



universität
wien

Masterarbeit

**Einfluss von Folsäure auf die Proliferation und Differenzierung von
myogenen Vorläuferzellen**

vorgelegt von

Magdalena Elisa Münster, Bakk.

angestrebter akademischer Grad

Master of Science (MSc)

Wien, 2014

Studienkennzahl lt. Studienblatt: A 033 838

Studienrichtung lt. Studienblatt: Ernährungswissenschaften

Betreut von: Univ.-Prof. Dr. Jürgen König

1 EINLEITUNG	1
1.1 Die Rolle der Folate im menschlichen Organismus	2
1.2 Die Myogenese	4
1.3 Das Rhabdomyosarkom	8
1.4 Der Hedgehog-Signalweg	9
1.5 Epigenetik	11
2 ZIELSETZUNG DER ARBEIT	13
3 MATERIAL	15
3.1 Zelllinien	15
3.2 Gewebe	15
3.3 Kulturmedien	15
3.4 Antibiotika	15
3.5 Enzyme	15
3.6 Größenstandards	16
3.7 Primer	16
3.8 Chemikalien, Reagenzien und Puffer	17
3.9 Antikörper	19
3.10 Verbrauchsmaterialien	19
3.11 Kits	20
3.12 Geräte	20
4 METHODEN	21
4.1 Zellbiologische Methoden	21
4.1.1 Auftauen und Kultivieren von Zellen	21
4.1.2 Kryokonservierung von Zellen	21
4.1.3 Aussäen und Ernte von Zellen	22
4.1.4 Differenzierung von Zellen	22
4.1.5 Vitalitätsassay	23
4.1.6 Behandlung mit Folsäure	23
4.2 Molekularbiologische Methoden	24
4.2.1 DNA-Isolierung aus Gewebe und adhärenenten Zellen	24
4.2.2 RNA-Isolierung aus Gewebe und adhärenenten Zellen	24
4.2.3 cDNA-Synthese	25
4.2.4 Quantitative <i>real-time</i> PCR	25
4.2.4.1 Primerdesign	25

4.2.4.2 Genexpressionsanalyse	26
4.3 Epigenetische Methoden	27
4.3.1 Bisulfitkonvertierung	27
4.3.2 PCR der bisulfitkonvertierten DNA	27
4.3.2.1 Primerdesign	27
4.3.2.2 PCR und Agarose-Gelelektrophorese	28
4.3.3 Pyrosequenzierung	29
4.4 Immunhistochemische Methoden	30
4.4.1 Immunfluoreszenz	30
5 ERGEBNISSE	32
5.1 Etablierung des Zelldifferenzierungsversuchs	32
5.1.1 Morphologie während der Zelldifferenzierung	32
5.1.2 Genexpression im Verlauf der Zelldifferenzierung	33
5.1.2.1 Expression Myogenese-assoziiierter Gene	33
5.1.2.2 Expression Hedgehog-assoziiierter Gene	35
5.1.3 Immunhistochemische Darstellung der Zelldifferenzierung	35
5.2 Behandlung der Zelllinie C2C12 mit Folsäure	37
5.2.1 Vitalitätstest nach Folsäurebehandlung	37
5.2.2 Untersuchung der Differenzierungsfähigkeit nach Folsäurebehandlung	38
5.2.3 Morphologie nach Folsäurebehandlung	40
5.2.4 Genexpression im Verlauf der Zelldifferenzierung nach Folsäurebehandlung	41
5.2.4.1 Expression Myogenese-assoziiierter Gene	41
5.2.4.2 Expression Hedgehog-assoziiierter Gene	43
5.2.5 Untersuchung der DNA-Methylierung von <i>MyoG</i> im Verlauf der Zelldifferenzierung nach Folsäurebehandlung	44
5.2.5.1 Etablierung der Bisulfitsequenzierung	44
5.2.5.2 Methylierungsstatus von <i>MyoG</i>	46
5.3 Untersuchung der Genexpression im Gewebe der Maus	49
5.3.1 Expression Myogenese-assoziiierter Gene	49
5.3.2 Expression Hedgehog-assoziiierter Gene	51
6 DISKUSSION	52
6.1 Folsäure stimuliert die Zellproliferation und verzögert die Differenzierung	53
6.2 Folsäure erhöht die Methylierung von CpG-Dinukleotiden	55
6.3 Die duale Rolle der Folsäure in der Kanzerogenese	58
6.4 Die Diskussion der Folsäureanreicherung	60
7 ZUSAMMENFASSUNG	64
8 ABSTRACT	66
9 LITERATURVERZEICHNIS	70
10 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	78

11 EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG	81
12 LEBENSLAUF	82
13 DANKSAGUNG	84

1 Einleitung

Bis 1970 war die Ursache für Krebserkrankungen weitgehend unbekannt. Es wurde vermutet, dass äußere Einflüsse wie Ernährung, Lebensstil und Exposition gegenüber Giftstoffen Krebserkrankungen auslösen können. Heute weiß man, dass der Lebensstil und Umweltfaktoren zwar zur Krebsentstehung beitragen können, die Ursache von Krebs jedoch Mutationen in Tumorsuppressor- und Onkogenen im Genom einer Zelle sind. Treten Mutationen eines kontrollierenden Gens auf, kann die Balance zwischen Zellteilung und Zelltod aus dem Gleichgewicht geraten. Bei Tumorerkrankungen ist entweder die Zellteilung beschleunigt und/oder die Lebenszeit der Zellen verlängert, sodass es, ausgehend von einer Zelle, durch Proliferation zu einer vermehrten Anzahl von Zellen und somit zu einem Tumor kommen kann [MURKEN et al., 2006a].

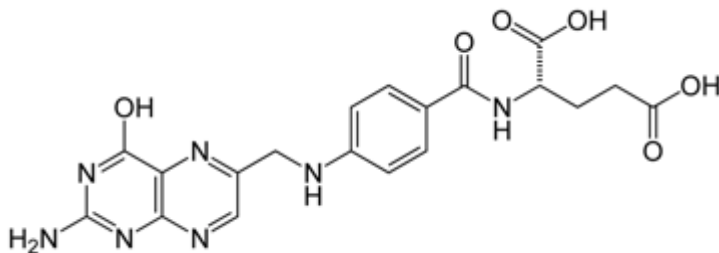
Im Gegensatz zu adulten Tumoren ist die Entstehung von kindlichen Tumoren auf eine fehlerhafte Differenzierung von embryonalen Zellen zurückzuführen. Prä- und postnatal sind Zellteilung, Apoptose und Zelldifferenzierung durch komplexe zelluläre Prozesse reguliert. Ist einer dieser Signalwege gestört, kann sich aus embryonalen Zellen ein Tumor entwickeln [SCOTTING et al., 2005].

Weiterhin ist heute bekannt, dass bei der Entstehung von Tumoren nicht nur genetische, sondern auch epigenetische Veränderungen eine Rolle spielen. Epigenetische Modifikationen wie die DNA-Methylierung von CG-reichen Sequenzen, die als CpG-Inseln bezeichnet werden, beeinflussen die Genexpression, ohne die DNA-Sequenz zu verändern. Eine anomale Methylierung von CpG-Inseln führt zu Fehlregulationen in der Differenzierung und kann somit ein weiterer Faktor für die Entstehung kindlicher Tumoren sein [KURMASHEVA et al., 2005]. Epidemiologische Studien lassen vermuten, dass auch Mikronährstoffe wie Folate die DNA-Methylierung beeinflussen können, da sie eine tragende Rolle bei der DNA-Synthese sowie bei biologischen Methylierungsreaktionen spielen [CHARLES et al., 2012].

1.1 Die Rolle der Folate im menschlichen Organismus

Folat ist ein wasserlösliches Vitamin, für dessen Vitaminwirkung unterschiedliche Folatverbindungen verantwortlich sind. Zu unterscheiden sind die in Lebensmitteln natürlich enthaltenen Folate und die zur Supplementierung verwendete, synthetisch hergestellte, Folsäure. Natürliche Folate bestehen chemisch aus Pteridin, para-Aminobenzoessäure und Glutamat. Über die γ -Carboxylatgruppe können bis zu acht Glutaminsäurereste gebunden sein, es wird dann von Polyglutamaten gesprochen. Die synthetisch hergestellte Folsäure (Abb. 1A) ist die stabilste Form des Vitamins. Sie ist ein vollständig oxidiertes Pteroylglutamat mit einem Glutaminsäurerest [DGE, 2008]. Die biologisch aktive Form der Folate ist die 5,6,7,8-Tetrahydrofolat (5,6,7,8-THF) (Abb. 1B). Diese wird in einer NADPH-abhängigen Reaktion durch Reduktion von Pteroylglutamat über die Dihydrofolsäure gebildet [PIETRZIK et al., 2010].

A



B

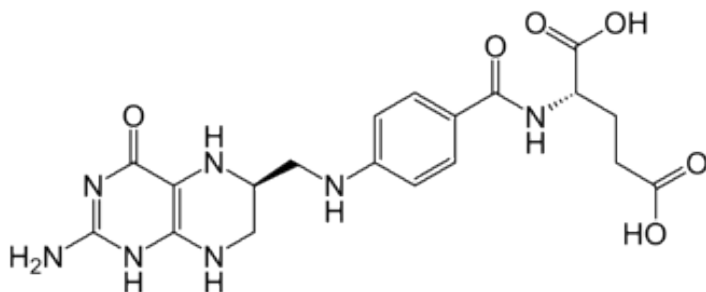


Abbildung 1: Strukturformel von A) synthetisch hergestellter Folsäure (Pteroylmonoglutamat) und B) 5,6,7,8-Tetrahydrofolat, der biologisch aktiven Form der Folate. Abbildungen übernommen von wikipedia.org, 2013.

Folate sind, wie in Abbildung 2 dargestellt, im menschlichen Organismus an einer Vielzahl von metabolischen Prozessen beteiligt. Ihre Hauptaufgabe ist die Übertragung von 1- Kohlenstoffeinheiten. Folate werden für die *de novo* Synthese von Desoxythymidinmonophosphat (dTMP) im 1-Kohlenstoffmetabolismus benötigt, das nach der Umwandlung in seine Triphosphatform dTTP bei der Synthese von DNA eine wichtige Rolle spielt. Folate sind außerdem an der Bildung von S-Adenosylmethionin (AdoMet) im Methioninzyklus beteiligt. AdoMet wird für die Biosynthese von Polyaminen benötigt und liefert Methylgruppen für intrazelluläre Methylierungsreaktionen [BISTULFI et al., 2010].

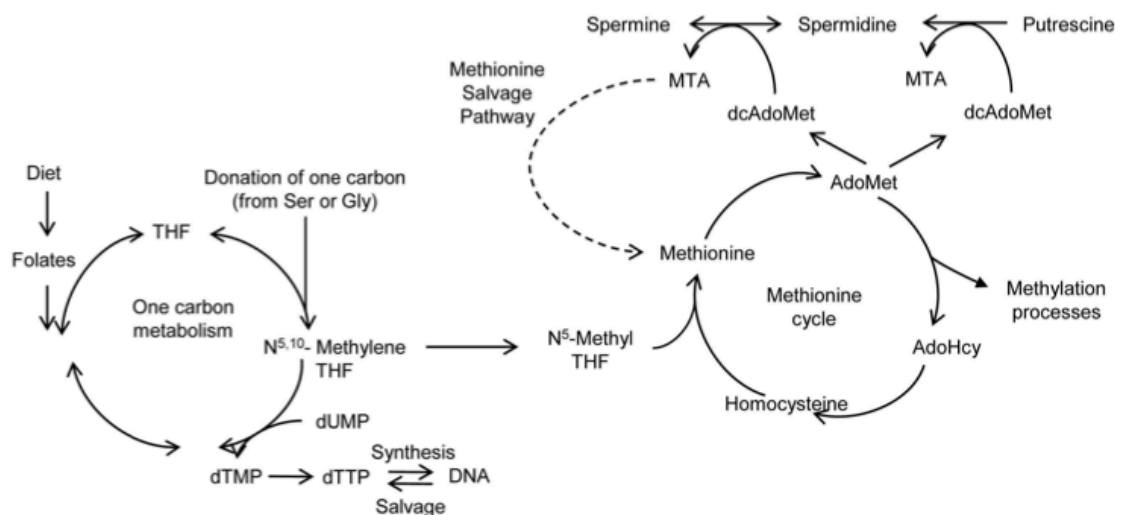


Abbildung 2: Folate im 1-Kohlenstoffmetabolismus und Methioninzyklus. Folate werden für die *de novo* Synthese von Desoxythymidinmonophosphat (dTMP) und S-Adenosylmethionin (AdoMet) benötigt. Diese Verbindungen sind für die DNA Synthese bzw. für intrazelluläre Methylierungsreaktionen von grundlegender Bedeutung. AdoMet wird außerdem für die Biosynthese von Polyaminen benötigt. dTMP kann durch DNA-Abbau als Thymidin abgefangen werden. AdoMet kann unabhängig von Folaten durch die Umwandlung von Methylthioadenosin (MTA) in Methionin im Methionin Salvage Pathway synthetisiert werden. Abbildung übernommen von Bistulfi et al., 2010.

Aufgrund ihrer zentralen Rolle im DNA-, RNA- und Proteinstoffwechsel sind Folate grundlegend für ein angemessenes Zellwachstum, eine normale Zellteilung sowie für eine optimale Zelldifferenzierung [WEIßENBORN et al., 2005].

Verschiedene Studien konnten zeigen, dass durch eine perikonzeptionelle Zufuhr von Folsäure das Risiko für die Entstehung von Neuralrohrdefekten (NRD)

gesenkt werden kann [LUMLEY et al., 2001; WOLFF et al., 2009]. Der genaue Mechanismus, der dieser Tatsache zugrunde liegt, ist nicht eindeutig geklärt. Es wird jedoch vermutet, dass veränderte Methylierungsmuster, die durch eine zu geringe Folatezufuhr entstehen, eine kausale Rolle bei der Entstehung von NRD spielen [CHANG et al., 2011]. Es wird daher empfohlen, spätestens vier Wochen vor Schwangerschaftsbeginn mit der Einnahme von 400 µg synthetischer Folsäure pro Tag zu beginnen und diese bis zum Ende des ersten Schwangerschaftsdrittels fortzuführen, da der Verschluss des Neuralrohrs normalerweise vier Wochen nach der Konzeption erfolgt. Hatte eine Frau bereits ein Kind mit NRD, wird sogar zu einer zusätzlichen Einnahme von 4 mg synthetischer Folsäure pro Tag geraten [WEIßENBORN et al., 2005].

Viele Frauen in Deutschland folgen diesen Empfehlungen nicht, da eine Vielzahl an Schwangerschaften ungeplant ist und diese erst zum oder nach dem Zeitpunkt des Neuralrohrverschlusses festgestellt werden. Deshalb werden Überlegungen angestellt, Grundnahrungsmittel in Deutschland mit Folsäure anzureichern [WEIßENBORN et al., 2005]. In den USA sowie in Kanada und Chile wird solch eine Folsäureanreicherung bereits durchgeführt. Seit der Umsetzung wurde in den Ländern eine signifikante Reduktion von NRD beobachtet. Es gibt jedoch auch Hinweise, dass eine perikonzeptionelle Folsäuresupplementierung nachteilige Wirkungen haben kann. Zu diesen zählen ein erhöhtes Risiko für eine Pylorusstenose, für obstruktive Harnwegsstörungen, Übergewicht und Insulinresistenz sowie für Dickdarmkrebs [STEEGERS-THEUNISSEN et al., 2009].

1.2 Die Myogenese

Die Skelettmuskulatur ist ein hochkomplexes und heterogenes Gewebe, das eine Vielzahl von Funktionen im Organismus übernimmt. Der Prozess der Muskelentwicklung wird als Myogenese bezeichnet. Alle Skelettmuskelfasertypen haben ihren Ursprung im paraxialen und prächordalen Mesoderm. Im Verlauf der Entwicklung formen mesenchymale Zellen des paraxialen Mesoderms lateral neben dem Neuralrohr epitheliale Strukturen, die sogenannten Somiten. Neugebildete Somiten bestehen aus einem Epithel und einem mesenchymalen

Hohlraum. Ein bereits epithelialisierter Somit wird in eine dorsale und eine ventrale Hälfte unterteilt. Aus dem ventralen Anteil entsteht das mesenchymale Sklerotom, welches die Anlagen für Knorpel und Knochen enthält. Der dorsale Anteil der Somiten bildet das Dermomyotom aus. Aus Zellen dieser Struktur bildet sich die spätere Skelettmuskulatur [BENTZINGER et al., 2012; YUSUF und BRAND-SABERI, 2012].

Postnatal verbleiben einige Muskelvorläuferzellen für Regenerationsprozesse als sogenannte Satellitenzellen. Diese sind zwischen Basalmembran und Sarkolemma lokalisiert [BENTZINGER et al., 2010]. Werden diese aktiviert, entstehen einkernige proliferative Myoblasten [ZAMMIT et al., 2006]. Sind die Zellen auf die terminale Differenzierung festgelegt, lagern sie sich zu Myocyten zusammen und fusionieren in weiterer Folge zu vielkernigen Myotuben, die dann zu Myofibrillen ausreifen (Abb. 3) [BENTZINGER et al., 2010; ZAMMIT et al., 2006].

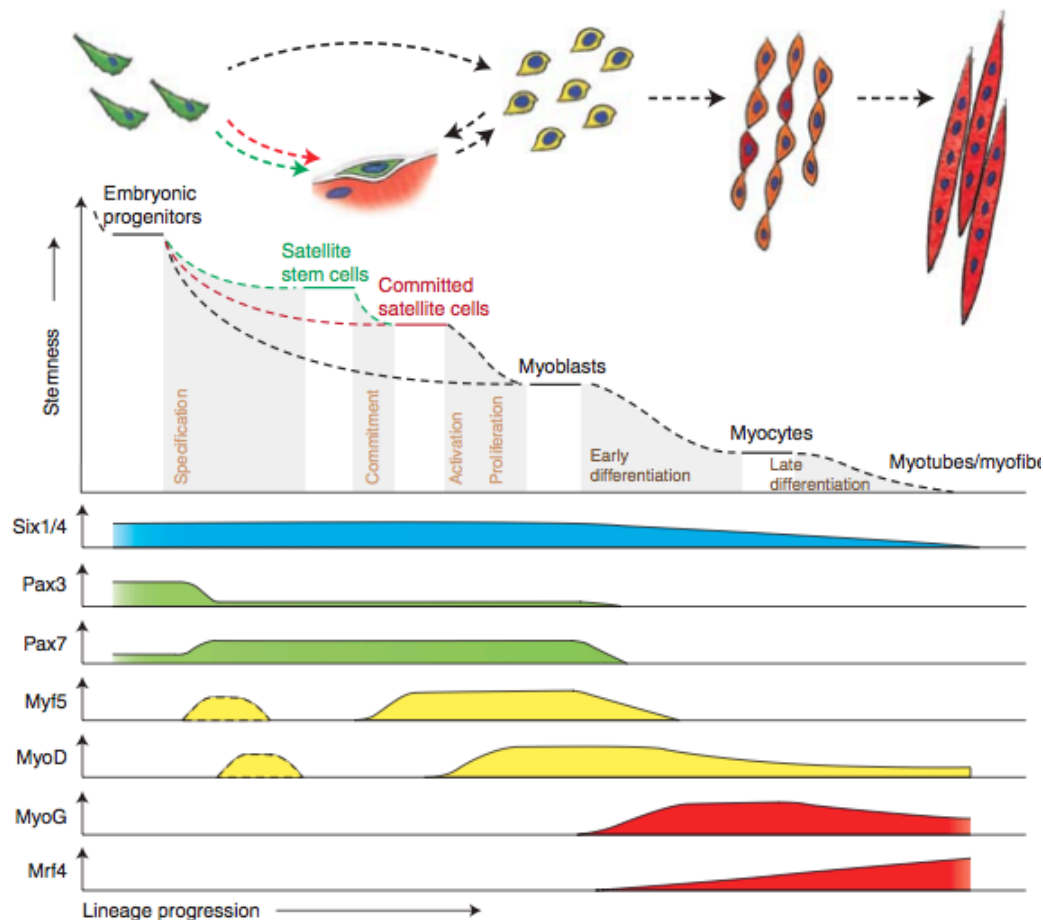


Abbildung 3: Hierarchie der Transkriptionsfaktoren in der Myogenese. Muskelvorläufer, die in die embryonale Muskeldifferenzierung eingebunden sind, verlassen das Ruhestadium der Satellitenzellen und werden direkt zu Myoblasten. Für Regenerationsprozesse verbleiben einige Vorläufer postnatal als Satellitenzellen. Six1/4 und Pax3/7 sind Regulatoren der frühen Zellspezifizierung, während Myf5 und MyoD Marker der terminalen Differenzierung sind und die Zellen auf das myogene Programm festlegen. Myogenin (MyoG) und Mrf4 werden für die Fusion der Myocyten und in weiterer Folge für die Ausbildung der Myotuben benötigt. Abbildung übernommen von Bentzinger et al., 2012.

Wie in Abbildung 3 dargestellt, erfolgt die Spezifizierung der multipotenten Zellen in den Somiten durch die Expression von muskelspezifischen Transkriptionsfaktoren. Zellen des Dermomyotoms sind durch die Expression der Paired-Box Transkriptionsfaktoren Pax3 und Pax7 [YUSUF und BRAND-SABERI, 2012], sowie durch geringe Expression des Basic Helix-Loop-Helix Transkriptionsfaktors Myf5 gekennzeichnet. Zellen des Myotoms, welches durch Ausreifung der Lippe des Dermomyotoms entsteht, exprimieren MyoD, einen weiteren Vertreter der Basic Helix-Loop-Helix Transkriptionsfaktoren, sowie

Myf5. MyoD und Myf5 gelten als Marker der terminalen myogenen Differenzierung. Bei einem Großteil der Muskelvorläuferzellen ist MyoD den Transkriptionsfaktoren Pax3 und Pax7 nachgeschaltet, Myf5 hingegen kann parallel zu diesen agieren. In weiterer Folge wird die Skelettmuskelentwicklung von den vier myogenen Regulationsfaktoren (MRFs) MyoD, Myf5, Myogenin (MyoG) und Mrf4 reguliert. Myf5 ist der erste MRF, der während der Embryogenese exprimiert wird [BENTZINGER et al., 2012]. Die Expression beginnt an Tag 8 der Embryogenese (e8.0) der Maus. Myf5 initiiert und koordiniert die myogene Kaskade durch Aktivierung des späteren MRFs MyoG, dessen Expression an e8.5 beginnt und bis zur Geburt in differenzierten Myoblasten nachgewiesen werden kann. Zusammengefasst sind Myf5 und MyoD den Differenzierungsmarkern MyoG und Mrf4 vorgeschaltet, um die Myoblasten auf die terminale Differenzierung festzulegen. MyoG und Mrf4 hingegen sind direkt in den Differenzierungsprozess eingebunden und lösen die Expression Myotuben-spezifischer Gene aus [BENTZINGER et al., 2012; PALACIOS et al., 2010].

Als Marker für die Zusammensetzung der Muskelfasern dienen die Myosin Heavy Chain (MyHC) Isoformen. Diese sind eine der Hauptkomponenten des kontraktile Apparates der quergestreiften Muskulatur. Verschiedene MyHC Isoformen wurden bisher beschrieben. Dazu gehören die embryonalen (MyHCemb) und neonatalen Isoformen (MyHCneo), die während der Muskelentwicklung und -regeneration exprimiert werden, sowie die adulten Isoformen, zu denen die Typen MyHCI, IIa, IIx und IIb zu zählen sind [AGBULUT et al., 2003; BROWN et al., 2012].

Als Modell für Untersuchungen der Myogenese und Muskeldifferenzierung eignet sich die Zelllinie C2C12. Es handelt sich dabei um aus Satellitenzellen hervorgegangene murine Myoblasten, die unter Serumreduktion zu vielkernigen Myotuben differenzieren [FERRI et al., 2009]. Im undifferenzierten Stadium sind flache, spindel- oder sternförmige, einkernige Zellen vorhanden. Die myogene Differenzierung ist durch eine fortlaufende Veränderung ihrer Zellmorphologie gekennzeichnet. Im mittleren Stadium der Differenzierung werden die Zellen konfluent und verlängern sich. In der späten Differenzierungsphase bilden sich

lange, vielkernige Myotuben. In dieser Phase sind auch bereits dünne und dicke Filamente, die als Sarkomere und Myofibrillen organisiert sind, zu erkennen [BURATTINI et al., 2004].

