

# **Beeinflussung der Lebensspanne von Caenorhabditis elegans durch RNA-Interferenz**

Seminarkurs  
im Fach Biotechnologie  
Biotechnologisches Gymnasium  
Justus-von-Liebig-Schule Waldshut

eingereicht bei  
Herrn Ebert

vorgelegt von  
Richard Kalkreuth  
Wallstr. 18  
79761 Waldshut-Tiengen

# Inhaltsverzeichnis

Danksagungen	3
1. Caenorhabditis elegans	4
1.1 Allgemeine Aspekte	4
1.2 C. elegans als Modellorganismus	6
2. DAF-2-Insulinsignalweg und SGK-1	9
3. RNA-Interferenz	11
4. Realisierung von RNA-Interferenz bei C. elegans	16
4.1 Injektion	16
4.2 Aufsaugen	16
4.3 Füttern	16
5. Plasmidvektor L4440 und T7-Expressionssystem	17
Material und Methoden	
6. Ansetzten von Bakterienkulturen	19
7. Kultur-Medien	19
8. Haltung von C. elegans	20
9. Synchronisation	21
10. Steriles Arbeiten	22
10.1 Sterilfiltrieren	22
10.2 Autoklavieren	22
10.3 Arbeiten mit steriler Sicherheitswerkbank	23
11. Zentrifugation	23
12. Transformation von Escherichia coli	24
13. Plasmid-Präparation	26
14. Auswertung der Versuche und Diskussion	27
15. Ergebnisse eines NCBI-BLASTs	28
16. Multiples Alignment mit Human-SGK-1	29
17. Literaturverzeichnis	30

## Danksagungen

Ich möchte mich bei allen Personen bedanken, die mir bei der Verwirklichung dieser Arbeit geholfen haben.

Zuallererst danke ich hierbei Herrn Ebert, ohne dessen Unterstützung der Seminarkurs in dieser Form nicht möglich gewesen wäre.

Des weiteren möchte ich Frau Dr. Sämann und Herrn Prof. Dr. Baumeister danken, die mir freundlicherweise DNA-Proben und wertvolle Ratschläge zu Verfügung stellten.

Sehr dankbar bin ich ebenso der Forschungsgruppe von Herrn Prof. Dr. Andrew Fire von der Stanford Universität und Frau Stiernagle von der Universität von Minnesota, die mit der Bereitstellung von Kulturen die Grundlage für meine Arbeit legten.

Des weiteren bedanke ich mich bei meinem gesamten Umfeld und meiner Familie für die lange und wichtige Unterstützung, die mit bei der Realisierung dieser Arbeit geholfen haben.

Waldshut, Juli 2007



# 1. Caenorhabditis elegans

## 1.1 Allgemeine Aspekte

Der Fadenwurm *C. elegans* ist ein Angehöriger der Gruppe der Nematoden.

Obwohl *C. elegans* als Bodenorganismus mit nur einem Millimeter Größe eher unscheinbar ist, ist das Tier als biologisches Modellsystem prädestiniert.

*C. elegans* repräsentiert eine äußerst erfolgreiche und weitverbreitete Tierklasse, die derzeit ca. 20.000 Arten umfasst.

*C. elegans* kommt in zwei Geschlechtsformen vor: Hermaphrodite und Männchen.

Welches Geschlecht sich entwickelt, hängt von der Anzahl der X-Chromosomen pro Zelle ab. Neben den 5 autosomen Chromosomenpaaren besitzt eine Hermaphrodit zwei (XX), ein Männchen aber nur eines (X0). Männchen entstehen durch spontane X-Chromosomen-disjunction und machen nur 0,05% der Laborpopulation aus. Die hermaphroditen Tiere können sich durch Selbstbefruchtung fortpflanzen, oder in seltenen Fällen durch Paarung mit Männchen.

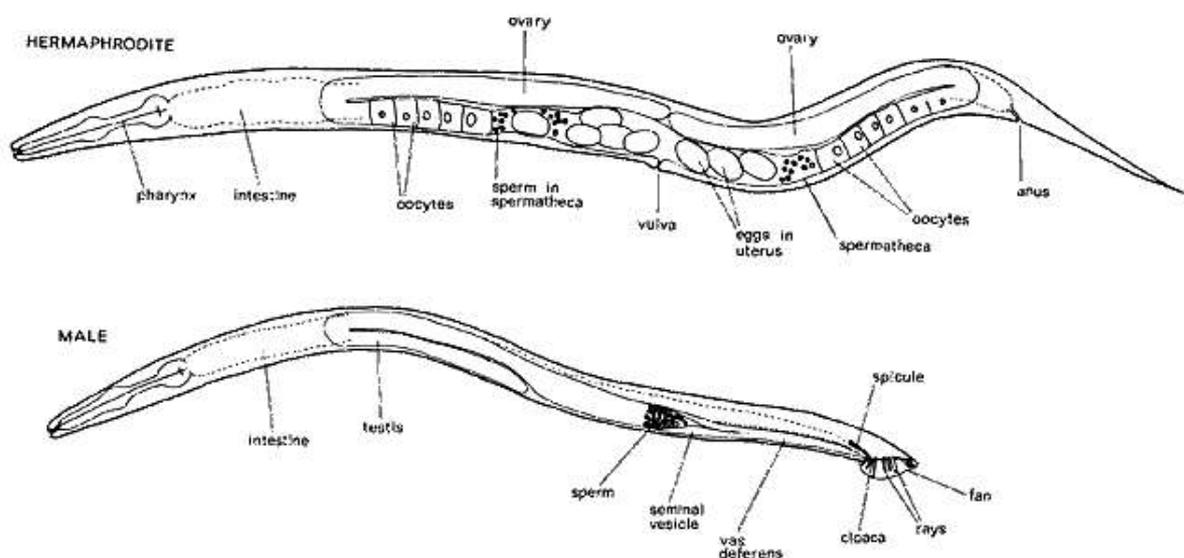


Abb. 1: Anatomie von *C. elegans*; oben: Hermaphrodit, unten: Männchen

In der Entwicklung der Hermaphroditen findet ein wichtiger Wechsel statt. Zunächst werden Spermien produziert und in der Spermatheca gelagert. Dann werden die Oocyten produziert. Die oocytischen Nuclei werden durch meiotische Zellteilung im Distalende der Gonaden hergestellt. Sie reifen in einem Syncytium, jedoch ohne komplette Zellmembran, was sie von den anderen unterscheidet. Der Zellkern und das Cytoplasma werden später in einer vollständigen Zellmembran eingeschlossen,

kurz vor der Befruchtung. Nach der Befruchtung wird die Eierschale hinzugefügt. Die Befruchtung findet als reifende Oocyten statt, die durch die Spermatheca gedrückt werden. Die Eier entwickeln sich rasch und werden im 40-Zellstadium durch die Vulva gelegt.

Nachdem *C. elegans* geschlüpft ist, durchläuft er vier Larvenstadien. Bereits zwei Tage nach dem Schlüpfen (bei 25°C) hat er seinen adulten Entwicklungsstand erreicht. Innerhalb der nächsten drei Tage findet die Ablage von 250 – 300 Eiern statt. 16 Tage später endet dann sein Leben. Unter schlechten Lebensbedingungen wie beispielsweise geringem Futterangebot oder sehr hoher Populationsdichte, entwickeln sich die L2-Larven zu Dauerlarven, die mehrere Monate in diesem

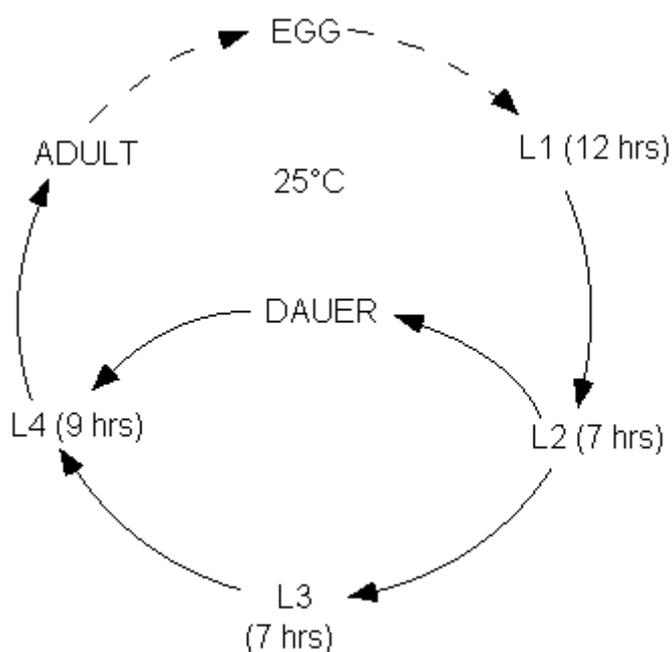


Abb. 2.: Lebenszyklus von *C. elegans*

Dauerstadium verweilen können. Unter verbesserten Lebensbedingungen (z.B. nach Zugabe von Bakterien), entwickeln sie sich innerhalb der nächsten zwölf Stunden weiter zu L4-Larven, die anschließend den normalen Entwicklungszyklus fortsetzen. Neben einer kurzen Generationszeit bringt *C. elegans* noch weitere Eigenschaften mit, die ihn in der modernen Biologie einen besonderen Stand als Modellorganismus verschaffen.

Er ernährt sich von Bakterien und kann sowohl auf Agarplatten als auch in Flüssigmedium kultiviert werden. Er toleriert Einfrieren bei -80°C. Die Stammhaltung wird dadurch stark vereinfacht. Er ist transparent und somit während aller Entwicklungsstadien der mikroskopischen Beobachtung zugänglich.

## 1.2 C. elegans als Modellorganismus

Trotz seines einfachen Körperbaus zeigt *C. elegans* alle Merkmale eines echten Tiers, seien es komplexe Verhaltensweisen oder sexuelle Vermehrung. Die Tiere sind Hermaphroditen. Homozygote Stämme sind daher durch Selbstbefruchtung einfach zu erhalten. Eine Rekombination des Genoms ist durch spontan auftretende Männchen möglich. Des weiteren zeichnet sich *C. elegans* durch weitgehende Zellkonstanz aus. Hermaphroditen besitzen exakt 959 Zellen. Das macht eine genaue Dokumentation über seinen Entwicklungsprozeß möglich. Die Entwicklung aller Zellen aus der Eizelle ist mittlerweile vollständig aufgeklärt.

Heute stellt er neben dem Bakterium *Escherichia coli*, der Taufliege *Drosophila melanogaster* und der Pflanze Ackerschmalwand *Arabidopsis thaliana* einen der am besten erforschten Organismen der Welt dar.

Vor allem die überschaubare Anatomie veranlaßte Sidney Brenner Mitte der 60er Jahre *C. elegans* als Modellsystem für die Beantwortung neurobiologischer Fragen zu wählen. Nach Jahren akribischer Kleinarbeit konnte das Schicksal jeder einzelnen Zelle während der Entwicklung geklärt werden.

