



universität  
wien

# DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

Einführung von *Caenorhabditis elegans* (MAUPAS, 1900)  
als Modellorganismus für molekularbiologische Arbeiten  
am Beispiel Folsäure

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Naturwissenschaften (Mag. rer.nat.)

Verfasserin:	Ulrike Stöger
Matrikel-Nummer:	8903784
Studienrichtung /Studienzweig (lt. Studienblatt):	Biologie / Zoologie
Betreuerinnen:	Ao. Univ.-Prof. Dr. Waltraud Klepal Univ.-Ass. Dr. Elisabeth Rudolph

Wien, im Oktober 2008







*Was lange währt, wird endlich gut.*

*gewidmet meinen Töchtern Anne und Sophie*



## *Danksagung*

*Ich möchte all jenen danken, die  
mir diese Arbeit ermöglicht haben,  
mir mit Rat und Tat zur Seite standen,  
mich gefordert und unterstützt haben,  
für mich da waren.*



**INHALTSVERZEICHNIS:**

<b>1. Einleitung und Fragestellung</b>	1
<b>2. <i>Caenorhabditis elegans</i></b>	3
2.1. Biologie und Lebensweise von <i>C. elegans</i>	3
2.2. Anatomie von <i>C. elegans</i>	5
2.3. Entwicklungszyklus von <i>C. elegans</i>	12
2.4. Forschungsgeschichte von <i>C. elegans</i>	14
2.5. <i>C. elegans</i> als Modellorganismus in der aktuellen molekularbiologischen Forschung	18
2.5.1. Aktuelle Forschung und Informationsquellen	18
2.6. Untersuchungsparameter Lebensdauer, Körpergröße, Nachkommenschaft und Motilität – die verschiedenen mutanten Phänotypen von <i>C. elegans</i>	20
<b>3. Ausgewählte Modellorganismen der Molekularbiologie versus <i>C. elegans</i></b>	23
3.1. Vorteile von <i>C. elegans</i>	23
3.2. <i>Mus musculus</i>	24
3.2.1. <i>M. musculus</i> als Modellorganismus	24
3.2.2. Die Modellorganismen <i>M. musculus</i> und <i>C. elegans</i> im Vergleich	26
3.3. <i>Drosophila melanogaster</i>	27
3.3.1. <i>D. melanogaster</i> als Modellorganismus	27
3.3.2. Die Modellorganismen <i>D. melanogaster</i> und <i>C. elegans</i> im Vergleich	28
3.4. <i>Escherichia coli</i>	29
3.4.1. <i>E. coli</i> als Modellorganismus	29
3.4.2. Die Modellorganismen <i>E. coli</i> und <i>C. elegans</i> im Vergleich	30
<b>4. Folsäure</b>	31
4.1. Folsäure bei <i>Homo sapiens</i>	31
4.1.1. Struktur	31
4.1.2. Vorkommen und Verfügbarkeit	32
4.1.3. Resorption, Metabolismus und Funktion	35
4.1.3.1. Anti – Aging – Wirkung	38
4.1.3.2. Mangelerscheinungen	39
4.1.4. Der Folsäure – Stoffwechsel und die Rolle des MTHFR – Enzyms	41
4.2. Die Rolle des MTHFR – Enzyms bei <i>C. elegans</i>	42

4.3. Die Bedeutung der Folsäure bei <i>C. elegans</i>	45
4.3.1. Escherichia coli K 12	45
4.3.2. Flüssigmedium	45
4.3.3. RNA - Interferenz	46
<b>5. Praktische Arbeiten zur Etablierung von <i>C. elegans</i> als Modellorganismus im Labor</b>	<b>49</b>
5.1. Material	49
5.1.1. Chemikalien	49
5.1.2. Geräte	50
5.1.3. Verbrauchsmaterialien	51
5.1.4. Organismen	51
5.1.4.1. <i>C. elegans</i>	51
5.1.4.2. <i>Escherichia coli</i> OP 50	52
5.1.5. Herstellung der Wachstumsmedien	52
5.1.5.1. NGM (Nematode Growth Medium)	52
5.1.5.2. LB Agar	52
5.1.5.3. LB Bouillon	53
5.2. Methoden	53
5.2.1. Ansetzen der OP 50 - Kultur	53
5.2.2. Kultivierung von <i>C. elegans</i>	54
5.2.3. Synchronisation der <i>C. elegans</i> Embryos	55
5.2.4. Lebensdauer von <i>C. elegans</i> (Lifespan)	56
5.2.5. Nachkommenzahl (Broodsize) und Schlüpfungserfolg von <i>C. elegans</i>	56
<b>6. Ergebnisse und Diskussion</b>	<b>59</b>
6.1. Lebensdauer von <i>C. elegans</i>	59
6.2. Nachkommenschaft von <i>C. elegans</i>	61
<b>7. Zusammenfassung</b>	<b>63</b>
<b>8. Summary</b>	<b>65</b>
<b>9. Anhang</b>	<b>67</b>
<b>10. Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen</b>	<b>73</b>
<b>11. Literatur</b>	<b>75</b>
<b>12. Curriculum Vitae</b>	<b>85</b>

## 1. Einleitung und Fragestellung

*Caenorhabditis elegans* ist ein Vertreter der Rhabditiden, die ihrerseits zur Gruppe der Nematoden gehören. Die Nematoden sind nicht nur die individuenreichste Metazoengruppe, sondern zeichnen sich auch durch ihre vielfältigen Lebensräume aus. Sie kommen freilebend im Sediment des Meeresbodens von der Tiefsee bis zur Küste, am Grunde von Süßgewässern aller Größen, in Moospolstern und im Boden vor. Die Individuendichte pro m<sup>2</sup> Wiese kann bis zu 20 Mio. Individuen betragen, das macht ungefähr 500 000 pro Fußtritt aus [LORENZEN, 2007]. Vier von fünf Tieren auf der Erde sind Nematoden [BARKER, 2004]. Einige von ihnen sind bekannt als Endoparasiten bei Menschen und Tieren. So werden 90% aller Menschen einmal im Leben von Nematoden, wie z.B. dem Haken- oder Madenwurm, befallen. Aber auch bei Pflanzen können sie gewaltige wirtschaftliche Schäden verursachen.

Die Nematoden sind aber auch eine sehr alte Tiergruppe. Sie haben sich schon im Präkambrium entwickelt und von den anderen Metazoen abgespalten. Ihre phylogenetische Einordnung gestaltet sich eher schwierig, da bis jetzt keine fossilen Verwandten gefunden wurden, und auch ihre Verwandtschaftsverhältnisse zu anderen Invertebraten sind ziemlich unklar.

Seit wenigen Jahrzehnten erhalten die Nematoden wissenschaftliche Aufmerksamkeit. Sydney Brenner führte *C. elegans* im Jahr 1965 als Versuchstier ein. Als Modellorganismus eignet sich *C. elegans* für die Beantwortung verschiedenster Fragestellungen, auch in Hinblick auf den menschlichen Stoffwechsel.

Die Folsäure ist als Nahrungsergänzungsmittel in aller Munde. Ihre Bedeutung in der frühen embryonalen Entwicklung des Menschen ist unumstritten. Aber auch im fortschreitenden Alter wird ihr eine sehr wichtige Funktion zugeschrieben, wobei die Auswirkungen und Mechanismen eines Folsäuredefizits noch nicht genau bekannt sind und ein Folsäuremangel vermutlich zu verschiedenen Folgeerkrankungen führen kann.

Ein wichtiges Enzym des menschlichen Folsäurekreislaufes ist die **Methyl-Tetra-Hydro-Folat-Reduktase** (in Folge kurz MTHFR genannt). *C. elegans* besitzt ein homologes Gen. Warum diese Tatsache diesen Nematoden für molekularbiologische Untersuchungen zu diesem Thema prädestiniert und wie seine Neueinführung am Emerging Focus Nutrigenomics des Departments für Ernährungswissenschaften der Universität Wien durchgeführt wurde bzw. wird ist Thema dieser Arbeit.



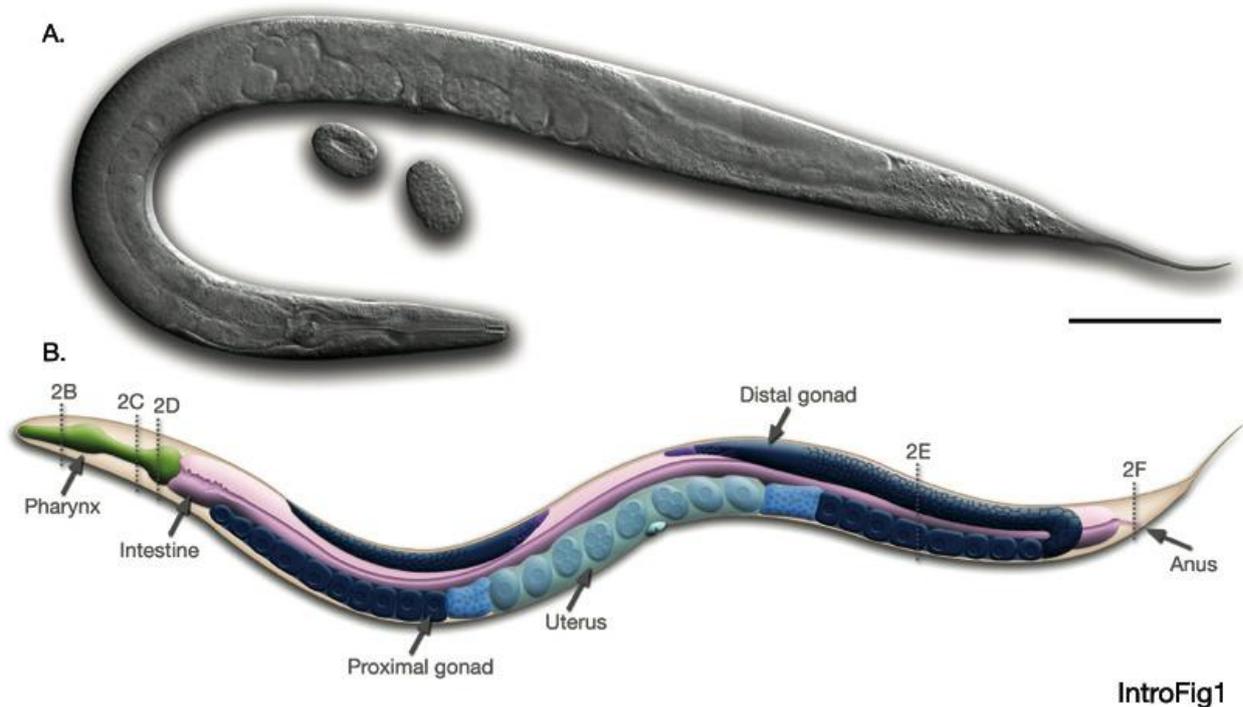
## 2. *Caenorhabditis elegans*

### 2.1. Biologie und Lebensweise von *C. elegans*

Der zur Gruppe der Rhabditida [LORENZEN, 2007] gehörende, freilebende Bodennematode *C. elegans* lebt in den gemäßigten Klimazonen. Sein Temperaturoptimum liegt zwischen +4°C und +30°C. Der Wurm ernährt sich von Bakterien, die totes organisches Material abbauen.

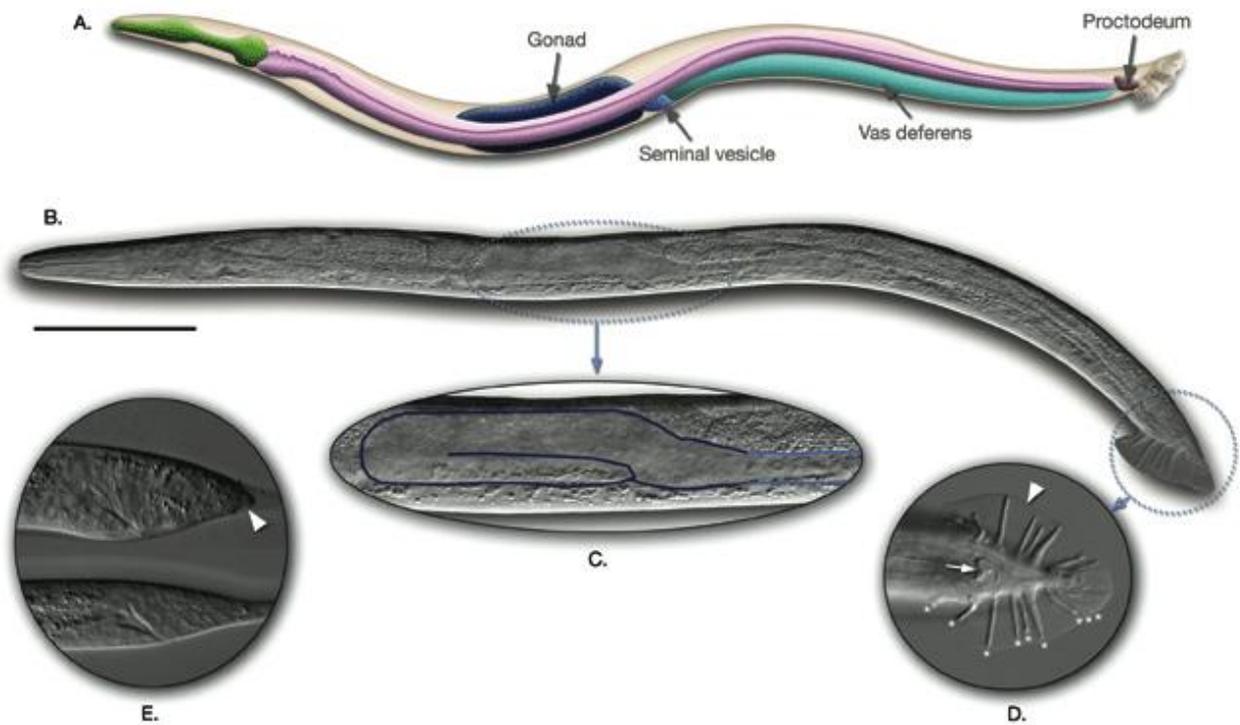
Das adulte Tier ist nur etwa 1 mm lang und erreicht einen Durchmesser von 65 µm. Die Tiere besitzen 6 Paar Autosomen und 1 Paar Geschlechtschromosomen. *C. elegans* hat einen Sexualdimorphismus, es gibt Hermaphroditen und Männchen. Die zwei Geschlechter haben einige unterschiedliche Merkmale.

Die **Hermaphroditen** (Abb.1) sind abgewandelte Weibchen, die vor der Oocyten – Produktion im vierten Larvalstadium [HERMAN, 2005] als fakultative Männchen Spermazellen produzieren und speichern, d.h. sie befruchten sich dann im adulten Weibchenstadium selbst. Ihre Geschlechtschromosomen sind als XX vorhanden. Äußerlich sind sie am spitz zulaufenden Schwanz und an der in der Körpermitte liegenden Geschlechtsöffnung zu erkennen. Ihr Körper besteht aus exakt 959 somatischen Zellen. Ein einziger Hermaphrodit kann innerhalb weniger Tage eine gesamte Population von Nachkommen produzieren [CORSI, 2006]. Bei Selbstbefruchtung produziert ein Tier im Laufe seines Lebens ca. 300 Nachkommen, kommt es allerdings zur geschlechtlichen Fortpflanzung steigt die Nachkommenschaft auf ca. 1000 Tiere an [STRANGE, 2006]. Dies begründet sich durch den zusätzlichen Versorgungsinput der männlichen Spermien.



**Abb. 1:** Hermaphrodit von *C. elegans*, laterale Ansicht von links. A – mikroskopische Aufnahme mit Hilfe eines Differential-Interferenzkontrast-Mikroskops. Zwei ovale Embryos liegen neben der Vulva-Öffnung des Tieres. B – Zeichnung mit den anatomischen Merkmalen eines Hermaphroditen: Pharynx (grün), Intestinum (lila), Gonade (dunkelblau), Uterus (hellblau). Maßstab Balken entspricht 0,1mm. (www.wormatlas.org)

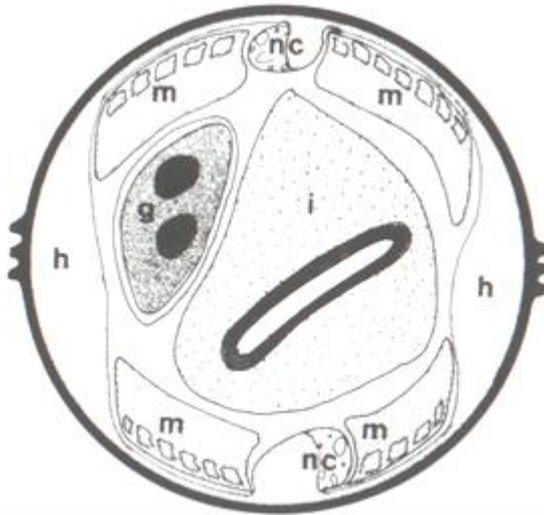
Die kleineren und dünneren **Männchen** (Abb.2) entstehen sehr selten bei Selbstbefruchtung eines Hermaphroditen (0,1 – 0,2% der Nachkommenschaft). Dies geschieht durch Nondisjunktion eines Geschlechtschromosoms in der Meiose zum Chromosomensatz X0 [CHASNOV und CHOW, 2001]. Bei der viel selteneren sexuellen Fortpflanzung mit vorangehender Paarung sind 50% der Nachkommen männliche Tiere. Auffällig ist ihr fächerförmiger Schwanz, auf dem sich Strukturen befinden, die sie zur Paarung benötigen. Sie besitzen genau 1031 Körperzellen [CORSI, 2006].



**Abb. 2:** Männchen von *C.elegans*. laterale Ansicht von links. A – Zeichnung eines Längsschnitts mit Pharynx (grün), Intestinum und Proctodeum (lila), Gonade und Samenblase (dunkelblau), Vas deferens (hellblau), B – mikroskopische Aufnahme mit Hilfe eines Differential-Interferenzkontrast-Mikroskops und vergrößerter Ansicht folgender Strukturen: C – einarmige Gonade, D – Strukturen am Schwanzfächer, E – Schwanz einer Larve vor der Differenzierung. ([www.wormatlas.org](http://www.wormatlas.org)).

## 2.2. Anatomie von *C. elegans*

So wie alle Nematoden hat auch *C. elegans* einen einfachen Grundbauplan. Er besteht aus 2 konzentrischen Röhren, die durch einen flüssigkeitsgefüllten Raum, ein sogenanntes Pseudocoelom (der Hohlraum zwischen Ekto- und Entoderm ist nicht vollständig von mesodermalem Gewebe umgeben), getrennt sind. Somit wird die Körperform über hydrostatischen Druck aufrecht erhalten. Dieser wird über ein Osmoseregulationssystem kontrolliert. Die innere Röhre (das Entoderm) ist der Darm. Die äußere Röhre (das Ektoderm) ist ein Hautmuskelschlauch, der aus Cuticula, Hypodermis, Längsmuskulatur und Nervenzellen aufgebaut ist [LORENZEN, 2007, WOOD, 1988]. Die Gonaden befinden sich beim Adulttier im Pseudocoel. Hypodermis und Muskulatur sind durch eine Basalmembran getrennt [WOOD, 1988].



**Abb. 3:** Medianer Querschnitt eines adulten Hermaphroditen (posterior) von *C.elegans*. (g) Gonade, (h) Hypodermisleiste, (i) Intestinum, (m) Muskulatur, (nc) Nervenstrang, verändert nach Wood, 1988.

Die **Cuticula** wird von der darunterliegenden Hypodermis sezerniert. Sie ist extrazellulär und bedeckt die gesamte Körperoberfläche, sowie den Pharynx und das Rektum. Die Oberfläche ist durch regelmäßige umlaufende Erhebungen, sogenannte Annuli, strukturiert. Im L1<sup>1</sup>, im Dauer<sup>2</sup>- und im Adultstadium haben die Tiere beidseitig über die ganze Körperlänge laufende Cuticularstrukturen, die Alae. Diese sind den Tieren bei der Fortbewegung auf festen Medien hilfreich. Je nach Funktion ist die Cuticula in verschiedenen Körperregionen chemisch und strukturell verschieden aufgebaut. Sie ist biegsam auf der Körperwand, elastisch im Pharynx und hart und starr im Spicularapparat. Die Cuticula der Körperwand ist kein totes, unveränderliches Gebilde, sondern ein Ort dynamischer biochemischer Aktivität und kann auch ohne Häutung wachsen [LORENZEN, 2007]. Sie ist zu über 80% [NISSI, 2002] aus Collagenmolekülen aufgebaut. Vor jeder Häutung wird eine neue Cuticula synthetisiert. *C. elegans* produziert je nach Entwicklungsstadium vier unterschiedliche Typen: Die Cuticula des L1-, des Dauer-, des L4- und des Adult-Stadiums unterscheiden sich in Ultrastruktur und Proteinzusammensetzung. Von außen nach innen lassen sich, die für Nematoden typischen vier Schichten unterscheiden: Epicuticula, Cortex-, Median-, und Basalschicht [COX et al., 1981, LORENZEN, 2007].

---

<sup>1</sup> Die 4 Larvenstadien von *C. elegans* werden im laufenden Text als L1, L2, L3 und L4 bezeichnet.

<sup>2</sup> Erklärung zum Begriff Dauerlarve bzw. -stadium siehe Kapitel 2.3. Entwicklungszyklus von *C. elegans*.

Die größten Unterschiede zwischen den Stadien zeigen sich in der Struktur von Median- und Basalschicht. Bei den Entwicklungsstadien L1 und Dauerlarve enthält die Basalschicht eine starke gestreifte Zone, die aus ineinander verflochtenen Längs- und Querfibrillen besteht. Die Basalschicht der adulten Cuticula besteht aus zwei Fibrillenschichten, die sich in gegensätzlicher Richtung um den Körper winden, hier ist auch die Basalschicht über säulenförmige Strukturen mit der Medianschicht verbunden. So ergibt sich ein Hohlraum, der evt. flüssigkeitsgefüllt ist [WHITE, 1988].

Die **Hypodermis** ist an Stellen mit einer gleichmäßigen Oberfläche, wie z.B. in der Körpermitte, syncytial und aus großen vielkernigen Zellen aufgebaut. Kleinere Syncytien oder Einzelzellen, sogenannte Saumzellen, befinden sich dort, wo Strukturen, wie z.B. die Vulva, ausgebildet sind. Die Hypodermalzellen von *C. elegans* lassen sich in vier Gruppen unterteilen: 1. das Hauptkörpersyncytium, 2. die Saumzellen, 3. die hypodermalen Zellen des Kopf- und Schwanzbereiches und 4. die interfazialen Hypodermiszellen [WHITE, 1988].

Das Hauptkörpersyncytium besteht beim geschlüpften Tier aus 23 Nuklei und bildet hier nur den dorsalen Teil der Hypodermis. Im Laufe der Entwicklung wird auch die ventrale Körperseite durch dieses Syncytium bedeckt. Auch als Saumzellen angelegte Zellen werden in den syncytialen Komplex mit hineingenommen. In Summe fusionieren 110 Zellen im Laufe der postembryonalen Entwicklung. Vor der Fusion werden die diploid angelegten Zellen tetraploid [HEDGECOCK und WHITE, 1985].

Beim geschlüpften Tier ist seitlich je eine Reihe aus zehn Saumzellen angelegt. Bis auf die vorderen sind alle wenig differenzierte, RNA-reiche Zellen, sogenannte pyronophile oder Blast-Zellen, die sich während der Entwicklung noch oft teilen. Beim adulten Tier bilden die Saumzellen zwei Saumsyncytien, die vom Hauptkörpersyncytium getrennt bleiben. Auch die oben erwähnten Alae werden von den Saumzellen produziert. [SINGH und SULSTON, 1978]. Die Saumzellen sind auch für das diametrische Schrumpfen während der Häutung der Dauerlarve zuständig.

Dort wo Pharynx, Anus, Vulva, die Exkretionsöffnung und verschiedene sensorische Rezeptoren (z.B. die Amphiden) die Hypodermis unterbrechen, liegen ringförmig die interfazialen Hypodermiszellen. Diese sind unterschiedlich ausgebildet: Bei sensorischen Organen sind es einkernige Zellen, beim Pharynx zwei syncytiale bogenförmige Zellen und beim Anus sind es ebenfalls bogenförmige Strukturen aus mononuklearen Zellen. Die Interfazialzellen sind in Funktion und Morphologie Übergangsstadien zu den angrenzenden Organen [WHITE, 1988].

Die Hypodermiszellen von *C. elegans* beschränken sich nicht nur alleine auf die Sezernierung der Cuticula. So phagozytieren sie die Zellen, die während der Entwicklung durch programmierten Zelltod ausgeschaltet werden [ROBERTSON und THOMSON, 1982, SULSTON et al., 1983]. Sie fungieren aber auch als Depots und enthalten Speicherkörnchen und Lipidtröpf-

chen. Während der postembryonalen Entwicklung haben verschiedene Hypodermiszellen auch Stammzellfunktion.

Das auffälligste Merkmal der **Nematodenmuskulatur** ist ihre Art der Innervierung. Sie funktioniert nicht wie bei anderen Metazoen üblich über lange Axone der Motoneuronen, sondern die Muskeln haben neuronartige Fortsätze, die ins Neuropil, das Nervenfasergeflecht, hineinreichen, in dem sich auch die Axone der Motoneuronen befinden [CHITWOOD und CHITWOOD, 1977]. *C. elegans* besitzt zwei verschiedene Muskeltypen: die einen sind einzelne Muskelsarkomere mit fokalen Anschlussstellen an den Enden, die zweiten sind schräg gestreifte Muskeln aus mehreren Sarkomeren, die keine solche Anschlussstellen besitzen, aber wohl über die Länge verteilte Kontaktpunkte zur Hypodermis haben. Alle Muskeln des Verdauungssystems und der Geschlechtsorgane gehören zum ersten Typ, die Körperwandmuskeln zum zweiten. Bis auf vier Muskelzellen im Pharynx sind alle einkernig [WHITE, 1988].