Auch das Transkriptionsprofil der Zelllinie C2C12 während der Zelldifferenzierung entspricht dem der Myogenese. Über einen Differenzierungsversuch von acht Tagen konnten Brown *et al.* folgende Beobachtungen machen: Die Expression von MyoD verändert sich im Verlauf der Zelldifferenzierung nicht. Die Expression von Myf5 hingegen ist hoch in Myoblasten und fällt im Verlauf der Differenzierung stark ab, verbleibt dann jedoch ab dem Zeitpunkt auf diesem Niveau. Auch die Expression von MyoG zeigt über den Verlauf starke Veränderungen. In Myoblasten ist diese sehr gering, steigt dann bis zur mittleren Phase der Differenzierung stark an und fällt dann wieder ab. Der Anstieg der MyoG-Expression fällt zeitlich zusammen mit dem Beginn der Ausbildung von Myotuben, der durch die Expression der MyHC Isoformen gekennzeichnet ist [BROWN et al., 2012].

Eine Studie von Kucharczak *et al.* konnte mithilfe der Zelllinie C2C12 zeigen, dass die Expression von R-Cadherin in Myoblasten die Myogenese inhibiert, eine Transformation der Myoblasten hervorruft sowie ihre Motilität erhöht und somit zur Tumorentstehung beitragen kann. R-Cadherine konnten bisher im sich entwickelnden Muskel sowie in Zelllinien und in Gewebe des Rhabdomyosarkoms (RMS) detektiert werden. Anhand dieser Daten wird deutlich, dass eine stark kontrollierte Genexpression während der embryonalen Entwicklung für Proliferations- und Differenzierungsprozesse der Muskelvorläuferzellen von großer Bedeutung ist und eine anomale Regulation zu Entwicklungsstörungen sowie zur Entstehung von Tumoren wie des RMS führen kann [KUCHARCZAK et al., 2008].

1.3 Das Rhabdomyosarkom

Das RMS ist das häufigste Weichteilsarkom im Kindesalter und macht ungefähr 7% aller kindlichen Krebserkrankungen aus. Die Tumoren können hinsichtlich

ihrer Histologie in zwei Subtypen unterteilt werden, das embryonale RMS (eRMS; ~60%) und das alveoläre RMS (aRMS; ~20%) [BELYEA et al., 2012]. Das eRMS tritt am häufigsten bei Kindern im Alter von 1-14 Jahren im Bereich des Kopfes und des Nackens sowie im Urogenitaltrakt auf. Vom aRMS hingegen sind hauptsächlich ältere Kinder und junge Erwachsene betroffen. Es findet sich vermehrt im Bereich der Extremitäten und des Rumpfes [WANG, 2012]. Da das aRMS schneller metastasiert als das eRMS, sind bei Patienten mit einem aRMS geringere Überlebensraten zu verzeichnen. Die 5-Jahres-Überlebensrate des eRMS beträgt 80%, die des aRMS 52% [BELYEA et al., 2012].

Genetisch ist das aRMS durch PAX3- bzw. PAX7-FKHR-Fusionsproteine charakterisiert, die durch reziproke Translokationen von Chromosom 2 bzw. 1 mit Chromosom 13 entstehen. Das eRMS zeigt einen Verlust der Heterozygotie des kurzen Arms von Chromosom 11 in der Region 11p15.5.

Es wird angenommen, dass das RMS aus Muskelvorläuferzellen entsteht, da muskelspezifische Gene exprimiert werden. Im Muskel wird die Balance zwischen Proliferation und Differenzierung durch Zellzyklusregulatoren und MRFs kontrolliert. Während Signalwege des Zellzyklus und der Myogenese hauptsächlich unabhängig voneinander reguliert werden, ist doch eine geregelte Interaktion der beiden Signalwege entscheidend für die normale Entwicklung des Muskelgewebes. Zellen des RMS weisen eine anomale Regulation dieser Signalwege auf, was die Basis für das unkontrollierte Wachstum und die fehlerhafte Differenzierung der Zellen darstellt [WANG, 2012].

1.4 Der Hedgehog-Signalweg

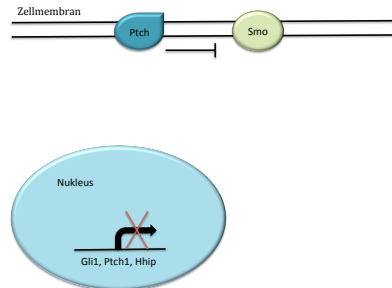
Der Hedgehog-Signalweg wurde erstmals 1980 als ein Gen beschrieben, das einen direkten Einfluss auf die embryonale Entwicklung in *Drosophila* hat. Hedgehog-Gene übernehmen Schlüsselfunktionen bei der Entwicklung eines Organismus. So kontrollieren sie verschiedene Prozesse während der Embryogenese, wie die Gewebekonstruktion, die Proliferation und Differenzierung. Auch im adulten Organismus spielt der Hedgehog-Signalweg eine wichtige Rolle und beeinflusst die Stammzellerhaltung, die Gewebereparatur und -regeneration. In Säugetieren

wurden bisher drei Hedgehog Proteine identifiziert - Sonic (Shh), Indian (Ihh) und Desert hedgehog (Dhh) [ROMA et al., 2012]. Dass Shh als Faktor für die Proliferation und den Erhalt der Satellitenzellen im adulten Organismus von Bedeutung ist, konnte von Koleva *et al.* gezeigt werden. Die Studie zeigt, dass Shh die Proliferation der Satellitenzellen fördert und gleichzeitig ihre Differenzierung zu vielkernigen Myotuben inhibiert [KOLEVA et al., 2005]. Eine Fehlfunktion des Signalwegs kann daneben zu schwerwiegenden Entwicklungsstörungen wie beispielsweise der Holoprosencephalie führen [GENG und OLIVER, 2009]. Postnatal können Mutationen im Hedgehog-Signalweg zu seiner pathologischen Aktivierung und somit zu diversen Krebsformen wie zu Basalzellkarzinomen, Medulloblastomen und RMS führen [GERBER et al., 2007].

Die drei Hedgehog-Proteine sind Liganden des Rezeptors Patched (Ptch). In Abwesenheit von Hedgehog wird Smoothened (Smo), ein Transmembranprotein, inhibiert und so die Signaltransduktion verhindert. Sobald Hedgehog einen Komplex mit Patched bildet, wird die inhibierende Wirkung aufgehoben und die Signalkaskade über einen Proteinkomplex aus Zink-Finger-Transkriptionsfaktoren der Gli-Familie (Glioma-associated, Gli), Costal2 (Cos2), Fused (Fu) und Suppressor of Fused (SuFu) aktiviert (Abb. 4). Gli wandert in den Zellkern, bindet an entsprechende Promotoren und führt so zur Expression verschiedener Zielgene wie Gli1, Ptch1 und Hhip [ROMA et al., 2012; GERBER et al., 2007; LUM et al., 2003].

Der Hedgehog-Signalweg

a) in Abwesenheit des Liganden Hh



b) in Anwesenheit des Liganden Hh

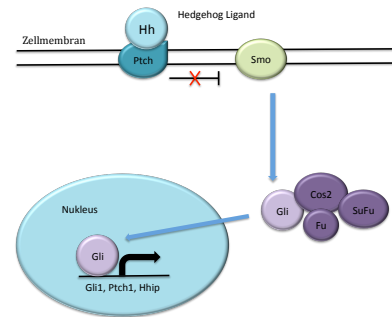


Abbildung 4: Schematische Darstellung des Hedgehog-Signalwegs. a) In Abwesenheit des Liganden Hedgehog (Hh) wird Smoothened (Smo) durch Patched (Ptch) inhibiert. Der Signalweg wird nicht aktiviert. b) In Anwesenheit von Hh bindet der Ligand an seinen Rezeptor Ptch, wodurch die Inhibition von Smo unterdrückt wird. Die Signalkaskade wird über einen Proteinkomplex aus Glioma-associated (Gli), Costal2 (Cos2), Fused (Fu) und Suppressor of Fused (SuFu) aktiviert. Gli wandert in den Zellkern, bindet an entsprechende Promotoren und führt so zur Expression verschiedener Zielgene wie Gli1, Ptch1 und Hhip.

1.5 Epigenetik

Conrad Waddington prägte 1942 den Begriff der Epigenetik [DOLINOY et al., 2007]. Nach moderner Definition beschäftigt sich die Epigenetik mit der Weitergabe von Eigenschaften an Nachkommen, die nicht auf Abweichungen in der DNA-Sequenz, sondern auf eine vererbare Änderung der Genregulation und Genexpression zurückzuführen ist. Bekannte epigenetische Veränderungen sind die DNA-Methylierung, die Histonmodifikation (Acetylierung, Phosphorylierung und Methylierung) und die RNA-Interferenz [MURKEN et al., 2006b]. Die DNA-Methylierung tritt an einem Cytosin innerhalb eines 5'-CpG-3'-Dinukleotids auf. Dabei wird eine Methylgruppe von AdoMet enzymatisch mittels DNA-Methyltransferase auf das 5-Kohlenstoffatom des Cytosins übertragen [CRIDER et al., 2012]. Wie bereits erwähnt beeinflusst die DNA-Methylierung von CpG-Inseln die Genexpression. Eine starke Methylierung eines Gens unterdrückt seine Expression, bei geringer Methylierung hingegen geschieht dies nicht [MURKEN et

al., 2006b]. Der Methylierungszustand eines Gens bleibt über die Zellteilung hinweg stabil erhalten [CHOI und MASON, 2000]. In normalen Zellen sind CpG-Inseln von Haushaltsgenen sowie von Tumorsuppressorgenen unmethyliert. In Neoplasien hingegen zeigen CpG-Inseln innerhalb von Genpromotoren häufig eine Hypermethylierung, die Expression der entsprechenden Gene wird somit unterdrückt. Diese Gene sind beispielsweise Tumorsuppressorgene, Apoptosegene und Gene der DNA-Reparatur und zellulären Abwehr [KURMASHEVA et al., 2005].

2 Zielsetzung der Arbeit

Seit 1995 gilt in Deutschland für Frauen, die schwanger werden wollen, die Empfehlung, täglich 400 µg Folsäure in Form von Supplementen über die normalen Zufuhrempfehlungen hinaus einzunehmen, um die Entstehung eines NRD beim Embryo zu verhindern. Bei hohen Folataufnahmen über die Nahrung konnten bisher keine unerwünschten Effekte beobachtet werden. Für synthetische Folsäure hingegen ist bisher weitgehend nicht bekannt, welche Wirkungen hohe Dosen dieser Verbindung auf den Organismus haben können.

In Tierstudien konnte bereits gezeigt werden, dass weit über den Bedarf hinausgehende Einnahmen von Folsäure bei bereits vorhandenen prämaligen Läsionen oder neoplastischen Herden das Krebsrisiko erhöhen und die Tumorentwicklung beschleunigen können [WEIßENBORN et al., 2005].

In den Industriestaaten konnte in den letzten Jahrzehnten ein genereller Anstieg der Krebserkrankungen bei Kindern um 1% verzeichnet werden. Dieser ist zum Teil durch die verbesserte Diagnostik bedingt, ist jedoch auch auf die Lebensumstände, die sich in den letzten Jahrzehnten stark verändert haben, zurückzuführen [KAATSCH, 2005].

Vor diesem Hintergrund wurde in dieser Arbeit untersucht, ob und welchen Einfluss Folsäure auf die Entstehung von Tumoren der quergestreiften Muskulatur, im Speziellen des RMS, hat. Dafür wurde mithilfe der Zelllinie C2C12 der Prozess der Muskeldifferenzierung in der Embryogenese nachgestellt. Etwaige Veränderungen, die durch die Gabe von Folsäure während des Differenzierungsprozesses entstehen können, wurden auf genetischer sowie auf epigenetischer Ebene überprüft. Auf genetischer Ebene wurden dabei die Expression der Zielgene des Hedgehog-Signalwegs *Gli1* und *Ptch1*, als Marker der Myogenese die Gene *Pax7*, *Myf5*, *MyoG* und *MyHC* untersucht. Außerdem wurde ermittelt, ob Expressionsunterschiede von *MyoG* auch auf epigenetischen Veränderungen, insbesondere auf DNA-Methylierungen beruhen.

Insgesamt sollen die Ergebnisse dieser Arbeit ermöglichen, eine Aussage über den Einsatz von Folsäuresupplementen während der Schwangerschaft im Hinblick auf die Entstehung von RMS treffen zu können.

3 Material

3.1 Zelllinien

C2C12

Es handelt sich hierbei um eine murine Myoblasten-Zelllinie, die muskelspezifische Proteine exprimiert und bei niedriger Serumkonzentration zu vielkernigen Myotuben differenziert [YAFFE und SAXEL, 1977].

3.2 Gewebe

Mauslinie *Ptch*^{+/-}

Es handelt sich dabei um Mäuse mit einer Deletion im *Patched*-Gen, die RMS ausbilden [HAHN et al., 1998]. Es wurde Tumor- und Normalgewebe entnommen.

3.3 Kulturmedien

DMEM, High Glucose

RPMI 1640, GlutaMAX™

RPMI 1640, no folic acid

Life Technologies GmbH, Darmstadt

Life Technologies GmbH, Darmstadt

Life Technologies GmbH, Darmstadt

3.4 Antibiotika

Penicillin-Streptomycin

Life Technologies GmbH, Darmstadt

3.5 Enzyme

Hot Start Taq DNA-Polymerase

Thermo Scientific, München

(5U/μl)	
iTaq SYBR Green Supermix with ROX	Biorad, München
Proteinase K (10mg/ml)	Sigma-Aldrich, Steinheim
SuperScript™ II Reverse Transkriptase (200U/μl)	Invitrogen, Karlsruhe
Trypsin-EDTA (0,05%)	PAA Laboratories GmbH, Cölbe

3.6 Größenstandards

Gene Ruler™ 100bp DNA Ladder	Thermo Scientific, München
------------------------------	----------------------------

3.7 Primer

Die Primersequenzen wurden für die verschiedenen Anwendungsbereiche mit der Software Primer Express (Applied Biosystems) designt und von Eurofins MWG Operon, Ebersberg bezogen.

Tabelle 1: Primer für die quantitative *real-time* Polymerasekettenreaktion (PCR)

Bez	Sequenz fw	Sequenz rev	AL	Lok
<i>Gli1</i>	GAATCGGACCCACTCCAATG	GTGTTTGCGGAGCGAGCT	91	Ex 10/11
<i>MyHCIIa</i>	CTGACACTGGCCAAGGTTGAG	TGGTTTCGTCCAGGCCTG	91	Ex 22/23
<i>MyHCemb</i>	ACAGAAGTCCCGGCTGCAG	CTTGCTCCTGGAGAGCTGAGA	91	Ex 28/29
<i>Myf5</i>	GAACAGCAGCTTTGACAGCATC	GGACAAGCAATCCAAGCTGG	91	Ex 2/3
<i>MyoG</i>	GCAATGCACTGGAGTTCGG	ATGGACGTAAGGGAGTGCAGA	91	Ex 2/3
<i>Pax7</i>	GGCTCCCTCCAACCACATG	CTGTGGAGGCACGGCAC	91	Ex 7/8
<i>Ptch1</i>	CTCCTGAAACCCAAAGCCAA	CGTCTCTACTCGGGTGGTC	91	Ex 14/15
<i>Tbp</i>	TCACTCCTGCCACACCAGC	TCAAGTTTACAGCCAAGATTACG	91	Ex 3/4

Angegeben sind die Bezeichnung (Bez), die Sequenz des forward-Primers (Sequenz fw) und des reverse-Primers (Sequenz rev) in 5'-3'-Richtung, die Amplikonlänge in Basenpaaren (AL) sowie die Lokalisation (Lok) des Primers innerhalb des Gens anhand der Exons (Ex). Alle Primer sind spezifisch für murine Gene.

Tabelle 2: Primer für die PCR der bisulfitkonvertierten DNA

Bez	Sequenz fw	Sequenz rev	AL	Lok
Myo1	GGGGTTGTGGAGAAATGAAAAT	CATATAATTCCCCTTCCTCTCCTTT	133	-265- -132
Myo2	GAGAGGGAAGGGAATTATATGT	AAAATCCCCAATCCCTTTTCTT	379	-154- +225
Myo3	GATTTGATGGAGTTGTATGAGATATTT	AAAATCCCCAATCCCTTTTCTT	179	+46- +225

Angegeben sind die Bezeichnung (Bez), die Sequenz des forward-Primers (Sequenz fw) und des reverse-Primers (Sequenz rev) in 5'-3'-Richtung, die Amplikonlänge in Basenpaaren (AL) sowie die Lokalisation (Lok) in Basenpaaren relativ zum Transkriptionsstart.

Tabelle 3: Sequenzierprimer für die Pyrosequenzierung

Bez	Sequenz	Lok
Myo1	GTGGAGAAATGAAAATTAATTAAT	- 259
Myo2	GGAATTATATGTAATTTATTGGAAA	- 143
Myo3	ATTTTTTTGTTTATTTTAGGGT	+ 116

Angegeben sind die Bezeichnung (Bez), die Sequenz des Sequenzierungsprimers in 5'-3'-Richtung sowie die Lokalisation (Lok) in Basenpaaren relativ zum Transkriptionsstart.

3.8 Chemikalien, Reagenzien und Puffer

Agarose	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
Borsäure	Roth, Karlsruhe
Bovine Serum Albumin (BSA)	Roth, Karlsruhe
Chloroform	Roth, Karlsruhe

Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Steinheim
dNTPs	Roche Diagnostics, Penzberg
Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline without CaCl_2 , MgCl_2 (DPBS)	Life Technologies GmbH, Darmstadt
Dithiothreitol (DTT)	Invitrogen, Karlsruhe
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Roth, Karlsruhe
Ethanol	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ethidiumbromid (10 mg/ml)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Fetal Bovine Serum (FBS)	Life Technologies GmbH, Darmstadt
Folsäure	Sigma-Aldrich, Steinheim
Horse Serum, Heat Inactivated	Life Technologies GmbH, Darmstadt
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Magnesiumchlorid (MgCl_2)	Thermo Scientific, München
MTT I Lösung	MTT gelöst in DPBS
MTT II Lösung	HCl, H_2O , SDS
Natriumchlorid (NaCl)	Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxid (NaOH)	Roth, Karlsruhe
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Phenol	Roth, Karlsruhe
PyroMark Annealing Buffer	Qiagen, Hilden
PyroMark Binding Buffer	Qiagen, Hilden
PyroMark Denaturation Solution	Qiagen, Hilden
PyroMark Gold Q24 Reagents (5 x 24)	Qiagen, Hilden
PyroMark Wash Buffer	Qiagen, Hilden
Random Hexamere	Roche Diagnostics, Penzberg
Salzsäure (HCl)	Roth, Karlsruhe
Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)	Roth, Karlsruhe
STE-Puffer	Tris, NaCl, EDTA, SDS
Streptavidin Sepharose High Performance	GE Healthcare Bio Sciences AB, Uppsala
Tri-Reagent	Sigma-Aldrich, Steinheim
Tris	Roth, Karlsruhe
Triton X100	Sigma-Aldrich, Steinheim

UltraPure™ DNase/RNase-Free	Life Technologies GmbH, Darmstadt
Distilled Water	
Vecta Shield Mounting Medium (with DAPI)	Biozol Diagnostica Vertrieb GmbH, Eching
1 st strand buffer	Invitrogen, Karlsruhe
6x DNA Loading Dye	Thermo Scientific, München
10x Hot start Taq Puffer	Thermo Scientific, München

3.9 Antikörper

Anti-Myogenin Alexa Fluor® 488, Clone: F5D	eBioscience, Frankfurt
--	------------------------

3.10 Verbrauchsmaterialien

Deckgläser rund 18 mm	Thermo Scientific, München
Falcon-Tubes	Greiner Bio-one, Frickenhausen
Nalgene® Kryoröhrchen	Schubert & Weiss GmbH, München
Neubauer-Zählkammer	Hycor, Penicuik
Parafilm® M	Sigma-Aldrich, Steinheim
PyroMark Q24 Cartridge	Qiagen, Hilden
Safe-Lock Gefäße	Eppendorf AG, Hamburg
Serologische Pipetten	Sigma-Aldrich, Steinheim
Skalpelle	Pfm Medical AG, Köln
Standard 96 Well-PCR Platten	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
Zellkulturflaschen (25 cm ² , 75 cm ²)	Nunc™, Roskilde
Zellkulturschalen Ø 10 cm	Nunc™, Roskilde
Zellschaber	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
6-Well, 12-Well, 96-Well Platten	Nunc™, Roskilde

3.11 Kits

EpiTect Bisulfite Kit (48)	Qiagen, Hilden
----------------------------	----------------

3.12 Geräte

Biofuge fresco	Heraeus, Hanau
BioPhotometer	Eppendorf AG, Hamburg
Canon PowerShot G6	Canon, Krefeld
Centrifuge 5702	Eppendorf AG, Hamburg
Feinwaage Te1245	Sartorius, Göttingen
Fluoview FV1000 Confocal Microscope	Olympus Deutschland GmbH, Hamburg
Gelapparatur Mini-SUB CELL GT	BIORAD, München
Homogenisator Micra	ART, Müllheim
Intas UV-Systeme	Intas, Göttingen
Mastercycler personal	Eppendorf AG, Hamburg
Mikroskop Axiovert 40 CFL	Zeiss, Jena
PCR Cyclex Realplex	Eppendorf AG, Hamburg
PyroMark Q24 MDx	Qiagen, Hilden
Tecan GENios Microplatereader	Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim
Thermomixer comfort	Eppendorf AG, Hamburg

4 Methoden

4.1 Zellbiologische Methoden

4.1.1 Auftauen und Kultivieren von Zellen

In flüssigem Stickstoff kryokonservierte Zellen wurden möglichst rasch aufgetaut und in 9 ml vorgewärmtem Kulturmedium für 5 min. bei 1200 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgekippt und das entstandene Pellet in 5 ml frischem Medium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde anschließend in eine 25 cm² Zellkulturflasche gegeben und bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Um abgestorbene Zellen zu entfernen, wurde am nächsten Tag das Medium gewechselt.

Die für diese Arbeit verwendete Zelllinie C2C12 wurde in DMEM, High Glucose, 10% FBS und 1% Penicillin/Streptomycin bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert.

Sobald die Zellen eine Konfluenz von ca. 80% erreicht hatten, wurden die Zellen passagiert, um ein Absterben der Zellen zu verhindern. Dazu wurde das Medium entfernt und die Zellen mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 0,05%igem Trypsin/EDTA für 3 min. bei 37°C inkubiert, um sie vom Boden der Zellkulturflasche abzulösen. Um die Reaktion abzustoppen, wurde frisches Medium dazugegeben und die Zellsuspension in ein 15 ml Falconröhrchen überführt. Die Suspension wurde dann für 5 min. bei 1200 rpm zentrifugiert, sodass sich ein Zellpellet am Boden des Falconröhrchens bildete. Überschüssiges Medium wurde abgesaugt und das Pellet in 2 ml frischem Medium resuspendiert. Je nach Bedarf wurde die Zellsuspension in neue Zellkulturflaschen mit frischem Medium aufgeteilt.

4.1.2 Kryokonservierung von Zellen

Für die Kryokonservierung von Zellen wurden diese wie beim Passagieren mit 0,05%igem Trypsin/EDTA vom Boden der Zellkulturflasche abgelöst. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 9 ml frischem Medium abgestoppt. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand abgekippt und das Pellet in Einfriermedium resuspendiert.

Einfriermedium:

90% (v/v) DMEM/FBS

10% (v/v) DMSO

Jeweils 1,5 ml dieser Lösung wurden dann auf mehrere Kryoröhrchen aufgeteilt. Die Zellen wurden bei -80°C für mindestens 24 h gelagert und anschließend in flüssigen Stickstoff überführt.

