universität wien

# Masterarbeit

„Molekulare Regulations- und Adaptionsmechanismen im Folsäurestoffwechsel von *C. elegans*“

verfasst von

Thomas Fuhrmann, BSc.

angestrebter akademischer Grad

Master of Science (MSc.)

Wien, 2013

| | |
|---|---|
| Studienkennzahl lt. Studienblatt: | A 066 838 |
| Studienrichtung lt. Studienblatt: | Ernährungswissenschaften |
| Betreut von: | Univ.-Prof. Dr. Jürgen König |

# Danksagung

In erster Linie bedanke ich mich ausgiebig bei Frau Dr. Martina Ortbauer für ihre direkte Betreuung sowohl beim praktischen Arbeiten im Labor, als auch bei den theoretischen Überlegungen im Rahmen dieser Masterarbeit. Ich wusste den großen Einsatz ihrerseits und die viele Geduld immer sehr zu schätzen. Ihre Bereitschaft mich auch außerhalb ihrer Dienstzeit schriftlich mit Feedback und Anleitung bei meiner Masterarbeit zu unterstützen half mir sehr dabei das Versuchsprotokoll exakt und flexibel einzuhalten.

Auch an Herrn Univ. Prof. Dr. Jürgen König geht mein Dank. Einerseits für die Übernahme der Masterarbeit, andererseits für sein vorbildliches Engagement in der Lehre. Sein umfangreiches Hintergrundwissen und sein Aufruf zum wissenschaftlich-kritischen Denken hat das Masterstudium Ernährungswissenschaften an Plastizität und Interesse gewinnen lassen.

Ebenfalls möchte ich mich bei Frau Sandra Auernigg-Haselmaier dafür bedanken, dass sie die Metabolitenmessungen am LC-Massenspektrometer im Rahmen dieser Masterarbeit durchgeführt hat.
Auch an die ganze Forschungsgruppe allgemein möchte ich meinen Dank aussprechen, da immer eine gute Stimmung und ein sehr angenehmes, freundliches Arbeitsklima herrschten.

# Inhaltsverzeichnis

**I. Einleitung und Fragestellung 6**

**1. Grundlagen und Literaturüberblick 7**

*1.1 Folsäure 7*

1.1.1 Folsäure und Homocystein 7

1.1.2 Der Folsäurestoffwechsel des Menschen 8

1.1.3 Nutrigenomics 10

1.1.4 Nutrigenomics und Folsäure 11

1.1.5 Folsäure und Schwangerschaft 12

*1.2 Caenorhabditis elegans* 13

1.2.1 Grundlagen 13

1.2.2 *C. elegans* als Modellorganismus 14

1.2.3 Der Folsäurestoffwechsel von *C. elegans* *15*

*1.3 RNA-interference* 16

1.3.1 RNA-interference allgemein & in *C. elegans* *16*

1.3.2 Gen-Knockdown und Gen-Knockout 21

*1.4 Orthologie der Folsäurestoffwechselenzyme* 22

1.4.1 Cystathioninbetasynthase (*cbs-1*/CBS) 22

1.4.2 Calsequestrin (*csq-1*/CASQ1) 23

1.4.3 Dihydrofolatreduktase (*dhfr-1*/DHFR) 23

1.4.4 Folattransporter (*folt-1*/SLC19A2) 23

1.4.5 Methioninsynthase (*metr-1*/MS) 23

1.4.6 Methylentetrahydrofolatreduktase (*mthf-1*/MTHFR) 23

1.4.7 Proton-Coupled Folate Transporter (*Y4C6.B5*/ SLC46A1) 24

1.4.8 ATP binding cassette D4 (*pmp-3*/ABCD4) 24

1.4.9 Thymidilatsynthase (*Y110A7A.4*/TYMS) 24

1.4.10 Iron-Sulfur Cluster Enzyme (*Y45F10D.4*/ISCU) 24

*1.5 PCR und Realtime-PCR* 24

1.5.1 One-Step und Two-Step qPCR 26

1.5.2 Quantifikation 26

1.5.3 Fluoreszenzmessung 27

1.5.4 cDNA Vervielfältigung 27

*1.6 Massenspektrometrie und Flüssigchromatographie* 28

**2. Materialien und Methoden 29**

*2.1 Materialien* 29

2.1.1 Chemikalien und Wasser 29

2.1.2 Lösungen 29

2.1.3 Verbrauchsmaterialien 33

2.1.4 Kits 34

2.1.5 Sonden 34

2.1.6 Bakterien 35

2.1.7 Nematoden 35

2.1.8 Geräte 36

*2.2 Methoden* *36*

2.2.1 Bakterienhandling 36

2.2.2 Plasmide und Verdau 37

2.2.3 Agarose-Gelelektrophorese 39

2.2.4 EggPrep 41

2.2.5 *C. elegans* *42*

2.2.6 *C. elegans* wildtype N2 Bristol Handling 42

2.2.7 Folsäuresupplementation 42

2.2.8 RNA Extraktion und Purifikation 42

2.2.9 Reverse Transkription 44

2.2.10 RT-qPCR 45

2.2.11 RT-qPCR Handling 47

2.2.12 Massenspektrometrische Messungen 48

2.2.13 LC-MS Parameter 50

**3. Ergebnisse 51**

*3.1 Plasmid Test Digest* *51*

*3.2 Ergebnisse RNAi Experimente* *52*

3.2.1 RNAi 53

3.2.1.1 METR-1 RNAi 53

3.2.1.2 MTHF-1 RNAi 54

3.2.1.3 DHFR-1 RNAi 55

3.2.2 Ergebnisse der RNAi mit Folsäure 56

3.2.2.1 METR-1 RNAi mit Folsäuresupplementation 57

3.2.2.2 MTHF-1 RNAi mit Folsäuresupplementation 58
3.2.2.3 DHFR-1 RNAi mit Folsäuresupplementation 59
3.2.3 Metabolitenmessung 60
**4. Diskussion 61**
*4.1 RNAi in C.elegans 61*
*4.2 Knockdown der METR-1, MTHF-1 und DHFR-1 62*
4.2.1 *METR-1* *62*
4.2.2 *MTHF-1* *63*
4.2.3 *DHFR-1* *64*
4.2.4 Expression der Transmembrantransporter *FOLT-1* & Y4C6.B5 64
4.2.5 Priorisierung des Methylierungspathways 65
*4.3 Knockdown der METR-1, MTHF-1 und DHFR-1 bei Supplementation mit Folsäure 65*
4.3.1 *METR-1* mit Folsäuresupplementation 65
4.3.2 *MTHF-1* mit Folsäuresupplementation 66
4.3.3 *DHFR-1* mit Folsäuresupplementation 67
4.3.4 Expression der Transmembrantransporter *FOLT-1* & Y4C6.B5 67
4.3.5 Priorisierung des DNA-Synthesepathways 67
*4.4 Zusammenfassung der RNAi Ergebnisse 68*
*4.5 Interpretation der RNAi der METR-1 Metabolitenmessung 69*
*4.6 SNPs und Folsäure Supplementierung 69*
**5. Zusammenfassung 70**
**6. Literaturverzeichnis 72**
**7. Anhang 75**
*7.1 Abbildungsverzeichnis 75*
*7.2 Datensätze 75*
*7.3 Diagramme Massenspektrometeie 77*
*7.4 Abkürzungen 81*

# I. Einleitung und Fragestellung

Die Untersuchung des Folsäurestoffwechsels im Nematoden *C. elegans* als genetischen Modellorganismus befindet sich in ihrer Anfangsphase. Es gibt derzeit nur wenige Studien die sich mit dem Knockout oder Knockdown von Genen in dessen Folsäurestoffwechsel beschäftigen.

Die Enzyme und Metaboliten des Folsäurestoffwechsels in *C. elegans* sind denen des Menschen sehr ähnlich. Durch Gen-Knockdown und Genexpressionsanalyse können molekulare Regulations- und Adaptionsmechanismen untersucht werden. Dies ist insofern interessant weil sich daraus möglicherweise auch Informationen über den Folsäurestoffwechsel des Menschen gewinnen lassen können, da dies beim Menschen experimentell nicht möglich ist und an ethische Grenzen stoßen würde.

Der Folsäurestoffwechsel spielt in Säugetieren eine tragende Rolle bei Methylierungsreaktionen und der *de novo* DNA-Synthese. Gen-Polymorphismen der involvierten Enzyme können schwere Folgen auf den Organismus haben, wie zum Beispiel Sterilität oder das Entstehen von Karzinomen. Störungen im Gleichgewicht des Folsäuremetabolismus durch ineffizienter arbeitende Enzyme, wie beispielsweise ein Single Nucleotide Polymorphismus (SNP) der Methyltetrahydrofolatreduktase, kann Entwicklungsstörungen bei Föten mit sich ziehen und die Lebensfähigkeit des Organismus einschränken. Die Sinnhaftigkeit von Folsäuresupplementation bei Single Nucleotide Polymorphismus Trägern ist allgemein noch zu beurteilen.

Es stellt sich die Frage, ob durch personalisierte Ernährung auf Basis von Genomanalysen, vorangetrieben durch das aufkeimende Forschungsfeld „Nutrigenomics“, die medizinischen Möglichkeiten und die Ernährungsforschung allgemein, in eine neue Richtung gelenkt werden. Folsäuresupplementation wird kontrovers diskutiert, da ein hoher Folsäurestatus über längere Zeit das Risiko für z.B. Prostata- oder Lungenkrebs erhöht. Daraus entstehenden ethischen Fragen, wie zum Beispiel die Rolle einer Folsäureanreicherung von Grundnahrungsmitteln beim Auftreten von Kolorektalkarzinomen, muss ein größerer Stellenwert in der politischen Diskussion und Gesundheitspolitik eingeräumt werden. Angesichts dessen, dass seit 1998 in den U.S.A. eine Folsäureanreicherung von Getreidemehl stattfindet, und in der E.U. dies ebenfalls diskutiert wird, ist dieses Thema sehr bedeutend und aktuell für die Gesundheit unserer Gesellschaft.

# 1. Grundlagen und Literaturüberblick

## 1.1 Folsäure

### *1.1.1 Folsäure und Homocystein*

Folsäure ist ein wasserlösliches Vitamin der B-Familie, welchem eine zentrale Rolle bei der Nukleinsäuresynthese, bei Methylierungsreaktionen und im Aminosäurestoffwechsel zukommt. Nahrungsfolate finden sich in Form von Pteroylpolyglutamaten, während Pteroylpolyglutaminsäuren (Abbildung 1) sich in Supplementen und angereicherten Lebensmitteln verwendet werden.

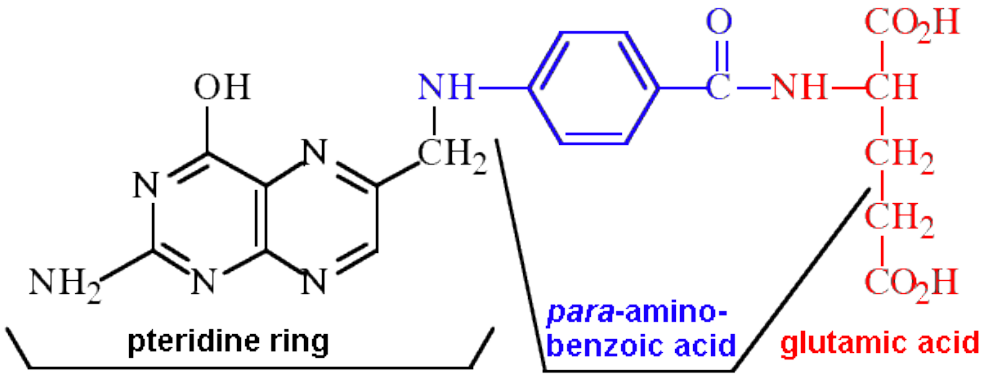



Abbildung 1: Pteroylmonoglutaminsäure

Beispielsweise wird seit 1998 in den U.S.A. und Kanada Mehl mit synthetischer Folsäure bei einer Konzentration von 1,2 mg/kg angereichert (Honein *et al.*, 2001). Synthetische Folsäure ist allerdings licht- und hitzeempfindlich, wodurch die Konzentration in Lebensmitteln je nach Verarbeitung stark schwanken kann.
Lebensmittel, die natürlich reich an Folat sind, sind beispielsweise grünblättriges Gemüse, grüne Bohnen, Zitrusfrüchte und Eigelb (Greenberg *et al.*, 2011). Die Bioverfügbarkeit von Nahrungsfolat entspricht ungefähr 50% derer von synthetischer Folsäure (Suitor *et al.*, 2000).

Homocystein (Abbildung 2) entsteht im Menschen durch Hydrolyse aus S-Adenosyl-Homocystein (SAH). SAH stammt aus der Demethylierung von S-Adenosyl-Methionin (SAM) bei DNA- und Histonmethylierung durch die DNMTs oder Protein- und RNA-Methylierungen.

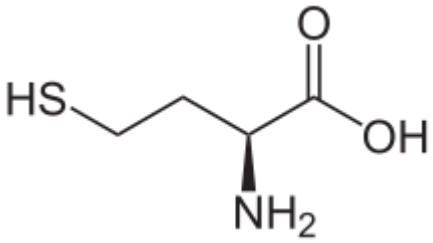



Abbildung 2: Homocystein

Erhöhte Plasmahomocysteinlevel sind mit verschiedenen Krankheiten assoziiert. Beispielsweise ist bei SNP-Trägern des Folsäurestoffwechsels eine niedrige Folatzufuhr ein größerer Risikofaktor für entzündliche Darmerkrankungen wie *Morbus Crohn* und *Colitis ulcerosa*, wobei erhöhte Plasmahomocysteinkonzentrationen als mögliche Ursache diskutiert werden (Oussalah *et al.*, 2011).

Erhöhte Homocysteinkonzentrationen im Plasma können mit Supplementation von Vitaminen der B-Familie (Folsäure, Pyridoxin und Cobalamin) gesenkt werden. Eine Meta-Analyse aus dem Jahre 2011 stellte allerdings fest, dass die dadurch niedrigere Homocysteinkonzentration das Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen nicht verringert (Zhou *et al.*, 2011). Dies deutet eventuell auf einen anderen kausalen Zusammenhang hin, wie z.B. vorhandene Plaque-Formationen aufgrund der vorherigen erhöhten Homocysteinlevels im Blut (Seinost *et al.*, 2000).

### *1.1.2 Der Folsäurestoffwechsel des Menschen*

Der Folsäurestoffwechsel des Menschen (Abbildung 3) hat zwei Funktionen. Zum einen dient er der DNA-Synthese und zum anderen für Methylierungsreaktionen von z.B. DNA, RNA oder Proteinen. Nahrungsfolat und synthetische Folsäure müssen im Organismus erst in ihre aktive Form, das 5-Methyl-Tetrahydrofolat (5-Me-THF) metabolisiert werden.

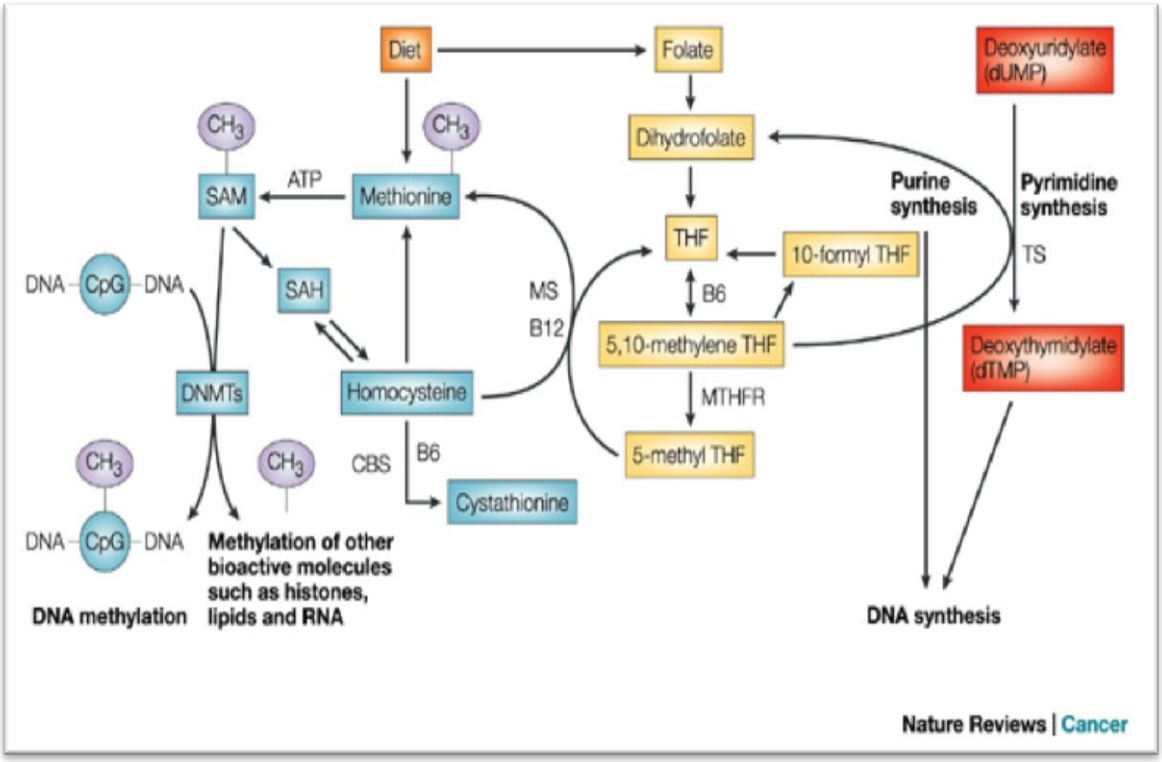



Abbildung 3: Folsäurestoffwechsel im Menschen

Nahrungsfolat wird aus dem Dünndarmlumen über den Proton Coupled Folate Carrier (PCFT) in das Blut aufgenommen. Über den Reduced Folate Carrier 1 (RFC) gelangt dieses dann aus dem Blut in das Zytosol (Blom *et al.*, 2011). Der Folatrezeptor Alpha (FRα) schleust ebenfalls Folsäure und Folatderivate in die Zellen (Kamen *et al.*, 2004) (Abbildung 4).

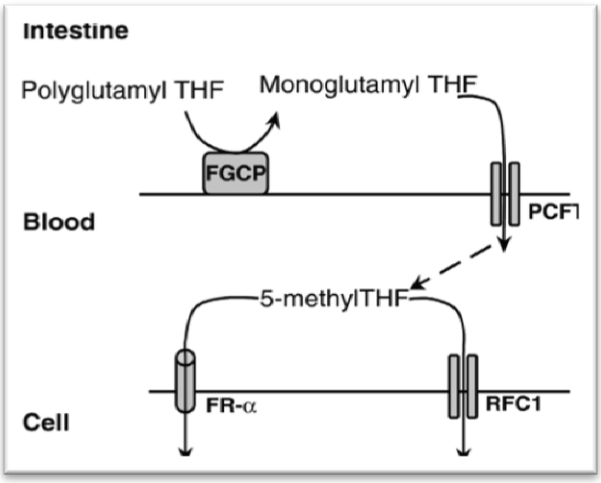



Abbildung 4: Folsäuretransporter

In der Leber reduziert die Dihydrofolatreduktase (DHFR) Folat zu Dihydrofolat (DHF) und dieses zu Tetrahydrofolat (THF). Dabei fungiert NADPH/H+ als H-Donor (Schnell *et al.*, 2004).

Über das Coenzym Pyridoxin (Vitamin $B_6$) und dem Enzym Serin-Hydroxymethyltransferase (SHMT) entsteht aus THF das 5,10-Methylen-THF (5,10-Me-THF). Dieses wird im Folsäurestoffwechsel über das 10-Formyl-THF zur Purinsynthese herangezogen und spielt somit eine entscheidende Rolle bei der DNA-Synthese. Die Pyrimidinsynthese findet parallel dazu über die Thymidilatsynthase (TYMS) aus Desoxyuridylat Monophosphat (dUMP) zu Desoxythymidylat Monophosphat (dTMP) statt.

5,10-Me-THF kann durch die Methylentetrahydrofolatreduktase (MTHFR) zu 5-Me-THF reduziert werden. Dabei fungiert Riboflavin als Cofaktor (Jala *et al.*, 2003). Dieses dient mit Hilfe des Enzyms Methioninsynthase (MS) als Methylgruppendonor bei der Regeneration von Methionin aus Homocystein, wodurch die Homocysteinkonzentration im Blut gesenkt wird. Bei diesem Schritt dient Cobalamin (Vitamin $B_{12}$) als Coenzym.

Homocystein kann parallel dazu auch mit der Aminosäure Serin zu Cystathionin abgebaut werden. Daran sind die Cystathionin-Betasynthase (CBS) und das Pyridoxin beteiligt.

Methionin wird im Zytosol unter Verbrauch von ATP zu S-Adenosyl-Methionin (SAM) umgewandelt und steht dadurch im Menschen als Methylgruppendonor zur Verfügung. DNA-Methylierungen und Histonmethylierungen werden vom Enzym DNA-Methyltransferase 1 (DNMT1) durchgeführt (Dhe-Paganon *et al.*, 2011). Dabei wird der 5'Kohlenstoff des Cytosinrings methyliert. DNMT1 methyliert die DNA bei der Zellteilung und die DNMT3a und DNMT3b methylieren *de novo* nach der Zelldifferenzierung (Okano *et al.*, 1999). Im Genom von *C. elegans* existieren keine DNA- bzw. Histonmethylierungen, da keine DNMTs vorhanden sind.

### *1.1.3 Nutrigenomics*

Nutrigenomics ist das Forschungsgebiet über die Interaktion von Nährstoffen und Nahrungsmitteln mit der Genexpression eines Organismus. Dabei werden individuelle Polymorphismen des Genoms in die Nährstoffempfehlungen miteinbezogen. Nutrigenomics stellt dabei einen Ansatz zur „*personalized nutrition*" dar.

Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) sind die häufigste Form von DNA-Alterationen. In SNPs sind einzelne Basen des Genoms durch eine andere Base ausgetauscht, was sich bei der Translation in Form einer anderen Aminosäure äußern kann. Dadurch verliert das entstehende Protein eventuell einen Teil-, oder seine Gesamtfunktion (Vignal *et al.*, 2002). Wenn eine andere Aminosäure in die Sequenz eingebaut wird und dabei das Protein in seiner Funktion nicht verändert wird, oder der SNP aufgrund der Redundanz des genetischen Codes für die selbe Aminosäure kodiert, spricht man von einer „*silent mutation*".

Die Krankheit Phenylketonurie, eine Punktmutation auf dem langen Arm des Chromosom 12, ist ein prominentes Beispiel für eine verpflichtende individuelle Einhaltung einer speziellen Ernährungsform aufgrund einer Alteration im Genom des betroffenen Individuums. Bei Phenylketonurie ist die Funktion der Phenylalaninhydroxylase eingeschränkt. Eine strikt phenylalaninarme Ernährung ist dabei das ganze Leben lang einzuhalten (Belanger-Quintana *et al.*, 2011).

### *1.1.4 Nutrigenomics und Folsäure*

Im Folsäurestoffwechsel können mehrere Polymorphismen die Enzymaktivitäten beeinflussen. Beispielsweise erhöht der SNP Rs1801133 (C667T) des Enzyms MTHFR dessen Thermolabilität. Dadurch senkt sich die Enzymaktivität im Vergleich zum CC Wildtyp auf ca. 66% in CT-, und 30% in TT-Allel-Trägern (Ulrich *et al.*, 2000). Als Folge davon erhöht sich in den 667TT Trägern die Blut-Homocysteinkonzentration. Eine 66% Aktivität, wie sie bei den CT Trägern auftritt, reicht aber aus, um Hyperhomocysteinämie aufgrund der niedrigeren Enzymaktivität zu vermeiden (Pejchal *et al.*, 2006).

Folsäure scheint eine Doppelrolle bei der Krebsentstehung zu spielen.

Während ein hoher Status an Plasmafolat als Substrat für die DNA-Reparatur bei chemischen oder physikalischen DNA-Schäden von Vorteil ist, und einer potentiellen Kanzerogenese durch DNA-Schäden entgegenwirkt, könnte ein hoher Status gleichzeitig auch bei der Tumorentwicklung progressiv wirken. Tumorzellen sind für die Zellteilung und das Zellwachstum auf ausreichend Folsäure angewiesen. Antifolate wie Methotrexat wurden, medizingeschichtlich gesehen, zur Chemotherapie eingesetzt

(Smith *et al.*, 2008) und finden heute noch Anwendung bei Autoimmunerkrankungen wie *Lupus erythematosus* oder rheumatoider Arthritis.

In der Literatur finden sich widersprüchliche Aussagen zur Rolle der Folsäure bei der Krebsentstehung.
Niedrige Folatkonzentrationen im Plasma wurden als protektiv gegen Kolorektalkrebs eingestuft (Van Guelpen *et al.*, 2006).
Bei Nachkommen von Müttern, welche während der Schwangerschaft mit Folsäure supplementiert hatten, wurde ein niedrigeres Auftreten von Kolorektalkrebs festgestellt. Dies kommt bei diesen Nachkommen eventuell daher, dass geringere Mengen an DNA-Schäden im Rektum vorhanden waren (Sie *et al.*, 2011).
Im Gegensatz dazu wurde bei der oberen Tertile von Männern, die Folsäure über die Nahrung und Supplemente aufnahmen, ein dreifach höheres Risiko für Kolorektalkrebs beobachtet. Das könnte eventuell auf Unterschiede bei der Metabolisierung von Folsäure zwischen Männern und Frauen schließen lassen (Curtin *et al.*, 2011).
Das Auftreten von Neuralrohrdefekten ist in den U.S.A. seit der Einführung der Folsäureanreicherung von Mehl im Jahre 1998 zurückgegangen. Allerdings erhöhte sich gleichzeitig in der Population über 50 Jahren die Inzidenz von Kolorektalkrebs, da kolorektale Adenome durch den höheren Folatstatus mehr Substrat für die Tumorprogression zur Verfügung haben könnten (Mason *et al.*, 2007).
Dem widersprüchlich hatte in einer anderen Studie eine Supplementation von 1 mg Folsäure pro Tag über 3 bis 6,5 Jahre keine signifikanten Auswirkungen auf das Wiederauftreten von Adenomen (Wu *et al.*, 2009).