Als diese Ergebnisse erreicht wurden, rückte das Genom in den Mittelpunkt des Interesses. Anfänglich noch mit der Zielsetzung, eine Kartierung der Chromosomen vorzunehmen, wurde bald der Entschluß gefaßt, das gesamte Genom zu sequenzieren. Zu einer Zeit, als die automatische Sequenzierung gänzlich unentwickelt war, ein gewagtes Unterfangen, das von vielen skeptisch betrachtet wurde, unter anderem auch, weil bezweifelt wurde, ob die Sequenz eines relativ niederen Organismus überhaupt nützliche Informationen in nennenswertem Umfang liefern könnte. Trotz dieser Schwierigkeiten nahmen Labore an zwei amerikanischen Universitäten die Aufgabe in Angriff. Im Verlauf des *C. elegans*-Genomprojekts wurden zahlreiche technische Probleme gelöst und die automatische Sequenzierung optimiert, so dass damit auch ein wichtiger Beitrag zur Vorbereitung des humanen Genomprojekts geleistet werden konnte. *C. elegans* war eines der ersten Tiere, dessen Genom mit 97 Mio. Basen praktisch vollständig sequenziert ist.

Faszinierenderweise sind nur 19 000 Gene demnach erforderlich, um ein vielzelliges Tier mit ausgeprägten Verhaltensmustern zu organisieren. Um so überraschender ist, dass trotz vierfach höherer Komplexität des menschlichen Genoms für rund 60 % der krankheitsassoziierten humanen Gene ein entsprechendes homologes Gen in *C. elegans* zu finden ist.

Somit lassen sich wegweisende Experimente vornehmen, welche die Grundlage für ein detailliertes Verständnis von Krankheiten wie zum Beispiel Alzheimer herstellen. Dabei ist besonders der ausgeprägte Informationsfluss innerhalb der *C. elegans* Forschergemeinde sehr hilfreich. So kann die komplette DNA-Sequenz jederzeit von öffentlichen Servern im Internet abgerufen werden. Seiten wie die Wormbase ([www.wormbase.org](http://www.wormbase.org)) und das Wormbook ([www.wormbook.org](http://www.wormbook.org)) bieten eine Vielzahl von Informationen, von einfachen Haltungsbedingungen bis hin zu biomedizinischen Screenings oder Genomkartierungen. Die Analyse von DNA oder auch Proteinsequenzen kann dadurch schnell und effizient durchgeführt werden. Im Vergleich zu anderen Modellorganismen, wie z.B. Mäusen, ist die Handhabung von *C. elegans* erheblich einfacher, schneller und kostengünstiger. Eine Knockout-Mutante kann in *C. elegans* innerhalb weniger Monate, mit nur einem Bruchteil der Kosten einer Knockout-Maus, erzeugt und analysiert werden. Zu dem eröffnete die Entdeckung der RNA-Interferenz eine Vielzahl komplett neuer Möglichkeiten, welche Kosten- und Zeitaufwand von Experimenten auf ein Minimum reduzierte. Prinzipiell ist *C. elegans* damit zur relativ schnellen Untersuchung von Regulationsmechanismen, aber auch für die Durchführung von Drug-Screening Programmen und Untersuchungen genetisch bedingter Erkrankungen geeignet. Ein Engpass in der Identifizierung neuer Leitstrukturen für die Medikamentenentwicklung wird häufig durch das Fehlen geeigneter, aussagekräftiger Screeningsysteme verursacht, die zudem high-throughput-tauglich (HTS), das heißt im großen Maßstab anwendbar sein müssen. Zellkulturen sind zwar HTS-kompatibel, besitzen jedoch den entscheidenden Nachteil, dass es sich dabei um einzelne Zellen und nicht um ein Tier handelt. Genau in diese Lücke stößt *C. elegans*, denn er vereint beide Anforderungen und ein Screeningsystem kann mit vertretbarem Aufwand etabliert werden.

Einen möglichen Ausgangspunkt zur Entwicklung eines entsprechenden Systems bietet die Erzeugung einer Mutantenbibliothek von *C. elegans* durch unspezifische Mutagenese. Dazu werden die Nematoden mit chemischen Mutagenen inkubiert und anschließend mit UV-Licht bestrahlt. Unter geeigneten Bedingungen entstehen dabei vor allem Deletionsmutanten, die mit ein wenig Glück zum Knockout des betroffenen Gens führen. Nach dieser Behandlung kultiviert man die Tiere noch einige Tage auf Agarplatten und impft, davon ausgehend, Flüssigkulturen im 96-well-Format an. Diese Flüssigkulturen werden ca. eine Woche später geteilt. Ein Teil der Tiere wird

zur DNA-Präparation verwendet, während der Rest bei -80 °C eingefroren wird. Ist diese Bank vorhanden, so kann sie mittels PCR auf interessante Knockouts durchsucht werden. Von identifizierten Mutanten werden die Würmer aufgetaut und erneut in Kultur genommen. Um sicherzugehen, dass die Tiere nur die gewünschte Mutation enthalten, folgen schließlich mehrere Rückkreuzungen mit Wildtyp-Tieren, die dazu dienen eventuell vorhandene, zusätzliche Mutationen zu entfernen. Etwa vier Monate nach Beginn des PCR-Screening kann dann mit der Analyse des Phänotyps und der Entwicklung eines HTS Drug-Screenings begonnen werden. Voraussetzung für ein Drug-Screening ist dabei, dass das menschliche Gen und das homologe aus *C. elegans* tatsächlich funktional konserviert sind. Dies wird überprüft, indem man das humane Gen in den Knockout-Nematoden einbringt und auf Umkehrung des Phänotyps kontrolliert.

Ist das der Fall, wird das mutierte menschliche Gen eingesetzt und mit diesem transgenen Stamm dann das Drug-Screening durchgeführt. Abhängig vom vorliegenden Phänotyp muss für jedes Projekt ein automatisierbarer Test entwickelt werden. Mit diesem Test, der vorzugsweise in Mikrotiterplatten durchgeführt wird, ist es schließlich möglich, ganze Substanzbibliotheken innerhalb kurzer Zeit zu testen. Üblicherweise startet man hier mit 5000 - 10000 Substanzen. Der Einsatz von *C. elegans* erweitert die präklinische Phase der Medikamentenentwicklung um ein vielversprechendes Modellsystem, das ein relativ einfaches Screening von Substanzbibliotheken in einem komplexen Organismus erlaubt.

Ethische Probleme, wie sie bei klassischen Tierversuchen an Wirbeltieren auftreten, stellen sich dabei nur begrenzt.

Dies kommt der häufig geäußerten Forderung nach Alternativen zu Tierversuchen an höheren Organismen entgegen.

## 2. DAF-2-Insulin-Signalweg und SGK-1

Der Lebenszyklus des Fadenwurms *Caenorhabditis elegans* hängt zum großen Teil von Umweltbedingungen ab.

Unter ungünstigen Umweltbedingungen stoppt die Larvalentwicklung allerdings im dritten Larvalstadium und geht in die Dauer-Diapause über. L3 Dauerlarven sind, wie bereits erwähnt, langlebig und resistent gegen oxidativen Stress. Die ontogenetische Alternative zwischen der Ausbildung der Dauerlarve und reproduktivem Wachstum wird vom Hormonrezeptor DAF-2 (*dauer formation*) im Zellkern gesteuert.

Ende 1993 entdeckte die Wissenschaftlerin Cynthia Kenyon während ihrer Versuchsreihen in San Francisco das Gen *daf-2*. Als sie es ausschaltete, erlebte sie eine Überraschung: Ohne *daf-2* wurde *C. elegans* doppelt so alt.

Die phänotypischen Veränderungen waren überwältigend: eine loss-function-Mutation von DAF-2 kann mit einer Reihe von Wachstumsfaktoren den Stoffwechsel des Fadenwurms optimieren, die Wirkung von Mikroorganismen verringern, oxidative Streßresistenz und die Lebensspanne dramatisch verbessern.

Für ihre Forschungen am Alterungsprozess erhielt die amerikanische Wissenschaftlerin Ende 2005 den Ilse & Helmut Wachter Preis.

*C. elegans* besitzt an seinen Zellen den Transmembranrezeptor DAF-2, der Insulin bzw. den insulinähnlichen Wachstumsfaktor IGF-1 bindet. Dieser Rezeptor steuert eine Proteinkinase-Kaskade bei deren Ende die Inaktivierung des Transkriptionsfaktors DAF-16 steht.

Sobald eine aktivierende Bindung des Rezeptors vorliegt, aktiviert er seinerseits die Kinase AGE-1 (Phosphatidylinositol-3-kinase). Diese Kinase phosphoryliert das Molekül  $IP_2$  zu  $IP_3$  (Inositol-1,4,5-triphosphat). Dieser second messenger stellt die Phosphatquelle für die Kinase PDK-1 (3-phosphoinositide-dependent protein kinase) dar. Diese Kinase aktiviert den Kinasen-Komplex aus den Proteinen AKT-1, AKT-2 und

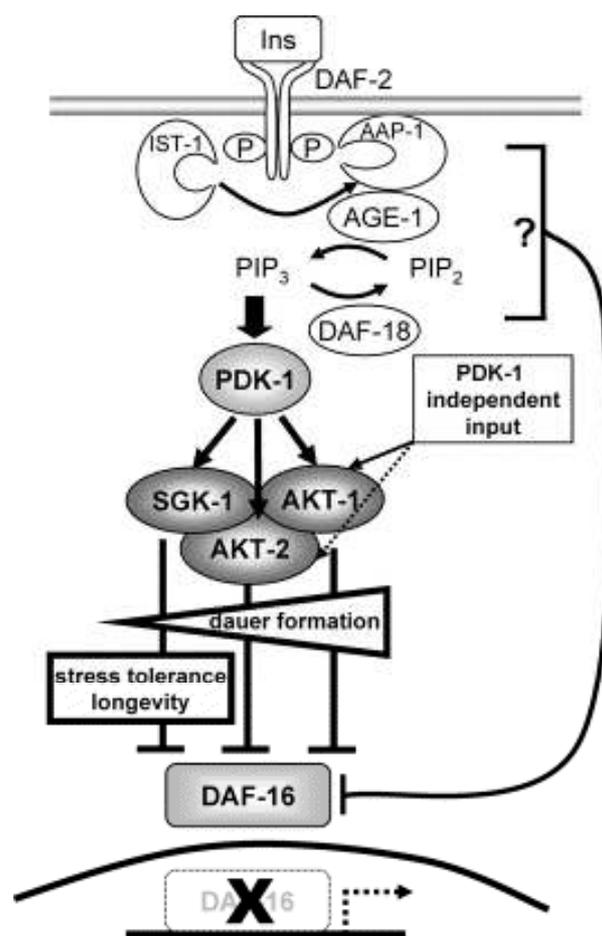


Abb. 3: DAF-Insulin-Signalweg

Diese Kinase aktiviert den Kinasen-Komplex aus den Proteinen AKT-1, AKT-2 und

SGK-1. Sobald dieser Komplex angeregt ist, inaktiviert er seinerseits den Transkriptionsfaktor DAF-16 durch Phosphorylierung.