4.1.3 Aussäen und Ernte von Zellen

Um eine definierte Zellzahl in den jeweiligen Zellkulturbehältern aussäen zu können, muss vorher die Zellzahl bestimmt werden. Dazu wurden die Zellen wie beim Passagieren abtrypsiniert und zentrifugiert und das entstandene Pellet in 1 ml frischem Medium resuspendiert. Aus dieser Zellsuspension wurden 10 µl entnommen und in eine Neubauer-Zählkammer überführt. Zur Bestimmung der Zellzahl wurden von drei Großquadraten jeweils drei Kleinquadrate ausgezählt. Die Zellzahl der drei Kleinquadrate wurde jeweils addiert und aus den drei Zählwerten anschließend der Mittelwert errechnet. Danach wurde die Zellzahl pro ml wie folgt ermittelt:

$\text{Zellzahl/ml} = \text{MW der Zellzahl aus drei Großquadraten} \times \text{Kammerkonstante} (10^4)$

Zur DNA- und RNA-Isolierung aus adhärenenten Zellen müssen die Zellen zuerst geerntet werden. Auch hier wurden die Zellen abtrypsiniert, in Medium aufgenommen und anschließend zentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wurde dann in 2 ml PBS resuspendiert und jeweils 1 ml der Zellsuspension in 2 ml Safe-Lock Gefäße überführt. Diese wurden dann für 5 min. bei 2000 rpm zentrifugiert. Danach wurde der Überstand vorsichtig abgekippt und wie in 4.2.1 und 4.2.2 beschrieben verfahren.

4.1.4 Differenzierung von Zellen

Die Zelllinie C2C12 besitzt die Fähigkeit, bei geringen Serumkonzentrationen zu vielzelligen Myotuben zu differenzieren. Für diese Arbeit wurde die Differenzierung durch RPMI 1640, GlutaMAX™ mit einem Zusatz von 2%

Pferdeserum (Differenzierungsmedium DM) induziert. Die Differenzierungsfähigkeit der Zellen wurde molekularbiologisch sowie immunhistochemisch untersucht.

4.1.5 Vitalitätsassay

Um die Auswirkungen von Folsäure auf die Proliferation bzw. Vitalität der Zellen zu untersuchen, wurde ein MTT-Assay durchgeführt. Hierbei kamen fünf Folsäurekonzentrationen zum Einsatz (200 μM , 20 μM , 2 μM , 0,2 μM , 0,02 μM ; Stock 200 mM gelöst in 1M NaOH). Proliferationsmedium, das nur Lösungsmittel enthielt (0 μM), wurde als Kontrolle mitgeführt. Für jede Konzentration wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt. In einer 96-Well Platte wurden dazu 5×10^3 Zellen in 100 μl Medium pro Well ausgesät. Sobald sich die Zellen am Boden des Wells abgesetzt hatten, wurde mit der Behandlung begonnen. Die Zellen wurden nun 48 h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert, wobei das mit Folsäure versetzte Medium nach 24 h gewechselt wurde. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen jeweils mit 10 μl MTT I Lösung versetzt. Das hier enthaltene gelbe Tetrazoliumsalz 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) wird von vitalen Zellen zum blauen Formazan verstoffwechselt. Nach weiteren 4 h Inkubation wurde jedes Well mit 100 μl MTT II Lösung versetzt, wodurch die Zellen lysiert werden und sich so das blaue Formazan freisetzt. Nach erneuter Inkubation über Nacht wurde die Absorption durch eine photometrische Messung bei 595 nm in einem Tecan GENios Microplatereader gemessen.

4.1.6 Behandlung mit Folsäure

Um zu untersuchen, wie sich die Gabe von Folsäure auf das Differenzierungsverhalten der Zellen auswirkt, wurde die Zelllinie C2C12 mit den in 4.1.4 genannten Folsäurekonzentrationen behandelt. Dazu wurden 5×10^5 Zellen pro Zellkulturschale ($\varnothing$ 10 cm) ausgesät. Pro Folsäurekonzentration wurden drei Kulturschalen angesetzt, um diese für 0 Tage, 5 Tage und 8 Tage zu kultivieren. Sobald sich die Zellen am Boden der Schale abgesetzt hatten, wurde das Proliferationsmedium durch Differenzierungsmedium, das vorher mit den jeweiligen Folsäurekonzentrationen versetzt wurde, ersetzt. Das Medium wurde

alle 48 h gewechselt. Nach der entsprechenden Inkubationszeit bei 37°C und 5% CO₂ wurden die Zellen zur DNA- und RNA-Isolierung (beschrieben in 4.2.1 und 4.2.2) geerntet.

4.2 Molekularbiologische Methoden

4.2.1 DNA-Isolierung aus Gewebe und adhärennten Zellen

Zur Gewinnung genomischer DNA aus Zellen und Geweben wurden die nach Ernte der Zellen erhaltenen Zellpellets oder entsprechende Gewebestücke über Nacht in 0,5 - 1 ml STE-Puffer mit 50 - 100 µl Proteinase K (10 mg/ml) bei 55°C verdaut. Nach dem Verdau wurde 1 Vol. Phenol dazugegeben, 5 min. per Hand invertiert und anschließend bei 8000 rpm und 4°C für 10 min. zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, in ein neues Tube überführt und 1 Vol. Chloroform zugegeben. Nach wiederholtem Invertieren für 5 min. wurde nochmals bei 8000 rpm und 4°C für 10 min. zentrifugiert. Der Überstand wurde in einem 15 ml Falconröhrchen mit 2,5 ml 100%igem Ethanol vorsichtig gemischt, um die darin enthaltene DNA zu fällen. Nach 5 minütiger DNA-Fällung wurde das entstandene DNA-Knäuel mit einer Pipette vorsichtig angesaugt und in ein neues Tube mit 500 µl 70%igem Ethanol überführt. Es folgte eine Zentrifugation bei 12000 rpm für 10 min. bei 4°C. Das Pellet wurde danach nochmals mit 70%igem Ethanol gewaschen und anschließend luftgetrocknet. Je nach Größe des Pellets wurde es in 30-100 µl ddH₂O für 10 min. bei 60°C gelöst und die DNA-Konzentration mittels eines Photometers gemessen. Die gelöste DNA wurde bis zur Weiterverarbeitung bei -20°C gelagert.

4.2.2 RNA-Isolierung aus Gewebe und adhärennten Zellen

Zur Isolierung von totalRNA aus Gewebe wurde ein Gewebestück in Tri-Reagent überführt und mit dem Homogenisator homogenisiert. Bei der Isolierung von totalRNA aus Zellen wurde das nach der Ernte entstandene Zellpellet in 1 ml Tri-Reagent lysiert. Alle weiteren Schritte wurden bei Gewebe und Zellen gleichermaßen durchgeführt. Zum Zell- bzw. Gewebelysat wurden 0,2 ml Chloroform gegeben, 15 sek. gevortext und nach 3 min. Inkubation bei

Raumtemperatur für 15 min. bei 12000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und in ein neues Tube überführt. Anschließend wurde 1 Vol. Isopropanol zugegeben und per Hand gemischt. Es folgte eine weitere Inkubation bei Raumtemperatur für 10 min und eine anschließende Zentrifugation für 15 min. bei 12000 rpm und 4°C. Das entstandene RNA-Pellet wurde mit gekühltem 70%igem Ethanol gewaschen und nach Abkippen des Überstands luftgetrocknet. Das Pellet wurde in 50 µl ddH₂O bei 55°C für 15 min. gelöst und die RNA-Konzentration mittels eines Photometers gemessen. Die RNA wurde bei -80°C gelagert.

4.2.3 cDNA-Synthese

Die Synthese von cDNA aus totalRNA wurde mittels reverser Transkription durchgeführt. Dazu wurden 2 µg der isolierten totalRNA mit ddH₂O auf ein Gesamtvolumen von 7 µl aufgefüllt. Nach der Zugabe von 5 µl Random-Hexamere (20 ng/µl) wurde der Ansatz für 10 min. bei 70°C inkubiert. Danach wurden jeweils 4 µl 5x 1st strand buffer, 2 µl DTT (0,1M) und 1 µl dNTPs (10mM) zugegeben. Darauf folgten eine Inkubation für 10 min. bei 25°C sowie eine Inkubation für 2 min. bei 42°C. Durch anschließende Zugabe von 1 µl SuperScript™ II Reverse Transkriptase (200U/µl) wurde die Synthese der cDNA induziert. Der Ansatz wurde bei 42°C 1 h inkubiert und die Reaktion durch Inkubation bei 70°C für 10 min. gestoppt. Um eine Endkonzentration von 20 ng/µl cDNA zu erhalten, wurde der Ansatz mit 80 µl ddH₂O aufgefüllt. Die cDNA wurde bei -20°C gelagert.

4.2.4 Quantitative *real-time* PCR

4.2.4.1 Primerdesign

Um Primer für die quantitative *real-time* PCR zu designen, wurde in der Genomdatenbank von ensembl.org nach dem entsprechenden Gen gesucht. Nach Angabe der Spezies und des gesuchten Gens wurden vorhandene Transkripte angezeigt. Nachdem ein Transkript ausgewählt wurde (bei mehreren vorhandenen Transkripten werden proteincodierende gewählt), werden die Exons des Gens angezeigt. Es wurden zwei möglichst große, hintereinanderliegende Exons gewählt und deren Sequenz in das

Computerprogramm *Primer Express* kopiert. Nach Angabe der Amplikonlänge (mind. 90 Basen), des GC-Gehalts (50-65%) und der Schmelztemperatur (58-60°C) wurden vom Programm mögliche Primerpaare angezeigt. Als Maß für die Primerspezifität wurde der Penalty-Wert herangezogen. Dieser sollte nach Möglichkeit kleiner als 15 sein. Ein weiteres Kriterium war die Lage der Primer in den Exons. Diese sollten so lokalisiert sein, dass die beiden Exons überspannt werden.

4.2.4.2 Genexpressionsanalyse

Die Untersuchung der Expression spezifischer Gene wurde mit Hilfe der quantitativen *real-time* PCR durchgeführt. Für jede zu untersuchende Probe wurde in jeweils zwei Wells einer 96-well-PCR-Platte 2 µl der entsprechenden cDNA pro Gen vorgelegt. In jedes Well wurden außerdem folgende Komponenten zugegeben:

Mastermix

- 10 µl iTaq SYBR Green Supermix with ROX
- 1 µl Primer fw des zu untersuchenden Gens
- 1 µl Primer rev des zu untersuchenden Gens
- 6 µl *ultraPURE*TM

Um zu überprüfen, ob sich in oben genannten Komponenten Kontaminationen befinden, wurden pro Gen zwei Negativkontrollen mitgeführt. Hierzu wurde in zwei Wells jeweils 18 µl des Mastermixes pipettiert, die mit *ultraPURE*TM anstatt mit cDNA versetzt wurden.

Die PCR wurde dann nach folgendem Programm durchgeführt:

Initiale Denaturierung: 2 min. 95°C

40 Zyklen:

- Denaturierung: 15 sek. 95°C
- Annealing: 15 sek. 55°C
- Elongation: 20 sek. 68°C

Um die Spezifität der Primerbindung überprüfen zu können, wurde am Ende der Reaktion eine Schmelzkurvenanalyse angefügt, die aus folgenden Schritten bestand:

- 15 sek. 95°C
- 20 min. 50 → 95°C (Heizrate 1°C/30 sek.)
- 15 sek. 95°C

Hold: 4°C

Für jede zu untersuchende Probe wurde neben den Kandidatengenomen das Haushaltsgen *Tbp* (TATA-Box binding protein) mitbestimmt. Die Kandidatengene wurden dann mittels folgender Gleichung auf *Tbp* normiert.

$$\Delta Ct (\text{Expression relativ zu Referenzgen}) = 2^{-(Ct \text{ zu untersuchendes Gen} - Ct \text{ } Tbp)}$$

4.3 Epigenetische Methoden

4.3.1 Bisulfitkonvertierung

Bei der Bisulfitkonvertierung handelt es sich um die Behandlung von DNA mit Bisulfit-Salzen. Durch diesen Vorgang werden unmethylierte Cytosine zu Uracil konvertiert, methylierte Cytosine bleiben unverändert. Die Bisulfitkonvertierung wurde mit Hilfe des Qiagen EpiTect Bisulfite Kit durchgeführt. Pro Ansatz wurden 2 µg DNA eingesetzt und mit RNase freiem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 20 µl aufgefüllt. Die weitere Vorgehensweise erfolgte laut Herstellerangaben. Am Ende der Aufreinigung der bisulfitkonvertierten DNA wurden jedoch für die Elution zweimal 20 µl EB-Puffer eingesetzt, woraus sich ein Endvolumen bisulfitkonvertierter DNA von 40 µl ergab.

4.3.2 PCR der bisulfitkonvertierten DNA

4.3.2.1 Primerdesign

Um den Methylierungsstatus mehrerer CpGs eines Gens untersuchen zu können, musste zuerst ein CpG-reicher DNA-Abschnitt festgelegt werden. Da der

Methylierungsstatus von *MyoG* während der Zelldifferenzierung bestimmt werden sollte, wurde mittels des Programms *PyroMark Assay Design* die Sequenz von *MyoG* in die bisulfitkonvertierte Sequenz umgewandelt. Die CpG-reiche Region wurde in Anlehnung an die in Palacios *et al.* untersuchte Region festgelegt und am 5'- und 3'- Ende noch um ca. 100 Basen erweitert. Diese Sequenz wurde dann nochmals in das oben genannte Programm kopiert, um für die PCR der bisulfitkonvertierten DNA und die Sequenzierung des PCR-Produkts mittels Pyrosequenzierung Primer ermitteln zu können. Es wurden drei Assays designt, deren Primer in Tab. 2 und 3 angegeben sind.

4.3.2.2 PCR und Agarose-Gelelektrophorese

Die zu untersuchenden DNA-Fragmente, die wie in 4.3.2.1 beschrieben festgelegt wurden, wurden mittels PCR vervielfältigt. Es wurden pro Ansatz 2 µl der bisulfitkonvertierten DNA vorgelegt und folgende Komponenten zugegeben:

- 1 µl Primer fw (10 µM)
- 1 µl Primer rev (10 µM)
- 2 µl 10x Hot start Taq Puffer
- 0,4 µl dNTPs (10 mM)
- 1,2 µl MgCl₂ (25 mM)
- 12,32 µl Aqua dest.
- 0,08 µl Hot start Taq Polymerase (5 U/µl)

Die PCR wurde nach folgendem Programm durchgeführt (die Annealingtemperatur wurde mit 53°C an die Primer angepasst):

Initiale Denaturierung: 4 min. 94°C

45 Zyklen:

- Denaturierung: 1 min. 94°C
- Annealing: 2 min. 53°C
- Elongation: 2 min. 72°C

Finale Elongation: 10 min. 72°C

Hold: 4°C

Mit dem entstandenen PCR-Produkt wurde anschließend eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Dazu wurde ein 1%iges Agarosegel mit folgenden Komponenten hergestellt:

- 1 g Agarose
- 100 ml TBE-Puffer
- 6 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml)

Jeweils 2 µl des PCR-Produkts wurden mit 1 µl *6x Loading Dye Solution* versetzt und in die Taschen des Agarosegels pipettiert. Zusätzlich wurde ein Größenstandard (Gene Ruler™ 100bp DNA Ladder) aufgetragen. Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte für 30 min. bei 80 Volt. Anschließend wurden die Fragmente mit Hilfe von UV-Licht auf dem Intas UV-System sichtbar gemacht, aufgenommen und zur Dokumentation ausgedruckt.

4.3.3 Pyrosequenzierung

Die Pyrosequenzierung ermöglicht die quantitative Analyse von DNA-Methylierungsmustern sowie die Quantifizierung des globalen Methylierungsstatus einer DNA-Probe. Das zur Verlängerung eines Sequenzierprimers einzubauende Nukleotid wird separat eingespritzt und führt bei Einbau zur Freisetzung von Pyrophosphat, das in ein Lichtsignal umgesetzt wird. Die Stärke des Lichtsignals ist direkt proportional zur Menge an eingebautem Nukleotid. Nicht eingebautes Nukleotid wird von der Apyrase abgebaut, bevor das nächste Nukleotid eingespritzt wird [TOST und GUT, 2007; LEHMANN, 2008].

Die Pyrosequenzierung wurde mit einem PyroMark Q24 MDx Pyrosequenzierungssystem (Qiagen) durchgeführt. Vor der Pyrosequenzierung muss das PCR-Produkt entsprechend vorbereitet werden. Pro Ansatz wurden 17 µl des PCR-Produkts in eine 24-well Platte vorgelegt. Folgende Komponenten wurden pro Ansatz zugegeben:

- 4 µl Streptavidin Sepharose High Performance Beads

- 40 µl Binding Buffer
- 19 µl *ultraPURE*[™]

In eine zweite, flache 24-well Platte wurden folgende Komponenten vorgelegt:

- 24,25 µl Annealing Buffer
- 0,75 µl Sequenzierungsprimer (10 µM)

Mit der PyroMark Workstation wird dann die an die Sepharose-Beads gebundene DNA mit den Primern, die sich in der flachen 24-well Platte befinden, zusammengebracht. Diese Platte wird zusammen mit der Kartusche, die den Enzym- und Substratmix sowie die Nukleotide enthält, in den Pyrosequenzierer gestellt und die Pyrosequenzierung gestartet. Mithilfe der PyroMark Q24 Software wurde als Endergebnis ein sogenanntes Pyrogramm erstellt, das den Methylierungsgrad der einzelnen CpGs in % angibt.

4.4 Immunhistochemische Methoden

4.4.1 Immunfluoreszenz

In einer 12-well Platte, die mit runden Deckgläsern versehen wurde, wurden pro Well 3×10^4 Zellen ausgesät. Nach Absetzen der Zellen auf den Deckgläsern wurden die Zellen mit Differenzierungsmedium versetzt und für 0 und 5 Tage inkubiert, um die Expression von MyoG darstellen zu können.

Verwendete Lösungen:

PFA-Lösung: 3% PFA in DPBS

PBS⁺-Lösung: 1% BSA in DPBS

PBS/Triton-Lösung: 0,15% Triton X100 in DPBS

Antikörper-Lösung: der verwendete Antikörper wurde in PBS⁺-Lösung im Verhältnis 1:200 verdünnt

Nach der Inkubationsdauer wurden die Zellen mit 1 ml PBS gewaschen und anschließend mit einer 3%igen PFA-Lösung für 15 min. fixiert. Die Lösung wurde

danach abgenommen und die Zellen 3x für je 5 min. mit PBS/Triton permeabilisiert. Im nächsten Schritt wurden die Zellen 3x für je 10 min. mit der PBS⁺-Lösung geblockt. Nun wurde in jedes Well 80 µl der Antikörperlösung pipettiert und die 12-Well Platte über Nacht bei 4°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Deckgläser 3x für je 5 min. mit DPBS inkubiert. Nach dem letzten Inkubationsschritt wurden die Deckgläser vorsichtig mit einer Pinzette aus dem Well gehoben und mit der Zellseite nach unten auf den vorbereiteten Objektträger (mit einem Tropfen Vectashield) gelegt. Das Deckglas wurde mit klarem Nagellack auf dem Objektträger fixiert und die Präparate im Dunkeln bei 4°C gelagert. Die Aufnahme der Fluoreszenzbilder erfolgte mittels des *Fluoview FV1000 Confocal Microscope*.

5 Ergebnisse

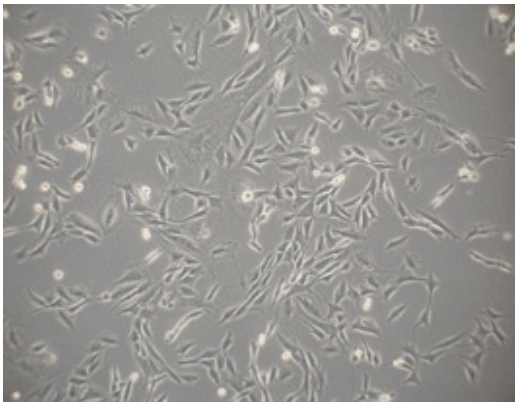
5.1 Etablierung des Zelldifferenzierungsversuchs

5.1.1 Morphologie während der Zelldifferenzierung

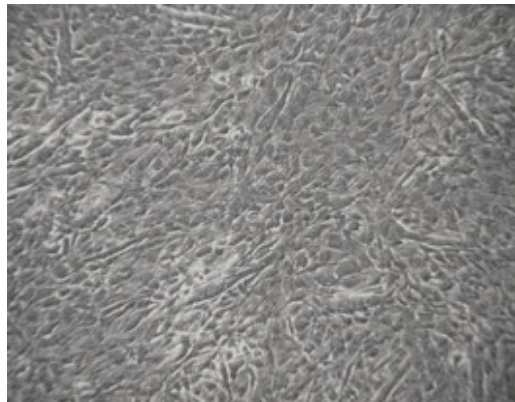
Da die Zelllinie C2C12 unter Serumreduktion und bei Konfluenz zu vielkernigen Myotuben differenziert, eignet sie sich sehr gut als Versuchsmodell für Untersuchungen der Myogenese und der Muskeldifferenzierung [FERRI et al., 2009].

Um den Zelldifferenzierungsversuch zu etablieren, wurde die Zelllinie C2C12 für 0 (T0), 5 (T5) und 8 Tage (T8) in Differenzierungsmedium (DM; enthält herkömmlich 9,1 μM Folsäure) kultiviert und die morphologischen Veränderungen beobachtet.

A



B



C

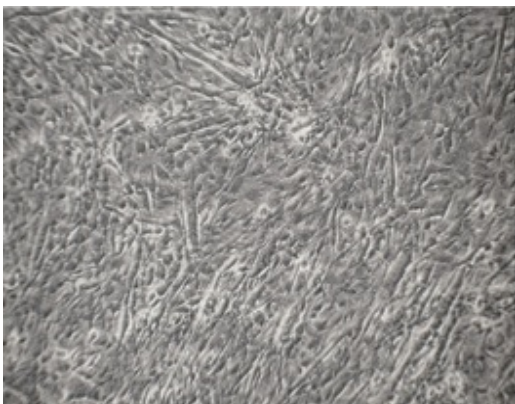


Abbildung 5: Morphologie der Zelllinie C2C12 während der Zelldifferenzierung. A: Undifferenzierte Zellen sind als einkernige, flache, spindel- oder sternförmige Myoblasten zu

erkennen. B: Im mittleren Stadium der Differenzierung (T5) zeigt sich die gerichtete Orientierung der Myoblasten. Es sind bereits binukleäre Zellen vorhanden. C: T8 ist charakterisiert durch die vermehrte Ausbildung langer, vielkerniger Myotuben.

An T0 sind undifferenzierte Myoblasten zu erkennen, die durch ihre flache, spindel- oder sternförmige Morphologie charakterisiert sind (Abb. 5A). Die Zellen sind ausnahmslos einkernig und adhärieren vereinzelt auf dem Boden der Zellkulturschale. Im mittleren Stadium der Zelldifferenzierung (T5) zeigt sich eine gerichtete Orientierung der Myoblasten sowie eine Zellverlängerung und -verdickung. In diesem Stadium sind bereits vereinzelt binukleäre Zellen zu erkennen (Abb. 5B). Nach acht Tagen in DM (T8) und somit im späten Stadium der Zelldifferenzierung sind vermehrt lange, vielkernige Myotuben erkennbar (Abb. 5C).

5.1.2 Genexpression im Verlauf der Zelldifferenzierung

Um die Differenzierung der Zelllinie C2C12 molekularbiologisch untersuchen zu können, wurde aus den Zellen zu den Zeitpunkten T0, T5 und T8 RNA isoliert und die Expression ausgewählter Gene mittels quantitativer *real-time* PCR gemessen.

5.1.2.1 Expression Myogenese-assoziiierter Gene

Der Prozess der Zelldifferenzierung wurde anhand der Expression der myogenen Marker *Pax7*, *Myf5*, *MyoG* und *MyHCIIa* untersucht.