### *1.1.5 Folsäure und Schwangerschaft*

Folsäure in Form von 5,10-Me-THF wird bei der DNA-Synthese als Substrat benötigt. Während der Schwangerschaft erhöht sich aufgrund des Fötus der Bedarf.
Das Auftreten von Neuralrohrdefekten im Neugeborenen, wie *Spina bifida* und Anenzephalie, kann durch Folsäuresupplementation gesenkt werden.
In den U.S.A., wo seit 1998 eine Folsäureanreicherung von Mehl praktiziert wird, wurde ein 19% Rückgang an Neuralrohrdefekten beobachtet (Honein *et al.*, 2001). Das U.S. National Institute of Health empfiehlt während der Schwangerschaft pro Tag eine

Supplementation von 600 µg Folsäure und respektive 500 µg in der postpartalen Stillperiode.

Frauen die durch Familienanamnese, Ethnizität, Alkohol- bzw. Tabakmissbrauch oder einer vorherigen Geburt mit Neuralrohrdefekten des Fötus ein höheres Risiko für eine Schwangerschaft mit Neuralrohrdefekt haben, wird in manchen Quellen eine Supplementation von bis zu 5 mg Folsäure pro Tag empfohlen (Wilson *et al.*, 2007).

Weiters reduziert eine Folsäuresupplementation das Risiko für kongenitale Herzfehler und Frühgeburten, wobei der Mechanismus hinter der geringeren Rate an Frühgeburten bei Folsäuresupplementation derzeit nicht bekannt ist.

Ein genetischer Einflussfaktor könnte ein Polymorphismus der *shmt-1* sein. Eine verringerte SHMT1 Aktivität könnte zelluläre THF-Konzentrationen senken und in Individuen einen Mangel induzieren, obwohl sie die täglichen Aufnahmeempfehlungen einhalten. So wurde ein 100% erhöhtes Risiko für Frühgeburten durch dessen Rolle im Folsäurestoffwechsel beobachtet (Engel *et al.*, 2006).

Allerdings kann durch einen hohen Folatstatus eine perniziöse Anämie, ausgelöst durch ein Cobalamindefizit, maskiert werden. Dies führt durch eine subakute Degeneration des Rückenmarks zu kognitiven Beeinträchtigungen des Neugeborenen.

## 1.2 *Caenorhabditis elegans*

### *1.2.1 Grundlagen*

Der natürliche Lebensraum des Nematoden *Caenorhabditis elegans* ist der Erdboden. Er ernährt sich hauptsächlich von Mikroorganismen, kann aber genauso simple Makronährstoffe wie Glukose als Nahrungsquelle heranziehen. Der Fadenwurm wurde in den Naturwissenschaften im Jahre 1974 durch Sydney Brenner populär, welcher diesen als Modellorganismus verwendete (Brenner, 1974). Seitdem wurden drei Nobelpreise an Forscher vergeben, die *C. elegans* als Modellorganismus benutzten, darunter auch Brenner selbst im Jahre 2002. Die Arbeit an der Entwicklung der RNA-interference Methode durch Andrew Fire ist dabei besonders bedeutend, da RNA-interference in *C. elegans* eine effiziente Methode des Gen-Knockdowns darstellt (Fire *et al.*, 1998). Andrew Fire und Craig Mello erhielten dafür im Jahre 2006 den Nobelpreis für Physiologie oder Medizin. Der Nobelpreis für Chemie ging mit *C.*

*elegans* Involvierung 2008 an Shimoura, Chalfie und Tsien für die Entdeckung des Grün-fluoreszierenden Proteins.

Als erstes beschrieb 1901 der französische Zoologe und Botaniker Émile Maupas den Fadenwurm in seinem Werk „*Modes et formes de reproduction des nematodes*", nachdem er ihn im Jahre 1900 in Algerien entdeckte.

Zoologisch gesehen ordnet sich der Nematode dem Reich der Animalia zu.

**Klassifizierung**

| | |
|---|---|
| *Stamm:* | Fadenwürmer |
| *Klasse:* | Secernentea |
| *Ordnung:* | Rhabditida |
| *Familie:* | Rhabditidae |
| *Gattung:* | Caenorhabditis |
| *Art:* | C. elegans |

### *1.2.2 C. elegans als Modellorganismus*

Die Vorteile von *C. elegans* (Abbildung 5) als Modellorganismus sind unter anderem seine konstante Zellzahl (Eutelie) (Azevedo *et al.*, 2001) und seine Durchsichtigkeit. Im Wachstumsstadium hat er bis zu 1090 Zellen, wobei einige bis zum adulten Stadium durch Apoptose abgebaut werden. Die Hermaphroditen (XX) haben 959 Zellen und die Männchen besitzen (XO) 1031 Zellen (WORMATLAS). *C. elegans* kann auf Agar-Agar Platten leicht mit *E. coli* Bakterien kultiviert werden und unter ungünstigen Lebensbedingungen, wie z.B. Nahrungsknappheit oder physiologisch unvorteilhaften Temperaturen, kann er in ein Dauerlarvenstadium übergehen. Er kann sowohl in wässriger Lösung als auch auf Agar-Agar-Petrischalen gehalten werden. Weiters ist die Handhabung im Labor durch seine geringe Größe von ca. 1,1 mm Länge und 80 µm Durchmesser, seiner schnellen Generationsfolge von ca. 45-50 h bei 20°C und hohe Nachkommenschaft von 300 Eiern pro Hermaphrodit, welche 99.9% der Population ausmachen, unkompliziert (WORMATLAS). Es wird geschätzt, dass zu 42% der menschlichen Krankheitsgene ein Ortholog in *C. elegans* existiert (Culetto *et al.*, 2000) und 74% der menschlichen Gensequenzen auch in *C. elegans* vorhanden sind (Consortium, 1998).

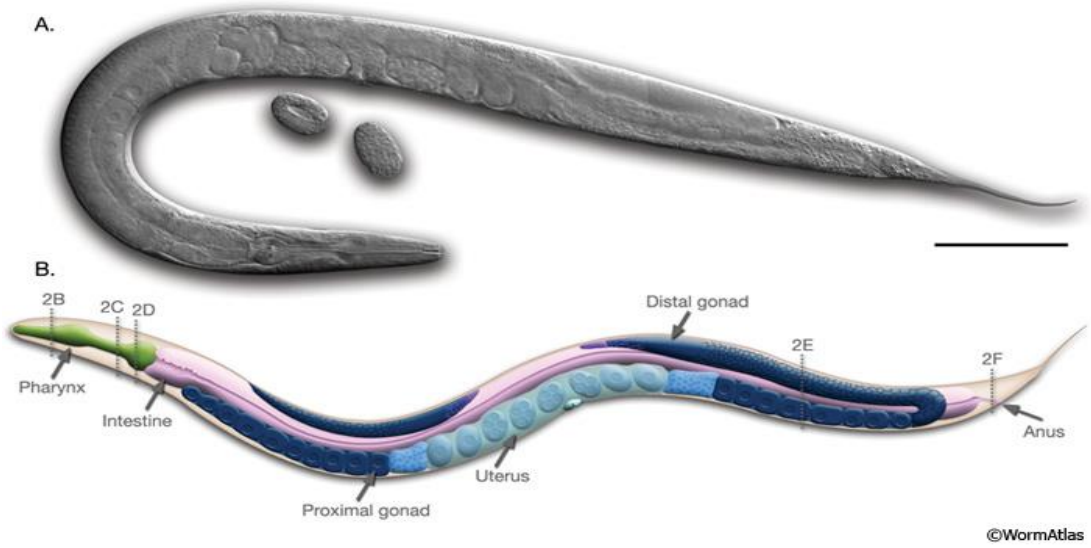



Abbildung 5: *C. elegans* Aufbau und Aussehen

Seit 1998 ist das Genom des Nematoden vollständig sequenziert (Consortium, 1998). Aufgrund seiner Zuordnung zu den Invertebraten stellt *C. elegans* eine attraktive Alternative zum Tierversuch dar und dieser wird in vielen Bereichen der naturwissenschaftlichen Forschung, u.a. der Neurologie, der Biochemie, der Alzheimerforschung, im Drug Screening und in Lifespan Experimenten verwendet.

### *1.2.3 Der Folsäurestoffwechsel von C. elegans*

Es gibt kaum Literatur über die Regulation des Folsäurestoffwechsels in *C. elegans*. Eukaryoten können Folsäure nicht selbst synthetisieren und sind daher auf die Aufnahme über die Nahrung angewiesen (Brzezinska *et al.*, 2000).

Bei einer spontanen Mutation des aroD Gens in HT115(DE3) Bakterien wurde in einer Studie eine Erhöhung der *C. elegans* Lebensspanne um 50% beobachtet. AroD-Mutanten besitzen eine geringere Folateigensynthese. Supplementierte man die Agar-Platten mit synthetischer Folsäure, revidierte sich der lebensverlängernde Effekt auf den Nematoden (Virk *et al.*, 2012).

Auch in Experimenten innerhalb der Arbeitsgruppe stellte sich eine Erhöhung der Lebenserwartung ein, wenn die Nematoden unter Folsäuremangel litten (Freistetter, Fuhrmann et al., unpublished data).

Der lebensverlängernde Effekt wurde auch in Ratten bei Sulfamethoxazol (SMX) Verabreichung, welches die Folateigensynthese von Mikroorganismen im Darm der Ratten hemmt, auf die Mikroflora beobachtet (Nguyen *et al.*, 2012). Bei einem Knockout des *folt-1* Gens in *C. elegans* war die Lebensdauer im Vergleich zur N2-Stamm Kontrollgruppe im Durchschnitt um 45% verringert. Dies legt nahe, dass der FOLT-1 Transporter im Körper des Nematoden bei mehreren Stoffwechselwegen eine Rolle spielt (Austin *et al.*, 2010).

## 1.3 RNA-interference

### *1.3.1 RNA-interference allgemein & in C. elegans*

Der Mechanismus der RNA-interference (RNAi) wurde erstmals zu Beginn der 90er Jahre in Pflanzen beobachtet (Napoli *et al.*, 1990) und das Konzept dann in *C. elegans* von Mello und Fire für die naturwissenschaftliche Forschung entwickelt. Es gibt mehrere Methoden um RNAi in *C. elegans* erfolgreich durchzuführen. Diese sind die Mikroinjektion, das Einlegen der Nematoden in dsRNA-Lösung und das Verfüttern von genspezifisch, dsRNA produzierenden, transgenen *E. coli* Bakterien (Fire *et al.*, 1998) (Abbildung 6).

Bei letztgenannter werden *E. coli* Bakterien vom Wurm gefressen und die dsRNA gelangt dadurch über spezielle Transmembrantransporter in die Zielzellen. So ist, im Vergleich zur Mikroinjektion, eine umfangreichere Verteilung im Organismus möglich.

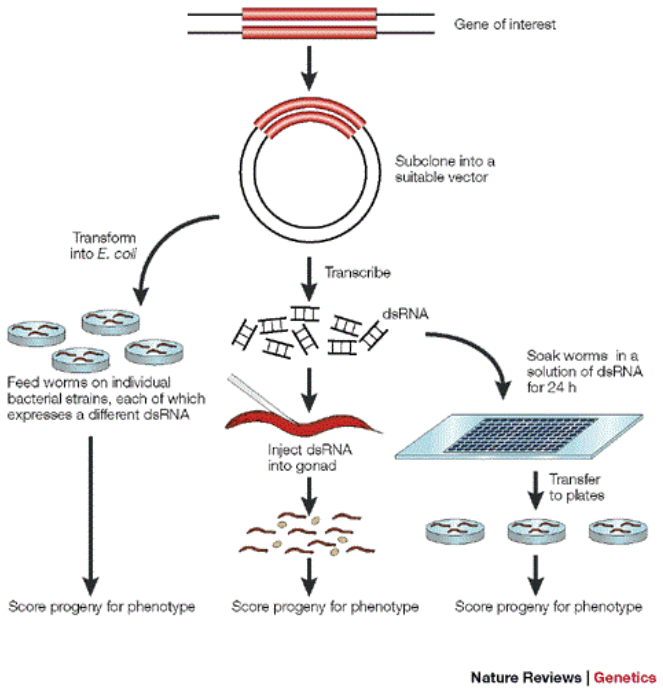



Abbildung 6: RNA-interference in C. elegans

Im Plasmid befindet sich die Open Reading Frame, welche für die gewünschte, zu exprimierende dsRNA kodiert. Um die Expression derer zu kontrollieren, wird diese in das Lac-Operon der Bakterien kloniert. Das Lac-Operon (Abbildung 7) besteht allgemein aus einer regulatorischen und einer strukturellen Sequenz.

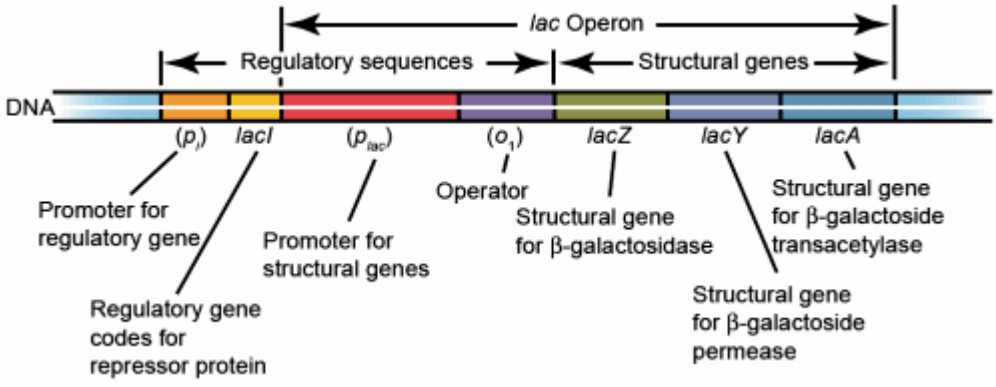



Abbildung 7: Lac-Operon

Die regulatorische Einheit ist der strukturellen vorangeschaltet und reguliert die Expression der Gene ß-Galaktosidase (LacZ-Gen), ß-Galaktosidpermease (LacY-Gen) und ß-Galaktosidtransacetylase (LacA-Gen). Das Regulatorgen (LacI) kodiert dabei für das Repressorprotein, welches die Promotion der Strukturgene unterdrückt und sich

direkt vor dem lac-Operon befindet. Es wird durch einen eigenen Promotor exprimiert. Das Repressorprotein bindet an den Operator und inhibiert die Promotion der Lac-ZYA Sequenzen. Laktose und Isopropyl-β-D-thio-Galaktosid (IPTG) führen dieses in eine allosterisch veränderte Form über, welche an den Operator nicht mehr binden kann. So kann die RNA-Polymerase II an den Strang binden und die Lac-ZYA Gene ablesen.
IPTG (Abbildung 8) kann durch seine Schwefelbindung nicht von Bakterien metabolisiert werden. Daraus resultiert eine gleichbleibende IPTG Konzentration und eine konstante Transkription der Lac-ZYA (Hansen *et al.*, 1998). Befindet sich in der Open Reading Frame des Lac-Operons eine klonierte DNA-Sequenz, wird diese ebenfalls mittranskribiert.

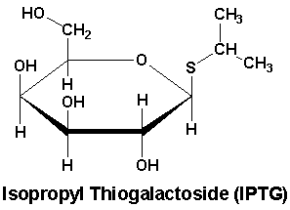



Abbildung 8: Isopropyl-β-D-thio-Galaktosid

DsRNA ist ein doppelsträngiger RNA-Abschnitt. Sie entsteht durch die T7-Polymerase bei der Transkription. Die Spaltung der dsRNA erfolgt im Zytosol durch das Enzym Dicer, welches zur RNAse III Familie gehört (Nicholson, 2012). Die daraus entstehende, einsträngige small-interfering RNA (siRNA) besitzt eine Länge von 19-23 Basenpaaren. SiRNA dient in Pflanzen zur Abwehr von RNA-Viren.
SiRNA wandert innerhalb des Zytosols in die sogenannten P-Bodys, wo sie an Argonautenproteine (Ago) bindet. Dadurch entsteht der RNA-induced silencing complex (RISC). Unklar ist, ob die Argonautenproteine für die siRNA als Shuttle in die P-bodies fungieren oder ob sie sich konstant innerhalb deren aufhalten und die siRNA nur bei Eintritt binden (Nguyen *et al.*, 2012). Anschließend wird der siRNA-Doppelstrang im RISC-Komplex aufgetrennt und der Leitstrang gebunden, während der redundante Nebenstrang im Zytosol abgebaut wird (Abbildung 9).

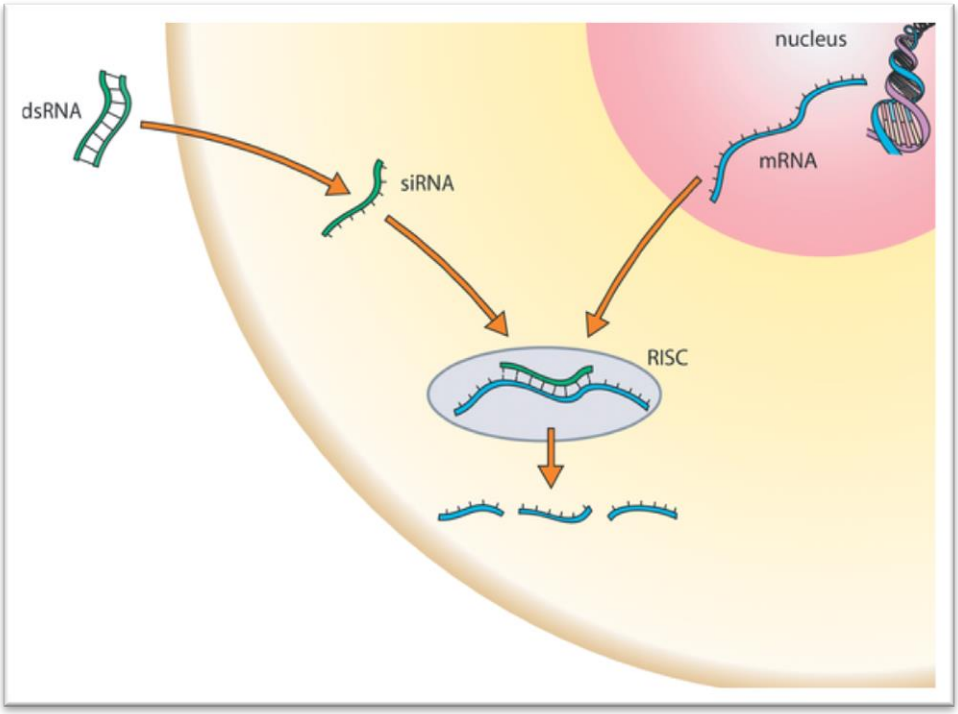



Abbildung 9: RNAi

Komplementäre, zytosolische mRNA wird an den RISC-Komplex gebunden und durch diesen zerstört. Im Menschen besitzt nur Ago2 die dafür nötige Endonukleaseaktivität (Nguyen *et al.*, 2012).

Die eigentliche Aufgabe des RISC-Komplexes ist microRNA (miRNA) zu binden. MiRNA stammt, im Gegensatz zu der siRNA, welche extrazellulärer Herkunft ist, aus dem zelleigenen Kern und spielt eine Rolle bei der Genregulation. Dabei ist das Enzym Drosha beteiligt. Es gehört ebenfalls zur RNAse III Familie und formt durch Spaltung im Nukleolus die pre-miRNA. Diese wandert über Exportin 5 in das Zytosol, welches ein Transportshuttle zwischen dem Zellkern und dem Zytosol darstellt. Im Zellplasma spaltet Dicer den Doppelstrang der miRNA. Der Einzelstrang bindet, so wie siRNA, im RISC-Komplex an die Argonautenproteine und diese wiederum an die komplementäre, zelluläre mRNA (Georgianna *et al.*, 2011). Der miRNA Prozess ist in der Evolution hochkonserviert und scheint in Organismen der Virusabwehr zu dienen.

Die Aufnahme und Wirkung von dsRNA, welche von transgenen *E. coli* Bakterien stammt, funktioniert in *C. elegans* aufgrund der *sid*-Gene. Die SID-Proteine sind zuständig dafür, die dsRNA über zwei Schritte aus dem Darmlumen in die Zielzellen zu transportieren.

Dies geschieht durch die Transmembranproteine SID-1 und SID-2 (Abbildung 10). SID-2 wird in den Zellen des Verdauungstraktes des Wurms exprimiert, was eine tragende Rolle bei der Aufnahme aus dem Darmlumen nahelegt. SID-1 lokalisiert sich an den Zielzellmembranen und ist verantwortlich für die Aufnahme in das Zytosol von Nerven- und Gewebszellen (Zhuang *et al.*, 2012). SID-1 und SID-2 sind charakteristisch für den Nematoden *C. elegans*, da z.B. die nah-verwandte Spezies *C. briggsae* diese Proteine nicht besitzt und in ihnen – ohne Mutation – kein Gen-Knockdown durch RNAi möglich ist. Eine induzierte Mutation in anderen Spezies, wie beispielsweise in *Drosophila melanogaster*, die eine SID-2 Expression mit sich zieht, erlaubt auch deren Aufnahme von dsRNA aus dem apikalen Lumen (McEwan *et al.*, 2012) und einen daraus resultierenden Gen-Knockdown. Ein saures Milieu fördert dabei die Aufnahme aus dem Verdauungstrakt. DsRNA gelangt durch SID-2 Endozytose in den Körper des Versuchsorganismus.

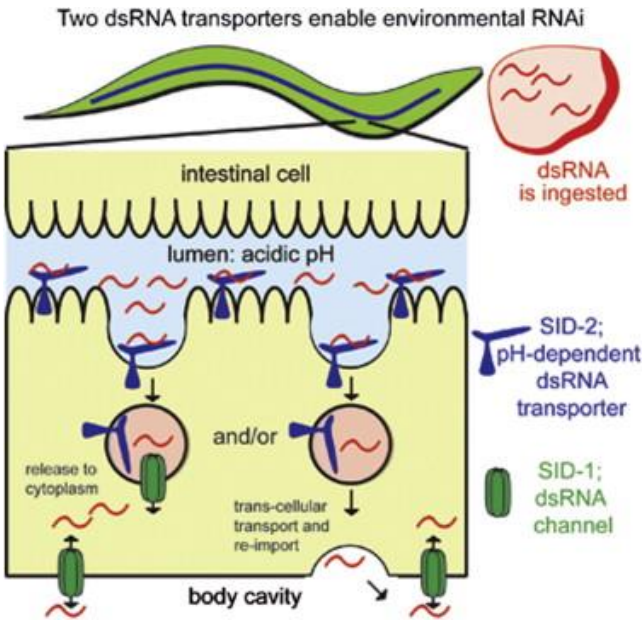



Abbildung 10: SID-Transporter

### *1.3.3 Gen-Knockdown und Gen-Knockout*

Bei einem Gen-Knockout werden transgene Organismen wie Tiere, Bakterien und Pflanzen gezüchtet, welchen ein oder mehrere Gene aus ihrem Genom *(„Loss of Function“*) entfernt wurden. Somit lässt sich eventuell über den resultierenden Phänotyp, falls es einen gibt, auf die Funktion eines Gens schließen. Ein Knockout ist irreversibel und hält über die gesamte Lebensspanne des Versuchsorganismus an, sofern der Gen-Knockout nicht letal ist.

Im Gegensatz dazu besitzen die Versuchsorganismen beim Gen-Knockdown ihr unverändertes Genom, aber die Expression des jeweiligen Gens wird während der Lebensspanne beeinflusst. Es handelt sich dabei um einen temporären, reversiblen Effekt, welcher eine Downregulation des jeweiligen Genproduktes mit sich zieht (Shan, 2010).

In *C. elegans* besteht der konkrete Vorteil eines Gen-Knockdowns von Enzymen des Folsäurestoffwechsel darin, dass die somatische Entwicklung des Nematoden trotzdem stattfindet.

Im Gegensatz dazu würde ein Gen-Knockout der jeweiligen Enzyme, bzw. Transporter, im Folsäurestoffwechsel des Nematoden die DNA-Synthese teilweise existenziell beeinträchtigen. Beispielsweise sind *C. elegans* Hermaphroditen mit Knockout des FOLT-1 Transporters steril, da die Aufnahme an Folsäure stark beeinträchtigt ist. Sie haben dadurch keine Folsäure für die DNA-Synthese zur Verfügung, was mit einer stark beeinträchtigten Spermatogenese einhergeht (Austin *et al.*, 2010).

Der Knockdown von Enzymen des Folsäurestoffwechsels L4/adulter Würmer stellt daher ein wichtiges Werkzeug der Erforschung der Regulation von Enzymen im Folsäurestoffwechsel dar, da die somatische Entwicklung des Nematoden bei einem Knockdown weitgehend intakt ist.

Bei Gonadenfärbung und Folsäurerestriktion in Flüssigmedium legen die adulten Würmer zwar Eier, aber die schlüpfenden Embryos sind nicht lebensfähig (Freistetter, Fuhrmann et al., unpublished data).

## 1.4 Orthologie der Folsäurestoffwechselenzyme

Alle Enzyme des menschlichen Folsäurestoffwechsels finden sich ortholog in *C. elegans*. Somit können Erkenntnisse der Folsäurestoffwechselregulation und Adaption im Nematoden auf den Menschen übertragen werden.