Die Körperwandmuskulatur besteht aus vier sich über die Körperlänge ziehenden Muskelsträngen, wobei jeder in einem Quadranten des Körpers liegt. Sie liegen eingebettet in die Hypodermis und sind über fibröse Elemente, die durch das Zytoplasma der Hypodermalzellen reichen, mit der Cuticula verbunden. Ein Muskel besteht aus zwei Reihen rhomboidförmiger Zellen, insgesamt sind 95 Muskelzellen am Aufbau der Körperwandmuskulatur beteiligt: 23 im linken Ventralquadranten, 24 in den anderen [SULSTON und HORVITZ, 1977]. Unterschiedlich ist auch die Innervierung der Muskelzellen: während die ersten vier Muskelzellen in jedem Quadranten durch Motoneuronen im Nervenring innerviert sind, sind die folgenden vier dual über Nervenring und ventralen Nervenstrang innerviert. Die übrigen Zellen sind nur noch von Motoneuronen des Ventralstrangs innerviert. Diese innervieren entweder dorsale oder ventrale Muskulatur. Somit sind nur Bewegungen in der Dorsoventralebene möglich. Der Kopf hingegen kann auch lateral bewegt werden, somit sind auch seitliche Suchbewegungen möglich. Der Pharynx besitzt 20 einzelne, deutlich in acht dreifach radialsymmetrischen Schichten angeordnete, Muskelsarkomere, einige sind mehrkernig [ALBERTSON und THOMSON, 1976]. Die übrigen Singelsarkomere des Rektalmuskels, der Darmmuskulatur und der Muskulatur der Geschlechtsorgane – beim Männchen am Schwanz, bei den Hermaphroditen an der Vulva, sind lineare Muskeln und an einem Ende an epitheliale Zellen gebunden. Eine Sonderstellung hat der anale Schließmuskel: er besteht aus einer einzelnen ringförmigen Zelle mit einem durchgehenden Ring von nicht angehefteten kontraktile Filamenten. Somit ist er ein Analogon zur glatten Vertebratenmuskulatur [WHITE, 1988].

Eine 20 nm dünne **Basalmembran** kleidet die pseudocoelomatische Höhle aus und trennt die Muskulatur von Hypodermis und Nervengewebe. Ebenso sind Gonade und Darm von einer Basalmembran umhüllt. Die Membran des Pharynx ist mit 45 nm doppelt so dick [ALBERTSON und THOMSON, 1976].

Das **Nervensystem** des adulten *C. elegans* besteht aus 302 einfach gebauten und relativ wenig verzweigten Neuronen. Die gebündelten Nervenfortsätze laufen in Längsrichtung oder um den Körper herum. Der Großteil der Synapsen hat Mehrfachkontakte mit 2 oder mehr Postsynapsen. Die meisten Nervenzellen befinden sich als Nervenring rund um den Pharynx, als dorsaler und ventraler Nervenstrang entlang der Körpermedianen und im Schwanz. Der anteriore, circumpharyngeale Nervenring erhält sensorische Signale von der Kopfregion, wo auch die meisten sensorischen Rezeptoren liegen, und leitet motorische Signale an die beiden Nervenstränge weiter. Innen liegen genau angeordnet die Axone der Motoneuronen. Ventral zweigt ein Nervenstrang ab, der sich über die gesamte Körperlänge bis zur Praeanalregion ausdehnt, wo er in einem Ganglion endet. In diesem Praeanalganglion werden auch die sensorischen Inputs der Schwanzregion verarbeitet. Über die gesamte Länge des Ventralstranges sind Motoneuronen für die Körperwandmuskulatur verteilt. Kommissuren ziehen um den Körper auf die Dorsalseite, bilden hier den dorsalen Nervenstrang und innervieren die Dorsalmuskulatur [WHITE et al., 1988].

Im Inneren des Tieres verläuft die zweite Röhre, der **Darm**. Er ist gerade und besteht aus Mundöffnung, Pharynx, Intestinum, Rektum und Anus.

*C. elegans* ist ein Filtrierer. Er nimmt alles Organische auf, das in seine Mundöffnung passt. Der zweilappige **Pharynx** besteht aus zwanzig Muskelzellen, zwanzig Neuronen, neun Epithelialzellen und neun spezialisierten Epithelialzellen (Marginalzellen). Der Pharynx ist nach der Mundhöhle in vier Abschnitte gegliedert: den vorderen Procorpus, den birnenförmigen Metacorpus, den zylindrischen Isthmus und den Terminalbulbus. Der Querschnitt ist dreistrahlig: das Zentrallumen besteht aus drei symmetrisch angeordneten Muskelzellen, die die Nahrung zerquetschen und in den Darm pumpen. Drüsenzellen produzieren Sekrete, die für das Einspeicheln der Nahrung aber auch für die Ablösung der pharyngealen Cuticula während der Häutung zuständig sind.

Nach einem pharyngeal-intestinalen Ventil folgt das **Intestinum**. Es ist eine Röhre, die aus zwanzig mit Microvilli besetzten Zellen besteht. Wie viele Zellen bei *C. elegans* sind auch sie multifunktional: Sie produzieren Verdauungsenzyme, absorbieren Nährstoffe und wirken als Speicher für Lipide, Proteine und Kohlehydrate. Auch spielen sie eine bedeutende Rolle bei der Ernährung der Keimzellen.

Das **Rektum** ist vom Intestinum durch das intestinal-rektale Ventil getrennt. Drei Muskel befinden sich in der Rektalregion: der Analdepressor, der bei Kontraktion das Dach des Anus hebt, der Schließmuskel, der sich rund um das intestinal-rektale Ventil befindet und dieses schließen kann und zwei Intestinalmuskeln [WHITE, 1988].

Das einfache **Exkretionssystem** besteht aus drei Zellen: einer einzigen sehr großen, H-förmigen Exkretionszelle (die größte einkernige Zelle von *C. elegans*) und deren Fortsätze,

zwei Exkretionskanälen, die sich über die ganze Länge des Tieres ziehen. Im vorderen Körperabschnitt werden die Exkrete über eine Ductuszelle zur Exkretionspore, die von einer Porenzelle gebildet wird, nach außen geleitet. Ans Exkretionssystem ist noch eine zweikernige Drüsenzelle, die ihre Sekrete in den Exkretionskanal abgibt, gekoppelt. Ihre Funktion ist noch unklar. Die Exkretionszelle ist zur Vergrößerung der Oberfläche mit Canaliculi, kleinen einseitig geschlossenen Kanälen, die ins Zytoplasma ragen, gesäumt. In der Dauerlarve pulsieren die Exkretionskanäle, wobei ungeklärt ist, wie sie das tun, da keine Muskelfilamente im Zytoplasma zu sehen sind. Das Exkretionssystem ist vermutlich auch für die Osmoregulation verantwortlich. Wird die Osmolarität des externen Mediums verändert, ändert sich auch der Puls der Kanäle. Am schnellsten – um das fünf bis sechsfache - pulsieren sie in destilliertem Wasser [NELSON und RIDDLE, 1984]. Werden die Ductuszellen amputiert, blähen sich die Tiere im hypotonischen Medium mit Flüssigkeit auf und sterben [NELSON und RIDDLE, 1984].

Das **Reproduktionssystem** der Hermaphroditen besteht aus einer symmetrisch angelegten, zweilappigen Gonade, wobei sich, ausgehend von der Mitte des Tieres, ein Lappen in den vorderen und einer in den hinteren Körperteil des Tieres erstreckt. Jeder Lappen ist U-förmig gebogen und besteht aus einem distal zum Uterus gelegenen Ovar. Proximal liegen der Ovidukt und die Spermatheca [HIRSH et al., 1976, KIMBLE und HIRSH, 1979]. Die aus drei somatischen Zellen gebildeten Ovarien enthalten die syncytialen Stammzellen. Der zentrale Zytoplasmastrang wird im Querschnitt von 12 Zellkernen umschlossen, insgesamt enthält das Stammzellsyncytium ca. 1300 Zellkerne. Diese sind anfangs mitotisch, durchlaufen dann die Prophase und erreichen das Diakinese-Stadium wenn sie in den Oviduct geleitet werden. An der Biegung der Lappen sind die Zellkerne schon mit Membranen umgeben – sie sind zu Oozyten geworden. Während sie den Rest des Oviducts passieren, reifen sie weiter heran und werden mit Dottermaterial, das im Darm synthetisiert wird, angereichert [KIMBLE und SHARROCK, 1983]. Der syncytiale Kontakt und die Verbindung zur Rachis bleiben bis kurz vor der Befruchtung erhalten. Die beiden Spermathecae, die sich am Ende der Oviducte befinden, bestehen aus jeweils 22 ziemlich kleinen endothelialen Zellen. Jede enthält bei jungen Adulttieren ca. 150 amöboide Spermien. Die Oviducte eröffnen sich nach einer raffiniert gebauten Klappe – um ein Ei durchzupressen wird sie mehrmals geöffnet, somit wird der Befruchtungserfolg erhöht und mitgeschwemmte Spermien können wieder in die Spermatheca zurückwandern - in einen gemeinsamen Uterus. Dieser besteht aus 50 vor allem endothelialen Zellen und mündet über eine erhabene Vulva, die von acht Muskeln geöffnet wird, nach außen.

Die männliche, einlappige Gonade beginnt in der Körpermitte, erstreckt sich ins anteriore Ende, macht ebenfalls eine U-förmige Biegung und mündet am proximalen Ende in der Kloake beim Schwanz nach außen [HIRSH et al., 1976, KIMBLE und HIRSH, 1979]. Die mitotischen Stammzellen befinden sich am distalen Ende der Gonade. Die fortlaufenden meiotischen Sta-

dien, zwei meiotische Teilungen werden durchlaufen, bilden sich vom distalen Ende bis zum Samenvesikel. Dort findet die Endreifung der Spermatiden, die bis zu ihrer Ejakulation dort gespeichert werden, statt. Bei der Kopulation werden sie dann durch einen Vas deferens in die Kloake geleitet, die in der Mitte eines fächerförmigen Schwanzes, der mit 9 sensorischen Rezeptoren – den Strahlen – besetzt ist, nach außen mündet. Vor und hinter der kloakalen Öffnung befinden sich weitere Sinnesrezeptoren: das Hook-Sensillum und zwei postkloakale Sensillen. Mittels dieses Schwanzes werden die Spermien an das fakultative Weibchen übertragen. Zwischen der Einmündung von Darm und Genitaltrakt liegt das Proctodeum, welches zwei einklappbare, U-förmige Spiculae enthält. Begegnet ein Männchen einem Hermaphroditen, so sucht es mit Hilfe des Hookschen Sensillums die Vulva des Weibchens. Die Sensoren auf den Fächerstrahlen leiten die Suchbewegungen an. Durch Einführen der beiden Kopulationsspicae verbinden sich die beiden Tiere. [SULSTON et al., 1980]. Nun kommt es zur Übertragung der Samen. Insgesamt sind 41 Muskeln an der Kopulation beteiligt.

*C. elegans* besitzt an **Sinnesstrukturen** chemische, mechanische und thermische Rezeptoren. Diese sind Neuronen, die mit Cilien ausgestattet sind, welche durch die Cuticula hinausragen. An drei Stellen sind mehrere, vor allem chemische Sinnesneuronen konzentriert: an der apikalen Spitze (Amphidium), im Pharynx (labiale Sinnesöffnungen) und am Schwanz (Phasmidium) [BARGMANN, 2006]. Hermaphroditen besitzen 30 mechanosensorische Neuronen. Männliche Tiere haben 52 zusätzliche, die sich hauptsächlich in der Schwanzregion befinden [GOODMAN, 2006]



aus annähernd 550 Zellen, damit ist die Proliferationsphase abgeschlossen. In den nächsten Stunden streckt sich der Körper in die Länge, Neuronen differenzieren sich und verschalten sich zu neuronalen Prozessen. Abschließend wird die erste Cuticula gebildet. Das sogenannte „Brezelstadium“ (wegen der Dreifaltung des Embryos) ist erreicht.

Das erste Larvalstadium, die L1 Larve, schlüpft mit einer Länge von 250 µm, ca. 8-9 Stunden nach der Eiablage [CORSI, 2006, RIDDLE, 1988]. Bei Futterentzug stoppt die L1 ihre Entwicklung. Die hermaphroditische L1 besteht aus 558 Zellen, männliche L1 aus 560. Für die gesamte Entwicklung von *C. elegans* hat John Sulston einen Zellstammbaum beschrieben [SULSTON, 1988].

In den nächsten 50 Stunden werden 3 weitere Larvalstadien, L2 (360-380 µm), L3 (490-510µm) und L4 (620-650µm), durchlaufen. Am Übergang von einem Larvalstadium zum nächsten häuten sich die Tiere.

Sind die Lebensbedingungen schlecht (Nahrungsentzug, zu viele Tiere, zu hohe Temperaturen), entwickeln sich die L1 – Tiere zu einem Ruhestadium, der sogenannten Dauerlarve. So können ungünstige Bedingungen im natürlichen Lebensraum ohne gesamten Populationsausfall lange Zeit überstanden werden. *C. elegans* ist aber somit auch ein Zwischenglied auf dem evolutiven Weg in Richtung Parasitismus innerhalb der Nematoden. Viele Vertreter dieser Gruppe sind als Parasiten bekannt. Um einen Wirtswechsel vollziehen zu können, sind solche Dauerstadien sehr hilfreich, da somit unwirtliche Bedingungen bis zur Aufnahme durch einen neuen Wirt überlebt werden können. Die Dauerlarven von *C. elegans* leben vier- bis achtmal länger als Tiere, die sich ohne Dauerstadium entwickelt haben und nur ca. drei Wochen alt werden. [RIDDLE, 1988]. Die zeitliche Länge des Dauerlarvenstadiums hat allerdings keine Auswirkung auf das nachfolgende Lebensalter [KLASS und HIRSH, 1976]. Wie lange das Dauerlarvenstadium andauern kann, hängt nach Riddle von der Menge an vorher gespeicherter Energie ab [RIDDLE, 1988]. Beendet wird es jedenfalls durch verbesserte Umweltbedingungen. Im Labor beginnt die weitere Entwicklung eine Stunde nach Umsetzen in frisches Medium, nach zwei bis drei Stunden beginnen die Tiere wieder zu fressen. Nach weiteren acht bis zehn Stunden schlüpft eine L4 – Larve, die sich dann normal weiterentwickelt.

#### 2.4. Forschungsgeschichte von *C. elegans*

*Caenorhabditis elegans* wurde im Jahr 1900 von E. Maupas als *Rhabditis elegans* erstmals beschrieben. Bereits 1948 wurde der potentielle Wert von *Rhabditis* – Arten für die genetische Forschung erkannt [DOUGHERTY und CALHOUN, 1948].

1952 wurde die Art von G. Osche dem Subgenus *Caenorhabditis* zugeordnet und 1955 von E. C. Dougherty, der zuerst am Kaiser Foundation Research Institute in Richmond, California, und von 1961 bis zu seinem Tod 1965 am Department of Nutritional Sciences an der University of California in Berkeley arbeitete, als eigener Genus benannt [RIDDLE et al., 1997].

1965 wählte Sydney Brenner, Molekularbiologe am Medical Research Council Laboratory of Molecular Biology in Cambridge, England, *Caenorhabditis elegans* als Versuchstier um an ihm mit molekularbiologischen Methoden Entwicklungs- und Verhaltensbiologie zu untersuchen. [BRENNER, 1973, BRENNER, 1988].

Für die Forschungsgeschichte sind 2 Stämme von *C. elegans* von Bedeutung: der Bergerac-Stamm, der 1949 von Victor Nigon von der Université von Lyon aus einer Bodenprobe gewonnen wurde, und der Bristol – Stamm, der von L.N. Staniland aus einer Pilz Kultur isoliert wurde. Nigon beschrieb am Bergerac-Stamm 6 haploide Chromosomen und die 2 Reproduktionsvarianten Selbstbefruchtung der Hermaphroditen und Kreuzung dieser mit männlichen Tieren. 1949 wurde von Nigon und Dougherty durch Kreuzung der beiden Stämme erkannt, dass es sich beim Bergerac- und beim Bristol-Stamm um dieselbe Art, *C. elegans*, handelt. Bevor Sydney Brenner 1965 *C. elegans* für seine Studien auswählte, arbeitete in den 1960er Jahren schon Dougherty intensiv an den Kultivierungsbedingungen für *Caenorhabditis* – Arten. Er entwickelte auch die Haltung auf mit *E. coli* geimpften Agar-Schalen [RIDDLE et al., 1997].

Der Großteil der grundlegenden Forschung zur Genetik von *C. elegans* wurde am Bristol-Stamm durchgeführt, da die Männchen des Bergerac-Stammes nahezu gänzlich infertil und die Hermaphroditen temperatur-sensitive sterile Mutanten sind. Brenner begann seine Forschungen mit Tiere der N2 – Linie des Bristol-Stammes, die er im Frühjahr 1965 von Dougherty erhielt.

Bis heute wurden Wildtyp-Stämme aus aller Welt isoliert [FITCH und KELLEY THOMAS, 1997]. Diese haben nach Barker zwar manchmal abweichende Merkmale, jedoch sind sie alle mit dem N2 Laborstamm fertil. 1965 wurde der N2 Laborstamm als Wildtyp-Referenz definiert [RIDDLE et al., 1997].

Vor 1970, also noch bevor Brenner seine ersten Arbeiten mit *C. elegans* als Versuchstier veröffentlichte, war eigentlich *C. briggsae* der weitaus häufiger verwendete Labororganismus.

## 2. *Caenorhabditis elegans*

---

Durch Brenners Erfolge begann für den kleinen Bodennematode allerdings einen wissenschaftlicher Höhenflug. Im Nachhinein wurden auch einige *C. briggsae* Laborlinien als *C. elegans* erkannt, da ursprünglich *C. briggsae* als *C. elegans* beschrieben und erst später als neue Art klassifiziert wurde [RIDDLE et al., 1997].

Nach Sydney Brenners Meinung bot *C. elegans* aufgrund folgender Eigenschaften großes Potential für genetische Analysen [BRENNER, 1988]:

- Er besitzt einen raschen Lebenszyklus (Entwicklung in 3 Tagen).
- *C. elegans* ist klein, adult wird er nicht länger als 1,5mm.
- Die Haltung im Labor ist denkbar einfach. Tausende Tiere können in Petrischalen auf *Escherichia coli* – Bakterienrasen gezüchtet werden.
- Ein Hermaphrodit produziert 300 bis 350 Nachkommen. Das ist mehr als ein T4 – Phage bei der Infektion einer *E. coli* – Zelle produzieren kann.
- Einmalig unter den bis dato verwendeten Versuchstieren waren die Fortpflanzungsmöglichkeiten von *C. elegans*: einerseits die sich selbst befruchtenden Hermaphroditen, andererseits zusätzlich die Möglichkeit zur Kreuzung, ermöglicht durch Befruchtung durch männliche Tiere. Diese Möglichkeit bot vorher nur ein pflanzlicher Versuchsorganismus: *Zea mays*.
- *C. elegans* besitzt ein relativ kleines Genom, das nur 20mal größer als das von *E. coli* ist.
- *C. elegans* hat eine einfache Anatomie. Sein Körper ist nur aus ca. 1000 Zellen aufgebaut, wobei das Nervensystem aus exakt 302 Zellen besteht.

Brenner hatte schon damals die Idee einen neuronalen Schaltplan mittels elektronenmikroskopischer Betrachtung von serialen Schnittreihen zu erstellen. Eine Vision, die 20 Jahre später von J. E. White realisiert wurde [WHITE et al., 1988].

Die hohe Qualität der von Nichol Thomson, einem Mitarbeiter von Sydney Brenner, angefertigten elektronenmikroskopischen Aufnahmen, hatte ebenfalls großen Einfluss auf Brenners Entscheidung. Anfangs begann er händisch das Nervensystem nachzukonstruieren. Um Prinzipien neuronaler Verschaltungen zu erkennen, konzentrierte er sich auf das retrovesikuläre Ganglion, das am anterioren Ende des Tieres liegt und ein Teil des ventralen Nervenstrangs ist. 1970 entwickelte Brenner dann eine Software zur Rekonstruktion der Zellmorphologie anhand elektronenmikroskopischer Schnittfolgen [RIDDLE et al., 1997].

Der Kritikpunkt früherer Skeptiker, dass *C. elegans* zu wenige morphologische und verhaltensbiologische Merkmale besitzen würde und somit ein Erkennen der Gen Funktion schwierig bis unmöglich wäre, wurde durch die Veröffentlichung Brenners erster genetischer Karte, die sie enthielt mehr als 100 verschiedene genetische Loci, etwas abgeschwächt [BRENNER, 1974]. Aber der Erfolg war unaufhaltbar, weitere Forschungsarbeiten anderer Wissenschaftler folgten: S. Ward (1973) und D.B. Dusenberry (1974) publizierten über die Wirkung von chemoatt-

raktiven Stoffen, S. Ward und R. W. Ware veröffentlichten 1975 unabhängig voneinander Arbeiten über die Ultrastruktur verschiedener Sinnesorgane, J.A. Lewis und J.A. Hodgkin arbeiteten Ende der 1970er Jahre mit *C. elegans* Mutanten mit defekter Chemotaxis [RIDDLE et al., 1997].

Heute sind alle Neuronenverbindungen des Hermaphroditen Nervensystems bekannt. Das 381 Zellen umfassende Nervensystem der Männchen wurde von der Forschungsgruppe rund um J.E. White teilweise mittels elektronenmikroskopischer Untersuchungen rekonstruiert [WHITE et al., 1988]. All diese Untersuchungen führten zu detaillierten Modellen, wie Neuronen gemeinsam Verhalten generieren. Die ultrastrukturellen Forschungen von E.M. Jorgensen und C. Rankin [JORGENSEN und RANKIN, 1997] führten zu überraschenden Beispielen für Plastizität in der neuronalen Entwicklung (JORGENSEN und RANKIN, 1997). Mit Hilfe von Wildtyp-Diagrammen wurden weitere Erkenntnisse über die Interpretation von Verhaltens- und Lokomotionsmutanten und den räumlichen Einsatz und die Funktion von Neurotransmittern gewonnen [DRISCOLL und KAPLAN, 1997, RAND und NONET, 1997].

Die Transparenz der Tiere und ihre Konstanz in Zellanzahl und Zellposition zeigten sich bald als eindeutige Vorteile für die Entwicklungsforschung. *C. elegans* ist das ideale Versuchssubjekt für die Verwendung von Lasermikrochirurgie mit Hilfe der differentialen Interferenz-Kontrastmikroskopie, da jede Zelle zugänglich ist. Die Eutelie (konstante Anzahl von Zellen) ist von fundamentaler Bedeutung für die Entdeckung und verlässliche Auswertung von mutanten Phänotypen mit abgeänderten Zelllinien. Die gesamte Zellentwicklung vom befruchteten Ei bis zum adulten Organismus wurde von der Forschungsgruppe rund um John E. Sulston an lebenden Tieren untersucht [SULSTON et al., 1988].

Brenners Ideen konnten mit den damals verfügbaren technischen Möglichkeiten noch nicht ausgeführt werden. Folgende heute alltägliche Methoden und Forschungsergebnisse bestätigen aber die Brauchbarkeit dieses Organismus: Klonen, genetisches Mapping des Genoms, Transposon-Identifizierung („tagging“), reverse Genetik, Keimlinien DNA Transformation, genetische Mosaik und die schon oben erwähnte Lasermikrochirurgie. Mittlerweile gibt es umfangreiche Sammlungen von Methoden und Informationsquellen zur Analyse von *C. elegans* [EPSTEIN und SHAKES, 1995, STRANGE, 2006, WORMBASE, WS188].

Am Anfang war die molekulargenetische Forschung gezwungenermaßen auf Gene beschränkt, die für biochemisch nachweisbare Produkte kodieren. Für Gene, die die neuronale Entwicklung und Funktion beeinflussen, fehlten damals noch dementsprechende Methoden. Die ersten Forschungsergebnisse auf diesem Gebiet wurden zu den Themen Muskelaufbau und Muskelfunktion erzielt. Das *unc-54* Gen, es kodiert für die schweren Myosinketten der Körperwandmuskulatur, wurde deshalb von H. F. Epstein ausgewählt, weil das transkribierte

Protein eines der häufigsten im Körper ist und leicht mit SDS-PAGE (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese) analysiert werden kann. Die Forschungsarbeiten an *unc-54* hatten einen großen Einfluss auf die Muskelforschung, da bis dahin Myosin biochemisch über Proteinsequenzierung untersucht wurde. *Unc-54* war das erste identifizierte und geklonte Gen von *C. elegans* und war somit ein Wegbereiter um homologe Gene in anderen Organismen zu klonen. Die Studien weiteten sich auf andere Muskelgene und Muskelproteinkomponenten aus und so wurden die Analyse der Muskelzusammensetzung und die Erkenntnisse über die Muskelfunktion zu einem bedeutenden Bestandteil der *C. elegans* Forschung [MOERMAN und FIRE, 1997].

1969 wurde das Problem der Aufbewahrung und Lagerung von Wildtyp- und Mutantenstämmen gelöst [SULSTON und HODGKIN, 1988]. Ähnlich wie Säugerzellkulturen können auch *C. elegans* Stämme über viele Jahre in flüssigem Stickstoff bei  $-80^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt werden. Sie sind nach 25 Jahren noch lebensfähig. Jederzeit kann auf tief gefrorene Referenzstämmen zurückgegriffen werden. Ebenso wurde die Verwaltung großer Sammlungen von Mutanten erheblich vereinfacht, da diese Methode der Aufbewahrung einerseits über lange Zeit weitaus weniger Kosten verursacht, andererseits Verlust oder Falschkennzeichnung von Stämmen durch wiederholte Transfers von wachsenden Kulturen wesentlich reduziert werden kann.