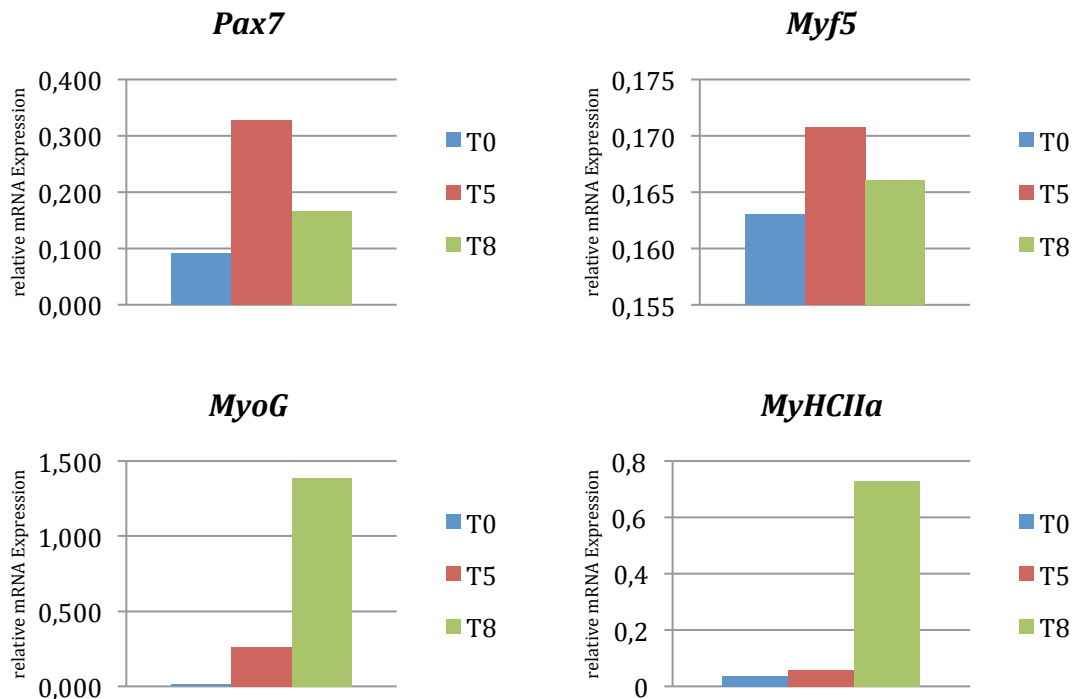


Abbildung 6: Expression Myogenese-assoziiierter Gene während der Differenzierung von C2C12. Dargestellt ist die zum Haushaltsgen *Tbp* relative Expression der Gene *Pax7*, *Myf5*, *MyoG* und *MyHCIIa* im Verlauf der Zelldifferenzierung zu den Zeitpunkten T0, T5 und T8.

Wie in Abbildung 6 dargestellt werden zum Zeitpunkt T0 die Gene *Pax7* und *Myf5* exprimiert, was im Falle von *Pax7* bestätigt, dass es sich um Vorläuferzellen der Skelettmuskulatur bzw. um Myoblasten handelt. Im Falle von *Myf5* deutet es auf die terminale Spezifizierung der Zellen auf die myogene Linie hin. Im Verlauf der Zelldifferenzierung werden *Pax7* und *Myf5* an T5 stärker exprimiert als an T0, zum Zeitpunkt T8 werden die Gene wieder herunterreguliert. Dies deutet auf eine fortschreitende Differenzierung der Zellen hin. Anhand von *MyoG* wird der Verlauf der Zelldifferenzierung deutlich sichtbar. Während an T0 *MyoG* kaum exprimiert wird, kann bereits an T5 eine mehr als zwanzigfache Expression detektiert werden. Dies zeigt, dass sich die Zellen im Differenzierungsprozess befinden. Im Hinblick auf die Expression von *MyHCIIa* ist zu erkennen, dass mit Expression von *MyoG* an T5 auch die Expression von *MyHCIIa* beginnt, da *MyoG* die Expression Myotuben-spezifischer Gene auslöst. Der frühere Anstieg der Expression von *MyoG* als der von *MyHCIIa* entspricht der Differenzierungskaskade. Die Expression von *MyoG* und *MyHCIIa* steigt bis T8 nochmals um ein Vielfaches. Dies zeigt, dass sich die Zellen zwar noch im Prozess

der Zelldifferenzierung befinden, die Expression von *MyHCIIa* weist aber auch darauf hin, dass bereits vielkernige Myotuben gebildet wurden.

5.1.2.2 Expression Hedgehog-assoziiierter Gene

Zur Untersuchung der Expression Hedgehog-assoziiierter Gene im Verlauf der Zelldifferenzierung wurden die Zielgene des Signalwegs *Gli1* und *Ptch1* herangezogen.

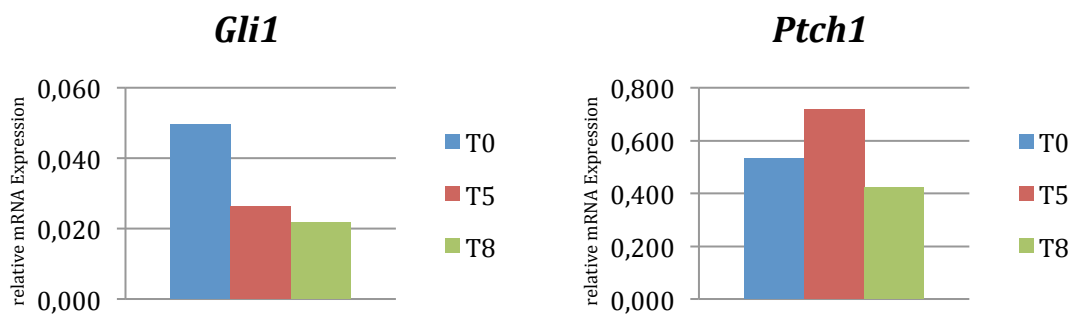


Abbildung 7: Expression Hedgehog-assoziiierter Gene während der Differenzierung von C2C12. Dargestellt ist die zum Haushaltsgen *Tbp* relative Expression der Gene *Gli1* und *Ptch1* im Verlauf der Zelldifferenzierung zu den Zeitpunkten T0, T5 und T8.

Während die Expression von *Gli1* insgesamt niedriger startet als die von *Ptch1*, werden doch beide Gene im Verlauf der Zelldifferenzierung herunterreguliert. Da *Gli1* und *Ptch1* zum Zeitpunkt T0 exprimiert werden, ist der Hedgehog-Signalweg in undifferenzierten Myoblasten bereits aktiviert. *Gli1* wird bis T8 stetig herunterreguliert. *Ptch1* wird bis T5 hochreguliert, an T8 hingegen fällt die Expression von *Ptch1* unter ihr Anfangsniveau zurück. Dieses Expressionsmuster spiegelt eine normale Regulierung des Hedgehog-Signalwegs wieder, der in undifferenzierten Zellen aktiviert ist und mit fortschreitender Differenzierung der Zellen seine Aktivität einstellt.

5.1.3 Immunhistochemische Darstellung der Zelldifferenzierung

Da *MyoG* ein deutlicher Marker für die Zelldifferenzierung ist, wurde, um den Zelldifferenzierungsprozess visualisieren zu können, im folgenden Experiment das MyoG-Protein zu den Zeitpunkten T0 und T5 mittels Immunfluoreszenz dargestellt.

Abbildung 8 zeigt, dass MyoG bereits zum Zeitpunkt T0 in einer Zelle exprimiert wird. Die Expression ist hierbei auf den Zellkern konzentriert (Abb. 8A). Mit fortschreitender Differenzierung (T5) zeigen sich vermehrt positive Zellkerne (Abb. 8B). Es ist aber auch zu erkennen, dass MyoG zum Zeitpunkt T5 ebenfalls, wenn auch noch sehr gering, im Cytoplasma exprimiert wird (Abb. 8C). Die Expression im Cytoplasma tritt im späteren Stadium der Zelldifferenzierung auf. Dennoch sind auch zu diesem Zeitpunkt noch viele MyoG-negative Zellen vorhanden, was auf Myoblasten im Ruhestadium hinweist.

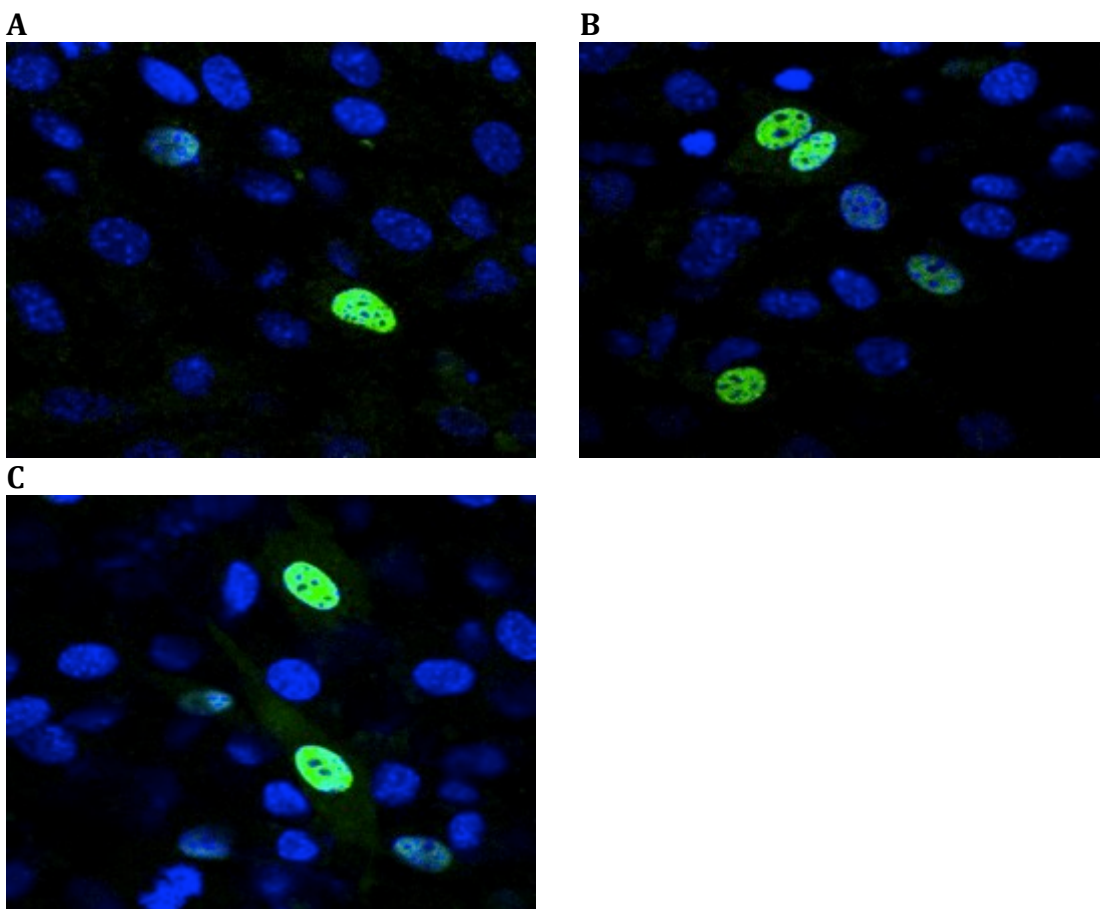


Abbildung 8: Expression von MyoG in der Zelllinie C2C12 im Verlauf der Zelldifferenzierung. Immunologischer Nachweis von differenzierten Myoblasten zum Zeitpunkt T0 (A) und T5 (B-C). A: Die MyoG-Expression in undifferenzierten Myoblasten ist auf den Zellkern konzentriert und nur in wenigen Zellen vorhanden. B: Die MyoG-Expression nach fünf Tagen in DM ist weiterhin großteils auf den Zellkern konzentriert. Die Anzahl an stark MyoG-exprimierenden Zellen hat sich vervielfacht. C: Bei wenigen Zellen zeigt sich bereits an T5 eine geringe Expression im Cytoplasma, was im späteren Stadium der Zelldifferenzierung auftritt.

5.2 Behandlung der Zelllinie C2C12 mit Folsäure

5.2.1 Vitalitätstest nach Folsäurebehandlung

Um den Einfluss von Folsäure auf die Vitalität der Zellen ermitteln zu können, wurde die Zelllinie C2C12 für 48 h mit sechs verschiedenen Folsäurekonzentrationen versetzt. Dabei kamen folgende Konzentrationen zum Einsatz: 0 μM (enthält nur das Lösungsmittel, kann jedoch durch die Zugabe von FBS zum Kulturmedium geringe Mengen an Folaten enthalten), 0,02 μM , 0,2 μM , 2 μM , 20 μM ($\sim 8,8 \text{ mg/l}$ Folsäure) und 200 μM ($\sim 88 \text{ mg/l}$ Folsäure). Zusätzlich wurde die Vitalität der Zellen ermittelt, die in herkömmlichem Zellkulturmedium (9,1 μM ; $\sim 4 \text{ mg/l}$ Folsäure) wie in Kapitel 5.1 kultiviert wurden. In Abbildung 9 ist zu sehen, dass bei einer Depletion von Folsäure die geringsten Vitalitätsraten zu verzeichnen sind. Die Vitalität steigt jedoch stetig bis hin zu einer Folsäurekonzentration von 20 μM . Da die Vitalität ab dieser Konzentration ein Plateau erreicht und der Vitalität der Zellen gleich kommt, die in herkömmlichen Medium kultiviert wurden, wurde im Folgenden eine Folsäurekonzentration von 20 μM als Optimum bzw. als physiologischer Bereich angenommen. Eine Konzentration von 0 μM , also Folsäuredepletion, wurde als pathologischer Bereich festgelegt, als supraphysiologischer Bereich die Folsäurekonzentration von 200 μM .

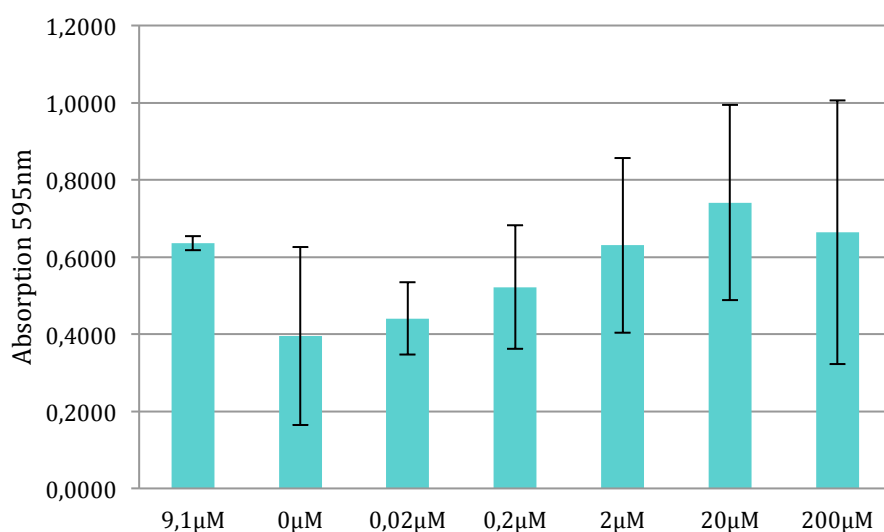


Abbildung 9: Vitalität der Zelllinie C2C12 nach Gabe von Folsäure für 48 Stunden. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert und die Standardabweichung der Absorption bei 595 nm aus

drei unabhängigen Messungen. Bei Folsäuredepletion sind die geringsten Vitalitätsraten zu verzeichnen, die dann mit steigender Folsäurekonzentration ansteigen und bei 20 μM ihr Maximum erreichen. Bei einer Konzentration von 200 μM erreicht die Vitalität ein Plateau bzw. geht im Mittel leicht nach unten.

5.2.2 Untersuchung der Differenzierungsfähigkeit nach Folsäurebehandlung

Um den Einfluss von Folsäure auf die Differenzierungsfähigkeit der Zelllinie C2C12 ermitteln zu können, wurde die Expression der deutlichsten Differenzierungsmarker *MyoG* und *MyHCIIa* nach Gabe der oben genannten sechs Folsäurekonzentrationen untersucht. Wie in Abbildung 10 deutlich zu erkennen ist, wird die Differenzierungsfähigkeit der Zelllinie durch Gabe von Folsäure stark beeinflusst.

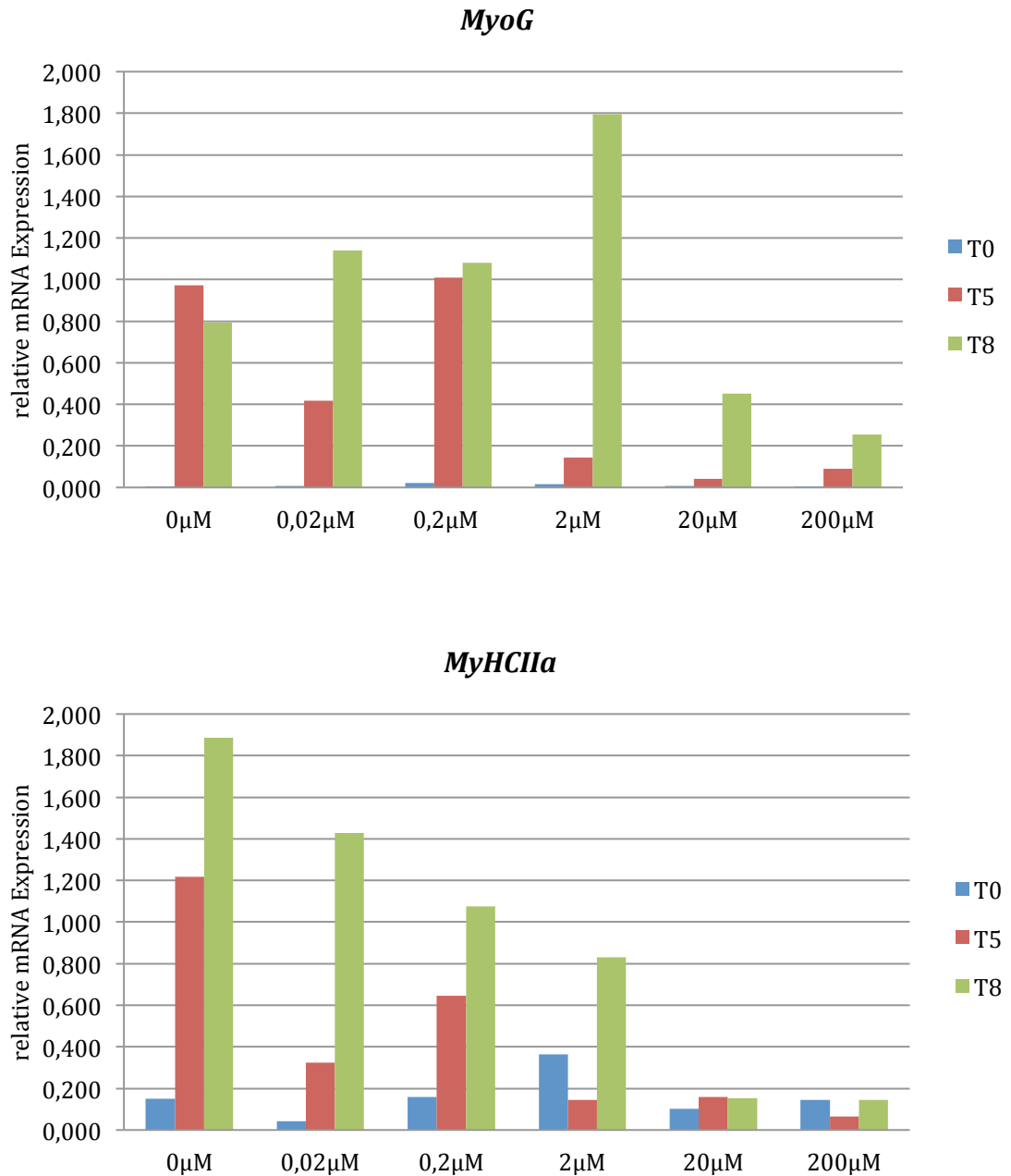


Abbildung 10: Expression von *MyoG* und *MyHCIIa* während der Differenzierung von C2C12 nach Folsäuredepletion bzw. Gabe von Folsäure. Dargestellt ist die zum Haushaltsgen *Tbp* relative Genexpression im Verlauf der Zelldifferenzierung zu den Zeitpunkten T0, T5 und T8.

Zum Zeitpunkt T0 wurde bei keiner Behandlung eine nennenswerte Expression von *MyoG* detektiert. Bei Folsäuredepletion steigt die Expression zum Zeitpunkt T5 stark an und sinkt dann wieder leicht. Bei allen Folsäurebehandlungen steigt die Expression bis T8 an, wobei dieser Anstieg bei einer Folsäurekonzentration von 2 μM an stärksten ist. Auffällig ist, dass ab einer Konzentration von 20 μM die Expression zwar im Verlauf von T0 zu T8 ansteigt, jedoch in deutlich geringeren

Maße als bei niedrigeren Folsäurekonzentrationen. Diese geringe Expression von *MyoG* deutet darauf hin, dass die Zellen bei hohen Folsäurekonzentrationen verzögert bzw. weniger stark differenzieren. Diesen Trend zeigt die Expression von *MyHCIIa* noch deutlicher. Die Expression steigt bei allen Behandlungen kontinuierlich bis T8 an, was auf eine fortgeschrittene Differenzierung der Zellen hindeutet. Aber auch hier ist eine rapide Reduktion der Expressionsstärke bei Folsäurekonzentrationen von 20 bzw. 200 μM zu beobachten. Insgesamt nimmt die Expression von *MyHCIIa* konzentrationsabhängig ab. Diese Beobachtungen stehen mit der erhöhten Vitalität der Zellen bei Folsäurekonzentrationen von 20 bzw. 200 μM im Einklang. Auf der Grundlage dieser Ergebnisse wurde der Fokus in den folgenden Experimenten auf die nach dem MTT-Assay festgelegte physiologische und supraphysiologische Folsäurekonzentration (20 bzw. 200 μM) sowie auf Folsäuredepletion (0 μM) gelegt.

5.2.3 Morphologie nach Folsäurebehandlung

Ausgangspunkt des Zelldifferenzierungsversuchs mit Folsäurebehandlung bilden die undifferenzierten, einkernigen, spindel- oder sternförmigen Myoblasten der Zelllinie C2C12. Nach fünf Tagen in DM, das mit Lösungsmittel bzw. Folsäure versetzt wurde, zeigen sich bereits deutliche Unterschiede in der Zellmorphologie. Bei Folsäuredepletion zeigt sich neben einer leichten Erhöhung der Zellzahl eine deutliche Vergrößerung der Zellen, die nach wie vor einkernig sind. Bei einer Folsäurekonzentration von 20 bzw. 200 μM ist zu beobachten, dass die Zellzahl stark erhöht ist. Die Zellen sind im Vergleich zum Zeitpunkt T0 deutlich kleiner. Auch im Vergleich zu T5 bei Folsäuredepletion fällt auf, dass die Zellgröße stark verringert ist. Es zeigt sich außerdem eine leichte Orientierung der Zellen. Zum Zeitpunkt T8 sind bei Folsäuredepletion nach wie vor deutlich größere Zellen und eine geringere Zellzahl als bei Folsäurekonzentrationen von 20 bzw. 200 μM zu erkennen. Die Ausbildung vielkerniger Myotuben ist jedoch bei keiner der drei Behandlungen sichtbar. Genauso fehlt die einheitliche Orientierung der Zellen.

