

Entwicklung einer ELISA- Hochdurchsatzmethode für RNA-Interferenz-Experimente am Modellorganismus *Caenorhabditis elegans*

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Heise, Vincent
aus Berlin

Gießen 2010

Aus dem Biochemischen Institut des Fachbereiches Medizin der
Justus Liebig Universität Gießen

Gutachter: PD Dr. Günter Lochnit

Gutachter: Prof. Dr. Renz

Tag der Disputation: 11.05.2011

Erklärung

„Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	7
Tabellen.....	8
Abkürzungen	9
1 Einleitung.....	11
1.1 <i>Caenorhabditis elegans</i> als Modellorganismus.....	11
1.1.1 Morphologie, Entwicklung und Lebenszyklus von <i>C. elegans</i>	11
1.1.2 Das Genom von <i>C. elegans</i>	13
1.2 Die Rolle von Phosphorylcholin bei Nematodeninfektionen	14
1.2.1 Biosynthese des Phosphorylcholins	14
1.2.2 Phosphorylcholin als Proteinmodifikation	16
1.2.3 Phosphorylcholin als Immunmodulator	19
1.3 RNA-Interferenz	25
1.3.1 Funktionsweise der RNA-Interferenz	25
1.3.2 RNA-Interferenz bei <i>C. elegans</i>	26
1.4 Ziel der Arbeit: Entwicklung einer Methode zum Hochdurchsatzscreening von RNAi-Modifikationen.....	28
2 Material und Methoden.....	30
2.1 Geräte.....	30
2.2 Chemikalien.....	30
2.3 Methoden.....	31
2.3.1 Kultivierung von <i>C. elegans</i>	31
2.3.1.1 Kultivierung mit <i>Escherichia coli</i> (<i>E. coli</i>) auf Agarplatten.....	31
2.3.1.2 Kultivierung mit <i>E. coli</i> in Flüssigkultur.....	32
2.3.2 Aufreinigung von <i>C. elegans</i>	33
2.3.3 Synchronisierung der einzelnen Stadien von <i>C. elegans</i>	33
2.3.4 Gewinnung von Eiern aus <i>C. elegans</i>	34

2.3.4.1	Unterschichtungsmethode	34
2.3.4.2	Überschichtungsmethode	34
2.3.5	Lyse der Würmer	35
2.3.6	Proteinbestimmung.....	35
2.3.7	Dot-Blot	36
2.3.8	Enzym Linked Immunosorbent Assay (ELISA)	38
2.3.8.1	Durchführung des ELISA mit dem Microlab Star ^{let} , Pipettierroboter.....	39
2.3.8.2	Manuelle Durchführung des ELISA	42
3	Ergebnisse	44
3.1	Dot-Blot	44
3.2	Vergleich von Tubulin- und Ubiquitin-Antikörpern.....	44
3.3	Blockierlösungen	45
3.4	Bindungspuffer	46
3.5	Optimierung der PC-BSA-Standardverdünnungsreihe	50
3.6	Gewinnung von <i>C. elegans</i> -Eiern für die Synchronisation	51
3.7	Vergleich – ELISA manuell und per Microlab Star ^{let} -Pipettierroboter.....	51
3.8	Test eines alternativen Ubiquitinantikörpers.....	57
3.9	Vergleich - Liquid-Feeding und Zucht auf Agar	58
3.10	Anwendung der Methode auf ausgewählte RNAi-modifizierte <i>C. elegans</i>	59
3.11	Zusammenfassung der Ergebnisse	61
4	Diskussion.....	63
4.1	Nutzung des Screenings zur Identifikation von Enzymen des PC-Stoffwechsels.....	63
4.2	Vor- und Nachteile des Hochdurchsatzscreenings.....	64
4.2.1	Kultivierung und Aufreinigung von <i>C. elegans</i>	64
4.2.2	Notwendigkeit der Synchronisierung der Larvenstadien für RNAi	65
4.2.3	Vor- und Nachteile der Durchführung per Pipettierroboter.....	65
4.2.4	Bindungspuffer	66

4.2.5	Blockierlösungen	66
4.2.6	Wahl der Antikörper	67
4.2.7	Inkubationszeiten	67
4.3	Ausblick	68
5	Zusammenfassung	69
5.1	Zusammenfassung	69
5.2	Abstract	69
6	Literatur	71

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1 (A) Fotografie eines adulten Hermaphroditen (B) Schematische Darstellung anatomischer Strukturen (modifiziert nach WormAtlas).....	12
Abb. 1.2 Darstellung des Entwicklungszyklus von <i>C. elegans</i> (modifiziert nach WormAtlas)	13
Abb. 1.3 Strukturformel des Phosphorylcholins	14
Abb. 1.4 Kennedy-, Bremer-Greenberg-, Serindecaboxylations-Phosphoethanolamin-Methylisations- und PE-Methyltransferase-Stoffwechselwege.....	16
Abb. 1.5 Verminderung der Zahl der Nachkommen durch RNAi-Knockdown von Cholinerasen in <i>C. elegans</i> im Vergleich zur Negativkontrolle	20
Abb. 1.6 Modulation auf zellulärer Ebene durch PC-Antigene	21
Abb. 1.7 Modulation der B-Zell-Signalwege durch das PC-substituierte ES-62	22
Abb. 1.8 Hemmung der T-Zell-Antwort durch parasitäre Antigene.....	23
Abb. 1.9 Störung des TLR4 Signalweges in Makrophagen durch ES-62	24
Abb. 1.10 Inhibierung der Mastzelldegranulation durch PC-Antigene	25
Abb. 1.11 Schematische Darstellung des RNAi-Mechanismus.....	27
Abb. 2.1 Schema des Versuchsaufbaus im Microlab Star ^{let} -Pipettierroboter.....	39
Abb. 2.2 Allgemeine Plattenbelegung der 96er ELISA-Platten.....	41
Abb. 2.3 Plattenbelegung der 384er ELISA-Platten (Teilansicht 1).....	41
Abb. 2.4 Plattenbelegung der 384er ELISA-Platten (Teilansicht 2).....	42
Abb. 3.1 Dot-Blot von <i>C. elegans</i> unter Verwendung des Ubiquitin- und PC-Antikörpers	44
Abb. 3.2 Vergleich des Ubiquitin- und des Tubulinantikörpers.	45
Abb. 3.3 Extinktionswerte unterschiedlicher Blockierlösungen	46
Abb. 3.4 Pipettierschema einer 96er ELISA-Platte für den Bindungspuffertest	48
Abb. 3.5 Extinktionswerte der Ubiquitin-Verdünnungsreihen.	49
Abb. 3.6 Extinktionswerte der PC-BSA-Verdünnungsreihen.....	50
Abb. 3.7 Logarithmierte Darstellung der optimierten PC-Standardkurve	50
Abb. 3.8 Plattenbelegung des Hand-/Roboter-Vergleichs	53
Abb. 3.9 Roboterbelegungsplan.....	54

Tabellen

Abb. 3.10 Boxplot der Leerwerte des automatisch durchgeführten ELISA	55
Abb. 3.11 Boxplot der Extinktionswerte des automatisch durchgeführten ELISA für Ubiquitin	55
Abb. 3.12 Boxplot der Extinktionswerte der automatisch durchgeführten ELISA für PC-BSA.....	56
Abb. 3.13 Boxplot der Extinktionswerte der manuell durchgeführten ELISA für Ubiquitin	57
Abb. 3.14 Boxplot der Extinktionswerte der manuell durchgeführten ELISA für PC-BSA.....	57
Abb. 3.15 Boxplot der Extinktionswerte des alternativen Antikörpers für Ubiquitin.....	58
Abb. 3.16 Boxplot der PC-Extinktionswerte des Flüssigkultur- / Agarplattenvergelechs	59
Abb. 3.17 Sortierte Darstellung der Verhältnisse von PC- zu Ubiquitin-Äquivalent	60

Tabellen

Tabelle 2-1 Pipettierschema der einzelnen Standards.....	38
Tabelle 3-1 Zuordnung von Genen und ihren Proteinprodukten für die 10 niedrigsten und die 10 höchsten PC- zu Ubiquitin-Aquivalent-Verhältnisse.....	61

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
<i>A. viteae</i>	<i>Acanthocheilonema viteae</i>
ADP	Adenosindiphosphat
AHC	Adenosyl-Homocystein
ATP	Adenosintriphosphat
ASP	Aspartyl-Protease
bp	Basenpaare
bzgl.	bezüglich
<i>C. briggsae</i>	<i>Caenorhabditis briggsae</i>
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
CDP	Cytidindiphosphat
CMP	Cytidinmonophosphat
CTP	Cytidintriphosphat
DAG	Diacylglycerol
DB	Dot-Blot
dsRNA	<i>double-stranded</i> RNA (doppelsträngige Ribonukleinsäure)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
evtl.	eventuell
g	Gramm
GSL	Glykosphingolipid
H ₂ O	Wasser
HRP	Horse raddish peroxidase
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
inkl.	inklusive
IPTG	Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranosid
L	Liter
LB	Bakterienmedium
μ	mikro
min	Minute
miRNA	<i>micro</i> Ribonukleinsäure
mL	Milliliter
mMol	Millimol
mRNA	<i>messenger</i> Ribonukleinsäure
n	nano
p	piko
PC	Phosphorylcholin
PE	Phosphoethanolamin
P-MeE	<i>N</i> -Methyl-Phosphoethanolamin
P-Me ₂ E	<i>N,N</i> -Dimethyl-Phosphoethanolamin
PP	Pyrophosphat
Ptd-C	Phosphatidylcholin
Ptd-E	Phosphatidylethanolamin
Ptd-MeE	<i>N</i> -Methyl-Phosphatidylethanolamin
Ptd-Me ₂ E	<i>N,N</i> -Dimethylphosphatidylethanolamin

Abkürzungen

Ptd-S	Phosphatidylserin
SAM	S-Adenosylmethionin
SM	Sphingomyelin
RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i>
rRNA	ribosomale RNA
SB	S-Basal-Medium
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
sRNA	<i>small RNA</i>
Tab.	Tabelle
Th1	T-Helferzelle Typ 1
Th2	T-Helferzelle Typ 2
TLR4	Toll-like Rezeptor 4
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
tRNA	Transport-Ribonukleinsäure
V	Volumen
vgl.	vergleiche
z.B.	zum Beispiel

1 Einleitung

1.1 *Caenorhabditis elegans* als Modellorganismus

1.1.1 Morphologie, Entwicklung und Lebenszyklus von *C. elegans*

Caenorhabditis elegans sind freilebende Fadenwürmer (Nematoden), die im adulten Zustand eine durchschnittliche Länge von 1 mm erreichen. Ihre äußere Schicht bildet eine transparente Kutikula, die die Hypodermis, Basalzone, mediale Zone und die kortikale Zone umfasst. Dabei besteht die Basalzone aus einer amorphen und zwei fibrillären Kollagenschichten, die gegensätzlich spiralig um den Wurm verlaufen. Die mediale Zone ist ein flüssigkeitsgefüllter Raum, der kollagene Querverstrebungen zur kortikalen Zone enthält, die selbst aus Kollagenen und einem, aus Lipiden und Glykoproteinen bestehenden, Überzug gebildet wird. Der Verdauungstrakt von *C. elegans* besteht aus drei Abschnitten: Dem mit einer Kutikula ausgekleideten, ektodermalen Vorderdarm, einem relativ gering differenzierten, endodermalen Mitteldarm, welcher keine eigene Peristaltik besitzt, und dem wiederum aus dem Endoderm hervorgegangenen Enddarm (siehe Abb. 1.1). Insgesamt besteht der Verdauungstrakt aus genau 127 Zellen. Die Atmung der Nematode erfolgt über die Haut. *C. elegans* verfügt über ein einfaches Zentralnervensystem, welches beim adulten Hermaphroditen aus 282 Neuronen des somatischen Systems und aus 20 Neuronen des pharyngealen Systems besteht. Sensilien dienen als Mechano- und Chemorezeptoren des Wurms. [1]

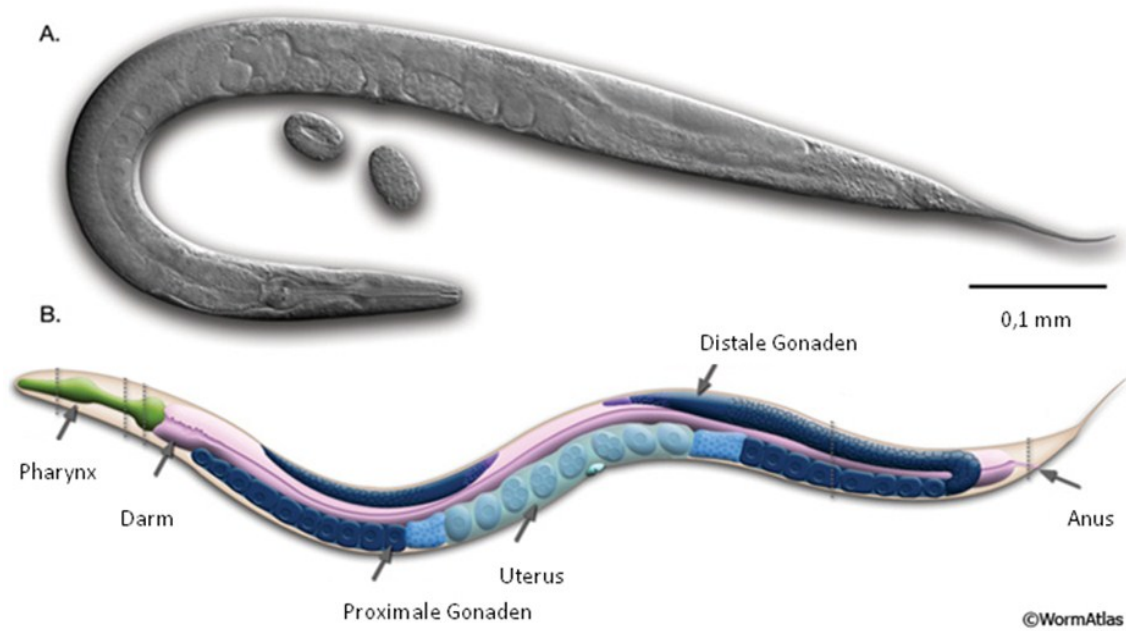


Abb. 1.1 (A) Fotografie eines adulten Hermaphroditen (B) Schematische Darstellung anatomischer Strukturen (modifiziert nach WormAtlas)

Eine Population von *C. elegans* besteht zu 99,7% aus Hermaphroditen, der Rest sind Männchen, die für eine größere Variabilität des Genpools sorgen. Der ausgewachsene Hermaphrodit besteht konstant aus 959 somatischen Zellen – während der Entwicklung besitzt er zwischenzeitlich 1090 Zellen, von denen allerdings genau 131 durch Apoptose verloren gehen [2, 3]. Zwei Gonadenarme münden in einen gemeinsamen Uterus, in den pro Lebenszyklus durchschnittlich 300 selbstbefruchtete Eier münden. Die Entwicklung eines Wurms nimmt etwa 3 Tage in Anspruch, seine Lebenszeit beträgt 14 Tage. Während der Entwicklung werden 4 Larvenstadien (L1, L2, L3 und L4) durchlaufen, die sich untereinander jeweils durch Häutungen abgrenzen. Bis zum Ende der Gastrulation verbleibt ein Embryo im Uterus. Das Schlüpfen erfolgt nach 14 Stunden (L1). Die erste Häutung, und damit der Übergang zur L2-Larve, erfolgt nach 25 Stunden. Im Alter von 32 Stunden erfolgt die zweite und in einem von 40 Stunden die vierte Häutung. Das adulte Stadium wird nach 50 Stunden erreicht. Nahrungsmangel – die Nahrung besteht in der Regel aus *Escherichia coli*-Bakterien – kann dazu führen, dass *C. elegans* nach dem L2-Stadium ein Dauerlarven-Stadium anschließt, welches durch ein Auslassen weiterer Entwicklung Ressourcen spart und bis zu 3 Monate aufrechterhalten werden kann. Ist wieder genügend Nahrung vorhanden, wird das

Dauerlarven-Stadium beendet und die Entwicklung zum adulten Wurm fortgeführt (siehe Abb. 1.2).

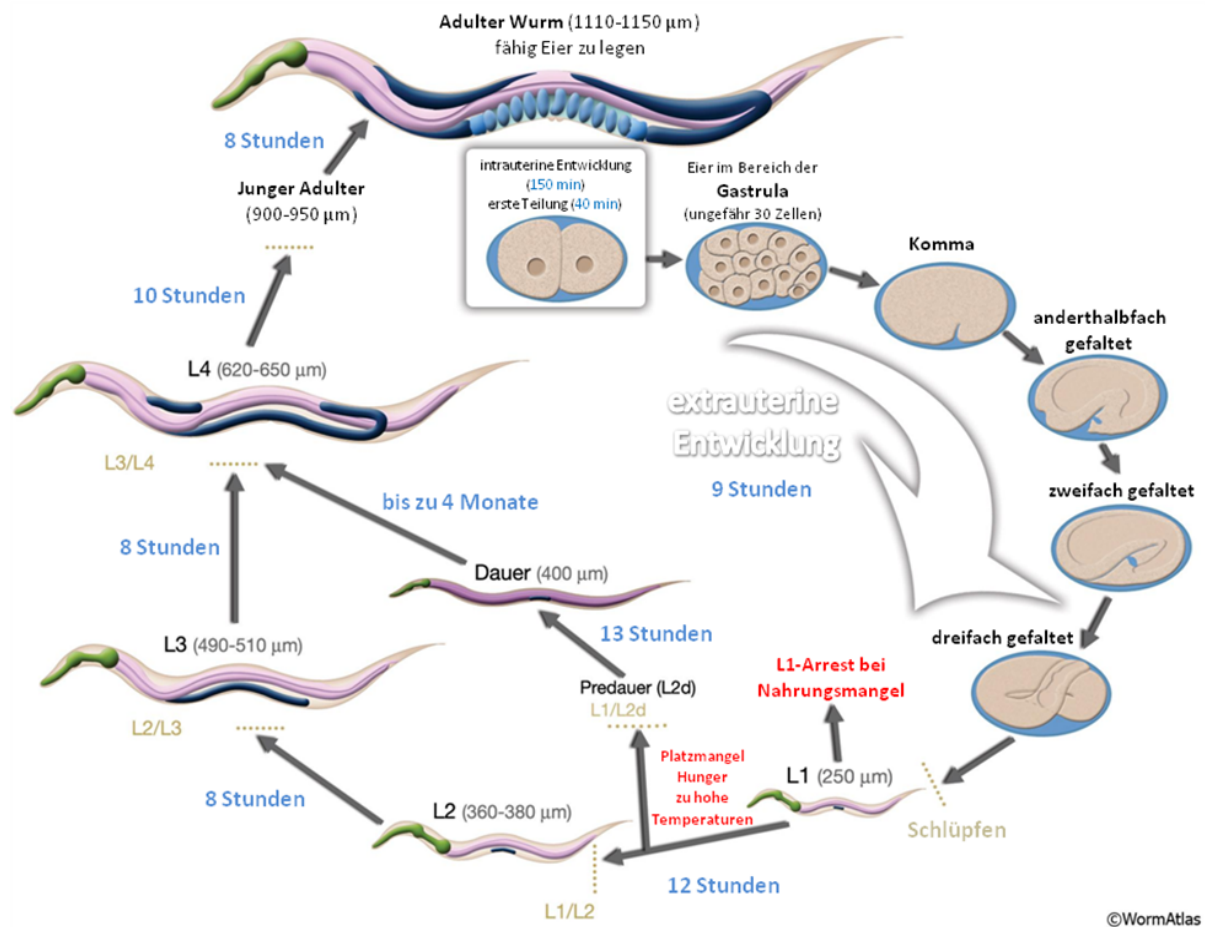


Abb. 1.2 Darstellung des Entwicklungszyklus von *C. elegans* bei 22 °C. 0 Minuten entsprechen der Befruchtung (modifiziert nach WormAtlas)

Die Differenzierung des Geschlechtsapparates beginnt bereits im Primordialstadium während des L1-Stadiums. Im L4-Stadium schließt sich der Beginn der Spermatogenese an. Die Anzahl der Spermien beschränkt die Anzahl der Nachkommen. Diese kann allerdings durch Befruchtung eines Männchens verdreifacht werden [4].

1.1.2 Das Genom von *C. elegans*

C. elegans war der erste Vielzeller, dessen Genom vollständig entschlüsselt wurde. 1998 wurde die gesamte DNA-Sequenz bis auf wenige Ausnahmen publiziert [5]. Derzeit sind insgesamt 24185 proteincodierende Gene inkl. 3954 verschiedener Spleißformen bekannt (<http://www.wormbase.org>, WS207 Release) [6]. Hinzu kommen mehrere tausend nicht

Protein-codierende Gene wie small RNA (sRNA), micro RNA (miRNA), endogene small interfering RNA (siRNA) und 21U-RNA. Letztere wurde 2006 bei einer Sequenzierung der RNA von *C. elegans* identifiziert [7]. Diese RNAs werden zur Steuerung von Spleißvorgängen, als transfer RNA (tRNA), als ribosomale RNA (rRNA) oder auch zur Steuerung der Gen-Expression verwendet.

Im Jahr 2003 wurde zudem die Sequenzierung des Genoms von *Caenorhabditis briggsae* fertig gestellt [8]. Dies erlaubt, durch die nahe Verwandtschaft der Nematoden zu *C. elegans*, eine bessere Vergleichbarkeit der Gen-Funktionalität.

Das Genom von *C. elegans* verteilt sich auf einen diploiden Satz von fünf Autosomen und einem Chromosom X von annähernd gleicher Größe [9]. Weibchen haben (XX), Männchen (X0) als Geschlechtschromosomen-Paar. Etwa 60% der humanen Gene haben ein homologes Gen in *C. elegans* [10].

1.2 Die Rolle von Phosphorylcholin bei Nematodeninfektionen

1.2.1 Biosynthese des Phosphorylcholins

Die Biosynthese von Proteinen mit Phosphorylcholin (PC, siehe Abb. 1.3) als Substituenten wurde mithilfe von *Acanthocheilonema viteae* näher untersucht. Der Transfer von PC innerhalb der Biosynthese erfolgte zwischen der 40. und 60. Minute im medialen Golgi-Apparat. Dieser Vorgang ist abhängig von den Akzeptorstrukturen $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_3$ bzw. $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_3$. Hier konnte speziell die Bindung von PC an ES-62 durch Tunicamycin, als Inhibitor der *N*-Glykosylierung von Proteinen, durch Brefeldin A, als Inhibitor des Transports vom endoplasmatischen Retikulum (ER) zum Golgi-Apparat, oder durch 1-Deoxynorjirimycin, als Inhibitor der Mannosidase I im cis-Golgi, blockiert werden [11]. Swainsonin, als Mannosidase-II-Inhibitor zeigte keinen Blockadeeffekt [12].

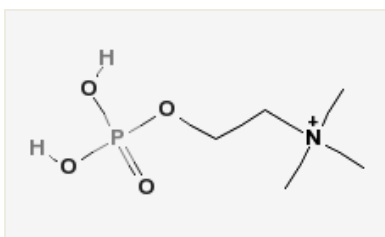


Abb. 1.3 Strukturformel des Phosphorylcholins

Die Biosynthese des Phosphatidylcholins – dem Donator des PC – erfolgt bei Eukaryoten im Wesentlichen auf der cytosolischen Seite des glatten ER über den Kennedy-Stoffwechselweg. In *C. elegans* existieren außerdem noch der Bremer-Greenberg- [13], der Serindecarboxylierungs-Phosphoethanolamin-Methylierungs- und der Phosphoethanolamin (PE)-Methyltransferase-Stoffwechselweg [14]. Beim Kennedy-Stoffwechselweg wird zunächst ein Phosphatrest des Adenosintriphosphat (ATP) durch eine Cholin kinase (E.C.2.7.1.32) auf Cholin übertragen. Das so entstandene PC wird zusammen mit Cytidintriphosphat (CTP) unter Abspaltung von Pyrophosphat durch eine CTP:Phosphorylcholin-Cytidyltransferase (E.C.2.7.7.15) zu Cytidindiphosphat (CDP)-Cholin umgesetzt. Anschließend folgt eine Übertragung des PC durch eine CDP-Cholin:Cholinphosphotransferase (E.C.2.7.8.2.) auf 1,2-Diacylglycerin [15]. Der Bremer-Greenberg-Stoffwechselweg beruht auf einer Umwandlung von Phosphatidylethanolamin zu Phosphatidylcholin durch schrittweise enzymatische Methylierung, wobei S-Adenosylmethionin als Methylgruppendonator verwendet wird. Das Phosphatidylethanolamin kann dabei entweder über die Umsetzung von Ethanolamin über Phosphoethanolamin zu CDP-Ethanolamin und anschließender Abspaltung von Pyrophosphat oder durch Decarboxylierung von Phosphatidylserin synthetisiert werden [13, 16]. Der Serin-Decarboxylierungs-Phosphoethanolamin-Methylierungs-Stoffwechselweg liefert über Decarboxylierung von Serin und Phosphorylierung des so entstandenen Ethanolamins Phosphoethanolamin. Dieses wird beim PE-Methyltransferase-Stoffwechselweg mithilfe von zwei N-Methyltransferasen schrittweise zu PC methyliert. Zunächst wird hierbei durch eine Phosphoethanolamin-N-Methyltransferase eine Methylgruppe des S-Adenosyl-Methionins auf Phosphoethanolamin übertragen und anschließend das Binden zweier weiterer Methylgruppen durch eine weitere Methyltransferase katalysiert [14] (siehe Abb. 1.4).