Sobald sich die Nahrungsbedingungen verschlechtern, kann sich *C. elegans* aus L2-Larven zu Dauerlarven entwickeln. Da Nährstoffe knapp sind, bleibt eine Aktivierung des DAF-2-Rezeptors aus, was zur Folge hat, dass der Transkriptionsfaktor DAF-16 nicht deaktiviert wird. In Folge dessen setzt er die Expression mehrerer Gene in Gang, die dem Wurm allgemeinen Stoffwechselveränderungen, sowie Schutz vor oxidativem und bakteriellen Stress verleiht und seine Lebensspanne verlängert.

Die Forschungsgruppe rund um Prof. Baumeister der Universität Freiburg hat 2004 gezeigt, dass die Kinase SGK-1 (Serum- and Glucocorticoid- inducible kinase) die entscheidende Komponente im AKT/PKB-Kinasen-Komplex ist, dessen Inaktivierung zur den obigen phänotypischen Veränderungen *C. elegans* führt.

Eine Vielzahl von Versuchen belegte diese Theorie. Mehrere RNAi-screenings zeigten die Auswirkungen eines Knockdowns mehrerer Proteine.

Strain	Mean Adult Life Span $\pm$ SEM 25°C (days)	Maximum Adult Life Span 25°C (days)
wild-type	14.7 $\pm$ 0.3	23
<i>sgk-1<sup>Δ</sup></i>	24.0 $\pm$ 0.4	33
<i>Ex[sgk-1::gfp]<sup>c</sup></i>	11.3 $\pm$ 0.2	18
<i>daf-2(c1370)</i>	26.0 $\pm$ 0.8	37
<i>daf-2(c1370); sgk-1<sup>Δ</sup></i>	36.0 $\pm$ 0.9	65
<i>age-1(mg44)<sup>d</sup></i>	20.7 $\pm$ 0.8	34
<i>age-1(mg44)<sup>d</sup>; sgk-1<sup>Δ</sup></i>	30.0 $\pm$ 0.8	46
<i>pkk-1(sa680)</i>	25.5 $\pm$ 0.6	35
<i>pkk-1(sa680); sgk-1<sup>Δ</sup></i>	*	*
<i>akt-1(ok525)</i>	15.5 $\pm$ 0.4	22
<i>akt-2(ok393)</i>	14.2 $\pm$ 0.3	22
<i>akt-1<sup>Δ</sup>; akt-2(ok393)</i>	17.5 $\pm$ 0.6	30
<i>akt-1<sup>Δ</sup>; akt-2(ok393); sgk-1<sup>Δ</sup></i>	22.7 $\pm$ 0.5	36
<i>daf-16(mgD)50</i>	11.4 $\pm$ 0.2	17
<i>daf-16(mgD)50; sgk-1<sup>Δ</sup></i>	11.4 $\pm$ 0.3	19

Abb. 4: Lebensspanne von *C. elegans* bei verschiedenen RNAi-Experimenten

Die gezielte Blockade der Expression von SGK-1 führte zu einer durchschnittlichen Anstieg der Lebenserwartung von 63% mit einem Maximum von 224%.

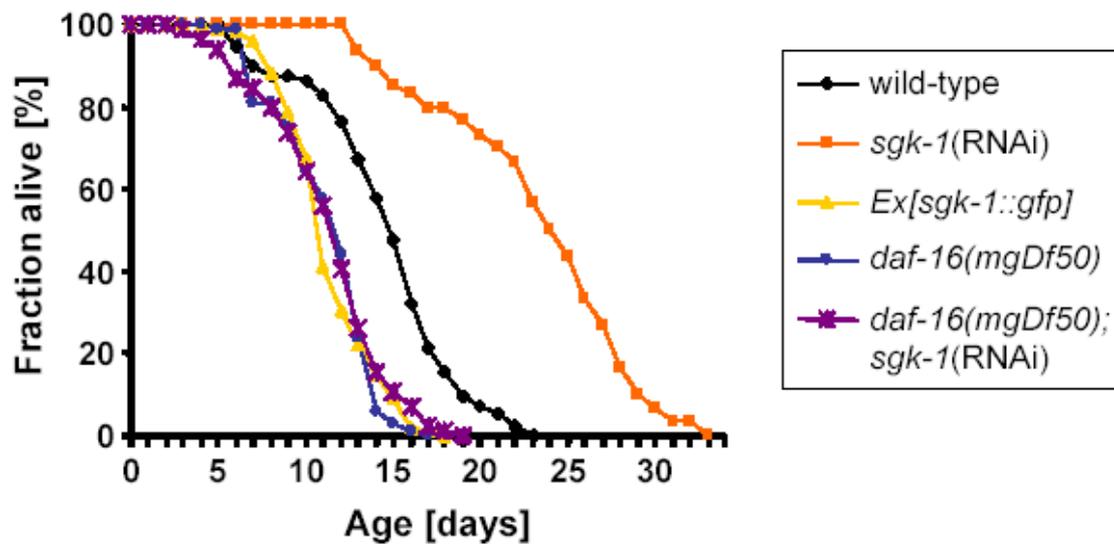


Abb. 5: Lebensspanne von *C. elegans* bei RNAi [SGK-1] und anderen RNAi-Experimenten

### 3. RNA-Interferenz

Nur selten erobert ein Ergebnis der Grundlagenforschung binnen kurzer Zeit ein breites Anwendungsfeld und wird zum kaum noch wegzudenkenden Standardwerkzeug auf seinem eigenen sowie vielen anderen Gebieten. Für solch einen spektakulären Durchbruch gab es im Jahr 2006 den Medizin-Nobelpreis. Die Auszeichnung honoriert eine erst vor acht Jahren entdeckte, verblüffend einfache Methode zur gezielten Blockade beliebiger Gene. Eine ähnlich rasante Karriere hatte zuletzt 1985 die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) gemacht.

Kurz vor Ende des 20. Jahrhunderts waren die Biologen überzeugt, alle genetischen Mechanismen im Prinzip zu kennen. Dabei hatten sie es besser wissen müssen.

Denn es gab einen unerklärlichen Effekt, den Forscher 1990 zunächst bei Petunien beobachtet hatten. Als sie zusätzliche Exemplare des Gens für den Blütenfarbstoff einführten, um eine noch intensivere Färbung zu erzielen, bleichten die Blüten statt dessen aus. Diese „Co-Suppression“ fand sich später auch bei Tafliegen, Pilzen und Tabakpflanzen. Aber niemand ging der Ursache des Phänomens nach.

Erst Untersuchungen auf einem anderen Gebiet sollten zur Auflösung des Rätsels führen - und den Beteiligten damit den Nobelpreis einbringen. Allen ist das zentrale

Dogma der Molekularbiologie, aus DNA wird RNA und daraus ein Protein, bekannt. Das brachte die Biologen schon Anfang der 1980er Jahre auf eine Idee, wie es möglich sein sollte, Genen gezielt auszuschalten: Durch gezieltes Einbringen spezieller RNA-Moleküle, die komplementär zur mRNA eines bestimmten Gens, könnte man die RNA dieses Gens abfangen und somit dessen Expression stoppen. Solche Antisense-Moleküle passen wie die Hohlform zum Abguss und verbinden sich mit der mRNA. Dabei entstehen doppelsträngige RNAs, die nicht mehr als Vorlage für die Proteinsynthese taugen.

In der Praxis allerdings lieferte dieses Verfahren oft unbefriedigende Ergebnisse. Das stellten auch Andrew Fire an der Carnegie Institution of Washington in Baltimore und Craig Mello an der Universität von Massachusetts in Worcester fest. Gene wurden teils nur schwach unterdrückt, und was noch verwirrender war: In Kontrollversuchen mit Original-mRNAs statt der Antisense-Form kam es ebenfalls zur Suppression. Fire und Mello zogen daraus einen radikalen Schluss, der bei ihren Kollegen zunächst Kopfschütteln auslöste. Sie vermuteten, dass weder Antisense- noch normale RNA die Genblockade hervorrief; verantwortlich dafür sei statt dessen die doppelsträngige Form, die jeweils als Verunreinigung zugegeben war. Das schien widersinnig, weil sich damals niemand vorstellen konnte, wie solche Moleküle den Abschalteneffekt hervorrufen sollten.

Unbeeindruckt davon machten Fire und Mello die Probe aufs Exempel: Sie injizierten *C. elegans* hochgereinigte RNA-Moleküle eines für die Muskelfunktion wichtigen Gens einmal im Original, dann in der Antisense-Variante und schließlich in doppelsträngiger Form. Dabei fanden sie ihre Vermutung bestätigt. Selbst große Mengen der einzelsträngigen Moleküle hatten kaum einen Effekt. Dagegen genügten wenige Exemplare der doppelsträngigen RNA, um die Würmer unkoordiniert zucken zu lassen. Daraus ergab sich eine weitere Erkenntnis: Die natürlichen Botenmoleküle konnten nicht wie bei der Antisense-Methode einfach nur abgefangen worden sein. Dazu wären mindestens gleich viele Abfänger nötig gewesen. Statt dessen zog jedes doppelsträngige RNA-Molekül offenbar gleich eine Vielzahl von Boten aus dem Verkehr.

In ihrer Veröffentlichung von 1998 prägten Fire und Mello für das Phänomen der RNA-Interferenz. Zwar konnten sie erst nicht erklären, wie es zu Stande kam. Doch schon bald deckten andere Forscher den Mechanismus auf. Zu ihnen zählte insbesondere der junge deutsche Chemiker Thomas Tuschl. Zunächst am

Whitehead Institut für Biomedizinische Forschung in Cambridge (Massachusetts) und dann am Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie in Göttingen fanden er und seine Mitarbeiter heraus, dass ein Enzym namens Dicer (Häcksler) die doppelsträngige RNA in kurze, 21 bis 23 Basenpaare lange Stücke zerhackt, die dann die Blockade bewirken. Mit diesen Mini-RNAs (small-interfering (si)-RNAs) konnten erstmals auch in Säugetieren und menschlichen Zellen gezielt Gene abgeschaltet werden.

Wenig später ließ sich schließlich die letzte Komponente des Mechanismus entschlüsseln. Demnach werden die kleinen doppelsträngigen RNA-Stücke in große Proteinkomplex namens RISC (RNA induced silencing complex ) eingebaut und dort in die beiden Einzelstränge aufgetrennt. Einer davon löst sich wieder ab, doch der andere bleibt und wirkt als Sonde, die alle m-RNA-Moleküle erkennt, welche einen komplementären Abschnitt enthalten. Diese werden gebunden, von einem Enzym namens Slicer (Hobel), das zum RISC-Komplex gehört, zerschnitten und wieder freigesetzt. Mittels dieser Schnipsel kann keine Genexpression mehr stattfinden. Auf diese Weise zieht die Zelle spezifisch nur all jene mRNAs aus dem Verkehr, die einen Abschnitt enthalten, dessen Basensequenz zu derjenigen des kurzen RNA-Strangs im RISC-Komplex komplementär ist. In der Praxis erwies sich diese Form des Gen-Knockouts als viel einfacher und zuverlässiger als das Antisense-Verfahren und ist inzwischen zur Methode der Wahl avanciert. Ihre Bedeutung lässt sich kaum überschätzen, wenn man bedenkt, dass derzeit ein Genom nach dem anderen entschlüsselt wird. Das macht die Konstruktionshandbücher für die verschiedenen Organismen zwar lesbar. Aber das meiste bleibt erst einmal unverständlich - wie der Inhalt eines fremdsprachigen Textes. Die RNA-Interferenz erlaubt nun, die gefundenen Gene der Reihe nach zu blockieren und aus den resultierenden Ausfallserscheinungen auf die jeweilige Funktion zu schließen.