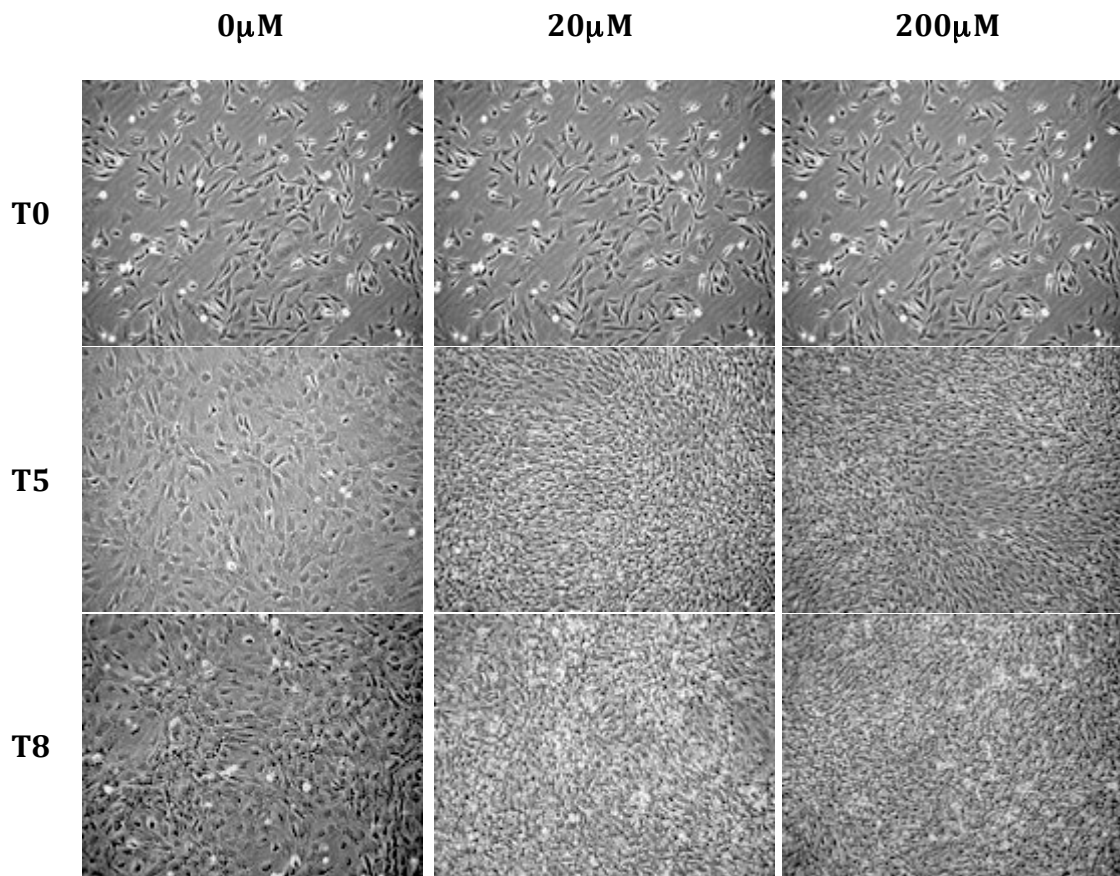


Abbildung 11: Morphologie der Zelllinie C2C12 im Verlauf der Zelldifferenzierung nach Folsäuredepletion bzw. Gabe von 20 und 200 μ M Folsäure. Bei Folsäuredepletion sind die Zellen zum Zeitpunkt T5 deutlich größer, die Zellzahl ist nur leicht erhöht. Bei Folsäurebehandlung ist die Zellzahl deutlich höher, die Zellen sind verkleinert und zeigen eine leichte Orientierung. Zum Zeitpunkt T8 zeigt sich bei Folsäuredepletion im Vergleich zu Folsäurebehandlung nach wie vor eine geringere Zellzahl sowie deutlich größere Zellen. Bei allen drei Konzentrationsstufen fehlt die gerichtete Orientierung der Zellen. Eine sichtbare Ausbildung vielkerniger Myotuben fehlt.

5.2.4 Genexpression im Verlauf der Zelldifferenzierung nach Folsäurebehandlung

Wie bei der Etablierung des Zelldifferenzierungsversuchs wurde die Genexpression der Myogenese- sowie Hedgehog-assoziierten Gene nach Behandlung mit Folsäure ermittelt.

5.2.4.1 Expression Myogenese-assoziiierter Gene

Betrachtet man die Expression der frühen myogenen Marker *Pax7* und *Myf5*, zeigt sich wie in Abbildung 12 dargestellt folgendes Bild: *Pax7* wird unter allen drei

Bedingungen an T0 am geringsten exprimiert. Die Expression steigt bei Folsäuredepletion und bei einer Konzentration von 20 μ M bis zum Zeitpunkt T8 stetig an, was darauf hinweist, dass sich die Zellen zum Zeitpunkt T8 noch in einem undifferenzierten Stadium befinden. Bei einer supraphysiologischen Folsäurekonzentration zeigte sich bereits an T5 eine maximale *Pax7*-Expression, die bis zum Zeitpunkt T8 erhalten blieb. Die Expression von *Myf5* weist bei allen drei Behandlungen und Zeitpunkten keine nennenswerten Veränderungen auf.

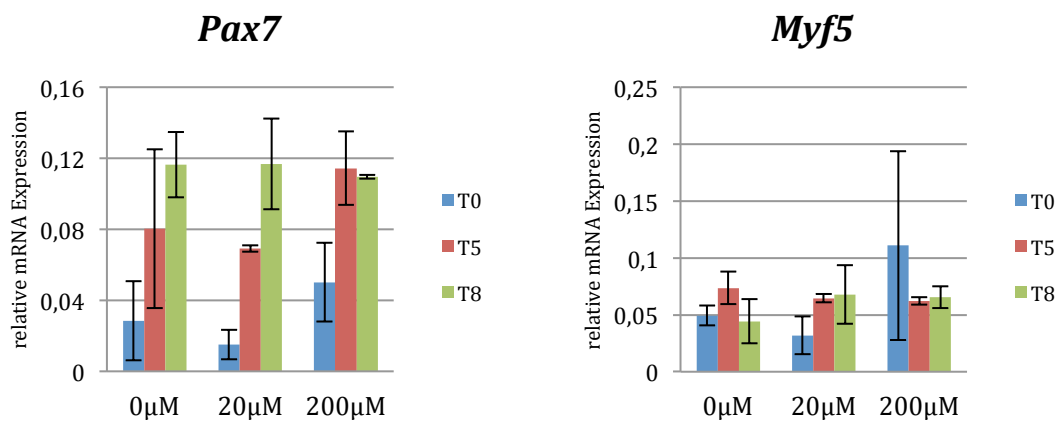


Abbildung 12: Expression der myogenen Marker *Pax7* und *Myf5* während der Differenzierung von C2C12 nach Folsäuredepletion bzw. Gabe von Folsäure. Dargestellt ist die zum Haushaltsgen *Tbp* relative Genexpression im Verlauf der Zelldifferenzierung zu den Zeitpunkten T0, T5 und T8. Es sind jeweils der Mittelwert und die Standardabweichung aus zwei Versuchen dargestellt.

In Abbildung 13 ist die Expression von *MyoG* und *MyHCIIa* bei Folsäuredepletion sowie bei physiologischen und supraphysiologischen Folsäurekonzentrationen, die aus zwei Zellversuchen ermittelt wurde, dargestellt. Auch hier lässt sich der in 5.2.2 beobachtete Trend ablesen. Bei Folsäuredepletion steigt die Expression von *MyoG* bis T5 an und erreicht dann im Mittel ein Plateau. Die Expression von *MyHCIIa* zeigt einen starken Anstieg bis T8. Daraus lässt sich ableiten, dass die Zellen bei Folsäuredepletion stark differenzieren, da an T8 die Expression von *MyoG* stagniert und die Expression des Myotuben-spezifischen Gens *MyHCIIa* stark ansteigt. Bei physiologischen und supraphysiologischen Folsäurekonzentrationen ist die Expression beider Gene im Vergleich zu Folsäuredepletion um ein Vielfaches geringer, zeigt aber dennoch den typischen Verlauf eines Anstiegs bis T8, wenn auch in stark verringertem Maße. Die

Reduktion der Expression von *MyHCIIa* an T5 ist bei einer Konzentration von 20 μM im Vergleich zu Folsäuredepletion signifikant, genauso bei einer Konzentration von 200 μM an T8. Insgesamt lässt sich aus diesem Ergebnis ableiten, dass die Zellen bei hohen Folsäurekonzentrationen in ihrer Differenzierungsfähigkeit gehemmt sind.

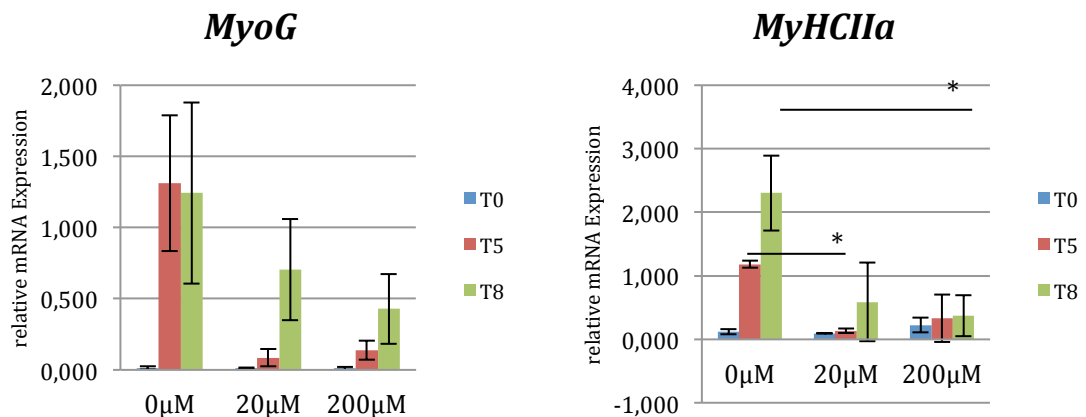


Abbildung 13: Expression von *MyoG* und *MyHCIIa* während der Differenzierung von C2C12 nach Folsäuredepletion bzw. Gabe von Folsäure. Dargestellt ist die zum Haushaltsgen *Tbp* relative Genexpression im Verlauf der Zelldifferenzierung zu den Zeitpunkten T0, T5 und T8. Es sind jeweils der Mittelwert und die Standardabweichung aus zwei Versuchen dargestellt. *P < 0,05 (t-Test für unabhängige Stichproben).

5.2.4.2 Expression Hedgehog-assoziiierter Gene

Wie in Abbildung 14 dargestellt, werden die Gene *Gli1* und *Ptch1* bei Folsäuredepletion in undifferenzierten Myoblasten exprimiert. Die Expression wird mit fortschreitender Differenzierung der Zellen bis zum Zeitpunkt T5 herunterreguliert. Zum Zeitpunkt T8 werden die Gene jedoch nicht weiter herunterreguliert. Dies könnte darauf hinweisen, dass die Inaktivierung des Hedgehog-Signalwegs bei Folsäuredepletion verzögert ist. Auch bei einer physiologischen Folsäurekonzentration von 20 μM zeigt sich diese Tendenz. Bei einer supraphysiologischen Konzentration von 200 μM hingegen werden *Gli1* und *Ptch1* im Verlauf der Differenzierung herunterreguliert, was eine normale Regulierung des Hedgehog-Signalwegs widerspiegelt.

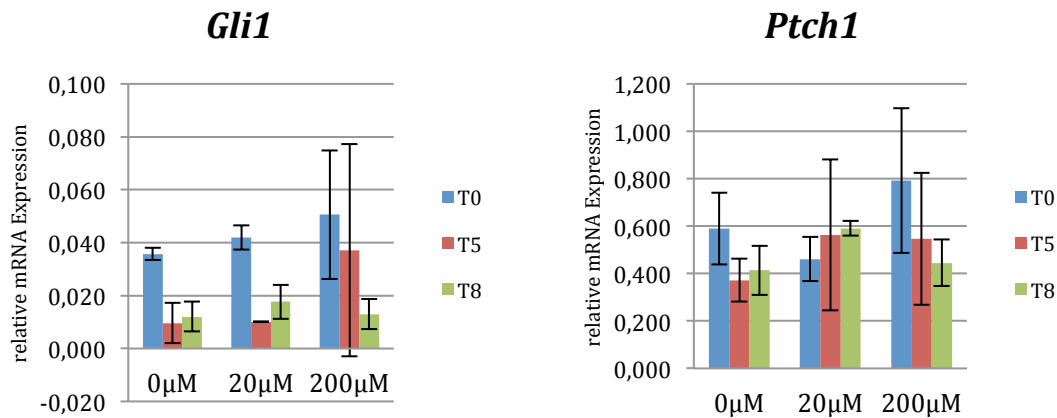


Abbildung 14: Expression Hedgehog-assoziiierter Gene während der Differenzierung von C2C12 nach Folsäuredepletion bzw. Gabe von Folsäure. Dargestellt ist die zum Haushaltsgen *Tbp* relative Expression der Gene *Gli1* und *Ptch1* im Verlauf der Zelldifferenzierung zu den Zeitpunkten T0, T5 und T8. Es sind jeweils der Mittelwert und die Standardabweichung aus zwei Versuchen dargestellt.

5.2.5 Untersuchung der DNA-Methylierung von *MyoG* im Verlauf der Zelldifferenzierung nach Folsäurebehandlung

5.2.5.1 Etablierung der Bisulfitsequenzierung

Neben der Genexpression wurde der Methylierungsstatus von *MyoG* bestimmt, um überprüfen zu können, ob Expressionsunterschiede auf epigenetische Veränderungen zurückgehen. Hierzu wurde zunächst in Anlehnung an Palacios *et al.* der Promotorbereich des Gens sowie der Bereich bis 191bp über das Startcodon hinaus auf das Vorhandensein von CpG-Dinukleotiden überprüft. Insgesamt wurden 14 CpGs gefunden (Abb. 15). Sieben CpGs befinden sich im Promotorbereich von *MyoG*. Weitere sieben erstrecken sich bis in das erste Exon. Die CpGs wurden in drei Abschnitte unterteilt (Myo1-3) und mit den jeweils für den entsprechenden Abschnitt designten Primern flankiert (Tabelle 2). Im Promotorbereich von *MyoG* befinden sich außerdem verschiedene Transkriptionsfaktorbindestellen, von denen jedoch keine ein CpG-Dinukleotid enthält. Dazu zählen eine Six-Bindestelle mit der Sequenz 5'-TCAGGTT-3', an die Proteine der Six-Familie binden [PALACIOS *et al.*, 2010], eine MyoD-Bindestelle mit der Sequenz 5'-AGCAGTTGGTG -3', eine Mzf-1-Bindestelle mit der Sequenz 5'-GAAGGGGA-3' sowie eine Bindestelle für c-Myc mit der Sequenz 5'-

AATCACATGTAA-3'. Die Lage der CpGs sowie der Transkriptionsfaktorbindestellen ist in Abbildung 15 schematisch dargestellt.

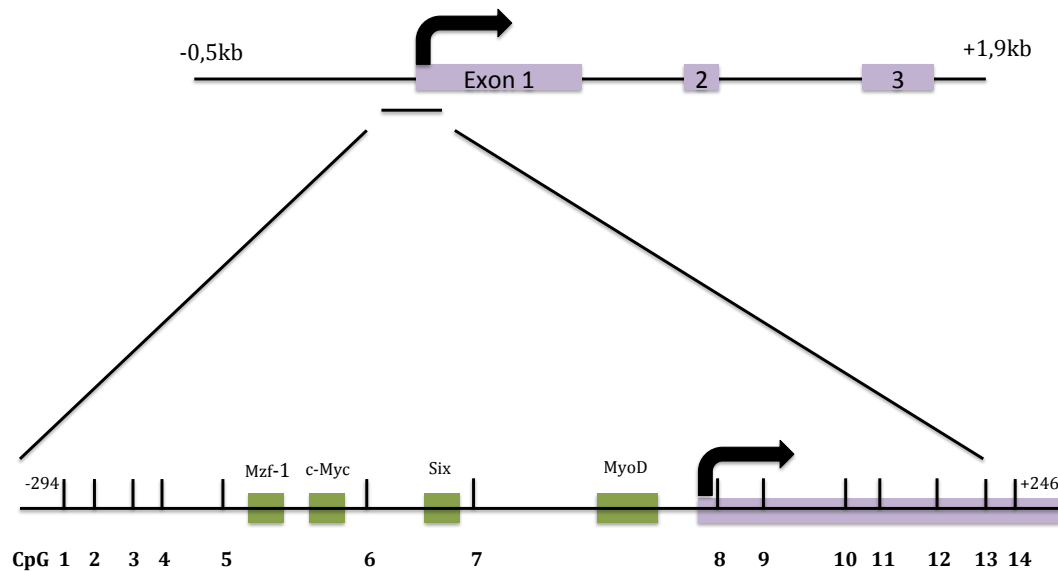


Abbildung 15: Schematische Darstellung des *MyoG*-Promotors und -Gens. Im oberen Bereich sind die Exons und deren Lage innerhalb des *MyoG*-Gens als Rechtecke (violett) dargestellt. Der untere Bereich zeigt die Lage der CpG-Dinukleotide innerhalb des *MyoG*-Promotors und -Gens, sowie die Lage und Bezeichnung der Transkriptionsfaktorbindestellen (grüne Rechtecke). Der Transkriptionsstart ist als schwarzer Pfeil dargestellt.

In Abbildung 16 ist das Pyrogramm eines Abschnitts des *MyoG*-Promotors der Zelllinie C2C12 nach Folsäuredepletion zum Zeitpunkt T8 dargestellt. Anhand des Pyrogramms kann nach der Pyrosequenzierung der Methylierungsgrad der untersuchten CpG-Dinukleotide, die in hellblau hervorgehoben sind, in % abgelesen werden. Die gelben Bereiche geben die internen Kontrollen für die Bisulfitkonvertierung an. Bei erfolgreicher Konvertierung sollte unmethyliertes Cytosin vollständig zu Thymin konvertiert sein.

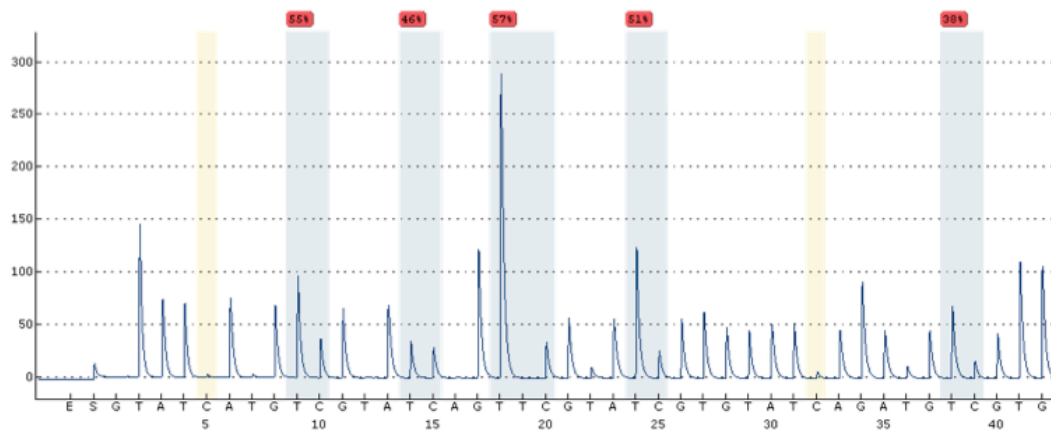


Abbildung 16: Pyrogramm eines Abschnitts des *MyoG*-Promotors. Dargestellt ist der Methylierungsgrad in % der ersten fünf CpG-Dinukleotide im *MyoG*-Promotor der Zelllinie C2C12 nach Folsäuredepletion zum Zeitpunkt T8. Unterhalb der Grafik befindet sich die zu analysierende Sequenz. Die hellblauen Areale zeigen die analysierten CpG-Dinukleotide. Die gelben Areale geben die internen Kontrollen für die Bisulfitkonvertierung an, bei der unmethyliertes Cytosin vollständig in Thymin konvertiert werden sollte. Die Sequenz zeigt eine mittelgradige Methylierung in den fünf analysierten CpG-Dinukleotiden. Die Höhe der Peaks zeigt die Menge an eingebautem Nukleotid.

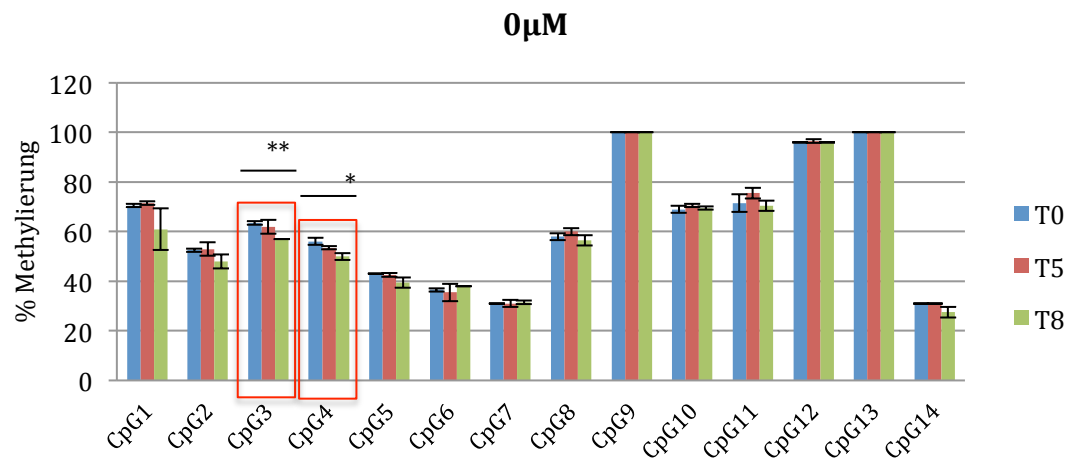
Unterhalb der Grafik ist die zu analysierende Sequenz angegeben. Die Höhe der Peaks gibt die Menge an eingebautem Nukleotid an. Wurden beispielsweise zwei Guanosine hintereinander eingebaut, zeigt sich ein doppelt so hoher Peak wie bei Einbau eines einzelnen Nukleotids. Betrachtet man die CpG-Dinukleotide, so ist in diesem Beispiel zu erkennen, dass die ersten fünf CpGs im *MyoG*-Promotor mittelgradig (38-57%) methyliert sind. Mithilfe solch eines Pyrogramms kann nun der Methylierungsgrad aller 14 identifizierten CpGs von *MyoG* der Zelllinie C2C12 im Verlauf der Zelldifferenzierung ermittelt werden.

5.2.5.2 Methylierungsstatus von *MyoG*

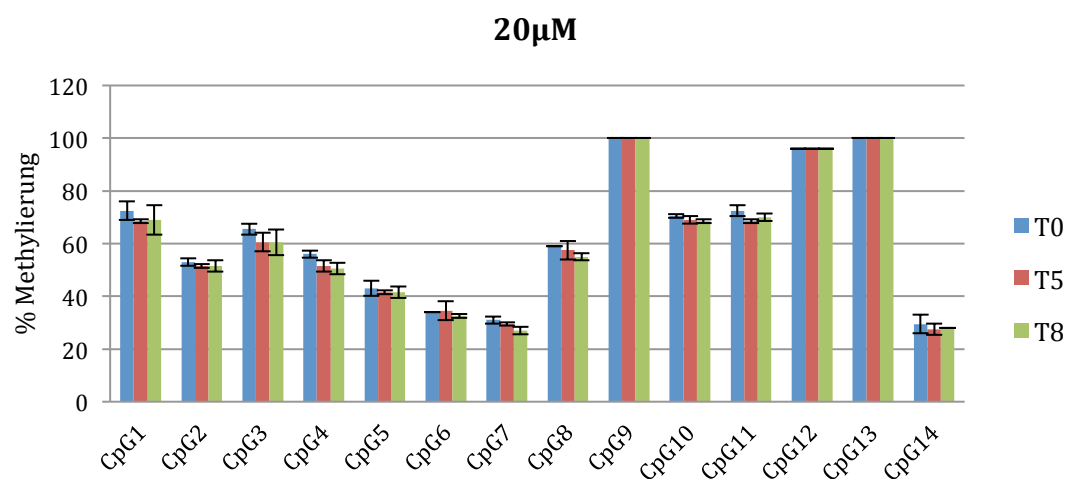
Nach erfolgreicher PCR-Amplifikation der gewünschten Genabschnitte wurde der Methylierungsstatus der CpGs mittels Pyrosequenzierung ermittelt. Die ersten fünf CpGs im Promotorbereich von *MyoG* werden im Verlauf der Zelldifferenzierung leicht demethyliert (Abb. 17A-C). Dieses Ergebnis wurde bei allen drei Behandlungen erzielt, wobei die Demethylierung nur bei

Folsäuredepletion signifikant ist. Die Demethylierung bei CpG4 ist signifikant mit $P < 0,05$, die bei CpG3 sogar hochsignifikant mit $P < 0,01$.