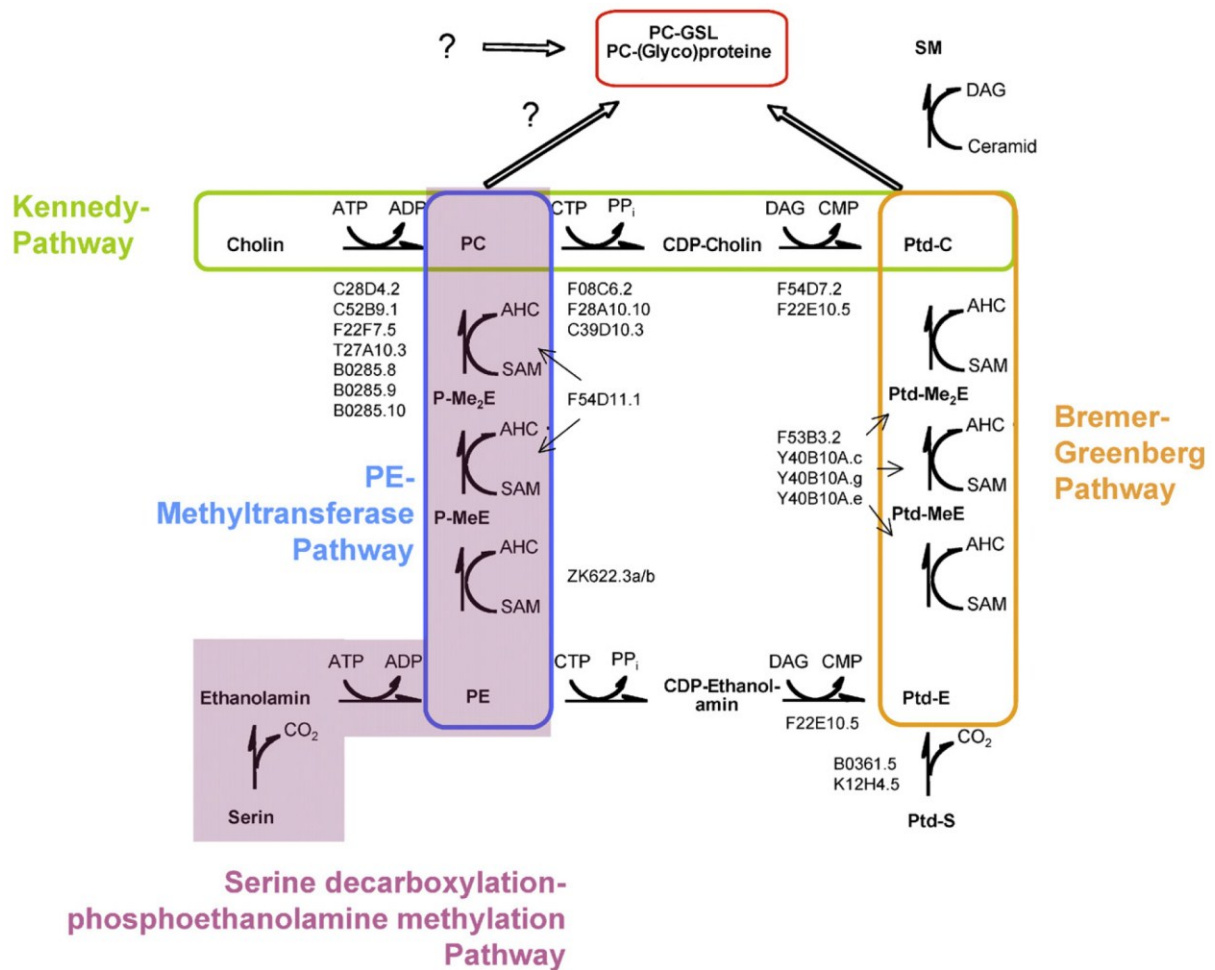


Abb. 1.4 Kennedy-, Bremer-Greenberg-, Serindecarboxylations-Phosphoethanolamin-Methylierungs- und PE-Methyltransferase-Stoffwechselwege

1.2.2 Phosphorylcholin als Proteinmodifikation

Ein wichtiger Bereich der Proteomanalytik ist die Analyse von Proteinmodifikationen. Diese haben für das Protein, neben einer strukturellen, auch für funktionelle Eigenschaften wie die Lokalisation innerhalb einer Zelle oder die Interaktion mit Makromolekülen eine Bedeutung [17]. Je nach Entstehungszeitpunkt lassen sich Proteinmodifikationen in drei Klassen einteilen: Prä-, co- und posttranslationale. Erstere besteht zumeist aus einer Kooperation von Selenocystein oder Pyrrolysin mit Aminosäuren der tRNA. Cotranslational sind Modifikationen, die während der Polypeptidsynthese ribosomal stattfinden [18]. Ein Großteil der Modifikationen findet allerdings erst nach Ausbildung der Sekundärstruktur, d.h. posttranslational, statt [17, 19].

Es existieren drei unterschiedliche Möglichkeiten der posttranslationalen Modifikation von Proteinen, welche die Funktion häufig erst erlauben: 1. Eine proteolytische Spaltung an Teilen der Peptidsequenz, z.B. die Entfernung eines Initiator-Methionin-Restes, 2. das

Anknüpfen einer chemischen Gruppe wie Acetyl-, Phosphoryl- und Glykosylgruppen und 3. das Bilden von Inter- bzw. Intrapeptidbindungen (Thioester- und Disulfidbrückenbindung) [20-22].

Bisher waren sämtliche entdeckten PC-Modifikationen an Glykanstrukturen gebunden. Allerdings legen Studien nahe, dass PC auch als direkter Proteinsubstituent existieren könnte [23, 24]. In vielzelligen Parasiten wurde PC an *N*-Glykanen und Glykosphingolipiden gefunden, in Bakterien auch an Lipopolysacchariden, z.B. *Haemophilus influenzae* [25-28]. Proteinprimärstrukturen, die auf eine Lokalisation von PC-Epitopen hinweisend wären, gibt es wenige. Ein Grund dafür ist die Schwierigkeit, den zwitterionischen Substituenten PC sensitiv nachzuweisen [29, 30].

Bei Glykosphingolipiden wird PC über eine Phosphodiesterbindung an C6 eines *N*-Acetylglucosamin-Restes gebunden. Zudem wurden auch Phosphoethanolamin-Substituenten am C6 der Mannose der Kernstruktur der Glykosphingolipide gefunden [31].

Das am intensivsten erforschte PC tragende Protein ist ES-62 von *A. viteae*, das 1989 von Harnett et al. identifiziert wurde [32]. Homologe Proteine wurden auch in anderen Nematoden gefunden, weshalb es sich sehr gut als Modell zur Erforschung der Biosynthese, Struktur und Funktion von PC-Modifikationen eignet. Durch massenspektrometrische Analysen und Behandlung mit *N*-Glykosidase F wurde gezeigt, dass PC hier an *N*-Glykane gebunden ist [32-34]. Für den PC-Transfer war eine tetramere Struktur des ES62 notwendig [35]. ES-62 wird von Zellen entlang des Oesophagus von *A. viteae* sekretiert [36].

In *C. elegans* war die Aspartyl-Protease (ASP-6) das erste Protein für das eine Modifikation mit PC nachgewiesen wurde [37]. Es wurde per Western-Blot unter Benutzung des PC-spezifischen Antikörpers TEPC-15 detektiert. Gemessen vom Zeitpunkt der Eigewinnung an, die durch eine Behandlung adulter Würmer mit einer Natriumhypochlorit-Lösung erzielt wurde, war das 40 kDa schwere Protein ab 24 Stunden im Kulturmedium von *C. elegans* nachweisbar und seine Menge stieg im weiteren Zeitverlauf an. Ein Knockdown anderer *asp*-Gene (ASP 1-5) im RNAi-Experiment zeigte keine sichtbaren Phänotypen [38]. Lektin-Bindungs-Analysen zeigten *N*-Acetylglucosaminreste aufgrund der Bindung an WGA, wohingegen bei ConA keine Reaktion auftrat, was gegen ein Vorhandensein von diantennären *N*-Glykanen des Mannosyl-Hybridtyps spricht. Eine Behandlung von ASP-6 mit PNGase F bzw. PNGase A beeinflusste weder die Bindung von TEPC-15 noch die Mobilität des Proteins in der Elektrophorese, was eine *N*-Glykan basierte PC-Substitution ausschließt,

wodurch weitere PC-Epitope in *C. elegans* möglich sind. Eine Detektion durch Immunfluoreszenz wies ASP-6 in vielen Geweben des adulten Wurms nach, konnte aber nicht in früheren Larvenstadien identifiziert werden. Die genaue Funktion des Proteins ist noch unbekannt, sie spielt allerdings keine Rolle in der Neurodegeneration wie ASP-3 und ASP-4 [39].

Sowohl Populationen mit gemischten als auch mit synchronisierten Larvenstadien von *C. elegans* wurden umfassend auf das Vorhandensein von PC-modifizierten Proteinen untersucht [37]. Neben einem N2- wurde auch ein *Triple-Knockout* (TKO)-Stamm untersucht, der durch ein Fehlen von Isoenzymen der *N*-Acetylglucosamin-Transferase I keine komplexen *N*-Glykan-Strukturen aufbauen kann. Insgesamt wurden 69 Proteine als PC-substituiert identifiziert. Im N2-Stamm waren 31% der identifizierten Proteine zytosolisch, 30% mitochondrial, 14% nukleär, 4% ER-assoziiert und 4% extrazellulär. Die Mehrheit der PC-substituierten Proteine (24%) ist in den Metabolismus involviert. Hinzu kommen strukturelle Proteine (14%), Proteine die in den Proteinabbau (14%) oder in Signalkaskaden (16%) involviert sind. Proteine des Energiemetabolismus oder der Proteinsynthese präsentierten kleinere Gruppen PC-modifizierter Proteine. Ein Vergleich zum TKO-Stamm zeigte hier große Unterschiede. Zum einen kam es insgesamt zu einer Reduktion PC-positiver Proteine zum anderen waren auch andere Proteine mit PC modifiziert. Das Verteilungsmuster anhand der funktionellen Klassifikation zeigte nur geringe Unterschiede, bezüglich der Lokalisation waren jedoch 43% aller mitochondrialen und 14% der Proteine des ER PC-positiv. Außerdem sind diese Verteilungsmuster entwicklungsabhängig: In Dauer- und L4-Larven waren der Großteil der PC-modifizierten Proteine zytosolisch, in Eiern und adulten Stadien überwiegend mitochondrial lokalisiert. Weiterhin präsentierten metabolische Enzyme die größte Gruppe PC-tragender Proteine in Eiern und adulten im Gegensatz zu anderen Larvenstadien. Das fast ein Drittel der PC-haltigen Proteine zytosolisch lokalisiert sind, wirft die Frage auf, wie die PC-Epitope strukturiert sind, da *N*-Glykosylierung an zytosolischen Proteinen nicht auftritt. *O*-Acetylglucosamin-Reste könnten als ein Akzeptor einer PC-Transferase dienen, welche auch eine Rolle in der Reversibilität der Modifikation während der Entwicklung von *C. elegans* spielen könnte [31].

1.2.3 Phosphorylcholin als Immunmodulator

Während der Evolution haben u.a. parasitäre Nematoden Mechanismen entwickelt, die gezielt das Immunsystem ihrer Wirte modulieren können und so zu Infektionen führen, die bis zu 10 Jahre persistieren [40]. Bei diesen Infektionen kann es auch zu schwerwiegenden Schäden des Wirtsorganismus kommen, z.B. schwere Hautschäden bei *Brugia malayi*, Elephantiasis bei *Wuchereria bancrofti* und Onchozerkose bei *Onchocerca volvulus* [41]. Es konnte gezeigt werden, dass Helmintheninfektionen zwar das Risiko erhöhen an Malaria zu erkranken, aber die Gefahr einer cerebralen Ausprägung reduzieren [42-44], was wahrscheinlich auf Immunmodulation zurückzuführen ist. Außerdem kommt es unter Helmintheninfektionen seltener zu Autoimmunerkrankungen wie Diabetes, Asthma, Allergischer Encephalomyelitis oder Rheumatoider Arthritis [45-47], sodass ihre Erforschung nicht nur das Verständnis parasitärer Erkrankungen verbessern kann. Eine Vielzahl von Pro- und Eukaryoten nutzt darüber hinaus für diese Immunmodulation PC. Es wird nicht nur in Nematoden sondern auch in Protozoen gefunden. Ungefähr ein Drittel der Weltbevölkerung ist mit Nematoden infiziert und das Protozoon *Plasmodium falciparum* ist für mehr als 500 Million Fälle von *Malaria tropica* jährlich verantwortlich.

PC-substituierte Komponenten haben einen Einfluss auf die Signalwege der B- und T-Zellen, auf die Entwicklung der Dendritischen Zellen, von Makrophagen und auf die Mastzelldegranulation [48-51]. Auch eine niedrige Antikörper- und Cytokinkonzentration, sowie eine verminderte Lymphozytenproliferation wurde beobachtet [49, 52-56]. So könnte die Erforschung von PC-Antigenen auch für die Behandlung von Allergien und Autoimmunerkrankungen von klinischer Relevanz sein [57]

Es konnten bereits mehrere Proteine und Glykolipide als PC-Träger identifiziert werden [29, 37, 58, 59], allerdings wurde, trotz intensiver Forschung der letzten Jahre, keine PC-Transferase bei *C. elegans* identifiziert. Es konnten allerdings bereits entsprechende Enzyme in anderen Spezies wie z.B. *Streptococcus pneumoniae* [60] und *Mycoplasma fermentans* [61] identifiziert werden. PC-Modifikationen spielen außerdem für die Entwicklung und Fortpflanzung der Nematoden eine entscheidende Rolle, wie durch RNAi-Experimente, die auf die Glykosphingolipid-Synthese und den Cholin-Metabolismus abzielten, gezeigt wurde (siehe Abb. 1.5). Hierbei kam es zu einer Entwicklungsverzögerung und zu einer starken Reduktion der Nachkommen [16]. Auch ein Gen-Knockdown von PMT-1 und PMT-2

resultierte in einer Sterilität und einer Unfähigkeit der P0-Generation weitere Larvenstadien zu erreichen [62].

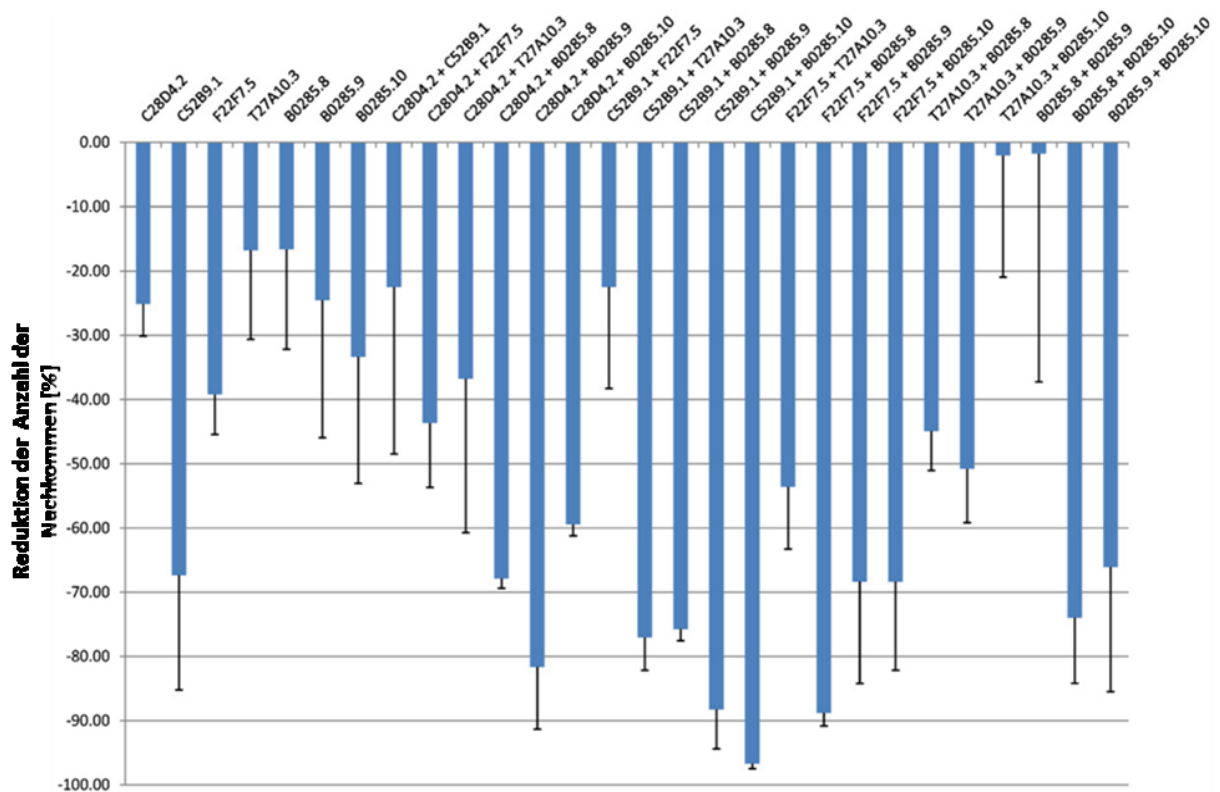


Abb. 1.5 Verminderung der Zahl der Nachkommen durch RNAi-Knockdown von Cholinkinasen in *C. elegans* im Vergleich zur Negativkontrolle in Prozent [16]. Die X-Achse bezeichnet die Sequenznamen der entsprechenden Gene.

Das derzeit am besten untersuchte System für Immunmodulation ist derzeit das exkretorische ES-62 des Modellsystems *A. viteae*. Es induziert die Bildung von anti-inflammatorischen T-Helferzellen Typ 2 (Th2). In hohen Konzentrationen hat es eine geringe mitogene Wirkung auf B-Zellen, in Konzentrationen, die für eine Infektion typisch sind, kommt es allerdings zu Inhibierung der B-Zell-Proliferation [63]. ES-62 führt zu einer vermehrten Aktivität der B-Zellen *in vivo*: In einer Umgebung, die Interleukin-4 (IL) enthielt, kam es zu einer Produktion von Th2-typischen IgG1 (Maus) bzw. IgG4 (Mensch), es wurde jedoch kein Th1-typisches IgG2a produziert [64] (siehe Abb. 1.6).

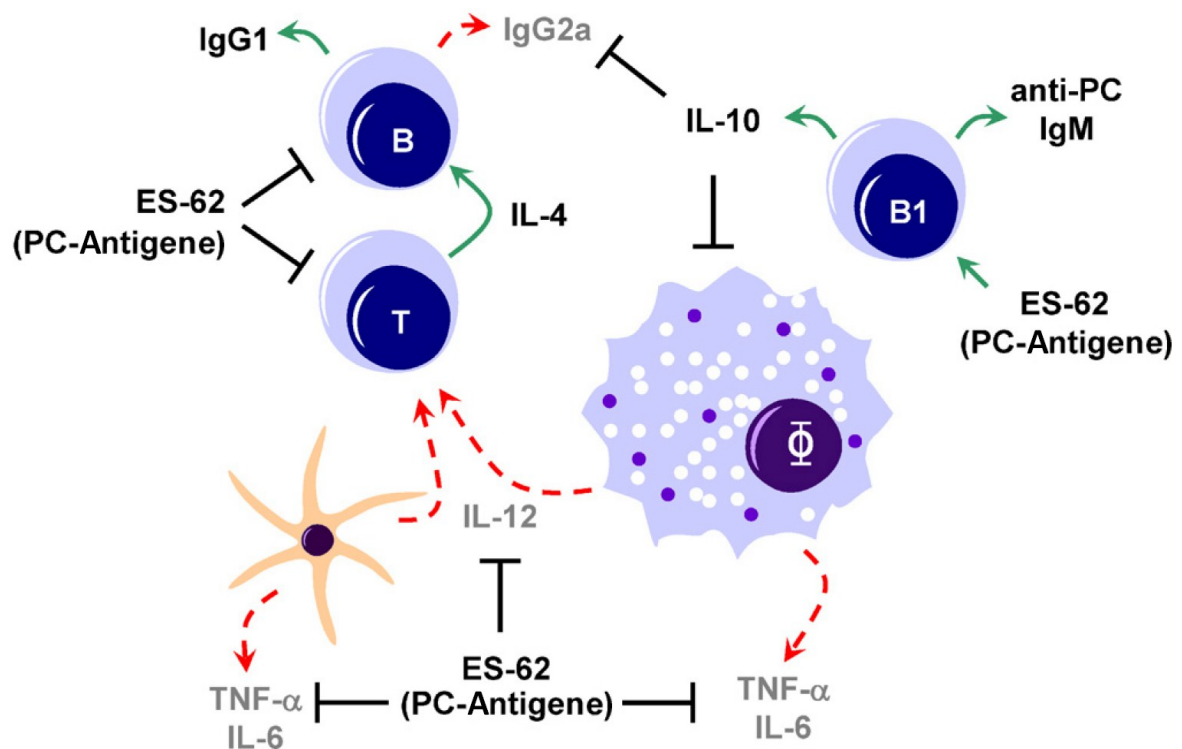


Abb. 1.6 Modulation auf zellulärer Ebene durch PC-Antigene, die verschiedene Immunzellen beeinflussen und zu einer anti-inflammatorischen Th2-Antwort führen. Es wird eine IL-10-Produktion in B-Zellen induziert, die die Synthese von IgG2a hemmt, die von IgG1 aber fördert. Es kommt zu einer Unterdrückung der Produktion von TNF- α , IL-6 und IL-12, diejenige von IL-4 wird allerdings gefördert. Bild modifiziert nach Goodridge et al. (2005c) [65].

Erhöhte der Konzentrationen des von den B1-Zellen produzierten IL-10 unterstützten die Inhibierung der IgG2a-Antwort [66, 67]. Eine Vermehrung von B-Zellen während der Bindung von PC über ihren Antigenrezeptor könnte eine Ursache für die häufig beobachtete anti-PC IgM Antwort sein [68]. Intrazellulär werden Signalwege der B-Zell-Rezeptor-Verbindung selektiv von ES-62 moduliert, z.B. über eine Veränderung der Aktivität und Expressionsraten mehrerer Isotypen der Proteinkinase C [63, 69]. Dabei kommt es zu einer Herabsetzung der Isoformen α , β , ξ , δ , ι/λ , während die Expression der Isoformen γ und ϵ heraufgesetzt wird. Weiterhin kommt es zu einer Störung der nukleären Translokations-Mechanismen der Proteinkinase α und ι/λ [69]. Aufgrund einer Bindung eines PC-haltigen Antigens an die Tyrosin-Phosphatase SHP-1, welche die ITAMs dephosphoryliert, verhindert dieses die Ras/Erk-MAP-Kinase-Kaskade (siehe Abb. 1.7). Außerdem verhindert die Induktion von GAP und der dualen Phosphatase Pac-1 den Signalweg der B-Zell-Rezeptor-Bindung zu Ras und

Erk. Es-62 führte zu einer verminderten Aktivierung der MAP-Kinasen, p38 und c-Jun N-terminaler Kinase [70].

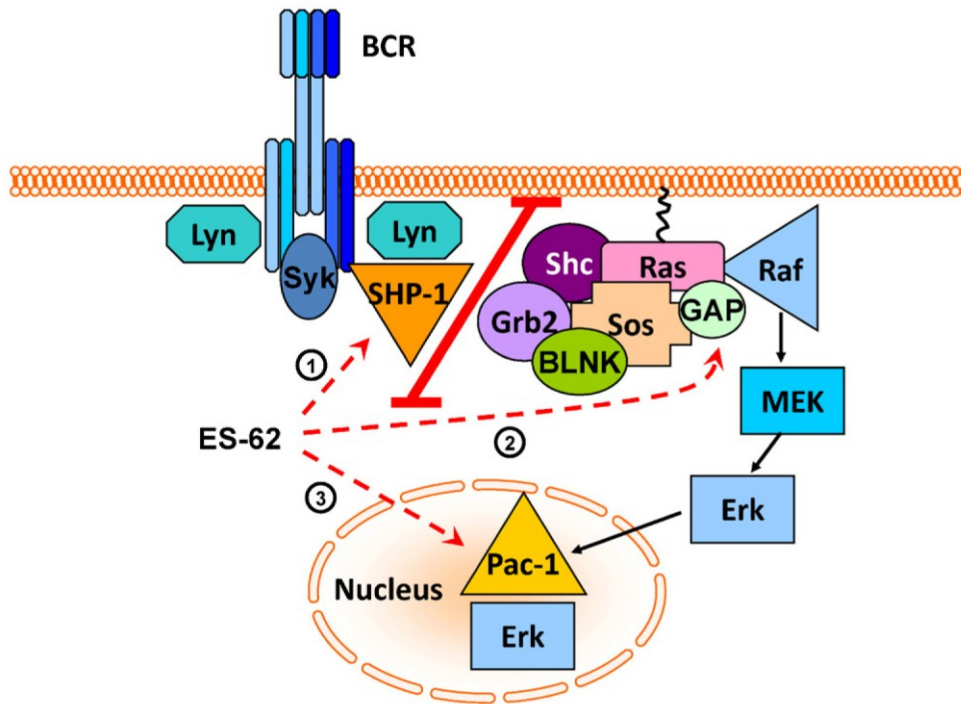


Abb. 1.7 Modulation der B-Zell-Signalwege durch das PC-substituierte ES-62. Dephosphorylierung von ITAMs durch Induktion der Tyrosin-Phosphatase SHP-1 (1), Unterbrechung des Ras-Signalweges durch Modifizierung von GAP (2) und Inhibierung der Erk-Kaskade durch Verbindung von PAC-1 mit Erk (3) [71].

