösung führte zu einem signifikant stärkeren Anstieg des Körpergewichts ($20.79\% \pm 3.10\%$) und der Fettmasse ($+10.53\% \pm 2.49\%$) im Vergleich zu Mäusen die mit einer Saccharose- oder HFCS-Lösung gefüttert wurden (Jürgens et al. 2005). Während in dieser Studie keine Unterschiede zwischen der Saccharosegruppe und der HFCS-Gruppe festgestellt werden konnten, zeigte sich in einer weiteren Studie an Ratten, dass die HFCS-Gruppe bei gleicher Kalorienzufuhr signifikant mehr Gewicht zulegte als die Saccharosegruppe (Bocarsly et al. 2010).

Ergebnisse aus Humanstudien

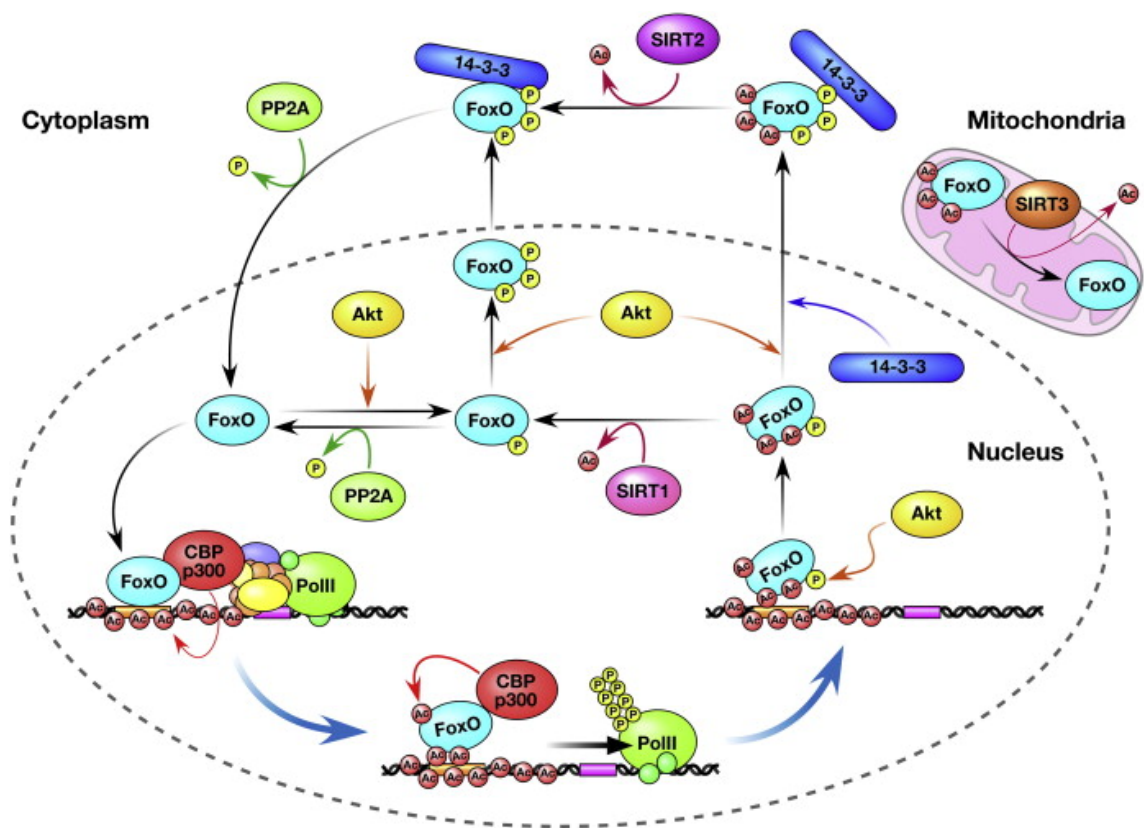
Da selbst die Ergebnisse bei den Tierversuchen unter kontrollierten Laborbedingungen teilweise kontrovers ausfallen, ist es nur wenig überraschend, dass die Studien an Menschen nicht zu eindeutigen Ergebnissen führen. Eine Meta-Analyse von kontrollierten Fütterungsversuchen zeigte dass der isokalorische Austausch von anderen Zuckern durch Fruktose bei gesunden Menschen und bei Diabetikern nicht zu einem signifikanten Anstieg der Triglyceridspiegel führt. Lediglich bei Studien an Übergewichtigen konnte eine signifikante Steigerung der Triglyceridspiegel festgestellt werden (David Wang et al. 2014). Bei isokalorischem Konsum von Fruktose konnte auch in Bezug auf die Entstehung von Übergewicht kein eindeutiger Zusammenhang festgestellt werden. Die moderate Gewichtszunahme, die laut einer Meta-Analyse durch einen erhöhten Konsum von Fruktose entsteht könnte auch eine Folge der übermäßigen Energiezufuhr und somit keine direkte Auswirkung der Fruktoseaufnahme sein (Sievenpiper et al. 2012). Die meisten Studien, die ausgewertet wurden liefen jedoch über einen sehr kurzen Zeitraum. Adipositas und andere nicht-übertragbare Krankheiten entstehen jedoch über einen längeren Zeitraum, weswegen ein direkter Langzeiteffekt der Fruktose an Hand dieser Studien auch nicht ausgeschlossen werden kann (Kelishadi et al. 2014).

1.5.2 Einfluss auf den Zuckerstoffwechsel

Neben der Steigerung der Lipogenese hat ein erhöhter Fruktosekonsum auch einen Einfluss auf die Glukoneogenese. Eine zentrale Rolle spielen dabei die

Transkriptionsfaktoren der FOXO Familie (Forkhead box 'Other'), die ein wichtiges Element in der Regulierung des Insulinsignalweges darstellen. Die Aktivierung von FOXO1 führt zu einer Induktion von Genen der Glukoneogenese und zahlreichen weiteren Stoffwechselprozessen wie z.B. der Stressantwort, der Zellproliferation und der Apoptose (Barthel et al. 2005). Unter normalen Umständen wird FOXO1 durch Insulin deaktiviert und in Phasen von verminderten Nahrungsangebot aktiviert, um durch eine vermehrte Glukoneogenese die Energiehomöostase aufrecht zu erhalten (Salih und Brunet 2008). Dabei unterliegt FOXO1 zahlreichen Regulationsmechanismen,

Abbildung 5: Regulationsmechanismen von FOXO (Daitoku et al. 2011)



welche die Effekte von FOXO1 modifizieren (Abbildung 5). Neben der vermehrten Genexpression, wird die Aktivität von FOXO1 hauptsächlich durch post-translationale Acetylierung und Phosphorylierung und die daraus resultierende Translokation zwischen Zellkern und Zytoplasma gesteuert (Jitrapakdee 2012). Wenn der Insulinspiegel hoch ist, kommt es zu einer

Acetylierung von FOXO1 an unterschiedlichen Stellen. Dadurch wird die Fähigkeit von FOXO1 an Promoter der Zielgene zu binden reduziert und gleichzeitig die Sensitivität für eine Phosphorylierung durch Akt (Proteinkinase B) gesteigert (Matsuzaki et al. 2005). Die daraus resultierende Phosphorylierung von FOXO1 ermöglicht die Bindung von 14-3-3 Proteinen und führt zu einer Rückhaltung von FOXO1 im Zytoplasma (Daitoku et al. 2011). Im Gegensatz dazu werden die Signale durch die Phosphorylierung von FOXO1 abgeschwächt, wenn der Insulinspiegel während einer Fastenphase niedrig ist. In diesem Fall wird FOXO1 durch SIRT1 deacetyliert und dadurch im Zellkern zurückgehalten (Frescas et al. 2005). Das führt zu einer Steigerung der Glukoneogenese durch die vermehrte Transkription von Zielgenen wie z.B. der Phosphoenolpyruvat Carboxykinase (PEPCK), die den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Glukoneogenese katalysiert und deren Fehlfunktion einen Einfluss auf die Entstehung von Diabetes und Adipositas hat (Beale et al. 2007). Durch den Konsum von Fruktose kommt es ebenfalls zu einer Aktivierung der Glukoneogenese über FOXO1 (Lim et al. 2010), obwohl in diesem Fall durch die Fruktose ausreichend Energie vorhanden ist. An Ratten konnte bereits gezeigt werden, dass die Fütterung mit einer 10%igen Fruktose-Lösung bereits nach 2 Wochen zu einer erhöhten Konzentration von Insulin und Glukose im Plasma führt (Rebollo et al. 2014). Sowohl eine Hyperinsulinämie als auch eine Hyperglycämie gelten als Risikofaktoren für die Entstehung von Typ 2 Diabetes mellitus (Adler et al. 1999).

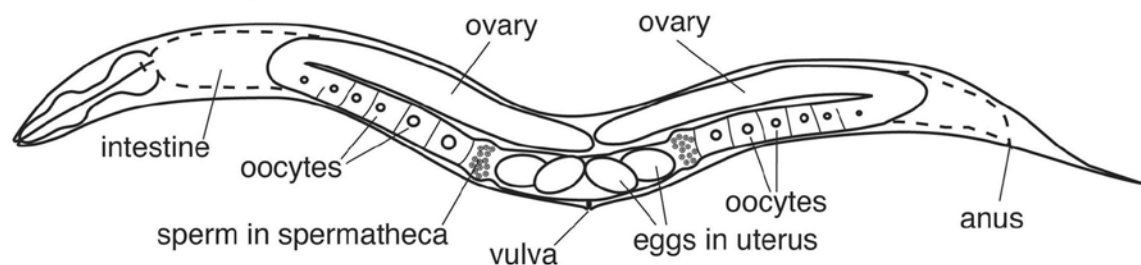
1.6 C.elegans als Modellorganismus

Vor knapp 40 Jahren wurde der genetische Modellorganismus *Caenorhabditis elegans* von Sydney Brenner eingeführt und genauer beschrieben (Brenner 1974). Seit dem ist die Zahl an Laboren die *C.elegans* verwenden rasant angestiegen, da die Handhabung sehr einfach und kostengünstig ist und der Nematode sich für den Einsatz in vielen unterschiedlichen Bereichen der Wissenschaft wie z.B. der Neurobiologie, der Entwicklungsbiologie und der Genetik eignet (Culetto und Sattelle 2000). *C. elegans* kommen in zwei

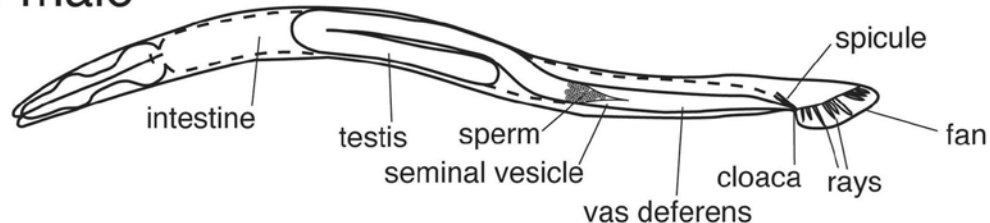
unterschiedlichen Geschlechtern vor. Als männliche Würmer, die aus 1031 somatischen Zellen bestehen, oder als Hermaphroditen, die sich selbst befruchten können und aus 959 somatischen Zellen bestehen (Abbildung 6). Den Großteil der Population machen dabei mit 99.9% die Hermaphroditen aus (Corsi 2006). Die männlichen Würmer spielen eine untergeordnete Rolle und werden in der Wissenschaft hauptsächlich zum gezielten Auskreuzen verwendet. Da der Anteil an männlichen Wurmern innerhalb einer Population bei schlechten Bedingungen (z.B. Hitzestress) steigt, könnte die geschlechtliche Fortpflanzung in der Natur bei einem erhöhten Selektionsdruck jedoch von Vorteil sein (Anderson et al. 2010). Im Labor werden die ca. 1,1 mm langen Nematoden auf Agar-Platten kultiviert und mit *Esterichia coli* Bakterien gefüttert. Sie können jedoch auch in Flüssigmedien kultiviert werden. Da *C.elegans* unter schlechten Bedingungen (z.B. Kälte, Nahrungsknappheit) in ein Dauerlarvenstadium übergehen kann und sehr widerstandsfähig ist, können die Würmer in Glycerolstocks bei -80°C für mehrere Jahre gelagert werden.

Abbildung 6: Die zwei Geschlechter des *C.elegans* (Zarkower 2006)

XX hermaphrodite



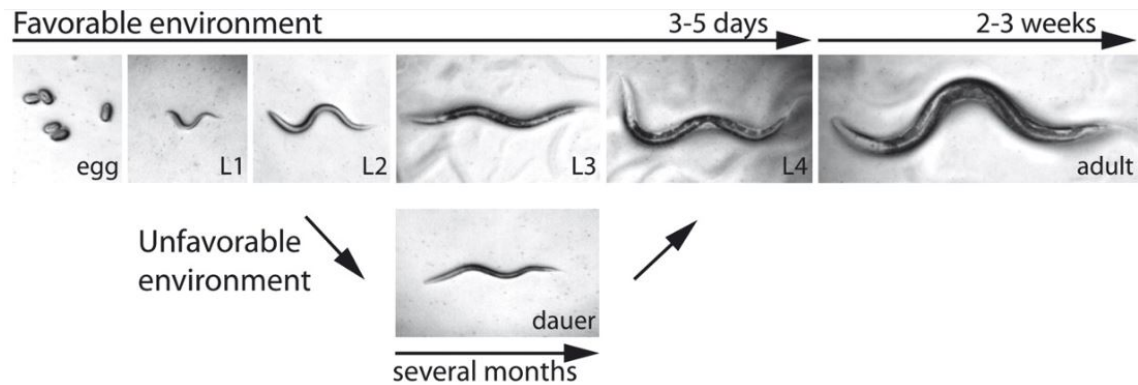
XO male



Nach dem Auftauen gehen die Würmer bei geeigneten Bedingungen wieder in ein normales Larvenstadium über und entwickeln sich zum adulten Wurm. Ein einzelner Hermaphrodit entwickelt sich bei Raumtemperatur innerhalb von 3 bis

5 Tagen vom Ei zum erwachsenen Wurm (Abbildung 7) und kann zwischen 300 und 1000 Nachkommen haben (Corsi 2006).

Abbildung 7: Entwicklungsstadien von *C.elegans* (Fielenbach et al. 2008)



Auf Grund der kurzen Reproduktionszeit und der Lebenspanne von ca. 4 Wochen eignen sich die Nematoden sehr gut um den Einfluss von unterschiedlichen Substanzen (z.B. Nährstoffe, Lebensmittelzusatzstoffe, Toxine) auf die gesamte Lebenszeit eines Organismus zu untersuchen und bilden eine gute Alternative zu Tierversuchen (Culetto und Sattelle 2000). Im Gegensatz zu Studien an höher entwickelten Tieren, müssen Studien am *C.elegans* nicht durch eine Ethikkommission geprüft und genehmigt werden, was die Organisation der Studien vereinfacht. Seit im Jahre 1998 das komplette Genom von *C.elegans* sequenziert wurde können auch Gene identifiziert werden die in orthologer Form in anderen Organismen inklusive dem Menschen vorkommen (Consortium 1998). Die Menge an Krankheitsgenen des Menschen, die in orthologer Form im *C.elegans* vorkommen, wird auf ca. 42% geschätzt (Culetto und Sattelle 2000). Darüber hinaus besteht beim *C.elegans* die Möglichkeit, einzelne Gene gezielt auszuschalten oder deren Expression zu steigern. Eine Möglichkeit bietet RNAi (RNA Interferenz), ein Vorgang bei dem gezielt die mRNA durch die Fütterung des Wurmes mit transgenen *E.coli* Bakterien, die eine dsRNA (doppelsträngige RNA) produzieren, abgebaut wird und somit die Translation zu Proteinen verhindert wird (Fischer 2010). Eine weitere Möglichkeit bietet der Einsatz von transgenen *C.elegans* Stämmen. Durch den Einbau einer zusätzlichen Kopie eines Gens in das Genom des *C.elegans* kann dessen Expression gesteigert werden (Thompson et al. 2013).

Andererseits kann durch eine gezielte Mutation die Inaktivierung des Zielgens erreicht werden (Cuppen et al. 2007). Der Einsatz dieser Techniken ermöglicht es, die Funktion von Genen und deren Einfluss auf molekulare Regulationsmechanismen besser zu verstehen.

1.7 Orthologie der untersuchten Gene

Die Auswirkungen eines erhöhten Fruktosekonsums auf die Regulationsmechanismen der Lipogenese und der Glukoneogenese am Menschen zu untersuchen ist sehr schwierig, da hierfür die Entnahme von Gewebeproben (z.B. Lebergewebe) notwendig ist. Die Regulationsmechanismen von zahlreichen Stoffwechselprozessen sind jedoch innerhalb unterschiedlicher Eukaryoten evolutionär hoch konserviert und ähneln sich daher auch zwischen Menschen und weniger hoch entwickelten Organismen wie *C.elegans*, bei dem diese Regulationsmechanismen in stark vereinfachter Form vorliegen. Modellorganismen wie *C.elegans* eignen sich daher hervorragend, um Hypothesen zu generieren, die später am Menschen oder an Tiermodellen getestet werden können. Im folgenden Abschnitt werden die Gene, die in dieser Arbeit untersucht werden, und die orthologen Gene im Menschen aufgelistet und deren Funktion genauer beschrieben.

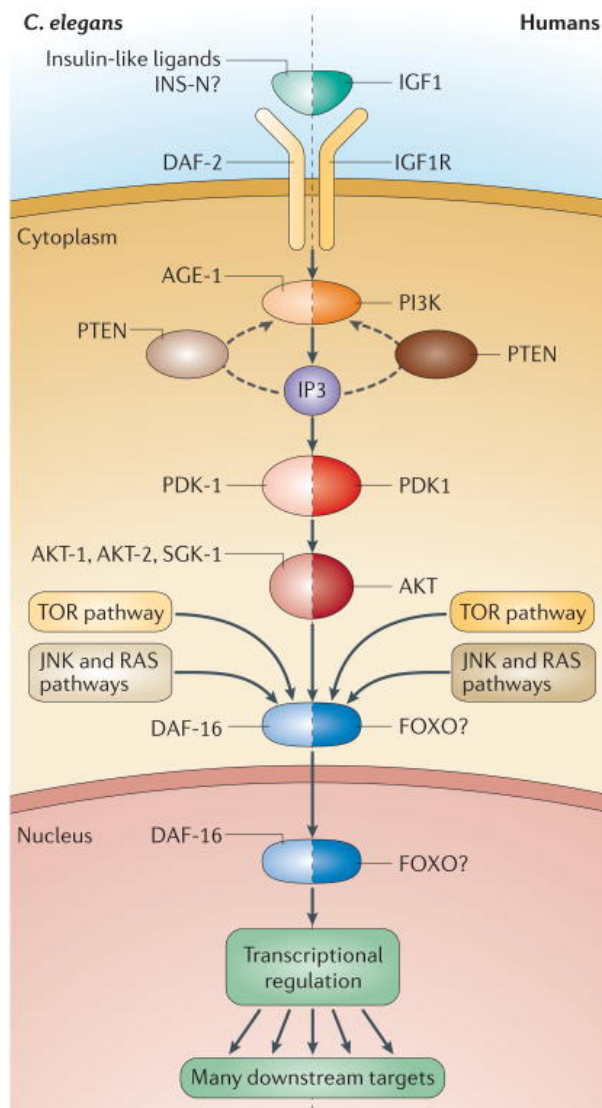
Tabelle 1: Orthologie der C.elegans Gene

C.elegans Gen	Orthologes menschl. Genprodukt
<i>daf-16</i>	FOXO1 - Transkriptionsfaktor
<i>daf-2</i>	Insulin/IGF1 Rezeptor
<i>fgt-1</i>	GLUT2 - Glukose Transporter Typ 2
<i>pck-1</i>	PEPCK-C - Phosphoenolpyruvat Carboxykinase
<i>pod-2</i>	ACC - Actetyl-CoA Carboxylase
<i>pyc-1</i>	PC - Pyruvat Carboxylase
<i>sbp-1</i>	SREBP-1c (Sterol regulatory element-binding protein)
<i>sir 2.1</i>	SIRT1 (Silent Information Regulator) - Deacetylase
<i>sod-3</i>	MnSOD - Superoxiddismutase

1.7.1 Der Insulinsignalweg

Die Insulin/IGF-1 Signalkaskade (IIS) gehört zu den am höchsten konservierten Signalwegen in Eukaryoten und reguliert die Aufnahme, die Verteilung, den Metabolismus und die Speicherung von Nährstoffen in unterschiedlichen Organismen vom Wurm bis hin zum Menschen.