Kaum geringer ist die medizinische Anwendung. So haben Tuschl und der einstige Nobelpreisträger Philip ein gegründet, das mit den kleinen RNA-Schnipseln krankmachende Gene abschalten will. Am weitesten fortgeschritten ist derzeit ein Wirkstoff der Firma Sirna gegen Makuladegeneration, ein Augenleiden bei älteren Menschen; das Mittel steht kurz vor klinischen Studien der Phase 2.

Aber auch im Bereich der Grundlagenforschung ging die Karriere der RNA-Interferenz rasant weiter. Von Anfang an war klar, dass hinter dem Phänomen ein Verteidigungsmechanismus von Pflanzen und primitiven Tieren gegen virale

Krankheitserreger stecken muss. Die meisten Viren erzeugen im Zuge ihrer Vermehrung nämlich doppelsträngige RNAs, an denen die befallene Zelle den fremden Eindringling erkennt und mit dem beschriebenen Mechanismus für die Stilllegung der viralen Gene sorgt.

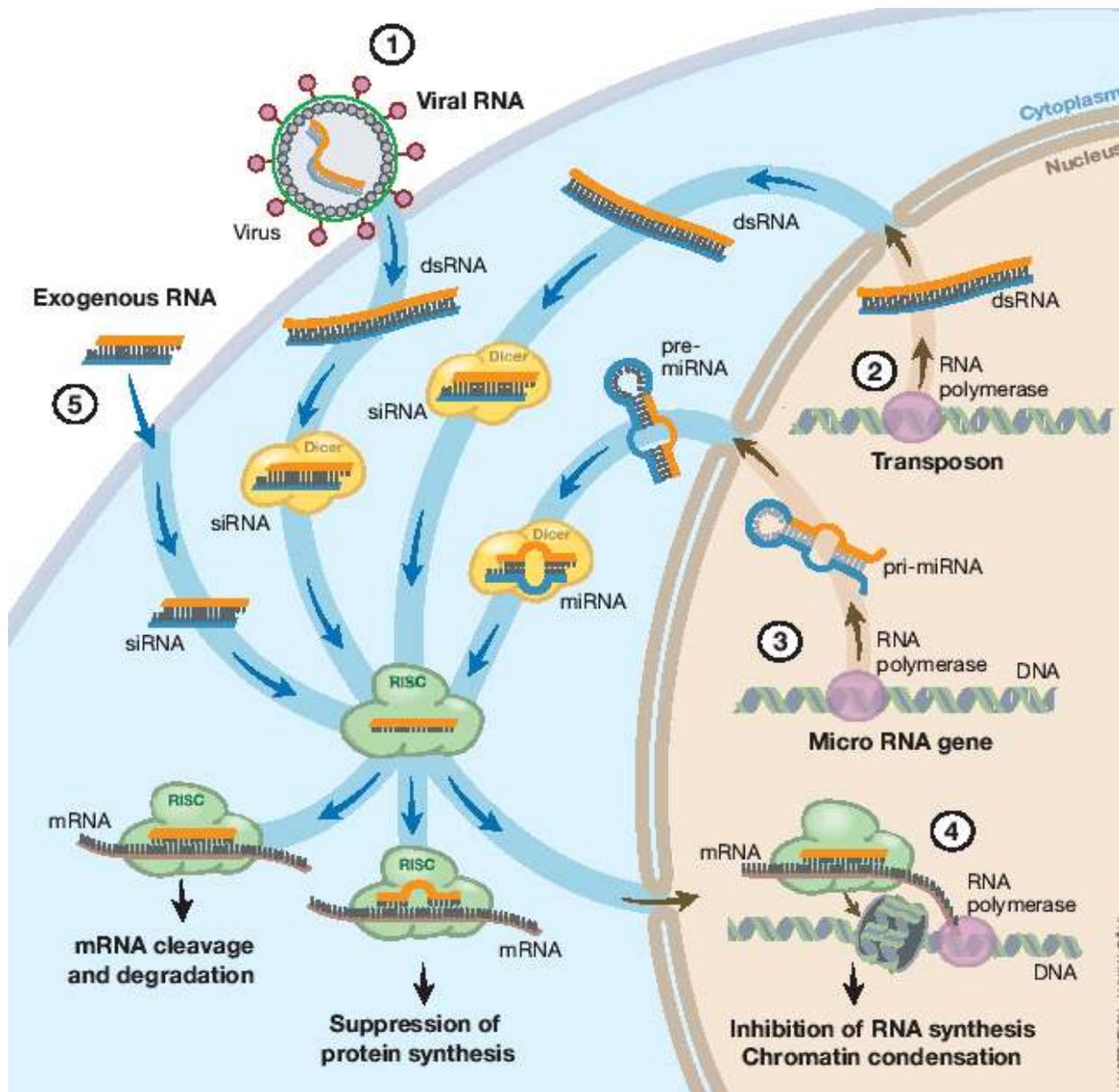


Abb. 6: Schema von RNAi: 1) Abbau viraler DNA, 2) Eliminierung von Transkripten von Transposons, 3) Regulation der Proteinsynthese, 4) Hemmung der RNA-Synthese, 5) künstlich induzierte Hemmung der Genexpression

Höhere tierische Organismen haben zusätzliche, komplexere Abwehrstrategien entwickelt. Trotzdem brauchen auch sie die RNA-Interferenz, um so genannte springende Gene (Transposons) im Zaum zu halten. Diese Schmarotzer, die in ferner stammesgeschichtlicher Vergangenheit ins Erbgut höherer Tiere eingedrungen sind, haben die Fähigkeit, sich eigenständig an beliebige Stellen im Genom zu kopieren.

Da das über die Zwischenstufe einer doppelsträngigen RNA geschieht, kann ihr gleichfalls durch RNA-Interferenz ein Riegel vorgeschoben werden.

Doch nicht nur unerwünschte fremde Erbsubstanz lässt sich so im Zaum halten. Wie sich zum Erstaunen der Biologen herausstellte, nutzen Zellen den Mechanismus auch, um ihre eigenen, normalen Gene zu regulieren. Nur ein kleiner Teil davon wird nämlich in einer spezialisierten Körperzelle gebraucht und darf folglich dort aktiv sein. Schon länger glaubten die Biologen zu wissen, wie diese Regulation funktioniert. Demnach entscheiden so genannte Transkriptionsfaktoren darüber, ob ein Gen abgelesen wird oder nicht.

Nun jedoch zeigte sich, dass dies zwar der wichtigste, aber keineswegs der einzige Mechanismus ist. Wie sich herausstellte, existieren im Erbgut Gene für so genannte Mikro-RNAs, Diese sind als Bauanleitungen für Proteine viel zu kurz und haben zudem einen ganz ungewöhnlichen Aufbau: Ihre eine Hälfte ist über weite Strecken komplementär zur anderen. Dadurch bilden sie eine hairpin-Struktur, sie biegen sich wie eine Haarnadel in der Mitte um und die beiden Enden bilden miteinander einen Doppelstrang. Dieser wird wie fremde doppelsträngige RNA in etwa 22 Basen lange Stücke zerhackt, die dann per RNA-Interferenz alle mRNAs mit komplementären Abschnitten eliminieren.

Doch das ist noch nicht alles. Wie sich inzwischen gezeigt hat, zerstört der RISC-Komplex nicht nur gezielt mRNAs, sondern hemmt auch bereits die Transkription der zugehörigen Gene. So sorgt er unter anderem dafür, dass die Erbsubstanz an der betreffenden Stelle in einer kompakten, fest verschnürten Form vorliegt, in der sie nicht abgelesen werden kann. Der Mechanismus, über den dies geschieht, ist allerdings noch nicht genau bekannt.

Insgesamt haben Fire und Mello also die Tür zu einer wahren Schatzkammer der Biologie und Medizin aufgestoßen.

## 4. Realisierung von RNAi in *C. elegans*

Es gibt drei unterschiedliche Methoden zum Knockdown von Genen mittels RNAi bei *C. elegans*. Per Injektion, durch Aufsaugen oder durch Füttern der doppelsträngigen RNA. Welche Methode die richtige ist, hängt vom Experiment ab.

### 4.1 RNAi durch Injektion

Zunächst gilt es, die Menge des auszuschaltenden Gens zu erhöhen. In der Regel wird dazu die DNA erst mittels PCR amplifiziert und anschließend in einen T7-Vektor (hier: L4440) kloniert und in Bakterien transformiert, wodurch dsRNA produziert wird. Die aufgereinigte dsRNA wird nun jungen ausgewachsenen Hermaphroditen in den Darm, in eine hohle Stelle im Interzellularraum oder in die Gonaden injiziert. Nun werden die Würmer zurück auf die Platten gesetzt und die Nachkommen auf nach phänotypischen Veränderungen untersucht und entsprechend ausgezählt. In den meisten Fällen gibt es keine nennenswerten phänotypischen Unterschiede, beim Verwenden dieser drei Methoden, allerdings gibt es eine kleine Gruppe von Genen, welche durch Injektion stärker unterdrückt werden, wie beispielsweise solche, die in der Mitte der Embryogenese aktiv sind. RNAi durch Injektion stellt eine sehr wirksame Methode zum Gen-Knockdown dar, um auch dauerhafte Mutanten zu erzeugen, allerdings ist sie mit einem erheblichen Laboraufwand verbunden.

### 4.2 RNAi durch Aufsaugen

Eine Anzahl von Würmern wird in eine Lösung mit hoher Konzentration von dsRNA gebracht. Anschließend werden die Phänotypen der Würmer bzw. ihrer Nachkommen untersucht. Diese Methode ist sehr nützlich, um eine große Anzahl von Würmern, etwa 10 bis hundert, zu beeinflussen oder für große Ansätze im 96 well-Format von Mikrotiterplatten. Für diese Methode können Nematoden sämtlichen Entwicklungsstands verwendet werden, allerdings ist eine große Menge von RNA nötig.

### 4.3 RNAi durch Füttern

Die Würmer werden Bakterien als Nahrung gegeben, welche dsRNA produzieren. Dadurch dass die Bakterien als Nahrungsquelle dienen, nehmen sie auch die RNA auf. RNAi durch Füttern ist mit dem kleinsten praktischen Laboraufwand verbunden

und ist mit ihren Standardmethoden die billigste, hat aber eine geringfügig größere Diversität der phänotypischen Resultate zur Folge als bei den anderen Methoden. Sie eignet sich zur gleichzeitigen Behandlung vieler Würmer und eignet sich sowohl auf Agar als auch in Flüssigmedium. Auch hier können Würmer sämtlichen Alters eingesetzt werden.