Auch die Effekte von ES-62 auf T-Zellen sind allein durch PC-Reste zu bedingt [72]. Die Proliferation der Zellen und die Sekretion von Zytokinen sind aber nur gering beeinflusst. ES-62 führt über eine Modulation der Reifung und Funktion von Dendritischen Zellen und Makrophagen indirekt zu einer veränderten T-Zell-Antwort [48, 54]. Gründe für eine verminderte T-Zell-Aktivität sind: Induktion von CTLA-4-exprimierenden regulatorischen T-Zellen, welche die heterologen T-Zellen suprimieren, eine Inhibierung der Proteinkinase-C- und MAPK-Signalkaskaden und eine Produktion von IL-10 durch B-Zellen, die wiederum zu einer Inhibierung der Molekülexpression auf Antigen Präsentierenden Zellen mit einer damit verbundenen niedrigen T-Zell-Aktivierung führt [71] (siehe Abb. 1.8).

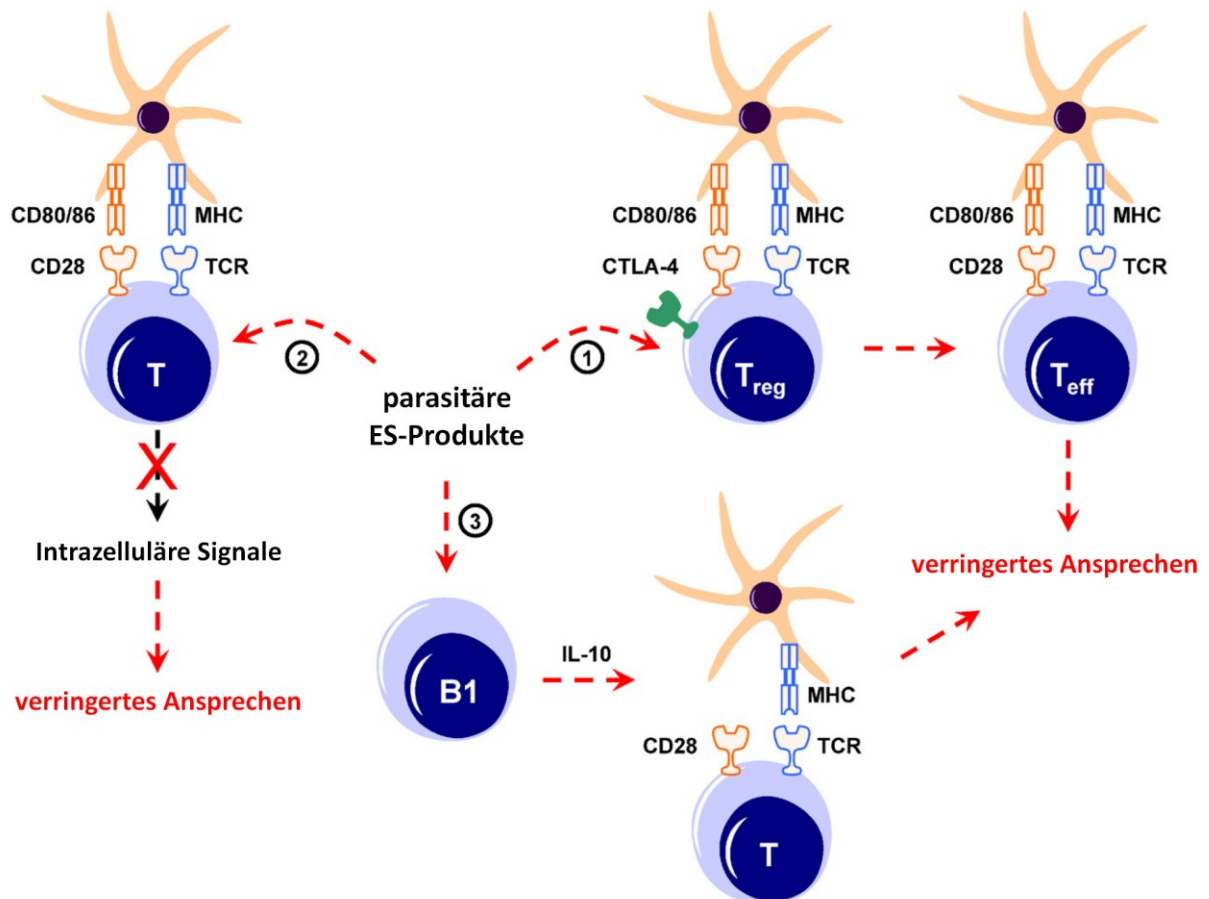


Abb. 1.8 Hemmung der T-Zell-Antwort durch parasitäre Antigene. Induktion CTLA-4-exprimierender T-Zellen, die Antigen-spaltend wirken und so die T-Zell-Aktivierung hemmen (1). Direkte Inhibition proliferationsfördernder Signalwege wie PKC und MAPK (2). Induktion der IL-10-Synthese in B1-Zellen, was zu einer Hemmung der Hochregulation der Expression von Co-stimulierenden Molekülen auf Antigen präsentierenden Zellen führt. MHC, major histocompatibility complex; TCR, T-Zell-Rezeptor; T_{eff}, T-Helferzellen; T_{reg}, regulatorische T-Zellen.

Intrazellulär kommt es zu einer Störung der T-Zell-Rezeptor-Bindung an Phospholipase D, Proteinkinase C, PI-3-K und an den Ras-Erk-MAP-Kinase-Komplex durch PC [73]. Der genaue Mechanismus ist dabei noch unbekannt. Auch bei *B. malayi* wurde ein immunsuppressiver Effekt durch PC-Substituenten festgestellt: Während einer Co-Kultivierung von Lymphozyten mit *B. malayi*-Antigen und Phyto-Hämagglutinin wurde die T-Zell-Proliferation durch das Antigen gehemmt [74].

ES-62 führt zu einer Modulation der Reifung Dendritischer Zellen und von Makrophagen, die für den Aktivierungsmechanismus von CD4⁺ T-Lymphozyten ähnlich dem der Th2-Aktivierung verantwortlich ist [51]. Diese Veränderungen finden bereits im Knochenmark auf Ebene der Vorläuferzellen statt [72]. Auch die Produktion von IL-12, Tumor Nekrose Faktor- α und IL-6

war signifikant reduziert [48, 75]. Intrazellulär induziert ES-62 eine Tyrosin-Phosphorylation verschiedener Proteine [70] und moduliert die Aktivierung von Erk, p38 und JNK [48, 54] (siehe Abb. 1.9).

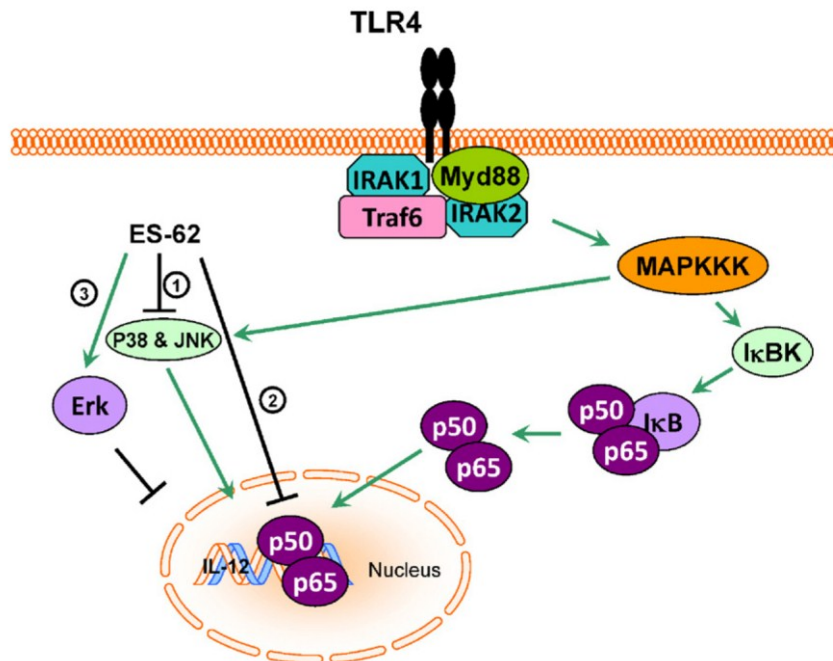


Abb. 1.9 Störung des TLR4 Signalweges in Makrophagen durch ES-62. Hemmung der p38-, JNK- und NF-κB-Aktivierung (1), Induktion der Erk MAP-Kinase (2), was zu einer verringerten IL-12 Produktion führt.

Die Aktivierungs-Modulation der Dendritischen Zellen und Makrophagen ist Toll-like-Rezeptor 4 (TLR4) abhängig [75]. TLR4 muss dabei zwar vorhanden, aber nicht voll funktionsfähig sein, was auf andere Signalkaskaden oder Nutzung eines Co-Rezeptors hinweisend ist. Auch dieser Zusammenhang ist hauptsächlich durch die Wirkung von PC zu erklären [76].

ES-62 inhibiert direkt die FcεRI-induzierte Freisetzung von Mastzellmediatoren durch eine Blockierung der Phospholipase D, der Sphingosinkinase vermittelten Calcium-Mobilisation und der nukleären Faktor-κB Aktivierung [50]. ES-62 bindet zudem an TLR4, was zu einer Blockierung der Proteinkinase C α führt. Dies führt zu einer Endozytose der Proteinkinase, die so nicht länger für die Kupplung von FcεRI an die Phospholipase D und für die Mastellaktivierung zur Verfügung steht (siehe Abb. 1.10).

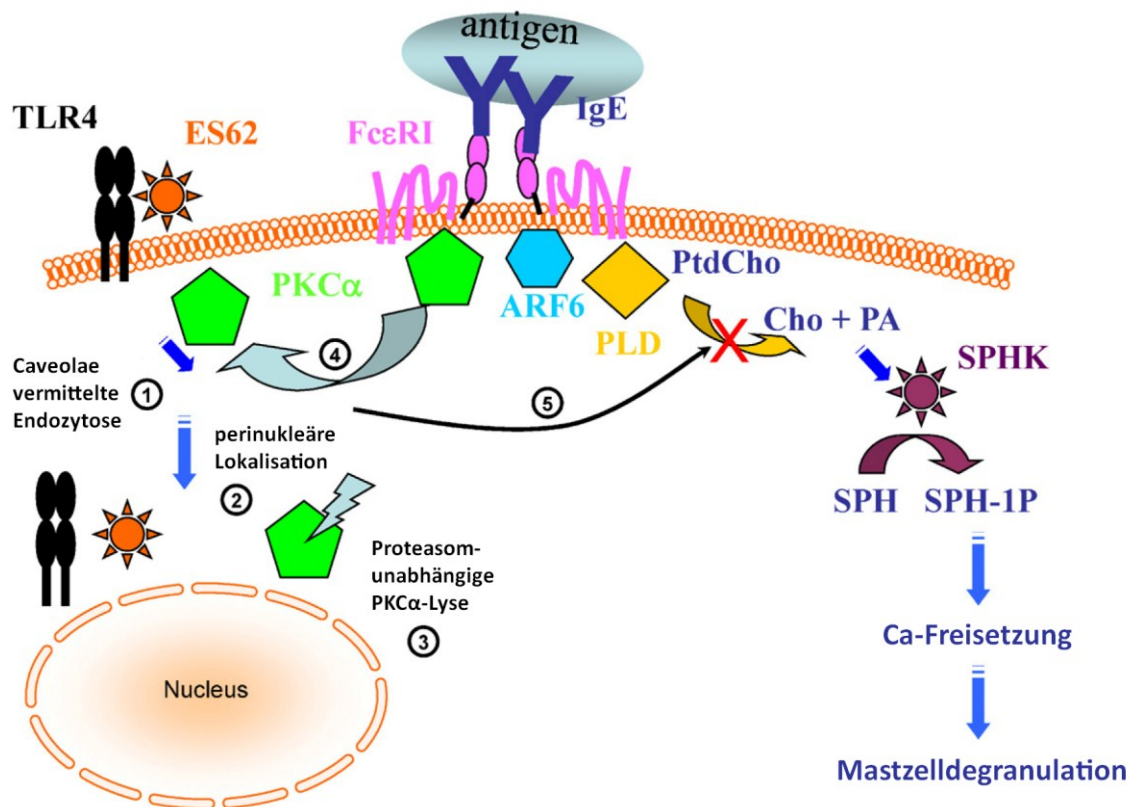


Abb. 1.10 Inhibition der Mastzelldegranulation durch PC-Antigene. Bindung von ES-62 an den TLR-4-Rezeptor führt zu einer Caveolae-vermittelten Endozytose des TLR-4/ES-62 Komplexes (1). Dieser Komplex führt später in der perinukleären Region (2) zu einer Proteasom-unabhängigen Lyse der PKC α (3). Bindung an den TLR-4 Rezeptor führt ebenso zu einer Aufspaltung der PKC α (4), die für eine Induktion der Mastzelldegranulation über den FcεRI-Rezeptor und die Bildung von Phosphatidylcholin notwendig ist (5). Bild nach Melendez et al. [77]. ARF6, ADP-ribosylation factor 6; Cho, Cholin; PA, Phosphatidylcholin; PLD, Phospholipase D; SPH, Sphingosin; SPHK, Sphingosinkinase; SPH-1P, Sphingosine-1-phosphat; PtdCho, Phosphatidylcholin.

1.3 RNA-Interferenz

1.3.1 Funktionsweise der RNA-Interferenz

Die RNA-Interferenz (RNAi) ist ein natürlicher Mechanismus, welcher die Genexpression von Eukaryoten auf Chromatinebene, post-transkriptionell und translational beeinflusst. Dieser Effekt wurde zunächst 1990 im Zusammenhang mit Blütenfärbungsversuchen beschrieben [78]. Andrew Fire und Craig Mello konnten 1998 an *C. elegans* zeigen, dass doppelsträngige RNA (dsRNA) maßgeblich an diesem Prozess beteiligt ist, wofür ihnen 2006 der Nobelpreis verliehen wurde [79]. Die Aufklärung des genauen Mechanismus gelang jedoch erst durch die Entdeckung sogenannter small interfering RNA (siRNA) [80], bei denen es sich um 22 bp lange RNA-Einzelstränge handelt, die in der Lage sind mRNA spezifisch zu binden und diese dann enzymatisch zu spalten. Schon zuvor wurde bei Versuchen mit *C. elegans* festgestellt,

dass das Gen *lin-4* nicht direkt für ein Protein, sondern für zwei kleine RNA-Stränge (miRNA) kodiert, welche komplementär zur mRNA des Gens *lin-14* sind und so über denselben Mechanismus wie den der dsRNA zur mRNA-Spaltung führen [81]. Mit der Entdeckung weiterer miRNA in *C. elegans* und auch anderen Spezies wurde offensichtlich, dass RNAi ein natürlicher Prozess der Genregulierung ist. Derzeit wird angenommen, dass mehrere tausend unterschiedliche miRNAs beim Menschen existieren [82].

1.3.2 RNA-Interferenz bei *C. elegans*

In *C. elegans* spalten Enzymkomplexe (Dicer) doppelsträngige RNA, die zuvor in eine Zelle aufgenommen wurde, in 22 bp große Fragmente (siRNA). Diese können sich über den gesamten Nematoden ausbreiten und werden intrazellulär entwunden und anschließend in Proteinkomplexe (RNA-induced silencing complex, RISC) eingebunden, die sequenzspezifisch einzelsträngige mRNA binden und schneiden. Dies führt zur Zerstörung des mRNA-Stranges einerseits und andererseits zu einer möglichen Amplifikation der siRNA durch eine RNA-abhängige RNA-Polymerase, wodurch wieder neue mRNA-Stränge zerstört werden können (siehe Abb. 1.11).

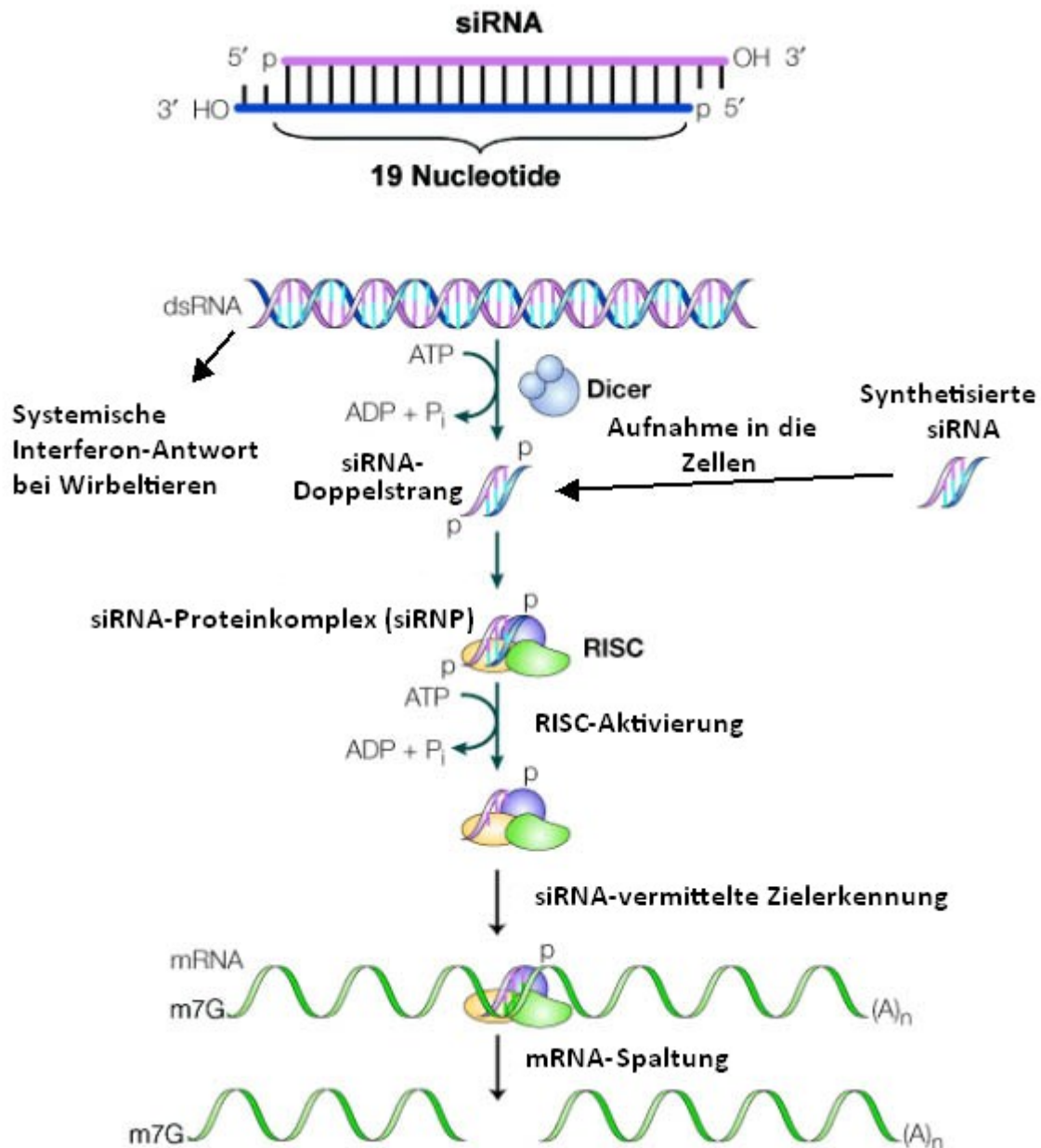


Abb. 1.11 Schematische Darstellung des RNAi-Mechanismus. Doppelsträngige RNA (dsRNA) wird über Dicer in 22 bp große Fragmente (siRNA) gespalten, führt bei Wirbeltieren aber zu einer systemischen Interferonantwort. Alternativ kann auch synthetische siRNA für einen RNAi-Knock-Out verwendet werden. Die Fragmente bilden gemeinsam mit Enzymen einen RNA-induced silencing complex (RISC), der zur einer Spaltung der, zur siRNA komplementären, mRNA-Stränge führt.

Die drei meistgenutzten Methoden, dsRNA in *C. elegans* einzuschleusen, sind: Die direkte Injektion, was die Manipulation einzelner Tiere notwendig macht und deswegen nicht für Hochdurchsatzmethoden geeignet ist [79, 83], das Einbringen in eine Lösung mit der entsprechenden dsRNA [84, 85] oder das Füttern mit *E. coli*-Bakterien, die die dsRNA selbst produzieren, was sich als die effizienteste und kostengünstigste Methode für groß angelegte Screens darstellt [86-88].

Es wurden in den letzten Jahren viele RNAi-Screens bezüglich der Embryonalentwicklung von Nachkommen modifizierter Parentalgenerationen durchgeführt, bei denen aber durchschnittlich nur 6% der Embryonen nicht geschlüpft sind [10]. Zudem kam es bei den meisten Genen, die in *C. elegans* durch RNAi ausgeschaltet wurden, zu keinen offensichtlichen Phänotypen [89, 90]. Auch bei der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* waren 80% der Gene für ihr Wachstum entbehrlich [91], was eine Redundanz wichtiger Enzyme annehmen lässt. Dies führte in der Folge zu Experimenten, bei denen durch mehrfachen Gen-Knockdown im selben Organismus nicht lebensfähige Phenotypen entstanden, was Rückschlüsse auf Zusammenhänge der einzelnen Gene erlaubte. So konnten z.B. Gene der DNA-Reparatur-Mechanismen bei *C. elegans* identifiziert werden [92].

Wegen des großen Nutzens für die Genomforschung kam es seit der Entdeckung des RNAi-Mechanismus zur Entwicklung von RNAi-Bibliotheken, die regelmäßig um neu entdeckte bzw. korrigierte Gensequenzen von *C. elegans* erweitert werden und sich beispielsweise als Arrays tiefgefrorener, siRNA-haltiger *E. coli* beziehen lassen.

Für eine Kontrolle eines RNAi-Knock-Outs werden unter anderem Housekeeping-Gene genutzt. Dies sind nicht-regulierte Gene, welche weitestgehend unabhängig von Zelltyp, Zellstadium und äußeren Einflüssen exprimiert werden. Meist sind sie für die grundlegenden Stoffwechselfunktionen einer Zelle, wie den Glukosestoffwechsel (hier z.B. die Glucokinase), zuständig. Die Bestimmung der Quantität der entsprechenden Proteine erlaubt einen Vergleich zur Menge anderer Stoffe der Zelle, die von den Versuchsbedingungen abhängig ist.

Um den anfänglichen Umfang des RNAi-Screens einzuschränken, können Kriterien wie das Fehlen oder die verminderte Expressierung bestimmter PC-modifizierter Proteine, eine Stagnation im L2-Stadium oder die Unfähigkeit adulter Tiere zu befruchten oder Eier zu legen herangezogen werden.

1.4 Ziel der Arbeit: Entwicklung einer Methode zum Hochdurchsatzscreening von RNAi-Modifikationen

Infektionen mit parasitären Nematoden stellen weltweit eine der häufigsten Krankheiten bei Menschen und Tieren dar. Wirksame Medikamente gibt es nur wenige und Neuinfektionen nach Gabe von Antihelminthika sind keine Seltenheit. Abgesehen davon ist die Erforschung der immunmodulatorischen Eigenschaften der Nematoden auch für das Verständnis

autoimmunologischer Erkrankungen hilfreich. Derartige Immunmodulationen werden durch posttranslationale Modifikationen, die sich in vielen Parasitenarten finden, ermöglicht. Für die Aufklärung der zu Grunde liegenden Mechanismen steht mit *C. elegans* ein hervorragender Modellorganismus zur Verfügung.

In dieser Arbeit soll eine Methode zum Hochdurchsatzscreening von RNAi-Experimenten der PC-Epitope entwickelt werden. Durch RNAi sollen mögliche, derzeit noch unbekannte, Enzyme, die für die Biosynthese von PC-Epitopen verantwortlich sind, identifiziert werden. Hierzu sollte der quantitative Abfall von PC-Epitopen als Indikator dienen. Die Identifizierung der PC-Transferase wäre ein vielversprechender Ansatz für die Entwicklung neuer Strategien gegen Nematodeninfektionen.