Auch in der Entwicklungsbiologie waren Ende der 1970er Jahre erste wissenschaftliche Erkenntnisse zu verbuchen. Die Untersuchung der Embryogenese durch die Arbeitsgruppen um R. Vanderslice und G. von Ehrenstein, die Determinierung des Geschlechts durch J.A. Hodgkin und S. Brenner, die Erforschung der Larvalentwicklung durch R.C. Dassada und R.L. Russell und die Erforschung der postembryonalen Zellentwicklung von J.E. Sulston und H.R. Horvitz brachten die Entwicklungsgenetik in Schwung [RIDDLE et al., 1997].

Die neuen Erkenntnisse in der molekularen Genetik wurden aber auch bald für die Erforschung des Nervensystems eingesetzt [ANTEBI et al., 1997, RUVKUN, 1997].

2002 erhielten S. Brenner, H. Robert Horvitz und John E. Sulston für ihre Forschungsarbeiten auf dem Gebiet der genetischen Regulierung der Organentwicklung und des programmierten Zellsterbens den Nobelpreis für Physiologie und Medizin.

## **2.5. *C. elegans* als Modellorganismus in der aktuellen molekularbiologischen Forschung**

### 2.5.1. Aktuelle Forschung und Informationsquellen

*C. elegans* war das erste metazoische Lebewesen bei dem das gesamte Genom (19.735 proteincodierende Gene und über 1300 nichtcodierende RNA-Gene [HILLIER et al., 2005]) erforscht war [THE *C. ELEGANS* SEQUENCING CONSORTIUM, 1998].

Wenn man die 90er Jahre des 20. Jahrhunderts als die „Dekade des Genoms“ bezeichnet, in dem Organismus nach Organismus sequenziert wurde, muss das erste Jahrzehnt des 21. Jahrhunderts die „Dekade der Genomfunktion“ genannt werden, da das Hauptaugenmerk bei der Erforschung der Gen-Funktion, -Regulation, -Interaktion und -Expression liegt [HILLIER et al., 2005].

Bis heute sind in mehr als 14.600 Artikeln (Recherche vom 3.10.2008 bei PubMed: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>) über alle Aspekte dieses Organismus wissenschaftliche Erkenntnisse niedergeschrieben worden.

Einige aktuelle molekularbiologische Forschungsschwerpunkte sind: Krebsforschung und Tumorgenese [JANNOT und SIMARD, 2006, KATO und SLACK, 2008, SKAFTNESMO et al., 2007], Altersforschung [ANTEBI, 2007, GOLDEN und MELOV, 2007, KENNEDY, 2008, PIPER et al., 2008, SYNTICHAKI et al., 2007, ZAHN und KIM, 2007] [TAVERNARAKIS, 2007], Apoptose [DOMINGOS und STELLER, 2007, KOURTIS und TAVERNARAKIS, 2007, LETTRE und HENGARTNER, 2006, O'NEIL und ROSE, 2006, SAMARA und TAVERNARAKIS, 2008] und RNA-Interferenz [BOISVERT und SIMARD, 2008, CALDERÓN und LAVERGNE, 2005].

Um sich über den kleinen Nematoden zu informieren gibt es eine Reihe von Informationsquellen aus dem Internet. Igor Antoshechkin und Paul W. Sternberg haben diese in ihrer Arbeit „The Versatile Worm: Genetic and Genomic Resources for *Caenorhabditis elegans* research“ auf sehr übersichtliche Art und Weise zusammengefasst [ANTOSHECHKIN und STERNBERG, 2007]. Es soll nur auf einige eingegangen werden:

- **C. elegans II:** <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bv.fcgi?rid=ce2.TOC/>

Dieses Onlinebuch bietet viele grundlegende Informationen über eine ganze Reihe von Themen, die sowohl für Anfänger als auch für erfahrene *C. elegans* Forscher sehr brauchbar sein können, trotzdem muss gesagt werden, dass es schon 11 Jahre alt und daher nicht auf dem neuesten Stand ist.

- **WormBook:** <http://www.wormbook.org/>

Dieser online Review wird ständig mit neuen Artikeln aktuell gehalten (derzeit sind es 147) und bietet somit neueste Erkenntnisse auf dem Gebiet der *C. elegans* Forschung. Das WormBook ist in 13 Kapitel unterteilt: Genetics and genomics, Molecular biology, Biochemistry, Cell Biology, Signal transduction, Developmental control, Post-embryonic development, Sex determination, The germ line, Neurobiology and behavior, Evolution and ecology, Disease models and drug discovery und WormMethods.

- **WormAtlas:** <http://www.wormatlas.org/>

Hier finden Fragen zur Anatomie des Wurmes eine Antwort. Das Anatomie – Handbuch erklärt, ergänzt durch viele elektronenmikroskopische Bilder alle Organe und Gewebstypen. Es gibt eine Reihe von Zellstammbäumen, einen Color Code für die dargestellten Organe und Gewebe, die Darstellung aller Neuronen von *C. elegans*, Anleitungen zur Zellidentifikation mit vielen detaillierten Abbildungen, eine Datenbank für Genexpressionen, sichtbar gemacht mit Hilfe des GFP (Green Fluorescence Protein) und Anleitungen für anatomische Methoden. Zusätzlich gibt es auch noch ein Glossar mit anatomischen Termini. Unter „links“ findet man eine Reihe von Filmen und viele Laborprotokolle.

- **WormImage:** <http://www.wormimage.org/>

Ist die begleitende Bilddatenbank von WormAtlas und enthält tausende elektronenmikroskopische Aufnahmen.

- **WormBase:** <http://www.wormbase.org/>

Die WormBase ist die bedeutendste Datenbank über *C. elegans* und verwandte Nematoden. Sie enthält:

- alle Gensequenzen von *C. elegans*, *C. briggsae* und *C. remanei*
- Funktionsbeschreibungen von allen nahezu 20.000 *C. elegans* Genen
- umfangreiche Informationen über mutante Allele und deren Phänotypen
- RNAi<sup>3</sup> Screens des gesamten Genoms
- genetische Karten, Marker und Polymorphismen
- die physische Karte von *C. elegans*
- den Zellstammbaum
- das Verschaltungsdiagramm des Nervensystems
- Protein – Protein Interaktionsdaten
- Beziehungen in der genetischen Regulation

---

<sup>3</sup> Erklärung RNAi: siehe Kapitel 4.3.3. RNA - Interferenz

- Details über intra- und interspezifische Homologien (mit links zu Datenbanken anderer Modellorganismen)
- außerdem ist die WormBase mit anderen Gen – Datenbanken verknüpft.

Einerseits enthält diese Datenbank eine Fülle von Informationen über Gene und Genprodukte, andererseits dient sie aber auch der Veröffentlichung neuer Forschungsergebnisse für die „*C. elegans* Research Community“. Als tools dienen WormMart und Genome Browser zum Finden von Genen und dazugehörigen Informationen und TextPresso – eine eigene Suchmaschine für publizierte *C. elegans* Literatur.

WormBase ist eine Zusammenarbeit zwischen dem Wellcome Trust Sanger Institut, dem Cold Spring Harbor Labor, der Washington University in St. Louis, und dem California Institute of Technology. Unterstützt wird sie durch die National Institutes of Health und das British Medical Research Council.

Jedenfalls ist die Fülle von Datenbanken und Informationsquellen ein Schritt in Richtung eines gesamten Netzwerkes, in dem alle einzelnen Informationen (kodierende Transkripte, nicht-kodierende Transkripte und open reading frames) über ihre Beziehungen miteinander verknüpft werden – ein „gläserner Wurm“ sozusagen [PIANO et al., 2006].

### 2.6. Untersuchungsparameter Lebensdauer, Körpergröße, Nachkommenschaft und Motilität – die verschiedenen mutanten Phänotypen von *C. elegans*

Mutationen können verschiedene phänotypische Ausprägungen zeigen. Manche sind sichtbar, andere letal oder es ist von außen keine Veränderung am Individuum zu erkennen. Einen bedeutenden Teil in der Bewertung von Untersuchungen an *C. elegans* nimmt die Beurteilung der erhaltenen Phänotypen ein.

Die vier Parameter Lebensdauer, Körpergröße, Nachkommenschaft und Motilität kommen in verschiedensten Ausprägungsstufen und Kombinationen vor und zeigen sich in den folgenden am häufigsten vorkommenden bzw. verwendeten sichtbaren Phänotypen [FAY et al., 2001]:

- **dpy – dumpy:** Diese Tiere sind in ihrem Erscheinungsbild kurz und dick. Es gibt verschiedene Ausprägungsstufen von starkem bis moderatem Charakter. Eine starke dpy – Ausprägung („kleine Fußbälle“) zeigt oft auch eine unc – phänotypische Ausprägung.
- **unc – uncoordinated:** Hier werden alle Typen zusammen gefasst, deren Motilität in irgendeiner Art und Weise gestört ist. Die häufigsten Unterklassen sind: „coiler uncs“ haben eine spiralförmige Bewegungsweise, „kinker uncs“ kringeln sich, „paralyzed uncs“ sind gelähmt. Außerdem gibt es Tiere, die entweder in ihrer Vorwärts- oder in ihrer Rückwärtsbewegung ge-

stört sind. Uncs sehen oft unterentwickelt aus und sind typischerweise kleiner und dünner als der Wildtyp.

- **sma – small:** Diese Tiere sind einfach nur kleiner als der Wildtyp und sind diesem in den Körperproportionen – im Gegensatz zum dpy – sehr ähnlich.
- **lon – long:** Die Tiere sehen sehnig aus. Während dpy und sma in einigen Fällen sehr klein im Vergleich zum Wildtyp sein können, ist der längste lon nur 50% länger als der Wildtyp.
- **egl – egg-laying defective:** Hier gibt es den bag – Phänotyp, bei dem die Embryos bereits in der Mutter schlüpfen und das Tier wie ein cuticularer Sack mit sich windenden Larven aussieht. Das Muttertier sieht vor dem Schlüpfen der Larven sehr aufgebläht aus, als wäre es bis zum Platzen mit Eiern gefüllt. Diese werden eigentlich als egl bezeichnet. Vorsicht ist nur bei älteren Tieren geboten, weil diese öfter wie egl Tiere aussehen. Lässt man die Tiere hungern, kommt es auch beim Wildtyp zu einem starken Auftreten von eg l- und bag – Typen. So darf die Identifizierung dieser Typen nur auf Schalen ohne hungernde Tiere erfolgen.
- **let – lethals:** In dieser Gruppe sind alle zusammengefasst, die während der Entwicklung (Embryo bis Larvalstadien) sterben. Auffälliger sind natürlich larvale Todesfälle, vor allem, wenn sie einen letalen larvalen Phänotypen, wie „paralyzed rod“ („gelähmter Stab“) oder „severe dpy“ („schwerer dumpy), zeigen. Tote oder sterbende Eier sind auf den ersten Blick selbst mit einem Stereomikroskop kaum von lebenden zu unterscheiden. Um embryonale Todesfälle zu sehen, muss das Muttertier zur Eiablage auf eine neue Schale gesetzt werden (üblicherweise 3 bis 11 Stunden). Nach ca. 18 Stunden bei 20°C, da sind die Wildtyp Embryonen schon geschlüpft, können die Letalfälle gezählt werden. Andere Bezeichnungen für embryonale Letalmutationen sind **emb** und **zyg**.
- **ste – sterile:** Es gibt verschiedene Varietäten dieser Gruppe. Am einfachsten zu erkennen sind die Tiere mit offensichtlicher Sterilität, weil sie im Adultstadium keine Eier tragen. **pvl – sterile** Tiere sind auch leicht zu erkennen, da sie eine hervorstehende („protruding“) Vulva haben. Es gibt aber auch „**maternal-effect**“ Mutanten, die tote Eier enthalten.
- **rol – Roller-Typ:** Diese Tiere sind hufeisenförmig gebogen und drehen sich am Platz um ihre Längsachse. Dieser Phänotyp kann durch einen starken **unc** oder **dpy** maskiert werden, da die Tiere dann nicht mehr die typischen rollenden Bewegungen durchführen.
- **Bli – Blister-Typ:** Die Cuticula adulter Individuen mit dieser Ausprägung ist variabel mit Bläschen besetzt, es kann sogar nur eine große Blase ausgebildet sein. Dieser Phänotyp kann durch eine Reihe von **dpy** und **rol** Mutationen unterdrückt sein.
- **Lin – lineage defective:** Je nach Ausprägung des Zellliniendefekts können hier verschiedenste Phänotypen zur Ausprägung kommen.



### **3. Ausgewählte Modellorganismen der Molekularbiologie versus *C. elegans***

In der wissenschaftlichen Forschung werden eine ganze Reihe von Organismen als Versuchsmodelle genutzt, um biologische Vorgänge zu verstehen. Im Speziellen geht es darum, Ursachen und Behandlungsmöglichkeiten für Erkrankungen unserer eigenen Art zu finden. Grundsätzliche Voraussetzungen für die Eignung zum Modellorganismus sind einfache und billige Haltung, einfache Manipulation und eine Fülle von genetischen und molekularbiologischen Hilfsmitteln. Je nach Forschungsschwerpunkt gibt es eine ganze Reihe von Eigenschaften, die als Auswahlkriterien herangezogen werden können: Größe, Generationsdauer, Verfügbarkeit, Genetik, Erhaltung von Mechanismen, etc. Da in den letzten Jahrzehnten vor allem die molekularbiologische Forschung im Vordergrund stand, wurden auch Organismen, die in ihrer Abstammung weiter von uns entfernt sind, verwendet.

Vergleichend auf alle verwendeten Modellorganismen einzugehen, würde den Rahmen dieser Arbeit bei weitem sprengen. So wird nach einer zusammenfassenden Beschreibung der Vorteile von *C. elegans* auf drei wichtige Labororganismen näher eingegangen und diese werden mit dem Wurm verglichen.

#### **3.1. Vorteile von *C. elegans***

*C. elegans* verfügt über eine Reihe von Eigenschaften, die ihn zu einem „Vorzeigemodellorganismus“ machen. Die speziellen Charakteristika von *C. elegans* sind [CORSI, 2006]:

- *C. elegans* ist ein einfacher Vielzeller: die Zahl der somatischen Zellen der adulten Tiere ist genau bekannt.
- Er hat verschiedene Gewebetypen, wie Muskeln, Nerven und Darm.
- Der kurze Generationszyklus macht rasches Experimentieren möglich.
- Bei Raumtemperatur ist die Entwicklung vom Embryo über die Larvalstadien bis zum adulten Tier in drei Tagen abgeschlossen.
- Ein adultes Tier produziert 300 bis 1000 Nachkommen.
- Die sich selbst befruchtenden Hermaphroditen benötigen keine Paarung, somit sind Untersuchungen auch an Tieren möglich, die sich nicht paaren können. Außerdem liefern sie homozygote Mutationen. Sind Kreuzungen für die Forschungsarbeit notwendig, werden Männchen zur Paarung verwendet.

### 3. Ausgewählte Modellorganismen der Molekularbiologie versus *C. elegans*

- Die Tiere sind durchsichtig. Somit können Zeitabläufe, wie Mitose oder Zytokinese in Echtzeit beobachtet werden. Außerdem ist die Verwendung von GFP (Grün fluoreszierendes Protein, dieses gehört zu den fluorescent reporter genes) möglich.
- Bei der Arbeit mit RNA – Interferenz ist eine rasche Bewertung der Genfunktion möglich.
- Die Embryogenese wurde genau erforscht [KIMBLE und HIRSH, 1979, SULSTON und HORVITZ, 1977, SULSTON et al., 1983]: Es gibt Abbildungen zur gesamten Larvalentwicklung. Diese sind besonders hilfreich für die Interpretation von Mutationsphänotypen auf niedrigem Zellniveau.
- Die Tiere überleben Einfrieren unbeschadet, und bei Futterentzug, zu hoher Individuendichte oder zu hohen Temperaturen werden zwischen 1. und 2. Larvalstadium Dauerlarven gebildet. Das heißt die Tiere können lange Zeit aufbewahrt werden.

## **3.2. *Mus musculus***

### **3.2.1. *M. musculus* als Modellorganismus**

Die Maus ist das am längsten verwendete Versuchstier in der biomedizinischen Forschung. Im alten Japan und China wurden die Tiere wegen ihrer spontan auftretenden Fellfarbvariationen gehalten und gezüchtet. Im 17. Jahrhundert wurden in Europa diese Tiere mit lokalen Mausrassen gekreuzt. So entstanden die Vorläufer der heutigen Labormaus. Gregor Mendel hätte seine Kreuzungsversuche mit der Labormaus gemacht, wenn ihm nicht der Bischof Anton Ernst Schaffgotsch verboten hätte mit diesen „unzüchtigen“, weil kopulierenden, Tieren sein Zimmer zu teilen [HENIG, 2001].

Der Franzose Lucien Cuénot war dann der erste, der nach der Wiederentdeckung der Mendelschen Regeln Untersuchungen zur Vererbung der Fellfarbe an Mäusen durchführte und als erster multiple Allele beschrieb [CUÉNOT, 1905, PAIGEN, 2003].

C. C. Little, Gründer des Jackson Laboratory, arbeitete in der 1920er Jahren an Mäusen mit transplantierten Tumoren. Diese Untersuchungen führten in weiterer Folge zur Entdeckung des Histokompatibilitätskomplexes, der Immunerkennung und Gewebeverträglichkeit reguliert [SNELL, 1948]. Untersuchungen zur genetischen Basis vom Auftreten spontaner Neoplasmen führten zur Entdeckung der Retroviren [BRYAN et al., 1942, VISSCHER et al., 1942] und ihrer Rolle in der Tumorbildung [MÜHLBOCK und BENTVELZEN, 1968, VARMUS et al., 1972]. Die Verwendung der Labormaus als genetisches Modell zur Züchtung verschiedener Inzuchtstämme führte in den 1960er bis 1980er Jahren zu grundlegenden Erkenntnissen in verschiedenen

Bereichen der Säugerbiologie, wie z.B.: Geschlechtsdetermination [LYON, 1961] und Hormonregulation [PAIGEN, 1961a, PAIGEN, 1961b, SWANK et al., 1973]. 1980 waren schon über 300 Inzuchtstämme bekannt. Alle zurzeit verfügbaren Mausstämme findet man auf der Homepage der Mouse Phenome Database unter [www.jax.org/phenome](http://www.jax.org/phenome) (Recherche 8. Oktober 2008: 606 Stämme). Die Fortschritte der Mausgenetik erstreckten sich bis Anfang der 80er Jahre aber auch auf andere Gebiete: Die Erstellung genetischer Karten, die Entwicklung kongener Stämme, rekombinierter Inzuchtlinien und deren Variationen und Umbauten an Chromosomen.

Ende 1980 begann ein neuer Abschnitt der Mausgenetik: die erste transgene Maus wurde gezüchtet. Diese neue Technik führte zu einer Fülle wissenschaftlicher Untersuchungen [PAIGEN, 2003]. Ab diesem Zeitpunkt dominierten zwei sich ergänzende Forschungslinien: Einerseits die Erforschung der Funktion bekannter DNA – Sequenzen, andererseits die Untersuchung des Genoms bekannter Phänotypen und der Gene für normale bzw. anormale Expression.

Das große Ziel der heutigen Mausforschung ist die Mutagenese des kleinen Säugers. Große Summen an Forschungsgeldern werden investiert um Knockout – Mäuse zu züchten. So investiert das US National Institute of Health (NIH) 70 Millionen US\$ in das Knockout Mouse Project (KOMP), die wiederum mit der Europäischen (European Conditional Knockout Mouse Mutagenesis – EUCOMM) und der Kanadischen (North American Conditional Knockout Mouse Mutagenesis – Nor-COMM) Initiative zusammenarbeiten. Um für alle 25.000 Gene Knockout – Linien zu züchten würde man 7 Millionen Tiere benötigen [QIU, 2006].

Ebenso wie für *C. elegans* gibt es auch für den Modellorganismus *Mus musculus* eine Reihe von Informationsquellen aus dem Internet, die einerseits grundlegende Informationen über die Verwendung der Maus als Modellorganismus bieten, andererseits aber auch durch regelmäßige Aktualisierungen die neuesten Forschungsergebnisse verfügbar machen. Des Weiteren sind sie auch sehr gute Datenbanken für definierte Gene, Phänotypen, verfügbare Stämme, etc. In Folge wird kurz auf einige Internetressourcen eingegangen:

- **MGI (Mouse Genome Informatics):** [www.informatics.jax.org/](http://www.informatics.jax.org/)

Diese Webseite und Datenbank des Jackson Laboratory, USA, fasst drei wichtige Datenbanken zusammen: die Mouse Genome Database (MGD), die Mouse Gene Expression Database (GXD) und die Mouse Tumor Biology Database (MTB). Des Weiteren liefert sie Informationen zu Genen, Phänotypen, Genexpressionen, Genfunktionen, Stoffwechselwege, Zuchtstämme, Orthologien und Tumore. Ein eigener Link zeigt veröffentlichte Forschungsneuigkeiten und es besteht auch die Möglichkeit eigene Forschungsergebnisse hochzuladen.

- **Mouse Atlas and Gene Expression Database:** [genex.hgu.mrc.ac.uk/](http://genex.hgu.mrc.ac.uk/)  
Diese Webseite der Universität Edinburgh bietet einen digitalen dreidimensionalen Atlas der Embryologie und Entwicklung von *M. musculus* in Bezug auf Genexpression und Zelllinien (emap). In Zusammenarbeit mit dem Jackson Laboratory, USA, wurde die Gene Expression Database (emage) entwickelt. Emage ist komplementär zur GXD.
- **Mouse Phenome Database:** [www.jax.org/phenome](http://www.jax.org/phenome)  
Diese Web Seite gibt Information über verschiedene Mausstämmen. Die veröffentlichten phäno- und genotypische Daten wurden von verschiedensten Institutionen zur Verfügung gestellt. Sie sollen einerseits bei der Auswahl des richtigen Mausstammes behilflich sein, andererseits aber auch als standardisierte Sammlung für Referenzdaten dienen. Auch der Gewinn neuer Erkenntnisse über den Zusammenhang zwischen Genotyp und Phänotyp ist ein Ziel der Betreiber. Auch diese Datenbank läuft über das Jackson Laboratory, ist aber ein eigenständiges Projekt neben dem schon oben vorgestellten MGI.

#### 3.2.2. Die Modellorganismen *M. musculus* und *C. elegans* im Vergleich

Der Vorteil der Maus als Modellorganismus zur Untersuchung biomedizinischer Fragestellungen ist eindeutig ihre nähere Verwandtschaft zum Menschen und liegt in der in weiten Bereichen identischen Biologie der Säugetiere. Die Genome von Mensch und Maus haben ungefähr dieselbe Größe, eine ähnliche Anzahl von Genen (ca. 25.000) und viele dieser Gene liegen auf denselben Chromosomen (Syntänie). Viele Mutationen verursachen bei beiden ähnliche Krankheiten bzw. Krankheitsbilder. Eine kleine Auswahl sind: Stammzellforschung, neurologische Mutationen, Erkrankungen des Auges, muskuläre Dystrophie und andere den Bewegungsapparat betreffende Erkrankungen, Rachitis, verschiedenste Stoffwechselstörungen, wie z.B. Diabetes, etc. [JONAS, 1984]. Dadurch ist die Maus als Modellorganismus in vielen Forschungsbereichen unerlässlich. Eines der Forschungsgebiete, das ohne den Modellorganismus Maus sicher nicht auf dem heutigen Wissensstand wäre ist die Onkologie.

Obwohl auch die Maus ein relativ einfach zu haltendes Tier ist, ist sie doch weitaus aufwändiger zu züchten als *C. elegans*. Ihr Platzbedarf ist deutlich größer (für *C. elegans* reichen ein Kühl- und ein Brutschrank) und sie verursacht höhere Kosten in Haltung und Pflege. Außerdem dauert ihr Generationszyklus länger und sie produzieren weniger Nachkommen. Ein weiterer Nachteil der Maus ist auch die ethische Frage. Einen uns nahe verwandten Säuger für Untersuchungen zu verwenden, der auch als Haustier gehalten wird, ist in dieser Hinsicht doch bedenklicher.

Welches Versuchstier für Untersuchungen gewählt wird, hängt wohl trotzdem von der Art der Fragestellung ab.

### **3.3. *Drosophila melanogaster***

#### **3.3.1. *D. melanogaster* als Modellorganismus**

1909 wählte Thomas Hunt Morgan die Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* als Versuchstier für seine experimentellen Evolutionsstudien. Er wollte als Gegner der Mendelschen Regeln diese widerlegen. Seine Versuche belehrten ihn eines besseren und er revidierte seine Meinung alsbald. Er entdeckte, dass sich die Gene auf den Chromosomen befinden (in diesem Fall die Gene der Augenfarbe auf den Geschlechtschromosomen) und erhielt dafür im Jahr 1933 den Nobelpreis für Medizin. Außerdem erkannte er, dass manche Merkmale nicht unabhängig voneinander vererbt werden. Auch einer seiner Schüler, Hermann Muller, erhielt den Nobelpreis. Im Jahr 1941 wurde er für die Entdeckung der Chemie von Mutationen ausgezeichnet. 1936 veröffentlichten G.W. Beadle und B. Ephrussi ihre Arbeit „The differentiation of eye pigments in *Drosophila* as studied by transplantation.“ Die beiden hatten larvale Augenanlagen in das Abdomen anderer Larven transferiert, wo sich diese weiter entwickelten. Viele weitere solcher Mosaikstudien folgten. *D. melanogaster* ist der bedeutendste Modellorganismus im Bereich der Entwicklungsgenetik. 1995 erhielten Ed Lewis, Christiane Nüsslein-Volhard und Eric Wieschaus den Nobelpreis für ihre Untersuchungen zur genetischen Kontrolle der frühen embryonalen Entwicklung. In weiterer Folge klärten sich durch Untersuchungen auf diesem Gebiet viele Zusammenhänge von Krankheiten beim Menschen, die in einer fehlgesteuerten Entwicklung ihre Ursache haben [LETSOU und BOHMANN, 2005]. Auch, dass viele genetische Abläufe sich im Laufe der Evolution kaum verändert haben und nach strengen Mustern ablaufen, ist eine erfolgreiche Erkenntnis der Arbeit mit *D. melanogaster* [BELLER und OLIVER, 2006]. Im Jahr 2000 wurde von der von Gerry Rubin geleiteten gemeinsamen Initiative des Berkeley *Drosophila* Genome Projects (BGDP) und von Celera Genomics, Inc. die aus ca. 14.000 Genen bestehende Genomsequenz der Fruchtfliege veröffentlicht [ADAMS et al., 2000]. Obwohl *D. melanogaster* deutlich weniger Gene als *H. sapiens* besitzt, haben vergleichende Studien von S. Chien ergeben, dass für nahezu alle bekannten beim Menschen Krankheiten verursachten Gene, Homologe vorhanden sind [CHIEN et al., 2002]. So werden, obwohl die Fruchtfliege bis jetzt eher ein Organismus der klassischen Genetik war, sicher noch viele interessante Ergebnisse in Bezug auf menschliche Erkrankungen veröffentlicht werden.