Abbildung 8: IIS - Homologie zwischen Mensch und *C.elegans* (Christensen et al. 2006)

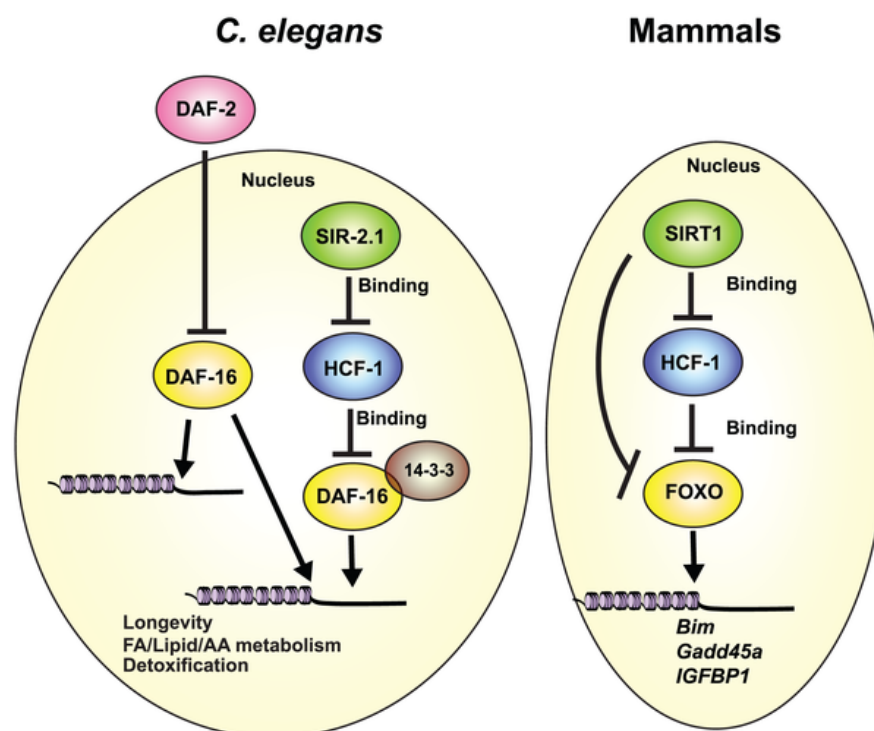


Beim *C.elegans* werden darüber hinaus zahlreiche biologische Prozesse wie die Lebenspanne, das Dauerlarvenstadium, die Reproduktion und die Stressantwort durch den Insulinsignalweg reguliert (Barbieri et al. 2003). Es

konnte sogar gezeigt werden, dass die Blockierung der Signalübertragung durch Mutationen an Genen des Insulinsignalweges zu einer Verlängerung der Lebensspanne bei *C.elegans* und eventuell sogar bei Mäusen führt (Tatar et al. 2003). Der Insulinsignalweg im *C.elegans* wird über eine Rezeptor Tyrosinkinase reguliert (DAF-2) die homolog zum menschlichen Insulin/IGF1 Rezeptor ist (Kimura et al. 1997). Die Aktivierung von DAF-2 (z.B. durch Insulin) setzt eine Kinase Kaskade in Gang die, über AGE-1/PI3K (Phosphoinositid-3-Kinase) ein Phospholipid Signal generiert, dass die Serin/Threonin Kinasen AKT-1, AKT-2, PDK-1 und SGK-1 aktiviert (Abbildung 8). Durch die Aktivierung dieser Kinasen kommt es zu einer Phosphorylierung von DAF-16/FOXO, wodurch die Translokation aus bzw. in den Zellkern (Abbildung 5) gesteuert wird (Gami und Wolkow 2006). Der Transkriptionsfaktor DAF-16/FOXO integriert Signale von zahlreichen Signalwegen (z.B. IIS, TOR, JNK, RAS) und steuert die Transkription von Zielgenen für verschiedene biologische Prozesse, wie z.B. die Glukoneogenese, die Lipogenese oder die Stressantwort (Mukhopadhyay et al. 2006). Um die zahlreichen umweltbedingten Stimuli richtig zu verarbeiten, ist eine strikte Feinabstimmung der DAF-16/FOXO Aktivität notwendig. Die Aktivität von DAF-16/FOXO wird durch post-translationale Modifikationen, durch die Translokation zwischen Zellkern und Zytoplasma und durch die Assoziation mit Co-Regulatoren der Transkription reguliert (Lin et al. 2001). Ein wichtiger Regulator der DAF-16/FOXO Aktivität ist SIR2.1/SIRT1 (Silent Information Regulator), eine NAD⁺-abhängige Deacetylase aus der Familie der Sirtuine die in Organismen von allen biologischen Reichen vorkommt (Landry et al. 2000). Sowohl DAF-16/FOXO als auch SIR2.1/SIRT1 spielen eine essentielle Rolle bei der Verlängerung der Lebenszeit des *C.elegans* durch kalorische Restriktion (Berdichevsky et al. 2006, Wang et al. 2006). Die Überexpression von SIR2.1/SIRT1 führt über die Aktivierung von DAF-16/FOXO zu einer Verlängerung der Lebenszeit (Tissenbaum und Guarente 2001) und die verminderte Expression von SIR2.1/SIRT1 hat im Gegenzug eine verkürzte Lebenszeit zur Folge (Wang und Tissenbaum 2006). Die genauen Mechanismen der Interaktion zwischen DAF-16/FOXO und SIR2.1/SIRT1 sind jedoch noch nicht vollständig geklärt und

werden derzeit intensiv diskutiert. Während es unter normalen Umständen keine Interaktion zwischen DAF-16/FOXO und SIR2.1/SIRT1 gibt, kommt es unter Stresseinwirkung (z.B. Hitzestress) zur Bildung eines Proteinkomplexes aus DAF-16/FOXO und SIR2.1/SIRT1 der durch 14-3-3 Proteine ermöglicht wird (Berdichevsky et al. 2006, Wang et al. 2006). Es wird jedoch angenommen, dass neben den 14-3-3 Proteinen noch weitere Co-Regulatoren für diesen Vorgang notwendig sind. Einer dieser Co-Regulatoren ist HCF-1 (Host Cell Factor 1), der sowohl im *C.elegans* als auch im Menschen vorkommt (Rizki et al. 2011). Es konnte gezeigt werden dass es durch die Überexpression von SIR2.1/SIRT1 und die daraus resultierende Bildung eines solchen Proteinkomplexes zu einer vermehrten Expression von DAF-16/FOXO Zielgenen kommt, welche die Resistenz gegenüber oxidativem Stress erhöhen (Berdichevsky et al. 2006). Bei diesem Vorgang scheint HCF-1 ein Repressor der Aktivität von DAF-16/FOXO zu sein (Abbildung 9), da eine Nullmutation von *hcf-1* zu ähnlichen Ergebnissen führt wie eine Nullmutation von *daf-2* bzw. eine Überexpression von *sir 2.1/sirt1* (Rizki et al. 2011).

Abbildung 9: Regulation der Aktivität von DAF-16/FOXO (Rizki et al. 2011)



1.7.2 Aktivierung von Stressgenen über DAF-16/FOXO

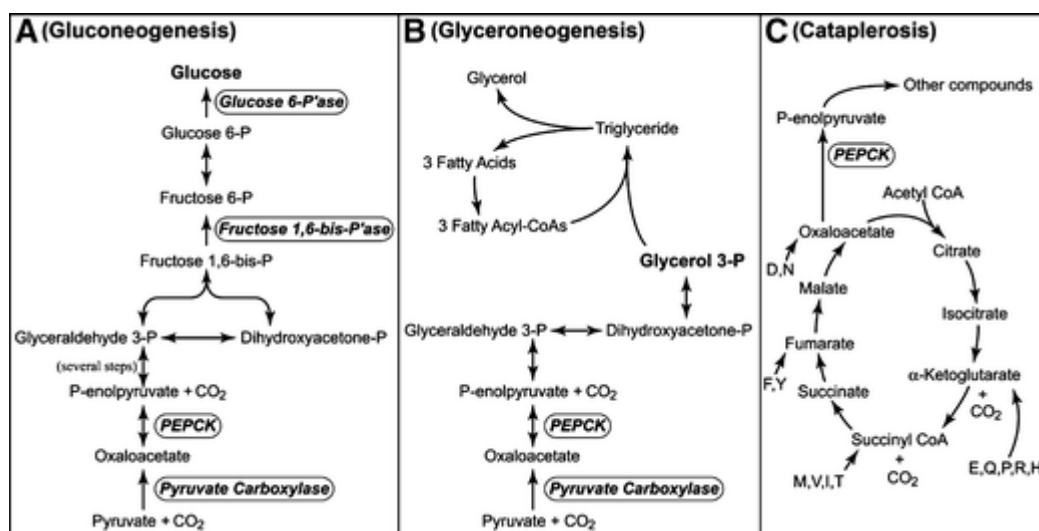
Eines dieser Stressgene ist *sod-3* (Superoxiddismutase), das sowohl im *C.elegans* als auch im Menschen (MnSOD) vorkommt (Yen et al. 2009, Wang et al. 2010). Im *C.elegans* gibt es fünf Gene die unterschiedliche Superoxiddismutasen verschlüsseln. SOD-1, SOD-4 und SOD-5 sind Isoformen die hauptsächlich im Zytoplasma vorkommen und Kupfer oder Zink enthalten. SOD-2 und SOD-3 kommen hingegen in Mitochondrien vor und enthalten Mangan (Back et al. 2010). Superoxiddismutasen sind antioxidative Enzyme, die eine Reaktion katalysieren bei der zwei Superoxidradikale in Wasserstoffperoxid und Sauerstoff umgewandelt werden. Im Jahr 1956 wurde erstmals die Theorie aufgestellt, dass oxidativer Stress der durch reaktive Sauerstoffspezies wie z.B. die Superoxide ausgelöst wird, über eine oxidative Schädigung der DNA und anderer wichtiger Biomoleküle den Alterungsprozess erklärt. Seitdem ist auch das Interesse an der Funktion von Antioxidantien und antioxidativen Enzymen gewachsen (Bokov et al. 2004), da eine hohe antioxidative Kapazität Alterungsprozesse verzögern könnte. Beim *C.elegans* kommt es durch eine *daf-2* Mutation zu einer Dämpfung der Signalübertragung des Insulinsignalweges der eine deutliche Steigerung der Lebenszeit im Vergleich zu den wild type Würmern zur Folge hat (Braeckman und Vanfleteren 2007). Die starke Hochregulierung von *sod-3* bei diesen *daf-2* Mutanten scheint die Annahme zu unterstützen, dass die Superoxiddismutase eine wichtige Rolle bei der Erhöhung der Lebenszeit hat (Honda und Honda 1999). Das Ausschalten von *sod-3* durch Mutationen (Doonan et al. 2008) oder durch RNAi (Hsu et al. 2003) zeigt jedoch, dass es dadurch nicht zu einer Verkürzung der Lebenszeit kommt. Der fehlende Effekt auf die Lebenszeit könnte jedoch durch die Kompensation des Verlustes von SOD-3 durch andere Enzyme erklärt werden (Back et al. 2010).

1.7.3 Aktivierung von Genen der Glukoneogenese über DAF-16/FOXO

Neben der Aktivierung von Stressgenen kommt es auch zu einer Aktivierung von Genen der Glukoneogenese durch den DAF-16/FOXO Proteinkomplex. Eines dieser Gene ist *pyc-1*, das die Pyruvat Carboxylase verschlüsselt die

den ersten Schritt der Glukoneogenese im *C.elegans* bzw. im Menschen katalysiert (Wallace et al. 1998). Darüber hinaus hat die Pyruvat Carboxylase im Menschen auch weitere Funktionen. In Adipozyten ist die Pyruvat Carboxylase an der de novo Synthese von Fettsäuren beteiligt (Abbildung 10) und in den Inselzellen ist sie durch die Bereitstellung von Oxalacetat an der Glukose-induzierten Ausschüttung von Insulin beteiligt (Jitrapakdee et al. 2006). Nach der Umwandlung von Pyruvat in Oxalacetat durch die Pyruvat Carboxylase wird im nächsten Schritt der Glukoneogenese das Oxalacetat weiter in Phosphoenolpyruvat umgewandelt. Dieser Schritt wird von der Phosphoenolpyruvat Carboxykinase (PEPCK-C) katalysiert (Yang et al. 2009), die im *C.elegans* durch das Gen *pck-1* verschlüsselt wird. Im Menschen gibt es neben der zytosolischen PEPCK-C noch eine weitere Isoform die in den Mitochondrien vorkommt (PEPCK-M) und eine eher untergeordnete Rolle spielt. Die Gene beider Isoformen gelten jedoch als Kandidaten-Gene für die Entstehung von Typ 2 Diabetes mellitus, weswegen zahlreiche Studien an Mäusen durchgeführt wurden, um die Funktion dieser Schlüsselenzyme besser zu verstehen (Beale et al. 2007). Auch die PEPCKs haben neben ihrer Funktion in der Glukoneogenese auch weitere Funktionen (Abbildung 10). Dazu zählt z.B. die Glycerinneogenese, eine etwas abgeänderte Form der

Abbildung 10: Funktionen der PEPCKs und der Pyruvat Carboxylase (Beale et al. 2007)



Glukoneogenese die Glycerin-3-Phosphate als Endprodukt liefert. Die Glycerin-3-Phosphate werden zur Re-Esterifizierung von freien Fettsäuren verwendet und sind essentiell für die hepatische Synthese von Triglyceriden (Reshef et al. 2003). Darüber hinaus hat die PEPCK auch eine cataplerotische Funktion, da sie Oxalacetat aus dem Citratzyklus abführt und in Phosphoenolpyruvat umwandelt, das wiederum zur Glukoneogenese verwendet werden kann (Owen et al. 2002). Diese Vorgänge finden normalerweise während verlängerten Fastenphasen statt, die durch eine verminderte Anwesenheit von Insulin gekennzeichnet sind. Da der Konsum von Fruktose nicht zu einer Ausschüttung von Insulin führt, könnte die vermehrte Produktion von Triglyceriden und Glukose durch erhöhten Fruktosekonsum durch diese Prozesse mitbestimmt werden. Es wird angenommen, dass ca. 50% der freien Fettsäuren, die während einer Fastenphase in die Leber aufgenommen werden zu Triglyceriden umgewandelt und als VLDL in den Blutkreislauf abgegeben werden (Owen et al. 1998). Darüber hinaus konnte an Mäusen gezeigt werden, dass die Überexpression von PEPCK über eine vermehrte Glycerinneogenese zu Adipositas ohne das gleichzeitige Auftreten einer Insulinresistenz führt (Franckhauser et al. 2002). Eine weitere Folge der Überexpression von PEPCK bei Mäusen ist die Entstehung einer insulinunabhängigen Form von Diabetes (Valera et al. 1994).

1.7.4 Aufnahme von Zucker über Transportproteine

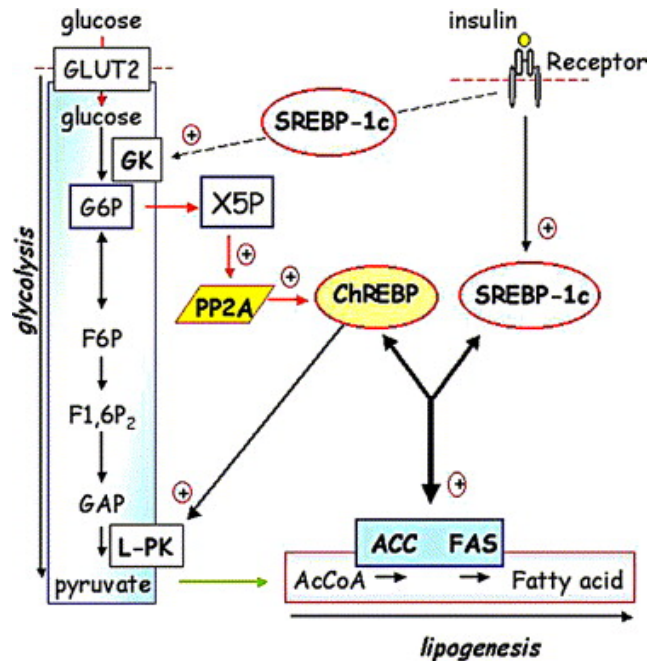
Die Aufnahme von unterschiedlichen Zuckern bzw. deren Transport über die Zellmembran ist eine grundlegende Eigenschaft einer großen Mehrheit aller lebenden Organismen. Im Menschen sind mehrere unterschiedliche Transportproteine für die Translokation der Zucker durch die Zellmembran verantwortlich, die alle zur GLUT (Glukosetransporter) Familie gezählt werden. Einer dieser Transporter ist GLUT2 (Glukosetransporter Typ 2), der in sehr hohen Konzentrationen in den β -Zellen des Pankreas, den basolateralen Membranen des Intestinums, in Epithelzellen der Niere sowie in den Hepatozyten vorkommt (Thorens und Mueckler 2010) und somit eine zentrale Rolle bei der Absorption und der darauf folgenden Verwertung von Zuckern hat.

GLUT2-artige Transporter kommen in einer Vielzahl von Organismen von Insekten bis hin zu Schafen vor und sind evolutionär hoch konserviert (Kellett et al. 2008). Im *C.elegans* gibt es nur einen bekannten GLUT2-artigen Transporter, den FGT-1 (facilitated glucose transporter) (Feng et al. 2013). FGT-1 kommt hauptsächlich in der basolateralen Membran des Digestionstraktes des Wurmes vor. Obwohl FGT-1 ähnlich wie GLUT2 die höchste Affinität gegenüber Glukose aufweist, können auch andere Hexosen wie z.B. Fruktose über dieses Transportprotein aufgenommen werden (Kitaoka et al. 2013). Eine Nullmutation von *fgt-1* führt zu einer Verlängerung der Lebenszeit, die der von *daf-2* Nullmutanten entspricht. FGT-1 hat somit einen direkten Einfluss auf die lebensverlängernden Effekte einer kalorischen Restriktion bzw. einer verminderten Insulin Signaltransduktion (Feng et al. 2013). Darüber hinaus ist FGT-1 auch am Lipid Metabolismus beteiligt, da es durch eine *fgt-1* Nullmutation zu einer vermehrten Ansammlung von Fett kommt (Kitaoka et al. 2013).

1.7.5 Aktivierung von Genen der Lipogenese

Das Verbindungselement zwischen einem vermehrten Einstrom von Glukose in die Zelle über GLUT2 und dem Lipid- und Glukosemetabolismus, bildet der Transkriptionsfaktor SREBP-1c (sterol regulatory element-binding protein 1c – Abbildung 11). Bei Anwesenheit von Insulin und Glukose wird SREBP-1c in den Zellkern transportiert und bindet an spezifische Promoter (SRE - sterol regulatory elements), was zu einer Induktion von Genen der Glykolyse und der Lipogenese führt (Dentin et al. 2005). Eines dieser Gene ist die Acetyl-CoA Carboxylase (ACC) die den ersten und geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Lipogenese katalysiert. Sowohl SREBP-1c als auch ACC haben ein homologes Gen im *C.elegans*. Die Translokation von SBP-1/SREBP-1c führt auch beim *C.elegans* zu einer Induktion von Genen der Lipogenese wie z.B. *pod-2/acc* (Nomura et al. 2010). Die Fütterung von *C.elegans* mit Glukose oder Fruktose führt zu einer SBP-1/SREBP-1c vermittelten Ansammlung von Speicherfett, die durch den Knockdown von *sbp-1* mittels RNAi verhindert werden kann (Nomura et al. 2010).

Abbildung 11: Induktion von Genen der Lipogenese/Glykolyse durch SREBP-1c (Dentin et al. 2005)



Bei Mäusen führt die Überexpression von *srebp-1c* zur Entstehung einer Fettleber und zu gesteigerten mRNA Levels von Genen der Lipogenese (Shimomura et al. 1998), während der Knockout von *srebp-1c* eine verminderte Fähigkeit zur Expression von Genen der Lipogenese zur Folge hat (Liang et al. 2002).

In dieser Arbeit sollen die Effekte der Fütterung von *C.elegans* mit Fruktose, Glukose, Saccharose oder einer 50:50 Mischung aus Fruktose und Glukose auf die Genexpression von Genen des Insulinsignalweges, der Glukoneogenese, der Lipogenese und der Stressantwort (Tabelle 1), sowie den daraus resultierenden Einfluss auf die Stressresistenz (Stress Assay mit Paraquat) der Nematoden untersucht werden. Die Materialien und Methoden die dafür eingesetzt wurden, werden im folgenden Teil aufgelistet und genauer beschrieben.