2 Material und Methoden

2.1 Geräte

Modulares System-Stereomikroskop Leica MS 5, Leica, Wetzlar

Universal 32 R-Zentrifuge, Hettich-Zentrifugen, Tuttlingen

Ultraschallbad Badelin Sonorex TK 52, Roth, Karlsruhe

Digitale Waage Mettler AJ150, Mettler PB3000, Mettler-Toledo GmbH, Gießen

Speed Vac, RC 10.22 Jouan, Thermo, Fernwald

Hamilton Microlab Star^{let}, Pipettierroboter, Martinsried

BioTek, ELx800, ELISA-Reader, Bad Friedrichshall

2.2 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien wurden, sofern nicht anders vermerkt, in p.a.-Qualität (Merck, Darmstadt; Roth, Karlsruhe; Fluka, Neu Ulm; Serva, Heidelberg) bezogen. Wasser wurde mit dem „Milli-Q Ultra-pure water system“ (Millipore, Eschborn) entsalzt und gereinigt.

2.3 Methoden

2.3.1 Kultivierung von *C. elegans*

Für die Kultivierung von *C. elegans* wurden Petrischalen mit 145 mm Durchmesser verwendet, in die eine Agarlösung gegossen wurde.

Die Agarlösung setzt sich zusammen aus:

5 g Caseinhydrolysat (Pepton 140) (Merck)

5 g Hafeextrakt (Life Technologie, Eggenstein)

3 g NaCl

20 g Agar, high gel-strength (Serva)

auf 1000 mL mit H₂O auffüllen

Anschließend wurde die Agarlösung autoklaviert (20 min, 120 °C) und es wurden folgende sterile Lösungen hinzugesetzt:

1,0 mL Cholesterinlösung (5,0 g Cholesterin/ 1 L Ethanol)

0,5 mL CaCl₂ (110,8 g CaCl₂ / 1 L H₂O)

25 mL Kaliumdihydrogenphosphat-Lösung (108,3 g KH₂PO₄ und 36 g K₂PO₄ / 1 L H₂O)

2,0 mL Thiabendazol (10 mg / Thiabendazol in Dimethylsulfoxid)

2,0 mL 0,1 % Methylenblau in H₂O

Unter Durchmischung wurde der Agar in einer 0,5 cm dicken Schicht in die Petrischale gegossen und über Nacht bei Raumtemperatur stehengelassen.

2.3.1.1 Kultivierung mit *Escherichia coli* (*E. coli*) auf Agarplatten

Für den Bakterienrasen auf den Agarplatten wurden *E. coli*-Bakterien (OP 50) verwendet.

Luria Broth, Bakterienmedium (LB-Medium):

0,5 g Caseinhydrolysat

0,5 g Hafeextrakt

0,3 g NaCl

4 mMol / L Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG, Roth, Karlsruhe)

100 µg / mL Ampicillin (Sigma, Taufkirchen)

auf 100 mL mit H₂O auffüllen

Das Bakterienmedium wurde verrührt und bei 120 °C für 20 min autoklaviert. Nach dem Autoklavieren kühlte die Lösung ab und wurde mit 50 µl *E. coli*-Bakterienmedium versetzt. Die Suspension wuchs über Nacht bei 37 °C. Der abgekühlte Agar wurde mit 800 µl der Bakteriensuspension angeimpft. Der Bakterienrasen wuchs anschließend über Nacht bei 37 °C im Brutschrank.

Auf die bewachsenen Agarplatten wurden 500 µl *C. elegans*-Suspension (ca. 2000 Würmer) aufgegeben. Die Agarplatten wurden bei 18 °C inkubiert.

2.3.1.2 Kultivierung mit *E. coli* in Flüssigkultur

Für die Kultivierung von *C. elegans* in Flüssigkultur wurden 96er Deep-Well-Platten (Nunc, Langenselbold) verwendet, in die je Well 1 mL S-Basal-Medium (SB) pipettiert wurde:

Zusammensetzung des S-Basal-Mediums:

22 mL 1 mol / L NaH₂PO₄

3 mL 1 mol / L Na₂HPO₄

475 mL H₂O

2,9 g NaCl

Es folgt ein Autoklavieren der Lösung

5 mL Natriumcitrat (21 g Zitronensäure / 100ml H₂O mit NaOH auf pH 6)

1,5 mL 1 mol / L MgSO₄

5 mL PentStrep (10 g/ 1000 mL H₂O)

0,5 mL Cholesterin (0,5 % in Ethanol)

4 mMol / L IPTG

100 µg / mL Ampicillin

Anschließend wurden je 50 µl *E. coli*-Suspension und 50 µl *C. elegans*-Suspension (ca. 10-50 Würmer) hinzugesetzt. Die Deep-Well-Platte wurde danach so abgedeckt, dass ein

Gasaustausch noch möglich war und bei 18 °C unter leichtem Schütteln für 72 Stunden inkubiert.

2.3.2 Aufreinigung von *C. elegans*

Die Agarplatten werden mit 15 mL M9-Puffer abgespült und die Flüssigkeit in ein Zentrifugenröhrchen (Greiner, Frickenhausen) (V = 50 mL) überführt.

Zusammensetzung des M9-Puffers:

250 mL Phosphatpuffer (60 g KH_2PO_4 , 120 g Na_2HPO_4), pH 6,0

25 g NaCl

5 mL 1 mol / L MgSO_4

auf 5 L mit H_2O auffüllen

C. elegans wurden im M9-Puffer auf Eis gestellt, dadurch setzten sich die Würmer als Sediment ab. Der Überstand wurde abgezogen. Da das Sediment noch Kontaminationen mit Zelltrümmern, Bakterienresten und Häutungsaggregaten enthielt, wurden die Nematoden durch eine Dichtezentrifugation gereinigt.

Zur Reinigung der Würmer wurden sie mit M9-Puffer auf 15 mL aufgefüllt und mit 10 mL Saccharoselösung (30 %) unterschichtet. Anschließend wurden sie bei 1500 g 7 Minuten zentrifugiert. Die Saccharoseschicht mit den *C. elegans* wurde in ein weiteres Zentrifugenröhrchen (V = 50 mL) überführt und dreimal mit jeweils 50 mL M9-Puffer bei 900 g gewaschen.

2.3.3 Synchronisierung der einzelnen Stadien von *C. elegans*

Zur Gewinnung eines definierten Larvenstadiums musste eine Wurmpopulation zunächst synchronisiert werden. Das Prinzip beruht auf der Eliminierung aller lebenden Larvenstadien und adulten Tiere durch eine stark alkalische Hypochloritlösung, wobei nur die Embryonen, geschützt durch eine Vitellinschicht ihrer Eihülle, diese Prozedur überleben. Die gewaschenen Eier von *C. elegans* blieben im M9-Puffer bei 18 °C über Nacht. Nach dem Schlüpfen blieben die Tiere bei Nahrungsmangel im M9-Puffer am Ende der L1-Phase in ihrer Entwicklung stehen und setzten ihr Wachstum (über L2) erst nach Umsetzung auf *E. coli*-

Platten oder in Flüssigkultur fort. Nach der Fütterung wurde der Entwicklungsgrad der Würmer regelmäßig mikroskopisch geprüft. Sobald das gewünschte Larvenstadium erreicht war, wurden die Würmer geerntet und gereinigt (siehe 2.3.2.).

2.3.4 Gewinnung von Eiern aus *C. elegans*

Zur Gewinnung von Eiern aus *C. elegans* gibt es zwei unterschiedliche Methoden. Die Unterschichtungsmethode setzt direkt an der Aufreinigung des Wurmmaterials an, während die Übersichtungsmethode beide Schritte kombiniert.

2.3.4.1 Unterschichtungsmethode

Die gewaschenen Würmer wurden mit 15 mL M9 und 15 mL Natriumhypochlorit-Lösung (12% Chlor, Roth) versetzt.

Zusammensetzung der Hypochlorit-Lösung:

12 mL Natriumhypochlorit

5 mL 5 M KOH

auf 100 mL mit H₂O auffüllen

Anschließend wurde der Ansatz 5 Minuten kräftig geschüttelt und bei 900 g zentrifugiert. Der Überstand wurde bis auf 15 mL abgesaugt. Es wurden nochmals 15 mL Natriumhypochlorit-Lösung zugegeben, erneut 2 Minuten geschüttelt und zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde so häufig wiederholt, bis im Mikroskop nur noch die Eier sichtbar waren. Diese wurden anschließend drei- bis viermal mit je 50 mL M9-Puffer gewaschen (siehe 2.3.2.).

2.3.4.2 Übersichtungsmethode

Die Würmer wurden mit 10 mL M9-Puffer von einer Agarplatte abgespült und in ein Zentrifugenröhrchen (V = 15 mL) überführt. Die Würmer wurden bei Raumtemperatur und 900 g 5 Minuten abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgezogen. Nun wurden 6 mL Natriumhypochlorit-Lösung hinzupipettiert und das Röhrchen dreimal in Abständen von einer Minute kräftig geschüttelt. Der Aufschluss der Würmer wurde unter dem Mikroskop kontrolliert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 6 mL 60%iger Saccharoselösung und

folgendem, kräftigem Schütteln gestoppt. Die Lösung wurde für 15 Minuten stehen gelassen und dann vorsichtig mit 3 mL M9-Puffer überschichtet. Der Ansatz wurde dann bei 900 g für 5 Minuten zentrifugiert. Es bildete sich eine eierhaltige Interphase, die abpipettiert und in einem neuen Zentrifugenröhrchen solange mit M9-Puffer gewaschen wurde bis kein Chlorgeruch mehr wahrnehmbar war und im Mikroskop nur noch Eier sichtbar waren.

2.3.5 Lyse der Würmer

Um die Proteine der *C. elegans* in dem ELISA nachweisen zu können, mussten zunächst die Zellmembranen der Würmer aufgelöst werden, damit sich für alle Stoffe in den Proben einheitliche Konzentrationen im Probenvolumen einstellen konnten. Dementsprechend wurden nach der Inkubation der 96er Deep-Well-Platte pro Well 250 µl Lysis-Puffer hinzupipettiert.

Zusammensetzung des Lysis-Puffers:

100 mMol / L NaCl

100 mMol / L TRIS, pH 8,5

1% SDS

1 % 2-Mercaptoethanol

Der Ansatz wurde für 2 Stunden bei Raumtemperatur geschüttelt. Danach wurde die Lyse der Würmer mikroskopisch kontrolliert. Anschließend wurde der Ansatz über Nacht in der Speed-Vac getrocknet, um das Probenvolumen zu reduzieren und durch Neuaufnahme in ELISA-Bindungspuffer (siehe 2.3.8.) höhere Antigenkonzentrationen zu erhalten.

2.3.6 Proteinbestimmung

Für die Proteinbestimmung wurde das *BCA™ Protein Assay Kit* (Pierce, Bonn) verwendet. Nach den Vorgaben des Herstellers wurde eine Verdünnungsreihe des Albumin-Standards in den Konzentrationen 0; 25; 125; 250; 500; 750; 1000; 1500; 2000 µg / mL in einer 96er ELISA-Platte vorbereitet. Je 25 µl der zu untersuchenden Proben wurden auf die übrigen Wells verteilt und anschließend je 200 µl der *BCA™ Working Reagent* zu den zu messenden Wells pipettiert. Die Platte wurde bei 37 °C für 30 Minuten inkubiert und danach wieder auf

Raumtemperatur abgekühlt. Die Messung der Extinktionen erfolgte bei einer Wellenlänge von 562 nm. Die Leerwerte wurden von den übrigen Messergebnissen abgezogen und die Proteinkonzentration anhand der Eichkurve bestimmt.

2.3.7 Dot-Blot

Für den Nachweis von PC-, Ubiquitin- und γ -Tubulin-Epitopen in *C. elegans* wurde ein Dot-Blot durchgeführt. Dazu wurde eine 0,45 μ m starke Nitrocellulose-Membran (Roth) zunächst für 10 Sekunden in H₂O getaucht. Anschließend wurden *C. elegans*-Extrakte (100 ng / 10 μ l Probenpuffer) auf die Membran aufgebracht und bei Raumtemperatur getrocknet. Die Membran wurde mit Roti-Block (Roth) über Nacht bei 4 °C blockiert.

Zusammensetzung des Probenpuffers:

1 M TRIS / HCl, pH 6,8	62,5 μ l
Glycerin 87%	100 μ l
SDS 10%	200 μ l
100 mMol / L Na ₂ EDTA	10 μ l
Bromphenolblau 0,25%	25 μ l
2-Mercaptoethanol	50 μ l
H ₂ O	552,5 μ l

Als primärer Antikörper zur Erkennung von PC-Epitopen wurde der PC-spezifische monoklonale Antikörper TEPC-15 (Maus IgA; Sigma, 1:1000 in Roti-Block, Roth) verwendet. Als zweiter Antikörper diente ein mit Horse-raddish-peroxidase (HRP) konjugiertes Anti-Maus-Immunglobulin (Dako 0260, 1:3000 in Roti-Block).

Zur Erkennung der Ubiquitin-Epitope wurde ein Ubiquitin-Antikörper (Rabbit IgG, Acris Antibodies GmbH, 1:1000 in TST) verwendet. Zur Bestimmung der γ -Tubulin-Epitope wurde Anti- γ -Tubulin (LL-17, Rabbit IgG, Sigma, 1:3000 in Roti-Block) benutzt. Als zweiter Antikörper diente hier ein HRP-konjugiertes Anti-Rabbit-Immunglobulin (Dako, 1:3000 in Roti-Block).

Zusammensetzung von TST:

25 mMol / L TRIS, pH 7,5 (mit HCl eingestellt)

100 mMol / L NaCl

1 % BSA (Sigma)

0,1 % Tween-20 (Sigma)

auf 1000 mL mit H₂O auffüllen

Der erste Antikörper wurde über Nacht bei 4 °C auf die Membran gegeben. Am nächsten Tag wurden die Membranen dreimal je 10 Minuten mit Roti-Block gewaschen. Anschließend wurde der zweite Antikörper für eine Stunde bei Raumtemperatur auf die Membran gegeben. Die Membran wurde fünfmal je 10 Minuten mit Roti-Block gewaschen und schließlich einmal 10 Minuten mit PBS-T gewaschen. PC-modifizierte Proteine, Ubiquitin und Tubulin wurden mittels Chemilumineszenz (ECL) mit dem *West Dura Substrate Kit* (Perbio Science, Bonn) visualisiert.

PBS-T:

9,68 g NaCl

2,9 g Na₂HPO₄

0,234 g NaH₂PO₄

0,1 g NaN₃

0,5 mL Tween-20

auf 1000 mL mit H₂O auffüllen

Der Blot wurde über die Kante abgetropft und auf die Saranfolie (Roth) gelegt. Lösung A und Lösung B des *West Dura Substrate Kit* wurden 1:1 vermischt und auf der Proteinseite verteilt. Der Blot wurde mit Saranfolie bedeckt und in eine Fotokassette gelegt und im Dunkeln mit einem Film (Kodak, X-Omat AR Film, XAR-5; 5x5 cm; Sigma) bedeckt. Nach der Exposition (zwischen 30 Sekunden und 5 Minuten) wurde der Blot 60 Sekunden in Entwicklerlösung (Cronex MD-Developer, Agfa, Dübendorf), 30 Sekunden in H₂O und anschließend für 5 Minuten in Fixiererlösung (Cronex MFEDeveloper, Agfa, Dübendorf) getaucht. Nach der Fixierung wurde der Blot getrocknet.

2.3.8 Enzym Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Ein *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) ist ein immunologisches Verfahren zum Nachweis von Proteinen. Es werden hierbei Antikörper genutzt, welche für das gesuchte Antigen spezifisch sind und über eine Kopplung mit einem Enzym eine Färbereaktion für eine photometrische Messung katalysieren oder auch radioaktiv bzw. mit einer Fluoreszenz markiert sein können.

In die Wells der 96er Deep-Well-Platte wurden nach dem Trocknen der *C. elegans*-Lysate in der Speed-Vac (siehe 2.3.5) jeweils 500µl Phosphatbindungsbuffer pipettiert.

Zusammensetzung des Phosphatbuffers (pH 7,4; 10 mM):

27,6 g NaH_2PO_4 auf 1000 mL mit H_2O auffüllen (Lösung 1; 0,2 M)

53,6 g Na_2HPO_4 auf 1000 mL mit H_2O auffüllen (Lösung 2; 0,2 M)

1,9 mL Lösung 1

8,1 mL Lösung 2

100 mL H_2O

150 mMol / L NaCl in H_2O

Anschließend wurde die Platte zum Lösen der Proteine für 15 Minuten in ein Ultraschallbad getaucht. Für die Standards wurde je eine Verdünnungsreihe mit PC-BSA und mit Ubiquitin mit je 8 Eppis angelegt (Siehe Tabelle 2-1).

Tabelle 2-1 Pipettierschema der einzelnen Standards

Eppi	in ng / 50 µl	
	PC-BSA	Ubiquitin
1	7,8125	0,1875
2	15,625	0,375
3	31,25	0,75
4	62,5	1,5
5	125	3
6	250	6
7	500	12
8	1000	24

2.3.8.1 Durchführung des ELISA mit dem Microlab Star^{let}, Pipettierroboter

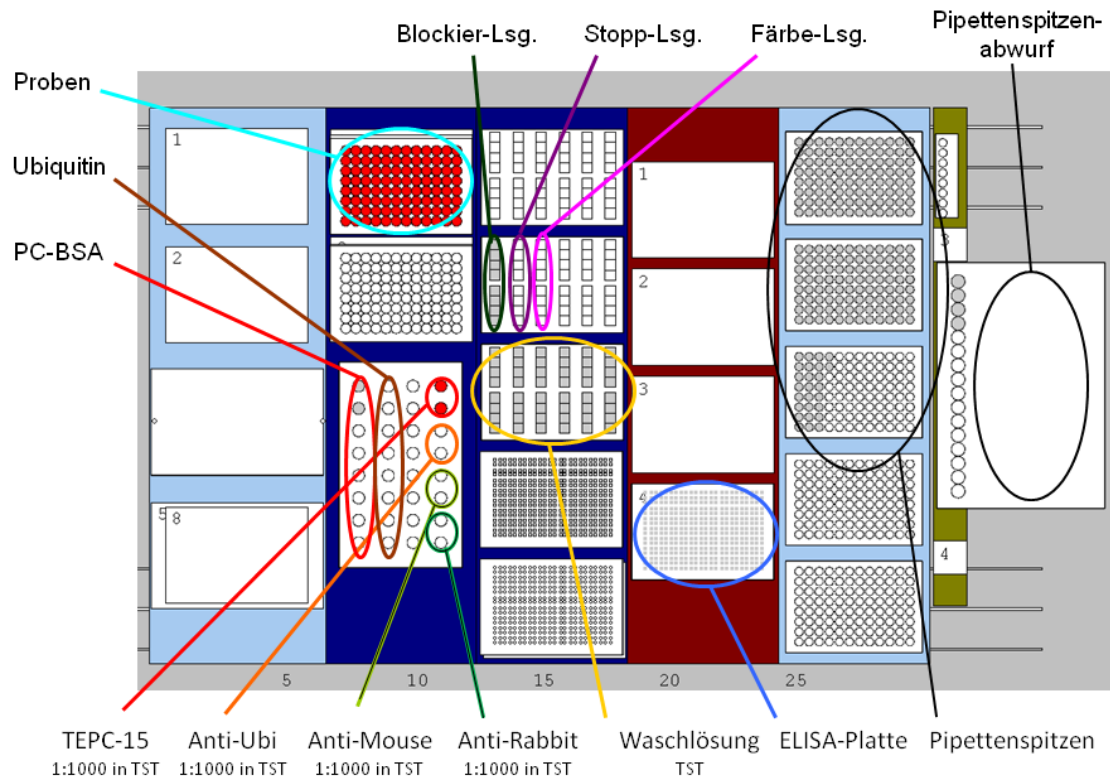


Abb.2.1 Schema des Versuchsaufbaus im Microlab Star^{let}-Pipettierroboter

Aus den Wells der 96er Deep-Well-Platte wurden für den ELISA per Roboter je Well 100 µl abpipettiert und auf zwei Wells zu je 50 µl einer 384-Well-ELISA-Platte (Maxisorp, Nunc) verteilt.

Die Standards wurden in einer Konzentrationsreihe von 7 bis 1000 ng pro Well (PC-BSA) und von 0,19 bis 24 ng pro Well (Ubiquitin) hinzupipettiert (siehe Abb. 2.3 und Abb. 2.4). Anschließend wurde die 384er-Platte bei 4 °C über Nacht inkubiert. Nach der Antigenbindung wurde die Platte zweimal mit je 100 µl TST pro Well gewaschen und der Überstand abgenommen.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 4	Probe 5	Probe 6	Probe 7	Probe 8	Probe 9	Probe 10	Probe 11	Probe 12
B	Probe 13	Probe 14	Probe 15	Probe 16	Probe 17	Probe 18	Probe 19	Probe 20	Probe 21	Probe 22	Probe 23	Probe 24
C	Probe 25	Probe 26	Probe 27	Probe 28	Probe 29	Probe 30	Probe 31	Probe 32	Probe 33	Probe 34	Probe 35	Probe 36
D	Probe 37	Probe 38	Probe 39	Probe 40	Probe 41	Probe 42	Probe 43	Probe 44	Probe 45	Probe 46	Probe 47	Probe 48
E	Probe 49	Probe 50	Probe 51	Probe 52	Probe 53	Probe 54	Probe 55	Probe 56	Probe 57	Probe 58	Probe 59	Probe 60
F	Probe 61	Probe 62	Probe 63	Probe 64	Probe 65	Probe 66	Probe 67	Probe 68	Probe 69	Probe 70	Probe 71	Probe 72
G	Probe 73	Probe 74	Probe 75	Probe 76	Probe 77	Probe 78	Probe 79	Probe 80	Probe 81	Probe 82	Probe 83	Probe 84
H	Probe 85	Probe 86	Probe 87	Probe 88	Probe 89	Probe 90	Probe 91	Probe 92	Probe 93	Probe 94	Probe 95	Probe 96

Abb. 2.2 Allgemeine Plattenbelegung der 96er ELISA-Platten

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A		Leerwert PC	Leerwert PC	Leerwert PC	Leerwert PC	Leerwert PC	Leerwert PC	Leerwert PC	Leerwert PC	Leerwert PC		
B		Leerwert PC	Leerwert PC	Leerwert PC	Leerwert PC	Leerwert PC	Leerwert PC	Leerwert PC	Leerwert PC	Leerwert PC		
C		Probe PC 12	Probe PC 12	Probe PC 24	Probe PC 36	Probe PC 48	Probe PC 60	Probe PC 72	Probe PC 84	Probe PC 96		
D		Probe PC 11	Probe PC 23	Probe PC 23	Probe PC 35	Probe PC 47	Probe PC 59	Probe PC 71	Probe PC 83	Probe PC 95		
E		Probe PC 10	Probe PC 22	Probe PC 22	Probe PC 34	Probe PC 46	Probe PC 58	Probe PC 70	Probe PC 82	Probe PC 94		
F		Probe PC 9	Probe PC 21	Probe PC 21	Probe PC 33	Probe PC 45	Probe PC 57	Probe PC 69	Probe PC 81	Probe PC 93		
G		Probe PC 8	Probe PC 20	Probe PC 20	Probe PC 32	Probe PC 44	Probe PC 56	Probe PC 68	Probe PC 80	Probe PC 92		
H		Probe PC 7	Probe PC 19	Probe PC 19	Probe PC 31	Probe PC 43	Probe PC 55	Probe PC 67	Probe PC 79	Probe PC 91		
I		Probe PC 6	Probe PC 18	Probe PC 18	Probe PC 30	Probe PC 42	Probe PC 54	Probe PC 66	Probe PC 78	Probe PC 90		
J		Probe PC 5	Probe PC 17	Probe PC 17	Probe PC 29	Probe PC 41	Probe PC 53	Probe PC 65	Probe PC 77	Probe PC 89		
K		Probe PC 4	Probe PC 16	Probe PC 16	Probe PC 28	Probe PC 40	Probe PC 52	Probe PC 64	Probe PC 76	Probe PC 88		
L		Probe PC 3	Probe PC 15	Probe PC 15	Probe PC 27	Probe PC 39	Probe PC 51	Probe PC 63	Probe PC 75	Probe PC 87		
M		Probe PC 2	Probe PC 14	Probe PC 14	Probe PC 26	Probe PC 38	Probe PC 50	Probe PC 62	Probe PC 74	Probe PC 86		
N		Probe PC 1	Probe PC 13	Probe PC 13	Probe PC 25	Probe PC 37	Probe PC 49	Probe PC 61	Probe PC 73	Probe PC 85		
O		PC-Std. 1	PC-Std. 2	PC-Std. 2	PC-Std. 3	PC-Std. 4	PC-Std. 5	PC-Std. 6	PC-Std. 7	PC-Std. 8		
P		Leerwert PC	Leerwert PC	Leerwert PC	Leerwert PC	Leerwert PC	Leerwert PC	Leerwert PC	Leerwert PC	Leerwert PC		

Abb. 2.3 Plattenbelegung der 384er ELISA-Platten (Teilansicht 1). Hier finden sämtliche Proben der 96er Deep-Well-Platte zusammen mit Leerwerten und Standardreihen Platz.