Natürlich stehen auch für *D. melanogaster* einige sehr gute Internetressourcen zur Verfügung:

- **FlyBase:** <http://flybase.org/>

Dies ist vermutlich die wichtigste Datenbank für *Drosophila* – Forscher. Wie die Datenbanken für *C. elegans* und Maus liefert auch diese viele Informationen über Gene, Stämme, Methodik, etc. Das FlyBase – Projekt wird von einem Konsortium von *Drosophila* Forschern und Computer Wissenschaftlern der Harvard University, der University of Cambridge (UK) und der Indiana University betrieben.

- **Berkeley Drosophila Genome Project:** <http://www.fruitfly.org/>

Dies ist die Web Seite des Fruchtfliegen Genom entschlüsselnden Konsortiums. Auch hier finden sich viele Informationen über *Drosophila* Genomic, eine Möglichkeit zur Sequenzsuche, Zutritt zu speziell entwickelter Software, Labormethoden, etc.

- **The Interactive Fly:** <http://www.sdbonline.org/fly/aimain/1aahome.htm>

Diese Seite zeigt die Gene von *Drosophila* und ihre Rolle in der Entwicklung. Sie enthält einen Gen-Index mit den Kategorien Name und Funktion und gibt auch detaillierte Informationen über Genprodukte. Diese Seite wird von der Society for Developmental Biology betrieben.

#### 3.3.2. Die Modellorganismen *D. melanogaster* und *C. elegans* im Vergleich

Die Forschungsschwerpunkte an der Fruchtfliege und dem Wurm haben sich bis heute wenig gekreuzt. Während *D. melanogaster* eher ein Modellorganismus der klassischen Genetik ist, wird an *C. elegans* doch eher in angewandten Bereichen der Genetik geforscht. Dies wird sich wie oben schon erwähnt sicher in naher Zukunft ändern. Die beiden sind jedenfalls in der Haltung ähnlich anspruchslos. Kultivierung auf kleinstem Raum und billigste Versorgung sind gegebene Grundvoraussetzungen. *Drosophila* ist als Insekt sicher der höher entwickelte Organismus und kann mit der Einfachheit des kleinen Nematoden nicht mithalten. Diese Tatsache verhilft dem Wurm sicher in mancher Hinsicht zu einem Forschungsvorsprung, die aber auch anders, nämlich als Wegbereiter für die Arbeit mit der Fruchtfliege, gesehen werden kann.

### 3.4. *Escherichia coli*

#### 3.4.1. *E. coli* als Modellorganismus

1946 begann an diesem gram-negativen, fakultativ anaeroben, vielen als meist ungefährliches Darmbakterium bekannten Organismus die molekularbiologische Forschung. Joshua Lederberg und Edward Tatum beschrieben an *E. coli* die bakterielle Konjugation [LEDERBERG, 1996]. Ebenso wurden die grundlegenden Erkenntnisse der Genetik des T4 Phagen mit Hilfe von *E. coli* gewonnen. Heute stehen Forschern viele Stämme zur Verfügung, die im Unterschied zu Wildstämmen die Eigenschaft verloren haben einen Biofilm auszubilden und somit nicht mehr den menschlichen Darm besiedeln können. Eine kleine Auswahl der über *E. coli* bis jetzt gewonnenen Erkenntnisse sind: mutante Phänotypen, metabolische und regulatorische Netzwerke, Kenntnisse über Genregulation, Proteinaktivität, mehrere 100 Enzymreaktionen, Stoffwechselwege, regulatorische Interaktionen und vieles mehr. Ein Meilenstein der *E. coli* Forschungsgeschichte war sicherlich die 1997 erfolgte Sequenzierung des Genoms durch unabhängig voneinander arbeitende Amerikanische und Japanische Gruppen [MORI, 2004]. Damit war das Bakterium der erste in dieser Hinsicht erforschte Organismus. Aktueller Forschungsschwerpunkt ist das „Post Genome Sequencing Project“: wofür kodieren die Gene, die Analyse der Transcriptome, das Gebiet der Proteomics mit der Lokation von Proteinen und der Protein – Protein Interaktion und der Bereich Metabolomics.

Folgende Webseiten bieten grundlegende, aber auch weiterführende Informationen über *E. coli*:

- **E. coli Genome Project:** [www.genome.wisc.edu/](http://www.genome.wisc.edu/)

Die University von Wisconsin war eines der ersten Forschungsinstitute, die die Genomsequenz von *E. coli* analysierten. Auf dieser Web Seite werden eine ständig aktualisierte Sequenzen des Genoms verschiedener Stämme veröffentlicht. Des Weiteren gibt es Informationen zu funktionellen Genomics und vielen anderen Bereichen.

- **ECDC – die *E. coli* Database Collection:** [www.uni-giessen.de/ecoli/ECDC/ecdc.html](http://www.uni-giessen.de/ecoli/ECDC/ecdc.html)

Diese Sammlung der Justus Liebig Universität in Giessen hat sich zum Ziel gesetzt alle Informationen zu dem klassischen *E. coli* Laborstamm K 12 zu vereinigen.

- **EcoCyc:** <http://ecocyc.org/>

EcoCyc ist eine Datenbank der BioCyc Datenbank Sammlung, die ihrerseits eine Genom-Datenbanksammlung für Mikroorganismen und Menschen ist. Sie wird veröffentlicht vom Institute for Genomic Research der University of California in San Diego und der National Autonomous University of Mexico.

3.4.2. Die Modellorganismen *E. coli* und *C. elegans* im Vergleich

Hier trifft *C. elegans* auf einen vermutlich noch leichter zu kultivierenden Organismus. Eine Petrischale, einige Salze und eine Kohlenstoffquelle, das ganze unter sterilen Bedingungen, die auch für die Kultivierung von *C. elegans* wichtig sind, mehr benötigt man für die Arbeit mit diesem Organismus nicht. Der Nachteil für *E. coli* liegt ganz einfach in der weit entfernten Verwandtschaft zu *Homo sapiens*. So ist *E. coli* eindeutig ein Modell für die Systembiologie. Seine Aufgabe in der angewandten Forschung liegt vor allem im Bereich der Biotechnologie: in der Produktion von Vakzinen, rekombinanter DNA und von Proteinen (z.B. Produktion von Insulin).

## 4. Folsäure

Die Folsäure ist ein Vitamin der B – Gruppe und erst seit 1941 bekannt. Herschel K. Mitchell und seine Kollegen isolierten sie 1941 an der University of Texas aus 4 Tonnen Spinatblättern [MITCHELL et al., 1941]. Über 100 Derivate der Pteroylmonoglutaminsäure werden unter den Begriffen Folsäure bzw. Folate zusammengefaßt [REHNER und DANIEL, 2002].

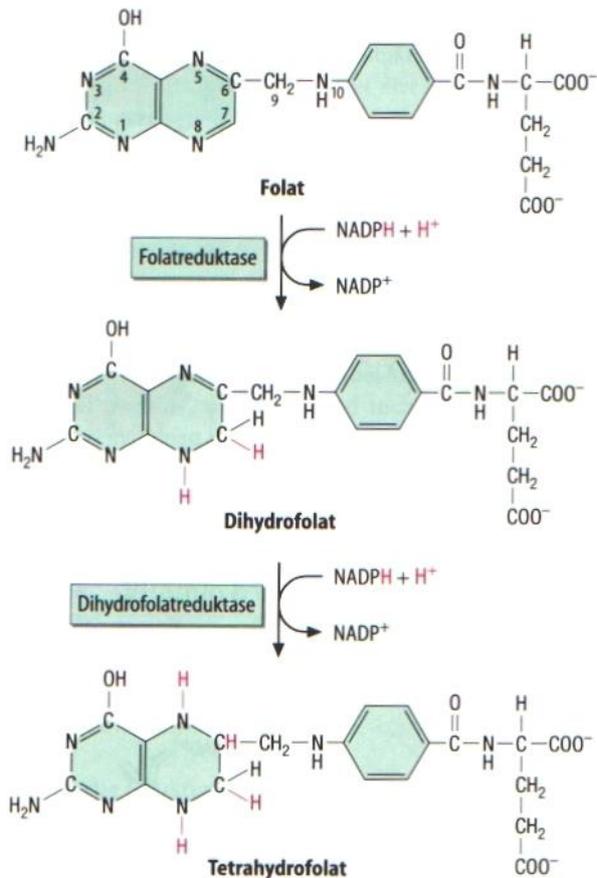
### 4.1. Folsäure bei *Homo sapiens*

#### 4.1.1. Struktur

Die Grundstruktur der Folsäure, das Pteroylmonoglutamat, besteht aus einem Pteridinkern, einer p-Aminobenzoessäure und einem L-Glutamat. Polyglutamate werden durch Anhängen von 2 bis 11 Glutamatresten (meist 3 bis 7) an die  $\gamma$ -Carboxylatgruppe gebildet [BIESALSKI und GRIMM, 2004].

Monoglutamate können Zellmembranen leichter passieren, Polyglutamate werden besser gespeichert und sind im Stoffwechsel aktiver [MORAN, 1999].

In der Nahrung kommen in der Zahl der gebundenen Glutamylreste verschiedene Formen vor. Die 5,6,7,8-Tetrahydrofolsäure ist die biologisch aktive Form. Sie wird aus dem aufgenommenen Folat durch Reduktion zur Dihydrofolsäure und weiters mittels der NADPH/H<sup>+</sup> - abhängigen Folatreduktase bzw. der Dihydrofolatreduktase zur Tetrahydrofolsäure reduziert (Abb. 5) [LÖFFLER et al., 2007].



**Abb. 5:** Die Bildung von Tetrahydrofolat aus Folat [LÖFFLER et al., 2007]

### 4.1.2. Vorkommen und Verfügbarkeit

Die häufigsten Formen der Folsäure in Lebensmitteln sind das Methyl-Tetrahydrofolat und das Formyl-Tetrahydrofolat. Die Anteile sind je nach Nahrungsmittel unterschiedlich [SHILS et al., 2006]. Studien zum Folatgehalt sind sehr aufwändig und wegen inadäquater Extraktion und unvollständiger Hydrolyse der Polyglutamatformen problematisch in der Methodik. So ergaben sich bis heute variierende Ergebnisse.

Zurzeit wird der Folatgehalt mit dem Begriff Folat-Äquivalent gemessen. Dies ist die Summe aller wirksamen Folatverbindungen in der Nahrung:  $1\ \mu\text{g Folat-Äquivalent} = 1\ \mu\text{g Nahrungsfolat} = 0,5\ \mu\text{g synthetische Folsäure (PGA - Pteroylmonoglutaminsäure)}$  [MEDICINE, 1998].

Besonders reich an Folsäure sind: Spinat, Salat, Spargel und Getreide (Weizenkeime und -kleie). Folate sind aber nicht nur in pflanzlichen, sondern auch in tierischen Nahrungsmitteln, wie z.B. Leber, enthalten. Relativ folsäurearm sind hingegen Rindfleisch, Fisch und Obst (siehe Tab. 1).

#### 4. Folsäure

---

Laut H. K. Biesalski bestehen in Bezug auf die Bioverfügbarkeit der Folate große Unterschiede. In vielen Nahrungsmitteln sind Inhibitoren, die die Konjugaseaktivität herabsetzen, enthalten. Zusätzlich ist die Folsäure oxidations- und lichtempfindlich [BIESALSKI et al., 2002].

**Tab. 1:** Folsäuregehalt ausgewählter Lebensmittel [BIESALSKI et al., 1999]

<b>Lebensmittel</b>	<b>Folsäuregehalt (µg FÄ pro 100g)</b>
<b>Fleisch und Eier</b>	
Rinderleber	108
Schweineleber	108
Eidotter	127
<b>Getreide, Getreideprodukte</b>	
Hafermehl	21
Roggenvollkornmehl	40
Weizenvollkornmehl	43
Weizenkeime	271
Weizenkleie	159
<b>Gemüse, Salate, Nüsse</b>	
Broccoli	103
Endivie	116
Grünkohl	47
Karfiol	60
Kohl	66
Rote Rüben	74
Spargel	59
Spinat	134
Erdnüsse, geröstet	40
Walnüsse	55

Die Unterschiede in der Absorptionsfähigkeit, in der Form und auch in der Proteinanbindung führten zu einer Festlegung der Bioverfügbarkeit von 50%. Nach neuesten Erkenntnissen liegt sie für Nahrungsfolat bei 85%, bei zugesetzter synthetischer Folsäure bei 100% [SHILS et al., 2006].

#### 4. Folsäure

---

Die DACH – Referenzwerte<sup>4</sup> für die tägliche Nahrungszufuhr, inklusive von Sicherheitszuschlägen, liegen für Erwachsene bei 400 µg Folat-Äquivalent pro Tag. Für Kinder liegt die Empfehlung, bezogen aufs Körpergewicht, relativ betrachtet, höher (siehe Tab.2). Kinder benötigen – ebenso wie Erwachsene – eine ausreichende Folatversorgung für die Erhaltung der Anzahl der Blutzellen und für die Regenerationsfähigkeit von Epithelien. Zusätzlich benötigen Kinder aber Folsäure für eine ausreichende Vermehrung und ein optimales Wachstum der Zellen, da sie eine wichtige Funktion im DNA – Stoffwechsel hat. [BIESALSKI et al., 1999].

Spezielle Untersuchungen des Bedarfs von Kindern und Jugendlichen gibt es bis jetzt keine (Recherche in PubMed am 11.08.2008). Daher wurden die empfohlenen Einnahmemengen nur von den Bedarfswerten für Erwachsene interpoliert. Als Anhaltspunkte wurden die Folatmengen, bei denen eine genügende Versorgung mit ausreichender Sicherheit angenommen werden kann, verwendet. Die von der DACH festgelegten Mengen sind in Tab. 2 angeführt.

**Tab. 2:** Empfohlene tägliche Zufuhr von Folsäure (µg Folatäquivalent) [DACH, 2000]

Altersgruppe	Folsäure (µg Folatäquivalent)
0 bis unter 4 Monate	60
4 bis unter 12 Monate	80
1 bis unter 4 Jahre	200
4 bis unter 10 Jahre	300
ab 10 Jahren	400
Schwangere <sup>5</sup>	600
Stillende	600

---

4 Die DACH – Referenzwerte für die Nährstoffzufuhr werden von der Deutschen Gesellschaft für Ernährung (DGE), der Österreichischen Gesellschaft für Ernährung (ÖGE), der Schweizerischen Gesellschaft für Ernährungsforschung (SGE) sowie der Schweizerischen Vereinigung für Ernährung (SVE) seit dem Jahr 2000 herausgegeben. In Anlehnung an die üblichen Kennzeichen der beteiligten Länder (Deutschland = D; Österreich = A; Schweiz = CH) werden die neuen Referenzwerte als DACH-Referenzwerte bezeichnet.

5 Frauen im gebärfähigen Alter sollten zusätzlich 400 µg synthetische Folsäure (= Pteroylmonoglutaminsäure/PGA) in Form von Supplementen aufnehmen, um Neuralrohrdefekten vorzubeugen. Diese erhöhte Folsäurezufuhr sollte spätestens 4 Wochen vor Beginn der Schwangerschaft erfolgen und während des ersten Drittels der Schwangerschaft beibehalten werden.

### 4.1.3. Resorption, Metabolismus und Funktion

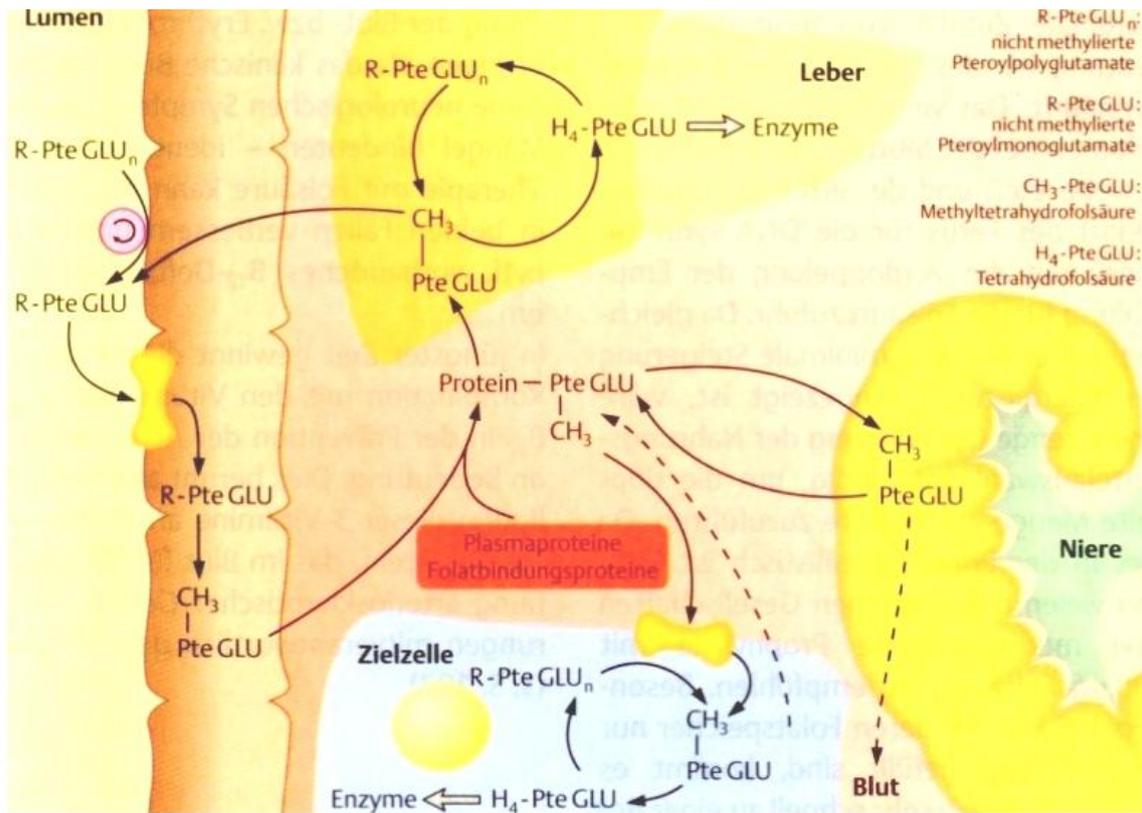
Folate werden einerseits im Duodenum und proximalen Jejunum über einen aktiven energieabhängigen Transportmechanismus mit Sättigungskinetik (ca 200µg) andererseits unspezifisch und unlimitiert im Ileum aufgenommen (Abb.6). Die Folatresorption ist bei einem pH – Wert von 6,3 am größten. Von der Dünndarmmukosa können nur Monoglutamate aufgenommen werden, so werden die in der Nahrung überwiegend vorkommenden Polyglutamatverbindungen (60-80%) vor der Aufnahme durch eine im Bürstensaum und /oder im Darmsaft enthaltenen  $\gamma$  – Glutamylcarboxypeptidase (Konjugase) zu resorbierbaren Monoglutamaten abgebaut.

Die Monoglutamate werden im Darm durch den „reduced folate carrier“ (RFC), der eine hohe Affinität für reduzierte Folate besitzt und in der Bürstensaummembran sitzt, aufgenommen [ANTONY, 1996, SIROTNAK und TOLNER, 1999]. In der Zelle werden die Monoglutamate in Methyl-THF umgebaut und anschließend mit einem weiteren Carrier ins Blut transportiert. Dieser Prozess geschieht ca. eine Stunde nach der Nahrungsaufnahme.

Im Ileum werden große Mengen nicht reduzierter Folsäure unmodifiziert in den Blutstrom geleitet. Im Blut ist das meiste Folat unspezifisch an Proteine, wie z.B. Albumin, gebunden. Nur eine geringe Menge des Serumfolats hängt an Folatrezeptoren von Zellmembranen.

Die Rollen beider Transportmechanismen sind noch unklar. Die spezifischen Folatbinder sind jedenfalls auch in der Muttermilch vertreten, hier wird vermutet, dass die Aufnahme durch Bakterien verhindert werden soll [SHILS et al., 2006].

In der Leber werden die oxidierten Folate zu den verwertbaren Tetrahydrofolaten reduziert. Methyl-Tetrahydrofolsäure, die häufigste Folatverbindung im Plasma und in Geweben beim Menschen [SHILS et al., 2006], wird nach Aufnahme in die Leber schnell quantitativ in die Galle sezerniert und unterliegt einem enterohepatischen Kreislauf. In Geweben kommt Folsäure überwiegend in der Polyglutamatform vor, während im Blut ausschließlich Monoglutamate auftreten [BIESALSKI et al., 2002]. Die Aufnahme in Leber, Hirn und anderen Geweben erfolgt auch mit dem RFC.



**Abb.6:** Metabolismus der Folsäure [BIESALSKI und GRIMM, 2004]

Die Folatverbindungen wirken als Coenzyme für Übertragungen von Ein-Kohlenstoffgruppen, die bei verschiedenen Reaktionen im Stoffwechsel entstehen (siehe auch Abb.7 und 8):

- Methylierung von Homocystein zu Methionin
- Umwandlung von Glycin in Serin
- Histidinstoffwechsel
- Cholinbiosynthese (Phospholipidstoffwechsel)
- Purinsynthese
- Pyrimidinsynthese (DNA- und RNA-Synthese)

Zur Aktivierung werden die kovalent gebundenen Gruppen vor allem durch Dehydrogenasen reversibel in unterschiedliche Oxidationsstufen überführt, so dass unter anderem Methyl-, Methylen-, Methenyl- und Formylreste entstehen. Als Träger der Ein-Kohlenstoffgruppen dienen nur die Stickstoffatome des Pterinringes in Position fünf und zehn.

Abb.7 zeigt eine Zusammenfassung aller wichtigen Reaktionen mit Tetrahydrofolat (THF) als Coenzym. Die Aminosäure Serin ist die Hauptquelle für Ein-Kohlenstoffgruppen. Durch eine Pyridoxalphosphat-abhängige Reaktion wird die Hydroxymehtyl-Gruppe des Serins an das THF übertragen. Aus diesem Zwischenprodukt entsteht durch  $\text{H}_2\text{O}$  - Austritt  $\text{N}^5, \text{N}^{10}$ -Methylen-THF (1) Die Reaktion ist reversibel, aus dem entstandenen Glycin könnte wieder Serin synthetisiert werden.

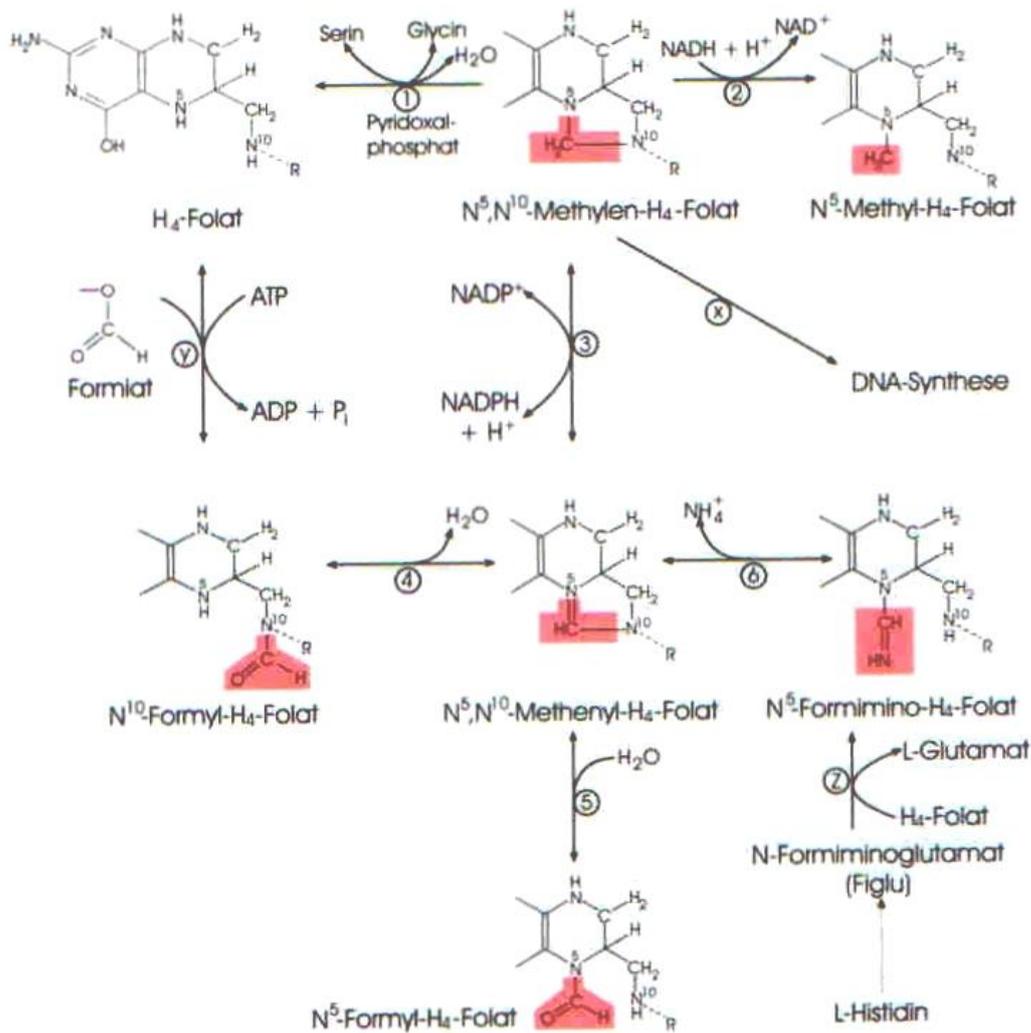
Durch NADH wird  $\text{N}^5, \text{N}^{10}$ -Methylen-THF zu  $\text{N}^5$ -Methyl-THF reduziert (2), welches als Methylgruppen-Donator bei verschiedenen Methylierungen dient, wie z.B. die Synthese von Methionin aus Homocystein. Hier ist das Vitamin  $\text{B}_{12}$  in Form von Methylcobalamin der Zwischenträger der  $\text{CH}_3$ -Gruppe. Die  $\text{CH}_3$ -Gruppen zur Cholin - Methylierung kommen auch vom  $\text{N}^5$ -Methyl-THF.