2. Materialien und Methoden

2.1 Chemikalien und Wasser

2.1.1 Chemikalien

Tabelle 2 - Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller
Ethanol 96%	Roth
Glycerin	Roth
Mercaptoethanol	Roth
Natriumhypochlorit	Roth
5-Fluoro-2'-deoxyuridine (FudR)	Sigma Aldrich (# F0503)
Paraquat dichloride	Sigma Aldrich (# 36541)

Tabelle 3 - Laborwasser

Bezeichnung	Hersteller
DEPC H ₂ O	Invitrogen
Destilliertes H ₂ O (WEK)	
MilliQ H ₂ O	LS Orbital

2.1.2 Lösungen

Tabelle 4 - Zucker

Bezeichnung	Menge	Hersteller
Glukose	5,4 g	Roth
Fruktose	5,4 g	Roth
Saccharose	5,4 g	Roth
Glukose : Fruktose (50:50)	2,7 g : 2,7 g	Roth
Glukose : Fruktose (25:75)	1,35 g : 4,05 g	Roth
MilliQ H ₂ O	25 ml	LS Orbital
1. Einwaage der oben angegebenen Menge an Zucker 2. Zucker in 25 ml MilliQ H ₂ O auflösen (Stocklösung) 3. 300 mM: 6,6 ml MilliQ H ₂ O mit 3,3 ml Stocklösung 50 mM: 9,5 ml MilliQ H ₂ O mit 0,5 ml Stocklösung		

Tabelle 5 - Cholesterin

Bezeichnung	Menge	Hersteller
Cholesterin	0,5 g	Roth
Ethanol 96%	100 ml	Roth

Tabelle 6 - Nystatin

Bezeichnung	Menge	Hersteller
Ammoniumacetat	14,45 g	Roth
Destilliertes H ₂ O	25 ml	
Ethanol 96%	25 ml	Roth
Nystatin	0,5 g	Roth
1. Ammoniumacetat in destilliertem H ₂ O lösen 2. Nystatin in Ethanol lösen 3. Lösungen zusammen bei 50°C im Becherglas mit Magnetprüher homogenisieren 4. Sterilfiltration durchführen		

Tabelle 7 - M9 Puffer

Bezeichnung	Menge	Hersteller
Destilliertes H ₂ O	1000 ml	
KH ₂ PO ₄	3 g	Roth
MgSO ₄ 1M	1 ml	Roth
NaCl	5 g	Roth
Na ₂ HPO ₄	6 g	Roth
1. KH ₂ PO ₄ , Na ₂ HPO ₄ , NaCl in 1000 ml dest. H ₂ O lösen 2. Autoklavieren 3. Nach Abkühlen MgSO ₄ 1M hinzufügen		

Tabelle 8 - Bleach Lösung

Bezeichnung	Menge	Hersteller
KOH 5M	1 ml	Roth
NaOCL	1,5 ml	Roth
MilliQ H ₂ O	10 ml	LS Orbital

Tabelle 9 - C.elegans Glycerinstock

Bezeichnung	Menge	Hersteller
Destilliertes H ₂ O	110 ml	
Glycerin	60 ml	Roth

KH₂PO₄	10 ml	Roth
MgSO₄ 0,1M	0,6 ml	Roth
NaCl	20 ml	Roth
1. Autoklavieren 2. Nach Abkühlen MgSO₄ 0,1M hinzufügen		

Tabelle 10 - Kaliumphosphatpuffer (pH = 6)

Bezeichnung	Menge	Hersteller
KH₂PO₄	54,3 g	Roth
K₂HPO₄	17,64 g	Roth
MilliQ H₂O	10 ml	LS Orbital
1. KH₂PO₄ und K₂HPO₄ einwiegen und in MilliQ H₂O lösen 2. Autoklavieren		

Tabelle 11 - Nematode Growth Medium (NGM)

Bezeichnung	Menge	Hersteller
Agar - Agar	17 g	Roth
CaCl₂ 1M	0,5 ml	Roth
Cholesterin	0,5 g / 100 ml	Roth
Kaliumphosphatpuffer (pH = 6)	25 ml	Roth
MgSO₄ 1M	1 ml	Roth
MilliQ H₂O	1000 ml	LS Orbital
NaCl	3 g	Roth
Nystatin	3 ml	Roth
Pepton	2,5 g	Roth
1. Agar, Pepton und NaCl in 1000ml MilliQ H₂O lösen 2. Autoklavieren 3. MgSO₄, CaCl₂, Cholesterin, Nystatin und Kaliumphosphatpuffer nach Abkühlen auf 60°C im Wasserbad hinzufügen 4. Unter dem Abzug in Petri-Schalen gießen und aushärten lassen		

Tabelle 12 - NGM - Platten mit supplementiertem Zucker

Bezeichnung	Menge	Hersteller
NGM – Platten (siehe Tabelle 10)		
Zuckerlösungen (siehe Tabelle 3)	200 µl	Roth
OP50 Bakterien in LB-Medium (OD₆₀₀ = 0,8)	100 µl	
1. OP50 Bakterien mit Triglaski-Spatel auf NGM-Platten verteilen und 1 Std unter Abzug antrocknen		

2. Jeweilige Zuckerlösung mit Eppendorf-Pipette auf der Platte verteilen und 1 Std antrocknen lassen

Tabelle 13 - NGM-Platten mit FudR und Paraquat

Bezeichnung	Menge	Hersteller
NGM – Platten (siehe Tabelle 10)		
5-Fluoro-2'-deoxyuridine (FudR) 40mM	98,4mg/10ml	Sigma Aldrich
OP50 Bakterien in LB-Medium (OD = 0,8)	100 µl	
Paraquat dichloride	51,4 mg/ml	Sigma Aldrich
1. FudR wird in MilliQ H₂O gelöst und steril filtriert		
2. NGM-Medium wird wie in Tabelle 10 beschrieben angesetzt, jedoch werden zusätzlich 3ml der FudR-Lösung (40mM) pro Liter NGM beigemischt – Endkonzentration an FudR im NGM-Medium entspricht 120µM		
3. Platten gießen und OP50-Bakterien auf den Platten verteilen		
4. Paraquat dichloride wird in MilliQ H₂O gelöst und steril filtriert		
5. 200µl der Paraquat-Lösung werden mit 200 µl der Zuckerlösung/ MilliQ H₂O (für Kontrolle) vermengt und gleichmäßig auf den jeweiligen Platten verteilt		

Tabelle 14 - LB Medium

Bezeichnung	Menge	Hersteller
LB Basis	20 g	Roth
MilliQ H₂O	500 ml	LS Orbital
1. LB Basis einwiegen und in MilliQ H₂O lösen		
2. Autoklavieren		

2.1.3 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 15 - Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller
Cryotubes	Roth
Falcontubes (15 ml, 50 ml)	Sarstedt
Glasperlen (Ø 325-600 µm)	Sigma-Aldrich
Insulinspritze (500 µl)	Terumo
Kulturfläschchen	Sarstedt
Messküvetten (1,5 ml)	Brand
Parafilm	American National Can
PCR-Röhrchen (100 µl)	Eppendorf

Petrischalen (Ø 9 cm)	Roth
Pipettenspitzen (10 µl, 200 µl, 1000 µl)	Sarstedt
Reaktionsröhrchen (1,5 ml)	Eppendorf
Wiegeschiffchen	Roth
Spritzenfilter (21 µm)	Roth
Spritzen	Sarstedt

2.1.4 Kits

Tabelle 16 - Enzym - und Reinigungskits

Bezeichnung	Verwendung	Hersteller
QuantiTec Reverse Transcription Kit	cDNA Transkription	Qiagen
RNAeasy Kit	RNA Extraktion	Qiagen

2.1.5 RT-qPCR Sonden

Tabelle 17 – RT-qPCR Sonden (TaqMan Gene Expression Assay)

Gen-Bezeichnung	Protein	Funktion	Hersteller
<i>csq-1</i>	Calsequestrin	Referenz	Life Technologies
<i>daf-16</i>	Transkriptionsfaktor (FOXO1)	Target	Life Technologies
<i>daf-2</i>	Rezeptor Tyrosin Kinase	Target	Life Technologies
<i>fgt-1</i>	Glukose Transporter	Target	Life Technologies
<i>pck-1</i>	PEP Carboxykinase	Target	Life Technologies
<i>pmp-3</i>	ABC Transporter	Referenz	Life Technologies
<i>pod-2</i>	Acetyl-CoA Carboxylase	Target	Life Technologies
<i>pyc-1</i>	Pyruvat Carboxylase	Target	Life Technologies
<i>sbp-1</i>	bHLH Transkriptionsfaktor (SREBP-1c)	Target	Life Technologies
<i>sir 2.1</i>	Sirtuin	Target	Life Technologies
<i>sod-3</i>	Superoxiddismutase	Target	Life Technologies
<i>Y45F10D.4</i>	Eisen-Schwefel-Cluster-Gerüstprotein	Referenz	Life Technologies
TaqMan GeneExpression MasterMix			Life Technologies

2.1.6 Bakterien

Tabelle 18 - Bakterien

Bezeichnung	Hersteller
<i>E. coli</i> OP50	Caenorhabditis Genetic Center, University of Minnesota

2.1.7 Nematoden

Tabelle 19 - Nematoden

Bezeichnung	Hersteller
<i>C. elegans</i> N2 wild type Bristol	Caenorhabditis Genetic Center, University of Minnesota

2.1.8 Geräte

Tabelle 20 - Geräte

Bezeichnung	Verwendung	Hersteller
Beadbeater	Homogenisation	Biospec
Blockheater SBH200D	Heizblock	Stuart
BR4i Centrifuge	Standzentrifuge	Jouan
Cary 50 Scan	Photometrie	Varian
CH2	Mikroskop	Olympus
MC410S	Feinwaage	Sartorius
MS1 Minishaker	Vortexer	IKA
Picodrop	RNA Messung	Picodrop
RCT Basic	Magnetrührer	IKA
Realtime PCR 7300	RT-qPCR	Applied Biosystems
Tablecentrifuge	Tischzentrifuge	Biozym
Wild M3C	Mikroskop	Wild

2.2 Methoden

2.2.1 Bakterienhandling

E.coli Bakterien (OP50) dienen dem Nematoden *C. elegans* als Nahrungsquelle. Die Bakterien werden in Glycerinstocks bei -60°C im Tiefkühlschrank aufbewahrt. Zur Vermehrung der Bakterien werden 5 ml LB-Medium in einem 50 ml Falcontube vorgelegt. Die Bakterien werden dann mit Hilfe einer Impföse

aus den Cryotubes entnommen und in das LB-Medium überführt. Das Falcontube wird dann über Nacht bei 37°C in den Brutschrank gestellt. Um eine ausreichende Sauerstoffzufuhr für den Bakterienstoffwechsel zu gewährleisten, wird der Deckel des Falcontubes nicht fest verschlossen, sondern lediglich leicht auf das Falcontube aufgelegt. Die Wachstumskontrolle erfolgt dann durch eine photometrische Messung der Bakteriendichte bei 600nm. Die OD₆₀₀ sollte dabei zwischen 0,8 und 1,0 liegen. Falls die OD₆₀₀ zu hoch ist, kann sie durch Zugabe von LB-Medium auf 0,8 – 1,0 eingestellt werden. Je 100µl der Bakterien werden auf je eine NGM-Platte aufgetragen und gleichmäßig mit einem Trigalski-Spatel auf der Oberfläche verteilt. Um eine Kontamination der Platten mit fremden Bakterien zu vermeiden wird dieser Arbeitsschritt unter dem zuvor desinfizierten Abzug durchgeführt. Außerdem wird der Trigalski-Spatel vor und nach dem Verteilen der Bakterien abgeflammt und in der Zwischenzeit in 30%igen Ethanol gestellt. Die Petrischalen werden dann für ca. 1Std im geschlossenen Abzug gelagert bis das LB-Medium angetrocknet ist. Die fertigen NGM Platten werden dann in eine sterile Aufbewahrungsbox gegeben und bis zum Gebrauch (maximal 2 Wochen) bei 4°C im Kühlraum gelagert.

2.2.2 C. elegans wildtype N2 Bristol

Für alle angeführten Versuche wurden *C. elegans* wildtype N2 Bristol Stämme verwendet. Die Nematoden werden in Glycerinstocks bei -60°C im Tiefkühlschrank aufbewahrt. Bei Bedarf werden die Würmer mit Hilfe einer Eppendorf-Pipette auf NGM-Platten überführt. Die Platten werden über Nacht bei 20°C in den Inkubator gegeben. Nach ca. 16 Stunden werden die Nematoden mit M9- Puffer von den Platten gespült und durch mehrmaliges Waschen von den Glycerin-Rückständen befreit. Die Nematoden werden dann wieder auf NGM-Platten gegeben. Um eine Beeinträchtigung der Würmer durch die Lagerung in Glycerin auszuschließen, werden mehrere Generationen abgewartet bis Versuche durchgeführt werden. Hierfür werden alle 2-4 Tage 5 Würmer mit einem hitzesterilisierten Spatel auf eine neue NGM-Platte überführt, um eine ausreichende Nahrungsversorgung zu gewährleisten.

2.2.3 EggPrep

Der EggPrep wird eingesetzt, um aus den *C.elegans* Mischkulturen eine synchronisierte Population von L1-Larven zu erhalten. Da das Entwicklungsstadium der Nematoden einen direkten Einfluss auf die Genexpression hat, werden für die Versuche späte L4-Larven/junge adulte Würmer verwendet die sich alle im gleichen (altersbedingten) Entwicklungszustand befinden. Die Mischkulturen eignen sich für den EggPrep wenn sich viele junge, adulte Würmer auf der Platte befinden, die bereits angefangen haben Eier zu legen (Kontrolle unter dem Mikroskop).

EggPrep Protokoll:

- Die Würmer/Eier werden mit 2 x 3 ml M9-Puffer von den NGM-Platten abgespült und in zwei 15 ml Falcontubes überführt → NGM-Platten werden unter dem Mikroskop auf zurückgebliebene Würmer/Eier überprüft
- Das Falcontube für 5-10 min in einem Gestell stehen lassen, bis sich die Würmer am Boden absetzen → Der Überstand wird abgenommen und verworfen um die Bakterien aus der Lösung zu entfernen
- Das Wurmpellet wird in 5 ml M9-Puffer resuspendiert und für 2 min bei 2500 rpm und 20°C zentrifugiert
- Der Überstand wird abgenommen und das Wurmpellet erneut in 5 ml M9- Puffer resuspendiert und zentrifugiert. Dieser Vorgang wird so lange wiederholt bis der Überstand klar ist (ca. 2 bis 3-mal).
- Das Wurmpellet wird dann mit 5 ml der Bleach-Lösung versetzt und für 10 min gevortext → dadurch werden die enthaltenen Würmer abgetötet, während die Wurmeier unversehrt bleiben
- Das Falcontube wird dann erneut für 2 min bei 2500 rpm und 20°C zentrifugiert. Die Bleach-Lösung im Überstand wird mit einer Pipette abgenommen und verworfen
- Um die Eier restlos von der Bleach-Lösung zu befreien, wird das Pellet in 5 ml M9- Puffer aufgelöst und für 2 min bei 2500 rpm und 20°C

zentrifugiert → dieser Waschvorgang wird 4 mal wiederholt um die Bleach-Lösung restlos zu entfernen

- Das Pellet wird dann in 10 ml M9-Puffer gelöst und in ein Kulturfläschchen überführt
- Das Kulturfläschchen wird mit leicht geöffnetem Deckel auf den Kippschüttler gestellt und über Nacht bei 20°C inkubiert → Die Larven schlüpfen über Nacht

2.2.4 Synchronisierte *C. elegans* Larven

Für die Versuche werden synchronisierte *C. elegans* Larven verwendet. Die nach dem EggPrep über Nacht geschlüpften L1-Larven werden abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Wurmpellet wird dann in den zurückgebliebenen 0,5 ml M9- Puffer durch leichtes schütteln des Falcontubes aufgelöst. Unter dem Mikroskop wird nun überprüft ob genügend L1-Larven für den Versuch zur Verfügung stehen. Die synchronisierten L1-Larven werden dann mit einer Eppendorf-Pipette aufgenommen und tropfenweise auf die mit unterschiedlichen Zuckern präparierten NGM-Platten aufgetragen. Die NGM-Platten werden mit Parafilm versiegelt, um eine Kontamination durch Fremdorganismen zu verhindern, und mit dem Deckel nach unten in eine sterilisierte Aufbewahrungsbox gegeben. Die L1-Larven werden für 50 Std. bei 20°C im Brutschrank inkubiert. Die so erhaltenen synchronisierten L4-Larven/jungen adulten Würmer werden für die weitere Durchführung der unterschiedlichen Versuche verwendet.

2.2.5 Supplementation mit Zucker

Um den Einfluss von unterschiedlichen Einfach- und Mehrfachzuckern auf *C. elegans* zu untersuchen, werden die NGM-Platten neben den OP50 Bakterien auch mit unterschiedlichen Zuckerlösungen angereichert. Hierfür werden Zuckerlösungen hergestellt (siehe Tabelle 3) und durch einen Spritzenfilter (Ø 21 µm) sterilfiltriert. Je 200 µl der Zuckerlösungen werden mit einer Eppendorf-Pipette gleichmäßig auf den NGM-Platten verteilt, die zuvor schon mit OP50 Bakterien bestückt wurden. Die NGM-Platten werden dann für ca. 1 Stunde im

geschlossenen Abzug gelagert, bis die Zuckerlösungen angetrocknet sind. Sobald die Platten getrocknet sind werden sie mit den L1-Larven aus dem EggPrep bestückt (bzw. mit den Würmern die bei den Versuchen alle 2 Tage umgesetzt werden). Da der Zucker ein ideales Nährmedium für zahlreiche Mikroorganismen bietet, werden die mit Zucker angereicherten NGM-Platten nicht gelagert, sondern vor jedem Versuch frisch hergestellt.

2.2.6 RNA Extraktion und Reinigung

Um die mRNA-Level vergleichen und somit den Einfluss der unterschiedlichen Zucker auf die Genexpression messen zu können, muss zuerst die gesamte intrazelluläre RNA der Nematoden extrahiert werden. Außerdem dient dieser Schritt dazu, die RNA der Nematoden von Alkoholen und bakterieller RNA zu reinigen. Um die Zellen der Nematoden aufzubrechen, werden sie in flüssigem Stickstoff schockgefroren und im Anschluss mit Glasperlen versetzt, um sie im Beadbeater zu homogenisieren.