13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
	Leerwert Ubi	Leerwert Ubi	Leerwert Ubi	Leerwert Ubi	Leerwert Ubi	Leerwert Ubi	Leerwert Ubi	Leerwert Ubi	Leerwert Ubi		
	Leerwert Ubi	Leerwert Ubi	Leerwert Ubi	Leerwert Ubi	Leerwert Ubi	Leerwert Ubi	Leerwert Ubi	Leerwert Ubi	Leerwert Ubi		
	Probe Ubi 12	Probe Ubi 11	Probe Ubi 24	Probe Ubi 36	Probe Ubi 48	Probe Ubi 60	Probe Ubi 72	Probe Ubi 84	Probe Ubi 96		
	Probe Ubi 11	Probe Ubi 23	Probe Ubi 35	Probe Ubi 47	Probe Ubi 59	Probe Ubi 71	Probe Ubi 83	Probe Ubi 95	Probe Ubi 95		
	Probe Ubi 10	Probe Ubi 22	Probe Ubi 34	Probe Ubi 46	Probe Ubi 58	Probe Ubi 70	Probe Ubi 82	Probe Ubi 94	Probe Ubi 94		
	Probe Ubi 9	Probe Ubi 21	Probe Ubi 33	Probe Ubi 45	Probe Ubi 57	Probe Ubi 69	Probe Ubi 81	Probe Ubi 93	Probe Ubi 93		
	Probe Ubi 8	Probe Ubi 20	Probe Ubi 32	Probe Ubi 44	Probe Ubi 56	Probe Ubi 68	Probe Ubi 80	Probe Ubi 92	Probe Ubi 92		
	Probe Ubi 7	Probe Ubi 19	Probe Ubi 31	Probe Ubi 43	Probe Ubi 55	Probe Ubi 67	Probe Ubi 79	Probe Ubi 91	Probe Ubi 91		
	Probe Ubi 6	Probe Ubi 18	Probe Ubi 30	Probe Ubi 42	Probe Ubi 54	Probe Ubi 66	Probe Ubi 78	Probe Ubi 90	Probe Ubi 90		
	Probe Ubi 5	Probe Ubi 17	Probe Ubi 29	Probe Ubi 41	Probe Ubi 53	Probe Ubi 65	Probe Ubi 77	Probe Ubi 89	Probe Ubi 89		
	Probe Ubi 4	Probe Ubi 16	Probe Ubi 28	Probe Ubi 40	Probe Ubi 52	Probe Ubi 64	Probe Ubi 76	Probe Ubi 88	Probe Ubi 88		
	Probe Ubi 3	Probe Ubi 15	Probe Ubi 27	Probe Ubi 39	Probe Ubi 51	Probe Ubi 63	Probe Ubi 75	Probe Ubi 87	Probe Ubi 87		
	Probe Ubi 2	Probe Ubi 14	Probe Ubi 26	Probe Ubi 38	Probe Ubi 50	Probe Ubi 62	Probe Ubi 74	Probe Ubi 86	Probe Ubi 86		
	Probe Ubi 1	Probe Ubi 13	Probe Ubi 25	Probe Ubi 37	Probe Ubi 49	Probe Ubi 61	Probe Ubi 73	Probe Ubi 85	Probe Ubi 85		
	Ubi-Std. 1	Ubi-Std. 2	Ubi-Std. 3	Ubi-Std. 4	Ubi-Std. 5	Ubi-Std. 6	Ubi-Std. 7	Ubi-Std. 8	Ubi-Std. 8		
	Leerwert Ubi	Leerwert Ubi	Leerwert Ubi	Leerwert Ubi	Leerwert Ubi	Leerwert Ubi	Leerwert Ubi	Leerwert Ubi	Leerwert Ubi		

Abb. 2.4 Plattenbelegung der 384er ELISA-Platten (Teilansicht 2). Hier finden sämtliche Proben der 96er Deep-Well-Platte zusammen mit Leerwerten und Standardreihen Platz.

Alle Spalten der 384er-Platte, die Proben enthielten, wurden dann mit 100 µl pro Well *The Blocking Solution* (Candor Bioscience GmbH, Weißensberg) über Nacht bei 4 °C blockiert. Die Blockierlösung wurde per Hand ausgeklopft und die Platte mit jeweils 50 µl pro Well mit den Antikörpern TEPC-15 (Maus IgA, Sigma, 1:1000 in TST) und Anti-Ubiquitin (Rabbit IgG, Acris Antibodies GmbH, 1:1000 in TST) bzw. Anti-γ-Tubulin (LL-17, Rabbit IgG, Sigma, 1:1000 in TST) befüllt. Es folgte eine erneute Inkubation über Nacht bei 4 °C. Die Antikörperlösung wurde durch manuelles Ausklopfen entfernt und die Platte fünfmal mit 100 µl TST pro Well gewaschen. Dann wurden je 50 µl der jeweiligen Zweitantikörper, Anti-Mouse (Dako, 1:1000 in TST) für den TEPC-15-Erstantikörper und Anti-Rabbit (Dako, 1:1000 in TST) für den Anti-Ubiquitin- und für den Anti-γ-Tubulin-Erstantikörper, in die entsprechenden Wells pipettiert. Es wurde erneut über Nacht bei 4 °C inkubiert. Die Antikörperlösung wurde ausgeklopft und die Platte anschließend fünfmal mit 100 µl TST je Well gewaschen. In die Wells wurden nun je 50 µl Färbelösung (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB) Liquid Substrate System, Sigma-Aldrich) pipettiert. Es wurde 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Durch Hinzugabe von 12%iger H₂SO₄ wurde die Färbereaktion abgestoppt. Die ELISA-Platte wurde anschließend bei Wellenlängen von 450 nm und 630 nm ausgelesen. Die Extinktionswerte der 630 nm-Messungen wurden zur Vermeidung von wellenlängenunabhängigen Messfehlern (z.B. Luftbläschen) von den 450 nm-Messwerten abgezogen.

2.3.8.2 Manuelle Durchführung des ELISA

Für die von Hand pipettierten ELISAs wurden 96-Well ELISA-Platten (Maxisorp, Nunc) verwendet. Es wurde je eine Platte für die PC-Bestimmung und eine für den Ubiquitin-Bestimmung verwendet.

Aus den Wells der 96er Deep-Well-Platte wurden jeweils 100 µl abpipettiert und auf die Wells der 96er ELISA-Platte verteilt. Beide ELISA-Platten wurden dann über Nacht bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden alle Wells zweimal mit je 250 µl TST gewaschen und mit je 250 µl *The Blocking Solution* befüllt und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Die erste Platte wurde mit je 100 µl TEPC-15 (1:1000 in TST) und die zweite Platte mit je 100 µl Ubiquitin-Antikörper (1:1000 in TST) pro Well befüllt und erneut über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Platten wurden anschließend fünfmal mit je 250 µl TST pro Well gewaschen. Anschließend wurde in die

Platte zur PC-Bestimmung 100 µl Anti-Mouse-Antikörper (1:1000 in TST) pro Well und in die Platte zur Ubiquitin-/Tubulin-Bestimmung 100 µl Anti-Rabbit-Antikörper pro Well pipettiert. Inkubation über Nacht bei 4 °C. Nach der Inkubation wurden beide Platten nochmals fünfmal mit 250 µl TST je Well gewaschen, der Überstand abgenommen und anschließend mit 100 µl Färbelösung (TMB) je Well befüllt. Inkubation erfolgte über 20 Minuten bei Raumtemperatur. Die Färbereaktion wurde mit 100 µl 12%iger H₂SO₄ gestoppt. Die Platten wurden bei Wellenlängen von 450 nm und 630 nm ausgelesen und die Messwerte wie in 2.3.8.1 beschrieben voneinander subtrahiert.

3 Ergebnisse

Ziel der Arbeit ist die Etablierung einer Hochdurchsatzmethode zum Screening von RNAi-Versuchen, die einen Knockdown der PC-Produktion in *C. elegans* zufolge haben könnten. Hierzu ist die Verwendung eines ELISA am besten geeignet, da er im Vergleich zu anderen Methoden relativ einfach per Pipettierroboter erfolgen kann, sich die Auswertung weitestgehend automatisieren lässt und auch das Probenhandling durch die, in einer Deep-Well-Platte mögliche Aufzucht vieler *C. elegans*-Stämme, sehr ressourcensparend gestalten lässt.

In dem ELISA soll für jeden RNAi-Genknockdown die Menge von PC und von einem Housekeeping-Antigen über die Bildung einer Äquivalenz von Extinktion und Probenmenge ermittelt und miteinander verglichen werden. Ein Abfall des PC-Gehalts gegenüber dem Housekeeping-Antigen, wäre ein Hinweis für den Knockdown eines Enzymes, das in den PC-Stoffwechsel von *C. elegans* involviert ist.

3.1 Dot-Blot

Um die Verwendbarkeit von Ubiquitin als House-Keeping-Antigen und die Eignung von TEPC-15 zur Detektion von PC-modifizierten Proteinen nachzuweisen, wurde ein Dot-Blot durchgeführt. Hierzu wurden *C. elegans* (N2-Stamm) in Probenpuffer aufgenommen (siehe Abb. 3.1). Es zeigt sich ein deutliches Signal für beide Antikörper.

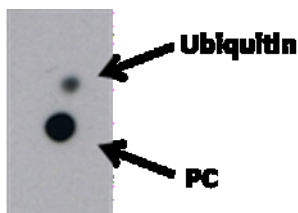


Abb. 3.1 Dot-Blot von *C. elegans* unter Verwendung des Ubiquitin- und PC-Antikörpers. Sowohl der Ubiquitin als auch der PC-Spot zeigen ein deutliches Signal.

3.2 Vergleich von Tubulin- und Ubiquitin-Antikörpern

Zur Quantifizierung des in den Proben vorhandenen Wurmmaterials musste ein möglichst sensibler und spezifischer Antikörper für eines der möglichen House-Keeping-Antigene gefunden werden. Hierzu wurde ein ELISA durchgeführt, bei dem sowohl ein Ubiquitin- als auch ein Tubulin-Antikörper für das gleiche Probenmaterial in unterschiedlichen Konzentrationen Verwendung fand. Zunächst wurden die lysierten *C. elegans* in 1350 μ L,

500 µL oder 200 µL Bindungspuffer aufgenommen und davon jeweils 10 µL, 50 µL oder 100 µL in die Wells der ELISA-Platte pipettiert.

Dabei zeigte sich, dass sowohl Ubiquitin als auch Tubulin als House-Keeping-Antigene zum Nachweis von *C. elegans* geeignet waren. Allerdings zeigte sich unter Verwendung des Ubiquitin-Antikörpers bei allen Konzentrationen eine höhere Extinktion als beim Tubulin-Antikörper (siehe Abb. 3.2).

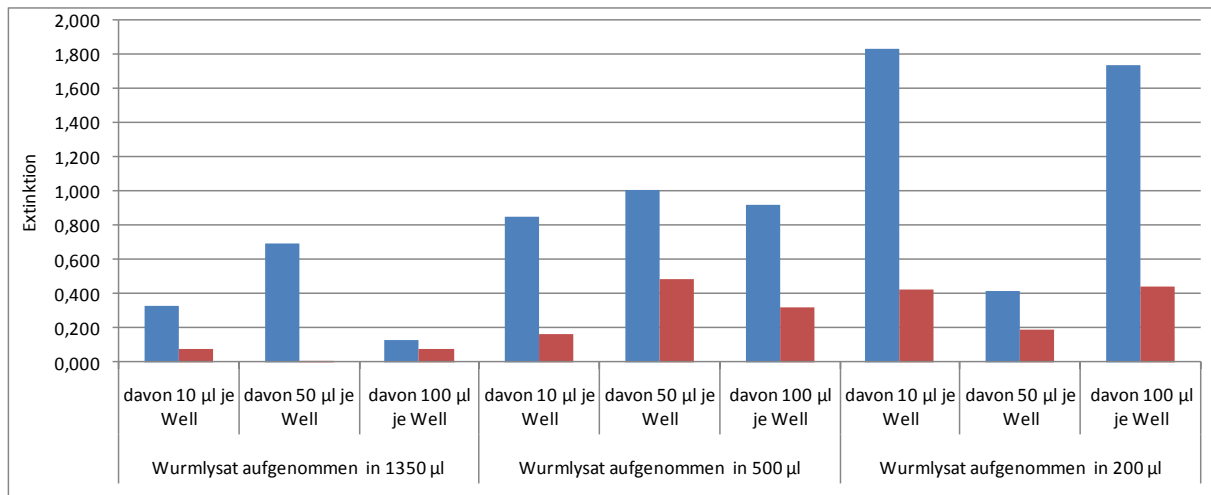


Abb. 3.2 Vergleich des Ubiquitin- (blau) und des Tubulinantikörpers (rot). Es zeigen sich bei allen Konzentrationen des *C. elegans*-Lysates höhere Extinktionswerte beim Ubiquitinantikörper. Die niedrigen Messwerte der 50 µl des in 200 µl aufgenommenen Wurmlysates wurden durch eine unzureichende Lösung im Bindungspuffer verursacht.

3.3 Blockierlösungen

Zu Beginn der Arbeit zeigte sich, dass sehr hohe Leerwerte die Ergebnisse beeinträchtigen. Zu hohe Leerwerte eines ELISA behindern insbesondere Bestimmungen von Antigenkonzentrationen, die Nahe an der Nachweisgrenze liegen. Aus diesem Grund wurden mehrere Blockierlösungen miteinander verglichen. Da mit einer selbsthergestellten BSA-Lösung keine akzeptablen Ergebnisse zu erreichen waren, wurde auf kommerzielle Lösungen zurückgegriffen. Hierunter befanden sich auch Lösungen auf Casein-Basis. Getestet wurden *BSA-Block*, *SmartBlock* und *The Blocking Solution* (alle Candor Bioscience GmbH, Weißenberg)[93]. Dabei wurden je zwei Wells pro Blockierlösung für die Leerwerte und je drei Kontrollansätze pro Blockierlösung mit je 2 µg Ubiquitinstandard pipettiert. Als Erstantikörper wurde für diesen Versuch ausschließlich der Ubiquitin-Antikörper verwendet, da hier ein niedriger Leerwert aufgrund der insgesamt niedrigen Extinktionswerte eine höhere Priorität bei der Methodenetablierung als die PC-Bestimmung hatte.

Dabei erhielt man bei der *The Blocking Solution* die niedrigsten Extinktionswerte für die Leerwerte (0,32 und 0,45) bei gleichzeitig erhaltener hoher Extinktion für die Standardproben (Mittelwert: 2,17). *SmartBlock* zeigte höhere Leerwerte (0,74 und 0,72) bei ebenfalls hoher Extinktion für die Standardproben (Mittelwert: 1,92), wobei *BSA-Block* die höchste Extinktion für die Leerwerte (0,92 und 1,43) bei sehr hohen Messwerten für die Standardproben (Mittelwert: 2,75) zeigte. Siehe Abb. 3.3.

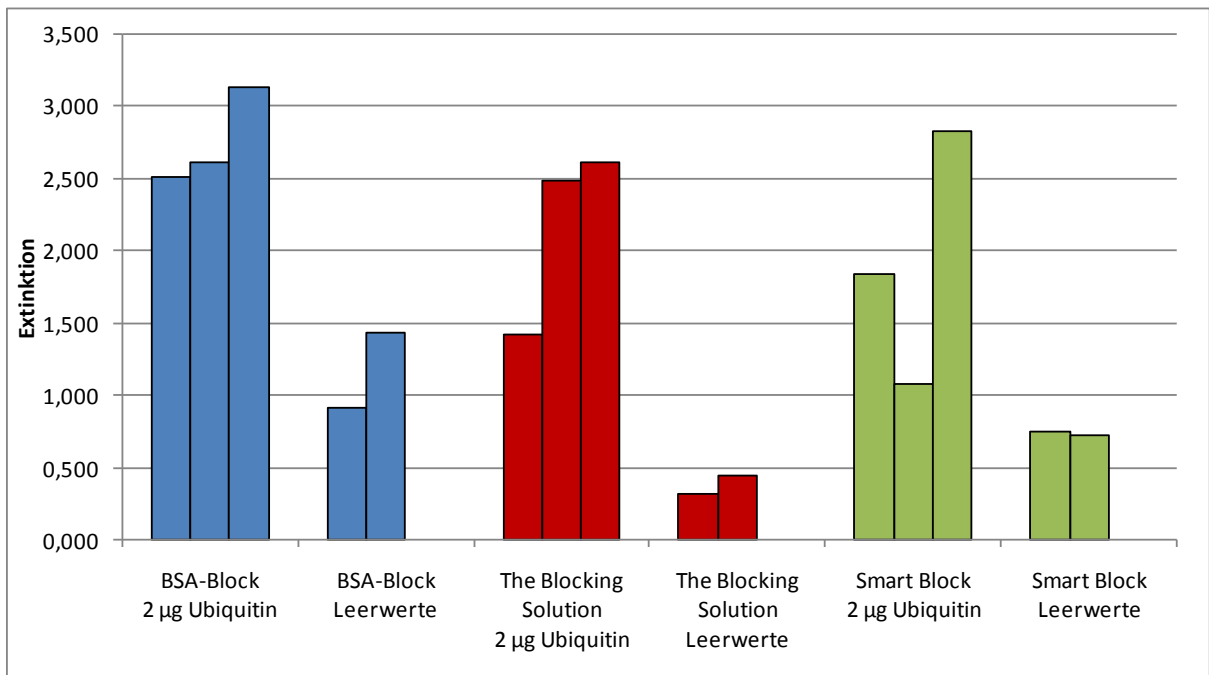


Abb. 3.3 Extinktionswerte unterschiedlicher Blockierlösungen; Ubiquitin-Leerwerte: *The Blocking Solution* zeigt die niedrigsten Extinktionswerte für Ubiquitin (0,32 und 0,45). *SmartBlock* mittlere Werte (0,74 und 0,72), während *BSA-Block* hier die schlechtesten Blockiereigenschaften aufweist (0,92 und 1,43). Für je 2 µg Ubiquitin-Standard zeigt *The Blocking Solution* im Mittel Extinktionswerte von 2,17. Die Messergebnisse von *SmartBlock* variieren stärker. Hier zeigt sich ein mittlerer Wert von 1,92. Bei *BSA-Block* liegen die Werte im Mittel bei 2,75.

3.4 Bindungspuffer

Für die optimale Bindung der zu untersuchenden Proteine ist ein Puffer notwendig, dessen pH-Wert die Struktur und Ladung der Proteine so modifiziert, dass möglichst viele Wasserstoffbrückenbindungen mit der hydrophilen Oberfläche der ELISA-Platten eingegangen werden können und gleichzeitig die Konfiguration der Eiweiße eine optimale Bindung der Antikörper erlaubt. Am wahrscheinlichsten erfüllen diese Eigenschaften Puffer

mit physiologischem pH-Wert, für spezielle Fragestellungen sind aber evtl. auch andere Puffer geeigneter.

Es wurde ein Acetat-, Carbonat- und Phosphatpuffer getestet. Der Acetatpuffer war mit einem pH von 5,5 der Sauerste. Der Phosphatpuffer lag mit einem pH-Wert von 7,4 im neutralen, der Carbonatpuffer mit pH 9,6 im alkalischen Bereich.

Zusammensetzung der Puffer:

Acetat: 50 mMol / L Natriumacetat mit Essigsäure auf pH 5,5

Carbonat: 0,1 Mol / L Na_2CO_3 mit HCl auf pH 9,6

Phosphat: 10 mMol / L ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 + \text{Na}_2\text{HPO}_4$) + 150 mMol / L NaCl pH 7,4 (siehe 2.3.8)

Es wurden je zwei Verdünnungsreihen mit Ubiquitinstandard und PC-BSA mit jeweils 10 pg, 50 pg, 100 pg, 1 ng, 10 ng, 50 ng, 100 ng, 1 µg pro Well und pro Bindungspuffer erstellt (Siehe Abb. 3.4).

	mit Acetatpuffer				mit Phosphatpuffer				mit Carbonatpuffer			
	mit Ubiquitin		mit PC-BSA		mit Ubiquitin		mit PC-BSA		mit Ubiquitin		mit PC-BSA	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Leerwert Ubi	Leerwert Ubi	Leerwert PC	Leerwert PC	Leerwert Ubi	Leerwert Ubi	Leerwert PC	Leerwert PC	Leerwert Ubi	Leerwert Ubi	Leerwert PC	Leerwert PC
B	10 pg	10 pg	10 pg	10 pg	10 pg	10 pg	10 pg	10 pg	10 pg	10 pg	10 pg	10 pg
C	50 pg	50 pg	50 pg	50 pg	50 pg	50 pg	50 pg	50 pg	50 pg	50 pg	50 pg	50 pg
D	1000 pg	1000 pg	1000 pg	1000 pg	1000 pg	1000 pg	1000 pg	1000 pg	1000 pg	1000 pg	1000 pg	1000 pg
E	10 ng	10 ng	10 ng	10 ng	10 ng	10 ng	10 ng	10 ng	10 ng	10 ng	10 ng	10 ng
F	50 ng	50 ng	50 ng	50 ng	50 ng	50 ng	50 ng	50 ng	50 ng	50 ng	50 ng	50 ng
G	100 ng	100 ng	100 ng	100 ng	100 ng	100 ng	100 ng	100 ng	100 ng	100 ng	100 ng	100 ng
H	1000 ng	1000 ng	1000 ng	1000 ng	1000 ng	1000 ng	1000 ng	1000 ng	1000 ng	1000 ng	1000 ng	1000 ng

Abb. 3.4 Pipettierschema einer 96er ELISA-Platte für den Bindungspuffertest. Getestet wurden drei unterschiedliche Bindungspuffer mit jeweils zwei Verdünnungsreihen (Ubiquitin und PC-BSA)

Der Acetatpuffer zeigte einen vergleichsweise schnellen Anstieg der Extinktionswerte bei einem Anstieg der Ubiquitinkonzentration von 10 auf 100 ng. Der Carbonatpuffer zeigte bei einem niedrigen Ubiquitingehalt von 50 pg einen Anstieg der Extinktionswerte und ab einem Gehalt von 100 ng pro Well eine Sättigung der Färbereaktion. Der Phosphatpuffer erreichte am ehesten eine ausgeglichene Eichkurve (siehe Abb. 3.5). Die Messwerte für PC-BSA befanden sich weitestgehend im Bereich der unteren Nachweisgrenze, sodass die Konzentrationen der PC-BSA-Standardreihe für die nachfolgenden ELISAs entsprechend abgeändert wurden (siehe Abb. 3.6).

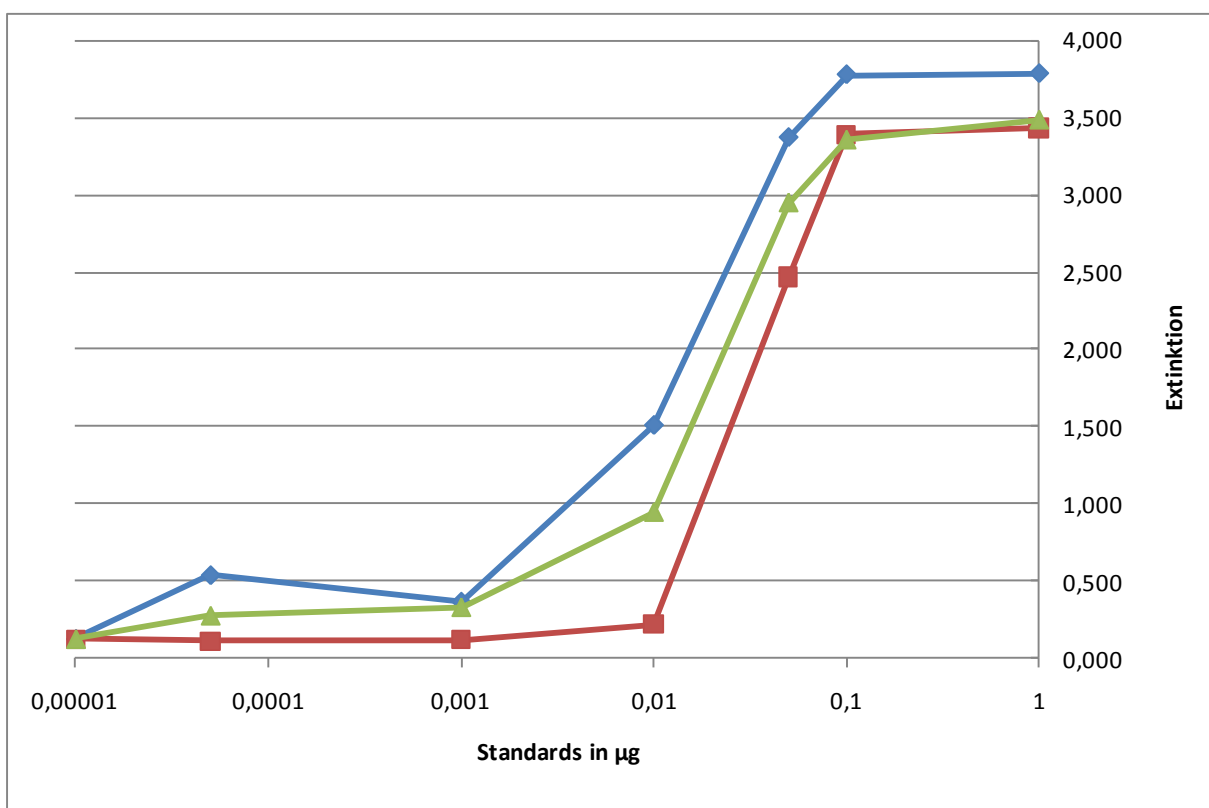


Abb. 3.5 Extinktionswerte der Ubiquitin-Verdünnungsreihen für den Carbonatpuffer (pH 9,6; blau), den Phosphatpuffer (pH 7,4; grün) und den Acetatpuffer (pH 5,5; rot). Bei letzterem zeigt sich ein vergleichsweise später und schneller Anstieg der Standardkurve, was eine Quantifizierung der entsprechenden Antigene nur in einem sehr geringen Konzentrationsbereich erlauben würde. Insgesamt entspricht die Kurve des Phosphatpuffers am ehesten einem sigmoidalen Verlauf.