Für manche Ansätze, wie zum Beispiel bei meinem Versuch, die Lebensspanne zu beeinflussen, ist es vorteilhaft, wenn die Würmer vorher synchronisiert wurden.

## 5. Plasmid-Vektor L4440 und T7-Expressionssystem

Für die „RNAi by feeding“-Methode wird das Plasmid pPD129.36 gekoppelt mit dem T7-Expressionssystem verwendet, um dsRNA in bakteriellen Wirtszellen zu produzieren. Dieser im Labor von Dr. Andrew Fire hergestellte Vektor hat eine Basenpaarzahl von 2790 bp. Er enthält neben einer ori-Region eine Ampicillin-Resistenz-Gen, einen lacZ-Operator des E. coli-Operons der  $\beta$ -Galaktosidase vor der Multiple cloning site und eine MCS, die von zwei T7-Promotoren flankiert ist. Der hierfür verwendete Bakterienstamm ist der Stamm E. coli Ht115(DE3). Für die Expression des Zielgens ist eine T7-Polymerase von Nöten, eine RNA-Polymerase, die nur in T7-Phagen natürlicherweise vorkommt. Das T7-Expressionssystem ist ein Expressionssystem in E.coli, das eine sehr dichte Regulation erlaubt. Die T7-Promotoren können ausschließlich von der T7-Polymerase und nicht von der E. coli-RNA-Polymerase abgelesen werden, parallel dazu erkennt dieses Enzym keine anderen Promotoren des Bakteriums. Da die T7-Polymerase in E. coli natürlicherweise nicht vorkommt, wird zu diesem Versuchsaufbau der Stamm HT115(DE3) verwendet, ein Stamm der das Gen für die T7-Polymerase genomisch integriert hat. Zur gezielten Regulation der Expression ist auch vor diesem ein lacZ-Operator kloniert. Das Gen für den lac\_I-Repressor ist in HT115(DE3) ebenfalls genomisch enthalten. Durch Induktion mit IPTG (Isopropyl-thio-  $\beta$ -D-galactosid), einem Stoff, der in seiner Konformation der Laktose ähnelt, wird der lac-Repressor räumlich so verändert, dass er nicht mehr an die den Operator binden kann. Nun kann das Gen der T7-Polymerase abgelesen werden. Parallel dazu ist nun auch der T7-Promotor des Plasmids frei. Dieses Regulationssystem sorgt dafür, dass die T7-Polymerase und damit auch das Zielgen erst zu einem definierten Zeitpunkt

exprimiert werden und somit den toxischen Streß der Bakterien durch artfremde Produkte reduzieren. Die T7-Polymerase kann jetzt das Zielgen transkribieren und entsprechende mRNA synthetisieren. Dieses Gen ist wie schön erwähnt von zwei T7-Promotoren flankiert, was zur Folge hat, dass das Gen von beiden Seiten abgelesen wird und sich somit komplementäre RNA-Moleküle bilden, welche sich zu dsRNAs zusammenschließen.

Das T7-Expressionssystem gepaart mit dem Plasmidvektor L4440 stellen eine sehr effiziente Methode zur Bildung doppelsträngiger RNA dar. Zum einen kann die Expression von Polymerase und Zielgen reguliert werden, zum anderen wird ausschließlich die gewünschte Gen-Sequenz abgelesen und das sehr stark, da der T7-Promotor ein sehr starker Promotor ist. Diese Methode ist im Labor sehr einfach durchzuführen. Das mit RNAi auszuschaltende Gen muss bloß amplifiziert werden, zwischen die T7-Promotoren in den Vektor kloniert und anschließend in *E. coli* transformiert werden. Die hier anzuwendenden Methoden sind Standard in modernen biotechnologischen Labors und sowohl kostengünstig als auch schnell machbar.

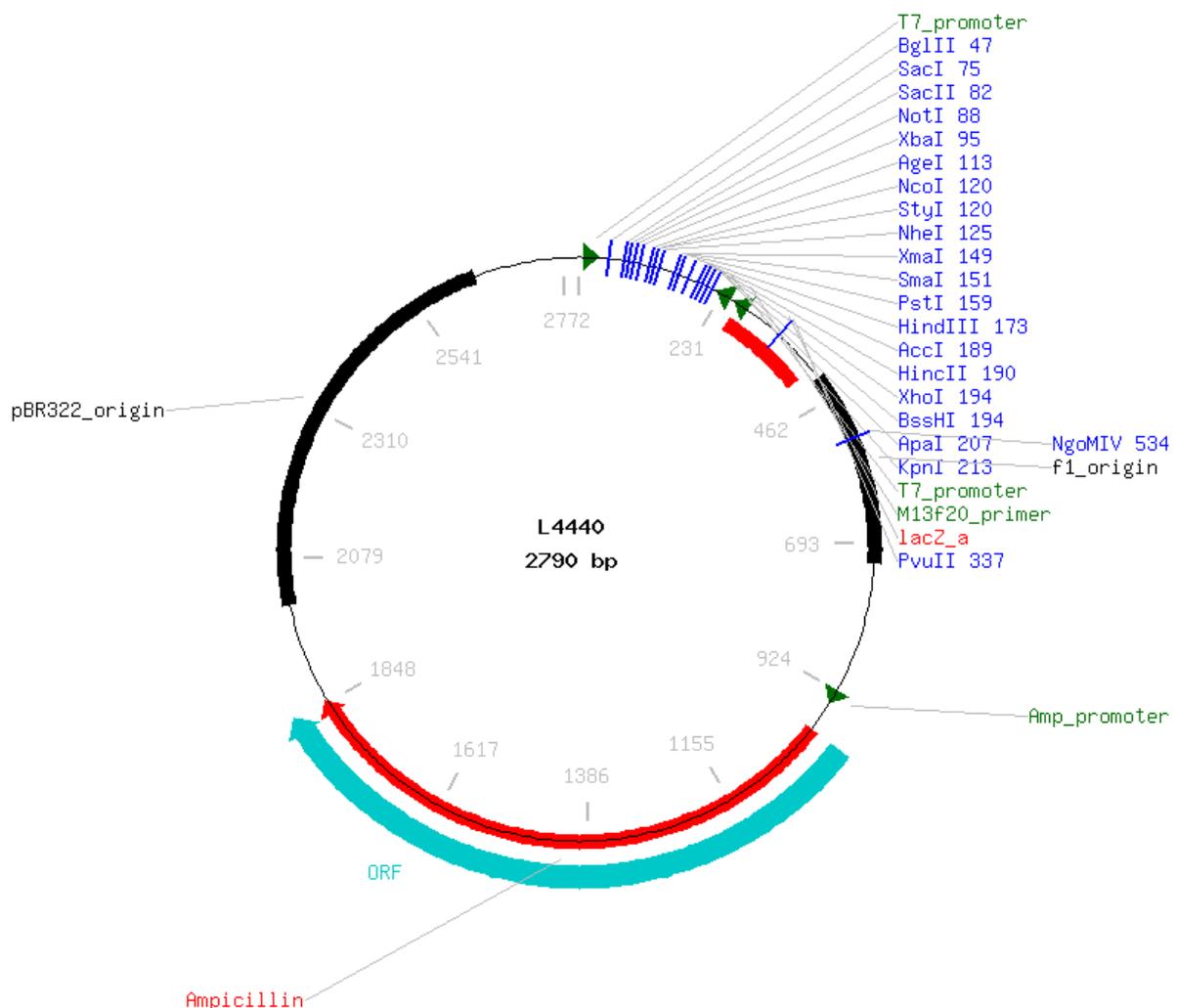


Abb. 7: Karte des Plasmids pPD129.36

## MATERIAL UND METHODEN

### 6. Ansetzen von Bakterienkulturen

Zunächst wird das Medium bzw. der Agar hergestellt, das den Bakterien als Lebensgrundlage dient.

Zum Ansetzen der Kultur werden in einem sterilen Gefäß, z.B. einem Erlenmeyerkolben, Medium (Menge abhängig von Versuch, hier ca. 20 mL) mit Bakterien beimpft, die als aufgetaute Stock-Suspension vorliegen oder als Kolonie von einer schon besiedelten Agar-Platte genommen wurden. Wichtig ist hier steriles Arbeiten, damit neben der Bakterienkultur keine anderen Organismen wachsen können. Eine solche Kultur ist nach Inkubation über Nacht bei 37°C im Schüttler bei ca. 200 Umdrehungen pro Minute gebrauchsfertig.

Wenn eine Bakterienkultur nicht weiter benötigt wird, können aus ihnen Gefrierstocks hergestellt werden, um sie für die weitere Zeit aufzubehalten und zu konservieren. Dazu mischt man zu gleiche Teilen Bakteriensuspension mit einer Lösung aus Medium und 15% Glycerin. Das Glycerin macht die Membran der Zellen durchlässiger, was bei einer Stammhaltung bei –80°C erwünschenswert ist, da sie Zellen aufgrund sich bildender Eiskristalle sonst platzen würden.

### 7. Kultur-Medien

Zur Kultivierung von *E. coli* OP50 und HT115(DE3) wurde jeweils Luria broth-Medium verwendet, wobei bei HT115(DE3) Antibiotika wie Tetracyclin (12,5 µg/mL) und bei Transformanten außerdem Ampicillin (100 µg/mL) hinzugegeben wurde (siehe Anhang7). Nach Mischen der Inhaltsstoffe mit demineralisiertem Wasser wurde das Medium bei 121°C autoklaviert.

*C. elegans* wurde auf NGM (nematode growth medium) –Agar kultiviert (siehe Anhang1). Nach Mischen der Inhaltsstoffe wurden die Flaschen autoklaviert. Bevor man den Agar verwenden konnte, mußte er zunächst in der Mikrowelle erhitzt werden. Wichtig ist hier, dass der Deckel vorher leicht geöffnet wird, da der beim Erhitzen entstehende Überdruck die Flasche explodieren lassen würde. Nachdem sich der gesamte Agar verflüssigt hatte, wurde das Gefäß unter fließendem Wasser auf Handwärme herabgekühlt. Nun konnten die Platten unter der Sterilbank

gegossen werden. Dazu eignen sich sterile 12 mL Pipetten und ein elektrischer Sauger. Nachdem Zusatzreagenzien hinzugegeben wurden, wurden pro well 6 mL flüssiger Agar in die Mikrotiterplatten gegossen. Die Platten wurden über Nacht zum Antrocknen stehen gelassen und konnten anschließend gekühlt aufbewahrt werden. Manche Reagenzien können erst nach dem Autoklavieren des Agars hinzugegeben werden, da sie sonst ausfallen würden. Sie müssen daher sterilfiltriert nach dem Aufschmelzen beigemischt werden. Bei den RNAi-Versuchsplatten mußte zudem IPTG und FUDR zugefügt werden. IPTG (Isopropyl-thio-  $\beta$ -D-galactosid) wird zur Induktion der Transkription (siehe T7-Expressionssystem) benötigt, FUDR (5-Flouro-2'-Desoxyuridin) ist ein Inhibitor der DNA-Replikation, der verhindert, dass sich die Nachkommen der synchronisierten *C. elegans* entwickeln können (siehe Anhang8).