Protokoll:

- Die Würmer werden mit 3,0 ml M9- Puffer von den Platten gespült und in ein 15 ml Falcontube überführt
- Das Falcontube wird für 10 min in einem Gestell stehen gelassen, bis die Würmer an den Boden des Falcontubes abgesunken sind → der entstandene trübe Überstand enthält einen Großteil der Bakterien und wird mit der Pipette abgenommen und verworfen
- Zu dem Wurmpellet werden 5 ml M9- Puffer hinzugefügt und bei 2500 rpm für 2 min bei 20°C abzentrifugiert. Der Überstand wird mit der Pipette abgenommen und verworfen → dieser Waschvorgang wird 3 Mal wiederholt
- Das Wurmpellet wird nun in 1 ml RLT-Puffer aus dem Qiagen-Extraktionskit gelöst. Der RLT-Puffer wurde zuvor mit dem Stabilisator Mercaptoethanol versetzt (1mM)
- Das Falcontube wird dann in flüssigem Stickstoff schockgefroren → die Zellen werden thermisch aufgebrochen

- Nach dem Auftauen wird die Lösung in ein Cryotube überführt. Die Cryotubes werden zuvor mit sterilen Glasperlen bestückt, die die Homogenisierung im Beadbeater ermöglichen.
- Die Cryotubes werden in den Beadbeater gegeben und eine Minute gebeated. Da sich die Lösung durch diesen Vorgang erwärmt, werden die Cryotubes danach für eine Minute auf Eis gelagert um die RNA nicht zu beschädigen. Dieser Vorgang wird 2 Mal wiederholt, um die Zellen restlos aufzubrechen
- Die Cryotubes werden dann bei 12000 rpm für 3 min bei 4°C zentrifugiert
- Die weiteren Arbeitsschritte werden im zuvor gereinigten/sterilisierten Abzug fortgesetzt, um eine Kontamination zu vermeiden
- Die Zellsuspension wird mit Hilfe von Insulinspritzen aufgenommen und in 1,5 ml Eppendorf-Tubes überführt. Die Cryotubes mit den zurückgebliebenen Glasperlen werden mit 200 µl RLT-Puffer versetzt und erneut für 1 min bei 12000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wird ebenfalls in die Eppendorf-Tubes überführt → die restliche RNA wird so aus den Glasperlen gewaschen und geht nicht verloren
- Aus der so erhaltenen Lösung kann nun mit Hilfe des RNAeasy Kits die RNA extrahiert werden

RNAeasy Kit (Qiagen) – Protokoll

- Zu den Eppendorf-Tubes werden nun gleiche Mengen an 70% Ethanol hinzugefügt (ca. 0,7 ml)
- Die Lösung wird dann mit einer Eppendorf-Pipette in die RNAeasy Kit Säule mit Reinigungsmembran überführt
- Die Membransäule wird dann bei 4°C und 10000 rpm für 15 Sekunden zentrifugiert. Die RNA wird dabei in der Membran zurückgehalten → der Durchfluss wird verworfen
- 700 µl RW1 Puffer werden auf die Membran pipettiert und erneut abzentrifugiert → Durchfluss wird verworfen
- 500 µl RPE Puffer werden auf die Membran pipettiert und abzentrifugiert → Durchfluss wird verworfen

- Die Membransäule wird nun auf ein 1,5 ml Eppendorf-Tube gesteckt, dass als Auffangbehältnis für die RNA dient
- Die RNA wird nun extrahiert indem 30 µl RNAase-freies Wasser (aus dem Kit) auf die Membran pipettiert wird. Durch erneutes zentrifugieren wird die RNA aus der Membran gelöst und in dem Eppendorf-Tube aufgefangen
- Das Wasser enthält die gereinigte RNA

2.2.7 Reverse Transkription

Da eine einzelsträngige RNA nicht durch eine PCR amplifiziert werden kann muss die RNA zuvor in cDNA umgeschrieben werden. Außerdem ist die cDNA stabiler und wird im Gegensatz zur RNA auch durch mehrmaliges Einfrieren und Auftauen nicht beschädigt. Das Umschreiben erfolgt enzymatisch durch eine Reverse Transkriptase die im QuantiTec Reverse Transcription Kit (Qiagen) enthalten ist. Die RNA-Menge der einzelnen Proben wird zuvor mit Hilfe eines Picodrops bestimmt. Für die Transkription werden RNA-Lösungen mit einer Konzentration von 500 ng/µl hergestellt.

QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen) – Protokoll

- 2 µl der RNA-Lösung (entspricht 1 µg RNA) wird mit 2 µl gDNA Wipeout Puffer aus dem Kit in ein 100 µl Tube pipettiert und mit 10 µl DEPC Wasser auf ein Endvolumen von 14 µl verdünnt.
- Die Lösung wird für 2 min bei 42°C auf dem Heizblock inkubiert und danach auf Eis gelagert
- In einem weiteren 100 µl Tube wird ein Master Mix aus 4 µl Quantiscript RT-Puffer, 1 µl Primer Mix und 1 µl der Reversen Transkriptase angesetzt. Dieser Schritt wird wegen der Hitzempfindlichkeit ebenfalls auf Eis durchgeführt. Die Reverse Transkriptase wird erst zum Schluss aus dem Tiefkühlschrank geholt und zu dem Master Mix gegeben, da diese bei Raumtemperatur sehr instabil ist.

- 6 µl Master Mix werden mit den zuvor hergestellten 14 µl der Probenlösung vermengt
- Das Tube mit einem Gesamtinhalt von 20 µl wird dann in eine Endpunkt-PCR (PeyLab) gegeben und für 15 Minuten bei 42°C und weitere 5 Minuten bei 95°C inkubiert → die erhaltene cDNA-Lösung wird zur Quantifizierung mittels RT-qPCR verwendet und kann bis zur Messung bei -20° C im Tiefkühlschrank aufbewahrt werden

2.2.8 RT-qPCR

Die RT-qPCR wird in diesem Versuch zur relativen Quantifizierung ($\Delta\Delta C_t$ -Methode) der mRNA-Level der unterschiedlich behandelten Nematoden (Glukose, Fruktose, etc.) eingesetzt. Die Unterschiede zwischen den Wurmpopulationen werden dabei als n-fache Expression mittels des $\Delta\Delta C_t$ -Wertes angegeben. Als Kontrolle werden Würmer verwendet, die auf NGM-Platten mit OP50 Bakterien (ohne Zucker) gezüchtet werden.

Die cDNA-Lösungen werden vor der Messung um den Faktor 1:2,5 mit DEPC Wasser von 20 µl auf 50 µl verdünnt. Somit wird sichergestellt, dass genügend cDNA-Lösung für eine 96-well-plate vorhanden ist. Außerdem wird durch das Verdünnen eine optimale cDNA-Konzentration für eine hohe Auflösung der Messung erhalten. Für jedes Gen, das gemessen werden soll wird ein Master Mix mit der jeweiligen Gen-Sonde nach dem folgenden Pipettierschema hergestellt.

Pipettierschema – RT qPCR Master Mix (1X)

- 12,5 µl TaqMan Gene Expression Master Mix
 - 8,75 µl DEPC H₂O
 - 1,25 µl TaqMan Sonde
- 22,5 µl Master Mix

Im Rahmen dieser Masterarbeit wurden TaqMan Sonden für 9 Target-Gene (*daf-16*, *daf-2*, *fgt-1*, *pck-1*, *pod-2*, *pyc-1*, *sbp-1*, *sir 2.1*, *sod-3*) und 3 Referenz-

Gene (Housekeeping genes: *csq-1*, *pmp-3*, *Y45F10D.4*) verwendet. Ein Beispiel für die Aufteilung einer 96-well-plate findet sich in Tabelle 20. Die grün markierten Referenz-Gene werden bei jeder Messung mitgemessen. Die gelb markierten Target-Gene variieren je nach den zu untersuchenden Genen. Die Expression der unterschiedlichen Gene wird für jede Gruppe (rot) im Doppelansatz gemessen und die Ergebnisse durch mindestens eine biologische Wiederholung bestätigt.

Tabelle 21 - Pipettierschema für RT-qPCR (Beispiel)

	<i>pmp-3</i>	<i>pmp-3</i>	<i>csq-1</i>	<i>csq-1</i>	<i>y45</i>	<i>y45</i>	<i>fgt-1</i>	<i>fgt-1</i>	<i>pod-2</i>	<i>pod-2</i>	<i>sbp-1</i>	<i>sbp-1</i>
CTR	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
GLC	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
FRU	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
SAC	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
50/50	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
25/75	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
NTC	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X

Protokoll für RT-qPCR – TaqMan Gene Expression Assay

Die Vorbereitungen für die RT-qPCR Messung finden unter dem Abzug statt der zuvor gründlich mit 96%igen Ethanol sterilisiert wird. Außerdem werden die Arbeiten durchgehend auf Eis durchgeführt.

- Den Master Mix nach Pipettierschema in Eppendorf-Tubes herstellen. Da alle Gene im Doppelansatz gemessen werden, wird die 14-fache Menge an Master Mix für jede Sonde vorbereitet.
- Die sterile 96-well-plate wird auf das Eis gestellt.
- Je 22,5 µl Master Mix für die einzelnen Sonden wird in die jeweiligen wells vorgelegt.
- Die cDNA-Lösungen werden aus dem Tiefkühlschrank genommen und aufgetaut. Nach dem Auftauen werden die Proben kurz gevortext und dann mit der Tischzentrifuge kurz abzentrifugiert.

- Je 2,5 µl der jeweiligen cDNA- Lösung wird zum Master Mix in die wells pipettiert.
- Bei jeder Messung wird eine Leerkontrolle (NTC = no template control) mitgemessen, die lediglich den Master Mix enthält und statt der cDNA mit 2,5 µl DEPC-Wasser auf 25 µl Gesamtvolumen aufgefüllt wird. → dient zur Kontrolle des Master Mix und der Sonden und wird später von der PCR Software zum Kalibrieren (Null-Wert) verwendet.
- Die 96-well-plate wird mit einer speziellen Folie luftdicht versiegelt.
- Die Platte wird dann kurz zentrifugiert um sicher zu stellen, dass die cDNA komplett im Master Mix gelöst ist.
- Die Platte wird in das qPCR-System gestellt und ist bereit für die Messung.

2.2.9 RT-qPCR Handling

Vor der Messung muss die Applied Biosystems 7300 RT-qPCR mit Hilfe der Software eingestellt werden. Zuerst wird als Methode die relative Quantifizierung ($\Delta\Delta C_t$ -Methode) ausgewählt. Danach wird das jeweilige Pipettierschema eingegeben. Die Leerkontrollen werden mit NTC bezeichnet. Das Signal der NTC-Werte dient als Kalibrator und wird bei der Auswertung von den gemessenen Werten der Proben abgezogen (Null-Wert).

Temperaturprogramm

Das Temperaturprogramm wird für die Sonden optimiert, so dass alle Sonden die Plateauphase erreichen. Das Programm teilt sich in die folgenden Phasen auf:

<u>Initiation:</u>	50°C für 2:00 Minuten
	93°C für 5:00 Minuten – Aktivierung der Hot-Start Polymerase
<u>Denaturierung:</u>	93°C für 0:15 Minuten
<u>Annealing und Elongation:</u>	60°C für 1:00 Minuten

Anzahl der Zyklen: 49

Probenvolumen: 25 µl

Nachdem das Programm beendet ist, berechnet die Software die C_t -Werte. Die C_t -Werte können dann zur weiteren Bearbeitung als Excel-Datei exportiert werden.

2.2.10 Stress Assay mit Paraquat dichloride

Der Stress Assay wird eingesetzt, um herauszufinden, ob die Behandlung mit unterschiedlichen Zuckern zu einer Veränderung der Stressresistenz über DAF-16/FOXO1 führt. Hierfür werden die Nematoden zuerst durch einen EggPrep synchronisiert. Die L1-Larven werden auf NGM-Platten gegeben die, entweder nur mit OP50 Bakterien (Kontrolle) oder zusätzlich mit dem jeweiligen Zucker (Glukose, Fruktose, Glukose/Fruktose 50:50) bestückt sind. Nach 50 Stunden werden von jeder Platte 30 Nematoden mit Hilfe eines Platinum-Drahtes auf neue NGM-Platten mit 5-Fluoro-2'-deoxyuridine (FudR) und Paraquat dichloride überführt (siehe Tabelle 12). Das enthaltene FudR verhindert durch Blockieren der Thymidin Synthase, dass der Nachwuchs der Nematoden heranwachsen kann und der Versuch so verfälscht wird. Das Paraquat dichloride induziert oxidativen Stress durch die Generierung von Superoxid-Radikalen. Die Paraquat-Lösung wird vor dem Umsetzen mit der jeweiligen Zuckerlösung vermischt und gleichmäßig auf den Platten verteilt. Um eine Kontamination der Platten zu vermeiden werden alle Lösungen vor jedem Einsatz mit Hilfe von Spritzenfiltern steril filtriert. Die Anzahl der lebenden Würmer wird dann täglich kontrolliert. Außerdem werden die Würmer alle zwei Tage auf neue Platten umgesetzt, um eine ausreichende Versorgung zu gewährleisten. Der Versuch endet erst nachdem alle Nematoden auf den jeweiligen Platten gestorben sind. Die Nematoden werden als tot gewertet, wenn sie nicht auf Berührung mit dem Platinum-Draht reagieren und kein Pulmonares Pumpen zu erkennen ist. Nematoden, die von den Platten kriechen oder nicht mehr auffindbar sind werden von der Auswertung ausgeschlossen.

3. Ergebnisse

3.1 Messung der Genexpression mittels RT- qPCR

Die aus den qPCR-Messungen erhaltenen mRNA-Level werden in den folgenden Abschnitten mit SigmaPlot grafisch dargestellt. Alle Gene werden im Doppelansatz gemessen und die Ergebnisse durch mindestens 2 biologische Wiederholungen bestätigt. Die Höhe der mRNA-Level in den Versuchsgruppen (Glukose, Fruktose, Saccharose, 50/50 Glukose/Saccharose) wird dabei als Mehrfaches der mRNA-Level der Kontrollgruppe (keine Zuckersupplementation) angegeben. Die Höhe der Balken entspricht dem Mittelwert, der sich aus den biologischen Wiederholungen ergibt. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler an, der sich aus der Standardabweichung ableitet. Das Hauptaugenmerk dieser Arbeit liegt dabei auf dem Insulinsignalweg und dessen nachgeschalteten Enzymen, die unter anderem in der Zucker- und Lipidhomöostase, aber auch in der Stressregulation eine wichtige Rolle spielen.

3.1.1 Der Insulinrezeptor - *daf-2*

Das *daf-2* Gen kodiert eine Rezeptor Tyrosin Kinase des *C.elegans*, die ortholog zum Insulin/IGF Rezeptor ist. Obwohl die Aufnahme von Fruktose insulinunabhängig ist, führt die Fütterung von 5,4% Fruktose zu einem höheren Anstieg der mRNA-Level von *daf-2* als die Fütterung von gleichen Mengen an Glukose oder Saccharose. Die Supplementation mit einer 50:50 Mischung aus Glukose und Fruktose in freier Form führt außerdem zu einem höheren Anstieg der mRNA-Level als die Fütterung von Saccharose. Obwohl in beiden Fällen die gleiche Menge an Fruktose und Glukose zugeführt wird, hat die Aufnahme in gebundener Form (Saccharose) einen niedrigeren Anstieg der mRNA-Level zu Folge als durch die Fütterung der 50:50 Mischung der beiden Einfachzucker in freier Form (Abbildung 12). Der mRNA-Level steigt dabei in Abhängigkeit von der aufgenommenen Menge an Fruktose. Abbildung 13 zeigt den Anstieg der mRNA-Level durch die Gabe von Fruktose in unterschiedlich hohen Konzentrationen.

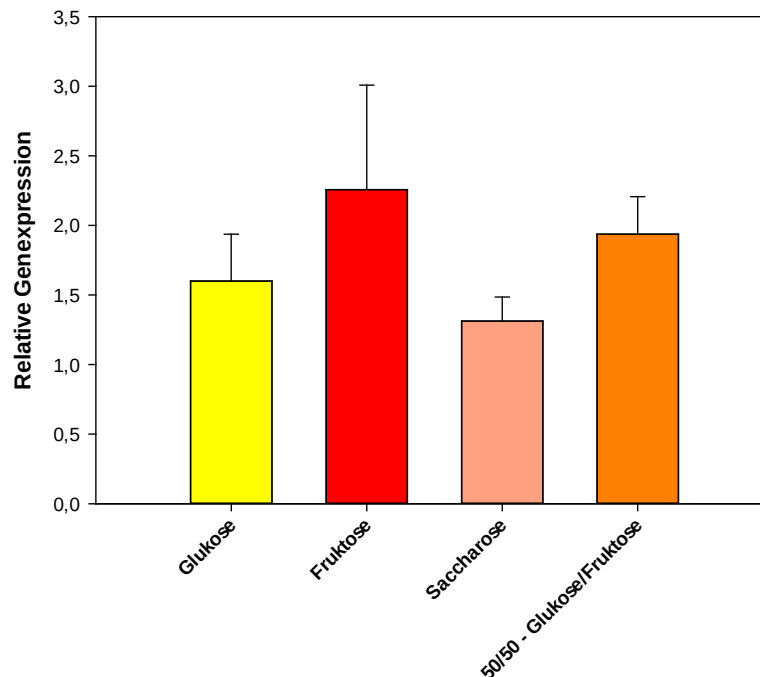
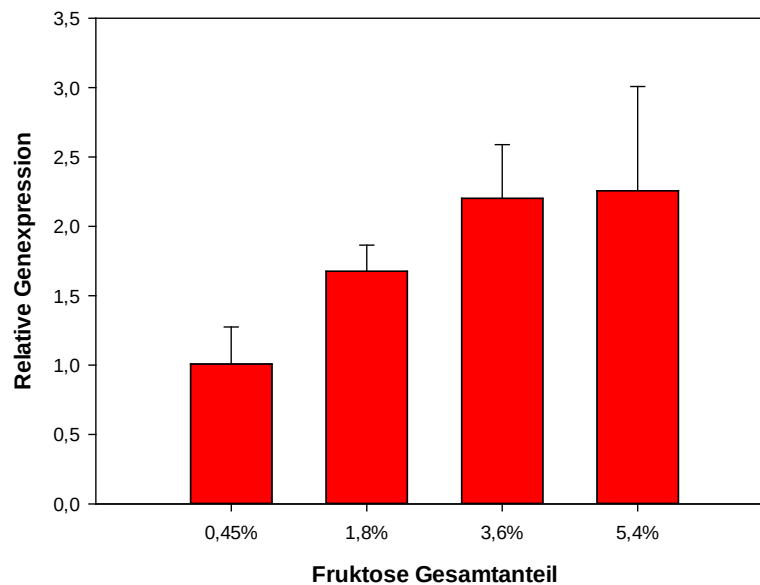
Abbildung 12: Relative mRNA-Level von *daf-2*

Abbildung 13: Abhängigkeit der mRNA-Level von der Fruktosemenge

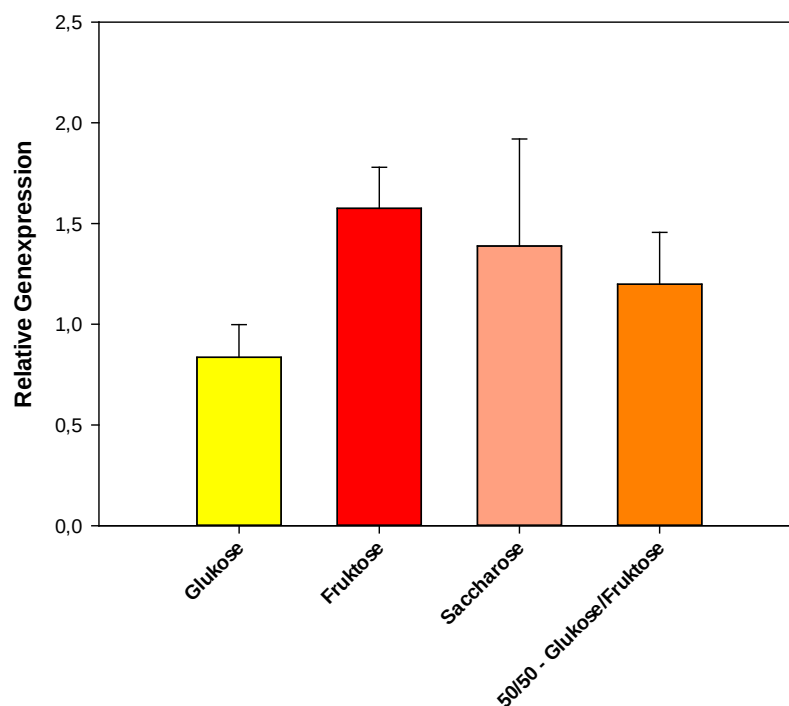


3.1.2 Protein Deacetylase - *sir 2.1*

Das *sir 2.1* Gen kodiert eine NAD⁺-abhängige Protein Deacetylase, die zur Familie der Sirtuine gehört. In Abbildung 14 erkennt man deutlich, dass die Expression von *sir 2.1* durch Fruktose stimuliert wird. Die Fütterung mit 5,4%

Fruktose führt zu einem deutlichen Anstieg der mRNA-Level, während die mRNA-Level nach der Fütterung mit 5,4% Glukose sogar im Vergleich zur Kontrollgruppe leicht absinken. Sowohl durch die Fütterung mit Saccharose als auch durch die Fütterung einer 50:50 Mischung von Fruktose und Glukose steigt die Genexpression von *sir 2.1* leicht an.