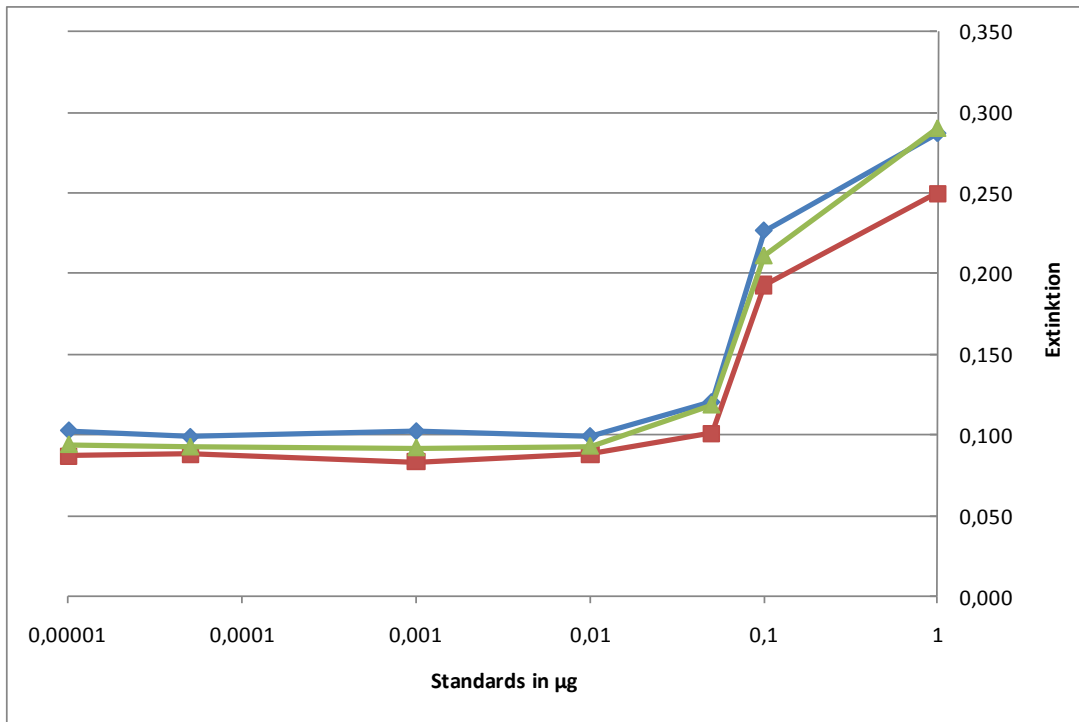


Abb. 3.6 Extinktionswerte der PC-BSA-Verdünnungsreihen für den Carbonatpuffer (pH 9,6; blau), den Phosphatpuffer (pH 7,4; grün) und den Acetatpuffer (pH 5,5; rot). In allen Fällen konnte PC erst ab einem Gehalt von 100 ng je Well nachgewiesen werden.

3.5 Optimierung der PC-BSA-Standardverdünnungsreihe

Für Quantifizierungen des Ubiquitin- bzw. PC-Gehalts sind lineare Bereiche der Standard-Extinktionskurven erforderlich. Da in vorherigen Versuchen der Gehalt von PC-BSA an der unteren Nachweisgrenze lag (vgl. 3.4), wurden erneut Verdünnungsreihen pipettiert. Hierbei lag der lineare Bereich zwischen 60 ng und 500 ng PC-BSA pro Well (siehe Abb. 3.7).

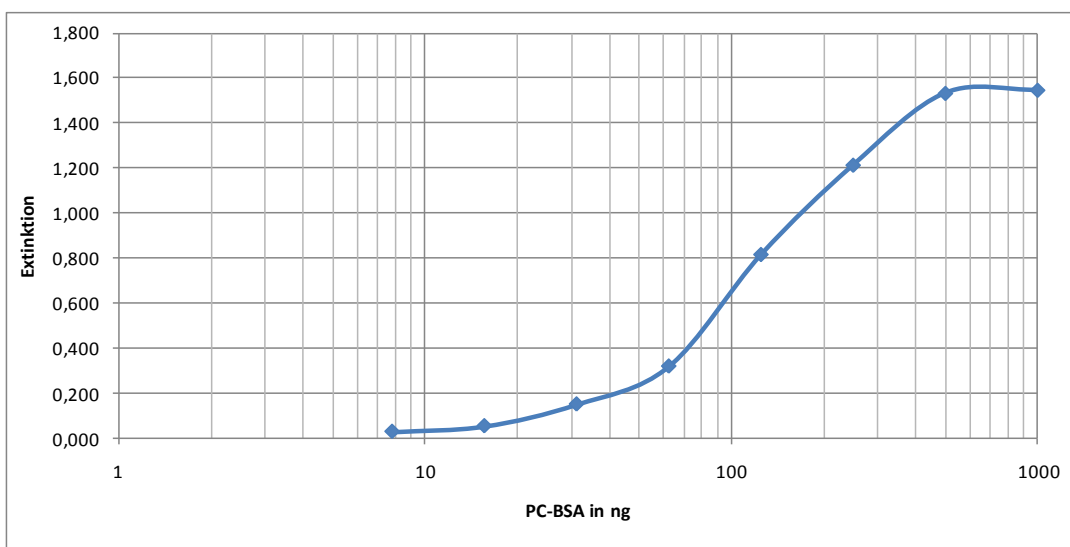


Abb. 3.7 Logarithmierte Darstellung der optimierten PC-Standardkurve. Der lineare Bereich für Quantifizierungen erstreckt sich von ca. 60 ng bis 500 ng PC-BSA pro Well.

3.6 Gewinnung von *C. elegans*-Eiern für die Synchronisation

Mehrfachmessungen bei einer Vielzahl von RNAi-Versuchen erfordern einen hohen Einsatz an Probenmaterial, daher ist es notwendig eine möglichst zeit- und materialeffektive Methode zu etablieren um die benötigten Mengen an synchronisierten L1-Larven zu erhalten. Außerdem dürfen bei der Eiextraktion nur möglichst wenige Zelltrümmer, *E. coli* und Agar-Reste bestehen bleiben, um spätere Messergebnisse nicht dadurch zu verfälschen.

Es wurden zwei Methoden zur Aufreinigung und Synchronisation der *C. elegans*-Würmer versucht. Die eine Methode überschichtet die gewaschenen und in M9-Puffer aufgenommenen Würmer und verwendet eine 30%ige Saccharoselösung (siehe 2.3.4.1). Die andere Methode (siehe 2.3.4.2) unterschichtet die Wurmlösung, hierbei wird ein anderer Dichtegradient verwendet (60%ige Saccharose). Bei beiden Methoden wurde dieselbe Bleiche verwendet. Es konnte gezeigt werden, dass die Überschichtungsmethode zu einer besseren Aufreinigung der Würmer führte, weniger Wurmreste bei den Eiern vorhanden waren und zudem noch zeitsparender war.

3.7 Vergleich – ELISA manuell und per Microlab Star^{let}-Pipettierroboter

Zur Etablierung einer Hochdurchsatzmethode für RNAi-Experimente war es notwendig die Zuverlässigkeit und Reproduzierbarkeit der Messergebnisse einer automatischen ELISA-Messung zu überprüfen. Hierzu wurden manuelle und per Pipettierroboter durchgeführte ELISAs miteinander verglichen.

Der ELISA per Roboter bietet den Vorteil des sehr genauen Umgangs mit Flüssigkeiten und mit Platten, die sehr viele Wells enthalten. Der Pipettierroboter kann über die elektrische Leitfähigkeit innerhalb der Pipettenspitzen das Eintauchen in Flüssigkeit detektieren und über Messungen des Drucks innerhalb der Spitze den Verlauf der Aspiration steuern. Dies macht es möglich die gewünschten Volumina von Flüssigkeiten, auch unterschiedlicher Dichte, sehr genau zu pipettieren. Versehentliche Verwechselungen von Wells kommen nicht vor. Die einzelnen Chemikalien können im Roboter temperiert werden. Als wichtigster Punkt ist es bei einer 384-Well-ELISA-Platte möglich alle Wells aus dem RNAi-Liquid-Feeding-Ansatz aus der 96er Deep-Well-Platte sowohl auf PC als auch auf Ubiquitin mit einem Mal zu

testen. Mit Einbeziehung der Eichkurve und Leerwerte wären für die gleiche Anzahl an Messungen mindestens drei 96-Well-ELISA-Platten notwendig.

Als Vorteile der manuellen Durchführung der ELISA sind sehr viel flexiblere Plattenbelegungsmöglichkeiten für Versuche mit kleinerem Probenumfang zu erwähnen. Hier können alle verwendeten Chemikalien und Volumina schnell an vorhandene Bedürfnisse angepasst werden, ohne dass erst eine Neuprogrammierung des Roboters nötig wäre.

Für den Vergleich wurde Ubiquitinstandard jeweils dreimal, PC-BSA jeweils zweimal und *C. elegans*-Extrakt jeweils 16mal angesetzt.

Folgende Mengen an Standards wurden verwendet (siehe Abb. 3.8):

Ubiquitin: 100 ng; 50 ng; 25 ng; 12,5 ng; 6,25 ng; 3,12 ng; 1,56 ng; 0,78 ng; 500 pg; 250 pg; 100 pg; 50 pg; 25 pg; 10 pg; 5 pg; 0 pg

PC-BSA: 1 µg; 500 ng; 250 ng; 100 ng; 50 ng; 10 ng; 1 ng; 0 ng

getestet auf Ubiquitin									getestet auf PC			
Ubiquitin-Standard									PC-BSA			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,78 ng	0,78 ng	0,78 ng	Leerwert Ubi	Leerwert Ubi	Leerwert Ubi	C. elegans	C. elegans	Leerwert PC	Leerwert PC	C. elegans	C. elegans
B	1,56 ng	1,56 ng	1,56 ng	5 pg	5 pg	5 pg	C. elegans	C. elegans	1 ng	1 ng	C. elegans	C. elegans
C	3,12 ng	3,12 ng	3,12 ng	10 pg	10 pg	10 pg	C. elegans	C. elegans	10 ng	10 ng	C. elegans	C. elegans
D	6,25 ng	6,25 ng	6,25 ng	25 pg	25 pg	25 pg	C. elegans	C. elegans	50 ng	50 ng	C. elegans	C. elegans
E	12,5 ng	12,5 ng	12,5 ng	50 pg	50 pg	50 pg	C. elegans	C. elegans	100 ng	100 ng	C. elegans	C. elegans
F	25 ng	25 ng	25 ng	100 pg	100 pg	100 pg	C. elegans	C. elegans	250 ng	250 ng	C. elegans	C. elegans
G	50 ng	50 ng	50 ng	250 pg	250 pg	250 pg	C. elegans	C. elegans	500 ng	500 ng	C. elegans	C. elegans
H	100 ng	100 ng	100 ng	500 pg	500 pg	500 pg	C. elegans	C. elegans	1 µg	1 µg	C. elegans	C. elegans

Abb. 3.8 Plattenbelegung des Hand-/Roboter-Vergleichs. Getestet wurde eine Ubiquitin- und eine PC-BSA-Verdünnungsreihe (jeweils Dreifach-bestimmungen) und *C. elegans*-Extrakt (16fach pro Antikörper).

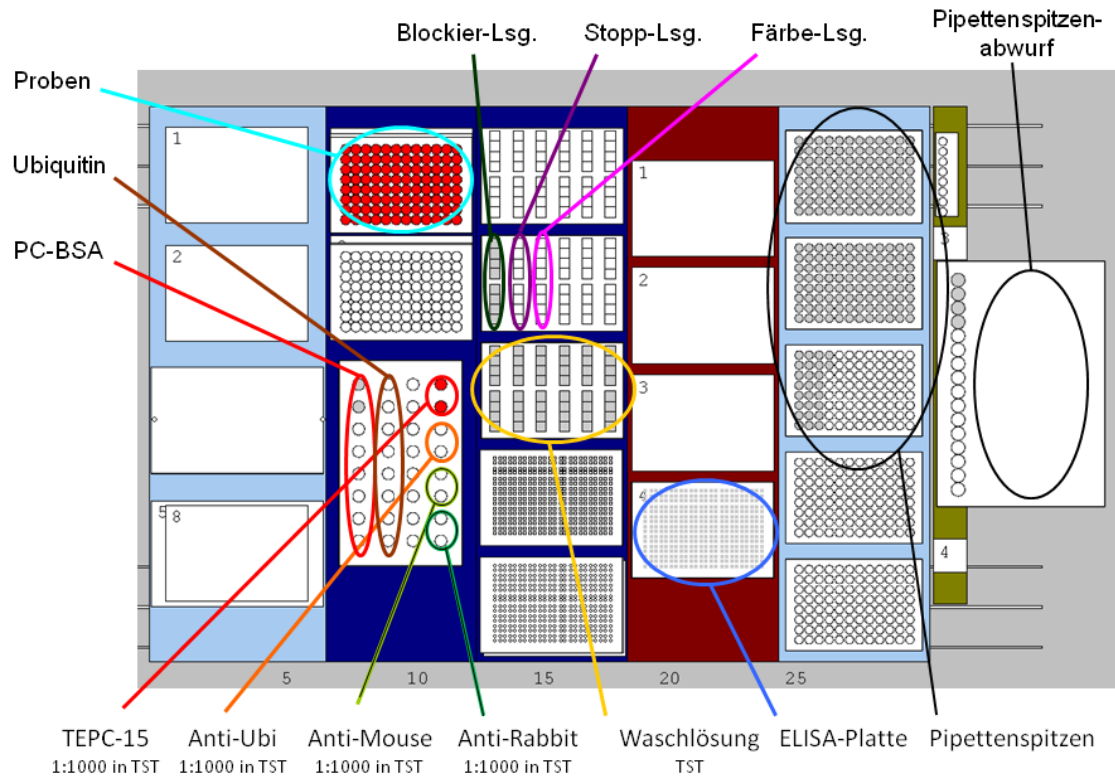


Abb. 3.9 Roboterbelegungsplan Übersicht des Versuchaufbaus im Roboter. Alle Module lassen sich individuell temperieren.

Die Leerwerte der automatischen ELISA lagen für Ubiquitin im Mittel bei 0,07, für PC bei 0,08 (siehe Abb. 3.10). Die Messungen für Ubiquitin zeigten einen Extinktionsanstieg ab einem Gehalt von ca. 0,7 ng Ubiquitin pro Well. Die Spannweite der Messwerte ging hier von 0,08 bis 0,20. Bei höheren Ubiquitinkonzentrationen zeigte sich ein insgesamt ansteigender, jedoch alternierender, Verlauf der Extinktionsrate bis zu einem Maximum von ca. 1,50 bei einem Ubiquitingehalt von 100 ng (siehe Abb. 3.11). Für PC-BSA zeigte sich ab einem Gehalt von ca. 50 ng eine gegenüber dem Leerwert erhöhte Extinktion von im Mittel 0,08. Die Messwerte zeigten bei 1000 ng die maximale Extinktionsrate von 0,93 (siehe Abb. 3.12). Die Werte für *C. elegans* lagen nach Abzug des Blank-Wertes im Mittel für Ubiquitin bei 0,04 und für PC bei 0,62.

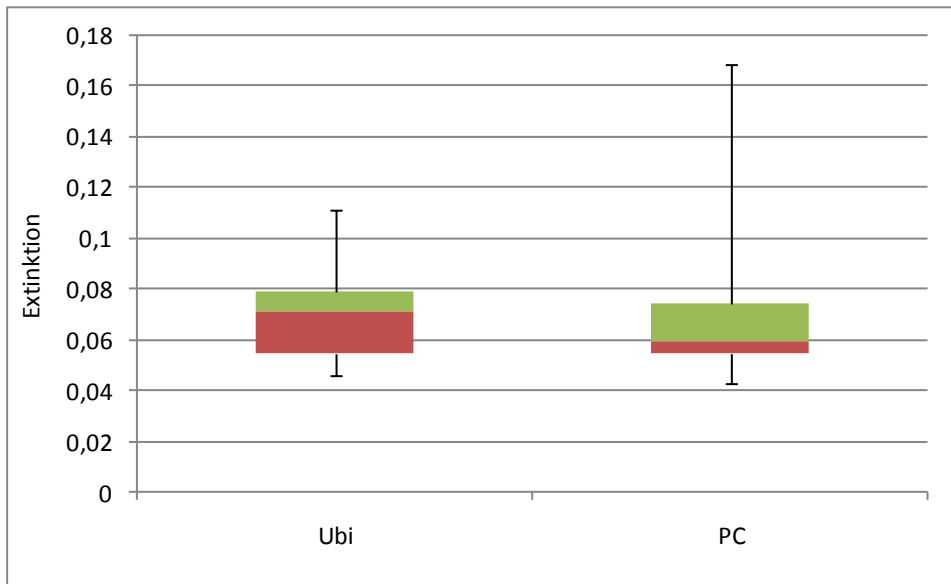


Abb. 3.10 Boxplot der Leerwerte des automatisch durchgeführten ELISA. Die Werte lagen für Ubiquitin im Mittel bei 0,07 und für PC-BSA bei 0,08.

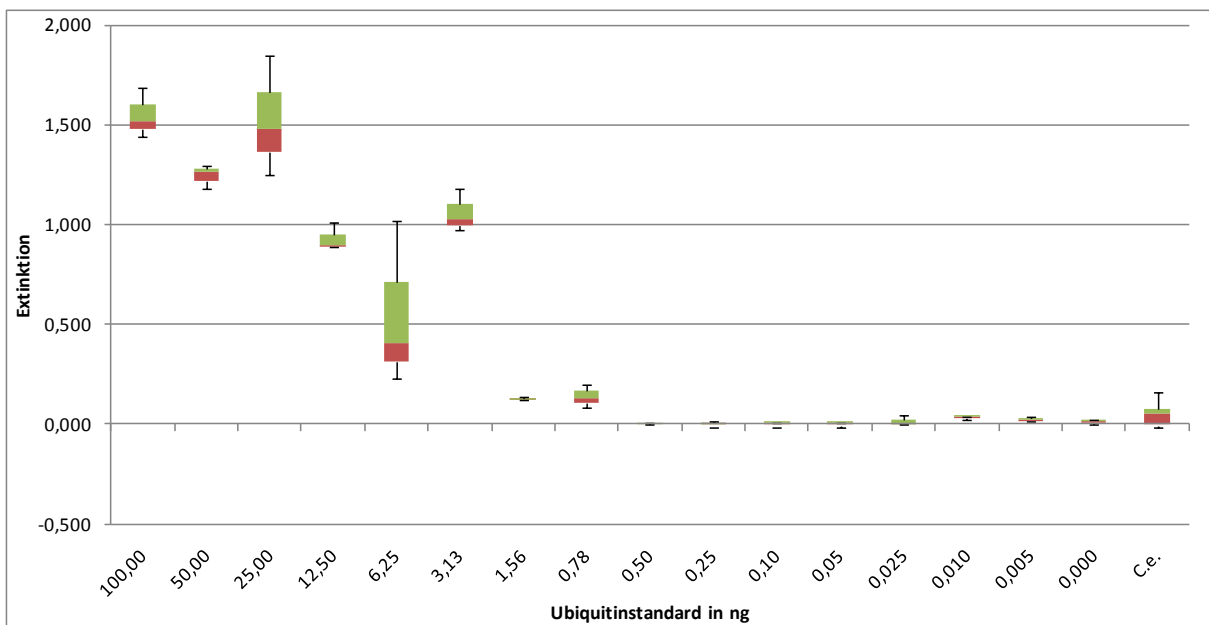


Abb. 3.11 Boxplot der Extinktionswerte des automatisch durchgeführten ELISA für Ubiquitin. Zu sehen ist ein Anstieg der Eichkurve ab einem Ubiquitingehalt von ca. 0,7 ng pro Well. Im weiteren Verlauf ist die Kurve alternierend, erreicht dann aber ihren maximalen Extinktionswert von ca. 1,5 bei einem Ubiquitingehalt von ca. 100 ng pro Well. Ubiquitin, aus 50 µl von in 500 µl Bindungspuffer gelöstem *C. elegans*-Lysat, konnte in diesem Versuch nur unzureichend nachgewiesen werden.

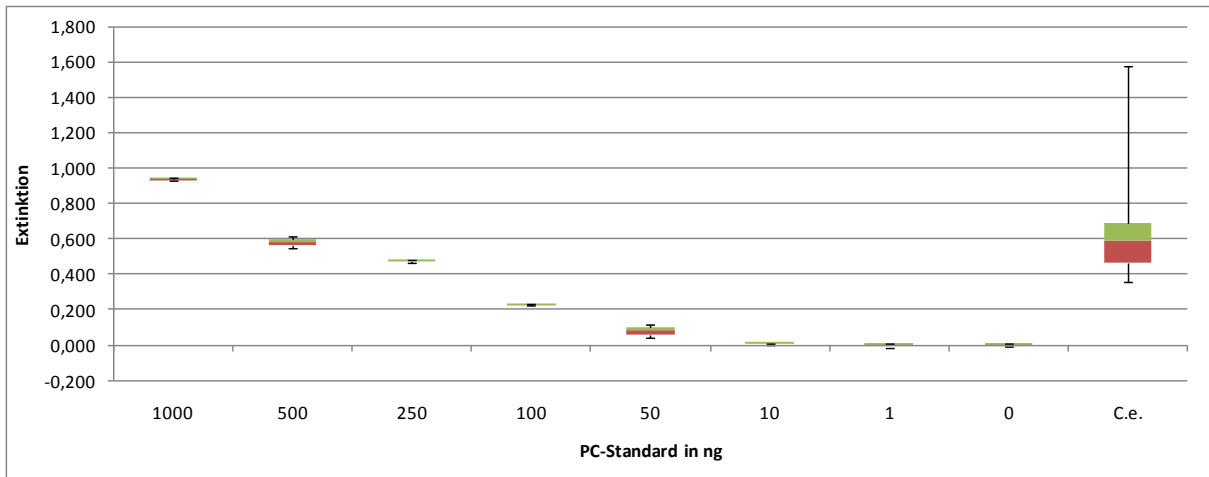


Abb. 3.12 Boxplot der Extinktionswerte der automatisch durchgeführten ELISA für PC-BSA. Zu sehen ist hier ein Anstieg der Extinktionswerte für PC-BSA ab einem Gehalt von ca. 50 ng pro Well. Die Eichkurve erreicht nach einem stetig ansteigenden Verlauf ihr Maximum bei einer Extinktion von 0,93. Der *C. elegans*-Extrakt (50 µl aus in 500 µl Bindungspuffer aufgenommenem Lysat) ergab hier eine mittlere Extinktion von 0,62.

Bei der von Hand pipettierten ELISA war ein erster Anstieg der Extinktionsrate ab einem Ubiquitingehalt von 1,5 ng zu erkennen (im Mittel hier 0,07). Es folgte ein, ebenso wie bei der automatischen ELISA alternierender, Anstieg der Eichkurve bis zu einem Maximum von 1,27 für 100ng Ubiquitin. Bei PC-BSA kam es ab einem PC-BSA-Gehalt von 100ng zu einer Extinktionserhöhung (im Mittel 0,07 nach Abzug des Blank-Wertes). Die Werte für *C. elegans* lagen nach Abzug des Blank-Wertes im Mittel für Ubiquitin bei 0,03 und für PC bei 0,09.