## 8. Haltung von *C. elegans*

Für meine Versuche wurde der *C. elegans* Wildtypstamm Variation Bristol (N2) verwendet. Dieser konnte 1946 erstmals in Großbritannien isoliert werden (Briggs et al., 1946), ein Stamm der sich weltweit als Testorganismus durchgesetzt hat.

Die *C. elegans* wurden auf 6 well-Mikrotiterplatten auf NGM-Agar (nematode growth medium) gehalten, als Futterquelle dienten *Escherichia coli* OP50, eine Uracil-Mangelmutante. Dieser Stamm ist vorteilhaft, da sein Wachstum begrenzt ist und dadurch eine einfachere Beobachtung der Nematoden ermöglicht. Zum Vorbereiten der Platten wurden 250  $\mu$ l einer OP50-Übernachtkultur in die Mitte des eines jeweiligen wells pipettiert. Die Platten wurden bei leicht geöffnetem Deckel unter der Sterilbank getrocknet, damit die überschüssige Flüssigkeit verdunsten konnte. Anschließend wurden die Platten über Nacht bei 37°C inkubiert. Solche Platten waren etwa 2 – 3 Wochen haltbar.

Zur Überführung wurden die Würmer der alten Platten mit 1 mL autoklaviertem M9-Puffer (siehe Anhang2) von den wells gespült und in Falcon-Tubes gesammelt. 200 – 300  $\mu$ L dieser Wurm-Suspension wurden auf die neuen Platten gebracht. Bei einer kleinen Wurmpopulation wurde die Suspension 5 min bei 1300rpm abzentrifugiert und das Pellet resuspendiert auf den Agar gegeben. Die Stammhaltung erfolgte abgedunkelt bei 15°C und die Platten wurden regelmäßig auf ihren Besiedlungsstand kontrolliert. Die Übertragungsrate lag bei einem Mal pro Woche. Falls größere

Mengen an Würmern benötigt wurden, erfolgte die Haltung bei schnellerem Wachstum bei einer Inkubationstemperatur von 25°C.

## 9. Synchronisation von *C. elegans*

Aufgrund meines Versuchsaufbaus, der zur Beobachtung der Lebensspanne des Wurmes dient, ist es notwendig, dass die Würmer vor jedem Versuch synchronisiert werden, also alle Würmer das gleiche Alter haben. Dazu wurden die Würmer zunächst von dicht besiedelten Platten gewaschen und in Tubes zu einem Gesamtvolumen von je 3,5 mL gesammelt. Zur Synchronisation macht man sich die starke Chemikalien-Toleranz der Eierschale der Nematoden zu nutze.

Als Reagenz nimmt man hierfür eine Lösung aus 5 prozentiger Natriumhypochlorit-Lösung (pro well Nematoden: 0,5 mL) und 5 molarer Natriumhydroxid-Lösung. Unbedingt zu beachten ist hier das Tragen von Laborkittel, Handschuhen und Schutzbrille, da der Umgang mit solch ätzenden Chemikalien schwere Verletzungen hervorrufen kann.

Die Lösung darf erst direkt vor dem Versuch gemischt werden. Jetzt werden je 1,5 mL in die Tubes mit der Wurm-Suspension pipettiert. Anschließend werden die Tubes für ein paar Sekunden mit Hilfe eines Vortex geschüttelt, alle 2 Minuten zu einer Gesamtzeit von etwa 10 Minuten. Hierbei werden sämtliche Würmer und Bakterien restlos aufgelöst, nur die Eier bleiben erhalten. Die Inkubationszeit von 10 Minuten darf nicht überschritten werden, da sonst auch die Eier angegriffen werden. Nun werden die Tubes 30 Sekunden bei 1300 g zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Ei-Pellet in einem Gesamtvolumen von 5 mL resuspendiert. Dieser Wasch-Vorgang wird zwei Mal wiederholt. Anschließend wird das Pellet in etwa 300 µL resuspendiert auf mit *E. coli* OP50 besiedelten Platten überführt. Es folgt eine Inkubationszeit von ca. 48 Stunden bei 25°C, bei der die Nematoden aus den Eiern schlüpfen und sich zu späten L4-Larven entwickeln. Anschließend werden die Larven auf die RNAi-Versuchsplatten überführt.

## 10. Steriles Arbeiten

Unerlässlich bei allen Methoden und Versuchen war genaues und steriles Arbeiten. Die Grundlage dafür waren autoklavierte bzw. sterilfiltrierte Lösungen.

### 10.1 Sterilfiltrieren

Beim Sterilfiltrieren wird die zu sterilisierende Lösung in ein Becherglas gegeben. Anschließend wurde sie in einer Spritze gesammelt. Ein steriler Membranfilter wurde auf die Spritze geschraubt und die Lösung schließlich durch diesen Filter in ein autoklaviertes Gefäß gespritzt. Wichtig hierbei ist, darauf zu achten, den Filter nie direkt zu berühren und den Spritzdruck so zu dosieren, dass die Lösung zwar mit moderater Geschwindigkeit aus der Spritze kommt, die Membran aber nicht durch zu festes Drücken zerstört wird.

### 10.2 Autoklavieren

Autoklavieren ist eines der wichtigsten Verfahren zur Keimabtötung. Im mikro- und molekularbiologischen Bereich wird es als Standardmethode angewandt, um sämtliche Sorten von lebensfähigen Keimen und deren Dauerstadien abzutöten. Zum Autoklavieren werden die Gefäße bzw. die Lösungen und Agaransätze in den Autoklav gestellt. Zu beachten ist, den Deckel eines jeden Gefäßes mit einer  $\frac{3}{4}$ -Drehung leicht zu öffnen, sowie Autoklavierband anzubringen. Dieses Band enthält einen Farbstoff, der sich bei großer Hitze schwarz färbt. Das ist ein Indikator, um später zu bestätigen, dass der Autoklaviervorgang erfolgt ist.

Anschließend wird das Thermostat-Kabel in ein Gefäß mit Testflüssigkeit (H<sub>2</sub>O) getaucht, einem Hilfsmittel des Autoklavs. Nun wurde das Gerät geschlossen und programmiert. Die enthaltenen Gefäße und Flüssigkeiten wurden 20 min bei 121°C und 1 bar Überdruck sterilisiert. Nach dem Autoklavieren wurden die Gefäße vorsichtig entnommen und luftdicht verschlossen.

### 10.3 Arbeiten mit steriler Sicherheitswerkbank

Ein wichtiger Bestandteil meiner Labortechniken war das Arbeiten unter einer sterilen Werkbank. Eine solche Sterilbank ist ein abgeschlossener Raum, der es erlaubt unter hohen sterilen Bedingungen zu arbeiten. Ein Luftstrom und ein Filter sorgen dafür, dass die Luft in der Bank keimfrei ist.

Nach Hochfahren der Plexiglasscheibe und Einschalten der Sterilbank müssen etwa 20 min abgewartet werden, bis die Nutzung erfolgen kann, um sicher zu sein, dass die Luft im Inneren vollständig gereinigt ist. Die Arbeitsfläche wurde mit 70%igem Ethanol desinfiziert. Während des Arbeitens unter der Sterilbank dürfen nur sterile Gefäße, Tubes, Pipetten und Pipettenspitzen verwendet werden. Die Gerätschaften dürfen nicht berührt werden, es ist ebenfalls darauf zu achten, nicht über geöffnete Gefäße zu kommen. Generell wurden Gefäße nur in unmittelbarer Brennernähe geöffnet und Deckel bzw. Öffnung kurz abgeflammt.

Eine unabdingbare Grundlage für steriles Arbeiten war natürlich hygienische Händedesinfektion bzw. das Tragen steriler Handschuhe.

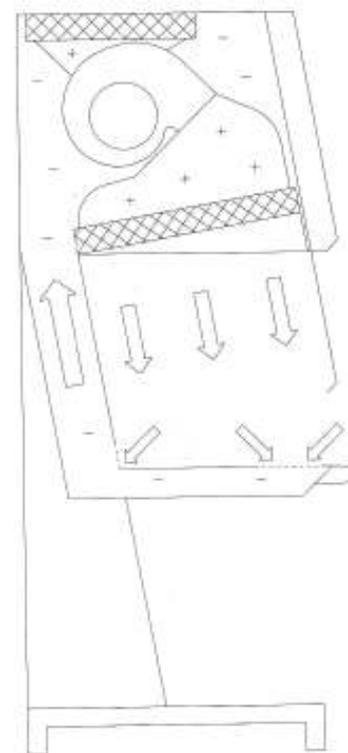


Abb. 8: Luftstromdiagramm einer Sterilbank

## 11. Zentrifugation

Ein wichtiges Mittel zum trennen von Suspensionen aus Organismen stellt die Zentrifuge dar. Um eine Trennung einer Suspension, also die Pelletierung der Organismen zu erreichen, müssen hohe G-Kräfte auf sie einwirken.

Man erzeugt ein künstliches Schwerfeld, in dem die Bestandteile der Suspension aufgrund ihrer unterschiedlichen aus Größe, Dichte und Form resultierende Sedimentationsgeschwindigkeit getrennt werden. Sie werden mittels der Zentripetalkraft auf ein Vielfaches der Gewichtskraft ihrer Eigenmasse beschleunigt. Das führt dazu, dass der Inhalt eine Suspension gemäß der Dichte seine Bestandteile aufgeteilt wird. Das wird durch schnelle Rotation innerhalb der Zentrifuge erreicht. Der Betrag der G-Kräfte ist abhängig von der Umdrehungszahl pro Minute (rotations per minute (rpm)) und dem Durchmesser des Rotors. Bei vielen Versuchen ist es vorteilhaft, unter einer bestimmten Temperatur zu zentrifugieren.

Dazu muss die Zentrifuge dementsprechend eingestellt und dem Rotationsraum eine Zeit zum Vorkühlen gewährt werden. Wichtig beim Arbeiten mit Zentrifugen ist, dass die benutzten Tubes stets mit dem gleichen Volumen gefüllt sind und symmetrisch in die Zentrifuge eingelegt werden, so daß der Rotor ausbalanciert ist, da es sonst bei hohen Drehzahlen zu Unfällen kommen kann.

## 12. Transformation von *Escherichia coli*

Um Bakterien wie oben erwähnt, dazu zu bringen, dsRNA für den Knockout zu produzieren, müssen sie das Plasmid enthalten und auf seiner Grundlage das gewünschte Produkt zu synthetisieren. Da Bakterien natürlicherweise mit einer solchen genetischen Ausstattung nicht vorkommen und die Plasmide nicht bereitwillig aufnehmen, muss an dieser Stelle eine Transformation stattfinden. Bakterien nehmen außer mittels Konjugation untereinander keine Fremd-DNA in sich auf. Um sie allerdings doch dazu zu bringen, gibt es verschiedene Methoden. Neben der Elektroporation beispielsweise, welche durch ein induziertes Spannungsfeld die Bakterienwand und –membran dazu bringt, Äußeres aufzunehmen, habe ich eine chemische Transformationsmethode gewählt, das Verfahren mit Calciumchlorid ( $\text{CaCl}_2$ ) und Hitzeschock.