Abbildung 14: Relative mRNA-Level von *sir 2.1*

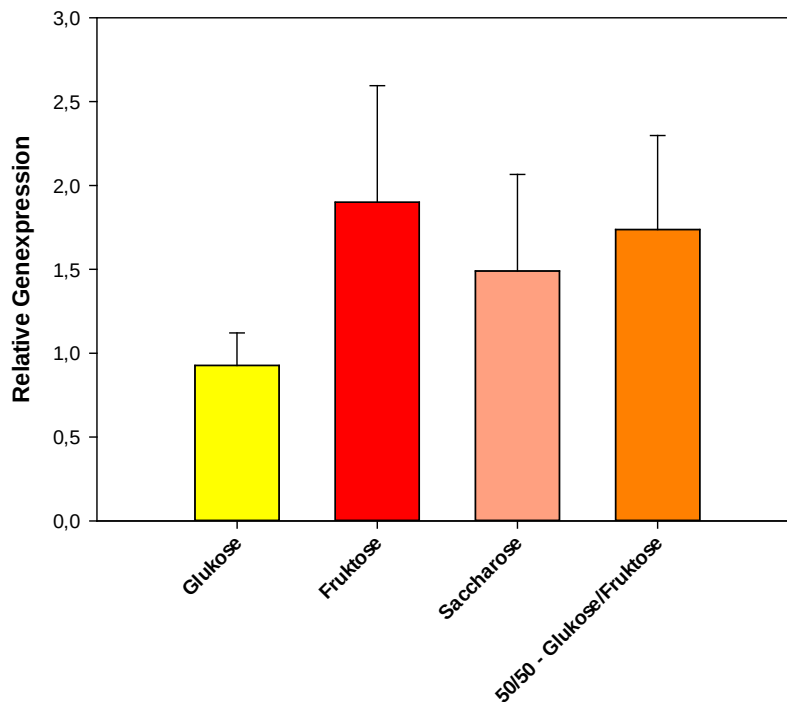


3.1.3 Transkriptionsfaktor - *daf-16/FoxO*

Die Aktivierung von *sir 2.1* hat eine dementsprechende Hochregulierung von *daf-16/FoxO* zur Folge. Obwohl die Aktivität von DAF-16/FOXO eher durch die Translokation aus bzw. in den Zellkern bestimmt wird, führt die Fütterung von 5,4% Fruktose zu einem deutlichen Anstieg der mRNA-Level (Abbildung 15). Genau wie bei *sir 2.1* führt auch hier die Fütterung von 5,4% Glukose zu einer Downregulation von *daf-16/FoxO*, während sowohl bei der Saccharose als auch bei der 50:50 Mischung ein leichter Anstieg der mRNA-Level zu erkennen ist. Die Ergebnisse zeigen deutlich einen Zusammenhang zwischen der Fütterung von Fruktose und der Hochregulierung von *sir 2.1*, was wiederum die Hochregulierung von *daf-16/FoxO* zur Folge hat. Die daraus resultierenden

Auswirkungen auf Gene der Fettsäuresynthese, der Glukoneogenese sowie auf Stressgene werden in den folgenden Abschnitten gezeigt.

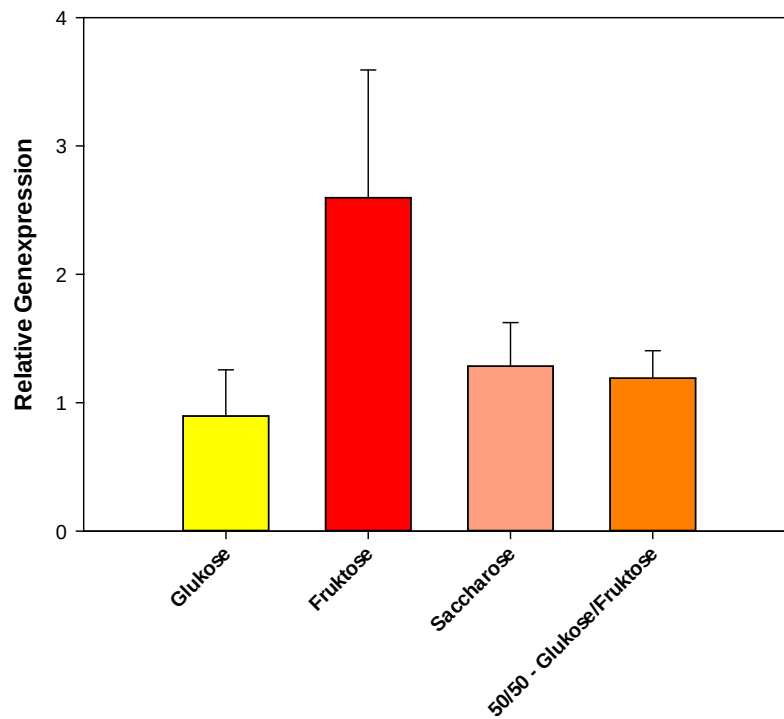
Abbildung 15: Relative mRNA-Level von *daf-16*



3.1.4 Superoxiddismutase - *sod-3*

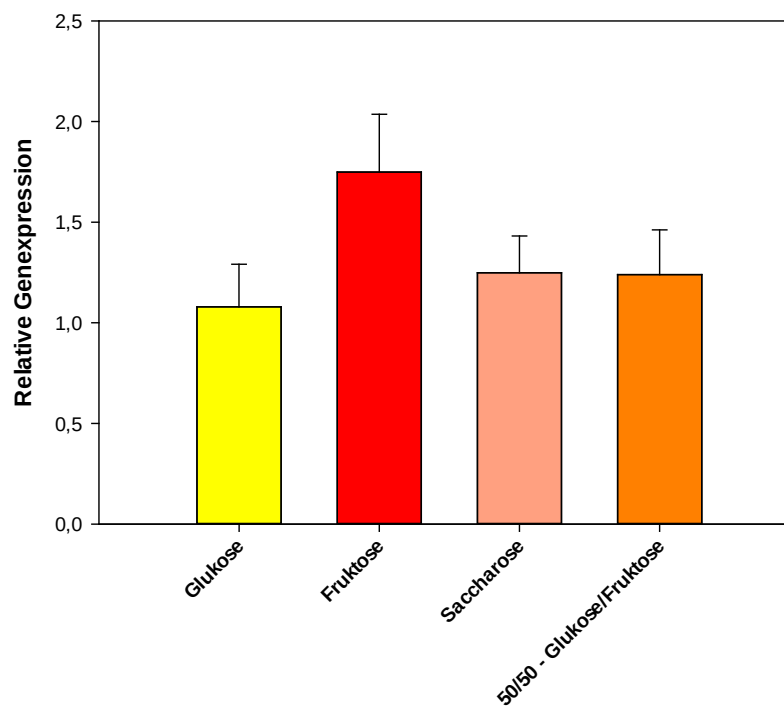
Das Gen *sod-3* kodiert für eine Superoxiddismutase, die im Regelfall durch oxidativen Stress aktiviert wird. Durch die Fütterung von 5,4% Fruktose wird *sod-3* jedoch ebenfalls sehr stark hochreguliert (Abbildung 16). Keiner der anderen Zucker hatte einen annähernd starken Anstieg der mRNA-Level zur Folge als die Fruktose. Durch die Fütterung von 5,4% Glukose kommt es nicht zu einer vermehrten Expression von *sod-3*. Lediglich bei der Saccharose lässt sich ein leichter Anstieg der mRNA-Level feststellen. Die Auswirkungen auf die Stressresistenz der Nematoden zeigen sich an den Ergebnissen des Stress Assays (s.u.). Die gleichzeitige Anwesenheit von Glukose scheint die vermehrte Expression von *sod-3* durch Fruktose zu verhindern.

Abbildung 16: Relative mRNA-Level von *sod-3*



3.1.5 Pyruvat Carboxylase - *pyc-1*

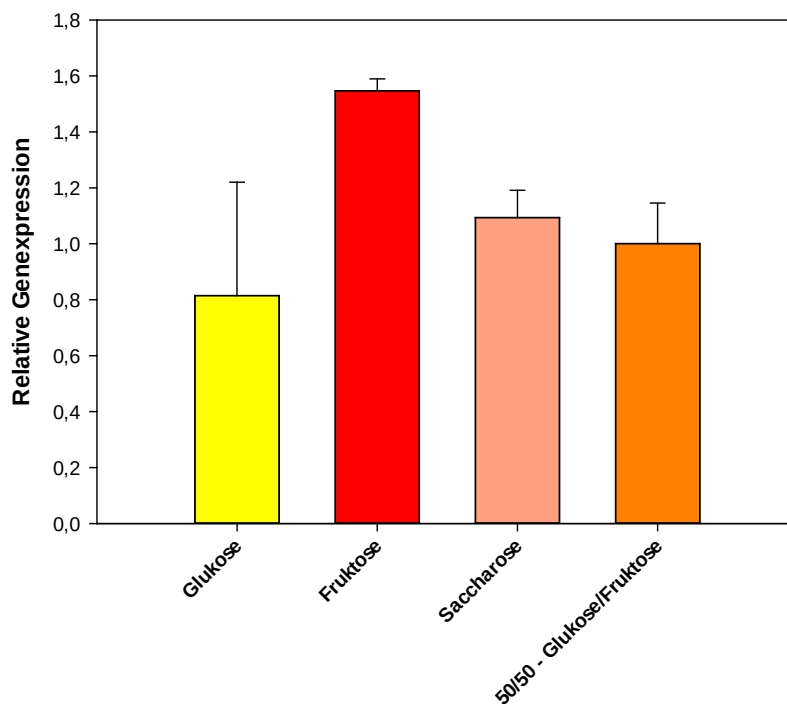
Abbildung 17: Relative mRNA-Level von *pyc-1*



Das Gen *pyc-1* kodiert für die Pyruvat Carboxylase. Als eines der Schlüsselenzyme reguliert die Pyruvat Carboxylase die Glukoneogenese, die Lipogenese und hat im weiteren Sinne auch anaplerotische Funktionen im *C.elegans*. Die Fütterung von 5,4% Fruktose führt zu einem deutlichen Anstieg der mRNA-Level. Bei der Glukose kommt es zu keinem Anstieg, während die mRNA-Level bei den anderen Zuckern nur sehr geringfügig ansteigen.

3.1.6 Phosphoenolpyruvat Carboxykinase - *pck-1*

Abbildung 18: Relative mRNA-Level von *pck-1*

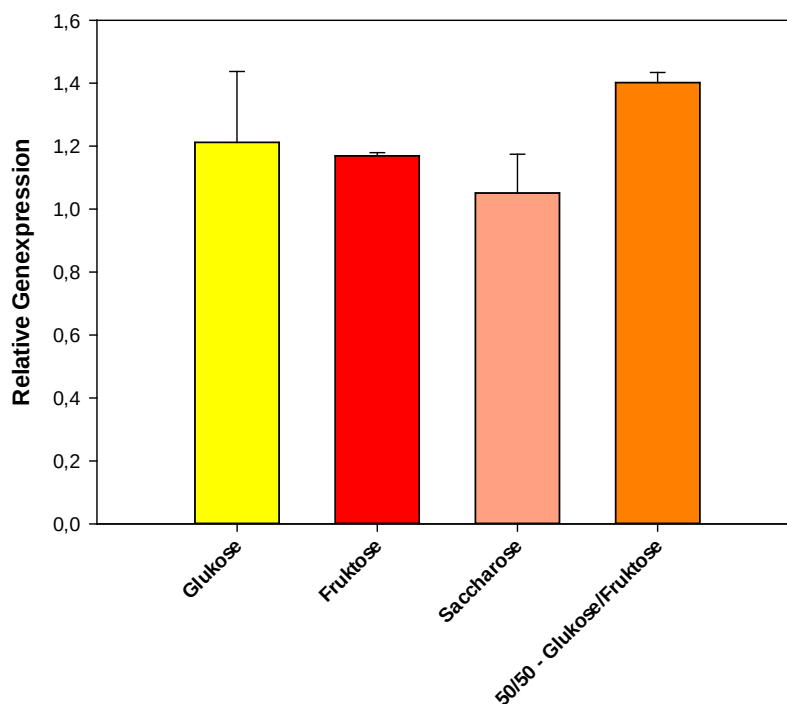


Das Gen *pck-1* kodiert eine Phosphoenolpyruvat Carboxykinase, die den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Glukoneogenese katalysiert. Im Gegensatz zu *pyc-1* konnte die Genexpression von *pck-1* nur durch die Fruktose deutlich gesteigert werden. Die Fütterung von 5,4% Glukose hat erwartungsgemäß eine leichte Senkung der mRNA-Level zur Folge, während die Genexpression durch die Fütterung der anderen Zucker im Vergleich zur Kontrolle nicht beeinflusst wird. Sowohl *pyc-1* als auch *pck-1* werden bei Anwesenheit von Fruktose hochreguliert, obwohl in beiden Fällen kein Mangel an Energie in der Zelle vorliegen kann.

3.1.7 Glukosetransporter - *fgt-1*

Das Gen *fgt-1* kodiert für den einzigen bekannten GLUT2-ähnlichen Transporter, der in *C.elegans* bekannt ist. Da der Transport von Glukose und Fruktose durch die Zellmembran über diesen Transporter stattfindet, besteht eine starke Verbindung zur Aktivität des Insulinrezeptors. Die Fütterung von Fruktose oder Glukose führt in beiden Fällen zu einem leichten Anstieg der Genexpression. Durch die Fütterung der 50:50 Mischung aus Glukose und Fruktose steigen die mRNA-Level jedoch stärker an als bei der alleinigen Gabe von Fruktose oder Glukose. Die Aufnahme der Fruktose könnte also durch die gleichzeitige Gabe von Glukose leicht verstärkt werden.

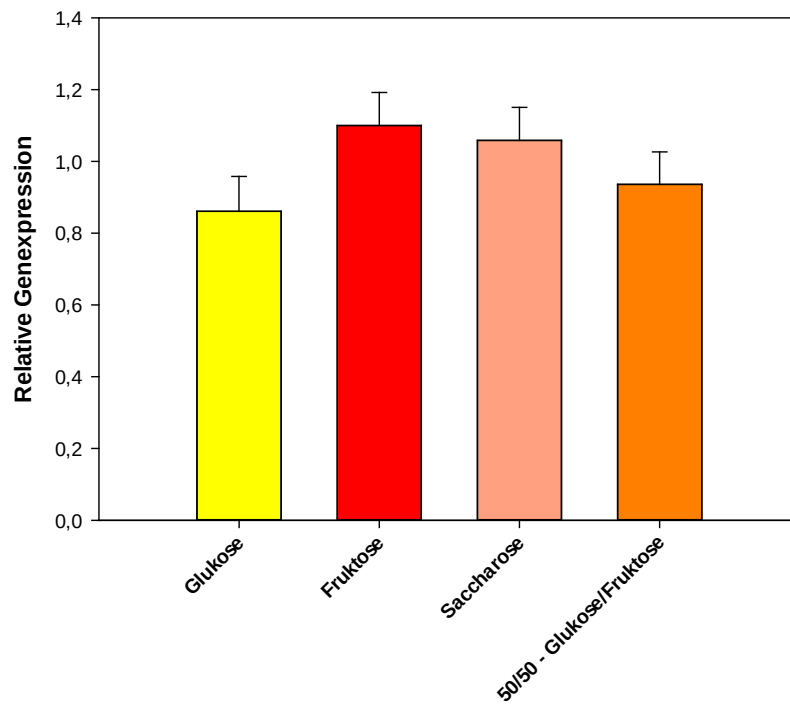
Abbildung 19: Relative mRNA-Level von *fgt-1*



3.1.8 Transkriptionsfaktor - *sbp-1*

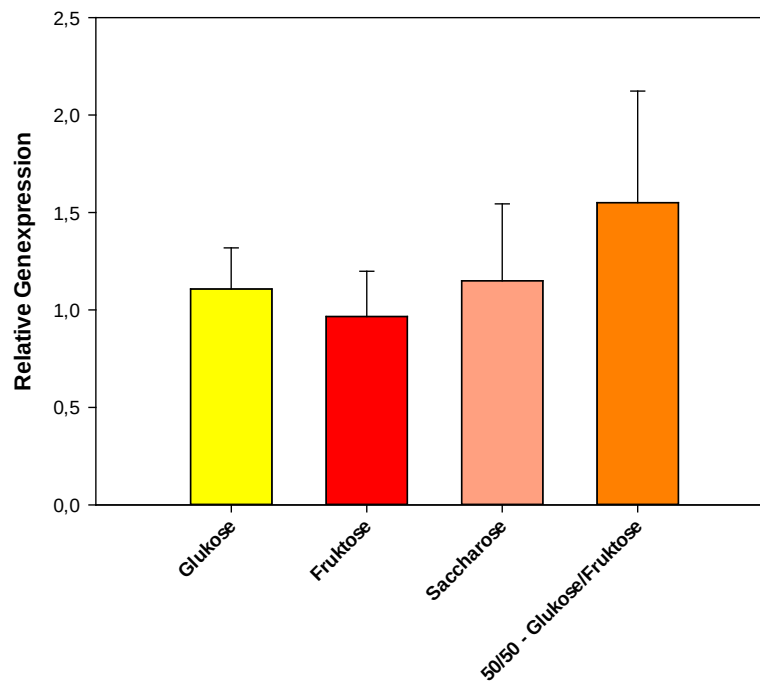
Das SREBP-1c Ortholog SBP-1 ist bei *C.elegans* für die Körpergröße, die Fettzusammensetzung und das Eier-legen verantwortlich. Die Fütterung der unterschiedlichen Zucker zeigte jedoch keine deutliche Veränderung der mRNA-Level von *sbp-1* (Abbildung 20).

Abbildung 20: Relative mRNA-Level von *sbp-1*



3.1.9 Acetyl-CoA Carboxylase - *pod-2*

Abbildung 21: Relative mRNA-Level von *pod-2*



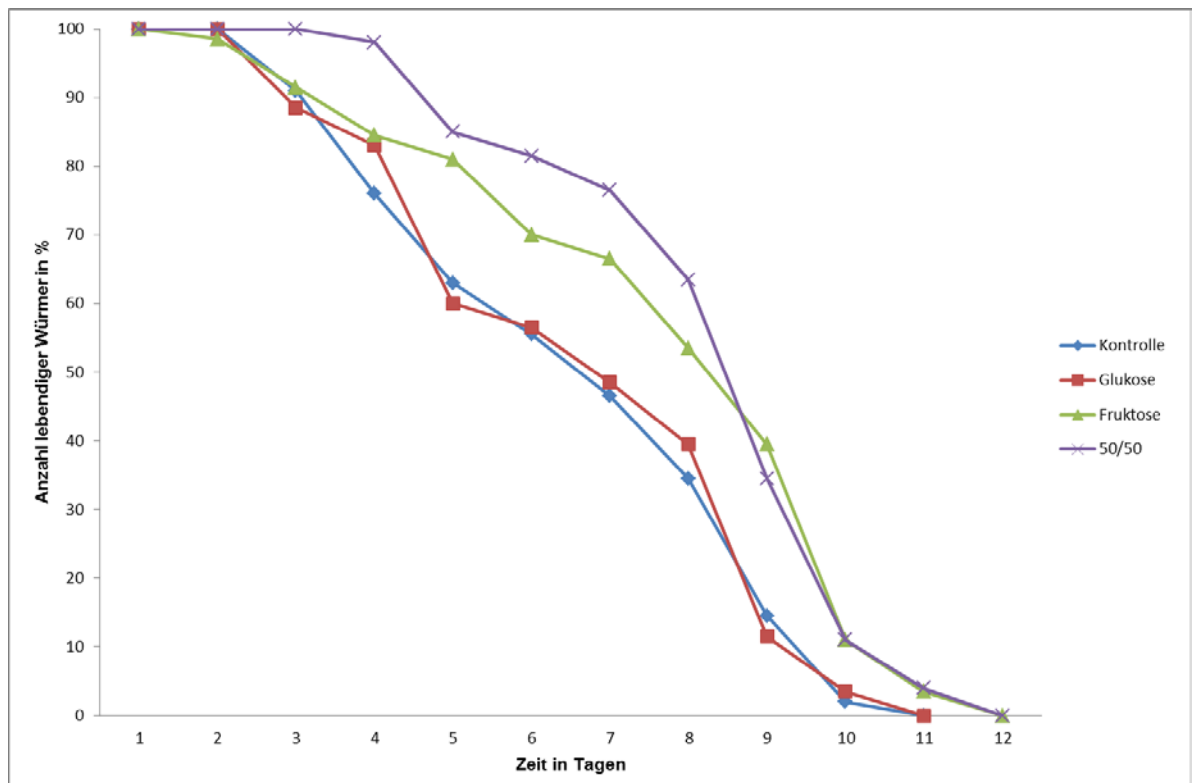
Das Gen *pod-2* kodiert für die acetyl-CoA Carboxylase, die ein wichtiges Enzym in der Lipogenese darstellt. Entgegen der Annahme wird Genexpression von *pod-2* durch die Fütterung von Fruktose nicht gesteigert. Gleiches gilt auch für die Fütterung mit Glukose. Die kombinierte Fütterung von Glukose und Fruktose in einer 50:50 Mischung hat jedoch eine Steigerung der mRNA-Level zur Folge. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass eine vermehrte Lipogenese nur dann entsteht, wenn die Signale von Fruktose und die Signale von Glukose sich überlagern. Auch in diesem Fall scheint es einen Unterschied zu machen, ob Fruktose und Glukose in gebundener Form (Saccharose) oder in freier Form (50:50 Mischung) verabreicht werden, da die Fütterung mit Saccharose im Vergleich zur 50:50 Mischung nicht zu einem Anstieg der mRNA-Level führt (Abbildung 21).