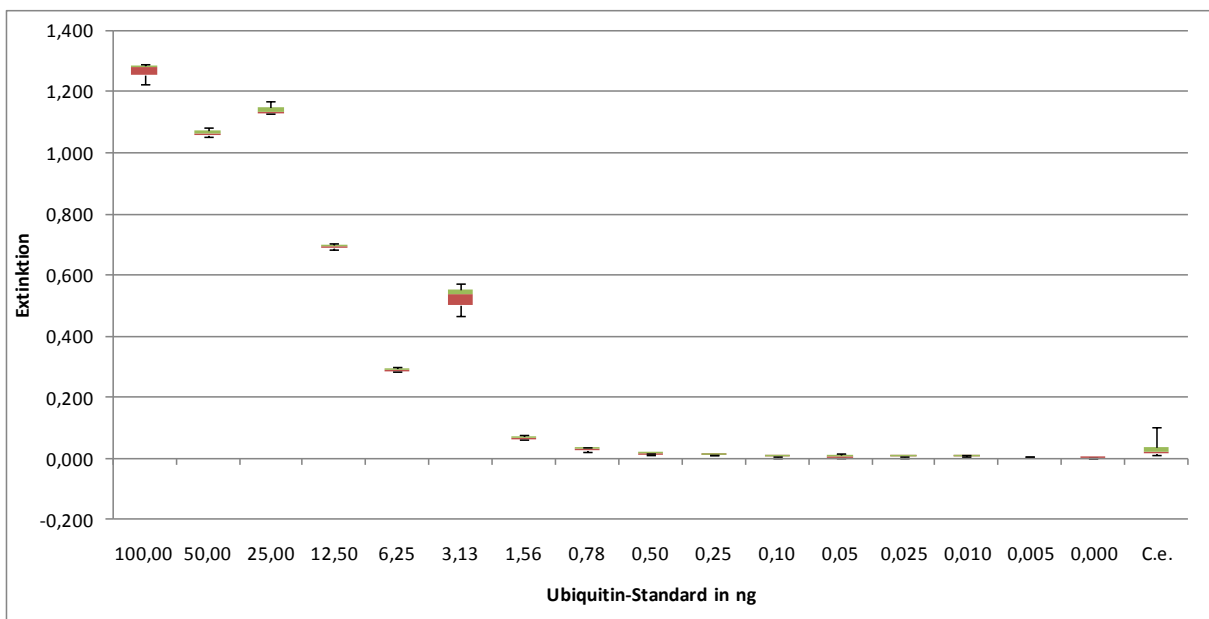


Abb. 3.13 Boxplot der Extinktionswerte der manuell durchgeführten ELISA für Ubiquitin. Zu sehen ist hier ein erster Anstieg der Eichkurve ab einem Gehalt von ca. 1,5 ng Ubiquitin pro Well. Auch der Verlauf der manuell pipettierten Standards ist alternierend und erreicht sein Maximum von 1,27 für ca. 100 ng Ubiquitin je Well. Ubiquitin aus *C. elegans* (50 µl aus in 500 µl Bindungspuffer aufgenommenem Lysat) konnte auch in diesem Versuch nicht nachgewiesen werden.

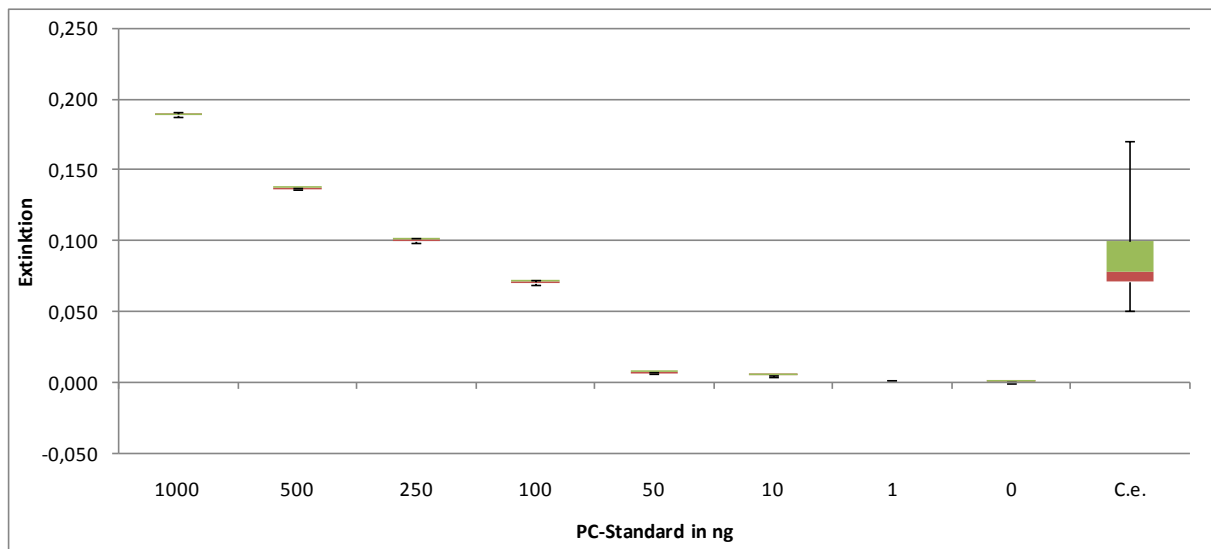


Abb. 3.14 Boxplot der Extinktionswerte der manuell durchgeführten ELISA für PC-BSA. Hier kam es ab einem Gehalt von ca. 100 ng PC-BSA je Well zu einem ersten Anstieg der Eichkurve, welche ihr Maximum bereits bei 0,19 für 1000 ng PC-BSA pro Well erreichte. Die Werte für *C. elegans* (50 µl aus in 500 µl Bindungspuffer aufgenommenem Lysat) lagen hier nach Abzug der Leerwerte im Mittel bei 0,09.

Im Vergleich des manuellen ELISA mit dem ELISA per Roboter zeigten sich nur geringe Unterschiede bei der Genauigkeit der Methoden, wobei der automatische ELISA Ubiquitin früher nachweisen konnte und im hohen Konzentrationsbereich höhere Extinktionswerte lieferte. Zusammen mit seinen anderen Vorteilen (s.o.) spricht dies für die Verwendung des Pipettierroboters.

3.8 Test eines alternativen Ubiquitinantikörpers

Für die Bestimmung des Ubiquitins musste ein möglichst optimaler Antikörper gefunden werden. Da sich der, während des Dot-Blots und des Hand-/Roboter-Vergleichs genutzte, Antikörper für den ELISA durch zu geringe Extinktionswerte als zu unsensitiv herausstellte, wurde ein neuer Antikörper (Acris Antibodies GmbH, Hiddenhausen) in einem automatischen ELISA getestet. Dieser zeigte bereits ab einem Ubiquitingehalt von 0,1 ng je Well einen beginnenden Anstieg der Eichkurve.

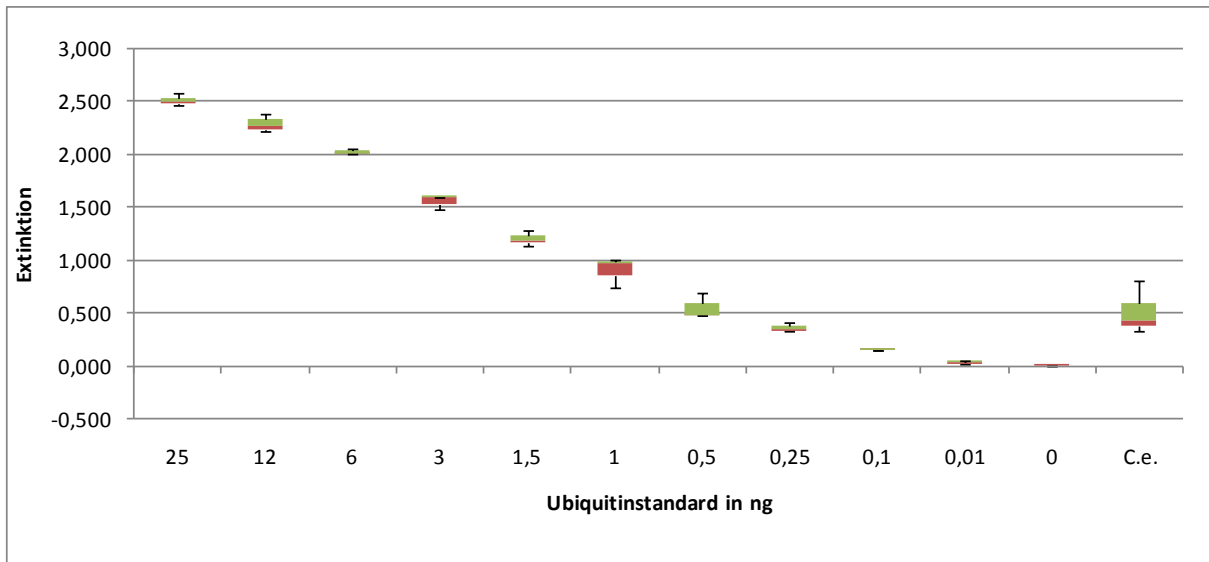


Abb. 3.15 Boxplot der Extinktionswerte des alternativen Antikörpers für Ubiquitin und *C. elegans*. Zu sehen ist hier ein Anstieg der Eichkurve bereits ab ca. 0,1 ng Ubiquitin pro Well. *C. elegans* (50 µl aus in 500 µl Bindungspuffer aufgenommenem Lysat) zeigte hier im Mittel Extinktionswerte von 0,49.

3.9 Vergleich - Liquid-Feeding und Zucht auf Agar

Zusammen mit dem alternativen Ubiquitinantikörper wurde die Materialausbeute und die damit verbundene ELISA-Tauglichkeit der Flüssig- und der Agar-Wurmaufzuchtmethode miteinander verglichen.

Für die Lyse der Würmer, die von den Agarplatten abgeerntet und gereinigt wurden, wurden jeweils 50 µl (ca. 20 Würmer) pro Well in eine Deep-Well-Platte gegeben und mit 1 mL SB und 50 µl *E. coli*-Lösung versetzt, um vergleichbare Bedingungen zur Liquid-Feeding-Methode zu erhalten. Insgesamt wurden 4 unterschiedliche Proben von den Agarplatten und 15 unterschiedliche Proben aus der Flüssigkultur verwendet. Nach der Extraktion im Ultraschallbad wurden jeweils Doppelwerte pipettiert.

Die Ubiquitin-Extinktionswerte für *C. elegans* (Agarplatte) lagen im arithmetischen Mittel bei 0,26 bei einer Standardabweichung von 0,06. Für PC lagen die Extinktionswerte von *C. elegans* (Agarplatte) bei 1,35 bei einer Standardabweichung von 0,39. Die Ubiquitin-Extinktionswerte für *C. elegans* (Liquid-Feeding) lagen im arithmetischen Mittel bei 0,29 bei einer Standardabweichung von 0,09 (siehe Abb. 3.15). Für PC lagen die Extinktionswerte von *C. elegans* (Liquid-Feeding) bei 0,51 bei einer Standardabweichung von 0,22 (siehe Abb. 3.16).

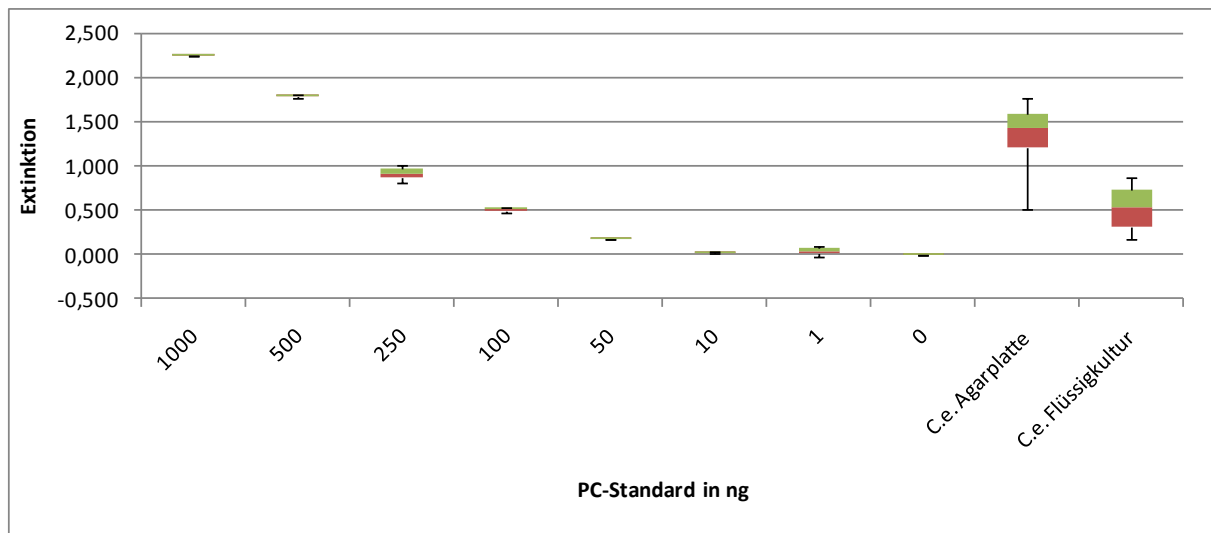


Abb. 3.16 Boxplot der PC-Extinktionswerte des Flüssigkultur- / Agarplattenvergleichs. Der mittlere PC-Extinktionswert für *C. elegans* (Liquid-Feeding) liegt hier bei 0,51. Der entsprechende Wert für *C. elegans* (Agarplatte) bei 1,35.

3.10 Anwendung der Methode auf ausgewählte RNAi-modifizierte *C. elegans*

Die Screening-Methode wurde exemplarisch auf einige Gene des Chromosoms I von *C. elegans* angewandt, die zu diesem Zeitpunkt noch nicht annotiert waren und bei denen ein RNAi-Knockdown zu einer Wachstumsretardierung oder zu einer Fertilitätsminderung geführt hatte. Hierzu wurden je Gen zwei Flüssigkultur-Ansätze vorbereitet. Von den gemessenen Extinktionswerten wurden zunächst die jeweiligen Mittelwerte berechnet und mit ihnen anschließend, anhand des linearen Anteils der Standardkurve, Standard-Äquivalente ermittelt, um die Werte von PC und Ubiquitin miteinander vergleichen zu können. Die Äquivalente von PC wurden nun mit denen des Ubiquitins ins Verhältnis gesetzt und vom erhaltenen Quotienten erneut Mittelwerte gebildet. Für alle 80 Gene des Gen-Knockdowns in diesem Versuch wurde so ein mittlerer Quotient von PC- zu Ubiquitin-Äquivalent von 12,4 (Standardabweichung von 2,3) ermittelt. Zur besseren Darstellung wurden die Namen der einzelnen Gene anhand der Größe dieser Quotienten sortiert (siehe Abb. 3.17).

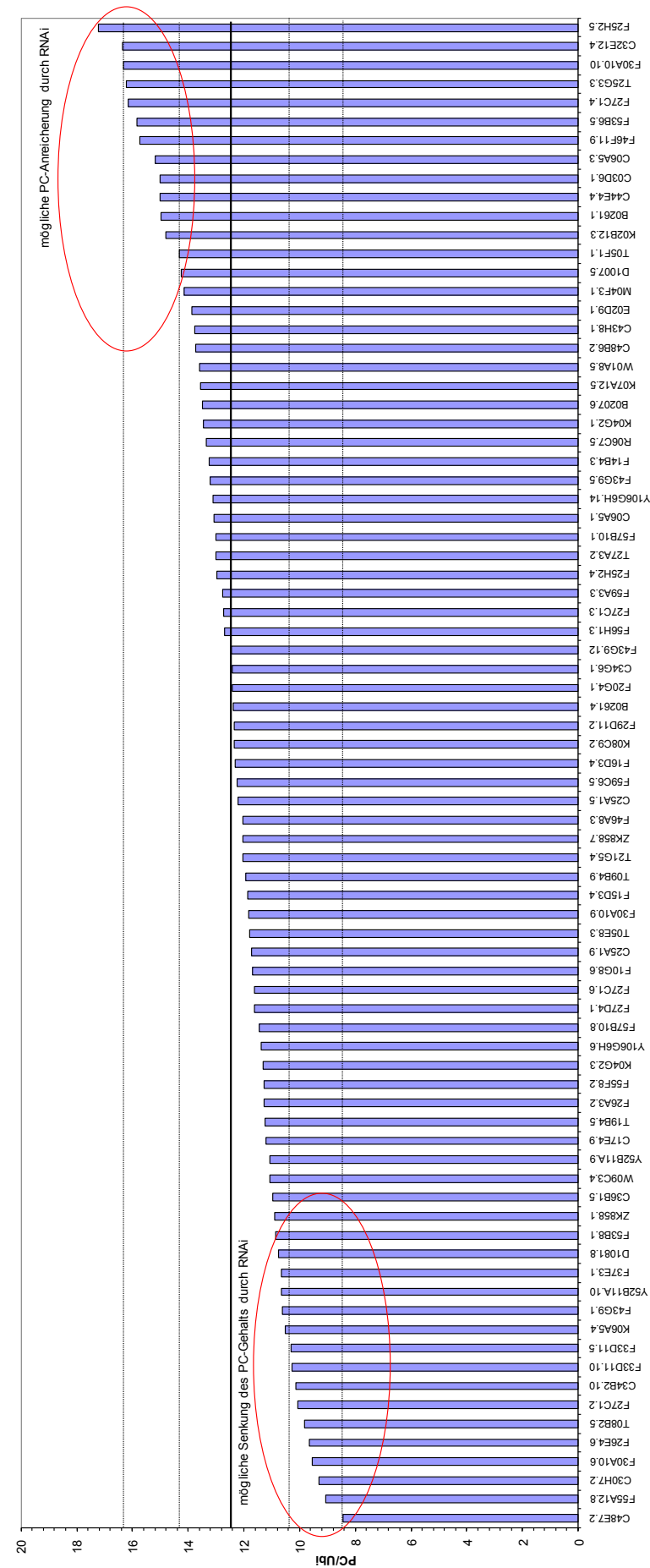


Abb. 3.17 Sortierte Darstellung der Verhältnisse von PC- zu Ubiquitin-Äquivalent für die jeweiligen RNAi-Gen-Knockdowns. Der Mittelwert dieser Verhältnisse liegt bei 12,4 bei einer Standardabweichung von 2,3.

Es zeigt sich hier ein niedriges PC- zu Ubiquitinverhältnis für die Gene C48E7.2, F55A12.8, C30H7.2, F30A10.6, F26E4.6 und T08B2.5. Ein hohes Verhältnis zeigten vor allem F53B6.5, F27C1.4, T25G3.3, F30A10.10, C32E12.4 und F25H2.5. Das Gen F30A10.10 mit einem Verhältnis von 16,3 codiert für eine Ubiquitin-Hydrolase (siehe Tabelle 3-1), wodurch das prinzipielle Funktionieren der Methode bestätigt wird.

Tabelle 3-1 Zuordnung von Genen und ihren Proteinprodukten für die 10 niedrigsten und die 10 höchsten PC- zu Ubiquitin-Äquivalent-Verhältnisse.

Gen	PC/Ubiquitin	Funktion nach Wormbase.org Version WS212
C48E7.2	8,438	RNA Polymerase III
F55A12.8	9,067	ATPase in Verbindung einer Acetyltransferase
C30H7.2	9,299	Thiodisulfid-Isomerase
F30A10.6	9,539	SAC 1 PIP Phosphatase
F26E4.6	9,637	Cytochrom-C-Oxidase
T08B2.5	9,809	RNA-bindendes Protein RBM5
F27C1.2	10,062	Kupfer-Transporter
C34B2.10	10,121	Reporter-Fusionsprotein
F33D11.10	10,286	RNA-Helicase FAL1
F33D11.5	10,314	Kalium-Kanal
C44E4.4	15,008	RNA-bindendes Protein La
C03D6.1	15,011	Translation-Initiations-Faktor 2C
C06A5.3	15,184	Transkriptions-Koaktivator
F46F11.9	15,727	Protein mit möglichem Einfluss auf die Meiose GSG1
F53B6.5	15,855	Metallopeptidase
F27C1.4	16,167	unbekannt
T25G3.3	16,236	NMD-Protein
F30A10.10	16,327	Ubiquitin-Hydrolase
C32E12.4	16,361	unbekannt
F25H2.5	17,213	Nukleosiddiphosphat-Kinase

3.11 Zusammenfassung der Ergebnisse

Für die Hochdurchsatzmethode zur Detektion von RNAi-Knock-Outs werden zunächst 2-3 Agarplatten *C. elegans* auf das L1-Larvenstadium synchronisiert und die Larven zusammen mit RNAi-*E. coli*-Stämmen für 72 Stunden bis zum Erreichen des adulten Stadiums inkubiert. Für die Lösung der Proteine werden die Nematoden lysiert und zur späteren Aufkonzentrierung gefriergetrocknet. Die ELISA wird per Pipettierroboter mit Inkubationszeiten über Nacht durchgeführt. Hierbei wird ein Phosphatpuffer zur Bindung der Antigene benutzt. Die Blockierung erfolgt mit *The Blocking Solution*. Die Antikörper werden 1:1000 in Tween-20-haltiger Waschlösung gelöst. Durch Verwendung des House-Keeping-Antigens Ubiquitin - hier wurden zwei Antikörper getestet - ist ein Vergleich der Messwerte

möglich. Tubulin als House-Keeping-Antigen führte zu geringeren Extinktionswerten bei gleicher Konzentration von *C. elegans*-Proteinen. Die Nachweisgrenze liegt bei ca. 0,5 ng Ubiquitin-Äquivalent bzw. bei ca. 50 ng für PC-BSA. Eine Anwendung der Methode auf einige Gen-Knockdowns per RNAi zeigt sowohl einen möglichen Abfall als auch einen möglichen Anstieg des PC-Gehalts für mehrere Gene. Insbesondere konnte dem Gen F30A10.10, das im Test der Methode mit ausgewählten Genen des Chromosoms I enthalten war, in einer späteren Datenbanksuche die Funktion einer Ubiquitin-Hydrolase zugeordnet werden.

4 Diskussion

4.1 Nutzung des Screenings zur Identifikation von Enzymen des PC-Stoffwechsels

Mit Hilfe des Hochdurchsatzscreenings soll es möglich sein eine Reduktion von Phosphorylcholin im Vergleich zur insgesamt eingesetzten Menge von *C. elegans* für möglichst viele RNAi-Versuche nachzuweisen. Solch ein Absinken der PC-Konzentration wäre ein Hinweis darauf, dass ein PC-Substitutionsmechanismus oder ein PC-Synthesemechanismus durch den Knockdown eines dafür verantwortlichen Gens stattgefunden haben muss. Um die Anzahl der zu untersuchenden Gene einzuschränken, muss zunächst eine Vorauswahl getroffen werden. Dabei sollten alle bereits identifizierten und einem Protein zugeordneten Gene und alle Gene, die in RNAi-Versuchen keine Fertilitätsminderung von *C. elegans* zeigten, von vornherein ausgeschlossen werden, um Aufwand und Kosten des Screenings gering zu halten.

Nach dem Messen der Extinktionen sollten, wie in Kapitel 2.3.8.1 beschrieben, die Messwerte der 630 nm-Messung von denen der 450 nm-Messung abgezogen werden, um Störeffekte durch Luftblasen oder Unreinheiten der ELISA-Platte zu vermeiden. Anschließend ist es notwendig, die Messergebnisse des House-Keeping-Antigens und des PCs zunächst auf der jeweiligen Standardkurve abzutragen um Äquivalenzmengen zu bestimmen, mit denen dann die Bildung eines Quotienten PC zu Ubiquitin möglich ist. Dies ist nötig, da der Zusammenhang zwischen Extinktion des ELISA und Antigenkonzentration nicht linear ist, sondern einen sigmoidalen Verlauf hat. Es stellte sich heraus, dass eine vorherige Logarithmierung der Werte zu einfacheren Vergleichbarkeit führt. Für eine sicherere Aussage, ob der PC-Ubi-Quotient im Verhältnis zu denen der anderen *C. elegans*-Lysate kleiner ist, müssen unbedingt Mehrfachmessungen als auch Mehrfachansätze des RNAi-Versuchs durchgeführt werden, da sowohl der ELISA selbst als auch der RNAi-Versuch eine Reihe von Fehlerquellen aufweist. Außerdem ist nicht in jedem Falle ein starkes Absinken des PC- zu Ubiquitin-Verhältnisses zu erwarten, da selbst bei fehlerfreier Messung und erfolgreichem Gen-Knockdown alternative Stoffwechselwege in *C. elegans* zur Verfügung stehen können, die den Verlust eines Genproduktes kompensierten. Hinzu kommt, dass

teilweise mehrere Gene für ein Protein codieren und es nicht sicher ist, in welchem Maße ein teilweiser Knockout zu einer Funktionsminderung führt.

Exemplarisch wurde das Screening für einige Gene des Chromosom I von *C. elegans* durchgeführt (siehe 3.10). Hierbei konnten allerdings keine PC-spezifischen Gene identifiziert werden, was durch die geringe Anzahl der Gene in diesem Versuch auch nicht wahrscheinlich war. Jedoch konnte, durch die Zuordnung des Gens F30A10.10 zu einer Ubiquitin-Hydrolase in einer späteren Datenbanksuche, das prinzipielle Funktionieren der Methode gezeigt werden.

4.2 Vor- und Nachteile des Hochdurchsatzscreenings

4.2.1 Kultivierung und Aufreinigung von *C. elegans*

Ein großer Vorteil von *C. elegans* ist die Möglichkeit die Nematoden sowohl auf Agarplatten als auch in Flüssigkultur aufzuziehen. Dies ermöglicht ein einfaches Handling - besonders, wenn sehr viele unterschiedliche RNAi-Ansätze durchgeführt werden sollen. So ist es möglich die entsprechenden RNAi-*E. coli*-Stämme in einer 96er Deep-Well-Platte zu inkubieren und sie dann direkt mit einer Mehrkanalpipette in die jeweiligen Wells der Deep-Well-Platte, die zur Wurmaufzucht gedacht ist, zu pipettieren. Auch beim späteren Lysieren und Zentrifugieren in der Speed-Vac sind die Arbeitsschritte sehr zeitsparend, da kein Umpipettieren in andere Gefäße notwendig ist. Problematisch ist es, dass derzeit leider keine Deep-Well-Platten mit transparentem Flachboden erhältlich sind, was die Mikroskopierbarkeit bei großen Ansätzen deutlich erschwert. Außerdem muss beim Schütteln der Platten während der Inkubation auf die Vermeidung von Kreuzkontaminationen geachtet werden, insbesondere bei dem *C. elegans*-Ansatz ist dies schwierig, da ein luftdichter Verschluss der einzelnen Wells zu einem Tod der Nematoden führen kann.