Der Versuch läßt sich prinzipiell in zwei Arbeitsschritte unterteilen: Zum einen, der Vorgang, bei dem die Zellen kompetent gemacht werden, sprich, dass sich die Permeabilität von Zellwand und –membran dahingegen verändert, dass die Zellen bereit sind, aufzunehmen und andererseits das Aufnehmen der DNA an sich. Für den Versuch wird zunächst eine *E. coli*-Kultur in der logarithmischen Phase ( $\text{OD}_{600\text{nm}} \sim 0,3-0,5$ ) benötigt. Dazu muss berechnet werden, wann die Kultur diesen Wert der optischen Dichte erreicht hat. Es wird ein günstiger Zeitpunkt festgelegt, bei dem die Transformation stattfinden kann. Von diesem Zeitpunkt gilt es zurückzurechnen, um auf die entsprechenden Parameter zu kommen, also wann die Kultur mit wie viel  $\mu\text{l}$  angesetzt werden muss, um dann den Zeitpunkt zu erreichen, an dem die *E. coli*-Kultur mit einer Verdopplungszeit von ca. 20 min diesen Wert der optischen Dichte erreicht hat. Die Effizienz der Transformation ist bei Zellen der logarithmischen Phase um ein Wesentliches höher. Nach dem Ansetzen der Kultur wird in regelmäßigen Zeitabständen die optische Dichte überprüft.

Nach dem Erreichen von OD ~ 0,3-0,5 werden 100mL der Kultur auf vorgekühlte Zentrifugenröhrchen verteilt und 20 min. auf Eis inkubiert. Anschließend werden die Tubes 10 min. bei 4°C und 5000 rpm zentrifugiert. Die pelletierten Zellen werden in je 50mL 100mM CaCl<sub>2</sub>-Lösung (1/2 Kulturvolumen) resuspendiert und erneut zentrifugiert. Das Pellet wird in einer eiskalten Lösung bestehend aus 100mM CaCl<sub>2</sub> und 15 % Glycerin (1/100 Kulturvolumen) resuspendiert und 20 min, auf Eis inkubiert. Diese Suspension wird anschließend in Eppendorftubes aliquotiert (je 100µL). An dieser Stelle kann man einen Teil der Aliquots bei -80°C einfrieren, um bei Bedarf sofort kompetente Zellen zu haben.

Zur Transformation der kompetenten Zellen werden 100 µg Plasmid-DNA auf 50 µL Zellsuspension pipettiert, wobei ein Ansatz nur mit Wasser, der als Negativ-Kontrolle dient. Nach einer 30-minütigen Inkubation auf Eis folgt der Hitzeschock durch Inkubation von 2 min. bei 42°C. Hierbei bekommen die Zellen an ihrer Außenhülle Löcher, durch die die Plasmide in die Zellen gelangen können. Nach diesem Schritt werden den Ansätzen je 1mL LB-Medium hinzugegeben und bei 30-60 min. bei 37°C inkubiert. Nach dieser Inkubationszeit werden je 100 µL eines Ansatzes auf Agar-Platten ausgestrichen (1:1 + Verdünnungen 1:10, 1:100, 1:1000). Es wurden jeweils transformierte, als auch Bakterien der Negativkontrolle auf Platten LB/amp und LB ausgestrichen. Der Selektionsmarker auf dem Plasmid, die Ampicillinresistenz zeigt, ob die Transformation gelungen ist, also das Plasmid in den Zellen integriert ist. Nach Inkubation bei 37°C über Nacht kann von einer Kolonie transformierter Zellen eine Kultur angesetzt werden.

### 13. Plasmid-Präparation

Zur Isolierung des Plasmids und damit zur Gewinnung großer Mengen von Plasmid-DNA aus den transformierten Zellen, wird die Plasmid-Präparation verwendet. Für meinen Ansatz das QIAprep Kit der Firma QIAGEN, durch welches sich Plasmid-DNA mittels Affinitätschromatographie isolieren lässt.

Dazu werden zunächst 1,5 mL einer transformierten E. coli-Übernackkultur durch 1-minütige Zentrifugation bei 13.000 rpm pelletiert. Das Pellet wird in 250 µL Puffer 1 resuspendiert, einer Lösung, die unter anderem RNase enthält. Anschließend werden mittels 250 µL des Puffers 2 die Zellen aufgebrochen. SDS erzeugt Löcher in der Zellmembran, durch welche Plasmide, RNA-Moleküle und Proteine freigesetzt werden. Das Bakterienchromosom ist allerdings zu groß und kann daher nicht die Membran passieren. Die im Puffer enthaltene Natronlauge denaturiert sämtliche DNA, RNA und Proteine. Nach Inkubation von 5 min. bei 20°C werden die Plasmide durch Zugabe von Kaliumacetat (350 µL Puffer N 3) renaturiert. Der Puffer schafft Bedingungen, bei welchen chromosomale DNA und Proteine denaturieren, was zu einer Trübung der Lösung führt. Anschließend werden die Tubes bei 13.000 rpm für 10 min. zentrifugiert. Im Überstand finden sich nun die Plasmide, denaturierte DNA und Proteine, sowie Zelltrümmer sind sedimentiert. Jetzt gilt es, die Plasmide an die Silikat-Matrix der Säule zu binden. Dazu wird der Überstand in die Säule pipettiert und bei 13.000 rpm 1 min. zentrifugiert. Somit werden erste Proteine und Puffersalze entfernt, welche im Durchlauf verworfen werden. Anschließend wird die Säule gewaschen, um restliche Verunreinigungen wie Puffersalzen, Proteinen und Nucleasen zu entfernen. Dazu werden die Puffer F1 (500µL) und F2 (750µL) und F3 nacheinander dazugegeben, wobei nach jedem Puffer zentrifugiert wird. Nach einem letzten Zentrifugieren, um den restlichen Waschpuffer zu entfernen, werden 50 µL Elutionspuffer beigegeben, der die Plasmide von der Säule ablöst und nach Zentrifugation als Durchlauf sämtliche DNA enthält. Jetzt kann die Konzentration mittels eines Photometers bestimmt werden bzw. die Plasmid-DNA mittels Gelelektrophorese nachgewiesen werden.

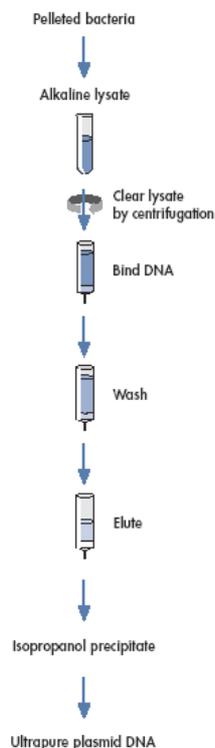


Abb. 9: Schema einer Plasmid-Präparation mittels Affinitätschromatographie

## 14. Auswertung der Versuche und Diskussion

Insgesamt habe ich zwei RNAi-Ansätze durchgeführt.

Bei dem ersten Experiment habe ich viele wichtige Erfahrungen gesammelt und leider viele Fehler übernommen, die fälschlicherweise in den gängigen Protokollen so enthalten waren. Viele Parameter gingen dort entweder völlig auseinander oder waren falsch notiert, so dass ich erst durch zusätzliche Versuchen die richtigen Angaben herausfinden mußte. Beispielsweise darf die NaOCl-Lösung bei der Synchronisation der *C. elegans* nur 5%ig sein, da sonst auch sämtliche Eier angegriffen werden. Des weiteren darf die Konzentration von FUDR nicht größer als 0,1 mg/mL betragen.

Beim ersten Ansatz zeigte sich nach etwa 10 Tagen, dass sowohl auf der RNAi-Platte aus auch bei der Negativkontrolle mit dem Wild-Typ sämtliche Würmer bereits gestorben waren. Bei genauerer Untersuchung zeigten sich kornartige Strukturen im Agar, die nach dem Giessen noch nicht vorhanden waren. Bei wells, bei denen der Agar nicht ganz bis an den Rand der Platte reichte, waren mehr Verunreinigungen als auf den anderen, was zu dem Schluß hindeutete, dass auf den gesamten Platten ein Stoff ausgefallen war, da bei diesen wells das höhere Luftvolumen eventuell aus dem Agar hinausdiffundierendes Wasser dem Agar Flüssigkeit entzieht und dadurch die Ausfällung zusätzlich unterstützt. Es war der Stoff FUDR, der ausgefallen war, da eine zu hohe Konzentration seine prinzipiell toxische Wirkung bestätigt, da der gesamte Wurmbestand gestorben war.

Ein Telefonat mit Frau Dr. Sämann aus dem Baumeister-Labor der Universität Freiburg brachte mir die richtige Konzentration. In meinem ersten Ansatz war FUDR 40-fach zu hoch konzentriert. Allerdings bemerkte sie auch, dass das Beisein von FUDR entgegen der allgemein gängigen Beschreibungen nicht zu optimalen Ergebnissen führt. Besser sei das Umsiedeln der einzelnen Tiere. Da für mich als Schüler das aufwendige Unterfangen des Umsiedelns aufgrund zeitlicher Probleme nicht in Frage kam, blieb FUDR die einzige Alternative.

Beim zweiten Ansatz zeigte sich wie beim ersten, dass die komplette Wurmpopulation innerhalb von zwei Wochen auf null zurückgegangen war. Hier war zu sehen, dass sich auf der Oberfläche des Agars Kristalle befanden. Offensichtlich war auch hier ein Stoff zu hoch konzentriert. Es waren wohl auch dieses Mal ein oder mehrere Parameter falsch. Möglich ist auch, dass die Mikrotiterplatten nicht richtig abgedichtet haben, was zur Folge hatte, dass im Inkubator große Teile der

Flüssigkeit hindurchdiffundiert. Parafilm, der das Verdunsten verhindern sollte, dichtet bei diesen Platten zusätzlich nicht vollständig ab. Leider waren meine Möglichkeiten in diesem Projekt aufgrund meines parallelen Schulalltags begrenzt.