3.2 Ergebnisse Stress Assay

Der Stress Assay wird eingesetzt um zu testen, ob die zuvor beschriebene Induktion von *sod-3* über DAF-16/FOXO eine messbare Auswirkung auf die Stressresistenz von *C.elegans* hat. Abbildung 22 zeigt, welchen Einfluss die Fütterung der unterschiedlichen Zucker in Kombination mit der Behandlung mit Paraquat dichloride auf die Lebensspanne hat. Die Kontrollgruppe wird nur mit OP50 Bakterien gefüttert, um den Einfluss von Fruktose, Glukose und Saccharose deutlich zu machen. Die Fütterung von 5,4% Glukose zeigt die geringste Auswirkung, da die Kurve nahezu synchron mit der Kurve der Kontrollgruppe verläuft. Der stärkste Unterschied zur Kontrollgruppe zeigt sich bei der 50:50 Mischung aus Glukose und Fruktose. Während nach 6 Tagen nur noch 56,5% der Kontrollwürmer leben, sind es bei der 50:50 Mischung noch 81,5%. Bei der Fruktose Gruppe sind nach 6 Tagen zwar mit 70% noch mehr Würmer lebendig als in der Kontrollgruppe, jedoch auch weniger als bei der 50:50 Mischung. Obwohl *sod-3* durch die Behandlung mit Fruktose am stärksten exprimiert wird, scheinen die Nematoden der 50:50 Gruppe resistenter gegenüber oxidativem Stress zu sein. Daraus lässt sich schließen, dass die gesteigerte Stressresistenz nicht allein auf die Hochregulierung von *sod-3* zurückzuführen ist, da die mRNA-Level der 50:50 Mischung sich nicht

von denen der Kontrollgruppe unterscheiden. Bezogen auf die gesamte Lebensspanne zeigt sich ebenfalls, dass die Würmer, die mit Fruktose oder einer 50:50 Mischung aus Glukose und Fruktose behandelt werden im Durchschnitt einen Tag länger leben. Das entspricht einem Unterschied von 9% im Vergleich zur Kontrollgruppe und der Glukosegruppe.

Abbildung 22: Stress Assay mit Paraquat dichloride



4. Diskussion

4.1 Regulation der Genexpression über SIR 2.1 und DAF-16

Das Ziel dieser Masterarbeit ist es, den Einfluss von Fruktose auf die molekularen Regulationsmechanismen des Insulin/IGF-1 Signalweges besser zu verstehen. Im Fokus stehen dabei die Deacetylasen aus der Familie der Sirtuine (SIR 2.1) die zusammen mit dem Transkriptionsfaktor DAF-16/FOXO zahlreiche biologische Prozesse wie die Stressantwort und die Lebensdauer von *C.elegans* regulieren (Berdichevsky et al. 2006, Wang und Tissenbaum 2006). Die Fütterung der Nematoden mit 5,4% Fruktose führt zu einer starken Hochregulierung von *sir 2.1* und zu einer daraus resultierenden Aktivierung von DAF-16/FOXO. Das hat eine Induktion von Genen der Stressantwort (*sod-3*)

sowie Genen der Glukoneogenese (*pck-1*, *pyc-1*) zur Folge. Eine weitere wichtige Rolle spielt die Co-Expression von unterschiedlichen 14-3-3 Proteinen mit *daf-16/FoxO* und *sir 2.1*, die ebenfalls als Regulatoren der Lebenszeit gelten (Wang et al. 2006). Einerseits können die 14-3-3 Proteine mit den phosphorylierten DAF-16/FOXO Proteinen interagieren und sie dadurch im Zytoplasma zurückhalten (Brunet et al. 1999, Obsil et al. 2003). Dieser Fall tritt bei der Fütterung der Nematoden mit Glukose ein, da die Aktivierung des Insulinsignalweges zur Phosphorylierung von DAF-16/FOXO führt. Die Fütterung von 2% Glukose geht dabei mit einer signifikanten Verkürzung der Lebenszeit von *C.elegans* einher (Lee et al. 2009). Andererseits ermöglichen die 14-3-3 Proteine die Bildung eines Proteinkomplexes aus DAF-16/FOXO und SIR 2.1 im Zellkern, was eine vermehrte Expression von Zielgenen der Stressantwort und der Glukoneogenese zur Folge hat (Berdichevsky et al. 2006). Dieser Fall könnte durch die insulinunabhängige Aufnahme von Fruktose eintreten und würde den starken Anstieg der mRNA-Level von *sod-3*, *pck-1* und *pyc-1* erklären. Die Ergebnisse zeigen deutlich, dass die Fütterung mit Fruktose in Bezug auf die Expression von *sir 2.1* und *daf-16* einen gegenteiligen Effekt im Vergleich zur Glukose hat. Bei der gleichzeitigen Aufnahme von Fruktose und Glukose kommt es zu einer Überlagerung der gegensätzlichen Signale, was sich durch eine verminderte Expression der Zielgene von DAF-16 zeigt.

4.2 Auswirkungen auf die Gene der Glukoneogenese (*pck-1*, *pyc-1*)

Über die Aktivierung von DAF-16/FOXO, der direkt an Promotoren von Genen der Glukoneogenese bindet, scheint SIR 2.1 auch eine entscheidende Rolle in der Fruktose-induzierten Glukoneogenese zu spielen. Die Phosphoenolpyruvat Carboxykinase (PCK-1) wird wegen ihrer zentralen Rolle als geschwindigkeitsbestimmender Schritt der Glukoneogenese bereits seit längerem in Zusammenhang mit der Entstehung von Krankheiten wie Diabetes (Beale et al. 2007) bzw. dem metabolischen Syndrom (Perez-Martinez et al. 2013) gebracht. Die Hochregulation von *pck-1* in der Leber führt bei Mäusen zu einer insulinunabhängigen Form von Diabetes (Valera et al. 1994) und zu Übergewicht (Franckhauser et al. 2002). Die Pyruvat Carboxylase (PYC-1)

katalysiert die Umwandlung von Pyruvat in Oxalacetat und liefert somit das Substrat für die Phosphoenolpyruvat Carboxykinase. Normalerweise kommt es durch kalorische Restriktion zu einer Überexpression von *sir 2.1* und *daf-16* (Wang et al. 2006, Bamps et al. 2009) und in Folge dessen zu einer Hochregulierung von *pyc-1* und *pck-1* sowie weiteren Enzymen der Glukoneogenese (Dhahbi et al. 2001). Dieser Effekt tritt auch bei Diabetikern auf, da die Expression der Gene für die Glukoneogenese nicht ausreichend durch Insulin unterdrückt wird (Puigserver et al. 2003). Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die Fütterung der Nematoden mit 5,4% Fruktose jedoch ebenfalls zu einem vergleichbaren Expressionsmuster führt, obwohl in diesem Fall durch die Fruktose keine kalorische Restriktion, sondern eher ein Überangebot an Nährstoffen besteht. Die Sirtuin-abhängige (SIRT1) Induktion der Glukoneogenese konnte auch schon an Hepatozyten, die mit 1-5 mM Fruktose behandelt wurden nachgewiesen werden (Caton et al. 2011). Dieser Fruktose-induzierte Mechanismus könnte vor allem bei der Entstehung von Typ 2 Diabetes mellitus oder einem metabolischen Syndrom schwerwiegende metabolische Konsequenzen haben.

4.3 Auswirkungen auf Gene der Stressantwort (*sod-3*)

Neben der vermehrten Expression von Genen der Glukoneogenese, hat die Fütterung von Fruktose über die Aktivierung von DAF-16/FOXO über SIR 2.1 auch eine deutliche Steigerung der Expression von *sod-3* zur Folge. Die Aktivierung von Genen der Stressantwort scheint eine spezifische Folge der Überexpression von *sir 2.1* zu sein und führt zu einer Verlängerung der Lebenszeit sowohl unter kalorischer Restriktion (Tissenbaum und Guarente 2001, Bamps et al. 2009) als auch unter oxidativem Stress (Rizki et al. 2011, Radak et al. 2013). Der Stress Assay Test mit Paraquat führte ebenfalls zu dem Ergebnis, dass die Stressresistenz der Fruktosegruppe im Vergleich zu der Kontrollgruppe und der Glukosegruppe leicht erhöht ist, was sich auch in einer geringfügigen Verlängerung der Lebenszeit zeigte. Obwohl die Expression von *sod-3* lediglich durch die Fütterung von Fruktose gesteigert werden konnte, zeigte die 50:50-Gruppe die deutlichste Steigerung der Stressresistenz

gegenüber Paraquat. Obwohl Würmer mit einer *sod-3* Nullmutation eine höhere Sensitivität gegenüber Paraquat aufweisen (Yen et al. 2009), kann der Anstieg der Stressresistenz nicht auf die Hochregulation von *sod-3* zurückgeführt werden, da die Fütterung der Nematoden mit einer 50:50 Mischung aus Glukose und Fruktose nicht zu einem Anstieg der relativen Genexpression von *sod-3* führt. Weitere Studien bestätigen die Annahme, dass die unterschiedlichen Isoformen der Superoxiddismutase nicht für die Verlängerung der Lebenszeit von *C.elegans* durch die Überexpression von sir 2.1 verantwortlich sind (Doonan et al. 2008, Yen et al. 2009).

4.4 Auswirkungen auf den Insulinrezeptor (*daf-2*)

Neben den bereits genannten Genen zeigt sich auch beim Insulinrezeptor (DAF-2) ein Anstieg der mRNA Level, der proportional zu der zugeführten Menge an Fruktose verläuft. Die Expression von *daf-2* ist zwar abhängig von zahlreichen Faktoren, jedoch ist die Halbwertszeit des Rezeptors unter normalen Bedingungen recht konstant und weitestgehend unabhängig vom Insulin selbst. Bei Ratten führt eine kalorische Restriktion zum Anstieg der mRNA-Level des Insulinrezeptors in der Leber und der Muskulatur (Zhu et al. 2005). Ebenso verändern sich die mRNA-Level des Insulinrezeptors in Abhängigkeit des Alters (Hallberg et al. 2000). Es ist jedoch sehr unwahrscheinlich, dass in dieser Arbeit die erhöhten mRNA-Level auf einen der genannten Faktoren zurückzuführen ist. Der Fruktose-induzierte Anstieg der Genexpression könnte jedoch auch über einen DAF-16/FOXO-regulierten Feedback Mechanismus gesteuert werden (Puig und Tijan 2005). Die erhöhten mRNA-Level könnten demnach auf einen verminderten Abbau der mRNA und/oder auf eine inhibierte Proteinsynthese zurückzuführen sein. Eine quantitative Bestimmung der resultierenden Mengen an Protein würde Aufschluss über diese überraschenden Ergebnisse geben. Im Normalfall hat die Fütterung mit Fruktose einen Abfall der Insulinrezeptorzahl sowie der Rezeptorbindung zur Folge (Basciano et al. 2005, Rebollo et al. 2014), was in Zusammenhang mit Adipositas, Hyperinsulinämie und Typ 2 Diabetes mellitus steht (Saltiel und Kahn 2001, Borissova et al. 2004, Fröjdö et al. 2009).

4.5 Auswirkungen auf den Glukosetransporter (*fgt-1*)

Die Aktivität des Insulinrezeptors und dessen Genexpression stehen im engen Zusammenhang mit dem Glukosetransport. Der einzige voll funktionsfähige Glukosetransporter des *C.elegans* ist FGT-1 (facilitated glucose transporter, isoform 1). Der Knockdown von *fgt-1* führt zu einem Verlust der Glukosetransportfähigkeit und zu einer daraus resultierenden Reduktion des Glukosestoffwechsels der Nematoden (Feng et al. 2013). Eine Nullmutation von *fgt-1* hat eine Verlängerung der Lebenszeit zur Folge, da durch das fehlende Signal der Glukose der Insulinsignalweg nicht aktiviert wird. Da *C.elegans* in einem Lebensraum vorkommt, der arm an Glukose ist verwundert es nicht, dass FGT-1 eine starke Affinität zur Glukose aufweist. Es konnte jedoch auch gezeigt werden, dass zahlreiche weitere Hexosen (u.a. Fruktose) über diesen Transporter aufgenommen werden. Die Substratspezifität des Rezeptors ist jedoch bei der Fruktose im Vergleich zur Glukose um einiges geringer (Kitaoka et al. 2013). Um die Beziehung zwischen Glukose- und Fruktosetransport in diesem Zusammenhang zu untersuchen, wurden die mRNA-Level von *fgt-1* gemessen. Sowohl die Fütterung von Fruktose als auch von Glukose hat einen leichten Anstieg der relativen Genexpression zur Folge. Der stärkste Anstieg der mRNA-Level erfolgt jedoch durch die Fütterung einer 50:50 Mischung aus Glukose und Fruktose. Das könnte auf eine vermehrte Aufnahme der Fruktose bei gleichzeitiger Anwesenheit von Glukose hindeuten. Auffällig ist jedoch auch, dass die Saccharose im Gegensatz zu der 50:50 Mischung, aber auch im Vergleich zu Fruktose und Glukose eine niedrigere Genexpression zur Folge hat. Auch in diesem Fall zeigt sich, dass sich das Expressionsmuster zwischen der Saccharosegruppe und der 50:50-Gruppe deutlich unterscheidet.

4.6 Auswirkungen auf Gene der Lipogenese (*sbp-1* , *pod-2*)

Die Regulation der Fettsäurehomöostase sowie der Speicherung von Fett steht ebenfalls im Zusammenhang mit dem Insulinsignalweg über DAF-2 (Horikawa und Sakamoto 2010). Um den Einfluss der unterschiedlichen Zucker auf die Expression von Genen der Lipogenese zu untersuchen, wurden die mRNA-Level von *sbp-1* (sterol regulatory element binding protein) und *pod-2* (actely-

CoA Carboxylase) untersucht. POD-2 katalysiert den ersten Schritt der de novo Synthese von Fettsäuren und ist daher essentiell für die Lipogenese. Während die mRNA-Level von *sbp-1* kaum Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen aufweisen, sticht bei *pod-2* lediglich die 50:50-Gruppe hervor, bei der eine moderate Steigerung der Genexpression festgestellt werden konnte. Die Untersuchung von weiteren Genen, die an der de novo Lipogenese und der Fettspeicherung beteiligt sind wie z.B. *elo-2* (Fettsäure Elongase) oder *fat-2*, *fat-6*, *fat-7* (Homologe Gene der Stearoyl-CoA Desaturase), könnten das Verständnis für den Einfluss von Fruktose auf die Fettsäuresynthese weiter verbessern. Darüber hinaus könnte eine Messung der Fettspeicher durch eine geeignete Methode (z.B. Nilrot-Färbung) zeigen, ob die Fütterung von Fruktose eine vermehrte Ansammlung von Speicherfett zur Folge hat.

5. Zusammenfassung und Schlussfolgerung

Diese Masterarbeit beschäftigt sich mit den Auswirkungen eines erhöhten Fruktosekonsums auf die molekularen Regulationsmechanismen des Kohlenhydrat- und Lipidstoffwechsels, sowie der Stressantwort des Modellorganismus *Caenorhabditis elegans*. Im Fokus steht dabei die Expression von Zielgenen über den Insulinsignalweg durch den Transkriptionsfaktor DAF-16/FOXO, der durch eine Überexpression von *sir 2.1* (NAD⁺-abhängige Protein Deacetylase) aktiviert werden kann. Die Messung der Genexpression erfolgt über eine relative Quantifizierung der mRNA-Level mittels RT-qPCR. Die Fütterung von *C.elegans* mit 5,4% Fruktose hat eine deutliche Steigerung der Expression von *sir 2.1* und *daf-16/FoxO* zur Folge. Das führt über eine gesteigerte Expression von *pyc-1* (Pyruvat Carboxylase) und *pck-1* (Phosphoenolpyruvat Carboxykinase) zur Induktion der Glukoneogenese. Darüber hinaus wird durch diesen Mechanismus auch die Expression von *sod-3* (Superoxiddismutase) massiv gesteigert. Diese Effekte treten nach der Fütterung mit 5,4% Glukose nicht auf, da DAF-16/FOXO durch die insulinabhängige Aufnahme von Glukose inaktiviert wird. Durch die Fütterung von Saccharose oder einer 50:50 Mischung aus Fruktose und Glukose kommt es zu einer Überlagerung der gegensätzlichen Signale, was zu einer

verminderten Expression der genannten Gene im Vergleich zur Fruktose führt. Um die Auswirkungen von Fruktose auf die Lipogenese zu untersuchen, wurde außerdem die Expression von *sbp-1* (sterol regulatory element binding protein) und *pod-2* (Acetyl-CoA Carboxylase) gemessen. Die Expression von *pod-2* konnte jedoch nur durch die Fütterung mit der 50:50 Mischung gesteigert werden. Da die Fütterung von Fruktose zu einem ähnlichen Expressionsmuster wie eine kalorische Restriktion führt, die beim *C.elegans* zu einer erhöhten Stressresistenz und einer verlängerten Lebensspanne führt, wurde auch die Stressresistenz der Würmer gegenüber Paraquat getestet. Die Fütterung mit Fruktose führt zu einer starken Expression von *sod-3* und zu einer leicht erhöhten Stressresistenz im Vergleich zu der Kontrollgruppe und der Glukosegruppe. Die Fütterung mit der 50:50 Mischung aus Glukose und Fruktose hatte jedoch die größte Steigerung der Stressresistenz zur Folge, obwohl es hier nicht zu einer deutlichen Steigerung der Expression von *sod-3* kam. Die leicht gesteigerte Stressresistenz kann also nicht auf die gesteigerte Expression von *sod-3* zurückgeführt werden.

Schlussfolgerung

Die Fütterung von *C.elegans* mit 5,4% Fruktose führt zu einer Überexpression von *sir 2.1* und zu einer daraus resultierenden Aktivierung von DAF-16/FOXO. Dadurch kommt es zur Induktion der Glukoneogenese über die vermehrte Expression von *pck-1* und *pyc-1*. Entgegen der Annahme kommt es jedoch nicht zu einer vermehrten Expression von Genen der Lipogenese (*sbp-1*, *pod-2*). Außerdem hat die Fütterung mit Fruktose im Vergleich zur Glukose eine leichte Steigerung der Stressresistenz gegenüber Paraquat zur Folge. Obwohl *sod-3* lediglich durch die Fütterung mit Fruktose vermehrt exprimiert wurde, zeigte sich auch bei der 50:50 Gruppe eine leichte Steigerung der Stressresistenz.