$\text{N}^5, \text{N}^{10}$ -Methylen-THF ist auch bei der DNA-Synthese beteiligt, es stellt die Methylgruppen für das Thyamin und das Hydroxymethylcytosin zur Verfügung (x).

$\text{N}^5$ -Methylen-THF kann mittels NADP auch zu  $\text{N}^5, \text{N}^{10}$ -Methenyl-THF dehydriert werden (3). Dieses steht im Gleichgewicht mit  $\text{N}^{10}$ -Formyl-THF (4), welches die C2- und C8-Atome des Purinkerns liefert.  $\text{N}^{10}$ -Formyl-THF entsteht in geringen Mengen auch durch eine ATP-abhängige Reaktion durch direkte Übertragung des Formiats auf die Tetrahydrofolsäure (y).

Die Aminosäure Histidin ist eine weitere Quelle von Ein-Kohlenstoff-Resten. Ihr Abbau läuft über N-Formiminoglutamat (Figlu). Der Formiminorest wird auch auf Tetrahydrofolsäure übertragen (z). Nach Desaminierung geht das so entstandene  $\text{N}^5$ -Formimino-THF in  $\text{N}^5, \text{N}^{10}$ -Methenyl-THF über (6).

$\text{N}^5, \text{N}^{10}$ -Methenyl-THF wird durch hydrolytische Spaltung der Bindung zwischen dem  $\text{N}^{10}$ - und dem benachbarten C-Atom in Folsäure oder  $\text{N}^5$ -Formyl-THF umgewandelt (5) [REHNER und DANIEL, 2002].



**Abb.7:** Interkonversion der Ein-Kohlenstoff-Einheiten an der Tetrahydrofolsäure [REHNER und DANIEL, 2002].

#### 4.1.3.1. Anti – Aging – Wirkung

Ca. 29% aller Senioren weisen eine unzureichende Folatversorgung auf [WOLTERS et al., 2004]. Anti-Aging-Medizin bedeutet vor allem die Prävention altersassoziierter Erkrankungen und daraus resultierender Komplikationen. Hier stehen an erster Stelle die vaskulären Krankheiten (koronare und periphere arterielle Erkrankungen, myokardiale Infarkte, Schlaganfälle,

venöse Thrombosen). In ganz Europa liegt die jährliche Todesrate bei etwa 4 Millionen. In den deutschsprachigen Ländern Deutschland, Österreich und Schweiz waren dies 2001 46% aller Todesfälle [STANGER et al., 2003]. Arteriosklerose kann oft schon in jungen Jahren diagnostiziert werden und kann somit auch auf lange Sicht gesehen prophylaktisch behandelt werden.

Ein hoher Homocystein Spiegel wird seit kurzer Zeit aber auch als Risikofaktor für Osteoporose gesehen. Einerseits dürfte Homocystein die Resorption von Knochenmaterial stimulieren, andererseits wird die Kollagen – Vernetzung gestört, vermutlich durch eine Inhibition der Lysil Oxidase, die eine wichtige Rolle bei der Kollagen Synthese spielt [HERRMANN et al., 2007].

Mangel an Folsäure und/oder eine eingeschränkte MTHFR – Funktion sind auch Ursache für colorektale Krebserkrankungen, dies zeigen verschiedene epidemiologische Studien [POWERS, 2005].

Auch Depressionen und Demenzerkrankungen sind häufig mit einem Defizit an Folsäure verbunden. Dies liegt an der Bedeutung von Folsäure bei der Transmethylierung neuroaktiver Verbindungen, wie Myelin und Neurotransmittern („Hypomethylierungshypothese“)

Hyperhomocysteinämie und Homocysteinurie sind Risikofaktoren (Stoffwechsel siehe Kapitel 4.1.4.). Diese können durch Enzym- oder Vitaminmangel hervorgerufen werden. Eine Reduktion der Plasma – Homocystein - Konzentration könnte theoretisch bis zu 25% der kardiovaskulären Vorfälle verhindern [STANGER et al., 2003]. Es besteht ein geschlechtsspezifischer Unterschied, der bei Personen im Alter von ca. 40 Jahren bei ca. 2 µmol/l Homocystein im Plasma liegt. Dies lässt sich vermutlich auf den höheren Östrogen Spiegel bei Frauen zurückführen, da dieser Unterschied nach der Menopause verschwindet. Der altersbedingte Anstieg kann durch die mit steigendem Alter verminderte Nierenfunktion erklärt werden [CLARKE et al., 1999, GRAHAM, 1999]. Auch eine bei älteren Menschen häufiger vorkommende nicht ausgeglichene Ernährung und somit eine Unterversorgung mit Folsäure kann zu einer Hyperhomocysteinämie führen. Durchschnittlich erreicht sie nur ein Drittel der empfohlenen Zufuhr. Nach M.A. Wolters führt auch eine atropische Gastritis vom Typ B, die die gastrale Säure- und Pepsinogen Sekretion vermindert und in Folge auch die Folat Absorption. 20 bis 50 % der Senioren sind davon betroffen [WOLTERS et al., 2004].

##### 4.1.3.2. Mangelerscheinungen

Ein Folatmangel kann sich, abhängig von Ernährung und Reserven im Körper, innerhalb von 1 bis 4 Wochen einstellen. Die frühen Symptome sind unspezifisch, sie schließen Müdigkeit, Reizbarkeit und Appetitlosigkeit ein. Ein Defizit an Folsäure ist der weitverbreitetste Vitaminmangel in Europa [STANGER et al., 2003]

Schwerer Folatmangel führt in fast allen Fällen in kurzer Zeit zu megaloblastischer Anämie, die auch durch den Mangel an Cobalamin verursacht werden kann. Durch die Verbindung der beiden Stoffwechselforgänge wird auch klar, warum der Mangel der beiden Vitamine zum selben Krankheitsbild führt (Erklärung des Stoffwechsels siehe 4.1.4.). Ein Mangel an DNA im Zellkern führt zu einer verzögerten Zellteilung und somit wachsen die Erythrozyten weiter und werden macrocytisch. Auch andere sich häufig teilende Zellen können betroffen sein, wie z.B. Epithelzellen des Verdauungstraktes. Des Weiteren ist die Blutbildung ineffizient, da die Blutzellvorstufen zwar reichlich im Knochenmark gebildet werden, allerdings sterben sie früh ab und kommen nicht in den Blutstrom [SHILS et al., 2006].

Eines von 1000 Kindern weltweit wird mit einem Neuraltubusdefekt (NTD) geboren, wobei diese Zahl weltweit großen Schwankungen unterworfen ist. Bei NTD handelt es sich um eine komplexe Störung des Zentralnervensystems. In einer frühen Phase der Embryogenese, 28 Tage nach der Befruchtung, schließt sich das Neuralrohr. Dieser Vorgang ist beim Auftreten von NTB gestört. Die zwei häufigsten Formen sind Anencephalie und Spina bifida.

Kinder mit Anencephalie sind nicht lebensfähig, da durch die nicht stattfindende Neurulation am kranialen Ende der Großteil des Gehirngewebes fehlt. Spina bifida tritt am kaudalen Ende auf, sie zeigt sich als offene Wunde, kann aber auch geschlossen sein. Oft kommen Störungen der Nerven oder des Rückenmarks vor. In Kalifornien, USA, übersteigen die Kosten für Kinder, die mit Spina bifida geboren sind, 81 Millionen US \$ pro Jahr [BLOM et al., 2006].

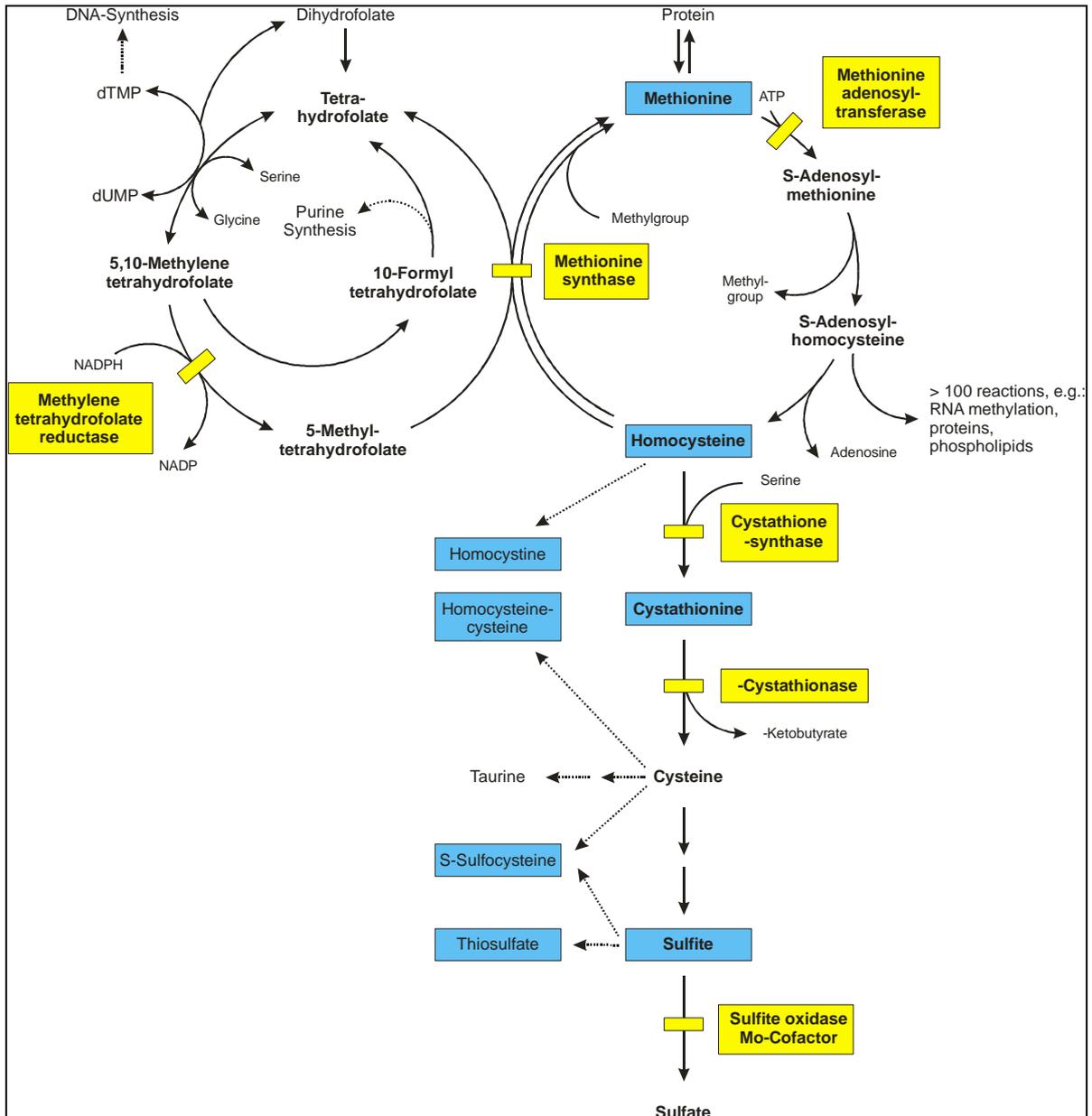
Seit über 20 Jahren ist bekannt, dass die Wahrscheinlichkeit eines NTD durch die Gabe von Folsäure sinkt. Trotzdem ist noch nicht klar, warum ein bestimmter Prozentsatz von Frauen trotz Folsäure Supplementation Kinder mit NTD bekommt. Das heißt, die genauen Mechanismen wie es zu NTD kommt, sind noch nicht bekannt. Allgemein wird angenommen, dass neben Umwelt- und Ernährungsfaktoren der Folatmetabolismus und das Risiko für NTD genetisch festgelegt sind. Hier wird an erster Stelle der MTHFR Polymorphismus genannt. In einer Metaanalyse fasste eine Gruppe rund um Henk Blom alle verfügbaren Studien zu diesem Thema zusammen [BLOM et al., 2006].

Seit 1998 werden in den USA Getreideprodukte mit Folsäure (140µg/100g) angereichert um vorbeugend gegen Neuralrohrdefekte bei Neugeborenen zu wirken [SHILS et al., 2006]. Jedenfalls sind die Serumfolat-Level in der Gesamtpopulation und bei Patienten unter ärztlicher Kontrolle signifikant angestiegen [LAWRENCE et al., 1999] und megaloblastäre Anämie auf Grund eines Folat Defizits ist mittlerweile sehr selten.

## 4. Folsäure

### 4.1.4. Der Folsäure - Stoffwechsel und die Rolle des MTHFR – Enzyms

Die Methyl-Tetrahydrofolsäure hat zwei Funktionen. Einerseits ist sie der Methyl - Donator für die Synthese von Methionin aus Homocystein durch die Methionin - Synthase, andererseits ist sie die Vorstufe zur stoffwechselaktiven Tetrahydrofolsäure. Ist das MTHFR – Enzym gestört, so kann das 5,10-Methylen-THF nicht zu Methyl-THF umgebaut werden und es kommt zu einem Engpass.



**Abb.8:** Die Rolle des MTHFR im Methionin und Homocystein Kreislauf (erhalten von Prof. Jürgen König)

Der Mangel an THF führt somit vor allem zu Störungen bei der Methylierung von Desoxyuridin-monophosphat zu Desoxy-thymidin-monophosphat. Dies initiiert den Prozess, der zur megaloblastären Anämie führt. Das überschüssige Uracil wird an Stelle des fehlenden Thymidins in die DNA eingebaut. Ab einer bestimmten Menge der falsch eingebauten Nukleinsäure kommt es zum Bruch des Doppelstranges und somit zu chromosomalen Schädigungen [BLOUNT et al., 1997, WICKRAMASINGHE, 1999].

Methionin wird in weiterer Folge zu S-Adenosyl-methionin umgewandelt, welches bei vielen wichtigen Methylierungsprozessen von Proteinen, Nukleoproteinen (z.B.: Methylierung der DNA-Cytosine), Histonen, Neurotransmittern und Phospholipiden als Methylgruppendedonator fungiert [CLARK und BANFIELD, 2001].

1988 beschrieben KANG ET AL. eine thermolabile MTHFR – Variante als Grund für eine herabgesetzte MTHFR – Aktivität und erhöhte Homocystein – Konzentrationen. Die Enzymaktivität geht bei Temperaturen über 37°C verloren. Dass ein sogenannter SNP, ein Single Nucleotide Polymorphismus – die Mutation einer einzelnen Base, die Ursache war, wurde 1995 erstmals beschrieben [FROSST et al., 1995]. Cytosin wird durch Thymin ersetzt und somit statt der Aminosäure Alanin die Aminosäure Valin bei der Proteinsynthese eingebaut wird, dies verursacht die Thermolabilität. Die genaue Position dieser Mutation ist am Chromosom 1, im Genlocus p36.3 (1p36.3), die Mutation befindet sich am Nukleotid 677.

Ein MTHFR Defizit ist eine autosomale rezessive Störung mit verschiedenen Ausprägungsmöglichkeiten. Homocysteinurie, Homocysteinämie, Entwicklungsstörungen, verschiedene mentale Retardationen, perinataler Tod, psychische Störungen, neurodegenerative Störungen und erhöhte Anfälligkeit für einen ischämischen Schock können die Folge sein. Ebenso ist die Wahrscheinlichkeit für Neuraltubus Defekte höher [UNIPROT, 2008]<sup>6</sup>.

#### 4.2. Die Rolle des MTHFR – Enzyms bei *C. elegans*

*C. elegans* besitzt ein orthologes (funktional verwandtes und von einem gemeinsamen Vorläufer abstammendes) Gen zum MTHFR – Gen von *Homo sapiens* (MSH HOMEODOMAIN BOX HOMOLOG 1) mit dem Sequenznamen C06A8.1, auch benannt als 2I64. Bei WormBase hat es die Gen-ID WBGENE00015512. In Tab. 3 sind die 3 Modelle mit ihrem Status, der Anzahl von

---

<sup>6</sup> Die **Universal Protein Database** ist die größte bioinformatische Datenbank für Proteine und enthält zahlreiche Informationen über Funktion und Struktur von Proteinen. Sie wird alle 14 Tage aktualisiert [THE UNIPROT CONSORTIUM, 2007]

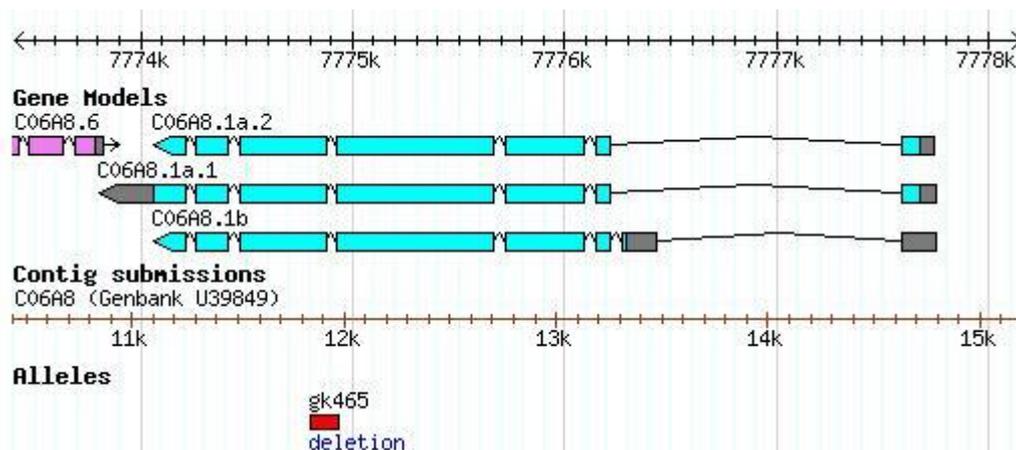
#### 4. Folsäure

Basenpaaren für kodierende und transkribierte Nukleotide, die Proteine und die Anzahl der Aminosäuren aufgelistet. Die beiden Genmodelle C06A8.1a.1 und C06A8.1a.2 unterscheiden sich nur in der Anzahl der transkribierten Nukleotide. Diese hat keinen Einfluss auf die 663 translatierten Aminosäuren und das synthetisierte Protein, WP:CE30593. Das dritte Genmodell, C06A8.1b unterscheidet sich nicht nur in der Anzahl transkribierter Nukleotide (3687 Basenpaare), sondern auch in der Zahl der kodierenden Nukleotide (1929 Basenpaare). In Folge werden natürlich auch weniger Aminosäuren translatiert (642) und es kommt zur Synthese eines anderen Proteins, WP:CE31291. Welche phänotypischen Auswirkungen dies hat, wurde bis jetzt noch nicht untersucht.

**Tab. 3:** Gen-Modelle von C06A8.1, Erklärung siehe Text, Bp = Basenpaare, Quelle: [www.wormbase.org](http://www.wormbase.org)

Gen Modell	kodierende Nukleotide	transkribierte Nukleotide	Protein	Aminosäuren
C06A8.1a.1	1992 Bp	3953 Bp	WP:CE30593	663
C06A8.1a.2	1992 Bp	3683 Bp	WP:CE30593	663
C06A8.1b	1929 Bp	3687 Bp	WP:CE31291	642

Die interpolierte Lage des Gens ist auf dem Chromosom II an der Position 0.56 bzw von Basenpaar 7777755 bis Basenpaar 7773803 in der in Abb. 9 dargestellten Genomumgebung.



**Abb. 9:** Genomumgebung der 3 C06A8.1 Modelle [WORMBASE, WS188].

C06A8.1 wird sowohl in den Larvenstadien als auch im Adultstadium exprimiert. Die larvale Expression erfolgt in Pharynx, Intestinum, Hypodermis, Nervensystem, Nervenring und in den Kopfneuronen. Beim Adultstadium gibt es keine Expression im Pharynx dafür zusätzlich im Reproduktionssystem und in der Vulvamuskulatur.

In fünf wissenschaftlichen Publikationen wurden Versuche mit RNAi an diesem Gen gemacht:

Die RNAi Sammlung von R.S. Kamath enthält 16.757 Bakterienstämme, die für 86% der 2003 19.427 *C. elegans* Gene homologe dsRNA produzieren. Durch Fütterung von *C. elegans* Bristol N2, dem Standard Wildtyp-Stamm, mit einem bestimmten Bakterienstamm kann so ein bestimmtes Gen ausgeschaltet werden und es kommt zur Ausbildung eines sogenannten „loss-of-function“ – RNAi Phänotyps. 10% der Gene zeigten einen solchen Phänotyp. Die Interferenz von C06A8.1, das der Metabolismusfunktionsgruppe zugeordnet ist, ergibt einen „Gro RNAi Phänotyp“, das heißt die Tiere haben ein verlangsamtes postembryonales Wachstum [KAMATH et al., 2003].

F.C. Simmer machte einen ähnlichen Versuch mit einem RNAi – hypersensitiven Stamm, dem *rrf-3* Mutanten. 23% der Gene zeigten eine andere phänotypische Ausprägung. Auch hier hatten die Tiere mit RNA Silencing am C06A8.1 Gen ein verlangsamtes postembryonales Wachstum [SIMMER et al., 2003].

Die Arbeitsgruppe um Jean-Francois Rual machte einen ähnlichen Versuch mit HT (high-throughput) RNAi mittels der „ORFeome RNAi v1.1 Library“, die eine Sammlung aus von ORFs (open reading frames) hergestellten dsRNAs ist [REBOUL et al., 2003]. Hier wurden keine Anomalitäten beobachtet [RUAL et al., 2004]. Ebenso beim Versuch von B. Sönnichsen: Diese Gruppe machte ein RNAi - Screening aller in den ersten zwei Zellteilungsdurchgängen benötigten Gene in der Embryonalentwicklung von *C. elegans*. Die Zellteilungen wurden mit zeitverzögerter Videomikroskopie aufgezeichnet. Auch hier wurden keine Abweichungen bei der Stummschaltung von C06A8.1 gefunden [SÖNNICHSEN et al., 2005]. Die Ergebnisse für alle Gene sind in der Phenobank ([www.phenobank.org](http://www.phenobank.org)) zu finden.

Eine Rolle spielt C0A8.1 auch bei der osmoprotektiven Genexpression durch *gpdh-1*. Bei einem RNAi Screening von ca 16.000 Genen entdeckte die Forschungsgruppe um T. Lamitina. 122 Gene, die an der Aktivierung dieses Gens beteiligt sind, eines davon ist C06A8.1 [LAMITINA et al., 2006]

Beim CGC sind 3 verschiedene Stämme betreffend C06A8.1 erhältlich: VC10007 mit einer homozygoten Deletion und 2 transgene Stämme: BC10398 und BC13891.

### 4.3. Die Bedeutung der Folsäure bei *C. elegans*

Bis jetzt gibt es keine Untersuchungen über die Bedeutung der Folsäure bei *C. elegans*. Einzige die Arbeitsgruppe rund um K. Balamurugan hat über zwei vermutliche Folattransporter, (folt-1 und folt-2), die dem menschlichen Folattransporter (hRFC: human reduced folat carrier) ortholog sind, gearbeitet [BALAMURUGAN et al., 2007].

Am Emerging Focus Nutrigenomics werden zurzeit 3 verschiedene Wege verfolgt um dieses Thema zu bearbeiten. Diese sollen im Folgenden näher erklärt werden.

#### 4.3.1. *Escherichia coli* K 12

Bei diesem *E. coli* Stamm wurde die kodierende Region des Dehydrofolatreduktasegens durch eine Kanamycin (ein Antibiotikum) resistente Determinante ersetzt. Diese Mutation wurde einerseits in einen Wildtyp-Stamm, der nicht überlebensfähig ist, und andererseits in einen Thymidin auxotrophen Stamm transferiert. Dadurch ist die Folatproduktion gestört und die Bakterien produzieren weniger Folat [HERRINGTON und CHIRWA, 1999].

Zurzeit werden Fütterungsversuche mit der Thymidin auxotrophen *E. coli* Mutante durchgeführt und ihre Auswirkung auf Wachstum, Körperform und Reproduktion beobachtet.

#### 4.3.2. Flüssigmedium

Eine alternative Kultivierungsmöglichkeit zu NGM ist die Haltung in axenischem Flüssigmedium nach Iqbal Hamza [HAMZA, k.A.]. Das Medium besteht aus 50% CeHR – Medium (*C. elegans* habitation and reproduction medium) und 20% 3%iger Milch. Bei Bedarf werden 2 µl/ml Medium Gentamycin (ein Antibiotikum) zugesetzt. CeHR ist ein Mix aus verschiedenen Salzen, Vitaminen und Nukleinsäuren, der speziell auf die Bedürfnisse von *C. elegans* abgestimmt ist. Die Rezepturen zur Zubereitung sind im Anhang zu finden.