## 15. Ergebnisse eines NCBI-BLASTs

Die Resultate eines Protein-BLASTs beim National Center for Biotechnology Information (NCBI) mit Humanproteinsequenzen:

Sequences producing significant alignments:		Score (Bits)	E Value
<a href="#">ref NP_005618.2 </a>	serum/glucocorticoid regulated kinase [Homo sap	414	1e-115
<a href="#">ref NP_037389.4 </a>	serum/glucocorticoid regulated kinase 3 isof...	403	2e-112
<a href="#">ref NP_733794.1 </a>	serum/glucocorticoid regulated kinase 2 isof...	383	2e-106
<a href="#">ref NP_057360.2 </a>	serum/glucocorticoid regulated kinase 2 isof...	383	2e-106
<a href="#">ref NP_733827.2 </a>	serum/glucocorticoid regulated kinase 3 isof...	327	2e-89
<a href="#">ref NP_005456.1 </a>	v-akt murine thymoma viral oncogene homolog ...	315	7e-86
<a href="#">ref NP_859029.1 </a>	v-akt murine thymoma viral oncogene homolog ...	315	7e-86
<a href="#">ref NP_005154.2 </a>	v-akt murine thymoma viral oncogene homolog ...	309	3e-84
<a href="#">ref NP_001617.1 </a>	v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 2 [	304	9e-83
<a href="#">ref NP_002728.1 </a>	protein kinase C, alpha [Homo sapiens]	285	7e-77
<a href="#">ref NP_997401.1 </a>	cAMP-dependent protein kinase catalytic subu...	283	2e-76
<a href="#">ref NP_002721.1 </a>	cAMP-dependent protein kinase catalytic subu...	283	2e-76
<a href="#">ref NP_002723.2 </a>	protein kinase, cAMP-dependent, catalytic, gamm	277	1e-74
<a href="#">ref NP_891993.1 </a>	cAMP-dependent protein kinase catalytic subu...	277	2e-74
<a href="#">ref NP_997700.1 </a>	protein kinase C, beta isoform 1 [Homo sapiens]	277	2e-74
<a href="#">ref NP_002722.1 </a>	cAMP-dependent protein kinase catalytic subu...	277	2e-74
<a href="#">ref NP_002731.4 </a>	protein kinase C, iota [Homo sapiens]	273	2e-73
<a href="#">ref NP_006248.1 </a>	protein kinase C, theta [Homo sapiens]	272	5e-73
<a href="#">ref NP_003152.1 </a>	ribosomal protein S6 kinase, 70kDa, polypept...	271	1e-72
<a href="#">ref NP_003943.2 </a>	ribosomal protein S6 kinase, 70kDa, polypept...	268	7e-72
<a href="#">ref NP_006246.2 </a>	protein kinase C, eta [Homo sapiens]	266	3e-71
<a href="#">ref NP_002729.2 </a>	protein kinase C, beta isoform 2 [Homo sapiens]	265	6e-71
<a href="#">ref NP_001028753.1 </a>	protein kinase C, zeta isoform 2 [Homo sa...	263	2e-70
<a href="#">ref NP_002735.3 </a>	protein kinase C, zeta isoform 1 [Homo sapiens]	263	2e-70
<a href="#">ref NP_005391.1 </a>	protein kinase C, epsilon [Homo sapiens]	263	3e-70
<a href="#">ref NP_006247.1 </a>	protein kinase N2 [Homo sapiens]	259	2e-69
<a href="#">ref NP_005035.1 </a>	protein kinase, X-linked [Homo sapiens]	254	1e-67
<a href="#">ref NP_002730.1 </a>	protein kinase C, gamma [Homo sapiens]	253	2e-67
<a href="#">ref NP_055311.1 </a>	ribosomal protein S6 kinase, 90kDa, polypept...	248	8e-66
<a href="#">ref NP_998725.1 </a>	protein kinase N1 isoform 1 [Homo sapiens]	248	1e-65
<a href="#">ref NP_002732.3 </a>	protein kinase N1 isoform 2 [Homo sapiens]	248	1e-65
<a href="#">ref NP_001006933.1 </a>	ribosomal protein S6 kinase, 90kDa, polyp...	247	2e-65
<a href="#">ref NP_066958.2 </a>	ribosomal protein S6 kinase, 90kDa, polypept...	247	2e-65
<a href="#">ref NP_004577.1 </a>	ribosomal protein S6 kinase, 90kDa, polypept...	244	1e-64
<a href="#">ref NP_001006666.1 </a>	ribosomal protein S6 kinase, 90kDa, polyp...	242	4e-64
<a href="#">ref NP_006245.2 </a>	protein kinase C, delta [Homo sapiens] >ref ...	242	4e-64
<a href="#">ref NP_002944.2 </a>	ribosomal protein S6 kinase, 90kDa, polypept...	242	4e-64
<a href="#">ref NP_037487.2 </a>	protein kinase PKNbeta [Homo sapiens]	239	5e-63
<a href="#">ref NP_872198.1 </a>	ribosomal protein S6 kinase, 90kDa, polypept...	237	1e-62
<a href="#">ref NP_004746.2 </a>	ribosomal protein S6 kinase, 90kDa, polypept...	237	1e-62
<a href="#">ref NP_001006945.1 </a>	ribosomal protein S6 kinase, 90kDa, polyp...	233	3e-61

Abb. 10: Protein-BLAST

## 16. Multiples Alignment mit Human-SGK-1

Das Ergebnis eines multiplen Alignments der Proteinsequenz von SGK-1

[*Caenorhabditis elegans*] mit jener der Serum/glucocorticoid regulierte Kinase [*Homo sapiens*]:

```

Score = 414 bits (1063), Expect = 1e-115
Identities = 202/383 (52%), Positives = 271/383 (70%), Gaps = 18/383 (4%)

Query 79  FYEKRRVWILVISQHLVDNNL--RSEDVRRFFHLESPDDDE-----NNVDLG 123
          F ++RR+ +   Q + +N+  +  +V+   + P + E               ++LG
Sbjct 27  FMKQRRMGLNDFIQKIANNSYACKHPEVQSILKISQPQPELMNANPSPPPSPSQINLG 86

Query 124 PSERKTATANDFDYLTITIGKGSFGRVYQVRHKETKKIYAMKILSKEHIRKKNEVKHVMAE 183
          PS  A +DF +L  IGKGSFG+V  RHK  +  YA+K+L K+ I KK E KH+M+E
Sbjct 87  PSSNPHAKPSDFHFLKVIKGSFGKVVLLARHKAEEVFFYAVKVLQKKAILKKKEEKHIMSE 146

Query 184 RNVLINNFKHPFLVSLHFSFQNKKEKLYFVLDHLNGGELFSLHLQREKHFSESRRFYAAEI 243
          RNVL+ N KHPFLV LHFSFQ  +KLYFVLD++NGGELF HLQRE+ F E R+RFYAAEI
Sbjct 147 RNVLLKNVKHPFLVGLHFSFQTADKLYFVLDYINGGELFYHLQRERCFLEPRARFYAAEI 206

Query 244 ACALGYLHEKNIIYRDLKPENLLDDKGYLVLTDFGLCKEDMQGSKTTSTFCGTPEYLAP 303
          A ALGYLH  NI+YRDLKPEN+LLD +G++VLTD FGLCKE+++ + TTSTFCGTPEYLAP
Sbjct 207 ASALGYLHSLNIVYRDLKPENILDSQGHIVLTDFGLCKENIEHMSTTSTFCGTPEYLAP 266

Query 304 EIILKKPYDKTVDWVWCLGSLVLYEMIFGLPPFFYSKDHNEMYDKIINQPLRLKHNISVPCSE 363
          E++ K+PYD+TVDWVWCLG+VLYEM++GLPPFFYS++ EMYD I+N+PL+LK NI+
Sbjct 267 EVLHKQPYDRTVDWVWCLGAVLYEMLYGLPPFFYSRNTAEMYDNILNKPLQLKPNITNSARH 326

Query 364 LITGLLQKDRSKRLGHRNDFRDIRDHPFFLPVDWDKLLNRELKAPFIPKVKNAMDTSNIS 423
          L+ GLLQKDR+KRLG ++DF +I+ H FF  ++WD L+N+++ PF P V   D  +
Sbjct 327 LLEGLLQKDRTKRLGAKDDFMEIKSHVFFSLINWDDLINKKITPPFMPNVSGPNDLRHFD 386

Query 424 KEFVEIQIDPSSL--APQQLAVT 444
          EF E  + P+S+  +P  + VT
Sbjct 387 PEFTEEPV-PNSIGKSPDSVLVT 408

```

Abb. 11 Multiples Alignment

Das Alignment zeigt eine große Ähnlichkeit zwischen dem Protein von *C. elegans* und dem des Menschen. Das lässt Überlegungen zu, inwiefern der Effekt, der bei den Nematoden bei Fehlen des Proteins zu beobachten ist, auf den Menschen übertragen werden kann. Vermutlich gibt es beim Menschen ähnliche Mechanismen, die die Lebensspanne in ähnlicher Weise kontrollieren, wie es bei *C. elegans* geschieht.

## 17. Literaturverzeichnis

Nobelpreis Medizin 2006:

[http://nobelprize.org/nobel\\_prizes/medicine/laureates/2006/](http://nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2006/)

Maintenance of *C. elegans*

[http://www.wormbook.org/chapters/www\\_strainmaintain/strainmaintain.html](http://www.wormbook.org/chapters/www_strainmaintain/strainmaintain.html)

Kamath et al.: Genome-wide RNAi screening in *Caenorhabditis elegans*

Kamath et al.: Effectiveness of specific RNA-mediated interference through ingested double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*

Baumeister et al: *C. elegans* SGK-1 Is the Critical Component in the Akt/PKB Kinase Complex to Control Stress Response and Life Span

Baumeister et al: experimental procedures:

<http://download.developmentalcell.com/supplementarydata/dcell/6/4/577/DC1/index.htm>

Warum müssen wir altern?

<http://www.pr.uni-freiburg.de/pm/2004/pm.2004-04-13.39>

Abb.1: [http://www.ciml.univ-mrs.fr/EWBANK\\_jonathan/Images/CeDiag.gif](http://www.ciml.univ-mrs.fr/EWBANK_jonathan/Images/CeDiag.gif)

Abb.2: <http://avery.rutgers.edu/WSSP/StudentScholars/project/introduction/lifeCycle.gif>

Abb.3, 4, 5: [http://www.sciencedirect.com/science?\\_ob=ArticleURL&\\_udi=B6WW3-4C4WK09-H&\\_coverDate=04%2F30%2F2004&\\_alid=491276364&\\_rdoc=1&\\_fmt=&\\_orig=search&\\_qd=1&\\_cdi=7119&\\_sort=d&view=c&\\_auct=C000050221&\\_version=1&\\_urlVersion=0&\\_userid=10&md5=053ef7d670f3d87601ce839906a2fa9d](http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6WW3-4C4WK09-H&_coverDate=04%2F30%2F2004&_alid=491276364&_rdoc=1&_fmt=&_orig=search&_qd=1&_cdi=7119&_sort=d&view=c&_auct=C000050221&_version=1&_urlVersion=0&_userid=10&md5=053ef7d670f3d87601ce839906a2fa9d)

Abb.6: [http://nobelprize.org/nobel\\_prizes/medicine/laureates/2006/adv.html](http://nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2006/adv.html)

Abb.7: <http://www.addgene.org/pgvec1?f=c&plasmidid=1654&cmd=genmap&mtime=1159931367&format=html&dim=800>

Abb.8: Betriebsanleitung HOLTEN LaminAir

Abb.9: QIAGEN Plasmid Purification Handbook

Abb. 10, 11: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>