6. Literaturverzeichnis

- Adler, A. I., H. A. W. Neil, S. E. Manley, R. R. Holman und R. C. Turner** (1999). "Hyperglycemia and hyperinsulinemia at diagnosis of diabetes and their association with subsequent cardiovascular disease in the United Kingdom Prospective Diabetes Study (UKPDS 47)." American Heart Journal **138**(5): S353-S359.
- Anderson, J. L., L. T. Morran und P. C. Phillips** (2010). "Outcrossing and the maintenance of males within *C. elegans* populations." J Hered **101** Suppl 1: S62-74.
- Appelhans, B. M., M. E. Bleil, M. E. Waring, K. L. Schneider, L. M. Nackers, A. M. Busch, M. C. Whited und S. L. Pagoto** (2013). "Beverages contribute extra calories to meals and daily energy intake in overweight and obese women." Physiology & Behavior **122**(0): 129-133.
- Avena, N. M., P. Rada und B. G. Hoebel** (2008). "Evidence for sugar addiction: Behavioral and neurochemical effects of intermittent, excessive sugar intake." Neuroscience & Biobehavioral Reviews **32**(1): 20-39.
- Back, P., F. Matthijssens, C. Vlaeminck, B. P. Braeckman und J. R. Vanfleteren** (2010). "Effects of sod gene overexpression and deletion mutation on the expression profiles of reporter genes of major detoxification pathways in *Caenorhabditis elegans*." Experimental Gerontology **45**(7-8): 603-610.
- Bamps, S., J. Wirtz, F. R. Savory, D. Lake und I. A. Hope** (2009). "The *Caenorhabditis elegans* sir-2.1 gene, sir-2.1, is widely expressed and induced upon caloric restriction." Mechanisms of Ageing and Development **130**(11-12): 762-770.
- Barbieri, M., M. Bonafè, C. Franceschi und G. Paolisso** (2003). "Insulin/IGF-I-signaling pathway: An evolutionarily conserved mechanism of longevity from yeast to humans." American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism **285**(5 48-5): E1064-E1071.
- Barthel, A., D. Schmoll und T. G. Unterman** (2005). "FoxO proteins in insulin action and metabolism." Trends in Endocrinology & Metabolism **16**(4): 183-189.
- Basciano, H., L. Federico und K. Adeli** (2005). "Fructose, insulin resistance, and metabolic dyslipidemia." Nutr Metab (Lond) **2**(1): 5.
- Beale, E. G., B. J. Harvey und C. Forest** (2007). "PCK1 and PCK2 as candidate diabetes and obesity genes." Cell Biochem Biophys **48**(2-3): 89-95.
- Benado, M., C. Alcantara, R. de la Rosa, M. Ambrose, K. Mosier und M. Kern** (2004). "Effects of various levels of dietary fructose on blood lipids of rats." Nutrition Research **24**(7): 565-571.
- Berdichevsky, A., M. Viswanathan, H. R. Horvitz und L. Guarente** (2006). "C. elegans SIR-2.1 Interacts with 14-3-3 Proteins to Activate DAF-16 and Extend Life Span." Cell **125**(6): 1165-1177.
- Bezerra, R. M., M. Ueno, M. S. Silva, D. Q. Tavares, C. R. Carvalho und M. J. Saad** (2000). "A high fructose diet affects the early steps of insulin action in muscle and liver of rats." J Nutr **130**(6): 1531-1535.
- Bocarsly, M. E., E. S. Powell, N. M. Avena und B. G. Hoebel** (2010). "High-fructose corn syrup causes characteristics of obesity in rats: Increased body weight, body fat and triglyceride levels." Pharmacology Biochemistry and Behavior **97**(1): 101-106.
- Bokov, A., A. Chaudhuri und A. Richardson** (2004). "The role of oxidative damage and stress in aging." Mechanisms of Ageing and Development **125**(10-11): 811-826.
- Borissova, A. M., T. I. Tankova und D. J. Koev** (2004). "Insulin secretion, peripheral insulin sensitivity and insulin-receptor binding in subjects with different degrees of obesity." Diabetes & Metabolism **30**(5): 425-431.
- Braeckman, B. P. und J. R. Vanfleteren** (2007). "Genetic control of longevity in *C. elegans*." Experimental Gerontology **42**(1-2): 90-98.
- Brenner, S.** (1974). "The genetics of *Caenorhabditis elegans*." Genetics **77**(1): 71-94.

- Brunet, A., A. Bonni, M. J. Zigmond, M. Z. Lin, P. Juo, L. S. Hu, M. J. Anderson, K. C. Arden, J. Blenis und M. E. Greenberg** (1999). "Akt Promotes Cell Survival by Phosphorylating and Inhibiting a Forkhead Transcription Factor." Cell **96**(6): 857-868.
- Caton, P. W., N. K. Nayuni, N. Q. Khan, E. G. Wood und R. Corder** (2011). "Fructose induces gluconeogenesis and lipogenesis through a SIRT1-dependent mechanism." J Endocrinol **208**(3): 273-283.
- Chandramohan, R. und L. Pari** (2014). "Protective effect of umbelliferone on high-fructose diet-induced insulin resistance and oxidative stress in rats." Biomedicine & Aging Pathology **4**(1): 23-28.
- Consortium, C. e. S.** (1998). "Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology." Science **282**(5396): 2012-2018.
- Corsi, A. K.** (2006). "A biochemist's guide to *Caenorhabditis elegans*." Anal Biochem **359**(1): 1-17.
- Culetto, E. und D. B. Sattelle** (2000). "A role for *Caenorhabditis elegans* in understanding the function and interactions of human disease genes." Hum Mol Genet **9**(6): 869-877.
- Cuppen, E., E. Gort, E. Hazendonk, J. Mudde, J. van de Belt, I. J. Nijman, V. Guryev und R. H. A. Plasterk** (2007). "Efficient target-selected mutagenesis in *Caenorhabditis elegans*: Toward a knockout for every gene." Genome Research **17**(5): 649-658.
- Daitoku, H., J.-i. Sakamaki und A. Fukamizu** (2011). "Regulation of FoxO transcription factors by acetylation and protein-protein interactions." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research **1813**(11): 1954-1960.
- David Wang, D., J. L. Sievenpiper, R. J. de Souza, A. I. Cozma, L. Chiavaroli, V. Ha, A. Mirrahimi, A. J. Carleton, M. Di Buono, A. L. Jenkins, L. A. Leiter, T. M. S. Wolever, J. Beyene, C. W. C. Kendall und D. J. A. Jenkins** (2014). "Effect of fructose on postprandial triglycerides: A systematic review and meta-analysis of controlled feeding trials." Atherosclerosis **232**(1): 125-133.
- Delpier, T., S. Giordana und B. M. Wedin** (2013). "Decreasing Sugar-Sweetened Beverage Consumption in the Rural Adolescent Population." Journal of Pediatric Health Care **27**(6): 470-478.
- Dentin, R., J. Girard und C. Postic** (2005). "Carbohydrate responsive element binding protein (ChREBP) and sterol regulatory element binding protein-1c (SREBP-1c): two key regulators of glucose metabolism and lipid synthesis in liver." Biochimie **87**(1): 81-86.
- Dhahbi, J. M., P. L. Mote, J. Wingo, B. C. Rowley, S. X. Cao, R. L. Walford und S. R. Spindler** (2001). "Caloric restriction alters the feeding response of key metabolic enzyme genes." Mechanisms of Ageing and Development **122**(10): 1033-1048.
- Doonan, R., J. J. McElwee, F. Matthijssens, G. A. Walker, K. Houthoofd, P. Back, A. Matscheski, J. R. Vanfleteren und D. Gems** (2008). "Against the oxidative damage theory of aging: superoxide dismutases protect against oxidative stress but have little or no effect on life span in *Caenorhabditis elegans*." Genes & Development **22**(23): 3236-3241.
- Drewnowski, A. und S. E. Specter** (2004). "Poverty and obesity: The role of energy density and energy costs." American Journal of Clinical Nutrition **79**(1): 6-16.
- Elliott, S. S., N. L. Keim, J. S. Stern, K. Teff und P. J. Havel** (2002). "Fructose, weight gain, and the insulin resistance syndrome." American Journal of Clinical Nutrition **76**(5): 911-922.
- Elmadfa, I., I. f. E. . und Ö. B. f. Gesundheit** (2012). Österreichischer Ernährungsbericht 2012, Bundesministerium für Gesundheit.
- Feng, Y., B. G. Williams, F. Koumanov, A. J. Wolstenholme und G. D. Holman** (2013). "FGT-1 is the major glucose transporter in *C. elegans* and is central to aging pathways." Biochemical Journal **456**(2): 219-229.
- Fischer, S. E. J.** (2010). "Small RNA-mediated gene silencing pathways in *C. elegans*." The International Journal of Biochemistry & Cell Biology **42**(8): 1306-1315.

- Francini, F., M. C. Castro, G. Schinella, M. E. García, B. Maiztegui, M. A. Raschia, J. J. Gagliardino und M. L. Massa** (2010). "Changes induced by a fructose-rich diet on hepatic metabolism and the antioxidant system." *Life Sciences* **86**(25–26): 965-971.
- Franckhauser, S., S. Munoz, A. Pujol, A. Casellas, E. Riu, P. Otaegui, B. Su und F. Bosch** (2002). "Increased fatty acid re-esterification by PEPCCK overexpression in adipose tissue leads to obesity without insulin resistance." *Diabetes* **51**(3): 624-630.
- Frescas, D., L. Valenti und D. Accili** (2005). "Nuclear trapping of the forkhead transcription factor FoxO1 via sirt-dependent deacetylation promotes expression of glucogenetic genes." *Journal of Biological Chemistry* **280**(21): 20589-20595.
- Fröjdö, S., H. Vidal und L. Pirola** (2009). "Alterations of insulin signaling in type 2 diabetes: A review of the current evidence from humans." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* **1792**(2): 83-92.
- Gami, M. S. und C. A. Wolkow** (2006). "Studies of *Caenorhabditis elegans* DAF-2/insulin signaling reveal targets for pharmacological manipulation of lifespan." *Aging Cell* **5**(1): 31-37.
- Hallberg, L. M., Y. Ikeno, E. Englander und G. H. Greeley Jr** (2000). "Effects of aging and caloric restriction on IGF-I, IGF-I receptor, IGFBP-3 and IGFBP-4 gene expression in the rat stomach and colon." *Regulatory Peptides* **89**(1–3): 37-44.
- Han, E. und L. M. Powell** (2013). "Consumption Patterns of Sugar-Sweetened Beverages in the United States." *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics* **113**(1): 43-53.
- Hanover, L. M. und J. S. White** (1993). "Manufacturing, composition, and applications of fructose." *The American Journal of Clinical Nutrition* **58**(5): 724S-732S.
- Hert, K. A., P. S. Fisk li, Y. S. Rhee und A. R. Brunt** (2014). "Decreased consumption of sugar-sweetened beverages improved selected biomarkers of chronic disease risk among US adults: 1999 to 2010." *Nutrition Research* **34**(1): 58-65.
- Honda, Y. und S. Honda** (1999). "The daf-2 gene network for longevity regulates oxidative stress resistance and Mn-superoxide dismutase gene expression in *Caenorhabditis elegans*." *The FASEB Journal* **13**(11): 1385-1393.
- Horikawa, M. und K. Sakamoto** (2010). "Polyunsaturated fatty acids are involved in regulatory mechanism of fatty acid homeostasis via daf-2/insulin signaling in *Caenorhabditis elegans*." *Molecular and Cellular Endocrinology* **323**(2): 183-192.
- Hsu, A.-L., C. T. Murphy und C. Kenyon** (2003). "Regulation of Aging and Age-Related Disease by DAF-16 and Heat-Shock Factor." *Science* **300**(5622): 1142-1145.
- Huang, C., J. Huang, Y. Tian, X. Yang und D. Gu** (2014). "Sugar sweetened beverages consumption and risk of coronary heart disease: A meta-analysis of prospective studies." *Atherosclerosis* **234**(1): 11-16.
- Jitrapakdee, S.** (2012). "Transcription factors and coactivators controlling nutrient and hormonal regulation of hepatic gluconeogenesis." *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **44**(1): 33-45.
- Jitrapakdee, S., A. Vidal-Puig und J. C. Wallace** (2006). "Anaplerotic roles of pyruvate carboxylase in mammalian tissues." *Cellular and Molecular Life Sciences* **63**(7-8): 843-854.
- Jones, H. F., R. N. Butler und D. A. Brooks** (2011). "Intestinal fructose transport and malabsorption in humans." *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **300**(2): G202-206.
- Jürgens, H., W. Haass, T. R. Castañeda, A. Schürmann, C. Koebnick, F. Dombrowski, B. Otto, A. R. Nawrocki, P. E. Scherer, J. Spranger, M. Ristow, H.-G. Joost, P. J. Havel und M. H. Tschöp** (2005). "Consuming Fructose-sweetened Beverages Increases Body Adiposity in Mice." *Obesity Research* **13**(7): 1146-1156.
- Kelishadi, R., M. Mansourian und M. Heidari-Beni** (2014). "Association of fructose consumption and components of metabolic syndrome in human studies: A systematic review and meta-analysis." *Nutrition* **30**(5): 503-510.

- Kellett, G. L., E. Brot-Laroche, O. J. Mace und A. Leturque** (2008). "Sugar Absorption in the Intestine: The Role of GLUT2." *Annual Review of Nutrition* **28**(1): 35-54.
- Kimura, K. D., H. A. Tissenbaum, Y. Liu und G. Ruvkun** (1997). "daf-2, an Insulin Receptor-Like Gene That Regulates Longevity and Diapause in *Caenorhabditis elegans*." *Science* **277**(5328): 942-946.
- Kitaoka, S., A. D. Morielli und F.-Q. Zhao** (2013). "FGT-1 Is a Mammalian GLUT2-Like Facilitative Glucose Transporter in *Caenorhabditis elegans* Whose Malfunction Induces Fat Accumulation in Intestinal Cells." *PLoS ONE* **8**(6): e68475.
- Koivisto, V. A.** (1978). "Fructose as a dietary sweetener in diabetes mellitus." *Diabetes Care* **1**(4): 241-246.
- Landry, J., A. Sutton, S. T. Tafrov, R. C. Heller, J. Stebbins, L. Pillus und R. Sternglanz** (2000). "The silencing protein SIR2 and its homologs are NAD-dependent protein deacetylases." *Proceedings of the National Academy of Sciences* **97**(11): 5807-5811.
- Lee, S.-J., C. T. Murphy und C. Kenyon** (2009). "Glucose Shortens the Life Span of *C. elegans* by Downregulating DAF-16/FOXO Activity and Aquaporin Gene Expression." *Cell Metabolism* **10**(5): 379-391.
- Liang, G., J. Yang, J. D. Horton, R. E. Hammer, J. L. Goldstein und M. S. Brown** (2002). "Diminished Hepatic Response to Fasting/Refeeding and Liver X Receptor Agonists in Mice with Selective Deficiency of Sterol Regulatory Element-binding Protein-1c." *Journal of Biological Chemistry* **277**(11): 9520-9528.
- Lim, J. S., M. Mietus-Snyder, A. Valente, J. M. Schwarz und R. H. Lustig** (2010). "The role of fructose in the pathogenesis of NAFLD and the metabolic syndrome." *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **7**(5): 251-264.
- Lin, K., H. Hsin, N. Libina und C. Kenyon** (2001). "Regulation of the *Caenorhabditis elegans* longevity protein DAF-16 by insulin/IGF-1 and germline signaling." *Nat Genet* **28**(2): 139-145.
- Lindqvist, A., A. Baelemans und C. Erlanson-Albertsson** (2008). "Effects of sucrose, glucose and fructose on peripheral and central appetite signals." *Regulatory Peptides* **150**(1-3): 26-32.
- Löffler, G.** (2008). *Basiswissen Biochemie*, Springer Medizin Verlag.
- Ludwig, D. S., K. E. Peterson und S. L. Gortmaker** (2001). "Relation between consumption of sugar-sweetened drinks and childhood obesity: a prospective, observational analysis." *The Lancet* **357**(9255): 505-508.
- Malik, V. S., B. M. Popkin, G. A. Bray, J. P. Després, W. C. Willett und F. B. Hu** (2010). "Sugar-sweetened beverages and risk of metabolic syndrome and type 2 diabetes: A meta-analysis." *Diabetes Care* **33**(11): 2477-2483.
- Malik, V. S., M. B. Schulze und F. B. Hu** (2006). "Intake of sugar-sweetened beverages and weight gain: A systematic review." *American Journal of Clinical Nutrition* **84**(2): 274-288.
- Marriott, B. P., N. Cole und E. Lee** (2009). "National Estimates of Dietary Fructose Intake Increased from 1977 to 2004 in the United States." *J Nutr* **139**(6): 1228S-1235S.
- Matsuzaki, H., H. Daitoku, M. Hatta, H. Aoyama, K. Yoshimochi und A. Fukamizu** (2005). "Acetylation of Foxo1 alters its DNA-binding ability and sensitivity to phosphorylation." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(32): 11278-11283.
- Mayes, P. A.** (1993). "Intermediary metabolism of fructose." *The American Journal of Clinical Nutrition* **58**(5): 754S-765S.
- Muir, J. G., S. J. Shepherd, O. Rosella, R. Rose, J. S. Barrett und P. R. Gibson** (2007). "Fructan and Free Fructose Content of Common Australian Vegetables and Fruit." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **55**(16): 6619-6627.
- Mukhopadhyay, A., S. W. Oh und H. A. Tissenbaum** (2006). "Worming pathways to and from DAF-16/FOXO." *Experimental Gerontology* **41**(10): 928-934.

- Nomura, T., M. Horikawa, S. Shimamura, T. Hashimoto und K. Sakamoto** (2010). "Fat accumulation in *Caenorhabditis elegans* is mediated by SREBP homolog SBP-1." Genes & Nutrition **5**(1): 17-27.
- Obsil, T., R. Ghirlando, D. E. Anderson, A. B. Hickman und F. Dyda** (2003). "Two 14-3-3 Binding Motifs Are Required for Stable Association of Forkhead Transcription Factor FOXO4 with 14-3-3 Proteins and Inhibition of DNA Binding." Biochemistry **42**(51): 15264-15272.
- Ouyang, X., P. Cirillo, Y. Sautin, S. McCall, J. L. Bruchette, A. M. Diehl, R. J. Johnson und M. F. Abdelmalek** (2008). "Fructose consumption as a risk factor for non-alcoholic fatty liver disease." Journal of Hepatology **48**(6): 993-999.
- Owen, O. E., S. C. Kalhan und R. W. Hanson** (2002). "The Key Role of Anaplerosis and Cataplerosis for Citric Acid Cycle Function." Journal of Biological Chemistry **277**(34): 30409-30412.
- Owen, O. E., K. J. Smalley, D. A. D'Alessio, M. A. Mozzoli und E. K. Dawson** (1998). "Protein, fat, and carbohydrate requirements during starvation: anaplerosis and cataplerosis." The American Journal of Clinical Nutrition **68**(1): 12-34.
- Perez-Martinez, P., A. Garcia-Rios, J. Delgado-Lista, I. M. F. Gjelstad, J. Gibney, B. Kieć-Wilk, A. Camargo, O. Helal, B. Karlström, E. E. Blaak, W. Hall, U. Risérus, A. Dembińska-Kieć, C. Defoort, W. H. M. Saris, J. A. Lovegrove, C. A. Drevon, H. M. Roche und J. Lopez-Miranda** (2013). "Gene–nutrient interactions on the phosphoenolpyruvate carboxykinase influence insulin sensitivity in metabolic syndrome subjects." Clinical Nutrition **32**(4): 630-635.
- Puig, O. und R. Tijan** (2005). "Transcriptional feedback control of insulin receptor by dFOXO/FOXO1." Genes & Development **19**(20): 2435-2446.
- Puigserver, P., J. Rhee, J. Donovan, C. J. Walkey, J. C. Yoon, F. Oriente, Y. Kitamura, J. Altomonte, H. Dong, D. Accili und B. M. Spiegelman** (2003). "Insulin-regulated hepatic gluconeogenesis through FOXO1-PGC-1[alpha] interaction." Nature **423**(6939): 550-555.
- Radak, Z., E. Koltai, A. W. Taylor, M. Higuchi, S. Kumagai, H. Ohno, S. Goto und I. Boldogh** (2013). "Redox-regulating sirtuins in aging, caloric restriction, and exercise." Free Radical Biology and Medicine **58**(0): 87-97.
- Rebollo, A., N. Roglans, M. Baena, A. Padrosa, R. M. Sánchez, M. Merlos, M. Alegret und J. C. Laguna** (2014). "Liquid fructose down-regulates liver insulin receptor substrate 2 and gluconeogenic enzymes by modifying nutrient sensing factors in rats." The Journal of Nutritional Biochemistry **25**(2): 250-258.
- Reshef, L., Y. Olswang, H. Cassuto, B. Blum, C. M. Croniger, S. C. Kalhan, S. M. Tilghman und R. W. Hanson** (2003). "Glyceroneogenesis and the Triglyceride/Fatty Acid Cycle." Journal of Biological Chemistry **278**(33): 30413-30416.
- Rizki, G., T. N. Iwata, J. Li, C. G. Riedel, C. L. Picard, M. Jan, C. T. Murphy und S. S. Lee** (2011). "The Evolutionarily Conserved Longevity Determinants HCF-1 and SIR-2.1/SIRT1 Collaborate to Regulate DAF-16/FOXO." PLoS Genet **7**(9): e1002235.
- Salih, D. A. M. und A. Brunet** (2008). "FoxO transcription factors in the maintenance of cellular homeostasis during aging." Current Opinion in Cell Biology **20**(2): 126-136.
- Saltiel, A. R. und C. R. Kahn** (2001). "Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism." Nature **414**(6865): 799-806.
- Scott, E. M., A. M. Carter und P. J. Grant** (2008). "Association between polymorphisms in the Clock gene, obesity and the metabolic syndrome in man." Int J Obes (Lond) **32**(4): 658-662.
- Shimomura, I., H. Shimano, B. S. Korn, Y. Bashmakov und J. D. Horton** (1998). "Nuclear Sterol Regulatory Element-binding Proteins Activate Genes Responsible for the Entire Program of Unsaturated Fatty Acid Biosynthesis in Transgenic Mouse Liver." Journal of Biological Chemistry **273**(52): 35299-35306.