Der Vorteil gegenüber der Züchtung auf NGM liegt darin, dass das Flüssigmedium in seiner Zusammensetzung verändert werden kann. So ist es möglich einzelne Bestandteile wegzulassen bzw. neue zuzusetzen um gezielt die Folgewirkungen zu untersuchen.

Bis jetzt sind keine Studien bekannt, ob Folsäure für *C. elegans* essentiell ist oder ob die Tiere sie selbst synthetisieren können. Da das CeHR – Medium auch Folsäure enthält, sind Untersuchungen geplant in denen gezielt ein Folsäuremangel hergestellt wird um die resultierenden Folgewirkungen zu beobachten.

### 4.3.3. RNA - Interferenz

RNA – Interferenz ist eigentlich ein natürlicher Mechanismus eukaryotischer Organismen um virale DNA gezielt auszuschalten. Sie beruht darin, dass die während der Reproduktion viralen Genoms produzierte dsRNA von der Zelle erkannt und abgebaut wird. Das Wissen um diese Funktion machte sie in den letzten Jahren aber auch zu einer wichtigen Methode in der molekularbiologischen Forschung um die Expression einzelner Gene zu deaktivieren.

Für die Erstbeschreibung der RNAi an *C. elegans* [FIRE et al., 1998] erhielten Andrew Z. Fire und Craig C. Mello 2006 den Nobelpreis.

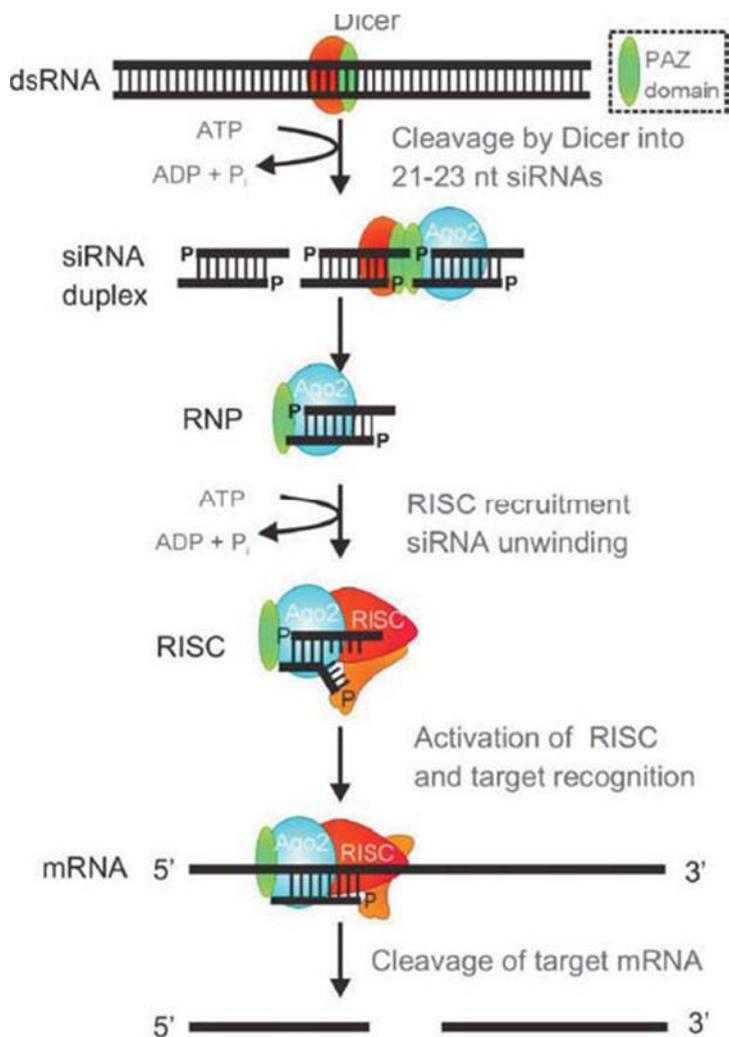
Bis heute sind schon einige Arten RNA – vermittelter Genabschaltung bekannt und es ist noch nicht klar, ob sie alle unter demselben Mechanismus zusammenfassbar sind. Trotzdem lassen sich einige allgemeine Aussagen treffen. Ein gemeinsames Merkmal ist der sogenannte „Dicer“, eine doppelstrangspezifische RNAase der RNase III - Familie, die dsRNA in Fragmente von 21 bis 25 Nukleotiden spaltet [GRAW, 2006], die siRNA. Diese bildet mit verschiedenen Proteinen einen RISC (RNA – induced silencing complex). Mit Hilfe von ATP trennt der RISC den RNA – Doppelstrang, die siRNA erkennt die Zielsequenz und diese wird vom Proteinkomplex des RISC ausgeschaltet (siehe Abb. 10)

Seit ihrer Entdeckung ist die RNA - Interferenz bzw. das RNA - Silencing eine molekularbiologische Methode der reversiblen Genetik um gezielt Gene oder Genabschnitte zu deaktivieren und so Phänotypen mit Fehlfunktionen zu erhalten, die dann einen Rückschluss auf die Genfunktion erlauben. Es werden verschiedene DNA – Matrizen für die dsRNA - Synthese verwendet: DNA – Fragmente, cDNAs, ORFs oder die „inducible hairpin RNAi“ [TAVERNARAKIS et al., 2000].

RNAi kann auf verschiedene Arten durchgeführt werden, abhängig wie die dsRNA verabreicht wird. Dies ist möglich durch Injektion [FIRE et al., 1998], Fütterung [TIMMONS und FIRE, 1998] oder Einweichen der Tiere in einer Lösung mit dsRNA [TABARA et al., 1998]. Die effektivste, aber auch aufwändigste Methode ist die direkte Mikroinjektion ins Cytoplasma des Intestinums [TABARA et al., 1998].

Auch der Zeitpunkt der Zugabe kann bei unterschiedlichen Larval- bzw. Entwicklungsstadien erfolgen.

Geplant ist eine Untersuchung mit gezieltem Ausknocken des MTHFR-Gens von *C. elegans*. Die genaue Methodik ist noch nicht festgelegt.



**Abb. 10:** Mechanismus der RNA – Interferenz: Die anfängliche doppelsträngige RNA (dsRNA) wird durch die Nuklease Dicer in kleine, interferierende RNA – Fragmente (siRNA) gespalten. Dicer bildet dabei über seine PAZ – Domäne (Piwi-Argonaute-Zwille – das sind verwandte Proteine aus *Drosophila*) einen aktiven Komplex mit anderen Proteinen. Diese so gebildete doppelsträngige siRNA bildet mit Proteinen einen Ribonucleotid-Protein-Komplex (RNP); durch Entspiralisierung der siRNA und Hinzufügen weiterer Proteine bildet sich der RNA-induzierte Abschalt-Komplex (engl. RNA-induced silencing complex, RISC). Die einzelsträngige siRNA kann dann spezifisch an ihre Ziel-mRNA binden [ARENZ und SCHEPERS, 2003, GRAW, 2006].



## **5. Praktische Arbeiten zur Etablierung von *C. elegans* als Modellorganismus im Labor**

Um den Umgang mit *C. elegans* zu erlernen, wurden am Emerging Focus Nutrigenomics einige grundlegende Versuche durchgeführt. Für diese Arbeit waren dies die erste Untersuchung der Lebensdauer und ein Versuch zur Feststellung der Nachkommenzahl. Diese beiden Versuche wurden wie folgt durchgeführt:

### **5.1. Material**

#### 5.1.1. Chemikalien

**Tab. 4:** Verwendete Chemikalien mit Angabe der Bezugsfirma und deren Standort.

Chemikalie	Firma
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Agar	Roth, Karlsruhe
Pepton	Roth, Karlsruhe
Calciumchlorid	Roth, Karlsruhe
Cholesterin	Roth, Karlsruhe
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Magnesiumsulfat	Roth, Karlsruhe
Nystatin	Roth, Karlsruhe
LB Agar	Roth, Karlsruhe
LB Medium	Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxid	Roth, Karlsruhe
Dikaliumhydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe
Kaliumdihydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe
Haushaltsbleiche (Danchlor)	Drogerie

5.1.2. Geräte

**Tab. 5:** Verwendete Geräte mit Angabe der Bezugsfirma und deren Standort.

Gerät	Firma
Autoklav Varioklav Dampfsterilisator 500	H+P Labortechnik, Oberschleissheim
Laminar Flow ESCO	Ehret, Tulln
beheizbarer Magnetrührer RCT basic	IKA, Staufen
Pipettierhilfe Easypet	Eppendorf, Wien
Kolbenhubpipette	Eppendorf, Wien
Spiritusbrenner	Roth, Karlsruhe
Stereomikroskop Wild Heerbrugg(Vergrößerung:6x bis 40x )	Kern, Aarau
Kühlbrutschrank Selecta	Selecta, Barcelona
Vortex MS1 Minishaker	IKA, Staufen
Zentrifuge Jouan BR4i multifunction	Thermo Scientific, USA
Wasseraufbereitungsanlage Easypure LF	Thermo Scientific, USA
Unterlicht intralux 6000	Volpi, Schlieren

### 5.1.3. Verbrauchsmaterialien

**Tab. 6:** Verwendetes Verbrauchsmaterial mit Angabe der Bezugsfirma und deren Standort.

Material	Firma
Bechergläser	Roth, Karlsruhe
Flaschen 1L und 100ml	Roth, Karlsruhe
serologische Pipetten (10ml - 50ml)	Greiner Bio-one, Frickenhausen
Glaspipetten	Roth, Karlsruhe
Petrischalen (Durchmesser: 3cm, 6cm, 9cm)	Greiner Bio-one, Frickenhausen
Pipettenspitzen (50µl)	Greiner Bio-one, Frickenhausen
Impfösen	VWR, Wien
Platindraht 32 gauge	Sigma, Wien
Pasteurpipetten	Roth, Karlsruhe
Gummisauger	Roth, Karlsruhe
Zentrifugenröhrchen	Greiner Bio-one, Frickenhausen

### 5.1.4. Organismen

#### 5.1.4.1. *C. elegans*

Das CGC (Caenorhabditis Genetics Center) an der University of Minnesota ist die Adresse schlechthin für den Kauf von verschiedensten Wurmstämmen. Dieses Labor hat sich zum Ziel gesetzt für alle bekannten Gene zumindest einen Mutanten anzubieten, das gleiche gilt für alle Arten von chromosomalen Änderungen (Defizite, Duplikationen, Translokationen und Inversionen). Mittlerweile sind abgesehen vom Wildtyp über 3000 mutierte Stämme von *C. elegans* erhältlich. Nach Registrierung auf der homepage [www.cbs.umn.edu/CGC](http://www.cbs.umn.edu/CGC), kann man aus dem reichen Angebot die für die jeweilige Fragestellung passenden Tiere bestellen. Die Kosten sind mit 7 US \$ pro Stamm relativ gering (Registrierungsgebühr: 25 US \$).

Die bestellten Tiere werden in NGM Petrischalen mit OP50 - Kultur versandt und sollten 7 bis 10 Tage nach der Bestellung ankommen. Die Sendung enthält des Weiteren Informationen zu

Genotyp, Phänotyp, Haltungsbedingungen und Herkunft des Stammes. Nach Lieferung der Tiere sollte eine Zustandsbeschreibung ans CGC zurückgesendet werden [STIERNAGLE, 2006].

#### 5.1.4.2. *Escherichia coli* OP50

*E. coli* OP50 ist ein Uracil auxotropher Stamm, der ein eingeschränktes Wachstum hat. Somit ist die Gefahr, dass das NGM von Bakterien überwuchert wird, nicht gegeben. Auch dieser Bakterienstamm wurde über das CGC bestellt.

#### 5.1.5. Herstellung der Wachstumsmedien (abgeändert nach T. Stiernagle [STIERNAGLE, 2006])

##### 5.1.5.1. NGM (Nematode Growth Medium)

- a. 1,5g NaCl, 8,5g Agar und 1,25g Pepton wurden in ein Becherglas eingewogen, in eine 1L Flasche, die einen Rührmagneten enthält, transferiert, mit 486 ml Aqua dest. aufgefüllt und anschließend autoklaviert. Die Flasche wurde bei ca. 90°C entnommen. Die weiteren Arbeiten erfolgten unter sterilen Bedingungen unter einem Laminar Flow.
- b. Die Flasche wurde auf einem beheizbaren Magnetrührer auf 65°C abgekühlt.
- c. Nach 15 Minuten unter ständigem Rühren wurden 0,5ml 1M CaCl<sub>2</sub>, 0,5ml 5mg/ml Cholesterin in Ethanol, 0,5ml 1M MgSO<sub>4</sub>, 12,5ml 1M KPO<sub>4</sub> Puffer sowie optional 2,5ml Nystatinlösung hinzugefügt.
- d. Der flüssige, noch warme NGM Agar wurde in die Petrischalen pipettiert (25ml für 100mm, 12ml für 60mm und 4ml für 35mm Platten). Luftbläschen wurden sofort entfernt.
- e. Anschließend wurden die Platten umgedreht für 2-3 Tage bei Raumtemperatur getrocknet. So konnte die überschüssige Flüssigkeit abdampfen. Nach einer Kontaminationskontrolle erfolgte die Lagerung luftdicht bei 4°C. Die NGM – Platten waren einige Wochen haltbar.

##### 5.1.5.2. LB Agar

35g LB Agar wurden mit 1 Liter Aqua dest. verrührt, autoklaviert und anschließend auf Petrischalen pipettiert.

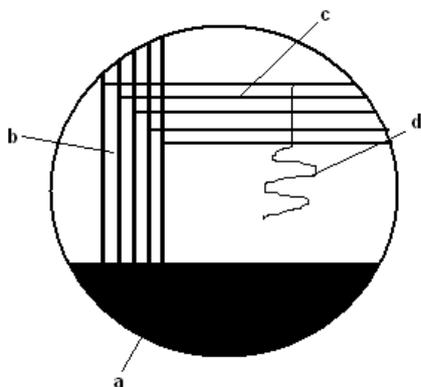
### 5.1.5.3. LB Bouillon

20g LB Medium wurde mit 1 Liter Aqua dest verrührt und anschließend autoklaviert.

## 5.2. Methoden

### 5.2.1. Ansetzen der OP50 – Kultur

- a. Auf sterilem LB Agar wurde ein fraktionierter Ausstrich (siehe Abb.10) der Startkultur bzw. von Bakterien einer bestehenden Wurmplatte angefertigt. Die Platten wurden bei 37°C über Nacht im Brutschrank bebrütet.
- b. Eine Einzelkolonie der ausgestrichenen Platte wurde verwendet um aseptisch eine Flasche mit LB Bouillon zu beimpfen. Die Bebrütung erfolgte bei 37°C über Nacht oder für mindestens 8 Stunden.
- c. Die *E. coli* OP50 Ausstrichplatte sowie die beimpfte Bouillon (Flüssigkultur) wurden bei 4°C gelagert. Diese konnten einige Monate verwendet werden.



**Abb.11:** Fraktionierter Ausstrich: Mit einer sterilen Impföse wurde nach Aufnahme von OP50 ein Teil der Schale ausgestrichen (a), Mit einer neuen Impföse wurden 4-5 Linien aus a herausgezogen (b). (c) Wiederholung des letzten Schrittes mit umgedrehter Impföse. Abschließend wurde mit der Hochkante der Öse nochmals eine Linie gesetzt (d). Dies garantierte eine gute Verteilung der Bakterien, sodass beim nächsten Arbeitsschritt eine reine Einzelkolonie entnommen werden konnte.

Das OP 50 LB- Flüssigmedium wurde verwendet um die NGM Platten zu beimpfen. Dazu wurden je 50µl des OP 50 LB- Mediums auf eine NGM- Platte pipettiert (60mm Petrischale)

und mittels einer Impföse verteilt um einen größeren Bakterienrasen zu erhalten und das Erkennen der Einzelindividuen von *C. elegans* zu erleichtern. Bei 30mm Platten reichten 10µl, die direkt mit der Impföse aufgetragen wurden. Wichtig war es das Medium möglichst zentral auf der Platte aufzubringen und es nicht bis zum Rand zu verteilen, damit die Tiere nicht über den Rand kriechen konnten. Die beimpften Petrischalen wurden kopfüber bei Raumtemperatur über Nacht inkubiert. Bei luftdichter Lagerung bei 4°C waren sie 2-3 Wochen haltbar.

### 5.2.2. Kultivierung von *C. elegans*

Die Tiere wurden nach Erhalt auf mit OP50 beimpfte NGM-Platten transferiert. Zum Umsetzen der Tiere wurde ein Stereomikroskop (6 bis 50fache Vergrößerung) mit Unterlicht verwendet. Kultiviert wurden die Tiere in einem Kühlbrutschrank.

Um die Würmer auf die frischen NGM-Schalen zu bringen, wurden verschiedene Methoden angewandt:

- „picken“: Mit Hilfe eines „Wurmpickers“ wurden die Tiere einzeln umgesetzt. Der Wurmpicker wurde folgendermaßen hergestellt: Ein 2 bis 3 cm langes Stück 32 gauge Platindraht wurde an der geschmolzenen Spitze einer Pasteurpipette befestigt. Das Drahtende wurde leicht mit einer Münze abgeflacht um das Aufnehmen der Tiere zu erleichtern. Zwischen zwei Transfers wurde der Draht abgeflämmt. Die Tiere wurden mit dieser Methode in zwei Varianten aufgenommen. Die erste war, dass mit der flachen Unterseite des Wurmpickers ein Tropfen des *E. coli* Rasens aufgenommen wurde. Dadurch blieb ein Wurm durch kurzes Antupfen kleben und konnte transferiert werden. Die zweite Möglichkeit war, den Wurmpicker wie einen Löffel zu verwenden. Der Nachteil der ersten Methode lag darin, dass es einige Zeit dauerte bis sie erlernt war. Die zweite Methode war zwar etwas einfacher für den Anfänger, wollte aber auch gelernt sein. Sie hatte nämlich den Nachteil, dass z.B. ältere, nicht mehr so agile Tiere beim Absetzen nicht mehr aktiv herunter kriechen konnten und so auf dem Picker kleben blieben. Sie ließen sich allerdings leichter zum aktiven Verlassen des Pickers animieren, wenn man den Wurmpicker leicht in das NGM hineindrückte, allerdings ohne die Oberfläche des Mediums zu verletzen. Wurde beim Picken die Oberfläche des NGM verletzt, so musste sie mit Hilfe einer erhitzten Pasteurpipette, die das NGM zum Schmelzen brachte, wieder versiegelt werden. Abgesetzt wurden die Würmer indem der Wurmpicker außerhalb des Bakterienrasens kurz und vorsichtig auf das NGM gedrückt wurde. Der Wurm blieb am NGM kleben und kroch nach kurzer Erholungsphase selbständig zum *E. coli* Rasen.

- „chunking“: Mit einem sterilen Skalpell oder Spatel wurde ein Agar-Brocken auf eine frische Schale umgesetzt. Die Tiere verteilten sich aktiv auf dem frischen Bakterienrasen. Diese Methode wurde angewandt wenn sich die Würmer in das NGM hineingeböhrt hatten.
- Eine dritte Möglichkeit wäre das Umsetzen mit Hilfe von Filterpapierstreifen: ein ½ bis 1 cm breiter und ca. 5 cm langer Streifen sterilen Filterpapiers wird vorsichtig auf die Wurmkultur gelegt, sodass er Flüssigkeit und Individuen aufnehmen kann. Ebenso werden die Tiere auf eine frische Platte aufgebracht. Ein Papierstreifen darf nur einmal verwendet werden [STIERNAGLE, 2006]. Diese Methode wurde allerdings bei den für diese Arbeit durchgeführten Versuchen nicht angewandt.

Wie oft die Tiere umgesetzt werden mussten, hing von der Art des Versuchs ab.

Im Allgemeinen lässt sich sagen, dass die Umsetzungsrate vom verwendeten Genotyp und der Haltungstemperatur abhängt. Über den Genotyp gibt die bei der Lieferung beiliegende Beschreibung Auskunft. Bei 11 bis 16°C können die mit Parafilm umwickelten Schalen mehrere Monate ohne Umsetzen aufbewahrt werden. Bei höheren Temperaturen müssen die Tiere öfter umgesetzt werden. Die beste Haltungstemperatur liegt zwischen 16 und 25°C, bei 25°C wächst *C. elegans* 2,1-mal schneller als bei 16°C. Bei der meist üblichen Kultivierungstemperatur von 20°C 1,3-mal schneller als bei 16°C [SAMBROOK et al., 1989]. Auch die Art der Untersuchungen hat einen Einfluss auf die Transfer – Häufigkeit. Will man Tiere unterschiedlicher Entwicklungsstadien haben, müssen die Tiere nach einem Tag umgesetzt werden.

### 5.2.3. Synchronisation der *C. elegans* Embryos

Um bakterielle Verunreinigungen von *C. elegans* Kulturen zu entfernen bzw. um gleich alte Larven zu erhalten, wurden die Embryos synchronisiert [STIERNAGLE, 2006]:

1. Um eine große Anzahl an Eiern zu gewinnen, wurden Platten mit möglichst vielen trächtigen Hermaphroditen verwendet, da nur die Embryos in den noch nicht gelegten Eiern die Behandlung überleben.
2. Die Platten wurden einige Male mit Aqua dest. gewaschen, indem mit einer Pipette das Wasser und die Tiere mehrmals auf die Platten aufgetragen und anschließend wieder aufgenommen wurden.
3. Anschließend wurde die Flüssigkeit mit den Tieren in einem sterilen Zentrifugenröhrchen gesammelt und mit Aqua dest. auf ein Volumen von 3,5ml aufgefüllt.
4. Es wurden 0,5ml 5M NaOH mit 1ml Bleiche gemischt und hinzugefügt. Diese Lösung muss immer frisch angesetzt werden.

5. Nun wurde die Wurm – Lösung am Vortex 10 Minuten gemischt und dann für 30 Sekunden bei 1300 x g zentrifugiert, sodass sich die Eier als Pellet absetzen konnten. Der Überstand wurde bis auf 0,1ml abgenommen. Der Rest mit dem Pellet wurde mit Aqua dest. auf 5ml aufgefüllt. Dieser Vorgang wurde nochmals wiederholt.
6. Mit einer sterilen Pasteurpipette wurden die 0,1ml Lösung mit den Eiern in mehreren Tropfen an den Rand einer mit OP50 beimpften NGM Platte gesetzt und im Brut-schrank bei 20°C über Nacht kultiviert.
7. Am nächsten Tag waren die ersten Larven geschlüpft. Diese wurden auf frische Platten umgesetzt.

#### 5.2.4. Lebensdauer von *C. elegans* (Lifespan)

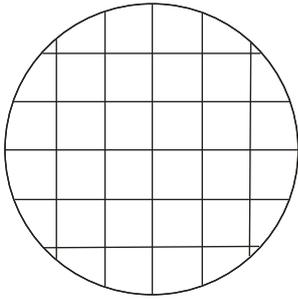
In einem Lifespan Versuch wurde ermittelt wie lange die Tiere leben. Laut W. B. Wood leben die Tiere des Wildstammes von *C. elegans* ca. 20 Tage [WOOD, 1988].

Zur Durchführung des Versuchs wurden auf 5 mit OP50 beimpfte NGM – Platten (6cm Durchmesser) je ca. 16 synchronisierte Tiere im L1 Stadium gesetzt. Insgesamt waren es 80 Individuen. Die Kolonien wurden bei 20°C im Kühlbrutschrank gehalten und jeden Tag auf frische Platten überführt. Erst nach Ende der reproduktiven Phase blieben die Versuchstiere länger auf den Platten und wurden nur im Fall einer Kontamination des NGM durch Bakterien oder Pilze auf neue Platten umgesetzt. Die Tiere wurden nach dem Umsetzen gezählt und die Zahlen protokolliert. Tote Tiere wurden entfernt. Mit dem Programm MedCalc wurde die mittlere Überlebensrate berechnet und zur bildlichen Darstellung eine Kaplan-Meier Überlebenskurve angefertigt (siehe Abb. 14).

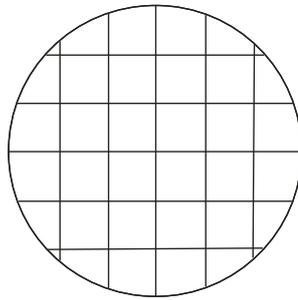
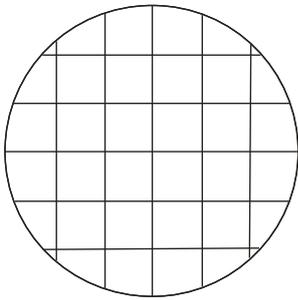
#### 5.2.5. Nachkommenzahl (Broodsize) und Schlüpfungserfolg von *C. elegans*

Ein Broodsize Versuch dient dazu um festzustellen, wie viele Nachkommen ein Tier produziert. Nach W. B. Wood legen Hermaphroditen von *C. elegans* in ihrer ungefähr 4 Tage dauernden reproduktiven Phase ca. 300 Eier [WOOD, 1988].

Für diesen Versuch wurden 10 synchronisierte Tiere im L2-Stadium auf je eine Platte gesetzt. Nach Beginn der Reproduktionsphase wurden die Tiere täglich zur gleichen Uhrzeit auf frische Nährplatten übersiedelt. Die verbliebenen Eier und L1 – Larven wurden mit Hilfe eines Rasters (siehe Abb.12) gezählt und die Anzahl der Eier und Larven in ein Rasterprotokoll (siehe Abb.13) eingetragen.



**Abb. 12:** Dieser Raster wurde auf eine durchsichtige Folie übertragen und unter die Versuchsschale gelegt. Somit war der Bakterienrasen mit den Würmern in Felder unterteilt, die das Zählen der Eier und Larven leichter und genauer ermöglichten.