*Referenzgene*

Die Gene *csq-1*, *pmp-3* und *Y45F10D.4* stellen im Rahmen dieser Masterarbeit Referenzgene (Housekeeping Genes) dar. Diese sind nicht Teil des Folsäurestoffwechsels und werden durch Silencing der Targetgene mittels RNAi nicht in ihrer Expression beeinflusst.

Tabelle 1 - Orthologie

| Orthologes menschliches Enzym | C. elegans Gen |
|---|---|
| CBS | *cbs-1* |
| CASQ1 | *csq-1** |
| DHFR | *dhfr-1* |
| SLC19A3 | *folt-1* |
| MS | *metr-1* |
| MTHFR | *mthf-1* |
| SLC46A1 (PCFT) | *Y4C6.B5* (PCFT) |
| ABCD4 | *pmp-3** |
| TYMS | *Y110A7A.4* (TS) |
| ISCU | *Y45F10D.4** |

* = Referenzgen

### *1.4.1 Cystathioninbetasynthase (cbs-1/CBS)*

*Cbs-1* ist das orthologe Gen zur menschlichen CBS. Eine Mutation dieses Gens führt beim Menschen zu Homocysteinurie, da der Abbau des Homocysteins zu Cystathionin über diesen Abbauweg nicht stattfinden kann (Kuwabara *et al.*, 2001).

### *1.4.2 Calsequestrin (csq-1/CASQ1)*

CSQ-1 wird in epithelialen Muskelzellen des Nematoden exprimiert und spielt eine Rolle bei der Kalziumhomöostase. Es ist zum menschlichen CASQ1 und CASQ2 ortholog. Im Menschen lokalisiert es sich im Sarkoplasmatischen Retikulum und bindet, bzw. speichert, Kalziumionen. CASQ1 findet sich im Skelettmuskel und CASQ2 im Herzmuskel (Sanchez *et al.*, 2012).

### *1.4.3 Dihydrofolatreduktase (dhfr-1/DHFR)*

Die DHFR-1 des *C. elegans* ist mit der DHFR des Menschen ortholog. Im Menschen führt eine Mutation dieses Gens zu Megaloblastärer Anämie und teilweisen Insulten im Kindesalter (Banka *et al.*, 2011).

### *1.4.4 Folattransporter (folt-1/SLC19A2)*

FOLT-1 gehört mit FOLT-2 und FOLT-3 zur Folsäuretransporterfamilie in *C. elegans*. Im Menschen nimmt diese Rolle das Gen *SLC19A2* ein. Eine Mutation dessen führt zu einer Thiaminmetabolismusdysfunktion, welche mit Megaloblastärer Anämie einhergeht (Bergmann *et al.*, 2009).

### *1.4.5 Methioninsynthase (metr-1/MS)*

METR-1 regeneriert Methionin aus Homocystein. Eine Mutation des Gens führt sowohl im Wurm, als auch im Menschen, zu einer Hyperhomocysteinämie (Steegers-Theunissen *et al.*, 1992).

### *1.4.6 Methylentetrahydrofolatreduktase (mthf-1/MTHFR)*

MTHF-1 und MTHFR reduzieren 5,10-Me-THF zu 5-Me-THF, welche das Substrat für die Methioninsynthase sowohl beim Menschen, als auch in *C. elegans* darstellt. Eine Mutation des Gens geht mit Hyperhomocysteinämie, verbunden mit einer Anenzephalie und *Spina Bifida* in Föten, einher.

### *1.4.7 Proton-Coupled Folate Transporter (Y4C6.B5/ SLC46A1)*

Die Orthologe fungieren als protonenabhängige Folattransporter. Er transportiert neben Folsäure auch Eisen und ist hauptsächlich im Dünndarm exprimiert. Eine Mutation führt zu Folatmangel des betroffenen Organismus, da die Aufnahme verringert ist. Die Symptome sind dabei das Auftreten einer Megaloblastären Anämie, Durchfall, neurologische Defizite und Immunschwäche (Qiu *et al.*, 2006).

### *1.4.8 ATP binding cassette D4 (pmp-3/ABCD4)*

PMP-3 und sein menschliches Ortholog ABCD4 sind Transmembrantransporter, deren Funktion großteils unbekannt ist. Da sie bei der RNAi von Enzymen des Folsäurestoffwechsels in ihrer Expression unverändert bleiben, fungiert *pmp*-3 in *C. elegans* als Referenzgen.

### *1.4.9 Thymidilatsynthase (Y110A7A.4/TYMS)*

Y110A7A.4 ist in *C. elegans* das Enzym der Pyrimidinsynthese. Das menschliche Ortholog TYMS nimmt dieselbe Rolle ein. Dessen Aktivität ist in *C. elegans* im L1, L3, Dauerlarven- und Adultstadium am höchsten (Winska *et al.*, 2005).

### *1.4.10 Iron-Sulfur Cluster Enzyme (Y45F10D.4/ISCU)*

Das Enzym produziert Eisen-Schwefel-Cluster ($Fe_2S_2$/$Fe_4S_4$) und eine Mutation äußert sich in Form von Myopathien mit Laktatazidose (Sanaker *et al.*, 2010). Aufgrund seiner gleichbleibenden Expression bei der RNAi von Enzymen des Folsäurestoffwechsels dient es im Rahmen dieser Masterarbeit als Referenzgen.

## 1.5 PCR und Realtime-PCR

Bei der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wird ein cDNA-Fragment amplifiziert, welches am Ende des Laufes mengenmäßig bestimmt werden kann. Es kann aber nicht die Menge an Ausgangs-DNA bestimmt werden. Dabei verhält sich die Amplifikation „idealerweise“ exponentiell, sofern im Medium genug Nukleotidsubstrat für die DNA-Polymerase vorhanden ist. Eine Erweiterung dazu ist die Realtime-PCR (Echtzeit-PCR), bei der die Quantifizierung auf Fluoreszenzmessung beruht. Sie basiert fundamental auf

dem Prinzip der PCR. Bei der quantitativen Realtime-PCR (qPCR) nimmt die Fluoreszenz mit den PCR Produkten zu. Die Quantifizierung erfolgt am Ende des Laufes durch die Auswertung der Fluoreszenzsignale in der exponentiellen Phase. Der Präfix „*RT*“ weist manchmal auch darauf hin, dass die mRNA vor dem Messlauf durch Reverse Transkriptase in cDNA umgeschrieben wurde und keine genomische DNA verwendet worden war.

Die Vorteile der RT-qPCR sind, im Vergleich zu anderen Methoden zur Messung der Genexpression, dass ihre Dynamic Range eine Breite von log7 - log8 besitzt und sehr sensitiv ist. Des Weiteren muss die Probe nach dem Messlauf nicht mehr weiterbearbeitet werden um deren Konzentration zu messen, was das Kontaminations- und Verarbeitungsfehlerrisiko senkt (Wong *et al.*, 2005). Der Zyklus, bei dem das Fluoreszenzsignal der Amplifikation zum ersten Mal über dem Signal der Hintergrundfluoreszenz liegt, markiert den Cycle Treshold Wert ($C_t$). Je mehr DNA initial in der Probe vorhanden war, desto niedriger ist der $C_t$ Wert.

*Eine RT-qPCR Amplifikationskurve besteht aus 4 Phasen (Abbildung 11):*

Linear Ground Phase: Die Probenfluoreszenz ist noch nicht von der Hintergrundfluoreszenz zu unterscheiden.

Early Exponential Phase: Die Phase, bei der die Probenfluoreszenz erstmals über der der Hintergrundfluoreszenz hervortritt. Der Übergang markiert den $C_t$-Wert.

Log-linear Phase: Die Fluoreszenz nimmt pro Cycle idealerweise um den Faktor 2 zu. Dies äußert sich im Diagramm durch eine stark lineare Kurve.

Plateau Phase: Aufgrund des Mangels an Reaktionsprodukten flacht die Kurve ab. Dabei ist keine zusätzliche Fluoreszenzemissionssteigerung mehr zu verzeichnen.

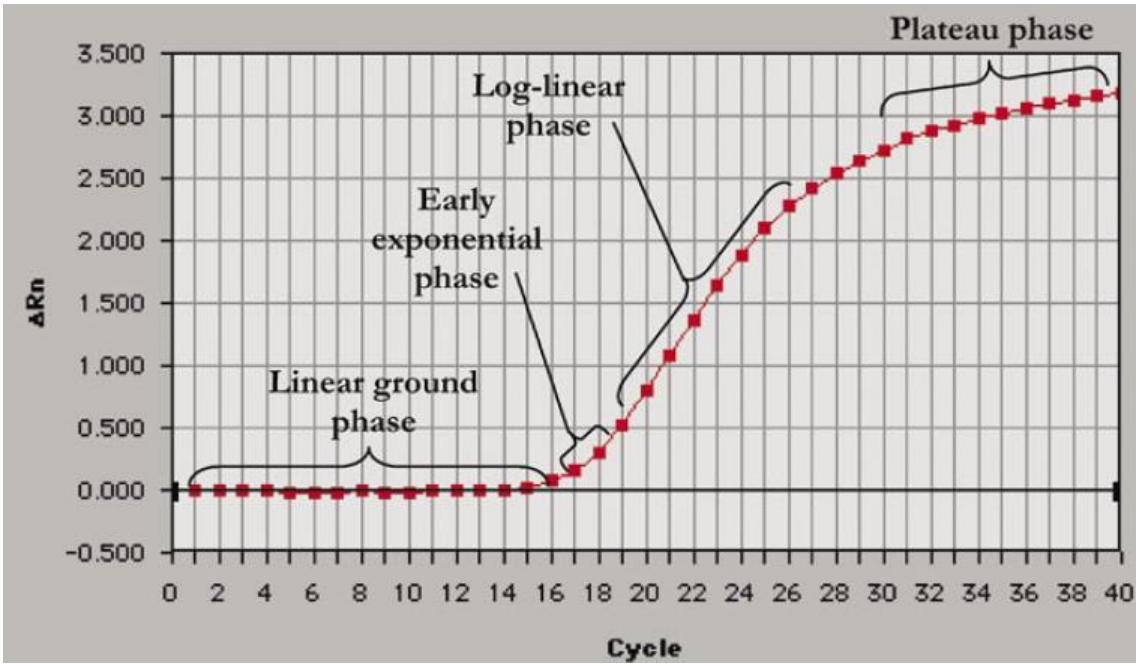



Abbildung 11: Standard Amplifikationskurve einer RT-qPCR

### *1.5.1 One-Step und Two-Step qPCR*

Man kann zwischen One-Step und Two-Step qPCR unterscheiden. Der Unterschied besteht darin, dass bei der One-Step qPCR die RNA mit Hilfe einer Reversen Transkriptase im selben Behälter in cDNA umgeschrieben wird. Bei der Two-Step qPCR wird die cDNA nach der Reversen Transkription zur Messung in einen anderen Behälter für die PCR transferiert. Im Rahmen dieser Masterarbeit wurde mit Two-Step qPCR gearbeitet.

### *1.5.2 Quantifikation*

Es besteht die Wahl zwischen absoluter- und relativer Quantifikation der Daten. Bei der absoluten Quantifikation wird die cDNA Konzentration mit einem Standard bekannter Konzentration verglichen und bestimmt. Bei der relativen Quantifikation wird die cDNA Konzentration des Target-Gens gegen eine Referenzproben-cDNA gemessen. Im konkreten Fall stellt eine Wurmpopulation, welche sich auf den Agar-Platten ohne durch transgene Bakterien produzierte dsRNA entwickelte, die Kontrolle dar. In diesen Nematoden wurde kein Genprodukt durch dsRNA gesilenced.

### *1.5.3 Fluoreszenzmessung*

Es gibt mehrere Möglichkeiten die Amplifikation während der Messung quantitativ zu bestimmen. Eine davon ist die Verwendung von TaqMan Sonden. Sie besitzen am 3‘-Ende einen Quencher (TAMRA) und am 5‘-Ende ein Fluorophor (FAM). Während die Sonde intakt ist, inhibiert der 3‘-Quencher das Fluoreszenzsignal des FAM 5‘-Endes. Sie bindet sequenzspezifisch am zu amplifizierenden cDNA Stück. Bei der Elongation wird die TaqMan Sonde von 5‘- nach 3‘- durch die RNA-Polymerase gespalten. Dadurch wird das Fluorophor am 5‘-Ende vom Quencher des 3‘-Endes getrennt. So emittiert das Fluorophor ein Signal, welches zur quantitativen Bestimmung der DNA-Konzentration herangezogen wird (Heid *et al.*, 1996). Die Methode basiert auf dem Prinzip der Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET).

### *1.5.4 cDNA Vervielfältigung*

Um die cDNA zu vervielfältigen benötigt es, neben den Nukleotiden, der Polymerase und den Sonden, ein bestimmtes Temperaturprogramm, dem sogenannten Assay. Dafür besitzt jede PCR einen Thermocycler.

Initialisierung: Um die cDNA und Primer aufzutrennen, wird die Probe für mehrere Minuten bei 95°C erhitzt. Dabei wird die Hot-Start Polymerase aktiviert.
Denaturierung: Bei ca. 95°C wird die cDNA hydrolytisch gespalten um zwei Einzelstränge zu produzieren.
Annealing und Elongation (One Step): Die Temperatur wird primerspezifisch auf ca. 60°C gesenkt. Dabei kann sich der Primer sequenzspezifisch an die Einzelstränge anlagern. Die RNA-Polymerase bindet an das 3‘-Ende des Primers und synthetisiert den komplementären Strang der Target-mRNA. Da die zu amplifizierenden Fragmente klein sind (ca. 250bp) erfolgen Annealing und Elongation in einem Schritt.
Denaturierung, Annealing und Elongation werden so oft wiederholt, bis im Idealfall alle zu messenden Proben in die Plateauphase übergegangen sind. Dies benötigt in etwa 40-50 Zyklen.

## 1.6 Massenspektrometrie und Flüssigchromatographie

Massenspektrometrie kann zum Metabolitenprofiling von Gewebe herangezogen werden. Dadurch können Zusatzinformationen gewonnen werden, durch die man gemeinsam mit den Genexpressionsdaten der mRNA-Levels, ein umfangreicheres Bild über die Stoffwechselvorgänge in einem Organismus gewinnen kann.

Ein Massenspektrometer besteht aus 3 grundlegenden Komponenten.
Einem Ionisator, welcher die Probe zerstäubt und ionisiert. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Elektronenspray-Ionisator (ESI) verwendet. Dabei wird die flüssige Probe in einem elektrischen Feld zerstäubt und ionisiert (Jemal *et al.*, 1997). Im Anschluss wird die Probe, aufgrund ihres Masse/Ladungsverhältnisses (m/z), durch den Massenselektor getrennt. Ionen unterschiedlicher m/z Verhältnisse wandern unterschiedlich schnell durch die Q-Time-of-Flight Röhre und treffen an dessen Ende auf einen Detektor. Je leichter die Ionen wegen ihrer unterschiedlichen m/z-Verhältnisse sind, desto kürzer ist ihre Flugzeit. Aufgrund der bekannten Massen von Molekülen kann man letztendlich mittels Softwareanalyse auf die Konzentrationen der gemessenen Proben schließen (Petrovic *et al.*, 2005).

Um die Moleküle in der Probenlösung zeitlich voneinander zu trennen, werden diese vor dem Einbringen in das Massenspektrometer durch High-Pressure Liquid Chromatography (HPLC) voneinander separiert. Im Prinzip funktioniert dies aufgrund ihrer lipophilen Eigenschaften. In der Säule der HPLC wandert die Probe in einer hydrophilen, mobilen Phase (meist ein Gemisch aus Methanol, Wasser und Acetonitril) an einer stationären, lipophilen Phase (z.B. $C_{18}$) vorbei. Aufgrund der unterschiedlichen Verweilzeit der einzelnen Moleküle in der stationären Phase trennen sich diese voneinander auf (Guiochon, 1972).

# 2. Materialien und Methoden

## 2.1 Materialien

### *2.1.1 Chemikalien und Wasser*

Tabelle 2 - Chemikalien

| Bezeichnung | Hersteller |
|---|---|
| **Aceton** | Sigma-Aldrich |
| **Acetonitril** | Roth |
| **Ethanol 96%** | Roth |
| **Glycerin** | Roth |
| **Methanol** | Roth |
| **Mercaptoethanol** | Roth |
| **Natriumhypochlorit** | Roth |
| **PeqGold Universal Agarose** | PeqLab |

Tabelle 3 - Laborwasser

| Bezeichnung | Hersteller |
|---|---|
| **DEPC $H_2O$** | Invitrogen |
| **Destilliertes $H_2O$ (WEK)** | |
| **MilliQ $H_2O$** | LS Orbital |

### *2.1.2 Lösungen*

Tabelle 4 – TAE Puffer X1 / X10

| Bezeichnung | Menge | Hersteller |
|---|---|---|
| **Destilliertes $H_2O$** | 800 ml | |
| **Eisessig** | 11.4 ml | Roth |
| **Tris(hydroxymethyl)Aminomethan** | 48.4 g | Roth |
| 1) Lösung auf 1000 ml auffüllen<br>2) Autoklavieren<br>3) 100 ml TAE X10 werden mit 900 ml dest. $H_2O$ zu TAE 1X verdünnt | | |

Tabelle 5 – Cholesterin [5 mg/ml]

| Bezeichnung | Menge | Hersteller |
|---|---|---|
| **Cholesterin** | 0.5 g | Roth |
| **Ethanol 96%** | 100 ml | Roth |

Tabelle 6 – Nystatin [10 mg/ml]

| Bezeichnung | Menge | Hersteller |
|---|---|---|
| **Ammoniumacetat** | 14.45 g | Roth |
| **Destilliertes $H_2O$** | 25 ml | |
| **Ethanol 96%** | 25 ml | Roth |
| **Nystatin** | 0.5 g | Roth |
| 1) Ammoniumacetat in dest. $H_2O$ lösen<br>2) Nystatin in Ethanol lösen<br>3) Beide Lösungen bei 50°C im Becherglas mit Magnetrührer homogenisieren<br>4) Sterilfiltration durchführen | | |

Tabelle 7 – Ampicillin [5 mg/ml]

| Bezeichnung | Menge | Hersteller |
|---|---|---|
| **Ampicillin** | 0.5g | Roth |
| **Ethanol 50%** | 100 ml | Roth |
| 1 ml Aliquote erstellen | | |

Tabelle 8 – IPTG 1 M [238 mg/ml]

| Bezeichnung | Menge | Hersteller |
|---|---|---|
| **Destilliertes $H_2O$** | 1 ml | |
| **IPTG** | 0.238 g | Roth |
| 1) Sterilfiltration<br>2) 20 µl Aliquote erstellen | | |

Tabelle 9 – M9 Puffer

| Bezeichnung | Menge | Hersteller |
|---|---|---|
| **Destilliertes $H_2O$** | 1000 ml | |
| **$KH_2PO_4$** | 3 g | Roth |
| **$MgSO_4$ 1M** | 1 ml | Roth |
| **NaCl** | 5 g | Roth |
| **$Na_2HPO_4$** | 6 g | Roth |
| 1) NaCl, $KH_2PO_4$, $Na_2HPO_4$ in 1000 ml dest. $H_2O$ lösen<br>2) Autoklavieren<br>3) $MgSO_4$ nach Abkühlen hinzufügen | | |

Tabelle 10 – Bleach Lösung

| Bezeichnung | Menge | Hersteller |
|---|---|---|
| **KOH 5M** | 1 ml | Roth |
| **MilliQ $H_2O$** | 10 ml | LS Orbital |
| **NaOCl** | 1,5 ml | Roth |

Tabelle 11 – *C. elegans* Glycerinstock

| Bezeichnung | Menge | Hersteller |
|---|---|---|
| **Destilliertes $H_2O$** | 110 ml | |
| **Glycerin** | 60 ml | Roth |
| **$KH_2PO_4$** | 10 ml | Roth |
| **$MgSO_4$ 0,1M** | 0,6 ml | Roth |
| **NaCl** | 20 ml | Roth |
| 1) Autoklavieren<br>2) $MgSO_4$ nach Abkühlen hinzufügen | | |

Tabelle 12 – Kaliumphosphatpuffer (pH = 6.0)

| Bezeichnung | Menge | Hersteller |
|---|---|---|
| **$KH_2PO_4$** | 54,3 g | Roth |
| **$K_2HPO_4$** | 17,64 g | Roth |
| **MilliQ $H_2O$** | 500 ml | LS Orbital |
| 1) Puffergemisch einwiegen<br>2) Autoklavieren | | |

Tabelle 13 – Nematode Growth Medium (NGM) Agar

| Bezeichnung | Menge | Hersteller |
|---|---|---|
| **Agar-Agar** | 17 g | Roth |
| **Ampicillin** | 500 µl | Roth |
| **$CaCl_2$ 1M** | 0,5 ml | Roth |
| **Cholesterin** | 0,5g/100 ml | Roth |
| **Kaliumphosphatpuffer (pH=6.0)** | 25 ml | Roth |
| **$MgSO_4$ 1M** | 1 ml | Roth |
| **MilliQ $H_2O$** | 1000 ml | LS Orbital |
| **NaCl** | 3 g | Roth |
| **Nystatin** | 3 ml | Roth |
| **Pepton** | 2,5 g | Roth |
| 1) Agar, Pepton und NaCl in 1000 ml MilliQ $H_2O$ lösen<br>2) Autoklavieren<br>3) $MgSO_4$, $CaCl_2$, Cholesterin, Nystatin und den Kaliumphosphatpuffer nach Abkühlen hinzufügen<br>4) Für HT115-RNAi: Ampicillin hinzufügen | | |

Tabelle 14 – NGM-Agar Platten mit supplementierter Folsäure

| Bezeichnung | Menge | Hersteller |
|---|---|---|
| **NGM-Agar Platten (siehe Tabelle 13)** | | |
| **Folsäurelösung 100 mM** | 200 µl | Roth |
| 1) NGM-Agar Platten mit 200 µl Folsäurelösung (100 mM) versetzen<br>2) Unter dem Abzug liegen lassen, bis die Platten komplett getrocknet sind | | |

Tabelle 15 – LB Medium

| Bezeichnung | Menge | Hersteller |
|---|---|---|
| **LB Basis** | 20 g | Roth |
| **MilliQ $H_2O$** | 500 ml | LS Orbital |
| 1) LB Basis einwiegen<br>2) Autoklavieren | | |

### *2.1.3 Verbrauchsmaterialien*

Tabelle 16 - Verbrauchsmaterialien

| Bezeichnung | Hersteller |
|---|---|
| **Cryotubes** | Roth |
| **Falcontubes (15 ml, 50 ml)** | Sarstedt |
| **Glasperlen (ø 325-600 µm)** | Sigma-Aldrich |
| **Insulinspritze (500 µl)** | Terumo |
| **Kulturfläschchen (50 ml)** | Sarstedt |
| **Messküvetten (1,5 ml)** | Brand |
| **Parafilm** | American National Can |
| **PCR-Röhrchen (100 µl)** | Eppendorf |
| **Petrischalen (ø 9 cm)** | Greiner Bio-One |
| **Pipettenspitzen (10 µl, 200 µl, 1000 µl)** | Sarstedt |
| **Reaktionsröhrchen (1,5 ml)** | Eppendorf |
| **Wiegeschiffchen** | Roth |

### *2.1.4 Kits*

Tabelle 17 – Enzym- und Reinigungskits

| Bezeichnung | Verwendung | Hersteller |
|---|---|---|
| **GeneJet Plasmid MiniPrep** | Plasmidpräparation | Fermentas |
| **QuantiTect Reverse Transcription Kit** | cDNA Transkription | Qiagen |
| **RNAeasy Kit** | RNA Extraktion | Qiagen |

### *2.1.5 Sonden*

Tabelle 18 – Sonden (TaqMan GeneExpression Assay)

| Gen-Bezeichnung | Funktion | Hersteller |
|---|---|---|
| ***cbs-1*** | Target | Life Technologies |
| ***csq-1*** | Referenz | Life Technologies |
| ***dhfr-1*** | Target | Life Technologies |
| ***folt-1*** | Target | Life Technologies |
| ***metr-1*** | Target | Life Technologies |
| ***mthf-1*** | Target | Life Technologies |
| ***Y4C6B.5*** | Target | Life Technologies |
| ***pmp-3*** | Referenz | Life Technologies |
| ***Y110A7A.4*** | Target | Life Technologies |
| ***Y45F10D.4*** | Referenz | Life Technologies |
| **TaqMan GeneExpression MasterMix** | | Life Technologies |

### *2.1.6 Bakterien*

Tabelle 19 – Bakterien

*E. coli* Stamm HT115 mit transformiertem L4440 Vektor (2790 bp Länge)

| Bezeichnung | ORF Länge [bp] | Open Biosystems / Thermo Scientific (Hersteller) |
|---|---|---|
| **OP50 *E. coli*** | | *Caenorhabditis* Genetic Center, University of Minnesota |
| **HT115(DE3) *E. coli dhfr-1*** | 570 | RCE 1182-9359428 |
| **HT115(DE3) *E. coli folt-1*** | 1233 | RCE 1182-9368216 |
| **HT115(DE3) *E. coli metr-1*** | 3750 | RCE 1182-9365280 |
| **HT115(DE3) *E. coli mthf-1*** | 1992 | RCE 1182-9364765 |
| **HT115(DE3) *E. coli Y4C6B.5*** | 1410 | RCE 1182-9363657 |

### *2.1.7 Nematoden*

Tabelle 20 – Nematoden

| Bezeichnung | Hersteller |
|---|---|
| ***C. elegans* N2 wild type Bristol** | *Caenorhabditis* Genetic Center, University of Minnesota |

### *2.1.8 Geräte*

Tabelle 21 – Geräte

| Bezeichnung | Verwendung | Hersteller |
|---|---|---|
| **Beadbeater** | Homogenisation | Biospec |
| **Blockheater SBH200D** | Heizblock | Stuart |
| **BR4i Centrifuge** | Standzentrifuge | Jouan |
| **Cary 50 Scan** | Photometrie | Varian |
| **CH2** | Mikroskop | Olympus |
| **Concentrator Plus** | Konzentrator | Eppendorf |
| **EV231 Elektrophoresis PSU** | Gelelektrophorese | PeqLab |
| **MC410S** | Waage | Sartorius |
| **micrOTOF-Q** | Massenspektrometer | Bruker |
| **MS1 Minishaker** | Vortexer | IKA |
| **Picodrop** | RNA Messung | Picodrop |
| **Primus 25 PCR** | PCR | PeqLab |
| **RCT Basic** | Magnetrührer | IKA |
| **Realtime PCR 7300** | RT-qPCR | Applied Biosystems |
| **Tablecentrifuge** | Tischzentrifuge | Biozym |
| **Transilluminator** | Blot-Imaging | PeqLab |
| **Ultimate 3000** | HPLC | Dionex |
| **Wild M3C** | Mikroskop | Wild |

## 2.2 Methoden

### *2.2.1 Bakterienhandling*

Bakterien dienen dem Nematoden *C. elegans* auf den Agar-Agar Platten als Nahrungsquelle. Sowohl die OP50 Stämme als auch die dsRNA produzierenden HT115(DE3) Stämme, wurden bei -60°C in einem Gefrierschrank in Glycerinstocks gelagert. Die HT115(DE3) Stämme haben eine Tetracyclinresistenz und durch den L4440 Vektor (Abbildung 12) besitzen die Stämme ebenfalls eine Ampicillinresistenz.