A



B



C

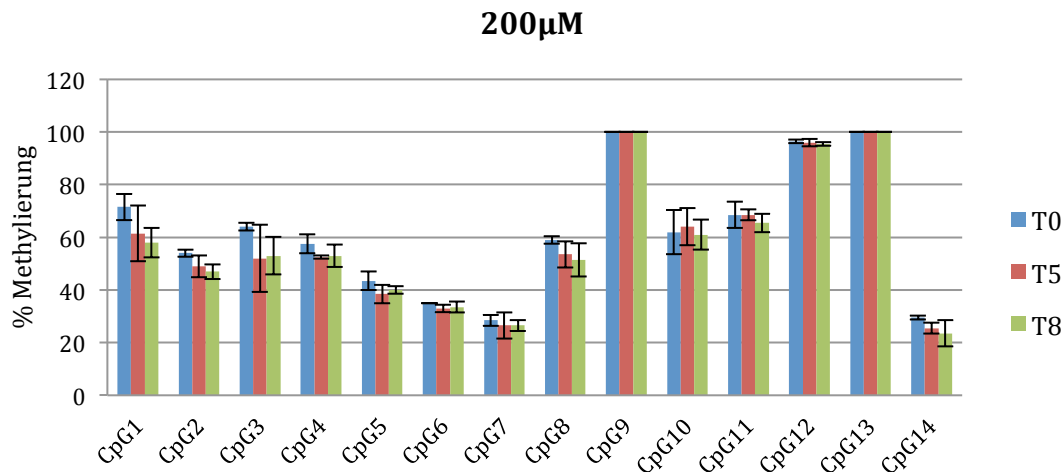


Abbildung 17: Methylierungsstatus der CpG-Dinukleotide von *MyoG* im Verlauf der Zelldifferenzierung nach Folsäurebehandlung. Dargestellt ist die Methylierung der CpGs im *MyoG*-Promotor und -Gen. Es sind jeweils der Mittelwert und die Standardabweichung aus zwei Versuchen dargestellt. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ (t-Test für unabhängige Stichproben). A: Bei Folsäuredepletion werden die CpGs (CpG1-5) im Promotorbereich von *MyoG* im Verlauf der Zelldifferenzierung demethyliert. Die Demethylierung bei CpG4 bzw. CpG3 ist signifikant bzw. hochsignifikant. B und C: Bei Behandlung mit 20 bzw. 200 µM Folsäure werden die CpGs im Promotorbereich ebenfalls geringfügig demethyliert. Die Demethylierung ist jedoch bei keinem der CpGs signifikant.

Dieses Methylierungsmuster ist mit der vorangegangenen Genexpressionsanalyse vereinbar. Bei Behandlung mit Lösungsmittel steigt die Expression von *MyoG* vom Zeitpunkt 0 zum Zeitpunkt 8 stark an, die Methylierung der CpGs sinkt gleichzeitig über diesen Zeitraum. Der Anstieg der Genexpression ist bei Behandlung mit 20 bzw. 200 µM Folsäure zwar ebenfalls vorhanden, jedoch in deutlich geringerem Maße. Die Demethylierung der CpGs findet entsprechend statt, ist aber nicht signifikant. Alle anderen CpGs, vor allem die, die nach dem Transkriptionsstart lokalisiert sind, sind während der Zelldifferenzierung teilweise zu 100% methyliert oder werden nicht oder nur geringfügig demethyliert.

5.3 Untersuchung der Genexpression im Gewebe der Maus

Neben der Genexpression in der murinen Zelllinie C2C12 sollte die Expression Hedgehog- und Myogenese-assoziiierter Gene im Gewebe von *Ptch*^{+/-} Mäusen untersucht werden. Dazu wurde von drei Mäusen jeweils Normalgewebe (NG) und Tumorgewebe (TG) entnommen.

5.3.1 Expression Myogenese-assoziiierter Gene

Da das RMS seinen Ursprung in myogenen Vorläuferzellen hat, werden Gene, die während der Myogenese exprimiert werden, ebenfalls im RMS exprimiert. Vor diesem Hintergrund wurde auch hier die Expression der Gene *Pax7*, *Myf5*, *MyoG*, *MyHCIIa* untersucht. Zusätzlich wurde die Expression von *MyHCemb* ermittelt. Während *MyHCIIa* hauptsächlich im reifen Muskelgewebe exprimiert wird, kann eine Expression von *MyHCemb* mehrheitlich während der Muskelentwicklung und -regeneration detektiert werden [BROWN et al., 2012].

Wie in Abbildung 18 dargestellt, werden die Gene *Pax7* und *Myf5* in allen TG um ein Vielfaches stärker exprimiert als in Proben des korrespondierenden NG. Dies bestätigt, dass sich im TG proliferierende und undifferenzierte Zellen befinden. Im Normalgewebe, also im reifen Muskel, werden die Gene nur noch sehr gering exprimiert. Der Marker der frühen Zelldifferenzierung, *MyoG*, wird im TG ebenfalls stärker exprimiert als im NG. Im NG wird *MyoG* herunterreguliert, da ein Großteil der Zellen die Myogenese bereits durchlaufen hat. Bei der Expression der myotubenspezifischen Gene *MyHCIIa* und *MyHCemb* zeigt sich folgendes Ergebnis: Reifes Muskelgewebe ist, wie erwähnt, charakterisiert durch die Expression von *MyHCIIa*. Auch im NG der Maus wird dieses Gen sehr stark exprimiert, wenn auch eine hohe Expression im TG detektiert werden konnte. Die Expression von *MyHCemb* zeigt ein deutlicheres Bild. Im NG konnte nahezu keine Expression detektiert werden. Im TG wird *MyHCemb* jedoch sehr stark exprimiert. Dies deutet darauf hin, dass einige Zellen zwar zu vielkernigen Myotuben fusionieren, die vollständige Differenzierung bleibt aber aus.

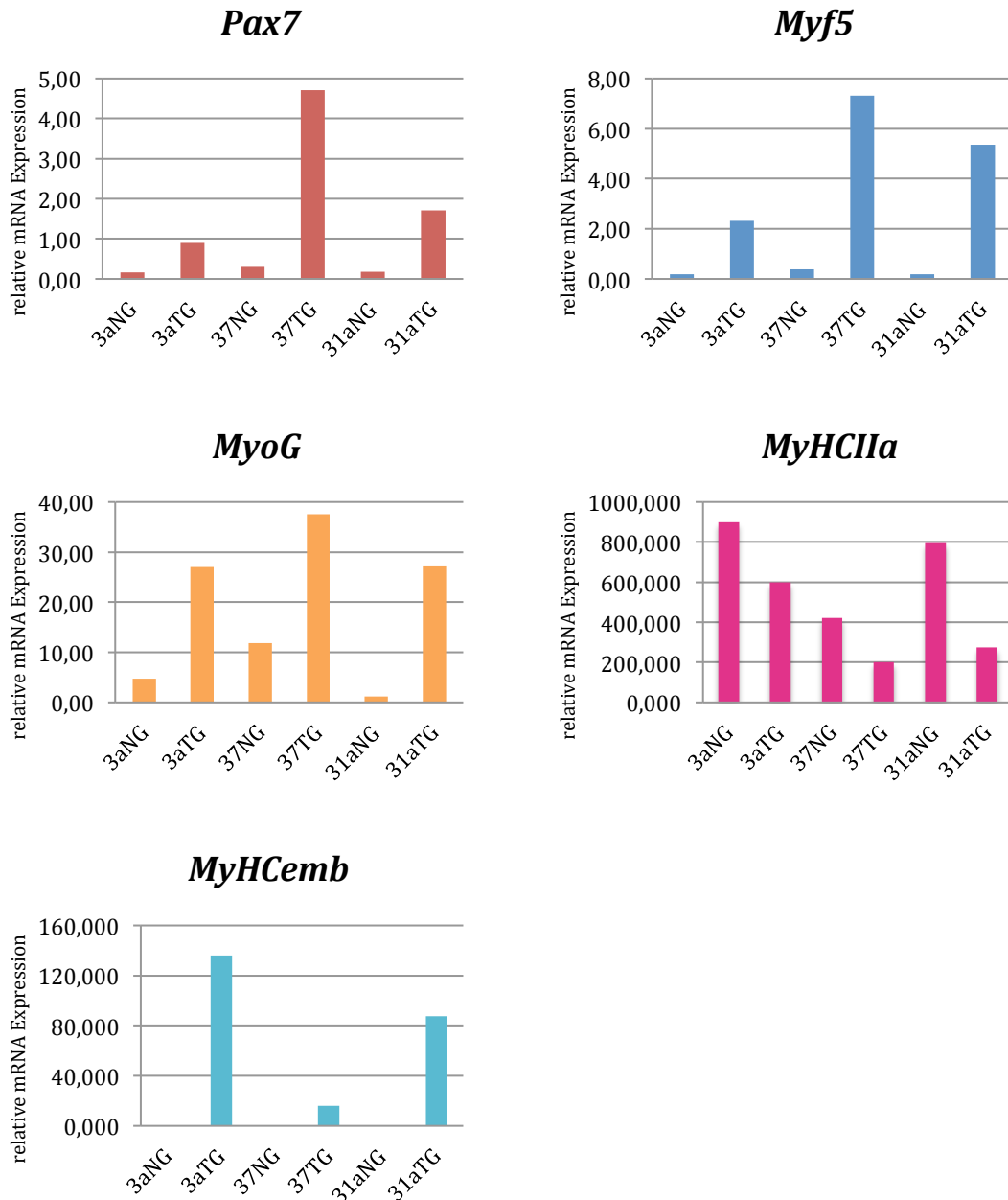


Abbildung 18: Expression Myogenese-assoziiierter Gene in Normalgewebe (NG) und Tumorgewebe (TG) von *Ptch*^{+/-} Mäusen. Dargestellt ist die zum Haushaltsgen *Tbp* relative Genexpression der Gene *Pax7*, *Myf5*, *MyoG*, *MyHCIIa* und *MyHCemb*.

Insgesamt zeigt dieses Ergebnis, dass sich die Zellen des RMS in den unterschiedlichsten Stadien der Differenzierung befinden. Es kommen zum einen proliferierende, myoblastenartige Zellen, die Rhabdomyoblasten vor, die die Gene *Pax7*, *Myf5* und *MyoG* exprimieren. Außerdem finden sich große, vielkernige Elemente, die Rhabdomyotuben, die die Grundlage für die Expression der myotubenspezifischen Gene *MyHCIIa* und *MyHCemb* bilden [NANNI et al., 2009].

5.3.2 Expression Hedgehog-assoziierter Gene

Aus der Literatur ist bekannt, dass das RMS eine anomale Regulierung des Hedgehog-Signalwegs aufweist [GERBER et al., 2007]. Bei einem Großteil der Fälle führt eine Mutation des Shh-Rezeptors *Patched* zu einer pathologischen Aktivierung des Signalwegs. Die Zielgene *Gli1* und *Ptch1* werden daher im RMS häufig überexprimiert [KOLEVA et al., 2005; ROMA et al., 2012; BELYEA et al., 2012]. Auch die Untersuchung des NG und TG von *Ptch*^{+/-} Mäusen zeigt, dass in allen drei Tumorgewebeproben die Gene *Gli1* und *Ptch1* stark exprimiert werden. Der Hedgehog-Signalweg ist demnach im RMS aktiv. Im Muskelgewebe hingegen ist die Expression beider Gene kaum mehr vorhanden, was eine Deaktivierung des Signalwegs widerspiegelt (Abb. 19).

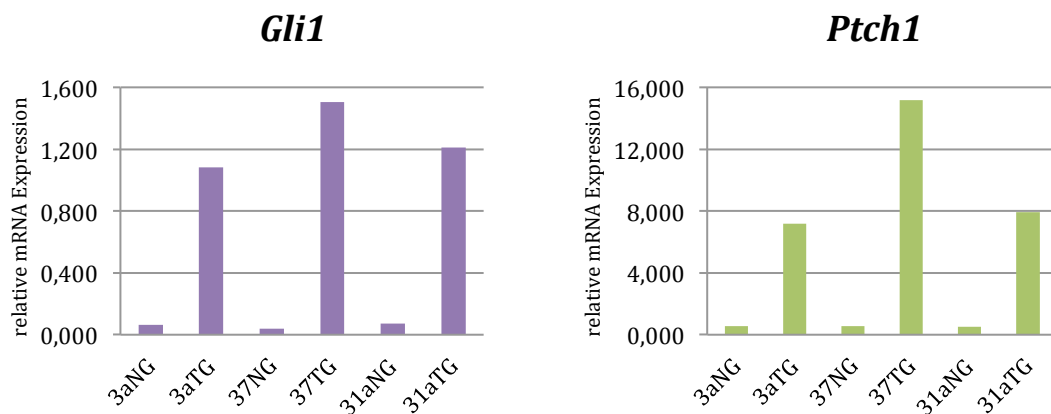


Abbildung 19: Expression Hedgehog-assoziierter Gene in Normalgewebe (NG) und Tumorgewebe (TG) des RMS von *Ptch*^{+/-} Mäusen. Dargestellt ist die zum Haushaltsgen *Thp* relative Genexpression der Gene *Gli1* und *Ptch1*.

6 Diskussion

Die Entstehung von RMS beruht unter anderem auf einer fehlerhaften Regulierung der Myogenese. Muskelvorläuferzellen, die als Ursprung des RMS angenommen werden, verfehlen ihre adäquate Differenzierung [BELYEA et al., 2012; KUCHARCZAK et al., 2008; MERLINO und HELMAN, 1999] und erlangen dadurch Charakteristika, die denen von Krebszellen vergleichbar sind. Zu diesen zählen die Fähigkeit der Zellen zur Selbsterneuerung, hohe Proliferationsraten, Alterungsresistenz sowie die Aufhebung ihres Ruhestadiums [BELYEA et al., 2012]. Neben diesen Eigenschaften haben Muskelvorläuferzellen ein ähnliches Transkriptionsprofil wie Zellen des RMS und exprimieren myogene Marker wie *Pax3* und *Pax7* sowie myogene Regulationsfaktoren [TIFFIN et al., 2003]. Darüber hinaus spielen embryonale Signalwege wie der Hedgehog-Signalweg eine kritische Rolle in der Muskelentwicklung und -regeneration sowie bei der Tumorgenese des RMS [BELYEA et al., 2012; LUM et al., 2003; ROMA et al., 2012]. Eine anomale Expression, Aktivierung oder Regulation des Signalwegs wird mit unterschiedlichen Krebsformen wie Medulloblastomen, Basalzellkarzinomen und RMS assoziiert [BELYEA et al., 2012; LU et al., 2013; ROMA et al., 2012].

Im 1-Kohlenstoffmetabolismus, der für die Synthese von Nukleotiden verantwortlich ist, sowie im Methioninzyklus, der Methylgruppen für intrazelluläre Methylierungsreaktionen liefert, sind Folate unentbehrlich [CRIDER et al., 2012; TOMASZEWSKI et al., 2011; WEIßENBORN et al., 2005]. Im Allgemeinen wird ein Mangel an Folaten mit einem erhöhten Risiko für Brust-, Lungen-, Dickdarm- und Bauchspeicheldrüsenkrebs assoziiert, ein hoher Folatstatus mit einer Risikoreduzierung [TOMASZEWSKI et al., 2011]. Im Gegensatz zu den positiven Aspekten der Folate stehen Studien, in denen bei hohen Gaben vor allem der synthetischen Form Folsäure ein erhöhtes Krebsrisiko beobachtet werden konnte [TOMASZEWSKI et al., 2011; WEIßENBORN et al., 2005]. Folate spielen außerdem eine tragende Rolle in der Embryogenese [WOLFF et al., 2009]. In Studien konnte gezeigt werden, dass eine perikonzeptionelle Folsäurezufuhr das Risiko für die Entstehung von NRD senken kann [LUMLEY et al., 2001; WOLFF et al., 2009]. Aufgrund der zentralen Rolle der

Folate in der Embryogenese sowie bei unterschiedlichen Stoffwechselwegen im menschlichen Organismus und ihrer kritischen Rolle in der Kanzerogenese [CRIDER et al., 2012; TOMASZEWSKI et al., 2011] wurde in dieser Arbeit der Einfluss der Folsäure, die in Supplementen Verwendung findet, auf die Proliferation und Differenzierung von myogenen Vorläuferzellen untersucht. Dies geschah vor allem im Hinblick auf die Entstehung von Tumoren der quergestreiften Skelettmuskulatur wie des RMS. Einerseits wurde mithilfe der murinen Zelllinie C2C12 der Einfluss von Folsäure auf die Zellproliferation untersucht. Andererseits wurde der Einfluss auf den Prozess der Myogenese sowie den Hedgehog-Signalweg, die ebenfalls bei der Tumorgenese des RMS grundlegend sind, ermittelt. Auch der Fragestellung, ob Folsäure in diesen Zellen epigenetische Veränderungen hervorrufen kann, wurde nachgegangen.

6.1 Folsäure stimuliert die Zellproliferation und verzögert die Differenzierung

Wie bereits erwähnt spielen Folate bei der DNA-Synthese und -Replikation eine wichtige Rolle [PELLIS et al., 2008; KIM, 2004]. Angesichts dieser Tatsache ist es plausibel, dass in neoplastischen Zellen, in denen DNA-Synthese und -Replikation in erhöhtem Maße stattfinden, Folatmangel zu ineffektiver DNA-Synthese und somit zur Inhibierung des Zellwachstums führt. Gleichzeitig bedeutet dies, dass sich hohe Folatgaben stimulierend auf das Zellwachstum sich schnell teilender Zellen auswirken [KIM, 2004]. Daher wurde in dieser Arbeit der Einfluss von Folsäure auf die Proliferation der Zelllinie C2C12 untersucht. Nach 48 h in Zellkulturmedium, das mit verschiedenen Folsäurekonzentrationen (0-200 μM) versetzt wurde, zeigte sich mit zunehmender Konzentration eine stetige Zunahme der Zellvitalität. Eine ähnliche Beobachtung konnte die Studie von Liu *et al.* machen, in der der Einfluss von Folsäure auf die Proliferation von embryonalen neuralen Stammzellen untersucht wurde. Über eine siebentägige Gabe von 8 (~ 18 μM) bzw. 44 mg/l (~ 100 μM) Folsäure zeigte sich eine konzentrations- sowie zeitabhängige signifikante Zunahme der Zellvitalität [LIU et al., 2010]. Die Studie von Petersen *et al.* beobachtete das Zellwachstum der humanen

Prostatakarzinomzelllinien LNCaP und PC-3 über einen Zeitraum von neun Tagen unter Gabe von 4, 20 und 100 nM Folsäure. Auch hier zeigte sich bei der höchsten Folsäurekonzentration die höchste Proliferationsrate der Zellen [PETERSEN et al., 2011]. Pellis *et al.* konnten einen ähnlichen Effekt bei weitaus geringeren Folsäurekonzentrationen beobachten. Hier wurde die humane Darmkrebszelllinie HT29 mit Folsäurekonzentrationen von 10 und 100 ng/ml behandelt. Dabei zeigte sich eine 2,4fach höhere Wachstumsrate der Zellen, die mit 100 ng/ml Folsäure behandelt wurden, sowie eine 2,1fach höhere Umsetzung des Tetrazoliumsalzes MTT [PELLIS et al., 2008]. Diese Arbeit und vorangegangene Studien bestätigen somit, dass die Proliferation unterschiedlichster Zelllinien unter Folsäuregabe konzentrationsabhängig zunimmt. Dieser Effekt wurde in dieser Arbeit und in der Studie von Liu *et al.* anhand von Nicht-Krebszellen gezeigt. Aber auch in Zelllinien verschiedener Krebsarten konnte dieser Effekt beobachtet werden. Folate scheinen offensichtlich eine duale Rolle in der Kanzerogenese zu spielen. Einerseits inhibiert eine pharmakologische Depletion der Folate durch Antifolate, wie sie in der Chemotherapie eingesetzt werden, die Proliferation von Krebszellen, ruft dabei aber durch genetische und epigenetische Schädigungen eine Transformation von Nicht-Krebszellen hervor. Andererseits beugt eine Folsäuresupplementierung solch einer Transformation vor, unterstützt dabei aber gleichzeitig die hohen Proliferationsraten von Krebszellen [BISTULFI et al., 2010]. Aus diesen Gründen erscheinen die gängigen Aussagen, Folsäuremangel erhöhe und Folsäuresupplementierung reduziere das Risiko für neoplastische Veränderungen [KIM, 2004; PELLIS et al., 2008; TOMASZEWSKI et al., 2011], auch unter Beachtung der Biochemie der Folate, sehr widersprüchlich.

Ein weiterer Faktor bei der Entstehung des RMS ist die fehlerhafte Differenzierung von Zellen [WANG, 2012]. Da die Zelllinie C2C12 ein ähnliches Transkriptionsprofil zeigt, wie es auch für die Myogenese beschrieben ist, [BROWN et al., 2012], wurde in dieser Arbeit die Differenzierung der Zelllinie unter Folsäuregabe untersucht. Unter physiologischen Bedingungen, also in herkömmlich erhältlichem Zellkulturmedium (9,1 μ M Folsäure), stiegen die deutlichsten Marker für die Zelldifferenzierung, *MyoG* und *MyHCIIa*, über den Differenzierungszeitraum von acht Tagen kontinuierlich an. Dies belegt eine

adäquate Differenzierung der Zellen. Bei Gabe von 20 bzw. 200 μ M Folsäure war zwar ebenfalls ein Anstieg der Genexpression vorhanden, jedoch in deutlich geringerem Maße. Auch insgesamt war die Expression beider Gene um ein Vielfaches niedriger. Man kann also von einer Verzögerung der Zelldifferenzierung sprechen. Interessanterweise wurde die Zelldifferenzierung durch Folsäuredepletion nicht beeinflusst. Vielmehr zeigte sich ein Anstieg der Expression von *MyoG* und *MyHCIIa* wie unter physiologischen Bedingungen. Dies geht mit der Beobachtung einher, dass die Zellen unter Folsäuredepletion am geringsten proliferieren. Ihre Differenzierung könnte dadurch induziert werden. Dass die Differenzierung von Zellen unter Folsäuresupplementierung herabgesetzt werden kann, konnten auch Pellis *et al.* beobachten. Sie untersuchten die Differenzierung der Darmkrebszelllinie HT29 anhand der Proteinexpression von E-Cadherin. In Zellen, die mit 100 ng/ml Folsäure versetzt wurden, war die E-Cadherin-Expression 4,6fach geringer als in Zellen, die mit 10 ng/ml versetzt wurden [PELLIS et al., 2008].

Insgesamt zeigen die Ergebnisse, dass die Proliferation der Zelllinie C2C12 mit steigender Folsäurekonzentration zunimmt, ihre Differenzierung zu vielkernigen Myotuben jedoch gleichzeitig abnimmt. Es ist also davon auszugehen, dass die Balance zwischen Zellwachstum und -differenzierung unter dem Einfluss hoher Folsäurekonzentrationen gestört ist, wie es auch bei Zellen des RMS der Fall ist. Das unkontrollierte Wachstum sowie die fehlerhafte Differenzierung von Zellen des RMS ist das Resultat einer gestörten Balance sowie einer anomalen Regulierung von Zellzyklus und myogenen Signalwegen [WANG, 2012].

6.2 Folsäure erhöht die Methylierung von CpG-Dinukleotiden

Krebszellen weisen häufig ein anomales Methylierungsmuster auf. Während die genomweite DNA-Methylierung herabgesetzt ist, sind CpG-Inseln in Promotorregionen häufig hypermethyliert [CRIDER et al., 2012; SI et al., 2010]. Eine Hypermethylierung von CpG-Inseln in Promotorregionen von Tumorsuppressorgenen führt zu deren Inaktivierung und kann zur Entstehung und Entwicklung von malignen Tumoren beitragen [HARADA et al., 2002; SI et al.,

2010]. Im Verlauf von Differenzierungsprozessen während der Embryogenese finden ebenfalls starke Veränderungen von Methylierungsmustern statt, um letztendlich die zelltypspezifischen Methylierungsmuster von voll differenzierten, adulten Zellen zu erhalten. Die Umstrukturierung der Methylierungsmuster in der Embryogenese bietet Umwelteinflüssen wie der Ernährung eine günstige Gelegenheit, auf diesen Prozess Einfluss zu nehmen und dadurch Methylierungsmuster zu verändern [DOLINOY et al., 2007]. Solche Veränderungen können die Genexpression sowie die Stabilität des Genoms maßgeblich beeinflussen und so zu einem erhöhten Krankheitsrisiko im Laufe des Lebens beitragen [CRIDER et al., 2012].