- Sievenpiper, J. L., R. J. De Souza, A. I. Cozma, L. Chiavaroli, V. Ha und A. Mirrahimi** (2014). "Fructose vs. glucose and metabolism: Do the metabolic differences matter?" Current Opinion in Lipidology **25**(1): 8-19.
- Sievenpiper, J. L., R. J. de Souza, A. Mirrahimi, M. E. Yu, A. J. Carleton, J. Beyene, L. Chiavaroli, M. di Buono, A. L. Jenkins, L. A. Leiter, T. M. S. Wolever, C. W. C. Kendall und D. J. A. Jenkins** (2012). "Effect of fructose on body weight in controlled feeding trials: A systematic review and meta-analysis." Annals of Internal Medicine **156**(4): 291-304.
- Stanhope, K. L., J. M. Schwarz, N. L. Keim, S. C. Griffen, A. A. Bremer, J. L. Graham, B. Hatcher, C. L. Cox, A. Dyachenko, W. Zhang, J. P. McGahan, A. Seibert, R. M. Krauss, S. Chiu, E. J. Schaefer, M. Ai, S. Otokozawa, K. Nakajima, T. Nakano, C. Beysen, M. K. Hellerstein, L. Berglund und P. J. Havel** (2009). "Consuming fructose-sweetened, not glucose-sweetened, beverages increases visceral adiposity and lipids and decreases insulin sensitivity in overweight/obese humans." Journal of Clinical Investigation **119**(5): 1322-1334.
- Sun, S. Z., G. H. Anderson, B. D. Flickinger, P. S. Williamson-Hughes und M. W. Empie** (2011). "Fructose and non-fructose sugar intakes in the US population and their associations with indicators of metabolic syndrome." Food and Chemical Toxicology **49**(11): 2875-2882.
- Tappy, L., K. A. Lê, C. Tran und N. Paquot** (2010). "Fructose and metabolic diseases: New findings, new questions." Nutrition **26**(11-12): 1044-1049.
- Tatar, M., A. Bartke und A. Antebi** (2003). "The Endocrine Regulation of Aging by Insulin-like Signals." Science **299**(5611): 1346-1351.
- Thompson, O., M. Edgley, P. Strasbourger, S. Flibotte, B. Ewing, R. Adair, V. Au, I. Chaudry, L. Fernando, H. Hutter, A. Kieffer, J. Lau, N. Lee, A. Miller, G. Raymant, B. Shen, J. Shendure, J. Taylor, E. Turner, L. Hillier, D. G. Moerman und R. H. Waterston** (2013). "The Million Mutation Project: A new approach to genetics in *Caenorhabditis elegans*." Genome Research.
- Thorens, B. und M. Mueckler** (2010). "Glucose transporters in the 21st Century." American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism **298**(2): E141-E145.
- Tissenbaum, H. A. und L. Guarente** (2001). "Increased dosage of a sir-2 gene extends lifespan in *Caenorhabditis elegans*." Nature **410**(6825): 227-230.
- Valera, A., A. Pujol, M. Pelegrin und F. Bosch** (1994). "Transgenic mice overexpressing phosphoenolpyruvate carboxykinase develop non-insulin-dependent diabetes mellitus." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(19): 9151-9154.
- Wallace, J. C., S. Jitrapakdee und A. Chapman-Smith** (1998). "Pyruvate carboxylase." International Journal of Biochemistry and Cell Biology **30**(1): 1-5.
- Wang, X., X. Wang, L. Li und D. Wang** (2010). "Lifespan extension in *Caenorhabditis elegans* by DMSO is dependent on sir-2.1 and daf-16." Biochemical and Biophysical Research Communications **400**(4): 613-618.
- Wang, Y., S. W. Oh, B. Deplancke, J. Luo, A. J. M. Walhout und H. A. Tissenbaum** (2006). "C. elegans 14-3-3 proteins regulate life span and interact with SIR-2.1 and DAF-16/FOXO." Mechanisms of Ageing and Development **127**(9): 741-747.
- Wang, Y. und H. A. Tissenbaum** (2006). "Overlapping and distinct functions for a *Caenorhabditis elegans* SIR2 and DAF-16/FOXO." Mechanisms of Ageing and Development **127**(1): 48-56.
- Wang, Y. C., S. N. Bleich und S. L. Gortmaker** (2008). "Increasing caloric contribution from sugar- sweetened beverages and 100% fruit juices among US children and adolescents, 1988-2004." Pediatrics **121**(6): e1604-e1614.
- Welsh, J. A., A. Sharma, S. A. Cunningham und M. B. Vos** (2011). "Consumption of added sugars and indicators of cardiovascular disease risk among US adolescents." Circulation **123**(3): 249-257.
- WHO** (2013). Obesity and overweight, World Health Organisation.

- Yamada, Y., K. Kato, T. Kameyama, K. Yokoi, H. Matsuo, T. Segawa, S. Watanabe, S. Ichihara, H. Yoshida, K. Satoh und Y. Nozawa** (2006). "Genetic factors for obesity." Int J Mol Med **18**(5): 843-851.
- Yang, J., S. C. Kalhan und R. W. Hanson** (2009). "What Is the Metabolic Role of Phosphoenolpyruvate Carboxykinase?" Journal of Biological Chemistry **284**(40): 27025-27029.
- Yen, K., H. B. Patel, A. L. Lublin und C. V. Mobbs** (2009). "SOD isoforms play no role in lifespan in ad lib or dietary restricted conditions, but mutational inactivation of SOD-1 reduces life extension by cold." Mechanisms of Ageing and Development **130**(3): 173-178.
- Zhu, M., R. de Cabo, R. M. Anson, D. K. Ingram und M. A. Lane** (2005). "Caloric restriction modulates insulin receptor signaling in liver and skeletal muscle of rat." Nutrition **21**(3): 378-388.

7. Anhang

7.1 Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1:** Struktur von Fruktose, Glukose und Saccharose 6
 Quelle: <http://cdavies.wordpress.com/2009/01/27/simple-sugars-fructose-glucose-and-sucrose/>
- Abbildung 2:** Fruktoseaufnahme im Darm und Abgabe in den Blutkreislauf (Ouyang et al. 2008) 9
 Quelle: **Jones, H. F., R. N. Butler und D. A. Brooks** (2011). "Intestinal fructose transport and malabsorption in humans." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **300**(2): G202-206.
- Abbildung 3:** Abbau der Fruktose in der Leber (Elliott et al. 2002) 10
 Quelle: **Elliott, S. S., N. L. Keim, J. S. Stern, K. Teff und P. J. Havel** (2002). "Fructose, weight gain, and the insulin resistance syndrome." American Journal of Clinical Nutrition **76**(5): 911-922.
- Abbildung 4:** Fruktose-induzierte Stoffwechselmechanismen (Lim et al. 2010) 11
 Quelle: **Lim, J. S., M. Mietus-Snyder, A. Valente, J. M. Schwarz und R. H. Lustig** (2010). "The role of fructose in the pathogenesis of NAFLD and the metabolic syndrome." Nat Rev Gastroenterol Hepatol **7**(5): 251-264.
- Abbildung 5:** Regulationsmechanismen von FOXO (Daitoku et al. 2011) 14
 Quelle: **Daitoku, H., J.-i. Sakamaki und A. Fukamizu** (2011). "Regulation of FoxO transcription factors by acetylation and protein–protein interactions." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research **1813**(11): 1954-1960.
- Abbildung 6:** Die zwei Geschlechter des *C.elegans* (Zarkower 2006) 16
 Quelle: **Zarkower, D.** Somatic sex determination (February 10, 2006), *WormBook*, ed. The *C. elegans* Research Community, WormBook, doi/10.1895/wormbook.1.84.1, <http://www.wormbook.org>.
- Abbildung 7:** Entwicklungsstadien von *C.elegans* (Fielenbach et al. 2008) 17
 Quelle: **Fielenbach, N. und A. Antebi** (2008). "C. elegans dauer formation and the molecular basis of plasticity." Genes & Development **22**(16): 2149-2165.
- Abbildung 8:** IIS - Homologie zwischen Mensch und *C.elegans* (Christensen et al. 2006) 19
 Quelle: **Christensen, K., T. E. Johnson und J. W. Vaupel** (2006). "The quest for genetic determinants of human longevity: challenges and insights." Nat Rev Genet **7**(6): 436-448.
- Abbildung 9:** Regulation der Aktivität von DAF-16/FOXO (Rizki et al. 2011) 21
 Quelle: **Rizki, G., T. N. Iwata, J. Li, C. G. Riedel, C. L. Picard, M. Jan, C. T. Murphy und S. S. Lee** (2011). "The Evolutionarily Conserved Longevity

Determinants HCF-1 and SIR-2.1/SIRT1 Collaborate to Regulate DAF-16/FOXO." PLoS Genet **7**(9): e1002235.

Abbildung 10: Funktionen der PEPCKs und der Pyruvat Carboxylase (Beale et al. 2007) 23

Quelle: **Beale, E. G., B. J. Harvey und C. Forest** (2007). "PCK1 and PCK2 as candidate diabetes and obesity genes." Cell Biochem Biophys **48**(2-3): 89-95.

Abbildung 11: Induktion von Genen der Lipogenese/Glykolyse durch SREBP-1c (Dentin et al. 2005)..... 26

Quelle: **Dentin, R., J. Girard und C. Postic** (2005). "Carbohydrate responsive element binding protein (ChREBP) and sterol regulatory element binding protein-1c (SREBP-1c): two key regulators of glucose metabolism and lipid synthesis in liver." Biochimie **87**(1): 81-86.

Abbildung 12: Relative mRNA-Level von *daf-2* 44

Abbildung 13: Abhängigkeit der mRNA-Level von der Fruktosemenge 44

Abbildung 14: Relative mRNA-Level von *sir 2.1* 45

Abbildung 15: Relative mRNA-Level von *daf-16* 46

Abbildung 16: Relative mRNA-Level von *sod-3* 47

Abbildung 17: Relative mRNA-Level von *pyc-1* 47

Abbildung 18: Relative mRNA-Level von *pck-1* 48

Abbildung 19: Relative mRNA-Level von *fgt-1* 49

Abbildung 20: Relative mRNA-Level von *sbp-1* 50

Abbildung 21: Relative mRNA-Level von *pod-2* 50

Abbildung 22: Stress Assay mit Paraquat dichloride..... 52

7.2 Messdaten

	<i>pck-1</i>	<i>pck-1</i>	<i>pck-1</i>	MW	STABW	SE
Glukose		1,311	0,3186	0,8148	0,7017	0,4051
Fruktose	1,5378	1,4775	1,6245	1,5466	0,0739	0,0427
Saccharose	0,9684	1,0253	1,2865	1,0934	0,1696	0,0979
50/50 - Glukose/Fruktose	0,9171	1,2827	0,802	1,0006	0,251	0,1449

	<i>sod-3</i>	<i>sod-3</i>	<i>sod-3</i>	MW	STABW	SE
Glukose	0,3186	1,0908	1,2783	0,8959	0,5087	0,3597
Fruktose	3,8077	1,052	2,9305	2,5967	1,4078	0,9955
Saccharose	1,8294	0,9257	1,0987	1,2846	0,4797	0,3392
50/50 - Glukose/Fruktose	1,2918	0,8499	1,4296	1,1904	0,3028	0,2141

	<i>sir 2.1</i>	<i>sir2.1</i>	<i>sir2.1</i>	<i>sir2.1</i>	<i>sir2.1</i>
Glukose	0,6951	0,4099	1,1566	1,2684	0,6502
Fruktose	2,1699	1,6636	1,1079	1,3585	
Saccharose	2,2524	0,8928	1,02		
50/50 - Glukose/Fruktose	0,9531	1,6788	1,662		0,5014
	MW	STAB	SE		
Glukose	0,836	0,3626	0,1621		
Fruktose	1,5749	0,4571	0,2044		
Saccharose	1,3884	0,7509	0,531		
50/50 - Glukose/Fruktose	1,1988	0,5749	0,2571		

	<i>pyc-1</i>	<i>pyc-1</i>	<i>pyc1</i>	<i>pyc1</i>	MW	STAB	SE
Glukose	0,7385	1,4335	1,4574	0,6861	1,0789	0,424	0,212
Fruktose	1,0198	1,9557	2,3837	1,6356	1,7487	0,5745	0,2873
Saccharose	0,8354	1,2518	1,7242	1,1831	1,2486	0,3657	0,1829
50/50 - Glukose/Fruktose	0,6588	1,5272	1,643	1,1273	1,2391	0,4455	0,2227

	<i>sbp-1</i>	<i>sbp-1</i>	<i>sbp-1</i>	<i>sbp-1</i>	MW	STAB	SE
Glukose	0,7496	0,9982	0,6446	1,0504	0,8607	0,1949	0,0974
Fruktose	1,2374	1,2108	0,8362	1,1159	1,1001	0,1835	0,0918
Saccharose	0,8519	1,0999	0,9932	1,2884	1,0584	0,184	0,092
50/50 - Glukose/Fruktose	0,7733	1,0165	0,8013	1,1529	0,936	0,1809	0,0904

	<i>fgt-1</i>	<i>fgt-1</i>	MW	STAB	SE
Glukose	0,9861	1,4372	1,2117	0,3189	0,2255
Fruktose	1,1597	1,1792	1,1695	0,0138	9,77E-03
Saccharose	0,9274	1,1744	1,0509	0,1747	0,1235
50/50 - Glukose/Fruktose	1,4342	1,3699	1,402	0,0454	0,0321

	<i>pod-2</i>	<i>pod-2</i>	<i>pod2</i>	<i>pod2</i>	MW	STAB	SE
Glukose	0,394 3	1,0383	0,3376	2,9618	1,183	1,2277	0,6138
Fruktose	0,635	0,9516	0,2508	0,7428	0,6451	0,2939	0,1469
Saccharose	0,836 4	1,7763	0,2183	0,6465	0,8694	0,6576	0,3288
50/50 - Glukose/Fruktose	0,600 8	0,6688	0,2815	0,8337	0,5962	0,2315	0,1157

	<i>daf-16</i>	<i>daf-16</i>	<i>daf-16</i>	<i>daf-16</i>	<i>daf-16</i>	<i>daf-16</i>	<i>daf-16</i>
Glukose	0,474 7	1,1477	0,7565	1,0133	0,4133	0,7565	1,9247
Fruktose	3,099 6	0,9088	0,8813	0,8723	1,0213	0,8813	5,634
Saccharose	3,644 5	0,8905	0,9305	1,1502		0,4592	1,8629
50/50 - Glukose/Fruktose	1,422 7	1,0761	0,9305	1,0938	1,6637		4,2361
	MW	STAB	SE				
Glukose	0,926 7	0,5129	0,1939				
Fruktose	1,899 8	1,8379	0,6947				
Saccharose	1,489 7	1,1516	0,5758				
50/50 - Glukose/Fruktose	1,737 1	1,253	0,5604				

	<i>daf-2</i>	<i>daf-2</i>	<i>daf-2</i>	MW	STAB	SE
Glukose	0,9256	1,9711	1,9019	1,5995	0,5847	0,3376
Fruktose	3,6971	1,9079	1,1639	2,2563	1,302	0,7517
Saccharose	1,1393	1,4856		1,3125	0,2449	0,1732
50/50 - Glukose/Fruktose	2,4405	1,853	1,5161	1,9365	0,4678	0,2701

7.3 Abkürzungen

ACC	Actetyl-CoA Carboxylase
BMI	Body Mass Index
<i>C.elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
CaCl₂	Calciumchlorid
cDNA	complementary Deoxyribonucleic acid
csq-1	Calsequestrin
Ct	Cycle Threshold
daf-16	abnormal DAuer Formation Typ 16
daf-2	abnormal DAuer Formation Typ 2
DEPC	Diethylpyrocarbonate
DNA	Deoxyribonucleic acid
dsRNA	double stranded Ribonucleic acid
<i>E.Coli</i>	<i>Escherichia Coli</i>
fgt-1	facilitated glucose transporter
FoxO	Forkhead box 'Other'
FudR	5-Fluoro-2'-deoxyuridine
GLUT	Glukose Transporter
H₂O	Wasser
HFCS	High Fructose Corn Syrup
IGF	Insulin-like Growth Factor
IIS	Insulin Signalkaskade
K₂HPO₄	Dikaliumhydrogenphosphat
KH₂PO₄	Kaliumhydrogenphosphat
KOH	Kaliumhydroxid
L1 (2,3,4)	Larvenstadium 1 (2,3,4)
LB Medium	<u>L</u> ysogeny <u>B</u> roth Medium
MgSO₄	Magnesiumsulfat
MnSOD	manganhaltige Superoxiddismutase
mRNA	messenger Ribonucleic acid
Na₂HPO₄	Dinatriumhydrogenphosphat

NaCl	Natriumchlorid
NaOCL	Natriumhypochlorit
NGM	Nematode Growth Medium
NTC	No Template Control
OD₆₀₀	Optische Dichte bei 600 Nanometer
PC	Pyruvat Carboxylase
pck-1	Phosphoenolpyruvat Carboxykinase
PCR	polymerase chain reaction
PEPCK	Phosphoenolpyruvat Carboxykinase
PEPCK-C	cytosolische Phosphoenolpyruvat Carboxykinase
PEPCK-M	mitochondriale Phosphoenolpyruvat Carboxykinase
pmp-3	Peroxisomal Membrane Protein related
pod-2	Polarity and Osmotic sensitivity Defect
pyc-1	Pyruvat Carboxylase
RNA	Ribonucleic acid
RNAi	Ribonucleic acid Interferenz
RNAse	Ribonukleinase
rpm	rounds per minute
RT-qPCR	Real Time quantitative Polymerase Chain Reaction
sbp-1	Sterol regulatory element-binding protein
sir 2.1	Silent Information Regulator 2.1
SIRT1	Sirtuin Typ 1
sod-3	Superoxiddismutase
WHO	World Health Organisation
Y45F10D.4	Eisen-Schwefel-Cluster-Gerüstprotein

Curriculum vitae

Manuel Aichert, BSc.

Hagenmüllergasse 21/1/21
1030 Wien

+43 650 20 39 736
manuel.aichert@gmail.com

Geboren am 31.03.1986 in Heilbronn
Staatsbürgerschaft: Deutsch



Studium und Ausbildung

09/2011 – heute	Universität Wien, Wien Masterstudiengang Molekulare Ernährung ▪ Master Thesis: „Fruktose-induzierte Veränderungen im Kohlenhydrat- und Lipidstoffwechsel von <i>C.elegans</i> “
09/2006 – 07/2011	Universität Wien, Wien Bachelor Studiengang Ernährungswissenschaften ▪ Bachelor Thesis: „Maßnahmen zur Bekämpfung von Übergewicht – Kritischer Vergleich diverser Diätformen und nicht-zentral wirkender, diätunterstützender Substanzen“
09/1996 – 06/2005	Albert-Schweitzer-Gymnasium, Neckarsulm ▪ Allgemeine Hochschulreife ▪ Leistungskurse: Mathematik, Englisch, Deutsch, Biologie und Sport

Praktika

07/2013 – 08/2013	Praktikum, Emerging Focus Nutrigenomics Universität Wien Schwerpunkt: Genexpression (qPCR), <i>C.elegans</i>
08/2012 – 09/2012	Praktikum, Emerging Focus Nutrigenomics Universität Wien Schwerpunkt: Probenaufarbeitung HPLC-MS, Spektralphotometrie

Berufserfahrung

09/2012 - heute	Tutorium - Übungen für experimentelle Ernährungsforschung Universität Wien ▪ Einweisung von Masterstudenten in Arbeitstechniken im Labor ▪ Qualitative und quantitative Bestimmung von Farbstoffen in Lebensmittelprouben
09/2008 – 04/2013	AviSys Electronics GmbH, Wien ▪ Teilzeitbeschäftigung als studentische Hilfskraft
09/2005 – 05/2006	Arbeiter Samariter Bund, Heilbronn ▪ Ausbildung zum Rettungssanitäter im Rahmen des Zivildienstes

Qualifikationen / Zusatzkenntnisse

Sprachen	Deutsch: Muttersprache Englisch: verhandlungssicher Französisch: Grundkenntnisse
EDV	Gute Kenntnisse in MS Office Grundkenntnisse in Adobe Photoshop, Adobe Illustrator, SigmaPlot
Labortechniken	Sicher im Umgang mit zahlreichen Labortechniken: RT qPCR, Spektralphotometrie, Gelelektrophorese
Lebendorganismen	Wormhandling <i>C.elegans</i> (z.B. Erhaltung, EggPrep, Lifespan, Stress Assay, Glycerol Stocks etc.), Bakterienhandling

Erklärung

Ich, Manuel Aichert, erkläre hiermit diese Arbeit selbstständig verfasst und alle verwendeten Quellen angeführt zu haben. Alle Ergebnisse aus anderen Arbeiten wurden als Zitate angeführt.

Datum/Unterschrift