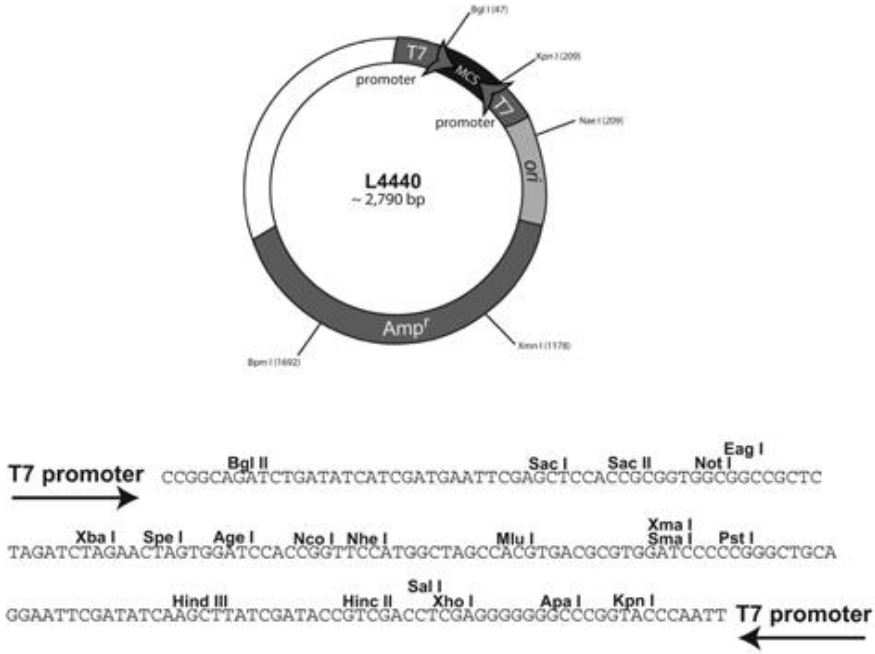



Abbildung 12: HT115(D3) Plasmid

Alle verwendeten Bakterienstämme waren fähig Folsäure selbst zu synthetisieren. Somit war keine Folsäureanreicherung der Agar-Platten nötig. Bei Bedarf wurden diese mit Hilfe einer Impföse aus den Cryotubes in 50 ml Falcontubes überführt und über Nacht in einer 5 ml LB-Medium-Lösung vermehrt. Dieser Prozess wurde in einem Brutschrank durchgeführt, die auf eine Temperatur von 37°C eingestellt war. Damit die Bakterien ausreichend Sauerstoff für ihren Stoffwechsel zur Verfügung hatten, wurden die Deckel der Falcontubes locker aufgelegt.

Bei den HT115(DE3) Stämmen wurden zusätzlich 5 µl Ampicillinlösung in das LB-Medium pipettiert, um anderwertige Mikroorganismen in ihrem Wachstum zu hemmen.

### *2.2.2 Plasmide und Verdau*

Die Plasmide wurden mit ScaI enzymatisch verdaut und mittels Gelelektrophorese gegen eine Lambda-HindIII Basenpaarladder auf ihre Plasmidlänge untersucht. ScaI schneidet das Plasmid in *E. coli* in der Ampicillinresistenz. Im Gel diente GelRed als Fluorophor, welches sich an die Nukleinsäuren anlagert und unter UV-Licht Bestrahlung fluoresziert. So konnte die Basenpaarlänge durch die

Wanderungsgeschwindigkeit im Gel mittels der Lambda-HindIII Ladder bestimmt werden.
Die Aufbereitung der bakteriellen Zellen wurde mit einem GeneJET Plasmid Miniprep Kit der Firma Fermentas durchgeführt.

Plasmid MiniPrep Protokoll

- Der zu untersuchende *E. coli* Stamm wird mit einer Impföse in 5 ml LB-Medium in ein 50 ml Falcontube transferiert und zur Vermehrung über Nacht (ca. 16 h) in einem Brutschrank bei 37°C gestellt.
- Nach 16 h wird die Optische Dichte gemessen, welche bei $OD_{600}$ 0,8 – 1,0 liegen sollte.
- Das Volumen des Tubes wird in 1,5 ml Eppendorftubes pipettiert und an der Tischzentrifuge bei 10000 RPM für 2 Minuten bei 20°C abzentrifugiert.
- Der Überstand wird entfernt und das Bakterienpellet wird in 250 µl der Resuspensionslösung aus dem Kit gelöst. Durch Vortexen wird das Pellet komplett gelöst, bis keine Zellklumpen mehr sichtbar sind.
- In das Eppendorftube wird 250 µl der Lyselösung pipettiert und vorsichtig durch leichtes Umschwenken vermischt. Dabei sollte die Lösung viskos werden.
- Es werden 350 µl der Neutralisationslösung in das Tube pipettiert und durch leichtes Schwenken vermischt. Die Lösung sollte weiß ausflocken.
- Das Eppendorftube wird bei 10000 RPM für 5 Minuten bei 20°C zentrifugiert. Der Überstand wird in die beigelegte GeneJET Säule transferiert.
- Die Säule wird bei 10000 RPM 1 Minute zentrifugiert und der Durchfluss wird verworfen.
- 500 µl der Waschlösung wird in die Säule pipettiert und bei 10000 RPM für 1 Minute bei 20°C zentrifugiert. Dieser Schritt wird wiederholt. Der Durchfluss wird verworfen und die Säule wird für 1 Minute bei gleichen Bedingungen zentrifugiert, um Restethanol aus der Säule zu entfernen.
- Die Säule wird auf ein Eppendorftube gesteckt und mit 50 µl des Elutionspuffers geladen, um die Plasmid DNA zu eluieren. Die Säule wird für 2 Minuten bei Zimmertemperatur inkubiert und dann 2 Minuten bei 10000 RPM und 20°C

zentrifugiert. Der Durchfluss stellt die gereinigte Plasmid-DNA dar und wird bei -20°C gelagert.

### *OP50 Bakterienhandling*

OP50 Bakterien wurden am nächsten Morgen am Photometer auf ihre Optische Dichte (600 nm) bestimmt, wobei die $OD_{600}$ = 0.8-1.0 betrug. 100µl der Bakterien-Lösung wurde dann auf die NGM Platten unter dem Abzug aufgetragen und mit einer sterilen Metallöse gleichmäßig über die Oberfläche verteilt. Die Platten wurden im Abzug 30 Minuten getrocknet. Bei nicht sofortiger Verwendung von OP50 Bakterien-Platten wurden diese im Kühlraum auf 4°C bis zu ihrer Verwendung maximal 2 Wochen gelagert.

### *RNAi HT115(DE3) Bakterienhandling*

Nach ca. 16 Stunden wurde die Optische Dichte ($OD_{600}$) der Lösung bei 600 nm photometrisch bestimmt und auf eine $OD_{600}$ von 0,4 durch Verdünnung mit LB-Medium eingestellt. Zur Induktion der dsRNA Synthese der HT115(DE3) Bakterien wurde 1 mM IPTG in das LB-Medium pipettiert, auf Platten ausgestrichen und (48h) imkubiert. HT115(DE3) Platten wurden am selben Tag für RNAi Versuche verwendet.

## *2.2.3 Agarose-Gelelektrophorese*

Um die Plasmide auf ihre Inserts zu überprüfen wurde ein ScaI (5‘AGT↓ACT3‘) Verdau mit anschließender Gelelektrophorese durchgeführt. Als Basenpaar-Ladder diente Lambda-HindIII. Da die Plasmide aufgrund ihrer jeweiligen Inserts unterschiedliche Längen vorweisen, kann mit Hilfe der Ladder und der Wanderungsgeschwindigkeit im elektrischen Feld auf das Vorhandensein der Inserts getestet werden.

<u>Plasmidverdau Protokoll</u>

Die aufbereitete Plasmid-DNA (s. 2.2.2) wird mit dem 10X Fast Digest Green Buffer und ScaI Fast Digest Enzyme nach folgendem Schema in ein 100 µl Tube pipettiert:

- 5 µl DNA (Plasmid aus MiniPrep)
- 2 µl 10X Fast Digest Green Buffer
- 1 µl ScaI Fast Digest Enzyme (als letztes zugeben)
- 12 µl destilliertes $H_2O$

---

20 µl Gesamtvolumen

Diese Lösung wird 15 Minuten bei 37°C inkubiert und anschließend in die Geltaschen pipettiert.

Gelelektrophorese Protokoll

1.0% Agarosegel:

- 0.5 g PeqGold Universal Agarose wird in 50 ml 1X TAE Buffer gelöst und in einer Mikrowelle zum Kochen gebracht.
- Die Lösung wird auf ca. 60°C abgekühlt und mit 3 µl GelRed versetzt.
- Das flüssige Gel wird in die Form gegossen und der Kamm aufgesetzt.
- Die Form wird im Dunklen gelagert bis das Gel erstarrt ist, da GelRed lichtempfindlich ist.
- Das Gel wird in die EV231 Elektrophoresis PSU eingespannt und mit 1X TAE Buffer gefüllt, bis das Gel komplett untertaucht.
- Die Geltaschen werden mit 20 µl der verdauten Plasmiden beladen, wobei in die erste und letzte Tasche jeweils 5 µl der Lambda-HindIII Ladder pipettiert werden.
- Eine Spannung von 120 V wird für ca. 45 Minuten angelegt und das Gel wird im Anschluss an der GelDoc Station mit UV-Licht bestrahlt, um die Banden sichtbar zu machen.

Zusätzlich wurden die Plasmide sequenziert, da ein Testverdau kein Beweis für die richtige Sequenz ist.

### *2.2.4 EggPrep*

Der EggPrep diente dazu, um die Nematodenpopulation auf dasselbe Entwicklungsstadium (L1) hin zu homogenisieren und eine einheitliche Messung von Würmern im L4-Stadium zu erhalten.

EggPrep Protokoll

- Die Nematoden werden mit 2x 2,5 ml M9-Puffer von den Platten gewaschen, sodass unter dem Mikroskop keine Würmer und Eier mehr auf den Agar-Platten zu sehen sind. Diese Wurm/M9-Lösung wird in einem 15 ml Falcontube gesammelt.
- Die Lösung wird 10 Minuten senkrecht in einem Tray stehen gelassen, um die Würmer und Eier auf den Boden sinken zu lassen. Der milchige Überstand wird abgehoben, um die Lösung von groben Partikeln und einem Großteil der unerwünschten Bakterien zu reinigen. Dieser Vorgang entfernt gleichzeitig einen Großteil der bakteriellen DNA, welche im weiteren Verlauf bei der Probenhandhabung stören könnte.
- Der Bodensatz mit den Würmern und Eiern wird mit 5 ml M9-Puffer verdünnt und bei 2500 RPM 2 Minuten auf 20°C in einer Tischzentrifuge zentrifugiert.
- Der Überstand wird abgehoben. Dies wird zweimal wiederholt um die Nematoden zu reinigen.
- Das klare Nematodenpellet wird mit 2 ml M9-Puffer und 5 ml frisch angesetzter Bleachlösung verdünnt und 10 Minuten an einem Tisch-Vortexer geschleudert, um alle Nematoden abzutöten und die Eier aus den Uteri freizusetzen. *C. elegans* Eier sind resistent gegen die Bleachlösung.
- Danach wird bei 2500 RPM für 2 Minuten auf 20°C zentrifugiert und der Überstand entfernt.
- Das Pellet vier Mal mit 5 ml M9-Puffer gewaschen.
- Das Pellet wird in 10 ml M9-Puffer aufgelöst und in ein 15ml Kulturfläschchen überführt. Dieses wird im Brutschrank auf 20°C unter stetigem schütteln inkubiert. Die Larven schlüpfen über Nacht.

### *2.2.5 C. elegans*

Die geschlüpften Larven werden in ein 15 ml Falcontube überführt und bei 2500 RPM für 2 Minuten auf 20°C abzentrifugiert und tropfenweise auf die mit Bakterien besiedelten Petrischalen verteilt.

Die sich auf den Agar-Platten befindenden L1-Würmer wurden 48 h bei 20°C bis zum Erreichen des L4-Stadiums (weißer Halbmond) inkubiert.

L4-Larven wurden für die RNA-Extraktion und Purifikation mittels des RNAeasy Kits (Qiagen) verwendet.

### *2.2.6 C. elegans wildtype N2 Bristol Handling*

*C. elegans* wurde in Glycerinstocks bei -60°C in einem Gefrierschrank gelagert und bei Bedarf aufgetaut.

Alle 4-7 Tage wurden jeweils 2-5 Würmer mit Hilfe eines hitzesterilisierten Spatels unter dem Mikroskop auf neue OP50 Platten umgesetzt. Die Petrischalen wurden mit Hilfe von Parafilm versiegelt um zusätzlich Schutz vor Kontaminationen mit Fremdbakterien zu gewährleisten.

Platten mit adulten Nematoden, welche bereits Eier in sich trugen, bzw. bereits Eier gelegt hatten, wurden für den *EggPrep* verwendet.

### *2.2.7 Folsäuresupplementation*

Bei den Folsäuresupplementationsexperimenten wurden Agar-Platten mit einer 100 mM Folsäurelösung versetzt. Dazu wurden NGM-Agar-Platten mit 200 µl einer 100 mM Lösung versetzt und im Abzug getrocknet. Da Folsäure relativ instabil ist, wurden die induzierten Bakterien nach 30 Minuten aufgetragen und im 20°C Brutschrank aufbewahrt.

Bei diesen Experimenten dienten Bakterien mit leerem L4440 Vektor, bzw. Bakterien mit leerem PL4440 Vektor auf den gleichen Folsäureplatten, als Vektorkontrolle.

### *2.2.8 RNA Extraktion und Purifikation*

Dieser Schritt diente dazu, um die gesamte intrazelluläre RNA der Nematoden zu extrahieren und im Anschluss von Alkoholen und bakterieller RNA zu reinigen. Dazu

wurden die Zellen der Nematoden erst mechanisch, bzw. thermisch aufgebrochen um die RNA freizusetzen. Das Wurmpellet wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und im Anschluss mit Glasperlen in einem Beadbeater homogenisiert.

Extraktionsprotokoll

- Die Würmer werden mit 2,5 ml M9-Puffer von den Platten gewaschen und in einem 15 ml Falcontube gesammelt.
- Die gesammelte Lösung wird 10 Minuten senkrecht in einem Tray stehen gelassen um die Nematoden am Boden zu sammeln.
- Der milchige Überstand wird vorsichtig entfernt, um die Lösung von einem Großteil der Bakterien zu befreien. Dies befreit die Lösung von bakterieller RNA und anderen Verunreinigungen.
- Das Wurmpellet wird mit 5 ml M9-Puffer gewaschen und bei 2500 RPM 2 Minuten auf 20°C abzentrifugiert. Dieser Vorgang wird 3 mal wiederholt.
- Der M9-Puffer wird abgehoben und das Wurmpellet wird in 1 ml RLT-Puffer gelöst, welcher aus dem Qiagen-Extraktionskit stammt. Dieser RLT-Puffer beinhält außerdem Mercaptoethanol (1 mM).
- Das Falcontube wird in flüssigem Stickstoff schockgefroren um die Zellen der Nematoden thermisch aufzubrechen.
- Nach dem Auftauen wird die Lösung in ein Cryotube überführt.
- Das Cryotube wird mit Glasperlen versetzt und in den Beadbeater eingespannt. Das Tube wird 1 Minute gebeatet und zum Abkühlen 1 Minute auf Eis gelegt. Danach wird es ein weiteres Mal 1 Minute gebeatet.
- Das Cryotube wird bei 12000 RPM bei 20°C für 3 Minuten an der Tischzentrifuge abzentrifugiert und der Überstand wird mit einer Insulinspritze in ein 1,5 ml Eppendorftube überführt. Der Bodensatz wird dabei verworfen, da sich die zu analysierende RNA im Überstand befindet.
- Die Perlen im Bodensatz werden mit 200 µl RLT-Puffer gewaschen und gevortext um restliche RNA aus dem Bodensatz in den Puffer zu bringen.
- Die Lösung wird bei 12000 RPM bei 20°C für 1 Minute abzentrifugiert und der Überstand wird mit dem vorigen im Eppendorftube vermischt.

- Diese Sammellösung bildet die Grundlage für die folgende Extraktion mit dem RNAeasy Kit (Qiagen).

RNAeasy Kit (Qiagen) Protokoll

- Gleiche Mengen 70% Ethanol werden zu der RLT-Pufferlösung im Eppendorftube hinzugegeben und in die RNAeasy Kit Säule mit Reinigungsmembran überführt.
- Die Membransäule wird bei 10000 RPM für 15 Sekunden bei Raumtemperatur an der Minizentrifuge zentrifugiert um die RNA von der RLT/Ethanol-Pufferlösung zu trennen. Der Durchfluss wird verworfen, da die RNA an der Säulenmembran gebunden ist.
- 700 µl RW1 Puffer werden hinzu pipettiert, an der Minizentrifuge bei 10000 RPM durchzentrifugiert und der Durchfluss verworfen.
- 500 µl RPE Puffer werden auf die Membransäule pipettiert und bei 10000 RPM 15 Sekunden bei Raumtemperatur an der Minizentrifuge zentrifugiert. Dieser Schritt wird ein zweites Mal wiederholt.
- Die Membransäule wird auf ein 1,5 ml Eppendorftube gesteckt. Das Eppendorftube dient als Auffangbehälter für die Elution.
- Es werden 30 µl destilliertes Wasser, welches aus dem Qiagen-Kit stammt, auf die Säulenmembran pipettiert und die Säule wird bei 10000 RPM 2 Minuten bei 20°C an der Tischzentrifuge zentrifugiert. Dabei ist darauf zu achten, dass die Membran zentral benetzt wird, da sonst mit suboptimalen Elutionsmengen an RNA zu rechnen ist.
- Die erhaltene Flüssigkeit beinhält die extrahierte RNA.

### *2.2.9 Reverse Transkription*

Da die extrahierte RNA instabil ist und mittels RT-qPCR keine RNA-Einzelstränge amplifizieren werden können, wurden die RNAs mit Hilfe des QuantiTect Reverse Transcription Kits (Qiagen) in cDNA umgeschrieben.

Oftmaliges Auftauen/Einfrieren der RNA ist nach Möglichkeit zu vermeiden. Die cDNA wurde bei -20°C aufbewahrt oder im Idealfall sofort auf der RT-qPCR quantifiziert.

Die Konzentration der RNA wurde mit Hilfe eines Picodrops bestimmt und 1 mg in cDNA umgeschrieben.

QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen) Protokoll

- 1 µg der RNA wird mit 2 µl gDNA Wipeout Puffer aus dem Kit und so viel µl destilliertem Wasser in ein 100 µl Tube pipettiert, dass das Gesamtvolumen 14 µl ergibt. Die verwendete Menge an RNA-Lösung schwankt dabei je nach RNA-Konzentration und ergibt mit dem Wasser in Summe 12 µl. Der gDNA Wipeout Buffer dient dazu um genomische DNA zu inaktivieren, welche bei der RT-qPCR Messung zu Fehlern führen würde.
- Das Tube wird bei 42°C am Heizblock in Wasser inkubiert und im Anschluss auf Eis gelagert.
- 4 µl Quantiscript RT-Puffer, 1 µl Primer Mix und 0,9 µl Reverse Transkriptase, welche alle aus dem Kit stammen, werden pipettiert. Dabei werden alle Lösungen auf Eis gelagert und die instabile Reverse Transkriptase erst aus dem -20°C Kühlschrank genommen, wenn sich alle anderen Lösungen bereits im 100 µl Tube befinden.
- Das Tube mit 20 µl Gesamtinhalt wird an einer Endpoint-PCR der Firma PeqLab mit einem Temperaturprogramm (15 Minuten bei 42°C und 5 Minuten bei 95°C) erwärmt und die entstandene cDNA Lösung wird zur Quantifizierung mittels RT-qPCR verwendet.

### *2.2.10 RT-qPCR*

Die RT-qPCR diente zur relativen Quantifikation der cDNA-Levels (= mRNA-Levels) der RNAi Wurmsamples. Als Vergleich diente eine Wurmpopulation die mit Bakterien gefüttert wurden, die den leeren L4440 Vektor enthielten.

Dafür wurden die cDNA-Lösungen um den Faktor 1:2,5 von 20 µl auf 50 µl verdünnt, damit für das 96-well-plate Pipettierschema (s.u.) genug cDNA-Lösung zur Verfügung stand. Die cDNA wurde erst direkt vor dem Pipettiervorgang aus dem -20°C Gefrierschrank genommen und auf Eis gelagert.

RT-qPCR Pipettierschema - MasterMix (1x):

- 12,5 µl TaqMan GeneExpressionMasterMix
- 8,75 µl DEPC $H_2O$
- 1,25 µl TaqMan Sonde
- 2,00 µl cDNA

24,5 µl MasterMix

Im Rahmen dieser Masterarbeit wurden 10 Sonden zur Analyse verwendet, wovon 3 davon Referenzgene (Housekeeping-Genes) waren.

Referenzgene: *pmp-3, csq-1* und *Y45F10D.4.*
Targets des Folsäurestoffwechsels: *metr-1, mthf-1, dhfr-1, folt-1, Y4C6.B5, cbs-1* und *Y110A7A.4*.

*Protokoll der RT-qPCR mittels TaqMan Gene Expression MasterMix*
Zu Beginn wurde für jede Sonde ein eigener MasterMix erstellt, aus diesem dann in die einzelnen Wells der 96-well-plate pipettiert wurde.

Dieser MasterMix (10x) bestand aus:

- 125 µl TaqMan GeneExpressionMasterMix
- 87,5 µl DEPC $H_2O$
- 12,5 µl TaqMan Sonde

225 µl MasterMix

Er bildete die Grundlage für die jeweiligen 8 Wells der zu messenden Sonde (Schema 1) und einer cDNA-freien Kontrolle (NTC) unter Miteinbezug von 10%-Sicherheitsüberschuss.
Diese wurden auf Eis gelagert und in ihre respektive Spalte pipettiert.

| Sonden / RNAi | *pmp-3* | *csq-1* | *Y45F10D.4* | *metr-1* | *mthf-1* | *dhfr-1* | *folt-1* | *Y4C6.B5* | *cbs-1* | *Y110A7A.4* | Control | Control |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| *metr*-1 | | | | | | | | | | | *pmp-3* | *cbs-1* |
| *metr*-1 | | | | | | | | | | | *csq-1* | *Y110A7A.4* |
| *mthf*-1 | | | | | | | | | | | *Y45F10D.4* | |
| *mthf*-1 | | | | | | | | | | | *metr-1* | |
| *dhfr*-1 | | | | | | | | | | | *mthf-1* | |
| *dhfr*-1 | | | | | | | | | | | *dhfr-1* | |
| Control | | | | | | | | | | | *folt-1* | |
| Control | | | | | | | | | | | *Y4C6.B5* | |

Schema 1: RT-qPRC 96well-Plate Aufteilung

Nachdem die Sonden in die 100 µl PCR-Tubes pipettiert wurden, wurde je 2 µl cDNA in die Reihen nach Schema 1 pipettiert.

Die Strips wurden mit den dazugehörigen Deckeln fest verschlossen und an der Tischzentrifuge abzentrifugiert.

### *2.2.11 RT-qPCR Handling*

Die Strips wurden auf die RT-qPCR Platte gegeben und in einer Applied Biosystems 7300 RT-qPCR Vorrichtung gemessen.

In der 7300 System Software wurde als Assay die Relative Quantification ($ddC_t$) gewählt und das Pipettierschema in die Software eingegeben. Die Wasserkontrollen wurden mit "*NTC*" (No Template Control) benannt, damit das Signal der Sonden von den Proben durch die Software abgezogen wurde.

Als Probenvolumen wurde 25 µl angegeben.

Temperaturprogramm des RT-qPCR Laufes

Es wurde ein Temperaturprogramm für die 10 Sonden verwendet. Bei diesem erreichten alle Sonden die Plateauphase.

Das Temperaturprogramm folgte folgendem Schema:

Initiation: 50°C (2:00 Minuten)

95°C (5:00 Minuten) – Aktivierung der Hot-Start Polymerase

Denaturierung: 95°C (0:15 Minuten)

Annealing und Elongation: 60°C (1:00 Minute)

Denaturation, Annealing und Elongationszyklen: 49

Gesamtlaufzeit: 2:03 Stunden

Nach Beendigung des Runs wurden die Daten in der Software analysiert. Die $C_t$-Werte wurden als Microsoft Excel-Dokument abgespeichert und zur Auswertung verwendet.