Da Folate an der Bildung von AdoMet beteiligt sind und somit Methylgruppen für intrazelluläre Methylierungsreaktionen liefern, liegt es nahe, dass Folate oder ihre synthetische Form Folsäure DNA-Methylierungsmuster beeinflussen können [SAUER et al., 2009]. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob die Gabe von Folsäure während der Differenzierung der Zelllinie C2C12 die Methylierung von CpG-Dinukleotiden im *MyoG*-Promotor und -Gen verändert. So sollte ermittelt werden, ob die Expressionsunterschiede des Differenzierungsmarkers *MyoG*, die sich unter Folsäuredepletion und Folsäuregabe ergeben haben, auf unterschiedliche Methylierungsgrade zurückgehen. Die Ergebnisse haben gezeigt, dass die ersten fünf CpGs im *MyoG*-Promotor unabhängig von der Folsäurekonzentration im Verlauf der Zelldifferenzierung demethyliert werden. Der Anstieg der Expression von *MyoG* bei allen Konzentrationsstufen in diesem Zeitraum ist mit diesem Ergebnis vereinbar. Da der Expressionsanstieg unter Gabe von 20 und 200 μM Folsäure um ein Vielfaches geringer war als unter Folsäuredepletion, ist es wichtig zu erwähnen, dass die Demethylierung nur unter Folsäuredepletion und nicht unter Folsäuregabe signifikant war. Der Grad der Demethylierung unter den verschiedenen Folsäuregaben steht damit im Einklang mit den jeweils ermittelten Expressionsmustern. Wie auch Si *et al.* beschreiben konnten, verursacht offenbar bereits eine geringe Hypomethylierung von CpGs die Reaktivierung eines Gens [SI et al., 2010]. Dass hohe Folsäuregaben zu einer Erhöhung der Methylierung von CpGs führen können, konnten auch Charles *et al.* zeigen. Hier wurde beobachtet,

dass die Methylierung von CpG-Dinukleotiden unter supraphysiologischen Folsäurekonzentrationen ansteigt. Die Lungen-Fibroblastenzelllinie WI-38 und die fetale Kolonepithelzelllinie FHC zeigten nach Gabe von 2,3 bzw. 9,1 μM Folsäure eine signifikante Hypermethylierung der CpGs im *p16*-Gen (*Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A*; *CDKN2A*). Derselbe Effekt wurde in der Zelllinie FHC für das Gen *ESR1* (*Estrogen receptor 1*) beobachtet [CHARLES et al., 2012]. Steegers-Theunissen et al. zeigten in ihrer Studie, dass auch die mütterliche Folsäurezufuhr einen Einfluss auf Methylierungsmuster des Kindes haben kann. Bei einer täglichen Einnahme der Schwangeren von 400 μg Folsäure konnte eine Erhöhung der Methylierung der CpGs des *IGF2* (*Insulin-like growth factor 2*)-Gens des Kindes um 4,5% festgestellt werden [STEEGERS-THEUNISSEN et al., 2009]. Trotzdem ist die Studienlage nicht eindeutig. Bistulfi et al. untersuchten den Einfluss von Folsäure auf die Methylierung der CpGs in drei Prostatakrebszelllinien. Anders als in oben beschriebenen Studien führte eine moderate Folsäuredepletion (100 nM) zur Erhöhung des Gesamtmethylierungsgrades von CpG-Inseln. Dieser Effekt wurde bei der Behandlung mit 2 μM Folsäure nicht beobachtet [BISTULFI et al., 2010]. Betrachtet man wiederum die Biochemie der Folate, so scheint es plausibler, dass eine Folsäuredepletion zur Reduktion der Methylierung von CpG-Dinukleotiden führt. Unter Folsäuremangel sinken die Pools an 5-Methyl-THF. Als Konsequenz führt dies zur Depletion von AdoMet als Lieferant für Methylgruppen und somit zu einer Reduktion der Methylierung von CpG-Dinukleotiden [DUTHIE, 1999].

Im Hinblick auf die Entstehung von embryonalen Tumoren ist es von besonderer Bedeutung, ob die Ernährung in der Schwangerschaft bzw. die Verfügbarkeit von methylgruppenliefernden Verbindungen einen Einfluss auf die DNA-Methylierungsmuster und den Phänotyp des Nachkommens hat. Dass dies der Fall ist, konnte bereits im Agouti Maus-Modell von Cooney et al. anschaulich gezeigt werden. Die Nachkommen von trächtigen gelb-felligen Agouti Mäusen (A^y), die mit einer methylgruppenreichen Ernährung (Folsäure, Vitamin B₁₂, Cholin) gefüttert wurden, zeigten eine erhöhte DNA-Methylierung im A^y -Allel und eine braune Fellfarbe. Außerdem waren sie im Gegensatz zu den krankheitsanfälligen gelben Agouti Mäusen weniger anfällig für Übergewicht und Diabetes [COONEY et

al., 2002]. Chang *et al.* verglichen in ihrer Studie die DNA-Methylierungsgrade in unterschiedlichen Geweben von gesunden und von mit einem NRD betroffenen Feten. Dabei zeigte sich eine Hypomethylierung im Gehirn von NRD-Feten im Vergleich zur Kontrollgruppe. Außerdem wurde eine Korrelation zwischen der Serumfolatkonzentration der Mutter und der DNA-Methylierung im Gehirn von NRD-Feten gefunden [CHANG *et al.*, 2011]. Eine *in utero* Exposition gegenüber methylgruppenliefernden Nährstoffen wie der Folsäure kann offensichtlich zu epigenetischen Modifikationen führen und DNA-Methylierungen erhöhen und dadurch die phänotypische Genexpression des Nachkommens beeinflussen [DAVIS und UTHUS, 2004]. Ferner wird diskutiert, ob dies einen Einfluss auf das spätere Krankheitsrisiko wie beispielsweise das Krebsrisiko des Nachkommens hat [CRIDER *et al.*, 2012; DAVIS und UTHUS, 2004; KIM *et al.*, 2009]. Diese Zusammenhänge sind jedoch sehr komplex und können deshalb nicht nur auf einen einzelnen Nährstoff wie die Folsäure zurückgeführt werden. Vielmehr können noch andere Verbindungen in der Ernährung bzw. Substrate des 1-Kohlenstoffmetabolismus beteiligt sein. Es kann somit kein linearer Zusammenhang zwischen der Folsäureeinnahme der Mutter und der Erhöhung der DNA-Methylierung des Kindes gebildet werden [CRIDER *et al.*, 2012].

6.3 Die duale Rolle der Folsäure in der Kanzerogenese

In der Pathogenese verschiedener Krankheiten wird Folsäure eine positive Rolle zugesprochen. Zu diesen Erkrankungen gehören unter anderem kardiovaskuläre Erkrankungen, thromboembolische Ereignisse, Neuralrohrdefekte, neuropsychiatrische Erkrankungen sowie Krebs [KIM, 2003; WIEN *et al.*, 2012]. Auch wenn Folsäure generell als sicher angesehen wird, häuft sich die Besorgnis darüber, dass eine Folsäuresupplementierung auch negative Auswirkungen haben könnte [KIM, 2004, PETERSEN *et al.*, 2011]. Ein Grund für die Besorgnis sind Tier- und Humanstudien, die darauf hindeuten, dass eine Folsäuresupplementierung das Fortschreiten von präneoplastischen und undiagnostizierten neoplastischen Läsionen begünstigen kann [CRIDER *et al.*, 2012; PELLIS *et al.*, 2007; WIEN *et al.*, 2012]. Diese konträren Erkenntnisse sind

einerseits dadurch zu erklären, dass der Zeitpunkt einer Folsäuresupplementierung offensichtlich eine entscheidende Rolle in der Kanzerogenese spielt [KIM, 2004; TOMASZEWSKI et al., 2011]. Epidemiologische Studien, die den Einfluss einer prä- und perinatalen mütterlichen Folsäuresupplementierung auf das Krebsrisiko des Kindes untersuchten, konnten einen Zusammenhang mit der Inzidenz von Neuroblastomen und Hirntumoren finden. Dabei war die Inzidenz für Neuroblastome um 60% gesenkt und auch bei der Entstehung von Hirntumoren konnte ein protektiver Effekt der Folsäure nachgewiesen werden [KIM, 2004]. Auch Bunin *et al.* konnten zeigen, dass eine hohe Folsäureaufnahme in den ersten sechs Wochen der Schwangerschaft mit einem geringeren Risiko für primitive neuroektodermale Tumoren des Kindes einher gehen [BUNIN et al., 1993]. Mehrere Studien berichten jedoch auch von einem erhöhten Krebsrisiko nach einer Supplementierung mit Folsäure, insbesondere bei bereits bestehenden präneoplastischen Läsionen. Die Studie von Cole *et al.* untersuchte den Einfluss von Folsäure bei Patienten, bei denen in der Vergangenheit ein kolorektales Adenom diagnostiziert wurde. Die Patienten, die sich einer Folsäuresupplementierung unterzogen, hatten ein um 67% erhöhtes Risiko für fortgeschrittene Läsionen [COLE et al., 2007]. Auch bei Leukämien scheint dieser negative Effekt einzutreten. Bei Kindern mit einer akuten Leukämie, die mit einer Folsäuresupplementierung behandelt wurden, konnte ein schnelleres Fortschreiten der Krankheit beobachtet werden [KIM, 2004]. Bevor präneoplastische Läsionen bestehen, scheint eine Folsäuresupplementierung einen protektiven Effekt auf die Tumorentstehung zu haben. Bei bereits bestehenden Neoplasien bewirkt eine Folsäuresupplementierung der Studienlage zufolge jedoch das Gegenteil und begünstigt bzw. unterstützt das Tumorwachstum [KIM, 2004; TOMASZEWSKI et al., 2011; WIEN et al., 2012].

Nicht nur der Zeitpunkt sondern auch die Dosis der Folsäuresupplementierung scheint eine Rolle in der Kanzerogenese zu spielen [KIM, 2004; SAUER et al., 2009]. Der protektive Effekt der Folsäure setzt sich offensichtlich nicht mit steigender Aufnahme fort, sondern stagniert ab einer gewissen Schwelle und kann ins Gegenteil umschlagen und negative Folgen mit sich ziehen [SAUER et al.,

2009]. Bei der Entstehung von kolorektalen Karzinomen wurde eine Begünstigung des Tumorwachstums mit hohen Folsäuredosen assoziiert [KIM, 2003]. In einer Tierstudie an Nagern führte eine Folsäuresupplementierung weit über den Bedarf hinaus zu einem erhöhten Risiko für die Entstehung und das Fortschreiten von kolorektalen Karzinomen [KIM, 2004]. In einer epidemiologischen Studie von Figueiredo *et al.* wurde der Einfluss von Folsäuresupplementen auf das Risiko für die Entstehung von Prostatakrebs untersucht. Die Männer, die über einen Zeitraum von zehn Jahren täglich 1 mg Folsäure, was dem Upper Limit (UL) von Folsäure entspricht, einnahmen, hatten demnach ein höheres Risiko an Prostatakrebs zu erkranken [FIGUEIREDO *et al.*, 2009]. Hier scheint zu gelten, dass Folsäuremangel in normalem Gewebe zwar die Entstehung von neoplastischen Läsionen begünstigt, bei bereits bestehenden Läsionen wird das Wachstum jedoch unterdrückt. Moderate Folsäuredosen hingegen unterdrücken eine Tumorentstehung, während supraphysiologische Dosen das Risiko für die Entstehung und das Fortschreiten eines Tumors erhöhen [KIM, 2004; TOMASZEWSKI *et al.*, 2011]. In gewissen Grenzen scheint Folsäure also ein geeigneter Kandidat zur Chemoprävention zu sein. Der optimale Zeitpunkt und die Dosis einer Folsäuresupplementierung beim Menschen zu diesen Zwecken muss jedoch noch ermittelt werden, um die Sicherheit und die Effektivität einer solchen Intervention gewährleisten zu können.

6.4 Die Diskussion der Folsäureanreicherung

Eine Anreicherung von Grundnahrungsmitteln mit Folsäure wird in Deutschland immer wieder diskutiert. Bis jetzt wurde eine Anreicherung jedoch nicht verpflichtend eingeführt [WEIßENBORN *et al.*, 2005]. Um Nutzen und Risiken einer solchen Anreicherung abschätzen zu können, können Daten und Erfahrungen aus den USA herangezogen werden. Hier wurde 1998 eine verpflichtende Anreicherung von Weizenmehl und anderen Getreideprodukten mit Folsäure eingeführt [CHOUMENKOVITCH *et al.*, 2002; KIM, 2004; QUINLIVAN und GREGORY, 2003]. Kritische Stimmen beklagen, dass eine Anreicherung dazu führen könnte, dass die Bevölkerung möglicherweise einer zu hohen

Folsäureaufnahme ausgesetzt ist [KIM, 2004; LUCOCK, 2004; SAUER et al., 2009] und somit nachteilige Effekte, wie sie in dieser und anderen Arbeiten beschrieben wurden, eintreten können. Die Zielgruppe einer solchen Anreicherung sind Frauen im gebärfähigen Alter, da in Studien belegt werden konnte, dass eine perikonzeptionelle Folsäurezufuhr das Risiko für NRD senken kann [CHOUMENKOVITCH et al., 2002; LUMLEY et al., 2001; WOLFF et al., 2009]. Besonders bei Personen, die nicht dieser Zielgruppe angehören, besteht die Gefahr, dass potenziell schädliche Wirkungen auftreten können. Verschiedene Studien konnten nach Einschätzung der Nahrungszusammensetzung und -aufnahme zeigen, dass die Folsäureaufnahme der US Bevölkerung nach Einführung der Anreicherung doppelt so hoch ist, wie ursprünglich erwartet [KIM, 2004; YETLEY und RADER, 2004]. Der Gehalt an Folsäure, der Produkten zugesetzt wird, liegt Angaben zufolge zwischen 95 und 309 µg / 100g Produkt und wurde auf Basis eines Zielwerts von 140 µg / 100g Produkt festgelegt. Tatsächlich liegt der Gehalt an zugesetzter Folsäure in angereicherten Produkten Analysen zufolge jedoch um ein Vielfaches höher [CHOUMENKOVITCH et al., 2002] und kann sogar bis zu 320% der deklarierten Menge betragen [WEIßENBORN et al., 2005]. Demnach liegt die durchschnittliche Aufnahme an Folsäure über angereicherte Produkte einer einzelnen Person nicht wie ursprünglich geschätzt bei 100 µg pro Tag, sondern erreicht Aufnahmen von 190 µg [CHOUMENKOVITCH et al., 2002] bzw. 200 bis 400 µg pro Tag [YETLEY und RADER, 2004]. Die Gefahr der bereits hohen Folsäureaufnahme über angereicherte Produkte liegt darin, dass Personen, die zusätzlich Supplemente einnehmen, den UL für Folsäure von 1 mg pro Tag überschreiten könnten [CHOUMENKOVITCH et al., 2002; SAUER et al., 2009; YETLEY und RADER, 2004]. Im Hinblick auf die Entstehung von kindlichen Tumoren ist zu erwähnen, dass bis jetzt keine systematischen Untersuchungen vorliegen, um den Effekt von erhöhten Folsäureaufnahmen bei Kindern einschätzen zu können. Der UL für Kinder zwischen ein und drei Jahren wird mit 300 µg angegeben, der von Kindern zwischen vier und acht Jahren mit 400 µg pro Tag [CHOUMENKOVITCH et al., 2002; YETLEY und RADER, 2004]. Es wird berichtet, dass 15-25% der Kinder

dieser Altersgruppen, die folsäureangereicherten Produkten ausgesetzt sind, den UL überschreiten [CHOUMENKOVITCH et al., 2002].

Ein weiterer Aspekt, der in die Diskussion um eine Folsäureanreicherung einfließt, ist die unterschiedliche Wirkung und Verstoffwechselung von Folaten und ihrer synthetischen Form Folsäure. Natürliche Folate sind weniger stabil und können ihre biologische Aktivität je nach Nahrungsquelle und Zubereitungsmethode schnell verlieren [SAUER et al., 2009]. Folsäure hingegen ist sehr stabil und besitzt eine höhere Bioverfügbarkeit als natürliche Folate [CHOUMENKOVITCH et al., 2002; LUCOCK, 2004; SAUER et al., 2009]. Aufgrund ihrer unterschiedlichen Bioverfügbarkeit wurde der Begriff Folatäquivalent eingeführt. Demnach entspricht 1 µg Folatäquivalent 1 µg Nahrungsfolat, welches wiederum 0,5 µg Folsäure entspricht [KIM, 2004, WEIßENBORN et al., 2005]. Folsäure wird im Körper zu 5-Methyl-THF verstoffwechselt. Die Kapazität dieses Prozesses reicht allerdings nur bis zu Folsäuredosen von 200 [YETLEY und RADER, 2004] bzw. höchstens 400 µg [LUCOCK, 2004; SAUER et al., 2009]. Bei höheren Aufnahmen erscheint Folsäure unverstoffwechselt im Plasma. Angesichts der geschätzten Aufnahme allein durch angereicherte Produkte besteht die Möglichkeit, dass die Bevölkerung in Ländern, in denen eine Anreicherung eingeführt wurde, einer lebenslangen Exposition gegenüber unverstoffwechselter Folsäure ausgesetzt ist [LUCOCK, 2004; YETLEY und RADER, 2004]. Welche Auswirkungen diese Exposition haben kann, muss zukünftig geklärt werden.

Dass ein Unterschied in der Wirkung zwischen natürlichen Folaten und Folsäure besteht, konnten beispielsweise Figueiredo *et al.* zeigen. Wie in 6.3 beschrieben, hatten Männer, die täglich 1 mg Folsäure einnahmen, ein dreimal höheres Risiko an Prostatakrebs zu erkranken als die Männer mit höheren Folataufnahmen bzw. höheren Plasmafolatkonzentrationen. Diese Männer hatten sogar ein geringeres Erkrankungsrisiko [FIGUEIREDO et al., 2009]. In einer prospektiven Studie wurde gezeigt, dass das Risiko für Bauchspeicheldrüsenkrebs bei Personen, die eine folatreiche Ernährung zu sich nahmen, reduziert war. Bei Personen, die Supplemente einnahmen, war dies nicht der Fall. Auch andere

Beobachtungsstudien konnten zeigen, dass Folate im Hinblick auf Krebserkrankungen protektiv wirken, Folsäuresupplemente hingegen keine oder sogar nachteilige Wirkungen haben können [WIEN et al., 2012].

Es werden weitere Untersuchungen benötigt, um Langzeiteffekte einer chronischen Exposition gegenüber hohen Folsäuredosen und vor allem gegenüber unverstoffwechselter Folsäure abschätzen zu können. Weitere Studien müssen untersuchen, ob ein Zusammenhang zwischen supraphysiologischen Folsäuredosen und der Entstehung von Krebs besteht und ob es Effekte gibt, die allein auf die synthetische Form Folsäure zurückzuführen sind. Erst dann können die Sicherheit einer verpflichtenden Folsäureanreicherung gewährleistet und gegebenenfalls Maßnahmen ergriffen werden.

7 Zusammenfassung

Die Entstehung des RMS beruht unter anderem auf einer fehlerhaften Regulierung der Myogenese. Da im RMS muskelspezifische Gene exprimiert werden, wird angenommen, dass Muskelvorläuferzellen, die ihre adäquate Differenzierung verfehlen, der Ursprung des RMS sind. Auch embryonale Signalwege wie der Hedgehog-Signalweg spielen bei der Tumorgenese des RMS eine Rolle. Postnatal verursachen Mutationen im Hedgehog-Signalweg seine pathologische Aktivierung. Daher werden die Zielgene *Gli1* und *Ptch1* im RMS häufig überexprimiert.

Folate oder seine synthetische Form Folsäure spielen als Überträger von 1-Kohlenstoffeinheiten im 1-Kohlenstoffmetabolismus bei der DNA-Synthese eine tragende Rolle. Aus diesen Gründen sind sie grundlegend für Zellwachstum, Zellteilung und Zelldifferenzierung. Außerdem sind sie im Methioninzyklus an der Bildung von AdoMet beteiligt, das bei der Biosynthese von Polyaminen benötigt wird und Methylgruppen für intrazelluläre Methylierungsreaktionen liefert. Daher wird vermutet, dass Folate oder Folsäure auch epigenetische Prozesse wie DNA-Methylierungen beeinflussen können.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde mithilfe der murinen Myoblastenzelllinie C2C12 der Einfluss der Folsäure bei der Entstehung des RMS untersucht. Es wurde ermittelt, ob und wie sich die Gabe von Folsäure auf die Genexpression im Verlauf der Myogenese und des Hedgehog-Signalwegs auswirkt. Zudem wurde untersucht, ob Veränderungen der Genexpression auf epigenetische Veränderungen zurückgehen und ob diese von einer Folsäuregabe beeinflusst werden.

Es konnte zum Einen gezeigt werden, dass die Proliferation der Zelllinie C2C12 mit steigender Folsäurekonzentration zunimmt. Zum Anderen wurde die Genexpression im Verlauf der Zelldifferenzierung unter Folsäuregabe beeinflusst. Die deutlichsten Marker der Zelldifferenzierung, *MyoG* und *MyHCIIa*, wurden mit steigender Folsäurekonzentration herunterreguliert. Den deutlichsten Effekt zeigten dabei die für diese Arbeit festgelegte physiologische Folsäurekonzentration von 20 μM und die supraphysiologische Konzentration

200 μM . Eine Folsäuredepletion beeinflusste die Genexpression dieser Marker nicht. Es ist also davon auszugehen, dass bereits die Gabe von physiologischen aber vor allem von supraphysiologischen Folsäurekonzentrationen das Zellwachstum stimuliert und gleichzeitig die Zelldifferenzierung verzögert. Bei der Untersuchung auf epigenetische Veränderungen konnte gezeigt werden, dass CpGs im Promotor von *MyoG* im Verlauf der Zelldifferenzierung demethyliert werden. Es zeigte sich jedoch auch, dass diese Demethylierung bei Gabe von 20 und 200 μM Folsäure weniger ausgeprägt war als unter Folsäuredepletion. Daraus ist zu schließen, dass hohe Folsäuregaben eine Demethylierung inhibieren und so die Reaktivierung eines Gens unterdrücken können. Auf den Hedgehog-Signalweg hatte eine Folsäuregabe keinen eindeutigen Einfluss. Trotzdem zeigte sich eine Tendenz zur Verzögerung der Deaktivierung des Signalwegs unter Folsäuredepletion sowie unter physiologischen Bedingungen.

Diese und andere Studien konnten somit zeigen, dass überhöhte Folsäuregaben zur Entstehung und zum Fortschreiten eines Tumors beitragen können. Vor allem unter bestimmten Voraussetzungen, wie dem Vorhandensein von Neoplasien, kann die krebspräventive Wirkung der Folsäure nicht untermauert werden. In jedem Fall sollte eine Folsäuresupplementierung während der Schwangerschaft, vor allem im Hinblick auf die Entstehung von embryonalen Tumoren, die Empfehlungen nicht überschreiten. Deshalb ist auch einer verpflichtenden Folsäureanreicherung in Deutschland kritisch gegenüberzustehen. Nutzen und Risiken einer solchen Anreicherung müssen weiterhin abgeklärt werden, um negative Auswirkungen ausschließen zu können.

8 Abstract

Deutsch

Die Entstehung von Rhabdomyosarkomen (RMS), den häufigsten Weichteiltumoren im Kindesalter, beruht unter anderem auf einer fehlerhaften Regulierung der Myogenese. Es wird angenommen, dass Muskelvorläuferzellen der Ursprung von RMS sind, da muskelspezifische Gene exprimiert werden. Auch embryonale Signalwege wie der Hedgehog-Signalweg spielen eine kritische Rolle in der Tumorgenese des RMS.

Folate und die synthetische Form Folsäure sind wichtige Cofaktoren bei einer Reihe von Stoffwechselwegen im menschlichen Organismus. Dazu gehören der 1-Kohlenstoffmetabolismus und der Methioninzyklus. Aus diesen Gründen sind diese Verbindungen essentiell für die Zellteilung, das Zellwachstum sowie die Zelldifferenzierung. Da sie außerdem im Zuge des Methioninzyklus Methylgruppen für intrazelluläre Methylierungsreaktionen liefern, stehen sie auch im Verdacht, epigenetische Prozesse wie die DNA-Methylierung zu beeinflussen.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von Folsäure auf die Entstehung von RMS untersucht. Mithilfe der murinen Myoblastenzelllinie C2C12 wurde ermittelt, ob die Gabe von Folsäure die Genexpression im Verlauf der Myogenese sowie des Hedgehog-Signalwegs verändert. Außerdem wurde untersucht, ob Veränderungen der Genexpression auf epigenetischen Modifikationen beruhen, und ob diese ebenfalls durch die Gabe von Folsäure beeinflusst werden.