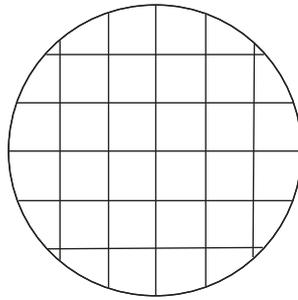
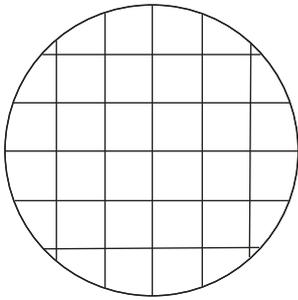
Plattennr: \_\_\_\_\_

Dat: \_\_/\_\_/\_\_ Tag: \_\_

Dat: \_\_/\_\_/\_\_ Tag:-\_\_

Eier gesamt: \_\_\_\_\_

Eier gesamt: \_\_\_\_\_



Plattennr: \_\_\_\_\_

Dat: \_\_/\_\_/\_\_ Tag: \_\_

Dat: \_\_/\_\_/\_\_ Tag:-\_\_

Eier gesamt: \_\_\_\_\_

Eier gesamt: \_\_\_\_\_

**Abb. 13:** Jeweils 2 Raster nebeneinander waren für eine Platte. Auf dem linken wurden die Eier und Larven nach Abnahme des Muttertieres eingetragen, auf dem rechten die Anzahl der am nächsten Tag nicht geschlüpften Eier.

## 5. Praktische Arbeiten zur Etablierung von *C. elegans* als Modellorganismus im Labor

Über Nacht wurden diese Schalen nochmals im Kühlbrutschrank gehalten um am nächsten Tag die Anzahl der nicht geschlüpften Eier zu zählen. Nach Ende der reproduktiven Phase der 10 Tiere wurde der Versuch abgeschlossen.

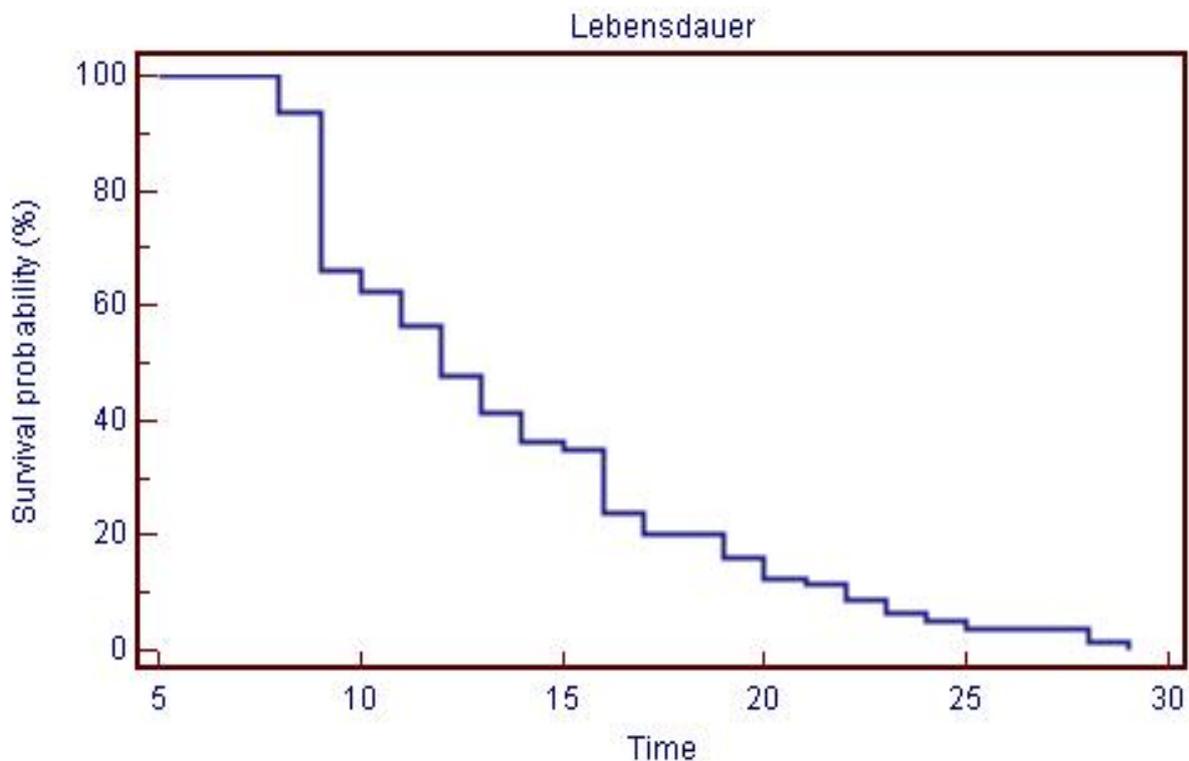
## 6. Ergebnisse und Diskussion

### 6.1. Lebensdauer von *C. elegans*

Aus den protokollierten Daten wurde mit dem Statistikprogramm MedCalc die durchschnittliche Lebenswahrscheinlichkeit berechnet. Diese betrug für die Tiere dieses Versuchs 12 Tage.

Die ersten Tiere verstarben nach 8 Tagen, das älteste Tier wurde 29 Tage alt.

Die Kaplan-Meier Überlebenskurve in Abb. 14 zeigt in Diagrammform eine Darstellung der Lebenswahrscheinlichkeit aller Tiere über die Gesamtversuchsdauer.



**Abb. 14:** Kaplan-Meier Überlebenskurve zur Darstellung der kalkulierten Lebensdauer. Erstellt mit dem Programm Med Calc. Die mittlere Überlebenswahrscheinlichkeit beträgt 12 Tage.

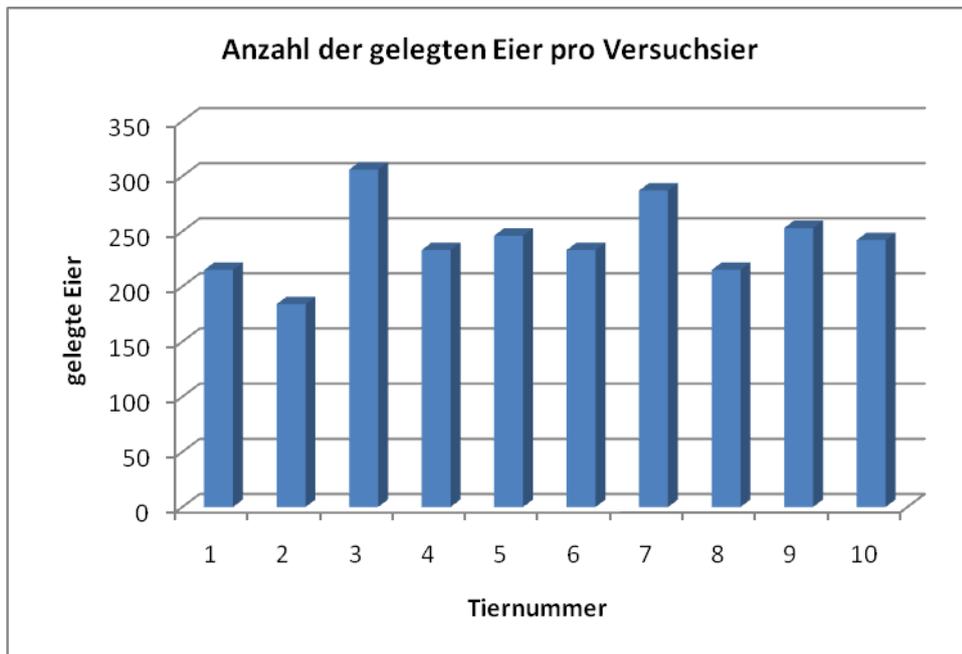
Laut Literatur werden Tiere des *C. elegans* Wildstammes unter optimalen Laborbedingungen ca. 2 bis 3 Wochen alt [STRANGE, 2006]. Optimale Lebensbedingungen sind erstens abhängig von der Versorgung mit Nahrung und zweitens von der Haltungstemperatur. Beide Punkte wurden optimal erfüllt.

Dass das durchschnittlich erreichte Alter der Tiere mit 12 Tagen trotzdem relativ gering war, konnte folgende Ursache haben:

- Die Tiere wurden anfangs täglich mit dem Wurmpicker umgesetzt. Dies war notwendig, da die Tiere des Versuchs durch ihre hohe Reproduktionsrate und die rasche Entwicklung ihrer Nachkommen nicht mehr von diesen unterschieden hätten werden können. Erst nach Ende der Fortpflanzungsperiode konnten die Tiere längere Zeit auf den Platten belassen werden. Sie wurden dann erst nach Kontamination der Platten übersetzt. Zu einer Besiedlung der Platten durch Fremdbakterien oder Pilze kommt es relativ häufig. Die Kontaminationsrate nach 14 Tagen liegt bei nahezu 100%. Aber auch der Uracil auxotrophe OP50 *E. coli* Stamm neigt offensichtlich durch Ausscheidungsprodukte des Wurmes zu einer Rückmutation und beginnt zu wuchern. Um die häufigeren Pilzkontaminationen zu verhindern, wird am Emerging Focus Nutrigenomics bereits kurz nach Beginn der Erstversuche Nystatin zum NGM zugesetzt.
- Wie andere Organismen zeigt auch *C. elegans* einen sichtbaren Alterungsprozess. Während junge Adulte sehr agil sind, viel Nahrung aufnehmen und sich rasch nach dem Umsetzen erholen, bewegen sich ältere Tiere sehr langsam, im hohen Alter von ca. 3 Wochen bewegen sie sich sogar nur noch nach Antupfen. Sie sind außerdem dicker und dunkler gefärbt, also optisch leicht unterscheidbar. Ist ein Umsetzen in diesem Alter noch notwendig, erholen sie sich nur sehr schwer davon und viele versterben am selben oder am nächsten Tag. Eine Möglichkeit um den Tieren den Stress durch das Umsetzen zu ersparen, wäre ein Zusatz von Fluorodeoxyuridin. Dieser DNA-Synthese-Inhibitor verhindert einerseits ein Schlüpfen der Larven und behindert andererseits das Wachstum der Nachkommen [MITCHELL et al., 1979].
- Das Erlernen der Aufnahmemethode mit dem Wurmpicker benötigt einiges an Übung und dauert bis zur Professionalität einige Wochen. Diese Tatsache wurde von den durchführenden Personen vermutlich unterschätzt und es wurde zu einer Zeit mit den Umsetzversuchen begonnen wo der sichere Umgang im benötigten Ausmaß vermutlich noch nicht vorhanden war. Vor allem im Anfangsstadium des Versuchs war zur Aufnahme mit dem Wurmpicker noch ein mehrmaliges Antupfen der Tiere notwendig. Dies führte sicher zu erhöhtem Stress der Tiere.

## 6.2. Nachkommenschaft von *C. elegans*

Wie aus Abb. 15 ersichtlich variiert die Anzahl der gelegten Eier pro Tier beträchtlich. Die wenigsten Eier legte Tier Nr. 2 (184 Eier), die meisten Tier Nr. 3 (306 Eier). Durchschnittlich legte ein Tier 241 Eier (Tier Nr. 2 und Nr. 3 nicht mit berechnet).



**Abb. 15:** Anzahl der gelegten Eier pro Tier.

Laut Literatur legt ein Hermaphrodit nach Selbstbefruchtung ca. 300 Eier. Warum der Durchschnitt berechnet von 10 Tieren doch deutlich niedriger ausfällt, könnte folgende Ursachen haben:

- Wie schon im Versuch über die Lebensdauer der Tiere könnte das tägliche Umsetzen die Tiere so sehr gestreßt haben, dass die erhöhte Belastung einen Einfluss auf die Größe der Nachkommenschaft zeigt. Mangelhaftes Beherrschen der Umsetztechnik wird bei diesem Versuch nicht als Fehlerquelle beurteilt, da zum Zeitpunkt der Durchführung die Methode von der durchführenden Person schon sehr gut beherrscht wurde.
- Ein weiterer Grund für eine verminderte Nachkommenschaft könnten nicht optimale Haltungsbedingungen sein. Da die Tiere konstant bei 20°C gehalten wurden, kann nur

## 6. Ergebnisse und Diskussion

durch die Nahrungsquelle eine Beeinflussung stattgefunden haben. Ob sich *E. coli* in seiner Qualität geändert hat, lässt sich schwer sagen.

Die Dauer der Fortpflanzungsperiode der Tiere im Versuch betrug knappe 5 Tage. Alle Tiere begannen mit der Eiablage am 5. Lebenstag. Durchschnittlich legte ein Tier am 1. Tag 42 Eier, am 2. Tag 105 Eier, am 3. Tag 58 Eier, am 4. Tag 28 Eier und am 5. Tag 6 Eier. Nur sehr wenige Eier wurden vor bzw. nach dieser Zeit gelegt (15 Eier).

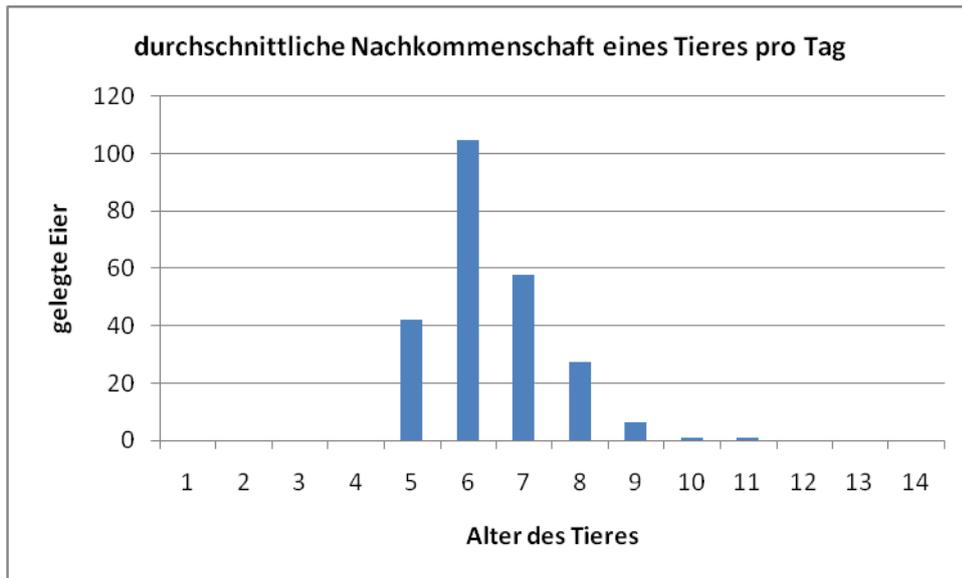


Abb. 16: Durchschnittliche Nachkommenschaft eines Tieres pro Tag im Laufe einer Fortpflanzungsperiode (n=8).

Von den insgesamt von 10 Versuchstieren gelegten 2414 Eiern sind aus 22 Eiern keine Larven geschlüpft. Das entspricht knapp 1 % der gelegten Eier und spricht für einen sehr hohen Fortpflanzungserfolg.

## 7. Zusammenfassung

Diese Arbeit behandelt im ersten Teil einerseits eine zusammenfassende Literaturrecherche und Beschreibung des Modellorganismus *Caenorhabditis elegans*, einen Überblick über seine Forschungsgeschichte und einen Vergleich mit anderen in der Molekularbiologie verwendeten Labororganismen. Andererseits wird auf das Thema Folsäure, ihren Stoffwechsel und die verschiedenen Auswirkungen auf die menschliche Gesundheit, bedingt durch verminderte Aufnahme und verschiedene Stoffwechselstörungen, eingegangen. Im Besonderen wird das menschliche MTHFR – Gen, welches für die Methylen-Tetra-Hydro-Folat-Reduktase kodiert, beschrieben. Dieses Enzym sitzt an einer Schlüsselstelle im menschlichen Folatkreislauf. *C. elegans* besitzt ein homologes Gen (C06A8.1) dessen Lage bekannt ist. Bis jetzt sind allerdings keine genaueren Untersuchungen zum Thema Folsäure und zu diesem Gen von *C. elegans* erfolgt.

Im zweiten Teil werden die ersten einführenden Versuche dieses Modellorganismus in einem molekularbiologischen Labor, dem Emerging Focus Nutrigenomics des Departments für Ernährungswissenschaften der Universität Wien beschrieben. Ausführlich wird auf die praktische Kultivierung von *C. elegans* eingegangen. Behandelt wird die in den Versuchen verwendete Methode der Haltung auf NGM (Nematode Growth Medium) mit *Escherichia coli* OP 50 – Kulturen als Nahrung. Es werden aber auch die Haltung im Flüssigmedium und die verschiedenen geplanten Methoden vorgestellt.

In 2 praktischen Versuchen werden die Lebensdauer der Tiere und die Anzahl ihrer Nachkommen bzw. ihr Fortpflanzungserfolg untersucht und die erhaltenen Ergebnisse mit Angaben aus der Literatur verglichen. Da sich die Ergebnisse teilweise von den Literaturangaben unterscheiden, wird des Weiteren auf aufgetretene Probleme und eventuelle Fehler in der Versuchsdurchführung eingegangen und nach Lösungsansätzen für die folgenden weiterführenden Versuche gesucht.



## 8. Summary

The first part of this diploma thesis is on the one hand a comprising literature review and description of the model organism *Caenorhabditis elegans*, an overview about its research history and a comparison with other organisms used in molecular biology. On the other hand, it is about folic acid, the metabolism and different effects on human health, due to low absorption and different metabolism diseases. In particular the human MTHFR –gene which encodes for the Methylene-Tetra-Hydro-Folate-Reductase is considered. This enzyme is located at a key place in the human folic acid metabolism. *C. elegans* owns a homologous gene (C06A8.1). Until now no investigations on the subject folic acid and *C. elegans* are known.

The second part is about the first experiments with this model organism in a molecular-biological laboratory (at the Emerging Focus Nutrigenomics of the Department of Nutritional Sciences of the University of Vienna). The practice of cultivation of *C. elegans* is described accurately. The used method is on NGM (Nematode Growth medium) with *Escherichia coli* OP 50 – culture as food resource. Also the culture in liquid medium and the different planned methods are described.

In 2 practical experiments the life span of the animals, their brood size, and the number of their offspring are investigated. The results are compared with investigations from literature. Due to the fact, that the results partly differ from literature data, problems and mistakes during the experiments are outlined and solutions are tried to find.



## 9. Anhang

**Tab. 7:** Zusammengefasste Ergebnisse des Lifespan Versuchs. Linke Spalte: Versuchsdauer in Tagen, rechte Spalte: % der noch lebenden Tiere (n=80).

Versuchstag	% der noch lebenden Tiere
1	100
2	100
3	100
4	100
5	100
6	100
7	100
8	96
9	69
10	65
11	59
12	50
13	44
14	39
15	38
16	26
17	23
18	23
19	19
20	15
21	14
22	11
23	9
24	8
25	6
26	6
27	6
28	4
29	0

**Tab. 8:** Ergebnisse des Brood Size Versuches. Hier wurden die Mittelwerte unter Einbezug aller Tiere berechnet. Protokolliert wurden nur die Tage der Fortpflanzung.

Tag	Tiere:										Mittelwert	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
4			2									
5	47	32	67	35	47	36	49	31	46	47	40	
6	107	73	134	82	100	125	132	84	101	108	96	
7	29	41	57	78	67	64	59	54	88	23	52	
8	20	8	27	31	27	7	39	40	15	41	24	
9	10	11	13	7	5	1	8	6	2	11	8	
10	2	11	3	0	0	0	0	0	0	6	3	
11		8	3	0	0	0	0	0	1	6	3	
Summe	215	184	306	233	246	233	287	215	253	242	225	

Zubereitung des axenischen Flüssigmediums nach folgenden Rezepturen von IQBAL HAMZA:

1. CeHR – Medium:

a. Salzlösung für das CeHR – Medium (100ml):

Zu 80 ml Millipore-Wasser werden folgende Chemikalien zugegeben:

4,1g	MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O
2,9g	Natriumcitrat
4,9g	Kaliumcitrat. H <sub>2</sub> O
0,07g	CuCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O
0,2g	MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O
0,1g	ZnCl <sub>2</sub>
0,6g	Fe(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O
02g	CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O (wird immer als letztes zugegeben)

b. Vitamine und Wachstumsfaktoren – Mix für das CeHR – Medium:

I. Zu 60 ml Millipore-Wasser werden zugegeben:

0,15g	N-Acetylglucosamin
0,15g	DL-Alanin
0,075 g	Nicotinamid
0,0375g	Pantethein
0,075g	Pantothenat (Ca)
0,075g	Folsäure
0,0375g	Pyridoxamin.2HCl
0,075g	Pyridoxin.HCl
0,075g	Riboflavin 5- PO <sub>4</sub> (Na)
0,075g	Thiamin.HCl

II. Zu 5 ml 1N KOH werden zugegeben:

0,075g	p- Aminobenzoessäure
0,0375g	Biotin
0,0375g	Cyanocobalamin (B12)
0,0375g	Folinat (Ca)
0,075g	Niacin
0,0375g	Pyridoxal 5'- phosphat

III. Zu 1 ml Ethanol wird zugegeben:

0,0375 g            Liponsäure

Lösungen I, II und III werden gemischt und mit Millipore-Wasser auf 100 ml aufgefüllt, dunkel bei 4°C aufbewahrt oder in kleinen Portionen bei -20°C eingefroren.

c. Nukleinsäuren – Mix für das CeHR – Medium:

Zu 60 ml Millipore-Wasser werden folgende Reagenzien zugesetzt:

1,74 g	Adenosin 5' PO <sub>4</sub> (Na)
1,84 g	Cytidin 5'-PO <sub>4</sub>
1,82 g	Guanosin 2'- & 3'- oder
2,04 g	Guanosin 5' - PO <sub>4</sub>
1,84 g	Uridin 5'-PO <sub>4</sub> (Na <sub>2</sub> )
0,63 g	Thymin (zuletzt zusetzen, löst sich dann auf)

d. Andere Stammlösungen für das CeHR – Medium:

Jede der folgenden Lösungen wird separat mit Millipore-Wasser (falls nicht anders angegeben) angesetzt:

450 mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
2 mM	Cholindisäurecitrat
2,4 mM	i-Inositol
1,46 M	d-Glukose
1 M	HEPES (Na)
5 mg/ml in Ethanol	Cholesterol
170 mg/ml	Lactalbuminhydrolysat
2 mM Heminchlorid in 0,1 N NaOH	Hemin (mit konz. HCL auf pH=8)

2. Milch:

Verwendet wird mit hoher Temperatur ultra-pasteurisierte Milch, diese ist im Supermarkt erhältlich. Die Packung muss steril geöffnet werden und die Milch auf Mikroben getestet werden (einige Tropfen auf Agarplatten geben und bei 37°C bzw. bei 30°C inkubieren). Bei negativem Test die Milch in 50 ml sterile Gefäße umfüllen und bei -80°C einfrieren.

3. Zusammenmischen des CeHR – Mediums:

Die Lösungen werden in folgender Reihenfolge gemischt:

10 ml	Cholin
10 ml	B Vitamin- und Wachstumsfaktoren-Mix
10 ml	i-Inositol
10 ml	Hemin
250 ml	Millipore-Wasser

Jetzt wird die Lösung mit einem 0,2 µm Filter gefiltert. Danach werden folgende Lösungen zugesetzt:

20 ml	Nukleinsäuren - Mix
100 ml	Salzlösung
20 ml	Lactalbumin
20 ml	essentielle Aminosäuren - Mix
10 ml	nicht - essentielle Aminosäuren - Mix
20 ml	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
50 ml	d-Glukose
10 ml	HEPES
250 ml	Millipore-Wasser
1 ml	Cholesterol

Abschließend wird das Medium erneut filtriert. Es kann bei 4°C aufbewahrt werden. Kurz vor Gebrauch wird die UHT Milch zugesetzt.



## 10. Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen

### 10.1. Abbildungen

Abb. 1: Hermaphrodit von *C. elegans*

Abb. 2: Männchen von *C. elegans*

Abb. 3: Medianer Querschnitt eines adulten Hermaphroditen von *C. elegans*

Abb. 4: Entwicklungszyklus von *C. elegans*

Abb. 5: Die Bildung von Tetrahydrofolat aus Folat

Abb. 6: Metabolismus der Folsäure

Abb. 7: Interkonversion der Ein-Kohlenstoff-Einheiten an der Tetrahydrofolsäure

Abb. 8: Die Rolle des MTHFR im Methionin und Homocystein Kreislauf

Abb. 9: Genomumgebung der 3 C06A8.1 Modelle

Abb. 10: Mechanismus der RNA – Interferenz

Abb. 11: Fraktionierter Ausstrich

Abb. 12: Folienraster

Abb. 13: Rasterprotokoll

Abb. 14: Kaplan-Meier Überlebenskurve der kalkulierten Lebensdauer

Abb. 15: Anzahl der gelegten Eier pro Tier

Abb. 16: Durchschnittliche Nachkommenschaft eines Tieres pro Tag

### 10.2. Tabellen

Tab. 1: Folsäuregehalt ausgewählter Lebensmittel

Tab. 2: Empfohlene tägliche Zufuhr von Folsäure

Tab. 3: Gen-Modelle von C06A81

Tab. 4: Verwendete Chemikalien

Tab. 5: Verwendete Geräte

Tab. 6: Verwendetes Verbrauchsmaterial

Tab. 7: Ergebnisse des Lifespan Versuchs

Tab. 8: Ergebnisse des Brood Size Versuchs



## 11. Literatur

ADAMS, M. D., S. E. CELNIKER, et al. (2000): The Genome Sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science*, 287(5461): 2185-2195.

ALBERTSON, D. G. and J. N. THOMSON (1976): The Pharynx of *Caenorhabditis elegans*. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, 275: 299-325.

ANTEBI, A. (2007): Genetics of Aging in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS Genetics*, 3(9): 1565-1571.

ANTEBI, A., C. R. NORRIS, et al. (1997). Cell and Growth Cone Migrations. *C. Elegans II*. D. L. Riddle, T. Blumenthal, B. J. Meyer and J. R. Priess, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

ANTONY, A. C. (1996): Folate Receptors. *Annual Review of Nutrition*, 16: 501-521.