*Homogenität der Referenzgene*

Mit Hilfe von *BestKeeper* wurden die Referenzgene auf ihre Homogenität untereinander geprüft.

*BestKeeper* ist eine Microsoft Excel Datei, welche mittels paarweiser Korrelationsanalyse die Homogenität analysiert. Es vergleicht die Referenzgene mit den Targetgenen und zeigt eine etwaige unterschiedliche Expression im Rahmen des Versuchsprotokolls (Pfaffl *et al.*, 2004).

### *2.2.12 Massenspektrometrische Messungen*

Zur relativen Metabolitenbestimmung des S-Adenosylmethionin (SAM), Homocystein, S-Adenosylhomocystein (SAH) und Cystathionin wurde in der Arbeitsgruppe eine HPLC-MS Methode entwickelt und zur Metabolitenanalyse herangezogen.

Es wurden pro zu silencender Nematodenpopulation 5 Petrischalen angesetzt um die quantitative Auswertung einfacher zu gestalten.

Protokoll der Probenaufbereitung für die LC-MS Messung

- Die Platten werden jeweils mit 2,5 ml M9-Puffer gewaschen und die Lösungen in einem 15 ml Falcontube gesammelt.
- Das Tube wird 10 Minuten senkrecht in einem Tray stehen gelassen um die Würmer am Grund zu sammeln. Der milchige Überstand wird abgehoben um die Lösung von Bakterien zu reinigen.
- Das Pellet wird mit 5 ml M9-Puffer gewaschen und bei 3000 RPM für 3 Minuten bei 20°C in der Standzentrifuge abzentrifugiert. Der Überstand wird entfernt und der Vorgang wird zwei Mal durchgeführt.
- Das Nematodenpellet wird in flüssigem Stickstoff eingefroren um die Zellwände thermisch durch die Kälteeinwirkung aufzubrechen.
- Im Anschluss werden 1600 µl Methanol pipettiert.
- Das Gesamtvolumen wird in ein Cryotube mit O-Ring Deckel und Glasperlen transferiert und in den Beadbeater eingespannt. Dadurch werden die Zellen mechanisch aufgebrochen.
- Das Cryotube wird für 1 Minute gebeatet, für 1 Minute auf Eis gelegt und abermals für 1 Minute gebeatet.
- Die resultierende Lösung wird bei 3000 RPM für 3 Minuten an der Standzentrifuge abzentrifugiert und der Überstand wird mit einer Insulinspritze in 1,5 ml Eppendorftubes überführt.
- Das Volumen von ca. 1600 µl wird auf 4 Eppendorftubes aufgeteilt und in den Eppendorfkonzentrator transferiert.
- Im Konzentrator wird unter Anlegen von Vakuum bei Zimmertemperatur das Volumen für 60 Minuten eingeengt, sodass ca. 100 µl in den Eppendorftubes übrig bleiben.
- Die vier Einzelvolumina von ca. 100 µl werden in einem Eppendorftube vereinigt und an der Standzentrifuge für 2 Minuten bei 10000 RPM abzentrifugiert.
- Der Überstand wird in ein neues Eppendorftube transferiert und steht der Analyse an der LC-MS bereit.

### *2.2.13 LC-MS Parameter*

HPLC Parameter

10 µl der aufbereiteten Probe wurde auf die Säule gebracht. Dabei handelte es sich um eine *WATERS Atlantis T3 150 mm* (3µm Partikelgröße, $C_{18}$) mit Vorsäule (10 mm).

Flussgeschwindigkeit: 0,250 ml/min

Säulentemperatur: 25°C

Probentemperatur: 4°C

Gradient: 99.9% Acetonitril / 0.1% $H_2O$ @ 0:00 Minuten

80.0% Acetonitril / 20.0% $H_2O$ @ 23:00 Minuten

75.0% Acetonitril / 25.0% $H_2O$ @ 25:00 Minuten

MS Parameter

Ionisationsquelle:

Electrospray Ionisation (ESI)

Nebulizer: 0,4 Bar

Dry Gas: 4,0 L/min

Dry Temp: 180°C

Massenselektor

*Transfer*

Funnel 1 RF: 250 Vpp (kleine Massen) / 350 Vpp (große Massen)

Funnel 2 RF: 250 Vpp (kleine Massen) / 350 Vpp (große Massen)

Hexapole RF: 200 Vpp (kleine Massen) / 300 Vpp (große Massen)

Quadrupole

Ion Energy: 7,0 eV

Low Mass: 150.00 m/z (kleine Massen) 250 m/z (große Massen)

Collision Cell

Collision Energy: 5,0 eV

Collision RF: 100 Vpp (kleine Massen) / 250 Vpp (große Massen)

Transfer time: 70,0 µs

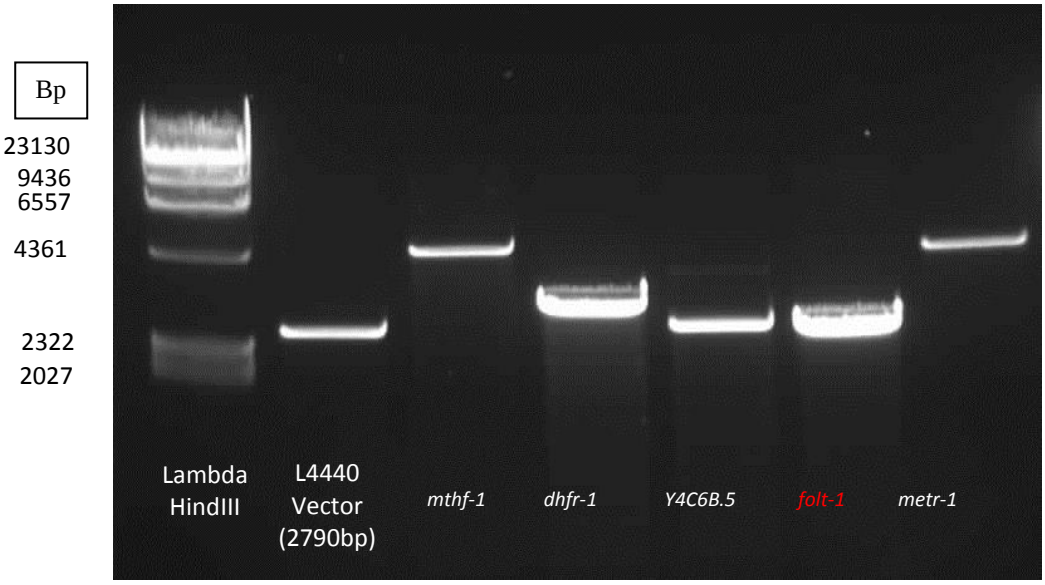
Pre Puls Storage: 6,0 µs

# 3. Ergebnisse

Es wurde ein Test Digest der Plasmide durchgeführt, um auf das Vorhandensein der Inserts zu prüfen. Die Plasmide wurden zusätzlich durch die Firma LGC Genomics sequenziert.

Es wurden Ergebnisse von sowohl den RNAi- als auch den MS-Versuchen ausgewertet.

## 3.1 Plasmid Test-Digest




Grafik 1: Gel des Plasmidverdaus

### *Interpretation des Plasmid Digests*

Der leere L4440 Vektor hat eine Länge von 2790bp. In Anlehnung an Tabelle 21 addiert sich dazu die ORF, was mit der Lambda-HindIII Ladder verglichen wird (Grafik 1).

| Plasmid | Bp Länge |
|---|---|
| ***mthf-1*** | 2790 + 1992 = **4782** |
| ***dhfr-1*** | 2790 + 570 = **3360** |
| ***Y4C6B.5*** | 2790 + 1410 = **4200** |
| ***folt-1*** | 2790 + 1233 = **4023** |
| ***metr-1*** | 2790 + 3750 = **6540** |

Tabelle 22: Plasmidlänge

Angesichts der Bp-Längen gegen die Lambda-HindIII Ladder erkennt man, dass alle Plasmide das Insert tragen, wobei *folt-1* und *Y4C6B.5* dem leeren Vektor sehr nahe kommen. Diese sollten bei Vorhandensein des Vektors nicht so schnell wandern und über der *dhfr-1* Bande in der Abbildung liegen (Grafik 1).

### *Sequenzierung durch LGC Genomics*

Die aufbereiteten Plasmide wurden zur Sequenzierung ebenfalls an die Firma LGC Genomics geschickt. Die jeweilige Sequenz wurde im Anschluss mittels DNASTAR SeqMan Software (Alignment mit der Gensequenz von der Wormbase) überprüft. Dabei stellte sich heraus, dass das *folt-1* Plasmid kein Insert trägt. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde im Rahmen dieser Masterarbeit auf eine RNAi des FOLT-*1* verzichtet.

## 3.2 Ergebnisse RNAi Experimente

Die mRNA-Levels der jeweiligen RNAi Populationen wurden in SigmaPlot grafisch dargestellt.

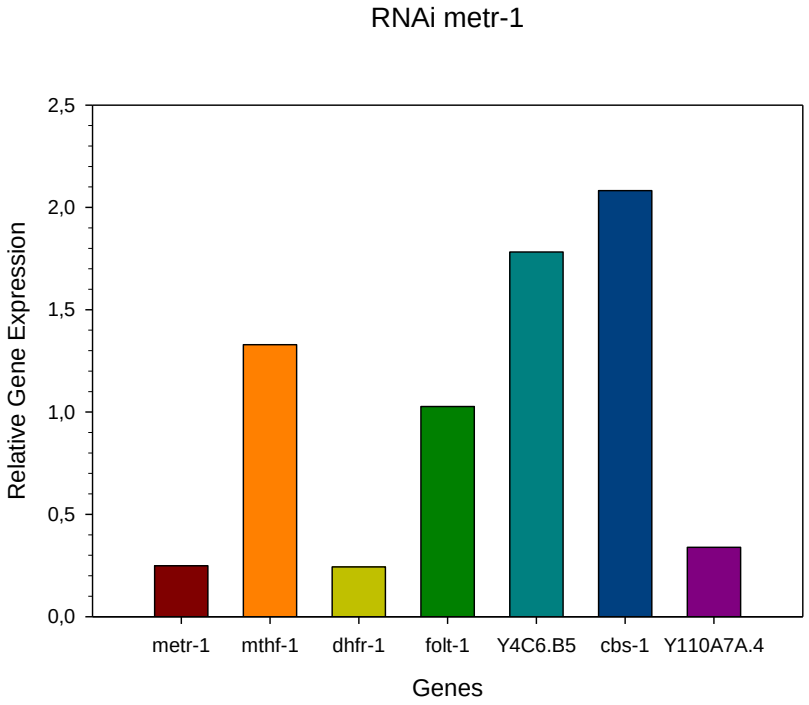
Die Ergebnisse beziehen sich auf eine *C. elegans* Vektorkontrolle, die induzierte Bakterien mit leerem L4440 Vektor (ohne ORFs) aufgenommen hatte. Für die mit Folsäure supplementierten Populationen wurden ebenfalls Vektorkontrollpopulationen auf den selbigen Folsäureplatten (Tabelle 14) verwendet.

Die Folsäuresupplementationsexperimente mit RNAi wurden nach dem Schema der Tabelle 15 durchgeführt und sowohl mit einer Vektorkontrolle, einer Vektorkontrolle auf Folsäure, als auch mit einer unsupplementierten RNAi Population auf ihre mRNA-Levels hin verglichen. Danach wurden die RNAi ohne, mit der RNAi mit Folsäuresupplementation zueinander in Relation gesetzt.

Es wurden RNAi der METR-1, MTHF-1 und DHFR-1 durchgeführt. Sie wurden auf ihre Downregulation hin in der RT-qPCR analysiert. Im Anschluss sind diese grafisch dargestellt. Auf der Y-Achse jeweils die relativen Genexpressionen.

## 3.2.1 RNAi

### *3.2.1.1 METR-1 RNAi*

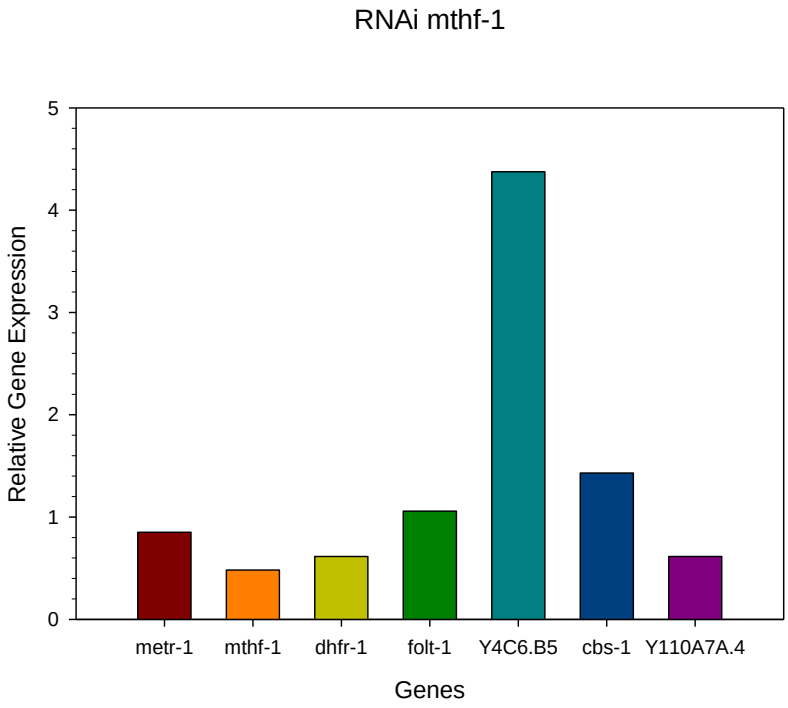



Grafik 2: METR-1 RNAi

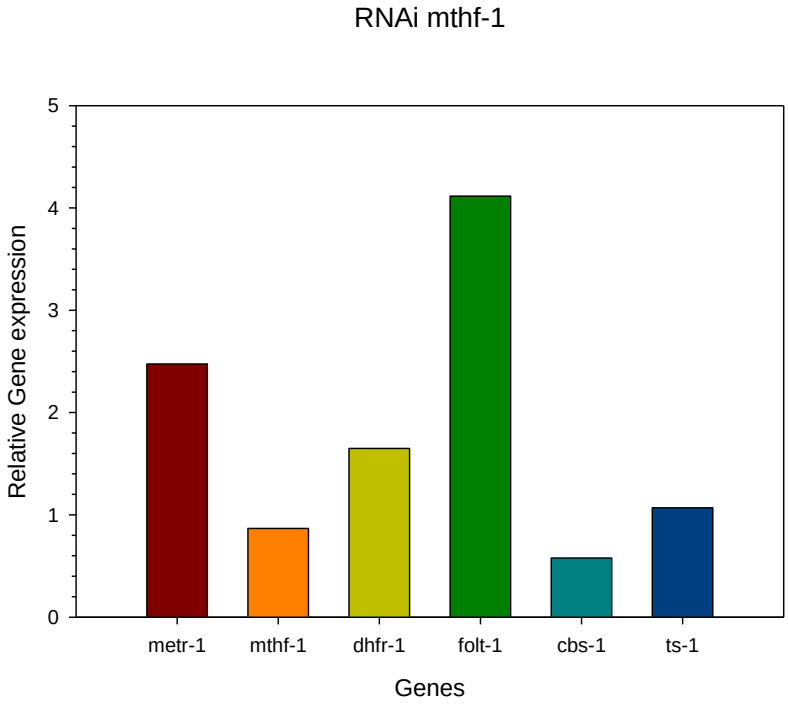
### *Interpretation der RNAi der METR-1*

Durch RNAi wurde die *metr-1* im Vergleich zur Vektorkontrolle auf 0,249 downreguliert (Grafik 2). Dadurch erhöhten sich die mRNA-Levels der MTHF-1 um den Faktor 1,329. Eventuell wird in der Zelle mehr Substrat (5-Me-THF) für die niedriger exprimierte METR-1 erzeugt. Gleichzeitig ist die CBS-1 stärker exprimiert, möglicherweise dadurch, damit das akkumulierende Homocystein alternativ zu Cystathionin abgebaut werden kann. Der Folsäuretransporter Y4C6.B6 ist stärker exprimiert, um vielleicht mehr Substrat für die Remethylierung des Homocysteins in die Zelle zu bringen. Die niedrigeren mRNA-Levels der an der DNA-Synthese beteiligten Y110A7A.4 könnten darauf hinweisen, dass der Remethylierung des Homocysteins, bzw. dessen Abbaus zu Cystathionin, mehr Beachtung geschenkt wird bei einer RNAi der METR-1.

### *3.2.1.2 MTHF-1 RNAi*




Grafik 3: MTHF-1 RNAi

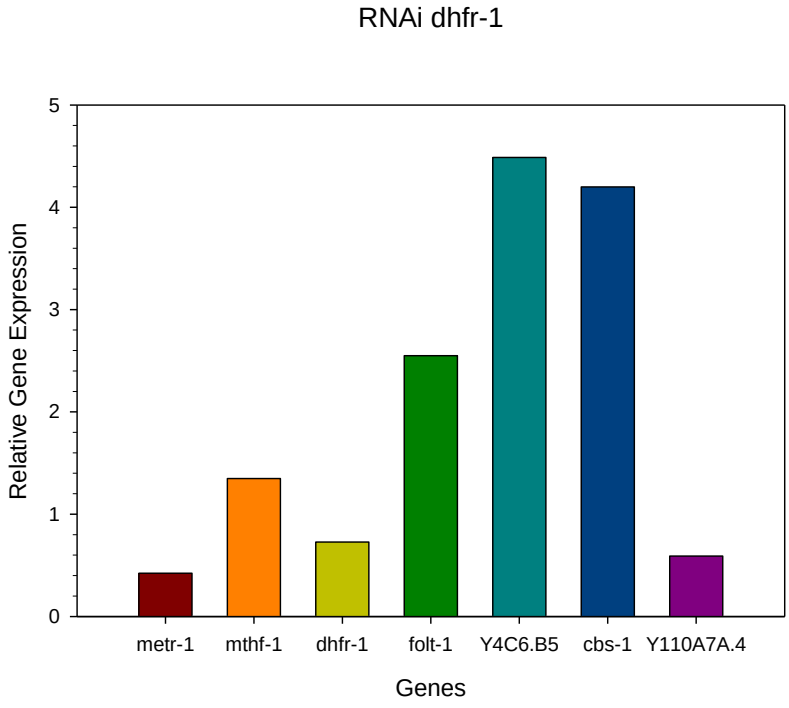



Grafik 4: MTHF-1 RNAi

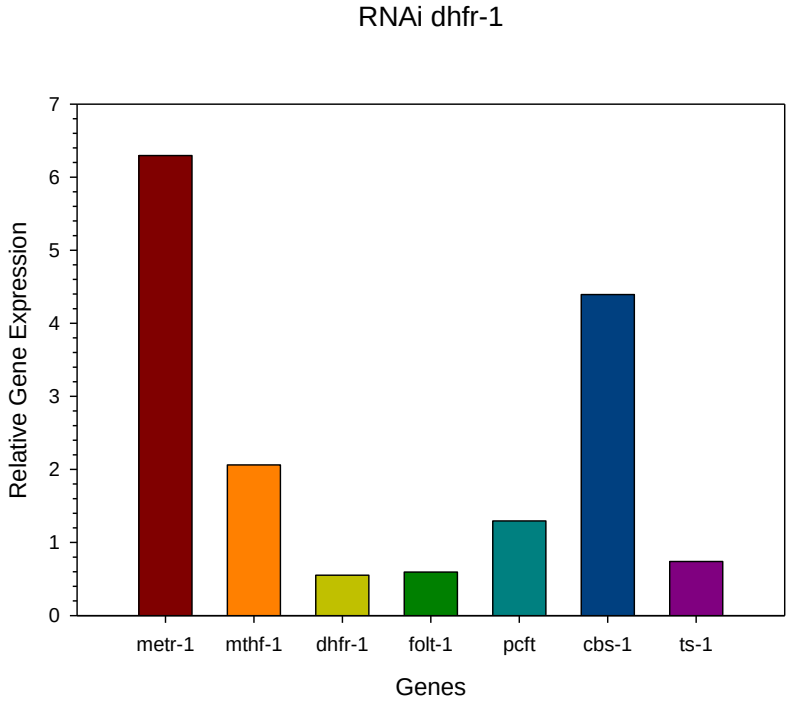
### *Interpretation der RNAi der MTHF-1*

Die MTHF-1 mRNA-Expression wurde durch RNAi auf den Faktor 0,482 bzw. 0,867 gesenkt (Grafik 3 und Grafik 4). Die MTHFR stellt ein zentrales Enzym des Folsäurestoffwechsels dar und limitiert durch seine Position darin den Remethylierungspathway des Homocysteins. Die CBS-1 mRNA ist vermehrt exprimiert, um möglicherweise Homocystein alternativ zu Cystathionin abzubauen, da der Methylgruppendonor 5-Me-THF möglicherweise für die Regeneration des Methionins unausreichend vorhanden ist. Bei der zweiten Messung, wo die MTHF-1 mRNA nur auf 0,867 war, waren *cbs-1* Expressionslevels auf 0,578. Dies bedeutet, dass eine stärkere Downregulation die *cbs-1* stärker stimuliert. Gleichzeitig ist der Folsäuretransporter Y4C6.B5 um den Faktor 4,376 vermehrt exprimiert. Dies könnte darauf hinweisen, dass der Organismus versucht mehr Substrat für den Folsäurestoffwechsel in Form von Folsäure aus dem Plasma in das Zytosol zu transportieren.

## *3.2.1.3 DHFR-1 RNAi*




Grafik 5: DHFR-1 RNAi




Grafik 6: DHFR-1 RNAi

### *Interpretation der RNAi der DHFR-1*

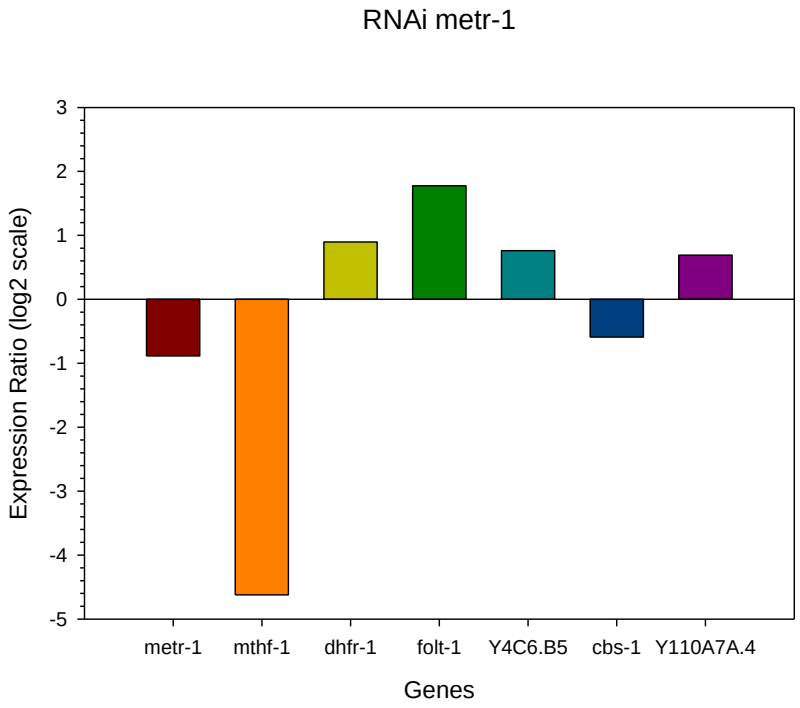
Die mRNA-Expression der DHFR-1 wurde durch RNAi auf 0,728 und 0,551 reduziert (Grafik 5 und Grafik 6). Man merkt bei beiden Messungen, dass ein Silencing der DHFR-1 die MTHF-1 Expression erhöht. Je niedriger die *dhfr-1*, desto höher die *mthf-1*.

Eine sehr stark erhöhte Exprimierung der CBS-1 in beiden Messungen deutet darauf hin, dass das Homocystein zu Cystathionin abgebaut wird. Gleichzeitig ist die Y110A7A.4 in beiden Messungen schwächer exprimiert, was bedeuten könnte, dass die Remethylierung bei RNAi der DHFR-1 gegenüber der DNA-Synthese Priorität hat.

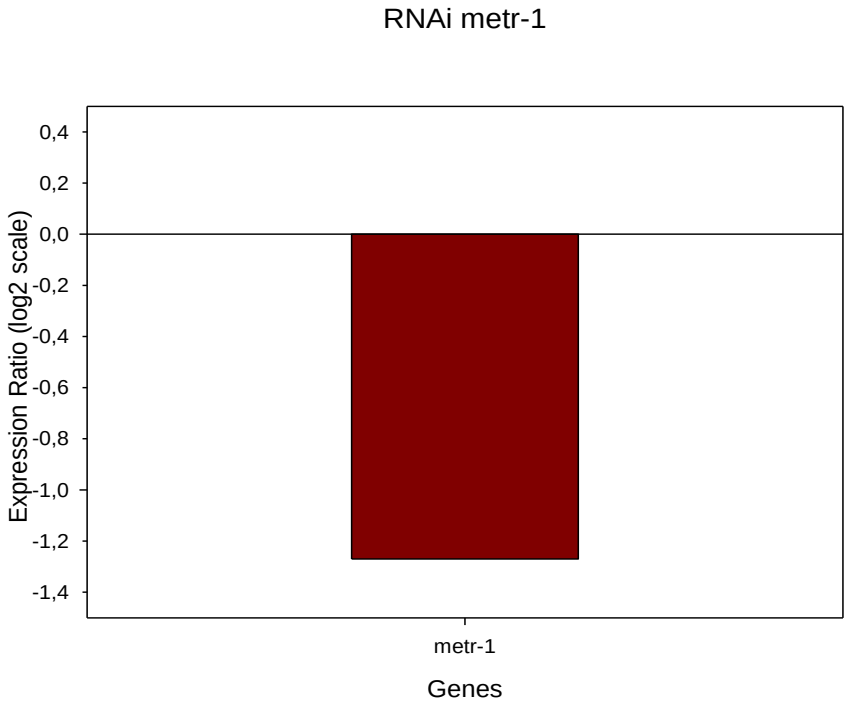
## 3.2.2 Ergebnisse der RNAi mit Folsäure

Die RNAi unter Folsäuresupplementation wurde mit den Genen *metr-1*, *mthf-1* und *dhfr-1* durchgeführt. Die Daten der Folsäuresupplementations-RNAi wurden mit RNAi-Daten ohne Folsäuresupplementation log-transformiert und in Relation gesetzt.