Es konnte gezeigt werden, dass die Proliferation der Zelllinie C2C12 mit steigenden Folsäurekonzentrationen zunimmt. Auch die Genexpression während der Myogenese wurde beeinflusst. Die deutlichsten Marker der Zelldifferenzierung, *MyoG* und *MyHCIIa*, wurden mit steigender Folsäurekonzentration herunterreguliert. Physiologische (20 µM) und vor allem supraphysiologische (200 µM) Folsäurekonzentrationen führen somit zu einem erhöhten Zellwachstum und einer Inhibierung der Zelldifferenzierung. Bei der Untersuchung der DNA-Methylierungen im *MyoG*-Gen konnte ermittelt werden, dass CpGs im *MyoG*-Promotor im Verlauf der Zelldifferenzierung demethyliert

werden. Diese Demethylierung wurde unter physiologischen und supra-physiologischen Folsäurekonzentrationen teilweise inhibiert. Der Hedeghog-Signalweg wurde durch die Gabe von Folsäure nicht beeinflusst.

Überhöhte Folsäuregaben können somit zur Entstehung und zum Fortschreiten von Tumoren wie des RMS beitragen. Vor allem unter bestimmten Voraussetzungen, wie dem Vorhandensein von Neoplasien, kann die krebspräventive Wirkung der Folsäure nicht untermauert werden. In jedem Fall aber sollte eine Folsäuresupplementierung während der Schwangerschaft die Empfehlungen nicht überschreiten. Einer verpflichtenden Folsäureanreicherung von Grundnahrungsmitteln in Deutschland ist demnach ebenfalls kritisch gegenüberzustehen.

English

The development of rhabdomyosarcomas (RMS), the most common soft-tissue sarcoma in early childhood, is based on a failed regulation of myogenesis. Because RMS tumors express muscle-specific genes, it is thought that they arise from muscle progenitor cells. Also the hedgehog pathway, which regulates normal embryonic development, plays a critical role in the tumorigenesis of RMS.

Folate and its synthetic variant folic acid are important cofactors in a large number of metabolic processes such as the one-carbon metabolism and the methionine cycle. Thus, these compounds are essential for cell division, cell growth and cell differentiation. Because they deliver methyl groups for intracellular methylation reactions via the methionine cycle, it is also thought that they can affect epigenetic processes like DNA-methylations.

In this work the influence of folic acid on the development of RMS was investigated. With the aid of the murine myoblast cell line C2C12 it was determined if folic acid influences gene expression during myogenesis and the hedgehog pathway. Furthermore it was analysed if changes in gene expression are due to epigenetic modifications and if they are also affected by folic acid.

It was shown that the proliferation of C2C12 cells accelerated with increased folic acid concentrations. Also the gene expression during myogenesis was influenced. The markers of cell differentiation, *MyoG* and *MyHCIIa*, were down-regulated with increased folic acid concentrations. Thus, physiological (20 μ M) and in particular supra-physiological (200 μ M) concentrations of folic acid stimulates cell growth and inhibits differentiation in C2C12 cells. Looking at epigenetic modifications, it was shown that CpGs in the promotor of the *MyoG* gene were demethylated during cell differentiation. This demethylation was inhibited under physiological and supra-physiological folic acid concentrations. The hedgehog signalling pathway wasn't influenced by folic acid.

In this work it was demonstrated that excessive administration of folic acid could promote the development and progression of tumors such as RMS. Especially in the case of the existence of preneoplastic lesions, the cancer preventive effect of

folic acid could not be underpinned. In any event, a supplementation with folic acid during pregnancy should not exceed recommendations. Therefore, a mandatory folic acid fortification in Germany should be regarded as a critical area.

9 Literaturverzeichnis

Agbulut, O. ; Noirez, P. ; Beaumont, F. ; Butler-Browne, G.: Myosin heavy chain isoforms in postnatal muscle development of mice. In: *Biology of the Cell* (2003), 95, S. 399-406

Anonym: Folsäure. Internet: wikipedia.org/wiki/Folsäure (Stand: 12.09.2013)

Anonym: Tetrahydrofolsäure. Internet: wikipedia.org/wiki/Tetrahydrofolsäure (Stand: 12.09.2013)

Belyea, B. ; Grondin Kephart, J. ; Blum, J. ; Kirsch, D.G. ; Linardic, C.M.: Embryonic signaling pathways and rhabdomyosarcoma: Contributions to cancer development and opportunities for therapeutic targeting. In: *Sarcoma* (2012), doi: 10.1155/2012/406239

Bentzinger, C. F. ; von Maltzahn, J. ; Rudnicki, M. A.: Extrinsic regulation of satellite cell specification. In: *Stem Cell Research & Therapy* (2010), 1

Bentzinger, C. F. ; Wang, Y. X. ; Rudnicki, M. A.: Building muscle: Molecular regulation of myogenesis. In: *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* (2012), doi: 10.1101/cshperspect.a008342

Bistulfi, G. ; VanDette, E. ; Matsui, S.-I. ; Smiraglia, D. J.: Mild folate deficiency induces genetic and epigenetic instability and phenotype changes in prostate cancer cells. In: *BMC Biology* (2010), 8

Brown, D. M. ; Parr, T. ; Brameld, J. M.: Myosin heavy chain mRNA isoforms are expressed in two distinct cohorts during C2C12 myogenesis. In: *Journal of Muscle Research and Cell Motility* (2012), 32, S. 383-390

Bunin, G. R. ; Kuijten, R. R. ; Buckley, J. D. ; Rorke, L. B. ; Meadows A. T.: Relation between maternal diet and subsequent primitive neuroectodermal brain tumors in young children. In: *New England Journal of Medicine* (1993), 329, S. 536-541

Burattini, S. ; Ferri, P. ; Battistelli, M. ; Curci, R. ; Luchetti, F. ; Falcieri, E.: C2C12 murine myoblasts as a model of skeletal muscle development: morpho-functional characterization. In: *European Journal of Histochemistry* (2004), 48, S. 223-234

Chang, H. ; Zhang, T. ; Zhang, Z. ; Bao, R. ; Fu, C. ; Wang, Z. et al.: Tissue-specific distribution of aberrant DNA methylation associated with maternal low-folate status in human neural tube defects. In: Journal of Nutritional Biochemistry (2011), 22, S. 1172-1177

Charles, M. A. ; Johnson, I. T. ; Belshaw, N. J.: Supra-physiological folic acid concentrations induce aberrant DNA methylation in normal human cells in vitro. In: Epigenetics (2012), 7, S. 689-694

Choi S.-W. ; Mason, J. B.: Folate and carcinogenesis: An integrated scheme. In: Journal of Nutrition (2000), 130, S. 129-132

Choumenkovitch, S. F. ; Selhub, J. ; Wilson, P. W. F. ; Rader, J. I. ; Rosenberg, I. H. ; Jacques, P. F.: Folic Acid Intake from Fortification in United States Exceeds Predictions. In: Journal of Nutrition (2002), 132, S. 2792-2798

Cole, B. F. ; Baron, J. A. ; Sandler, R. S. ; Haile, R. W. ; Ahnen, D. J. ; Bresalier, R. S.: Folic acid for the prevention of colorectal adenomas. In: Journal of the American Medical Association (2007), 297, S. 2351-2359

Cooney, C. A. ; Dave, A. A. ; Wolff, G. L.: Maternal methyl supplements in mice affect epigenetic variation and DNA methylation of offspring. In: Journal of Nutrition (2002), 132, S. 2393-2400

Crider, K. S. ; Yang, T. P. ; Berry, R. J. ; Bailey, L. B.: Folate and DNA methylation: A review of molecular mechanisms and the evidence for folate's role. In: Advances in Nutrition (2012), 3, S. 21-38

Davis, C. D. ; Uthus, E. O.: DNA-methylation, cancer susceptibility, and nutrient interactions. In: Experimental Biology and Medicine (2004), 229, S. 988-995

Deutsche Gesellschaft für Ernährung (DGE): Folat. In: Deutsche Gesellschaft für Ernährung (DGE) (Hrsg.): Referenzwerte für die Nährstoffzufuhr. Neustadt an der Weinstraße: Neuer Umschau Buchverlag, 2008, S. 117-121

Dolinoy, D. C. ; Das, R. ; Weidman, J. R. ; Jirtle, R. L.: Metastable Epialleles, Imprinting, and the Fetal Origins of Adult Diseases. In: Pediatric Research (2007), 61, S. 30R-37R

Duthie, S. J.: Folic acid deficiency and cancer: mechanisms of DNA instability. In: British Medical Bulletin (1999), 55, S. 578-592

Ferri, P. ; Barbieri, E. ; Burattini, S. ; Guescini, M. ; D'Emilio, A. ; Biagiotti, L. et al.: Expression and subcellular localization of myogenic regulatory factors during the differentiation of skeletal muscle C2C12 myoblasts. In: Journal of Cellular Biochemistry (2009), 108, S. 1302-1317

Figueiredo, J. C. ; Grau, M. V. ; Haile, R. W. ; Sandler, R. S. ; Summers, R. W. ; Bresalier, R. S. et al.: Folic acid and risk of prostate cancer: results from a randomized clinical trial. In: Journal of the National Cancer Institute (2009), 101, S. 432-435

Geng, X. ; Oliver, G.: Pathogenesis of holoprosencephaly. In: Journal of Clinical Investigation (2009), 119, S. 1403-1413

Gerber, A. N. ; Wilson, C. W. ; Chuang, P.-T.: The hedgehog regulated oncogenes Gli1 and Gli2 block myoblast differentiation by inhibiting MyoD-mediated transcriptional activation. In: Oncogene (2007), 26, S. 1122-1136

Hahn, H. ; Wojnowski, L. ; Zimmer, A.M. ; Hall, J. ; Miller, G. ; Zimmer, A.: Rhabdomyosarcomas and radiation hypersensitivity in a mouse model of Gorlin syndrome. In: Nature Medicine (1998), 4, S. 619-622.

Harada, K. ; Toyooka, S. ; Maitra, A. ; Maruyama, R. ; Toyooka, K. O. ; Timmons, C. F.: Aberrant promoter methylation and silencing of the RASSF1A gene in pediatric tumors and cell lines. In: Oncogene (2002), 21, S. 4345-4349

Hsiung, D. T. ; Marsit, C. J. ; Houseman, E. A. ; Eddy, K. ; Furniss, C. S. ; McClean, M. D. et al.: Global DNA methylation level in whole blood as a biomarker in head and neck squamous cell carcinoma. In: Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention (2007), 16, S. 108-114

Kaatsch, P.: Nehmen Krebserkrankungen bei Kindern zu? (2005) Internet: http://www.kinderkrebsstiftung.de/fileadmin/KKS/files/zeitschriftWIR/2005_3/langzeitfolgen02.pdf (Stand: 08.08.2013)

- Kim, Y. - I.: Role of folate in colon cancer development and progression. In: Journal of Nutrition (2003), 133, S. 3731-3739
- Kim, Y. - I.: Will mandatory folic acid fortification prevent or promote cancer? In: American Journal of Clinical Nutrition (2004), 80, S. 1123-1128
- Kim, K.-c. ; Friso, S. ; Choi, S.W.: DNA-methylation, an epigenetic mechanism connecting folate to healthy embryonic development and aging. In: Journal of Nutritional Biochemistry (2009), 20, S. 917-926
- Koleva, M. ; Kappler, R. ; Vogler, M. ; Herwig, A. ; Fulda, S. ; Hahn, H.: Pleiotropic effects of sonic hedgehog on muscle satellite cells. In: Cellular and Molecular Life Sciences (2005), 62, S. 1863-1870
- Kucharczak, J. ; Charrasse, S. ; Comunale, F. ; Zappulla, J. ; Robert, B. ; Teulon-Navarro, I.: R-Cadherin expression inhibits myogenesis and induces myoblast transformation via Rac1 GTPase. In: Cancer Research (2008), 68, S. 6559-6568
- Kurmasheva, R. T. ; Peterson, C. A. ; Parham, D. M. ; Chen, B. ; McDonald, R. E. ; Cooney, C. A.: Upstream CpG island methylation of the PAX3 gene in human rhabdomyosarcomas. In: Pediatric Blood & Cancer (2005), 44, S. 328-337
- Lehmann, U.: Quantitative DNA-Methylierungsanalyse mittels Pyrosequenzierung. In: BIOSpektrum (2008), 4; S. 374-375
- Liu, H. ; Huang, G.-w. ; Zhang, X.-m. ; Ren, D.-l. ; Wilson, J. X.: Folic acid supplementation stimulates Notch signaling and cell proliferation in embryonic neural stem cells. In: Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition (2010), 47, S. 174 -180
- Lu, J. ; Chen, M. ; Ren, X.-R. ; Wang, J. ; Lyerly, H. K. ; Barak, L. et al.: Regulation of hedgehog signaling by Myc-interacting zinc finger protein 1, Miz1. In: Plos One (2013), 8, doi: 10.1371/journal.pone.0063353
- Lucock, M.: Is folic acid the ultimate functional food component for disease prevention? In: BMJ (2004), 328, S. 211-214

Lum, L. ; Zhang, C. ; Oh, S. ; Mann, R. K. ; von Kessler, D.P. ; Taipale, J. et al.: Hedgehog signal transduction via smoothened association with a cytoplasmic complex scaffolded by the atypical kinesin, costal-2. In: Molecular Cell (2003), 12, S. 1261-1274

Lumley J. ; Watson, L. ; Watson, M. ; Bower, C.: Periconceptional supplementation with folate and/or multivitamins for preventing neural tube defects. In: Cochrane Database of Systematic Reviews (2001), doi: 10.1002/14651858.CD001056

Merlino, G. ; Helman, L.J.: Rhabdomyosarcoma - working out the pathways. In: Oncogene (1999), 18, S. 5340-5348

Murken, J. ; Grimm, T. ; Holinski-Feder, E. ; Zerres, K.: Genetik von Krebserkrankungen. In: Murken, J. ; Grimm, T. ; Holinski-Feder, E. ; Zerres, K. (Hrsg.): Humangenetik. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG, 2006a, S. 513

Murken, J. ; Grimm, T. ; Holinski-Feder, E. ; Zerres, K.: Epigenetik. In: Murken, J. ; Grimm, T. ; Holinski-Feder, E. ; Zerres, K. (Hrsg.): Humangenetik. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG, 2006b, S. 42-48

Nanni, P. ; Nicoletti, G. ; Palladini, A. ; Astolfi, A. ; Rinella, P. ; Croci, S. et al.: Opposing control of rhabdomyosarcoma growth and differentiation by myogenin and interleukin 4. In: Molecular Cancer Therapeutics (2009), 8, S. 754-761

Palacios, D. ; Summerbell, D. ; Rigby, P. W. J. ; Boyes, J.: Interplay between DNA methylation and transcription factor availability: Implications for developmental activation of the mouse myogenin gene. In: Molecular and Cellular Biology (2010), 30, S. 3805-3815

Pellis, L. ; Dommels, Y. ; Venema, D. ; van Polanen, A. ; Lips, E. ; Baykus, H. et al.: High folic acid increases cell turnover and lowers differentiation and iron content in human HT29 colon cancer cells. In: British Journal of Nutrition (2008), 99, S. 703-708

Petersen, L. F. ; Brockton, N. T. ; Bakkar, A. ; Liu, S. ; Wen, J. ; Weljie, A. M. et al.: Elevated physiological levels of folic acid can increase in vitro growth and

invasiveness of prostate cancer cells. In: BJU International (2011), 109, S. 788-795

Pietrzik K. ; Bailey L. ; Shane B.: Folic acid and L-5-methyltetrahydrofolate: comparison of clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics. In: Clinical Pharmacokinetics (2010), 49, S. 535-548, doi: 10.2165/11532990-000000000-00000

Piyathilake, C. J. ; Macaluso, M. ; Alvarez, R. D. ; Chen, M. ; Badiga, S. ; Siddiqui, N. R. et al.: A higher degree of LINE-1 methylation in peripheral blood mononuclear cells, a one-carbon nutrient related epigenetic alteration, is associated with a lower risk of developing cervical intraepithelial neoplasia. In: Nutrition (2011), 27, S. 513–519

Quinlivan, E. P. ; Gregory, J. F.: Effect of food fortification on folic acid intake in the United States. In: American Journal of Clinical Nutrition (2003), 77, S. 221-225

Roma, J. ; Almazán-Moga, A. ; Sánchez de Toledo, J. ; Gallego, S.: Notch, Wnt, and Hedgehog pathways in rhabdomyosarcoma: From single pathways to an integrated network. In: Sarcoma (2012), doi: 10.1155/2012/695603

Sauer, J. ; Mason, J. B. ; Choi, S.-W.: Too much folate - a risk factor for cancer and cardiovascular disease? In: Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care (2009), 12, S. 20-36

Scotting, P. J. ; Walker, D. A. ; Perilongo, G.: Childhood solid tumours: a developmental disorder. In: Nature Reviews Cancer (2005), 5, S. 481-488

Si, J. ; Bumber, Y. A. ; Shu, J. ; Qin, T. ; Ahmed, S. ; He, R. et al.: Chromatin Remodeling Is Required for Gene Reactivation after Decitabine-Mediated DNA Hypomethylation. In: Cancer Research (2010), 70, S. 6968-6977

Steegers-Theunissen, R. ; Obermann-Borst, S. A. ; Kremer, D. ; Lindemans, J. ; Siebel, C. ; Steegers, E. A. et al.: Periconceptional maternal folic acid use of 400 mg per day is related to increased methylation of the IGF2 gene in the very young child. In: Plos One (2009), 4, doi: 10.1371/journal.pone.0007845

Tiffin, N. ; Williams, R.D. ; Shipley, J. ; Pritchard-Jones, K.: PAX7 expression in embryonal rhabdomyosarcoma suggests an origin in muscle satellite cells. In: British Journal of Cancer (2003), 89, S. 327-332

Tomaszewski, J. J. ; Cummings, J. L. ; Parwani, A. ; Dhir, R. ; Mason, J.B. ; Nelson, J. B. et al.: Increased cancer cell proliferation in prostate cancer patients with high levels of serum folate. In: Prostate (2011), 71, S. 1287–1293

Tost, J. ; Gut, I. G.: DNA methylation analysis by pyrosequencing. In: Nature Protocols (2007), 2, S. 2256-2271

Wang, C.: Childhood rhabdomyosarcoma: Recent advances and prospective views. In: Journal of Dental Research (2012), 91, S. 341-350

Weißenborn, A. ; Burger, M. ; Mensink, G. B. M. ; Klemm, C. ; Sichert-Hellert, W. ; Kersting, M. ; Przyrembel, H.: Folsäureversorgung der deutschen Bevölkerung. In: Weißenborn, A. ; Przyrembel, H. (Hrsg.): BfR Wissenschaft: Folsäureversorgung der deutschen Bevölkerung. Berlin: Bundesinstitut für Risikobewertung (2005)

Wien, T. N. ; Pike, E. ; Wisloff, T. ; Staff, A. ; Smeland, S. ; Klemp, M.: Cancer risk with folic acid supplements: a systematic review and meta-analysis. In: BMJ open (2012), 2, e000653. doi: 10.1136/bmjopen-2011-000653

Wolff, T. ; Witkop, C. T. ; Miller, T. ; Syed, S. B.: Folic acid supplementation for the prevention of neural tube defects: an update of the evidence for the U.S. Preventive Services Task Force. In: Annals of Internal Medicine (2009), 150, S. 632-639

Yaffe, D. ; Saxel, O.: Serial passaging and differentiation of myogenic cells isolated from dystrophic mouse muscle. In: Nature (1977), 270, S. 725-727

Yetley, E. A. ; Rader, J. I.: Modeling the level of fortification and post-fortification assessment: U.S. experience. In: Nutrition Reviews (2004), 62, S. 50-59

Yusuf, F. ; Brand-Saberi, B.: Myogenesis and muscle regeneration. In: Histochemistry and Cell Biology (2012), 138, S. 187-199

Zammit, P. S. ; Partridge, T. A. ; Yablonka-Reuveni, Z.: The skeletal muscle satellite cell: The stem cell that came in from the cold. In: Journal of Histochemistry & Cytochemistry (2006), 54, S. 1177-1191

10 Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
AdoMet	S-Adenosylmethionin
aRMS	alveoläres Rhabdomyosarkom
BSA	Bovine Serum Albumin
C	Cytosin
cDNA	komplementäre DNA
Cos2	Costal 2
Ct	cycle threshold
Dhh	Desert hedgehog
DM	Differenzierungsmedium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DPBS	Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline
dTMP	Desoxythymidinmonophosphat
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eRMS	embryonales Rhabdomyosarkom
Ex	Exon
FBS	Fetal Bovine Serum
Fu	Fused
fw	forward
G	Guanin
Gli1	Gli family zinc finger 1
h	Stunde
HCl	Salzsäure
IGF2	Insulin-like growth factor 2
Ihh	Indian hedgehog
Lok	Lokalisation
MgCl ₂	Magnesiumchlorid

min	Minute
ml	Milliliter
mM	millimolar
MRF	myogener Regulationsfaktor
Mrf4 (Myf6)	Myogenic factor 6
MTA	Methylthioadenosin
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium-bromid
Myc	Myelocytomatosis viral oncogene homolog
Myf5	Myogenic factor 5
MyHC	Myosin Heavy Chain
MyoD	Myogenic Differentiation 1
MyoG	Myogenin
Mzf-1	Myeloid zinc finger 1
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NG	Normalgewebe
nm	Nanometer
NRD	Neuralrohrdefekt
Pax	Paired Box
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
Ptch1	Patched 1
rev	reverse
RMS	Rhabdomyosarkom
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
sek	Sekunde
Shh	Sonic hedgehog
Six	Six homeobox
Smo	Smoothened
SuFu	Suppressor of Fused

T	Thymin
Tbp	TATA-Box binding protein
TG	Tumorgewebe
THF	Tetrahydrofolat
UL	Upper Limit
μl	Mikroliter
μM	mikromolar

11 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, die vorliegende Arbeit selbständig und ohne Hilfe Dritter angefertigt zu haben. Gedanken und Zitate, die ich aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommen habe, sind als solche kenntlich gemacht. Diese Arbeit hat in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner Prüfungsbehörde vorgelegen und wurde bisher nicht veröffentlicht.

_____, _____

12 Lebenslauf

Persönliche Daten

Magdalena Elisa Münster

geboren am 14.02.1986 in München

Staatsangehörigkeit: deutsch

Studium

10/2012 bis 06/2013

Ludwig-Maximilians-Universität München

Masterarbeit in den kinderchirurgischen
Forschungslaboratorien im Dr. von Hauner'schen
Kinderspital
Thema: Einfluss von Folsäure auf die Proliferation
und Differenzierung von myogenen
Vorläuferzellen

03/2011-

Universität Wien

Masterstudium der Ernährungswissenschaften

10/2006 bis 02/2011

Universität Wien

Bachelorstudium der Ernährungswissenschaften

Praktische Erfahrungen

09/2011

**4-wöchiges Praktikum an der Universität
Wien** im Rahmen des Österreichischen

07/2011 bis 08/2011

**6-wöchiges Praktikum am Bayerischen
Landesamt für Gesundheit und
Lebensmittelsicherheit**

Abteilung: Forschungs- und Entwicklungslabor
des Sachbereichs Molekularbiologie

13 Danksagung

Ich möchte mich bei einigen Menschen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen und mich während meines gesamten Studiums unterstützt haben.

Mein Dank gilt meinem Betreuer Prof. Dr. Roland Kappler, der mir ermöglicht hat, dieses spannende Thema in den kinderchirurgischen Forschungslaboratorien des Hauner'schen Kinderspitals zu erarbeiten. Vielen Dank für die großartige Betreuung und die jederzeit hilfreiche Unterstützung bei meinem Projekt. Dabei möchte ich mich auch bei meinem Betreuer an der Universität Wien, Prof. Dr. Jürgen König, bedanken, der sich bereit erklärt hat, die offizielle Betreuung meiner externen Masterarbeit zu übernehmen.

Der gesamten AG Kappler und im Besonderen Alex, Franzi, Shiva und Tatiana danke ich für eine schöne Zeit im Laboralltag und für Rat und Tat bei all meinen Fragen. Ich hatte viel Spaß mit euch, auch über den Laboralltag hinaus, und danke euch für die manchmal notwendige und sehr amüsante Ablenkung.

Ein besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mir ermöglicht haben, mein Studium stress- und sorgenfrei zu durchlaufen. Ohne euch hätte ich mein Studium nicht in so guter Erinnerung.

Ich möchte mich auch bei meinen "Wienern" bedanken, die mich während des Studiums begleitet haben, vor allem Simone, Petra, Julia und Philipp. Ohne euch wäre meine Zeit in Wien und das Studium nur halb so schön gewesen.

Zuletzt danke ich meinen "Münchnern", vor allem Ines und Lena. Ohne euch geht's nicht :)!