ANTOSHECHKIN, I. and P. W. STERNBERG (2007): The Versatile Worm: Genetic and Genomic Resources for *Caenorhabditis elegans* Research. *Nature Reviews/Genetics*, 8: 518-532.

ARENZ, C. and U. SCHEPERS (2003): RNA Interference: from an Ancient Mechanism to a State of the Art Therapeutic Application? *Naturwissenschaften*, 90: 345-359.

BALAMURUGAN, K., B. ASHOKKUMAR, et al. (2007): Cloning and Functional Characterization of a Folate Transporter from the Nematode *Caenorhabditis elegans*. *Am J Physiol Cell Physiol*, 293: 670-681.

BARGMANN, C. I. (2006): Chemosensation in *C. elegans*. *WormBook*. The *C. elegans* Research Community.

BARKER, K. R. (2004). A Century of Plant Nematology. In: *Nematology: Advances and Perspectives*. Ed.: Z. X. Chen, S. Y. Chen and D. W. Dickson. Tsinghua University Press. Beijing, 1: 1-51.

BELLER, M. and B. OLIVER (2006): One Hundred Years of High-Throughput *Drosophila* Research. *Chromosome Research*, 14: 349-362.

BIESALSKI, H. K., P. FÜRST, et al. (1999): *Ernährungsmedizin*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart

BIESALSKI, H. K. and P. GRIMM (2004): *Taschenatlas der Ernährung*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart

BIESALSKI, H. K., J. KÖHRLE, et al. (2002): *Vitamine, Spurenelemente und Mineralstoffe*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart

## 11. Literatur

---

BLOM, H. J., G. M. SHAW, et al. (2006): Neurale Tube Defects and Folate: Case Far from Closed. *Nature Reviews/Neuroscience*, 7: 724-731.

BLOUNT, B. C., M. M. MACK, et al. (1997): Folate deficiency causes uracil misincorporation into human DNA and chromosome breakage: implications for cancer and neuronal damage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94: 3290-3295.

BOISVERT, M. E. and M. J. SIMARD (2008). RNAi Pathway in *C. elegans*: the Argonautes and Collaborators. In: *RNA Interference*. Ed.: P. P.J. and P. K. Vogt. Springer. Berlin.

BRENNER, S. (1973): The Genetics of Behaviour. *British Medical Bulletin*, 29: 269-271.

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

Brenner, S. (1988). Foreword. In: *The Nematode Caenorhabditis elegans*. Ed.: W. B. Wood and Community of *C. elegans* Researchers. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, New York: ix-xiii.

Bryan, W. R., H. Kahler, et al. (1942): Extraction and Ultracentrifugation of Mammary Tumor Inciter of Mice. *J. Natl. Cancer Inst.*, 2: 451.

CALDERÓN, A. J. and J. A. LAVERGNE (2005): RNA Interference: a Novel and Physiologic Mechanism of Gene Silencing with Great Therapeutic Potential. *Puerto Rico Health Sciences Journal*, 24(1): 27-33.

CHASNOV, J. R. and K. L. CHOW (2001): Why are there Males in the Hermaphroditic Species *Caenorhabditis elegans*? *Genetics*, 160: 983-994.

CHIEN, S., L. T. REITER, et al. (2002): Homophila: Human Disease Gene Cognates in *Drosophila*. *Nucleic Acids Research*, 30(1): 149-151.

CHITWOOD, B. G. and M. B. CHITWOOD (1977): *Introduction to Nematology*. University Park Press, Baltimore, Maryland

CLARK, S. and K. BANFIELD (2001). S-Adenosylmethionine-dependent Methyltransferases. In: *Homocysteine in Health and Disease*. Ed.: R. Carmel and D. W. Jacobsen. Cambridge University Press. Cambridge: 65-80.

CLARKE, R., M. SHIPLEY, et al. (1999): Underestimation of Risk Associations Due to Regression Dilution in Longterm Follow-up of Prospective Studies. *American Journal of Epidemiology*, 150(4): 341-353.

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

## 11. Literatur

---

COX, G. N., M. KUSCH, et al. (1981): Cuticle of *Caenorhabditis elegans*: Its Isolation and Partial Characterization. *J. Cell Biol.*, 90: 7-17.

CUÉNOT, L. (1905): Les races pures et leurs combinaisons chez les souris. *Arch. Zool. Exp. Gén. Ser. 4*, 3: 123-132.

DACH (2000): Referenzwerte für die Nährstoffzufuhr. Umschau/Braus, Frankfurt am Main

DOMINGOS, P. M. and H. STELLER (2007): Pathways Regulating Apoptosis During Patterning and Development. *Current Opinion in Genetics & Development*, 17: 294-299.

DOUGHERTY, E. C. and H. G. CALHOUN (1948): Possible Significance of Free-living Nematodes in Genetic Research. *Nature*, 161: 29.

DRISCOLL, M. and J. KAPLAN (1997). *Mechanotransduction. C. elegans II*. D. L. Riddle, T. Blumenthal, B. J. Meyer and J. R. Priess, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

EPSTEIN, H. F. and D. C. SHAKES (1995): *Caenorhabditis elegans: Modern Biological Analysis of an Organism.*, Academic Press, New York

FAY, D. S., D. STARR, et al. (2001). *Worm Breeding for Dummies: A Guide to Genetic Mapping in C. elegans*. A. Fluet and J. Yochem.

FIRE, A., S. XU, et al. (1998): Potent and Specific Genetic Interference by Double-Stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 391(6669): 744-745.

FITCH, D. H. A. and W. KELLEY THOMAS (1997). *Evolution. C. Elegans II*. D. L. Riddle, T. Blumenthal, B. J. Meyer and J. R. Priess, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

FROSST, P., H. J. BLOM, et al. (1995): A Candidate Genetic Risk Factor for Vascular Disease: A Common Mutation in Methylene tetrahydrofolate Reductase. *Nature Genetics*, 10: 111-113.

GOLDEN, T. R. and S. MELOV (2007). Gene Expression Changes Associated with Aging in *C. elegans*. *WormBook. The C. elegans Research Community*.

GOODMAN, M. B. (2006): *Mechanosensation. WormBook. The C. elegans Research Community*.

GRAHAM, I. (1999): Homocysteine in Health and Disease. *Annals of Internal Medicine*, 131: 387-388.

GRAW, J. (2006): *Genetik*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York

HAMZA, I. (k.A.) "Maintenance of *C. elegans* in Axenic Growth Cultures and Generation of Large Numbers for Biochemical Studies."

## 11. Literatur

---

- HEDGECOCK, E. M. and J. G. WHITE (1985): Polyploid Tissues in the Nematode *Caenorhabditis elegans*. *Dev. Biol.*, 107: 128-133.
- HENIG, R. M. (2001): *Der Mönch im Garten: die Geschichte des Gregor Mendel und die Entdeckung der Genetik*. Argon, Berlin
- HERMAN, R. K. (2005). Introduction to Sex Determination. WormBook. The *C. elegans* Research Community.
- HERRINGTON, M. B. and N. T. CHIRWA (1999): Growth Properties of a folA Null Mutant of *Escherichia coli* K12. *Can. J. Microbiol.*, 45: 191-200.
- HERRMANN, M., P. J. SCHMIDT, et al. (2007): The Role of Hyperhomocysteinemia as Well as Folate, Vitamin B(6) and B(12) Deficiencies in Osteoporosis: a Systematic Review. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 45(12): 1621-1632.
- HILLIER, L. W., A. COULSON, et al. (2005): Genomics in *C. elegans*: So Many Genes, Such a Little Worm. *Genome Res.*, 15: 1651-1660.
- HIRSH, D., D. OPPENHEIM, et al. (1976): Development of the Reproductive System of *Caenorhabditis elegans*. *Dev. Biol.*, 49: 200-219.
- JANNOT, G. and M. J. SIMARD (2006): Tumour-related microRNAs functions in *Caenorhabditis elegans*. *Oncogene*, 9(25(46)): 6197-6201.
- JONAS, A. M. (1984): The Mouse in Biomedical Research. *The Physiologist*, 27(5): 330-346.
- JORGENSEN, E. M. and C. RANKIN (1997). *Neural Plasticity. C. elegans* II. D. L. Riddle, T. Blumenthal, B. J. Meyer and J. R. Priess, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- KAMATH, R. S., A. G. FRASER, et al. (2003): Systematic Functional Analysis of the *Caenorhabditis elegans* Genome Using RNAi. *Nature*, 421: 231-237.
- KATO, M. and F. J. SLACK (2008): MicroRNAs: Small Molecules with Big Roles - *C. elegans* to Human Cancer. *Biol. Cell.*, 100(2): 71-81.
- KENNEDY, B. K. (2008): The Genetics of Ageing: Insight from Genome-wide Approaches in Invertebrate Model Organisms. *Journal of Internal Medicine*, 263(2): 142-152.
- KIMBLE, J. and D. HIRSH (1979): The Postembryonic Cell Lineages of the Hermaphrodite and Male Gonads in *Caenorhabditis elegans*. *Dev. Biol.*, 70: 396-417.
- KIMBLE, J. and W. J. SHARROCK (1983): Tissue-specific synthesis of yolk proteins in *Caenorhabditis elegans*. *Dev. Biol.*, 96: 189-196.
- KLASS, M. and D. HIRSH (1976): Nonaging Developmental Variant of *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 260: 523-525.

## 11. Literatur

---

- KOURTIS, N. and N. TAVERNARAKIS (2007): Non-developmentally Programmed Cell Death in *Caenorhabditis elegans*. *Seminars in Cancer Biology*, 17: 122-133.
- LAMITINA, T., C. G. HUANG, et al. (2006): Genome - Wide RNAi Screening Identifies Protein Damage as a Regulator of Osmoprotective Gene Expression. *PNAS*, 103(32): 12173-12178.
- LAWRENCE, J. M., D. B. PETITTI, et al. (1999): Trends in Serum Folate after Food Fortification. *The Lancet*, 354: 915-916.
- LEDERBERG, J. (1996): Genetic Recombination in *Escherichia coli*: Disputation at Cold Spring Harbor, 1946-1996. *Genetics*, 144: 439-443.
- LETSOU, A. and D. BOHMANN (2005): Small Flies - Big Discoveries: Nearly a Century of *Drosophila* Genetics and Development. *Developmental Dynamics*, 232: 526-528.
- LETTRE, G. and M. O. HENGARTNER (2006): Developmental apoptosis in *C. elegans*: a complex CEDnario. *Nature Reviews, Molecular Cell Biology*, 7: 97-108.
- LÖFFLER, G., P. E. PETRIDES, et al. (2007): *Biochemie und Pathobiochemie*. Springer Medizin Verlag, Heidelberg.
- LORENZEN, S. (2007). Nematelminthes i.e.S. In: *Spezielle Zoologie Teil 1: Einzeller und Wirbellose*. Ed.: W. Westheide and R. Rieger. Spektrum Akademischer Verlag. München: 732-751.
- LYON, M. F. (1961): Gene Action in the X-Chromosome of the Mouse (*Mus musculus L.*). *Nature*, 190: 372-373.
- FOOD AND NUTRITION BOARD/INSTITUTE OF MEDICINE (1998): Dietary Reference Intakes for Thiamin, Riboflavin, Niacin, Vitamin B<sub>6</sub>, Folate, Vitamin B<sub>12</sub>, Pantothenic Acid, Biotin and Cholin., National Academy Press, Washington D.C.
- MITCHELL, D. H., J. W. STILES, et al. (1979): Synchronous Growth and Aging of *Caenorhabditis elegans* in the Presence of Fluorodeoxyuridine. *J Gerontol.*, 34(1): 28-36.
- MITCHELL, H. K., E. E. SNELL, et al. (1941): The Concentration of "Folic Acid". *J. Am. Chem. Soc.*, 63: 2284.
- MOERMAN, D. G. and A. FIRE (1997). *Muscle: Structure, Function, and Development*. *C. elegans II*, D. L. Riddle, T. Blumenthal, B. J. Meyer and J. R. Priess, Cold Spring Harbor Laboratory Press
- MORAN, R. G. (1999): Roles of Folypoly-gamma-glutamate synthetase in Therapeutics with Tetrahydrofolate Antimetabolites: an Overview. *Seminars in Oncology*, 26(2 Suppl. 6): 24-32.

## 11. Literatur

---

MORI, H. (2004): From the Sequence to Cell Modelling: Comprehensive Functional Genomics in *Escherichia coli*. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 37(1): 83-92.

MÜHLBOCK, O. and P. BENTVELZEN (1968): The Transmission of the Mammary Tumor Viruses. *Perspect Virol.*, 6: 75-87.

NELSON, F. K. and D. L. RIDDLE (1984): Functional Study of the *Caenorhabditis elegans* secretory-excretory system using laser microsurgery. *J. Exp. Zool.*, 231: 45-46.

NISSI, R. (2002) "Prolyl 4-Hydroxylase - Genomic cloning of the human and mouse alpha (II) subunit, tissue distribution of type I and II isoenzymes, and cloning and characterization of a novel prolyl 4-hydroxylase from *Caenorhabditis elegans*.", 66.

O'NEIL, N. and A. ROSE (2006). DNA Repair. *WormBook*. The *C. elegans* Research Community.

PAIGEN, K. (1961a): The Effect of Mutation on the Intracellular Location of  $\beta$ -Glucuronidase. *Exp. Cell Res.*, 25: 286-301.

PAIGEN, K. (1961b): The Genetic Control of Enzyme Activity During Differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 47: 1641-1649.

PAIGEN, K. (2003): One Hundred Years of Mouse Genetics: An Intellectual History. I. The Classical Period (1902-1980). *Genetics*, 163: 1-7.

PIANO, F., K. C. GUNSALUS, et al. (2006). *C. elegans* Network Biology: a Beginning. *WormBook*. The *C. elegans* Research Community.

PIPER, M. D. W., C. SELMAN, et al. (2008): Separating Cause from Effect: How does Insulin/IGF Signalling Control Lifespan in Worms, Flies and Mice? *Journal of International Medicine*, 263: 179-191.

POWERS, H. (2005): Interaction among Folate, Riboflavin, Genotype, and Cancer, with Reference to Colorectal and Cervical Cancer. *The Journal of Nutrition*, 135(12 Suppl): 2960-2966.

QIU, J. (2006): Mighty Mouse. *Nature*, 444: 814-816.

RAND, J. B. and M. L. NONET (1997). Synaptic Transmission. *C. elegans* II. D. L. Riddle, T. Blumenthal, B. J. Meyer and J. R. Priess, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

REBOUL, J., P. VAGLIO, et al. (2003): *C. elegans* ORFeome version 1.1: Experimental Verification of the Genome Annotation and Ressource for Proteome-Scale Protein Expression. *Nat. Genet.*, 34: 35-41.

REHNER, G. and H. DANIEL (2002): *Biochemie der Ernährung*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin.

## 11. Literatur

---

RIDDLE, D. L. (1988). The Dauer Larva. In: The Nematode *Caenorhabditis elegans*. Ed.: W. B. Wood and C. o. C. e. Researchers. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 393-412.

RIDDLE, D. L., T. BLUMENTHAL, et al. (1997). Introduction to *C. elegans*. *C. Elegans* II. D. L. Riddle, T. Blumenthal, B. J. Meyer and J. R. Priess, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

ROBERTSON, A. M. G. and J. N. THOMSON (1982): Morphology of Programmed Cell Death in the Ventral Nerve Cord of *Caenorhabditis elegans* larvae. *J. Embryol. Exp. Morphol.*, 67: 89-100.

RUAL, J.-F., J. CERON, et al. (2004): Toward Improving *Caenorhabditis elegans* Phenome Mapping with an ORFeome-Based RNAi Library. *Genome Res.*, 14: 2162-2168.

RUVKUN, G. (1997). Patterning the Nervous System. *C. elegans* II. D. L. Riddle, T. Blumenthal, B. J. Meyer and J. R. Priess, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

SAMARA, C. and N. TAVERNARAKIS (2008): Autophagy and Cell Death in *Caenorhabditis elegans*. *Current Pharmaceutical Design*, 14(2): 97-115.

SAMBROOK, J., E. F. FRITSCH, et al. (1989): *Molecular Cloning: a Laboratory Manual.*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York

SCHNABEL, R. and J. R. PRIESS (1997). Specification of Cell Fates in the Early Embryo. *C. elegans* II. D. L. Riddle, T. Blumenthal, B. J. Meyer and J. R. Priess, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

SHILS, M. E., M. SHIKE, et al. (2006): *Modern Nutrition in Health and Disease*. Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, Philadelphia.

SIMMER, F., C. MOORMAN, et al. (2003): Genome - Wide RNAi of *C. elegans* Using the Hypersensitive rrf-3 Strain Reveals Novel Gene Functions. *PLoS Biology*, 1(1): 77-84.

SINGH, R. N. and J. E. SULSTON (1978): Some Observations on Molting in *Caenorhabditis elegans*. *Nematologica*, 24: 63-71.

SIROTNAK, F. M. and B. TOLNER (1999): Carrier-mediated Membrane Transport of Folates in Mammalian Cells. *Annual Review of Nutrition*, 19: 91-122.

SKAFTNESMO, K. O., L. PRESTEGARDEN, et al. (2007): MicroRNAs in tumorigenesis. *Curr. Pharm. Biotechnol.*, 8(6): 320-325.

SNELL, G. D. (1948): Methods for the Study of Histocompatibility Genes. *J. Genet.*, 49: 87-108.

SÖNNICHSEN, B., L. B. KOSKI, et al. (2005): Full - Genome RNAi Profiling of Early Embryogenesis in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 434: 462-469.

## 11. Literatur

---

STANGER, O., W. HERRMANN, et al. (2003): DACH - LIGA Homocystein (German, Austrian and Swiss Homocysteine Society): Consensus Paper on the Rational Clinical Use of Homocysteine, Folic Acid and B-Vitamins in Cardiovascular and Thrombotic Diseases: Guidelines and Recommendations. Clin. Chem. Lab. Med., 41(11): 1392-1403.

STIERNAGLE, T. (2006). Maintenance of *C. elegans*. WormBook. The *C. elegans* Research Community.

STRANGE, K. (2006): Methods in Molecular Biology 351: *C. elegans* - Methods and Applications., Humana Press, Totowa, New Jersey.

SULSTON, J. (1988). Cell Lineage. In: The Nematode *Caenorhabditis elegans*. Ed.: W. B. Wood and Community of *C. elegans* Researchers. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor New York: 123-155.

SULSTON, J. and J. HODGKIN (1988). Methods. In: The Nematode *Caenorhabditis elegans*. Ed.: W. B. Wood and Community of *C. elegans* Researchers. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor New York: 587-606.

SULSTON, J., H. R. HORVITZ, et al. (1988). Appendix 3. Cell Lineage. In: The Nematode *Caenorhabditis elegans*. Ed.: W. B. Wood and Community of *C. elegans* Researchers. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor New York: 457-489.

SULSTON, J. E., D. G. ALBERTSON, et al. (1980): The *Caenorhabditis elegans* Male: Postembryonic Development of Nongonadal Structures. Dev. Biol., 78: 542-576.

SULSTON, J. E. and H. R. HORVITZ (1977): Post - embryonic cell lineages of the nematode *Caenorhabditis elegans*. Dev. Biol., 56: 110-156.

SULSTON, J. E., E. SCHIERENBERG, et al. (1983): The Embryonic Cell Lineage of the Nematode *Caenorhabditis elegans*. Dev. Biol., 100: 64-119.

SWANK, R. T., K. PAIGEN, et al. (1973): Genetic Control of Glucuronidase Induction in Mice. J. Mol. Biol., 81: 225-243.

SYNTICHAKI, P., K. TROULINAKI, et al. (2007): Protein Synthesis is a Novel Determinant of Aging in *Caenorhabditis elegans*. Ann. N.Y. Acad. Sci., 1119: 289-295.

TABARA, H., A. GRISHOK, et al. (1998): RNAi in *C. elegans*: Soaking in the Genome Sequence. Science, 282: 430-431.

TAVERNARAKIS, N. (2007): Protein Synthesis and Aging: eIF4E and the Soma vs. Germline Distinction. Cell Cycle, 6(10): 1168-1171.

## 11. Literatur

---

TAVERNARAKIS, N., S. L. WANG, et al. (2000): Heritable and Inducible Genetic Interference by Double - Stranded RNA Encoded by Transgenes. *Nat. Genet.*, 24: 180-183.

TIMMONS, L. and A. FIRE (1998): Specific Interference by Ingested dsRNA. *Nature*, 395: 854.

UNIPROT. (2008). "<http://beta.uniprot.org/uniprot/P42898>." from: [www.uniprot.org](http://www.uniprot.org).

VARMUS, H. E., J. M. BISHOP, et al. (1972): Mammary Tumor Virus Specific Nucleotide Sequences in Mouse DNA. *Nat. New Biol.*, 238: 189-191.

VISSCHER, M. B., R. G. GREEN, et al. (1942): Characterization of Milk Influence in Spontaneous Mammary Carcinoma. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 49: 94-96.

WHITE, J. (1988). The Anatomy. In: *The Nematode Caenorhabditis elegans*. Ed.: W. B. Wood and Community of *C. elegans* Researchers. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor New York: 81-122.

WHITE, J., E. SOUTHGATE, et al. (1988). Neuroanatomy. In: *The Nematode Caenorhabditis elegans*. Ed.: W. B. Wood and Community of *C. elegans* Researchers. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor New York: 433-455.

WICKRAMASINGHE, S. N. (1999): The Wide Spectrum and Unresolved Issues of Megaloblastic Anemia. *Seminars in Hematology*, 36(1): 3-18.

WOLTERS, M., A. STRÖHLE, et al. (2004): Altersassoziierte Veränderungen im Vitamin - B12- und Folsäurestoffwechsel: Prävalenz, Ätiopathogenese und pathophysiologische Konsequenzen. *Zeitschrift für Gerontologie und Geriatrie*, 37(2): 109-135.

WOOD, W. B. (1988). Introduction to *C. elegans* Biology. In: *The Nematode Caenorhabditis elegans*. Ed.: W. B. Wood and Community of *C. elegans* Researchers. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor New York: 1-16.

WORMBASE (WS188). <http://www.wormbase.org>, 28/03/2008.

ZAHN, J. M. and S. K. KIM (2007): Systems biology of aging in four species. *Current Opinion in Biotechnology*, 18: 355-359.



## **Ulrike Stöger** **Curriculum Vitae**

### **Persönliche Daten:**

<b>Adresse</b>	2230 Gänserndorf, Bahnstraße 7
<b>Telefon</b>	0676/84223532
<b>E-Mail</b>	ulrike.stoeger@univie.ac.at
<b>Geburtsdatum, -ort</b>	28.9.1971, Wien
<b>Familienstand</b>	geschieden, 2 Kinder (Anne geb. 1997, Sophie geb.1999)
<b>Staatsbürgerschaft</b>	Österreich

### **Berufserfahrung:**

<b>seit 09/ 2008</b>	ÖKOLOG – Schulen Betreuerin an Volks- und Mittelschulen in Niederösterreich
<b>seit 01/ 2008</b>	Projektassistentin von EUROPIN (European Pharmacoinformatics Initiative) ein Projekt im Rahmen des LLP (Lifelong Learning Programme) der Europäischen Union
<b>seit 07/ 2007</b>	Administrator der Webpage der EFMC (European Federation of Medicinal Chemistry) <a href="http://www.efmc.info">www.efmc.info</a>
<b>seit 07/ 2006</b>	Administrative Assistentin am Emerging Focus Nutrigenomics des Departments für Ernährungswissenschaften der Universität Wien
<b>seit 05/ 2006</b>	Klimabündnis – Workshop – Referentin an Volks- und Mittelschulen in Wien und Niederösterreich
<b>seit 06/ 2004</b>	freie Dienstnehmerin als Besucherbetreuerin im Nationalpark Donauauen
<b>04/ 2003 – 01/ 2004</b>	geringfügig beschäftigt als Wissensvermittlerin und Besucherbetreuerin im Safaripark Gänserndorf
<b>03/ 2002 – 06/ 2003</b>	Tutorin am Institut für Zoologie, Abteilung für Ultrastrukturforschung und Elektronenmikroskopie
<b>11/ 1998 – 01/ 1999</b>	Bürotätigkeit bei der Fa. Axmann – Geoinformation

**Ausbildung:**

<b>10/ 1996</b>	1. Diplomprüfung
<b>10/ 1989</b>	Beginn des Studiums der Biologie an der Universität Wien
<b>06/ 1989</b>	Matura
<b>09/ 1981 – 04/ 1989</b>	neusprachlicher Zweig des BG und BRG Gänserndorf
<b>09/ 1977 – 06/ 1981</b>	Volksschule Gänserndorf

**Weiterbildung:**

<b>06/ 2008</b>	Europäischer Wirtschaftsführerschein EBC*L Stufe A
<b>12/ 2007 – 04/ 2008</b>	Ausbildung „Regionsführer Auland Carnuntum“
<b>04/ 2007 – 09/ 2007</b>	Ausbildung zur Wildnispädagogin im Nationalpark Kalkalpen
<b>02/ 2004 – 09/ 2004</b>	Ausbildung zur Besucherbetreuerin im Nationalpark Donauauen

**Besondere Kenntnisse:**

<b>Fremdsprachen:</b>	Englisch (sehr gut), Französisch (Mittelschulniveau), Italienisch, Tschechisch (Grundkenntnisse)
<b>EDV – Kenntnisse:</b>	Microsoft Office, Internet, HTML, SPSS, MedCalc, ArcView, ArcGis

Ich habe mich bemüht, sämtliche Inhaber der Bildrechte ausfindig zu machen und ihre Zustimmung zur Verwendung der Bilder in dieser Arbeit eingeholt. Sollte dennoch eine Urheberrechtsverletzung bekannt werden, ersuche ich um Meldung bei mir.