### *3.2.2.1 METR-1 RNAi mit Folsäuresupplementation*




Grafik 7: METR-1 RNAi mit Folsäure/ohne Folsäure Relation

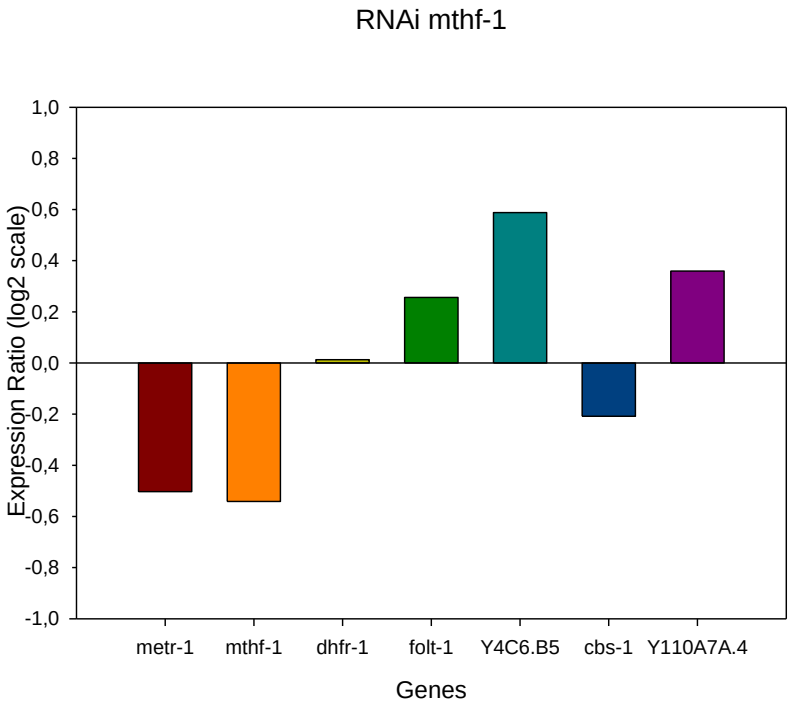



Grafik 8: METR-1 RNAi mit Folsäure/ohne Folsäure Relation

### *Interpretation der RNAi der METR-1 mit Folsäuresupplementation*

Zu METR-1/FS RNAi fanden zwei Messungen statt (Grafik 5 und Grafik 6). In beiden waren mRNA-Levels der METR-1 in der supplementierten Gruppe geringer als in der unsupplementierten. Eine Supplementation mit Folsäure bei RNAi der METR-1 erhöht wahrscheinlich die intrazellulären Speicher an Folsäure, was sich eventuell auf eine geringere Expression der METR-1 auswirkt. Allgemein ist bei einer Folsäuresupplementation bei METR-1 RNAi weniger mRNA vorhanden als ohne Folsäuresupplementation. Die erhöhten mRNA-Levels der Folsäuretransporter FOLT-1 und Y4C6.B5 bei der supplementierten, im Vergleich zur unsupplementierten, Gruppe deuten auf eine erhöhte Einschleusung von Folsäure in die Zelle hin. Ebenfalls ist CBS-1 bei der supplementierten Gruppe schwächer exprimiert, während Y110A7A.4 höher exprimiert ist. Dies deutet darauf hin, dass bei RNAi der METR-1 unter Folsäuresupplementation die DNA-Synthese gegenüber dem Methylierungspathway bevorzugt wird.

## *3.2.2.2 MTHF-1 RNAi mit Folsäuresupplementation*




Grafik 9: MTHF-1 RNAi mit Folsäure/ohne Folsäure Relation

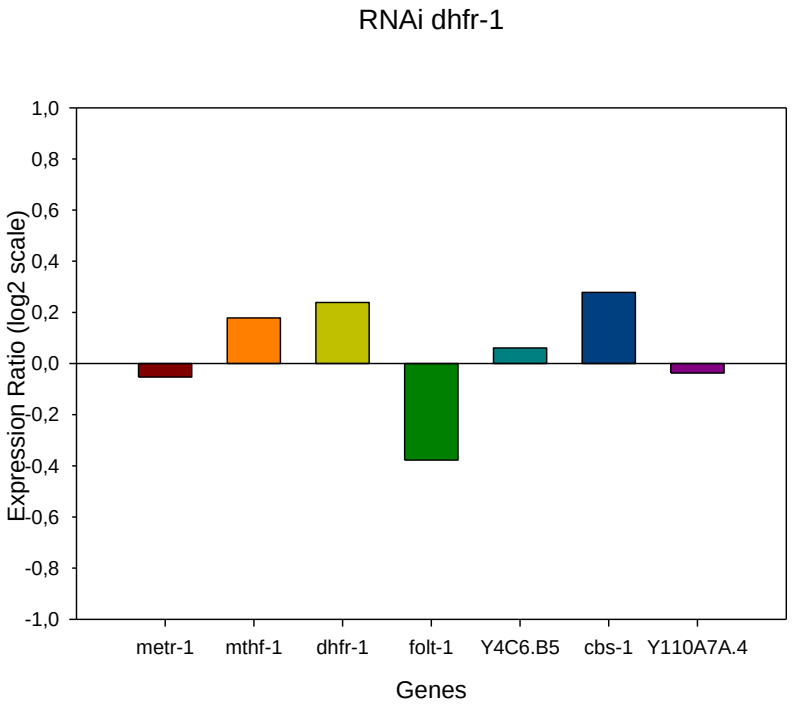
*Interpretation der RNAi der MTHF-1 mit Folsäuresupplementation*

Bei der Supplementation von 100 mM Folsäure auf den Agar-Platten findet sich weniger MTHF-1 mRNA im Vergleich zu ohne Supplementation (Grafik 7).

Die Folsäuretransporter FOLT-1 und Y4C6.B5 sind beide bei der supplementierten Gruppe höher exprimiert als bei der unsupplementierten. Dies deutet auf einen vermehrten Transport der Folsäure aus der Nahrung in die Zielzelle hin.

Die vergleichsweise erhöhte Expression der Y110A7A.4 in der supplementierten Population bedeutet, dass der DNA-Synthese bei Folsäuresupplementation mehr Priorität zukommt als dem Methylierungspathway. Die schwächere Expression von CBS-1, MTHF-1 und METR-1 bei der MTHF-1 RNAi mit Folsäure deuten ebenfalls darauf hin.

## *3.2.2.3 DHFR-1 RNAi mit Folsäuresupplementation*




Grafik 10: DHFR-1 RNAi mit Folsäure/ohne Folsäure Relation

*Interpretation der RNAi der DHFR-1 mit Folsäuresupplementation*

Bei einer Supplementation mit 100 mM Folsäure auf den Agar-Platten ist mehr DHFR-1 mRNA exprimiert als bei den Platten ohne Supplementation (Grafik 8). Somit scheint bei Supplementation die Reaktion von DHF zu THF vermehrt stattzufinden.

Gleichzeitig sind die mRNA-Levels der MTHF-1 bei beiden Populationen erhöht, wobei auch von der MTHF-1 mehr mRNA bei der supplementierten Wurmpopulation vorhanden ist. Dies deutet eventuell darauf hin, dass die Konvertierung von DHF zu THF vermehrt stattfindet. Allerdings erkennt man keinen Unterschied in der Y110A7A.4, was auf keine unterschiedliche DNA-Synthese aus dem Substrat 5,10-Me-THF deuten lässt. Die Folsäuretransporter FOLT-1 und Y4C6.B5 waren bei beiden Versuchsprotokollen höher exprimiert, allerdings in der unsupplementierten Gruppe mehr. Eine RNAi der DHFR-1 bewirkt durch deren Rolle bei der Reduktion von Folsäure zu DHF, und DHF zu THF, eine geringere Expression des FOLT-1, da dieser die Folsäure aus dem Plasma in die Zelle transportiert. So könnten hohe intrazelluläre Level an Folsäure und DHF einen negativen Feedbackmechanismus auf die Genexpression des FOLT-1 Transmembrantransporters bewirken.

Bei RNAi der DHFR-1 unter Folsäuresupplementation zeigt sich keine Tendenz einer Bevorzugung des DNA-Synthesepathways bzw. des Methylierungspathways.

### 3.2.3 Metabolitenmessung

Es wurden die Metabolite SAM, SAH, Cystathionin und Homocystein bei METR-1 RNAi auf dem Massenspektrometer gemessen. Diese sind Bestandteil des Methylierungspathways. Es wurde quantitativ über die Peakfläche [mAu] ausgewertet.

Alle Metabolite eluierten nach 1,5 – 2,5 Minuten. Diagramme siehe Anhang.

*Ergebnis der METR-1 RNAi auf Homocystein, Cystathionin, SAH und SAM*

| [mAu] | Homocystein | SAH | SAM | Cystathionin | H : SAH : SAM : CYS |
|---|---|---|---|---|---|
| **Kontrolle** | 23398 | 11448 | 62159 | 8429 | 1 : 0.5 : 3: 0.4 |
| **RNAi** | 41813 | 66219 | 64115 | 24140 | 1 : 1.5 : 1.5: 0.5 |
| **Faktor** | **1.7** | **5.8** | **1.03** | **2.87** | |

Tabelle 23: Homocystein, Cystathionin, SAH und SAM

### *Interpretation der RNAi der METR-1 Metabolitenmessung*

Bei einer Downregulation der METR-1 ist die Remethylierung des Homocysteins erschwert. Dies äußert sich in der Zelle in der Akkumulation von SAH und Homocystein.

Bei der Messung traf dies zu. Homocystein, SAH und Cystathionin waren in der RNAi der *metr-1* Population im Vergleich zur Vektorkontrolle erhöht (Tabelle 22). Es fällt die 5,8 fach höhere Konzentration von SAH in der RNAi Population auf. Homocystein war dabei um den Faktor 1,70 erhöht und Cystathionin um den Faktor 2,87. Ein vermehrter Abbau des Homocysteins über CBS-1 lässt sich aufgrund der höheren Cystathioninwerte vermuten.

# 4. Diskussion

## 4.1 RNAi in *C.elegans*

Ein Ziel dieser Masterarbeit war die erfolgreiche Downregulation der METR-1, MTHF-1 und DHFR-1 in *C. elegans* mittels RNAi. Der Faktor der Downregulation ist dabei zwischen den Enzymen unterschiedlich und wird durch das Versuchsprotokoll beeinflusst. Es stellt sich die Frage, wie stark eine Downregulation sein muss um den Substratumsatz tatsächlich zu limitieren, da nach der Michaelis-Menten Kinetik durch mehr Substrat ein Enzymmangel kompensiert werden kann. Eine Restenzymaktivität könnte in Verbindung mit höheren Substratmengen immer noch ausreichen um den Stoffwechsel nicht zu inhibieren. Dennoch wirkte sich eine Downregulation immer auf die anderen, im Folsäurestoffwechsel involvierten, Enzyme aus. Der Vergleich einer Downregulation mit einer Genmutation, die zu einer verminderten Enzymaktivität führt, ist möglicherweise schwer zu interpretieren.

Einen weiteren Punkt dieser Arbeit stellte die Interpretation des Zusammenhangs der Enzyme untereinander dar. Mögliche Feedbackmechanismen und Kompensationsverhalten zwischen den Enzymen werden im Anschluss diskutiert.

Da der Folsäurestoffwechsel eine Doppelrolle spielt, indem er den Methylierungspathway und auch den DNA-Synthesepathway mit Metaboliten, wie dem 5-Me-THF und 5,10-Me-THF versorgt, wurden aufgrund der Ergebnisse Aussagen darüber getroffen, welchem Pathway bei jeweiliger Downregulation Priorität zukommt.

*C. elegans* ist auf Folsäurezufuhr über die Nahrung angewiesen. Alle Bakterienstämme synthetisierten Folsäure, welche dadurch dem Wurm zur Aufnahme zur Verfügung stand. Dabei blieb allerdings ungeklärt, in welcher Metabolitenform *C. elegans* die Folsäure aufnahm, da unklar ist inwieweit die Aufnahme über das Fressen der Bakterien oder der Aufnahme über die Konzentrationen auf dem Agar selbst stattfand. Bakterien verwenden die Folsäure aus ihrer Eigensynthese für ihren eigenen Stoffwechsel und somit nimmt der Nematode eine Vielzahl von Folsäurederivaten auf.
Deshalb war die Supplementation mit synthetischer Folsäure ein weiterer Aspekt im Rahmen dieser Masterarbeit. Indem RNAi Populationen mit und ohne Supplementation untereinander auf ihre Enzymgenexpression des Folsäurestoffwechsels verglichen wurden, konnten Aussagen über die Rolle der Folsäure getroffen werden.
Ein Unsicherheitsfaktor bei der Interpretation ist, dass Methionin auch über die Nahrung aufgenommen wird und dies wirft die Frage auf, ob bei einer Downregulation der METR-1 eine Kompensation durch vermehrten Methionineintransport in die Zelle stattfindet.

Die Messungen der Metabolite im Methylierungszyklus von *C. elegans* stellten eine bedeutende Zusatzinformation bei der Interpretation der RNAi Daten dar, um das Ausmaß der Downregulation der Enzyme mit den tatsächlichen Veränderungen der Metabolitenlevels zu vergleichen.

## 4.2 Knockdown der METR-1, MTHF-1 und DHFR-1

Es wurde ein Knockdown der Enzyme METR-1, MTHF-1 und DHFR-1 in *C. elegans* durchgeführt. Die mRNA-Levels wurden dabei mit einer Kontrollgruppe verglichen, welche aufgrund ihres leeren L4440 Vektors keine dsRNA produzierten. Somit handelt es sich immer um eine relative Quantifikation der mRNA.

### *4.2.1 METR-1*

Die METR-1 mRNA wurde durch das Versuchsprotokoll auf den Faktor 0,249 im Vergleich zur Vektorkontrolle downreguliert.
Die Rolle von METR-1 ist die Remethylierung des Homocysteins zu Methionin. Als Methylgruppendonor fungiert das 5-Me-THF. Dabei ist die *mthf-1* auf den Faktor 1,329

upreguliert. Dies könnte bedeuten, dass die Zelle versucht durch eine höhere Substratbereitstellung des 5-Me-THF durch die MTHF-1 eine Enzymsättigung der downregulierten METR-1 sicherzustellen.
Die DHFR-1 ist bei METR-1 RNAi um den Faktor 0,243 stark downreguliert. Es scheint die Metabolisierung der Folsäure zu DHF und anschließend THF in diesem Fall eine kleinere Rolle zu spielen. Möglicherweise besteht ein Zusammenhang mit der Upregulation des Transmembrantransporters Y4C6.B5, welcher Polyglutamyl-THF aus dem Verdauungstrakt in den Blutkreislauf transportiert. Dadurch, dass somit THF bereits in der Zelle vorliegt, wird weniger in die Expression der DHFR-1 investiert.
Da durch die verringerte Remethylierung des Homocysteins durch die METR-1 die Homocysteinlevel ansteigen, versucht die Zelle dies durch den alternativen Abbauweg zu Cystathionin auszugleichen. Das verantwortliche Enzym CBS-1 ist um den Faktor 2,082 upreguliert, was diese Annahme unterstützt.
Die stark verminderte Expression des an der DNA-Synthese beteiligten Enzyms TS bedeutet, dass im Falle einer METR-1 Downregulation der Methylierungspathway priorisiert wird, um die Homocysteinlevels zu senken.

### *4.2.2 MTHF-1*

Die MTHF-1 wurde im Vergleich zur Vektorkontrolle auf einen Faktor von 0,482 downreguliert.
Dabei wird die Demethylierung des 5,10-Me-THF zu 5-Me-THF beeinflusst. Da 5-Me-THF der Methylgruppendonor bei der Remethylierung des Homocysteins über die METR-1 ist, könnte es dabei zu einem Anstieg der Homocysteinlevels kommen. Unterstützt wird diese Annahme durch die vermehrte Expression des alternativ abbauenden Enzyms CBS-1. Gemeinsam mit der verringerten Expression der Y110A7A.4 deutet dieses Ergebnis darauf hin, dass dem Methylierungspathway bei einer *mthf-1* Downregulation mehr Priorität zugeteilt wird. Die erhöhten Levels des Transmembrantransporters Y4C6.B5 in Verbindung mit einer verringerten DHFR-1 Expression bei MTHF-1 RNAi von 0,482 lassen auf eine verringerte Umsetzung von Folsäure zu DHF und THF schließen, während vorrangig Nahrungs-THF als Substrat zu dienen scheint.

### *4.2.3 DHFR-1*

Die DHFR-1 wurde auf den Faktor 0,728 und 0,551 downreguliert.

Sie reduziert Folsäure zunächst zu DHF und im Anschluss zu THF. Ihre Downregulation verringert im Folsäurestoffwechsel die Metabolisierung von Folsäure in ihre biologisch-aktiven Formen 5,10-Me-THF und 5-Me-THF.

Eine stärkere Downregulierung der DHFR-1 scheint die METR-1 hochzuregulieren. Außerdem ist die MTHF-1 upreguliert weil die Zelle so eventuell versucht 5-Me-THF-Level zu erhöhen.

Beide Folsäuretransporter sind bei schwachem Silencing stark upreguliert um die Folsäurestoffwechselenzyme zu sättigen, während bei stärkerem Silencing FOLT-1 downreguliert ist und PCFT nur schwach upreguliert ist. Die um den Faktor 4,199 und 4,392 überexprimierte CBS-1 deutet auf eine starke Beanspruchung des alternativen Abbauweges des Homocysteins zum Cystathionin hin. Da die an der DNA-Synthese beteiligte TS downreguliert wird, wird bei RNAi der DHFR-1 der Methylierungspathway über CBS-1 priorisiert.

### *4.2.4 Expression der Transmembrantransporter FOLT-1 & Y4C6.B5*

Die Downregulation von METR-1, MTHF-1 und DHFR-1 mündet in der Regel in eine Upregulation der Transmembrantransporterproteine FOLT-1 und Y4C6.B5.

FOLT-1, welcher Folsäure aus dem Blut in die Zellen transportiert, war bei *metr-1* RNAi normal exprimiert, während er bei schwacher DHFR-1 RNAi stark up- und bei starker RNAi downreguliert war. Dieselbe Beobachtung stellte sich bei MTHF-1 RNAi ein. Der luminale Transmembrantransporter Y4C6.B5 war bei allen Messungen stark überexprimiert. Dies bedeutet, dass bei RNAi der Folsäurestoffwechselenzyme mehr Folsäure aus der Nahrung in den Organismus aufgenommen wird, aber FRα und FOLT-1 scheinbar genug Aktivität besitzen, um ausreichende Mengen an Substrat in die Zelle zu transportieren. Bei schwacher DHFR-1 RNAi war FOLT-1 möglicherweise deshalb stark upreguliert, um die DHFR-1 bei verringerten Enzymlevels vollständig zu sättigen.

Eventuell hat der FRα, welcher im Rahmen dieser Masterarbeit nicht gemessen wurde, eine wichtigere bzw. universellere Stellung als FOLT-1 beim Transport von Folsäurederivaten in die Zelle.

### *4.2.5 Priorisierung des Methylierungspathways*

Folsäurederivate dienen im Folsäurestoffwechsel sowohl bei der DNA-Synthese als auch im Methylierungspathway als Substrat. Beide Zyklen scheinen um die Substrate zu konkurrieren und werden bei der Entwicklung des Nematoden sowie bei RNAi unterschiedlich priorisiert.

Anhand der mRNA-Expressionen der Folsäurestoffwechselenzyme CBS-1 und TS bei RNAi erkennt man eine klare Tendenz zur Bevorzugung des Methylierungszyklus in L4-Nematoden. Dabei ist die *cbs-1* immer upreguliert um das akkumulierende Homocystein zu Cystathionin abzubauen. TS war gleichzeitig bei allen RNAi Experimenten ohne Folsäuresupplementation downreguliert, da bei der RNAi von METR-1, MTHF-1 und DHFR-1 die Homocysteinlevelsenkung gegenüber der DNA-Synthese vorrangig zu sein scheint.

## 4.3 Knockdown der METR-1, MTHF-1 und DHFR-1 bei Supplementation mit Folsäure

Im Anschluss an die reguläre RNAi der Enzyme wurde die RNAi bei Supplementation mit Folsäure auf den Agar-Platten (s. Tabelle 13) wiederholt. Dabei wurde die Enzymregulationen zwischen den supplementierten und unsupplementierten Nematodenpopulation verglichen. Vektorkontrollen und Vektorkontrollen auf supplementierten Agar-Platten wurden zur relativen Quantifikation der mRNA-Levels an der RT-qPCR herangezogen.

### *4.3.1 METR-1 RNAi mit Folsäuresupplementation*

Bei RNAi der METR-1 fällt auf, dass die mRNA-Levels der METR-1 unter Supplementation im Vergleich zur unsupplementierten Population geringer waren. Möglicherweise muss von der Zelle weniger METR-1 exprimiert werden wenn viel Folsäure zur Verfügung steht. DHFR-1 war, genauso wie bei den Standardexperimenten (s. 4.2.1) in beiden Gruppen downreguliert, wobei in der Folsäuregruppe doppelt so hohe mRNA-Levels gemessen wurden. Ein hoher Folsäurestatus im Organismus äußert sich eventuell in einer verstärkten Expression der DHFR-1, um Folsäure zu DHF und THF zu reduzieren.

Besonders auffällig ist die unterschiedliche Expression der Transporter. FOLT-1 war im Vergleich zur Standardgruppe in der Folsäuregruppe um den Faktor 3,42 höher. Hohe Plasmalevels an Folsäure resultieren vielleicht in vermehrtem Transport in die Zellen. Auch der luminale Transporter Y4C6.B5 war in der Folsäuregruppe höher exprimiert.
Die erwartungsmäßige Upregulation der CBS-1 bei RNAi der METR-1 (s. 4.2.1) fiel unter Supplementation schwächer aus. Gleichzeitig war die an der DNA-Synthese beteiligte TS stärker exprimiert. Ohne Supplementation (4.2.1) wird der Methylierungszyklus priorisiert, doch unter Folsäuresupplementation findet das Gegenteil statt. Hohe Folsäurelevel scheinen die DNA-Synthese zu stimulieren. Möglicherweise dadurch, dass bei einem hohen Folsäurestatus weniger Homocystein akkumuliert wird und die zelleigenen Ressourcen für die DNA-Synthese genutzt werden können. In der Tat senkt eine Folsäuresupplementation Homocysteinlevels (Zhou *et al.*, 2011).

### *4.3.2 MTHF-1 mit Folsäuresupplementation*

Unter Folsäuresupplementation waren die MTHF-1 mRNA-Levels geringer als ohne Supplementation. Das Substrat 5-Me-THF wird unter hoher Folsäurezufuhr eventuell in geringeren Mengen für den Methylierungspathway synthetisiert, da durch niedrigere Homocysteinlevels dem Methylierungspathway allgemein eine geringere Rolle zukommt. METR-1 und CBS-1 waren unter Supplementation ebenfalls schwächer exprimiert, was ebenfalls auf eine geringere Bedeutung des Methylierungspathways bei hohen Folsäurelevels schließen lässt. Der DNA-Synthese scheint unter Supplementation mehr Priorität eingeräumt zu werden, was die Erhöhung der Expression der TS erklären würde. So wie bei der METR-1 (4.3.1) ist auch bei RNAi der MTHF-1 bei Folsäuresupplementation eine Umkehr der Priorität vom Methylierungspathway ohne Supplementation zum DNA-Synthesepathway bei Folsäuresupplementation zu erkennen. Beide Folsäuretransporter sind in der supplementierten Population stärker exprimiert, was einen vermehrten Transport aus dem Lumen und dem Plasma in die Zelle nahelegt.

### *4.3.3 DHFR-1 mit Folsäuresupplementation*

Unter Folsäuresupplementation fällt auf, dass mehr DHFR-1 mRNA gemessen wurde. Dies stellt einen Unterschied zu den Folsäureexperimenten mit METR-1 und MTHF-1 (4.3.1 und 4.3.2) dar und deckt sich mit der Beobachtung aus 4.2.3, dass die DHFR-1 unabhängig von METR-1 und MTHF-1 ist. Hohe Folsäurelevels im Organismus stimulieren die DHFR-1 Expression, da es für die Zelle möglicherweise günstiger ist Folsäure in Form ihrer Metaboliten DHF bzw. THF zu speichern. Die METR-1 war bei beiden Populationen nicht verändert und die MTHF-1 in beiden upreguliert. Gemeinsam mit einer erhöhten Expression der CBS-1 deutet dies auf einen vermehrten Abbau von Homocystein zu Cystathionin hin. Der DNA-Synthesepathway scheint anhand der vermehrt exprimierten TS eine größere Bedeutung zu spielen.

### *4.3.4 Expression der Transmembrantransporter FOLT-1 & Y4C6.B5*

Der Transmembrantransporter FOLT-1 war bei allen Experimenten mit Folsäuresupplementation upreguliert. Dies deutet darauf hin, dass ein hoher Folsäurestatus dessen Expression steigert um Folsäure aus dem Blutkreislauf in die Zellen zu transportieren. Ebenfalls wurden erhöhte mRNA-Levels des Y4C6.B5 gemessen. Durch die Folsäuresupplementation reagiert der Organismus möglicherweise mit einer erhöhten Aufnahme der Folsäure aus dem Darmlumen. Somit scheint eine höhere Folsäureaufnahme mit einer Upregulation der Transmembrantransporter einherzugehen.

### *4.3.5 Priorisierung des DNA-Synthesepathways*

Bei den RNAi-Experimenten ohne Folsäure (4.2.5) stellte sich heraus, dass der Methylierungspathway bevorzugt wird. Bei Folsäuresupplementation findet das Gegenteil statt. Die mRNA des Enzym TS war bei allen Folsäureexperimenten upreguliert, was auf eine vermehrte DNA-Synthese schließen lässt. Gleichzeitig waren CBS-1 mRNA-Levels geringer als in den Versuchen ohne Folsäuresupplementation. Durch höhere Folsäurelevels im Organismus akkumuliert möglicherweise weniger Homocystein, wodurch dem Methylierungspathway weniger Bedeutung zukommt und das Homocystein zu Cystathionin abbauende Enzym CBS-1 schwächer exprimiert wird. Eine Folsäuresupplementation, gemeinsam mit Vitamin $B_6$ und Vitamin $B_{12}$, senkt

Homocysteinlevels (Zhou *et al.*, 2011), was durch diese Ergebnisse untermauert wird. Die erhöhte Aktivität des DNA-Synthesepathways unterstützt ebenfalls die Annahme, dass hohe Folsäurelevels beim Tumorwachstum durch erleichterte Bereitstellung der Substrate 5,10-Me-THF und 10-Formyl-THF eine unterstützende Rolle spielen.

## *4.4 Zusammenfassung der RNAi Experimente*

Bei den RNAi-Experimenten mit und ohne Folsäuresupplementation (4.2 und 4.3) wurden klare Unterschiede bei der Enzymexpression festgestellt.

Ohne Supplementation scheint eher der Y4C6.B5 Transmembrantransporter upreguliert zu werden, während FOLT-1 nur bei einer schwachen RNAi der DHFR upreguliert war und bei METR-1 und MTHF-1 RNAi downreguliert war. Gleichzeitig war Y4C6.B5 bei den unsupplementierten Experimenten im Vergleich zur Vektorkontrolle stärker upreguliert als in den Experimenten mit Folsäuresupplementation.

Bei Folsäuresupplementation finden sich geringere mRNA-Levels der METR-1 und MTHF-1. Dies erklärt sich eventuell dadurch, dass die Enzyme mengenmäßig nicht so sehr gebraucht werden, da die Homocysteinlevels aufgrund der Supplementation nicht so hoch sind. Dies wird unterstützt davon, dass die CBS-1, welche Homocystein alternativ zu Cystathionin abbaut, in den supplementierten Populationen schwächer exprimiert ist. Fällt weniger Homocystein an, muss weniger CBS-1 exprimiert werden.

Bei Supplementation war die DHFR-1 stärker exprimiert. Sie reduziert Folsäure zu DHF und THF in der Zelle. Da durch die upregulierten Transporter mehr Folsäure in die Zelle gelangt, versucht diese möglicherweise die Folsäure in ihre Metabolite umzuwandeln, da Folsäure *per se* eine ungünstige Speicherform darstellen könnte.

Der auffälligste Unterschied zwischen den Experimenten war, dass ohne Folsäuresupplementation dem Methylierungspathway gegenüber dem DNA-Synthesepathway Priorität eingeräumt wird. Im Gegensatz dazu war bei Supplementation der DNA-Synthesepathway bevorzugt. Dies konnte man anhand der Expressionen der Enzyme CBS-1 und TS beobachten. Wenn sich das Homocysteinlevel durch Folsäuresupplementation senkt, muss die Zelle weniger Energie in den Abbau des Homocysteins investieren und kann dem DNA-Synthesepathway mehr Substrat zukommen lassen. Die beiden Pathways konkurrieren um die Substrate 5,10-Me-THF und 10-Formyl-THF.

## *4.5 Interpretation der RNAi der METR-1 Metabolitenmessung*

Die Akkumulation des SAH und Homocysteins lässt sich durch den Effekt des Silencing der *metr-1* erklären. Durch die geringere Remethylation durch die Methioninsynthase erhöhen sich die Zellpools an Homocystein. Dieses wird über die CBS-1 abgebaut, was die höheren Levels an Cystathionin erklärt. Da die Levels an SAM in beiden Populationen gleich waren, muss die Frage gestellt werden, ob Methionin bei einer verringerten Eigensynthese vermehrt aus der Nahrung in die Zelle gelangt.

Die Ergebnisse aus der Metabolitenmessung scheinen die Annahmen aus den RNAi Experimenten zu bestätigen.

## *4.6 SNPs und Folsäure Supplementierung*

Die Frage, ob eine Folsäuresupplementation bei Vorhandensein eines SNPs des Folsäurestoffwechsels sinnvoll ist, lässt sich aufgrund der Ergebnisse teilweise beantworten. Dabei muss man beachten, dass RNAi und ein Polymorphismus nicht gleichzusetzen sind und die Übertragung von Ergebnissen aus *C. elegans* auf den Menschen unter Umständen problematisch sein kann, da es sich um unterschiedliche Organismen handelt.

Eine Folsäuresupplementation bei einer verringerten Aktivität der MTHFR senkt die Homocysteinlevels. Aufgrund der Ergebnisse könnte es aber sein, dass dabei dem DNA-Synthesezyklus in der Zelle mehr Priorität zugeordnet wird, was die Beobachtung einer erhöhten Kolorektaltumorinzidenz bei Folsäureanreicherung untermauern könnte. Bei einem SNP der Methioninsynthase könnte diese Annahme aufgrund der gemessenen Ergebnisse ebenfalls zutreffen.

# 5. Zusammenfassung

Ziel dieser Masterarbeit war es, die molekularen Regulations- und Adaptionsmechanismen im Folsäurestoffwechsel im Hinblick auf verminderte Enzymaktivitäten wie sie z.B. bei SNPs (Single Nucleotide Polymorphismen) aufreten zu untersuchen. Dazu wurden Gene mittels RNA-interference im genetischen Modellorgansimus *C. elegans* gesilenced und anschließend Genexpressionsmuster und Metabolite mittels quantitativer Realtime-PCR und LC-Massenspektrometrie analysiert.
Silencing der Gene die für METR-1, MTHF-1 und DHFR-1 kodieren führte zu erhöhter Expression der CBS-1, die kompensatorisch Homocystein zu Cystathionin abbaut. Gleichzeitig führte ein mRNA Knockdown der METR-1 im Nematoden zu höheren Homocystein- sowie deutlich höheren SAH- und Cystathioninwerten gegenüber den Kontrollen. Die Werte für SAM blieben dabei konstant. Überdies waren beim METR-1, MTHF-1 und DHFR-1 mRNA Knockdown die Folsäuretransporter FOLT-1 und Y4C6.B5 stärker exprimiert um mehr Enzymsubstrat in Form von Folsäure in die Zellen zu transportieren.
RNAi der METR-1 und DHFR-1 resultierten in gesteigerter Expression der MTHF-1 mRNA. Die MTHF-1 nimmt eine zentrale Rolle als Schnittstelle zwischen DNA Synthese und Methylierungsreaktionen ein. Genexpressionsmuster in Folge eines METR-1 oder MTHF-1 mRNA Knockdowns lassen eine leichte Priorisierung des Homocystein abbauenden Methylierungspathways gegenüber dem DNA-Synthesepathway über die TYMS erkennen.
Bei Folsäuresupplementation priorisierten die Nematoden allerdings den DNA-Synthesepathway, was mit einer geringeren Aktivität der METR-1 und CBS-1 und einer erhöhten Aktivität der Y110A7A.4 einherging. Daher sollte eine Folsäuresupplementierung bei SNPs der MS und MTHFR sorgfältig abgewogen werden. Die Tatsache, dass der DNA-Synthesepathway durch Folsäuresupplementation stimuliert werden kann, unterstützt möglicherweise auch die Beobachtung einer steigenden Kolorektalkrebsinzidenz in Ländern, wo Grundnahrungsmittel mit Folsäure angereichert werden.
Diese Arbeit über die Analyse der Genexpressionsmuster und Metabolite im Modellorgansimus *C.elegans* gibt ein aufschlussreiches Gesamtbild um die Regualtionsmechanismen im Folsäurestoffwechsel genauer zu verstehen. Um die daraus

gewonnene Ergebnisse auf den Menschen anzuwenden müssten auch Überlegungen aus der Enzymkinetik einfließen sowie Proteinmengen bestimmt werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen jedoch, dass eine Folsäureanreicherung oder Supplementierung über einen längeren Zeitraum gegenüber ihrem Nutzen genau abgewogen werden sollten.

# 6. Literaturverzeichnis

**Austin, M.U., Liau, W.S., Balamurugan, K., Ashokkumar, B., Said, H.M., and LaMunyon, C.W.** (2010): Knockout of the folate transporter folt-1 causes germline and somatic defects in C. elegans. BMC developmental biology *10*, *46*.

**Azevedo, R.B., and Leroi, A.M.** (2001): A power law for cells. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *98*, *5699-5704*.

**Banka, S., Blom, H.J., Walter, J., Aziz, M., Urquhart, J., Clouthier, C.M., Rice, G.I., de Brouwer, A.P., Hilton, E., Vassallo, G., *et al.*** (2011): Identification and characterization of an inborn error of metabolism caused by dihydrofolate reductase deficiency. American journal of human genetics *88*, *216-225*.

**Belanger-Quintana, A., Burlina, A., Harding, C.O., and Muntau, A.C.** (2011): Up to date knowledge on different treatment strategies for phenylketonuria. Molecular genetics and metabolism *104 Suppl*, *S19-25*.

**Bergmann, A.K., Sahai, I., Falcone, J.F., Fleming, J., Bagg, A., Borgna-Pignati, C., Casey, R., Fabris, L., Hexner, E., Mathews, L., *et al.*** (2009): Thiamine-responsive megaloblastic anemia: identification of novel compound heterozygotes and mutation update. The Journal of pediatrics *155*, *888-892 e881*.

**Blom, H.J., and Smulders, Y.** (2011): Overview of homocysteine and folate metabolism. With special references to cardiovascular disease and neural tube defects. Journal of inherited metabolic disease *34*, *75-81*.

**Brenner, S.** (1974): The genetics of Caenorhabditis elegans. Genetics *77*, *71-94*.

**Brzezinska, A., Winska, P., and Balinska, M.** (2000): Cellular aspects of folate and antifolate membrane transport. Acta biochimica Polonica *47*, *735-749*.

**Consortium, C.e.S.** (1998): Genome sequence of the nematode C. elegans: a platform for investigating biology. Science *282*, *2012-2018*.

**Culetto, E., and Sattelle, D.B.** (2000): A role for Caenorhabditis elegans in understanding the function and interactions of human disease genes. Human molecular genetics *9*, *869-877*.

**Curtin, K., Samowitz, W.S., Ulrich, C.M., Wolff, R.K., Herrick, J.S., Caan, B.J., and Slattery, M.L.** (2011): Nutrients in folate-mediated, one-carbon metabolism and the risk of rectal tumors in men and women. Nutrition and cancer *63*, *357-366*.

**Dhe-Paganon, S., Syeda, F., and Park, L.** (2011): DNA methyl transferase 1: regulatory mechanisms and implications in health and disease. International journal of biochemistry and molecular biology *2*, *58-66*.

**Engel, S.M., Olshan, A.F., Siega-Riz, A.M., Savitz, D.A., and Chanock, S.J.** (2006): Polymorphisms in folate metabolizing genes and risk for spontaneous preterm and small-for-gestational age birth. American journal of obstetrics and gynecology *195*, *1231 e1231-1211*.

**Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E., and Mello, C.C.** (1998): Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in Caenorhabditis elegans. Nature *391*, *806-811*.

**Georgianna, W.E., and Young, D.D.** (2011): Development and utilization of non-coding RNA-small molecule interactions. Organic & biomolecular chemistry *9*, *7969-7978*.

**Greenberg, J.A., Bell, S.J., Guan, Y., and Yu, Y.H.** (2011): Folic Acid supplementation and pregnancy: more than just neural tube defect prevention. Reviews in obstetrics and gynecology *4*, *52-59*.

**Guiochon, G.** (1972): Gas-liquid chromatography in biochemical analysis: a review of recent trends in equipment. The Biochemical journal *130*, *56P*.

**Hansen, L.H., Knudsen, S., and Sorensen, S.J.** (1998): The effect of the lacY gene on the induction of IPTG inducible promoters, studied in Escherichia coli and Pseudomonas fluorescens. Current microbiology *36*, *341-347*.

**Heid, C.A., Stevens, J., Livak, K.J., and Williams, P.M.** (1996): Real time quantitative PCR. Genome research *6*, *986-994*.

**Honein, M.A., Paulozzi, L.J., Mathews, T.J., Erickson, J.D., and Wong, L.Y.** (2001): Impact of folic acid fortification of the US food supply on the occurrence of neural tube defects. JAMA : the journal of the American Medical Association *285*, *2981-2986*.

**Jala, V.R., Ambili, M., Prakash, V., Rao, N.A., and Savithri, H.S.** (2003): Disruption of distal interactions of Arg 262 and of substrate binding to Ser 52 affect catalysis of sheep liver cytosolic serine hydroxymethyltransferase. Indian journal of biochemistry & biophysics *40*, *226-237*.

**Jemal, M., Almond, R., Ouyang, Z., and Teitz, D.** (1997): Negative ion electrospray high-performance liquid chromatography-mass spectrometry method development for determination of a highly polar

phosphonic acid/sulfonic acid compound in plasma. Optimization of ammonium acetate concentration and in-source collision-induced dissociation. Journal of chromatography B, Biomedical sciences and applications *703, 167-175.*
**Kamen, B.A., and Smith, A.K.** (2004): A review of folate receptor alpha cycling and 5-methyltetrahydrofolate accumulation with an emphasis on cell models in vitro. Advanced drug delivery reviews *56, 1085-1097.*
**Kuwabara, P.E., and O'Neil, N.** (2001): The use of functional genomics in C. elegans for studying human development and disease. Journal of inherited metabolic disease *24, 127-138.*
**Mason, J.B., Dickstein, A., Jacques, P.F., Haggarty, P., Selhub, J., Dallal, G., and Rosenberg, I.H.** (2007): A temporal association between folic acid fortification and an increase in colorectal cancer rates may be illuminating important biological principles: a hypothesis. Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology *16, 1325-1329.*
**McEwan, D.L., Weisman, A.S., and Hunter, C.P.** (2012): Uptake of extracellular double-stranded RNA by SID-2. Molecular cell *47, 746-754.*
**Napoli, C., Lemieux, C., and Jorgensen, R.** (1990): Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into Petunia Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans. The Plant cell *2, 279-289.*
**Nguyen, J., and Szoka, F.C.** (2012): Nucleic acid delivery: the missing pieces of the puzzle? Accounts of chemical research *45, 1153-1162.*
**Nguyen, T.P., and Clarke, C.F.** (2012): Folate status of gut microbiome affects Caenorhabditis elegans lifespan. BMC biology *10, 66.*
**Nicholson, A.W.** (2012): Dissecting human dicer: some assembly required. Journal of molecular biology *422, 464-465.*
**Okano, M., Bell, D.W., Haber, D.A., and Li, E.** (1999): DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. Cell *99, 247-257.*
**Oussalah, A., Gueant, J.L., and Peyrin-Biroulet, L.** (2011): Meta-analysis: hyperhomocysteinaemia in inflammatory bowel diseases. Alimentary pharmacology & therapeutics *34, 1173-1184.*
**Pejchal, R., Campbell, E., Guenther, B.D., Lennon, B.W., Matthews, R.G., and Ludwig, M.L.** (2006): Structural perturbations in the Ala --> Val polymorphism of methylenetetrahydrofolate reductase: how binding of folates may protect against inactivation. Biochemistry *45, 4808-4818.*
**Petrovic, M., Hernando, M.D., Diaz-Cruz, M.S., and Barcelo, D.** (2005): Liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the analysis of pharmaceutical residues in environmental samples: a review. Journal of chromatography A *1067, 1-14.*
**Pfaffl, M.W., Tichopad, A., Prgomet, C., and Neuvians, T.P.** (2004): Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper--Excel-based tool using pair-wise correlations. Biotechnol Lett *26, 509-515.*
**Qiu, A., Jansen, M., Sakaris, A., Min, S.H., Chattopadhyay, S., Tsai, E., Sandoval, C., Zhao, R., Akabas, M.H., and Goldman, I.D.** (2006): Identification of an intestinal folate transporter and the molecular basis for hereditary folate malabsorption. Cell *127, 917-928.*
**Sanaker, P.S., Toompuu, M., Hogan, V.E., He, L., Tzoulis, C., Chrzanowska-Lightowlers, Z.M., Taylor, R.W., and Bindoff, L.A.** (2010): Differences in RNA processing underlie the tissue specific phenotype of ISCU myopathy. Biochimica et biophysica acta *1802, 539-544.*
**Sanchez, E.J., Lewis, K.M., Danna, B.R., and Kang, C.** (2012): High-capacity Ca2+ binding of human skeletal calsequestrin. The Journal of biological chemistry *287, 11592-11601.*
**Schnell, J.R., Dyson, H.J., and Wright, P.E.** (2004): Structure, dynamics, and catalytic function of dihydrofolate reductase. Annual review of biophysics and biomolecular structure *33, 119-140.*
**Seinost, G., Renner, W., Brodmann, M., Winkler, M., Koppel, H., and Pilger, E.** (2000): C677T mutation in the methylene tetrahydrofolate reductase gene as a risk factor for venous thrombotic disease in Austrian patients. Thrombosis research *100, 405-407.*
**Shan, G.** (2010): RNA interference as a gene knockdown technique. The international journal of biochemistry & cell biology *42, 1243-1251.*
**Sie, K.K., Medline, A., van Weel, J., Sohn, K.J., Choi, S.W., Croxford, R., and Kim, Y.I.** (2011): Effect of maternal and postweaning folic acid supplementation on colorectal cancer risk in the offspring. Gut *60, 1687-1694.*
**Smith, A.D., Kim, Y.I., and Refsum, H.** (2008): Is folic acid good for everyone? The American journal of clinical nutrition *87, 517-533.*

**Steegers-Theunissen, R.P., Boers, G.H., Blom, H.J., Trijbels, F.J., and Eskes, T.K.** (1992): Hyperhomocysteinaemia and recurrent spontaneous abortion or abruptio placentae. Lancet *339*, *1122-1123.*

**Suitor, C.W., and Bailey, L.B.** (2000): Dietary folate equivalents: interpretation and application. Journal of the American Dietetic Association *100*, *88-94.*

**Ulrich, C.M., Kampman, E., Bigler, J., Schwartz, S.M., Chen, C., Bostick, R., Fosdick, L., Beresford, S.A., Yasui, Y., and Potter, J.D.** (2000): Lack of association between the C677T MTHFR polymorphism and colorectal hyperplastic polyps. Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology *9*, *427-433.*

**Van Guelpen, B., Hultdin, J., Johansson, I., Hallmans, G., Stenling, R., Riboli, E., Winkvist, A., and Palmqvist, R.** (2006): Low folate levels may protect against colorectal cancer. Gut *55*, *1461-1466.*

**Vignal, A., Milan, D., SanCristobal, M., and Eggen, A.** (2002): A review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics. Genetics, selection, evolution : GSE *34*, *275-305.*

**Virk, B., Correia, G., Dixon, D.P., Feyst, I., Jia, J., Oberleitner, N., Briggs, Z., Hodge, E., Edwards, R., Ward, J., *et al.*** (2012): Excessive folate synthesis limits lifespan in the C. elegans: E. coli aging model. BMC biology *10*, *67.*

**Wilson, R.D., Johnson, J.A., Wyatt, P., Allen, V., Gagnon, A., Langlois, S., Blight, C., Audibert, F., Desilets, V., Brock, J.A., *et al.*** (2007): Pre-conceptional vitamin/folic acid supplementation 2007: the use of folic acid in combination with a multivitamin supplement for the prevention of neural tube defects and other congenital anomalies. Journal of obstetrics and gynaecology Canada : JOGC = Journal d'obstetrique et gynecologie du Canada : JOGC *29*, *1003-1026.*

**Winska, P., Golos, B., Ciesla, J., Zielinski, Z., Fraczyk, T., Walajtys-Rode, E., and Rode, W.** (2005): Developmental arrest in Caenorhabditis elegans dauer larvae causes high expression of enzymes involved in thymidylate biosynthesis, similar to that found in Trichinella muscle larvae. Parasitology *131*, *247-254.*

**Wong, M.L., and Medrano, J.F.** (2005): Real-time PCR for mRNA quantitation. BioTechniques *39*, *75-85*.

**Wu, K., Platz, E.A., Willett, W.C., Fuchs, C.S., Selhub, J., Rosner, B.A., Hunter, D.J., and Giovannucci, E.** (2009): A randomized trial on folic acid supplementation and risk of recurrent colorectal adenoma. The American journal of clinical nutrition *90*, *1623-1631*.

**Zhou, Y.H., Tang, J.Y., Wu, M.J., Lu, J., Wei, X., Qin, Y.Y., Wang, C., Xu, J.F., and He, J.** (2011): Effect of folic acid supplementation on cardiovascular outcomes: a systematic review and meta-analysis. PloS one *6*, *e25142.*

**Zhuang, J.J., and Hunter, C.P.** (2012): RNA interference in Caenorhabditis elegans: uptake, mechanism, and regulation. Parasitology *139*, *560-573.*

# 7. Anhang

## 7.1 Abbildungsverzeichnis

**Abbildung 1:** http://www.chm.bris.ac.uk/motm/folic-acid/folich.htm

**Abbildung 2:** Public Domain

**Abbildung 3:** Robertson et al. (2005): DNA methylation and human disease. Nature Reviews Genetics 6, 597-610

**Abbildung 4:** Blom and Smulders 2011: Overview of homocysteine and folate metabolism. J Inherit Metab Dis.]

**Abbildung 5:**

http://www.wormatlas.org/hermaphrodite/introduction/Introframeset.html

**Abbildung 6:** Stuart K. Kim (2001): *C. elegans*: Mining the functional genomic landscape. Nature Reviews Genetics 2, 681-689 doi:10.1038/35088523

**Abbildung 7:**

http://1.bp.blogspot.com/_NHHTvTVxCmc/SwtVnJU_dPI/AAAAAAAAAfc/1qzbX8spyDw/s1600/lac-operon.gif

**Abbildung 8:** Public Domain

**Abbildung 9:** Robinson R (2004): RNAi Therapeutics: How Likely, How Soon? PLoS Biology Vol. 2, No. 1, e28

**Abbildung 10:** McEwan et al. (2012): Uptake of Extracellular Double-Stranded RNA by SID-2. Molecular Cell 47, 746–754

**Abbildung 11:** Wong et Medrano (2005): Real-time PCR for mRNA quantification. BioTechniques V39, 1

**Abbildung 12:** http://www.openwetware.org/wiki/Image:L4440.tif

## 7.2 Messdaten

*Grafik 2:*

| | **METR-1** | **MTHF-1** | **DHFR-1** | **FOLT-1** | **Y4C6.B5** | **CBS-1** | **Y110A7A.4** |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **RNAi METR-1** | 0,249 | 1,329 | 0,243 | 1,027 | 1,782 | 2,082 | 0,339 |

*Grafik 3:*

| | **METR-1** | **MTHF-1** | **DHFR-1** | **FOLT-1** | **Y4C6.B5** | **CBS-1** | **Y110A7A.4** |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **RNAi MTHF-1** | 0,852 | 0,482 | 0,615 | 1,058 | 4,376 | 1,430 | 0,615 |

*Grafik 4:*

| | METR-1 | MTHF-1 | DHFR-1 | FOLT-1 | CBS-1 | Y110A7A.4 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **RNAi MTHF-1** | 2,474 | 0,867 | 1,648 | 4,115 | 0,578 | 1,068 |

*Grafik 5:*

| | METR-1 | MTHF-1 | DHFR-1 | FOLT-1 | Y4C6.B5 | CBS-1 | Y110A7A.4 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **RNAi DHFR-1** | 0,423 | 1,349 | 0,728 | 2,550 | 4,487 | 4,199 | 0,591 |

*Grafik 6:*

| | METR-1 | MTHF-1 | DHFR-1 | FOLT-1 | Y4C6.B5 | CBS-1 | Y110A7A.4 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **RNAi DHFR-1** | 6,295 | 2,0615 | 0,551 | 0,595 | 1,295 | 4,392 | 0,738 |

*Grafik 7:*

| | METR-1 | MTHF-1 | DHFR-1 | FOLT-1 | Y4C6.B5 | CBS-1 | Y110A7A.4 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **RNAi METR-1** | 1,705 | 50,527 | 0,393 | 0,849 | 0,676 | 2,435 | 0,691 |
| **RNAi METR-1 FS** | 0,947 | 2,052 | 0,732 | 2,907 | 1,145 | 1,615 | 1,150 |

*Grafik 8:*

| | METR-1 |
|---|---|
| **RNAi METR-1** | 2,322 |
| **RNAi METR-1 FS** | 0,963 |

*Grafik 9:*

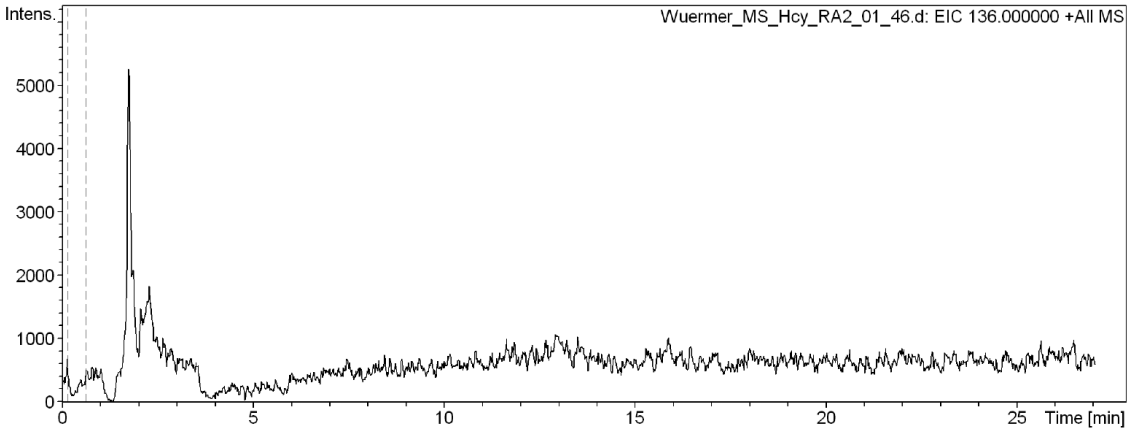
| | METR-1 | MTHF-1 | DHFR-1 | FOLT-1 | Y4C6.B5 | CBS-1 | Y110A7A.4 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **RNAi MTFR-1** | 4,513 | 1,170 | 1,315 | 1,648 | 1,003 | 0,721 | 0,982 |
| **RNAi MTFR-1 FS** | 3,185 | 0,804 | 1,327 | 1,968 | 1,508 | 0,624 | 1,260 |

*Grafik 10:*

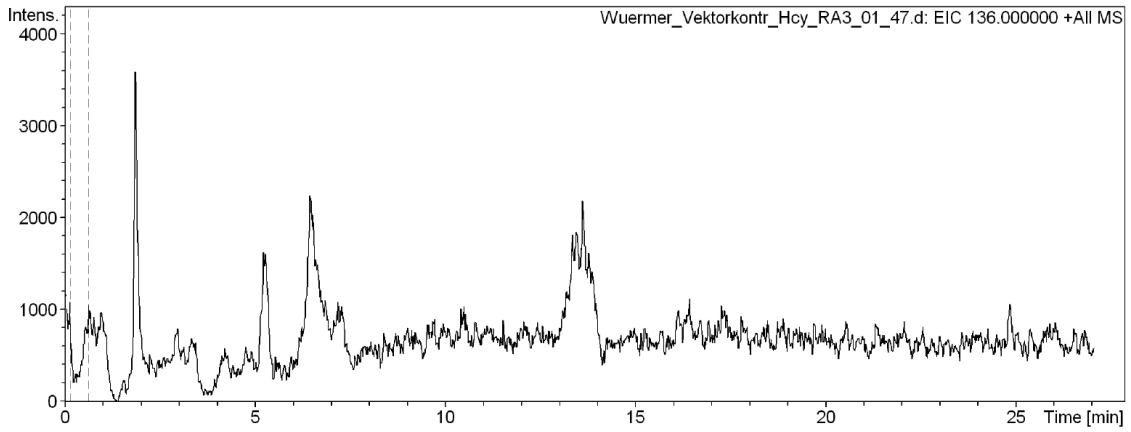
| | METR-1 | MTHF-1 | DHFR-1 | FOLT-1 | Y4C6.B5 | CBS-1 | Y110A7A.4 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **RNAi DHFR-1** | 0,999 | 1,529 | 1,038 | 1,854 | 1,712 | 1,137 | 1,249 |
| **RNAi DHFR-1 FS** | 0,963 | 1,730 | 1,225 | 1,427 | 1,786 | 1,379 | 1,217 |

## 7.3 Diagramme Massenspektrometrie

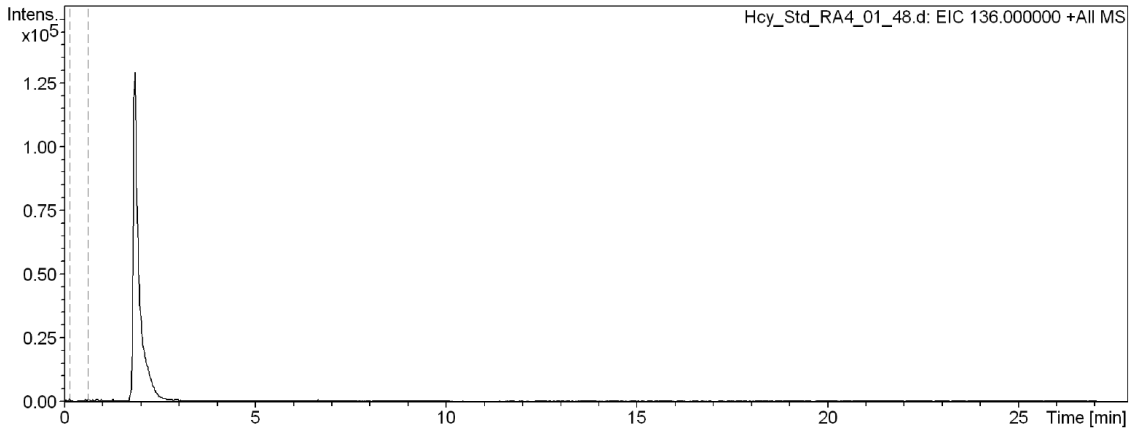
*Homocystein*



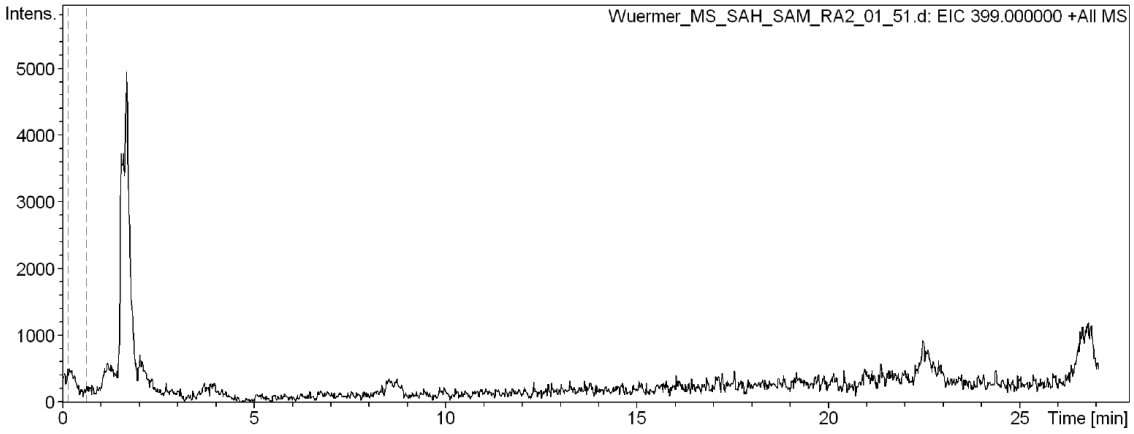

*Homocystein Vektorkontrolle*



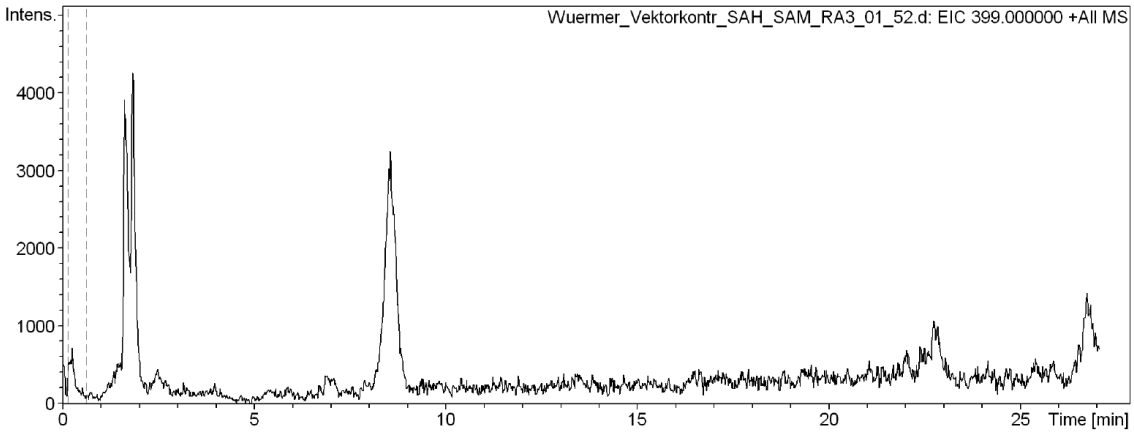

*Homocystein Standard*



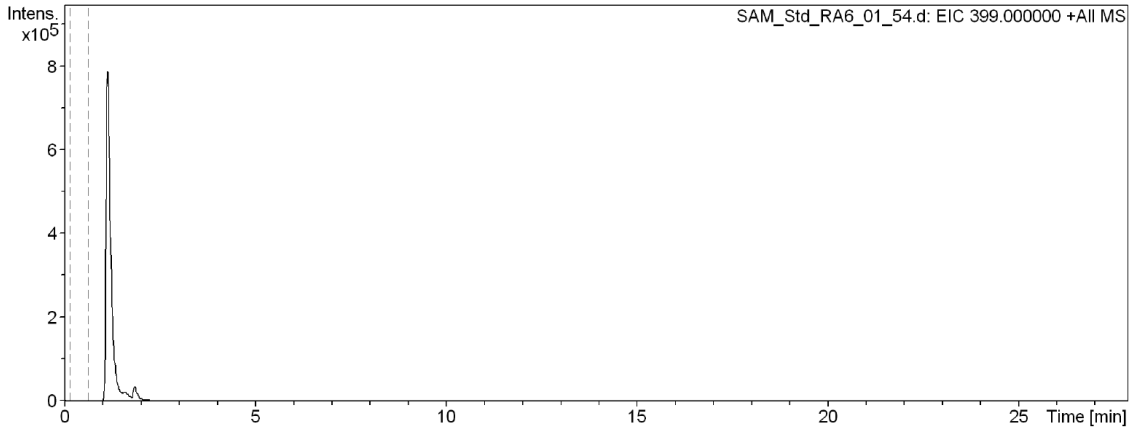
*S-adenosyl Methionin*



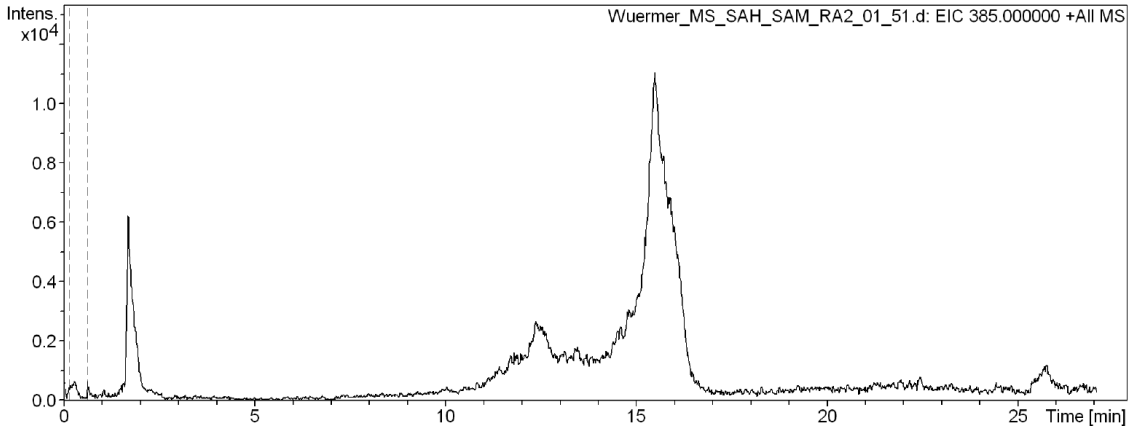

*S-adenosyl Methionin Vektorkontrolle*



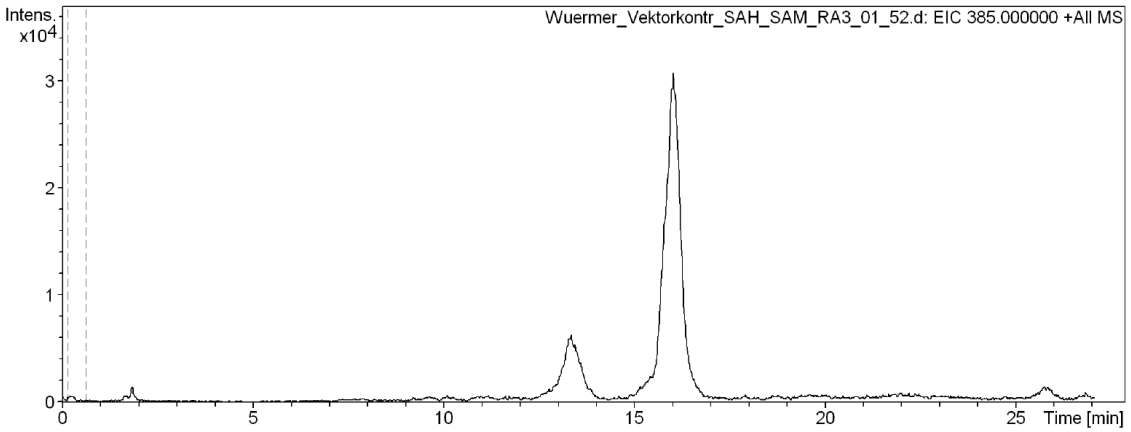

*S-adenosyl Methionin Standard*



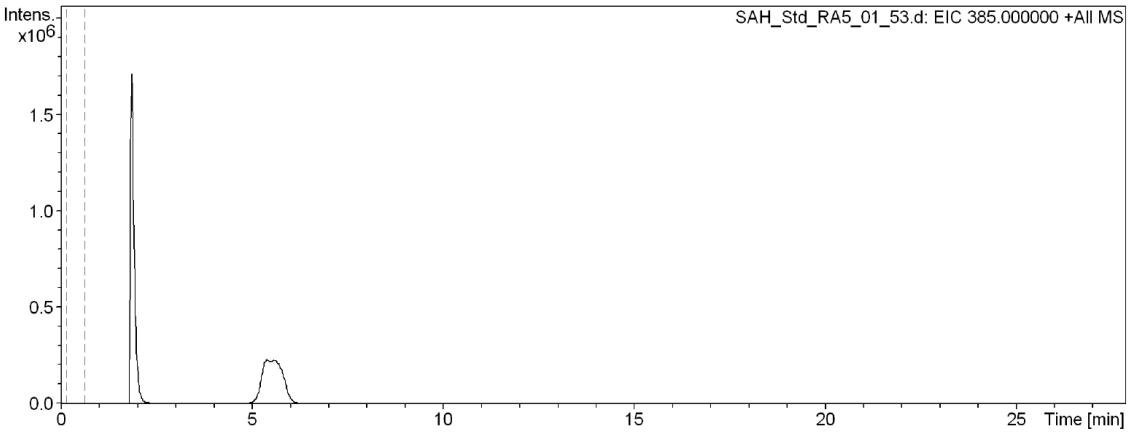
*S-adenosyl Homocystein*



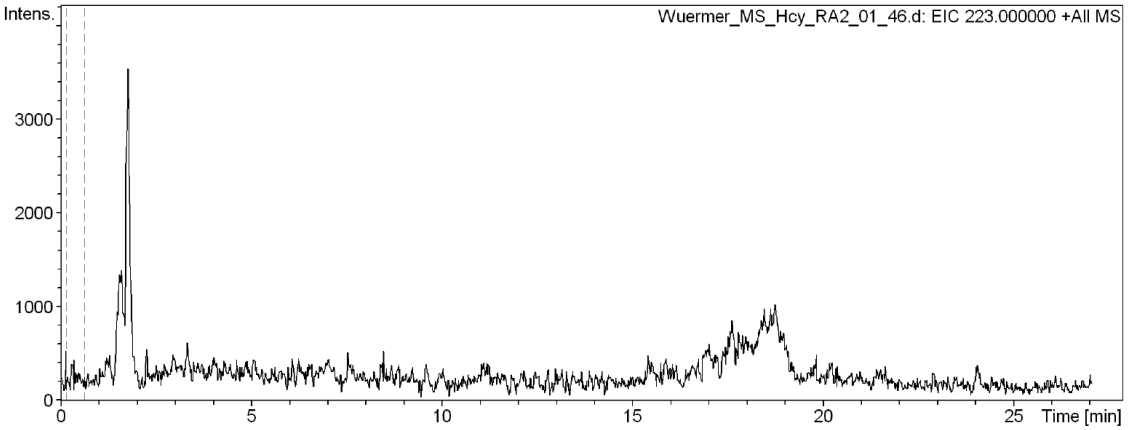

*S-adenosyl Homocystein Vektorkontrolle*



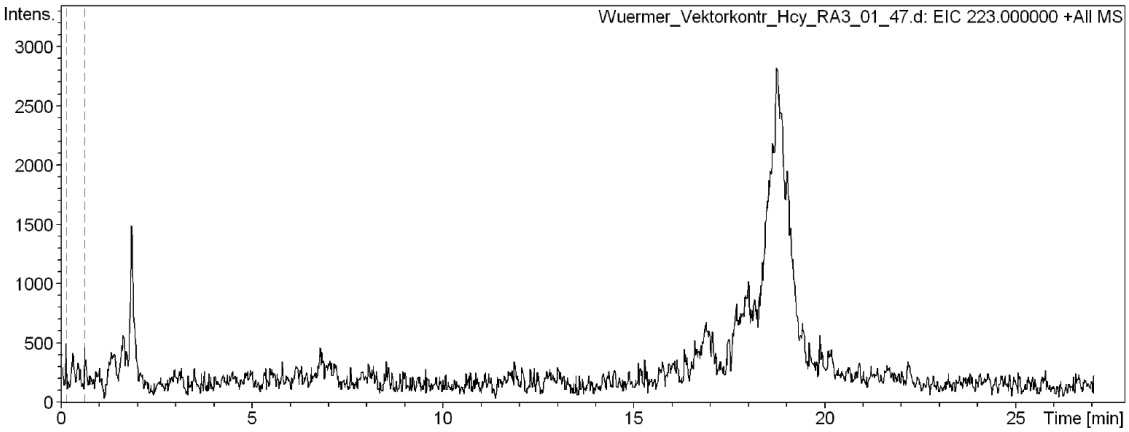

*S-adenosyl Homocystein Standard*



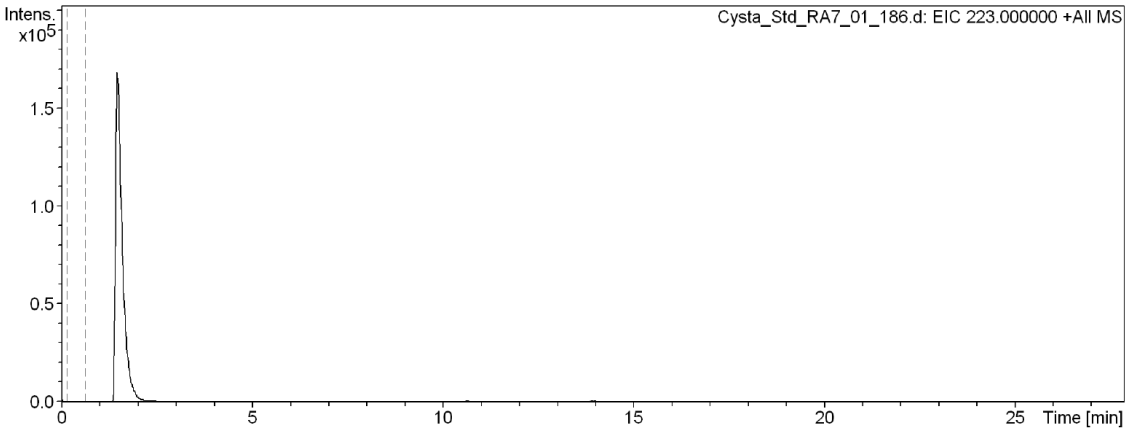
*Cystathionin*




*Cystathionin Vektorkontrolle*




*Cystathionin Standard*

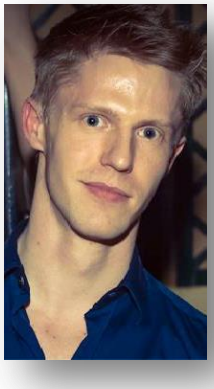


## 7.4 Abkürzungen

| | |
|---|---|
| **Bp** | Basenpaar Länge |
| **C. elegans** | Caenorhabditis elegans |
| **RNAi** | RNA Interference |
| **dsRNA** | Double-strain Ribonucleic acid |
| **IPTG** | Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside |
| **siRNA** | Silencing RNA |
| **miRNA** | Micro RNA |
| **RISC** | RNA-induced silencing complex |
| **RNAse** | Ribonukleinase |
| **mRNA** | Messenger RNA |
| **NTC** | No Template Control |
| **FOLT-1** | Folate Transporter 1 |
| **5-Me-THF** | 5-Methyl-Tetrahydrofolat |
| **5,10-Me-THF** | 5,10-Methyl-Tetrahydrofolat |
| **DHFR** | Dihydrofolat Reduktase |
| **THF** | Tetrahydrofolat |
| **PCFT** | Proton coupled Folate Transporter |
| **DHF** | Dihydrofolat |
| **MTHFR** | Methyltetrahydrofolat Reduktase |
| **RFC** | Reduced Folate Carrier |
| **TYMS** | Thymidilat-Synthase |
| **ISCU** | Iron-Sulfur Cluster Enzyme |
| **ABCD4** | ATP-binding cassette sub-family D4 |
| **SMX** | Sulfamethoxazol |
| **CASQ-1** | Calsequestrin |
| **FRα** | Folate Receptor Alpha |
| **SHMT** | Serin-Hydroxymethyltransferase |
| **dUMP** | Desoxyuridin Monophosphat |
| **dTMP** | Desoxythymidin Monophosphat |
| **MS** | Methioninsynthase |

| | |
|---|---|
| **CBS-1** | Cystathionin Beta Synthase |
| **MS** | Massenspektrometrie |
| **SAM** | S-Adenosyl Methionin |
| **SAH** | S-Adenosyl Homocystein |
| **DNMT** | DNA Methyltransferase |
| **SNP** | Single Nucleotide Polymorphism |
| **PCR** | Polymerase Chain Reaction |
| **qPCR** | Quantitative PCR |
| **RT** | Reverse Transcription |
| **RPM** | Rounds per minute |
| **gDNA** | Genomic DNA |
| **cDNA** | Complementary DNA |
| **LC** | Liquid Chromatography |
| **HPLC** | High Pressure Liquid Chromatography |
| **Ct** | Cycle Threshold |
| **ESI** | Electrospray-Ionisation |
| **$KH_2PO_4$** | Kaliumdihydrophosphat |
| **$MgSO_4$** | Magnesiumsulfat |
| **NaCl** | Natriumchlorid |
| **$Na_2HPO_4$** | Dinatriumhydrochlorid |
| **KOH** | Kaliumhydroxid |
| **NaOCl** | Natriumhypochlorit |
| **$KH_2PO_4$** | Kaliumdihydrogenphosphat |
| **$K_2HPO_4$** | Dikaliumhydrogenphosphat |
| **$CaCl_2$** | Kalzium-Dichlorid |
| **NGM** | Nematode Growth Medium |

# Curriculum vitae



**FUHRMANN Thomas, BSc.**
Pappenheimgasse 45
A-1200 Vienna, Austria

Date of Birth: 1986-09-28 in Vienna
Citizenship: Austria
Mobile: +43 676 722 91 90
E-Mail: thomas-fuhrmann@chello.at

**Occupation**

Masters student of Nutritional Sciences at the University of Vienna
Master's Thesis*: "Molekulare Regulations- und Adaptionsmechanismen im Folsäurestoffwechsel von C. elegans"*
Teaching Assistant for the Food Chemistry Lab Courses (University of Vienna)
Employee for the *Vienna Health Improvement Agency (Wiener Gesundheitsförderung - WiG)*

**Education**

*10/2011 – 06/2013 Master's Degree* in Nutritional Sciences at the University of Vienna
*01/2010 - 06/2010 Exchange Semester* in Kuopio, Finland (Master of Public Health, ERASMUS)
*10/2007 - 06/2011 Bachelor's Degree* in Nutritional Sciences at the University of Vienna
*10/2006 - 06/2007 Law School* of the University of Vienna

**Practical Experience**

Since 2012 *Teaching Assistant* at the University of Vienna (Flame Photometry)
September 2012 Employee at the annual Congress of the *Austrian Nutrition Society*
March/July 2012 Internship at the University of Vienna: *Department Emerging Focus Nutrigenomics*
February 2012 Internship at the AKH Hospital Vienna (PET-Center): *Radiopharmacy*
May 2011 Internship at the *Austrian Nutrition Society (ÖGE)*
July 2010 Employee for the *Diaplant Study* at the Dept. of Nutritional Sciences, Vienna
July 2009 Internship at *Staud's Vienna*
June 2009 Internship at the AKH Hospital Vienna: *Event* "*Nutritionday 2009*"
February 2009 Internship at the *GUM Symposium 2009* in Vienna
Sept./Oct. 2007-2013 Employee for the Vienna CHD Event (Wiener Herz-Kreislauf-Event)

**Additional Information**

Practical Experience with *Realtime-PCR, PCR, Polyacrylamide gel electrophoresis, restriction enzyme digest, C. elegans cultivation and handling, Bacteria cultivation, Flame Photometry, HPLC and Mass Spectrometry*
Additional Experience and internships in the *Public Health Field*
English: TOEFL Score 108/120
Spanish: Niveau B1
French: Niveau B1

## Erklärung

Ich, Thomas Fuhrmann, erkläre hiermit diese Masterarbeit selbstständig verfasst und keine anderen Quellen als die angegebenen benutzt zu haben. Ich versichere, alle Ergebnisse aus anderen Arbeiten als Zitate angeführt zu haben.

---

Datum/Unterschrift