Um die notwendigen Mengen an *C. elegans*-L1-Larven (mehrere Hundert bis Tausend) zu erhalten, müssen aus einer großen Menge *C. elegans* möglichst viele Eier extrahiert werden. Dabei erwies sich die Übersichtungsmethode als diejenige, die den größten Reinheitsgrad bzgl. Zelltrümmern und *C. elegans*- und *E. coli*-Resten aufwies. Die *C. elegans*-Reste sind durch ihre noch enthaltenen Proteine für den RNAi-Versuch am hinderlichsten, da die

Eiweiße bereits vor der Kultivierung in Flüssigkultur entstanden sind und so zu falsch positiven und falsch negativen Ergebnissen führen können. Auch Kollagenreste oder noch vorhandene DNA-Bruchstücke können die Löslichkeit weiterer Proteine negativ beeinflussen oder die Auswertung im Photometer stören. Beim Abzentrifugieren machte wahrscheinlich der hohe Saccharosegehalt, welcher zu einem ungünstigen Dichtegradienten der mit M9-Puffer zu waschenden Wurmlösung führte, eine Aufkonzentrierung der Eier schwierig. Hier sollte evtl. eine Filtrationsmethode in Erwägung gezogen werden, da der Verlust an Eiern momentan noch recht hoch ist.

4.2.2 Notwendigkeit der Synchronisierung der Larvenstadien für RNAi

Analog zu den zu vermeidenden Wurmresten bei der Eigewinnung ist es notwendig einen RNAi-Versuch ausschließlich mit den L1-Larven von *C. elegans* zu starten, damit keine Würmer, die sich noch von normalen *E. coli*s ernähren konnten, PC-modifizierte Proteine in den ELISA mit einbringen können. Da PC-modifizierte Proteine auch für den Entwicklungsprozess von *C. elegans* von der L1-Larve bis zum adulten Wurm notwendig sind, ist ein möglichst frühes Einsetzen des Gen-Knockdown-Mechanismus anzustreben.

4.2.3 Vor- und Nachteile der Durchführung per Pipettierroboter

Die Durchführung des ELISA mithilfe des Pipettierroboters bringt für das Hochdurchsatz-Screening eine Reihe von Vorteilen mit sich: Zum einen ist durch die immer gleichen Arbeitsabläufe eine hohe Reproduzierbarkeit der Messungen gewährleistet, was vor allem für die durchzuführenden Mehrfachmessungen von großer Wichtigkeit ist. Desweiteren erlaubt die automatische Ausführung entweder die Nutzung von personellen Ressourcen zu anderen Zwecken oder die Arbeit mit einer Vielzahl von parallel angesetzten Versuchen. Weitere Verbesserungsmöglichkeiten wären hier noch Module des Roboters, die ein Waschen der ELISA-Platten ohne manuelles Ausklopfen erlauben, was einen kompletten ELISA von der Bindung der Proben bis zur abgeschlossenen Färbung ohne Unterbrechungen möglich machen würde. Der Roboter bietet weiterhin den Vorteil, dass Fehler wie Verwechslungen von Wells oder Spritzer beim Pipettieren, die zu Kreuzkontaminationen führen, vermieden werden können.

Bei der derzeitigen Anzahl von Genen, die nach der Vorauswahl für evtl. PC-spezifische RNAi-Versuche 416 beträgt, wären für eine einmalige Untersuchung 8 Deep-Well-Platten für die

C. elegans-Ansätze notwendig, welche mit ebenfalls 8 384er ELISA-Platten untersucht werden könnten. Um die Reliabilität des ELISA zu testen, sollte dieser aber mehrfach durchgeführt werden. Auch der RNAi-Ansatz selbst sollte für statistisch sicherere Aussagen mehrmals wiederholt werden.

Als Nachteile des Screenings per Roboter sind zu nennen: Höhere Materialkosten durch Sicherheitsreste der verwendeten Chemikalien (um Luftblasen in der Pipettenspitze zu vermeiden), einen, im Vergleich zum geübten Experimentator, geringere Pipettiergeschwindigkeit und eine fehlende Flexibilität beim Umgang mit kurzfristig geänderten Versuchsbedingungen. Beispielsweise müssen beim Pipettieren per Roboter alle Wells der 96er Deep-Well-Platte mit Flüssigkeit befüllt sein, um eine Fehlermeldung zu vermeiden, auch wenn weniger Proben untersucht werden sollen. Eine entsprechende Programmierung, die jede dieser Eventualitäten abdeckt, wäre unverhältnismäßig zeitaufwendig.

4.2.4 Bindungspuffer

Die Verwendung eines optimalen Bindungspuffers stellt einen wichtigen Punkt in der ELISA-Entwicklung dar. Für die *C. elegans*-Extrakte wurden hierfür ein Acetat-, ein Carbonat- und ein Phosphatpuffer mit unterschiedlichen pH-Werten, welche einen Einfluss auf das zu immobilisierende Protein haben können [94], getestet, um möglichst hohe Extinktionswerte für niedrige Konzentrationen von PC und Ubiquitin zu erhalten. Hierbei zeigte sich die niedrigste untere Nachweisgrenze für Ubiquitin beim Phosphatpuffer. Auch der Verlauf der Eichkurve entsprach hier am ehesten dem zu erwartendem sigmoiden Verlauf. Abweichungen waren z.B. beim Carbonatpuffer zu beobachten. Beim Acetatpuffer wurde Ubiquitin erst bei einer hohen Konzentration nachgewiesen.

4.2.5 Blockierlösungen

Zur Vermeidung hoher Leerwerte, besonders bei insgesamt niedrigen Extinktionswerten, ist eine möglichst optimale Blockierung der Well-Oberfläche notwendig, um ein Binden der Antikörper an Stellen, die kein Probenmaterial gebunden haben, zu vermeiden, da es sonst zu falsch positiven Testergebnissen kommt. Die Blockierlösung muss dementsprechend möglichst sämtliche Lücken von unterschiedlicher Größe zwischen den gebundenen

Proteinen schließen, darf nicht mit den verwendeten Antikörpern kreuzreagieren und darf die Bindungsstellen zwischen Antigen und Antikörper nicht überlagern.

Am geeignetsten erwies sich hier *The Blocking Solution* (Candor Bioscience GmbH). Sie zeigte die niedrigsten Leerwerte im Vergleich zu *BSA-Block* und *SmartBlock* bei gleichzeitig erhaltener hoher Extinktion für die Standards. *The Blocking Solution* basiert wie *SmartBlock* auf Caseinen unterschiedlicher Größe, ist aber zusätzlich, nach Angaben des Herstellers, noch chemisch modifiziert, um Austausch-Reaktionen zwischen Blockierschicht und Probenmatrix zu verringern.

4.2.6 Wahl der Antikörper

Für optimale Ergebnisse des ELISA ist die Wahl der richtigen Antikörper unabdinglich. Sie müssen eine ausreichende Affinität zu den Proben und möglichst wenig Kreuzreaktivitäten mit anderen Proteinen haben. Auch die richtige Verdünnung der Antikörper ist wichtig für das Gelingen eines ELISA, so führte beispielsweise die Lösung des Ubiquitinantikörpers in einer BSA-haltigen Waschlösung während dieser Arbeit zu dessen Blockierung, wodurch ein fehlendes Extinktionssignal selbst bei hochkonzentrierten Standards resultierte. Ein Verzicht auf BSA löste dieses Problem. Anti-Ubiquitin wurde hier als Antikörper des House-Keeping-Antigens ausgewählt, da Ubiquitin in allen Zellen von *C. elegans* vorkommt und im Vergleich zu Tubulin höhere Extinktionswerte lieferte und dadurch die Differenz zu den Leerwerten größer war.

4.2.7 Inkubationszeiten

Die Festlegung der Inkubationszeiten spielt in der ELISA-Entwicklung eine wichtige Rolle. Für diese Arbeit wurden, außer für die Färbereaktion, sämtliche Inkubationszeiten des ELISA auf „über Nacht“ festgesetzt. Dies vermeidet u.a. Randeffekte, die durch ein schnelleres Erwärmen und wieder Abkühlen der äußeren als der inneren Wells der ELISA-Platte entstehen. Auf diese Weise werden auch mehr Wells der ELISA-Platte nutzbar, da kein „Rand“ mehr mit Waschlösung pipettiert werden muss. Eine Inkubation über Nacht bei 4 °C ermöglicht langsamere, aber dafür vollständig abgelaufene Bindungen und schützt die Proteine von *C. elegans*, deren Temperaturoptimum bei 17 °C liegt, vor einer Denaturierung durch Hitze, wodurch sich auch die Wahrscheinlichkeit spezifischer Antikörperbindungen erhöht.

4.3 Ausblick

Mit der hier vorgestellten Methode zum Hochdurchsatz-Screening von RNAi-Versuchen an *C. elegans* soll es möglich sein, Gene PC-modifizierender Enzyme zu identifizieren. Als mögliche Positivkontrollen wären hier die Gene der Cholin kinase des Kennedy-Pathways zu nennen. Hierzu müssten allerdings gleichzeitig Reaktionen des Bremer-Greenberg-Stoffwechselwegs inhibiert werden. Mit der Methode sollten so PC-Transferasen oder aber bisher unbekannte Enzyme des PC-Synthese-Stoffwechsels identifiziert werden. Im Falle einer Identifikation einer PC-Transferase könnten so, über die mit dem entsprechenden Gen bereits bekannte Aminosäuresequenz und über weitere Untersuchungen zur Proteinstruktur, Ansatzpunkte zur Medikamentenentwicklung gegen Nematodeninfektionen entstehen.

5 Zusammenfassung

5.1 Zusammenfassung

Phosphorylcholin-Modifikationen an Proteinen und Glycosphingolipiden spielen eine entscheidende Rolle für die Fähigkeit vieler Nematoden das menschliche Immunsystem zu modulieren und lange Zeit im Wirt zu persistieren. Dies führt zu einer Vielzahl chronischer Erkrankungen wie z.B. Onchozerkose oder Elephantiasis, aber auch zu einem verminderten Auftreten von Allergien oder autoimmunologischen Erkrankungen. Zur Erforschung der zugrundeliegenden Mechanismen ist *C. elegans* ein ausgezeichnete Modellorganismus.

In dieser Arbeit wurde eine Methode zum Screening von RNAi-Knockdowns in *C. elegans* etabliert. Es soll eine quantitative Bestimmung des PC-Gehaltes gegenüber dem Housekeeping-Antigen Ubiquitin für jeden RNAi-Stamm ermöglicht werden, um den möglichen Knockdown einer PC-Transferase oder anderer, bisher unbekannter, am PC-Stoffwechsel beteiligter, Enzyme zu erkennen. Die Identifizierung solcher Enzyme wäre ein wichtiger Ansatzpunkt für die Entwicklung von Medikamenten gegen Nematodeninfektionen.

Für das Hochdurchsatzscreening wurden die Abläufe von der Aufzucht der Würmer, über deren Synchronisation und Lyse, bis hin zu einem ELISA optimiert. Ubiquitin wurde als House-Keeping-Antigen, ein Phosphatpuffer als Bindungspuffer und *The Blocking Solution* als Blockierlösung ausgewählt und experimentell bestätigt. Durch die Verwendung eines Pipettierroboters wurden der Zeitaufwand minimiert und gleichzeitig große Kapazitäten für ein RNAi-Screening geschaffen.

Das prinzipielle Funktionieren der Methode wurde durch den Nachweis einer Ubiquitin-Hydrolase bestätigt.

5.2 Abstract

Modifications with phosphorylcholine on proteins and glycosphingolipids play an important role for the ability of many nematodes to modulate the human immune system and to cause severe long-lasting infections like onchocerciasis or elephantiasis, but also decrease the risk of developing allergies or auto-immune diseases. *C. elegans* is an excellent model-organism for the investigation of the underlying mechanisms.

In this work a method for the high-throughput screening of RNAi-knockdowns in *C. elegans* has been established. A quantitative analysis of the PC-amount relative to the amount of ubiquitin for each RNAi strain was performed. This should allow the identification of enzymes involved in the PC synthesis pathways or even a PC-transferase, which would be a promising starting point for the development of drugs against nematode infections.

The workflow for the high-throughput screening from the cultivation of the worms, over their synchronisation and lysis, up to an ELISA has been optimized. Ubiquitin has been chosen as an house-keeping-antigen, a phosphate buffer for protein binding and *The Blocking Solution* for blocking. By the usage of a robot the necessary amount of time has been reduced and large capacities for RNAi-screening were established. By identifying an ubiquitin-hydrolase the functioning of the developed method has been proven.

6 Literatur

1. Altun, Z.F., and Hall, D.H. . *Handbook of C. elegans Anatomy*. . 2008 [cited; Available from: <http://www.wormatlas.org/hermaphrodite/hermaphroditehomepage.htm>].
2. Sulston, J.E., et al., *The embryonic cell lineage of the nematode Caenorhabditis elegans*. Dev Biol, 1983. **100**(1): p. 64-119.
3. Kimble, J. and D. Hirsh, *The postembryonic cell lineages of the hermaphrodite and male gonads in Caenorhabditis elegans*. Dev Biol, 1979. **70**(2): p. 396-417.
4. Judith Kimble and S. Ward, *Germ-line Development and Fertilization*, in *The Nematode Caenorhabditis elegans*. 1988, Cold Spring Harbor Laboratory Press. p. 191-213.
5. *Genome sequence of the nematode C. elegans: a platform for investigating biology*. Science, 1998. **282**(5396): p. 2012-8.
6. Chen, N., et al., *WormBase: a comprehensive data resource for Caenorhabditis biology and genomics*. Nucleic Acids Res, 2005. **33**(Database issue): p. D383-9.
7. Ruby, J.G., et al., *Large-scale sequencing reveals 21U-RNAs and additional microRNAs and endogenous siRNAs in C. elegans*. Cell, 2006. **127**(6): p. 1193-207.
8. Stein, L.D., et al., *The genome sequence of Caenorhabditis briggsae: a platform for comparative genomics*. PLoS Biol, 2003. **1**(2): p. E45.
9. Brenner, S., *The genetics of Caenorhabditis elegans*. Genetics, 1974. **77**(1): p. 71-94.
10. Labbe, J.C. and R. Roy, *New developmental insights from high-throughput biological analysis in Caenorhabditis elegans*. Clin Genet, 2006. **69**(4): p. 306-14.
11. Harnett, W., I.B. McInnes, and M.M. Harnett, *ES-62, a filarial nematode-derived immunomodulator with anti-inflammatory potential*. Immunol Lett, 2004. **94**(1-2): p. 27-33.
12. Houston, K.M. and W. Harnett, *Prevention of attachment of phosphorylcholine to a major excretory-secretory product of Acanthocheilonema viteae using tunicamycin*. J Parasitol, 1996. **82**(2): p. 320-4.
13. Lochnit, G. and R. Geyer, *Evidence for the presence of the Kennedy and Bremer-Greenberg pathways in Caenorhabditis elegans*. Acta Biochimica Polonica, 2003. **50**(4): p. 1239-1243.
14. Brendza, K.M., et al., *Phosphoethanolamine N-methyltransferase (PMT-1) catalyses the first reaction of a new pathway for phosphocholine biosynthesis in Caenorhabditis elegans*. Biochem J, 2007. **404**(3): p. 439-48.
15. Houston, K.M., et al., *Investigation of the nature of potential phosphorylcholine donors for filarial nematode glycoconjugates*. Mol Biochem Parasitol, 2002. **123**(1): p. 55-66.
16. Lochnit, G., R. Bongaarts, and R. Geyer, *Searching new targets for anthelmintic strategies: Interference with glycosphingolipid biosynthesis and phosphorylcholine metabolism affects development of Caenorhabditis elegans*. Int J Parasitol, 2005. **35**(8): p. 911-23.
17. Lottspeich, F., *Proteom Analysis: A Pathway to the Functional Analysis of Proteins*. Angew. Chem. Int. Ed., 1999. **38**: p. 2476-2492.
18. Thiede, B., et al., *Peptide mass fingerprint*. Methods, 2005. **35**(3): p. 237-247.

19. Wollscheid, B., J.D. Watts, and R. Aebersold, *Proteomics/genomics and signaling in lymphocytes*. Curr Opin Immunol, 2004. **16**(3): p. 337-44.
20. Pandey, A. and M. Mann, *Proteomics to study genes and genomes*. Nature, 2000. **405**(6788): p. 837-46.
21. Clarks, R.S., H. Bayir, and L.W. Jenkins, *Posttranslational protein modifications*. Crit. Care. Med., 2005. **33**(12): p. 407-409.
22. Stults, J.T. and D. Arnott, *Proteomics*. Methods in Enzymology, 2005. **402**: p. 245-289.
23. Lochnit, G., et al., *First identification of a phosphorylcholine-substituted protein from Caenorhabditis elegans: isolation and characterization of the aspartyl protease ASP-6*. Biol.Chem., 2006. **387**: p. 1487-1493.
24. Lovell, T.M., et al., *Identification of a novel mammalian post-translational modification, phosphocholine, on placental secretory polypeptides*. J Mol Endocrinol, 2007. **39**(3): p. 189-98.
25. Kondakova, A.N., et al., *Structural and serological studies of the O-antigen of Proteus mirabilis O-9*. Carbohydr Res, 2003. **338**(11): p. 1191-6.
26. Landerholm, M.K., et al., *Characterization of novel structural features in the lipopolysaccharide of nondisease associated nontypeable Haemophilus influenzae*. Eur J Biochem, 2004. **271**(5): p. 941-53.
27. Mansson, M., et al., *Structural analysis of the lipopolysaccharide from nontypeable Haemophilus influenzae strain 1003*. Eur J Biochem, 2002. **269**(3): p. 808-18.
28. Mansson, M., et al., *A new structural type for Haemophilus influenzae lipopolysaccharide. Structural analysis of the lipopolysaccharide from nontypeable Haemophilus influenzae strain 486*. Eur J Biochem, 2001. **268**(7): p. 2148-59.
29. Friedl, C.H., et al., *Structural elucidation of zwitterionic sugar cores from glycosphingolipids by nanoelectrospray ionization-ion-trap mass spectrometry*. Anal Biochem, 2000. **284**(2): p. 279-87.
30. Grabitzki, J., et al., *Identification of phosphorylcholine substituted peptides by their characteristic mass spectrometric fragmentation*. Eur J Mass Spectrom, 2005. **11**(3): p. 335-344.
31. Grabitzki, J. and G. Lochnit, *Immunomodulation by phosphocholine--biosynthesis, structures and immunological implications of parasitic PC-epitopes*. Mol Immunol, 2009. **47**(2-3): p. 149-63.
32. Harnett, W., et al., *Origin, kinetics of circulation and fate in vivo of the major excretory-secretory product of Acanthocheilonema viteae*. Parasitology, 1989. **99 Pt 2**: p. 229-39.
33. Harnett, W., et al., *Some preliminary data on the nature/structure of the PC-glycan of the major excretory-secretory product of Acanthocheilonema viteae (ES-62)*. Parasite, 1994. **1**(2): p. 179-81.
34. Haslam, S.M., et al., *Characterisation of the phosphorylcholine-containing N-linked oligosaccharides in the excretory-secretory 62 kDa glycoprotein of Acanthocheilonema viteae*. Mol Biochem Parasitol, 1997. **85**(1): p. 53-66.
35. Harnett, W., M.M. Harnett, and O. Byron, *Structural/functional aspects of ES-62--a secreted immunomodulatory phosphorylcholine-containing filarial nematode glycoprotein*. Curr Protein Pept Sci, 2003. **4**(1): p. 59-71.
36. Stepek, G., et al., *Expression of the filarial nematode phosphorylcholine-containing glycoprotein, ES62, is stage specific*. Parasitology, 2002. **125**(Pt 2): p. 155-64.

37. Grabitzki, J., et al., *The PCome of Caenorhabditis elegans as a prototypic model system for parasitic nematodes: identification of phosphorylcholine-substituted proteins*. Mol Biochem Parasitol, 2008. **161**(2): p. 101-11.
38. Kamath, R.S. and J. Ahringer, *Genome-wide RNAi screening in Caenorhabditis elegans*. Methods, 2003. **30**(4): p. 313-21.
39. Syntichaki, P., et al., *Specific aspartyl and calpain proteases are required for neurodegeneration in C. elegans*. Nature, 2002. **419**(6910): p. 939-44.
40. Houston, K.M. and W. Harnett, *Structure and synthesis of nematode phosphorylcholine-containing glycoconjugates*. Parasitology, 2004. **129**(Pt 6): p. 655-61.
41. Subramanian, S., et al., *The dynamics of Wuchereria bancrofti infection: a model-based analysis of longitudinal data from Pondicherry, India*. Parasitology, 2004. **128**(Pt 5): p. 467-82.
42. Nacher, M., et al., *Contemporaneous and successive mixed Plasmodium falciparum and Plasmodium vivax infections are associated with Ascaris lumbricoides: an immunomodulating effect?* J Parasitol, 2001. **87**(4): p. 912-5.
43. Spiegel, A., et al., *Increased frequency of malaria attacks in subjects co-infected by intestinal worms and Plasmodium falciparum malaria*. Trans R Soc Trop Med Hyg, 2003. **97**(2): p. 198-9.
44. Yoshida, A., et al., *Schistosoma mansoni infection cancels the susceptibility to Plasmodium chabaudi through induction of type 1 immune responses in A/J mice*. Int Immunol, 2000. **12**(8): p. 1117-25.
45. Dunne, D.W. and A. Cooke, *A worm's eye view of the immune system: consequences for evolution of human autoimmune disease*. Nat Rev Immunol, 2005. **5**(5): p. 420-6.
46. Harnett, W. and M.M. Harnett, *Filarial nematode secreted product ES-62 is an anti-inflammatory agent: therapeutic potential of small molecule derivatives and ES-62 peptide mimetics*. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2006. **33**(5-6): p. 511-8.
47. Maizels, R.M., *Infections and allergy - helminths, hygiene and host immune regulation*. Curr Opin Immunol, 2005. **17**(6): p. 656-61.
48. Goodridge, H.S., et al., *Modulation of macrophage cytokine production by ES-62, a secreted product of the filarial nematode Acanthocheilonema viteae*. J Immunol, 2001. **167**(2): p. 940-5.
49. Harnett, W. and M.M. Harnett, *Modulation of the host immune system by phosphorylcholine-containing glycoproteins secreted by parasitic filarial nematodes*. Biochim Biophys Acta, 2001. **1539**(1-2): p. 7-15.
50. Melendez, A.J., et al., *Inhibition of Fc epsilon RI-mediated mast cell responses by ES-62, a product of parasitic filarial nematodes*. Nat Med, 2007. **13**(11): p. 1375-81.
51. Whelan, M., et al., *A filarial nematode-secreted product signals dendritic cells to acquire a phenotype that drives development of Th2 cells*. J Immunol, 2000. **164**(12): p. 6453-60.
52. Couper, K.N., et al., *ES-62 is unable to modulate Toxoplasma gondii-driven Th1 responses and pathology*. Parasite Immunol, 2005. **27**(4): p. 147-50.
53. Dell, A., et al., *Immunogenic glycoconjugates implicated in parasitic nematode diseases*. Biochim Biophys Acta, 1999. **1455**(2-3): p. 353-62.
54. Goodridge, H.S., et al., *Differential regulation of interleukin-12 p40 and p35 induction via Erk mitogen-activated protein kinase-dependent and -independent mechanisms and the implications for bioactive IL-12 and IL-23 responses*. Immunology, 2003. **109**(3): p. 415-25.

55. Harnett, W., I.B. McInnes, and M. Harnett, *ES-62, a filarial nematode-derived immunomodulator with anti-inflammatory potential*. Immunology Letters, 2004. **94**: p. 27-33.
56. Marshall, F.A., et al., *ES-62, an immunomodulator secreted by filarial nematodes, suppresses clonal expansion and modifies effector function of heterologous antigen-specific T cells in vivo*. J Immunol, 2005. **175**(9): p. 5817-26.
57. Harnett, M.M., et al., *The phosphorylcholine moiety of the filarial nematode immunomodulator ES-62 is responsible for its anti-inflammatory action in arthritis*. Ann Rheum Dis, 2008. **67**(4): p. 518-23.
58. Cipollo, J.F., et al., *Biosynthesis in vitro of Caenorhabditis elegans phosphorylcholine oligosaccharides*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(10): p. 3404-8.
59. Lochnit, G., R.D. Dennis, and R. Geyer, *Phosphorylcholine substituents in nematodes: structures, occurrence and biological implications*. Biol Chem, 2000. **381**(9-10): p. 839-47.
60. Eberhardt, A., et al., *Cellular localization of choline-utilization proteins in Streptococcus pneumoniae using novel fluorescent reporter systems*. Mol Microbiol, 2009. **74**(2): p. 395-408.
61. Ishida, N., et al., *Molecular cloning and expression of a novel cholinephosphotransferase involved in glycoglycerophospholipid biosynthesis of Mycoplasma fermentans*. Curr Microbiol, 2009. **58**(6): p. 535-40.
62. Palavalli, L.H., et al., *Defining the role of phosphomethylethanolamine N-methyltransferase from Caenorhabditis elegans in phosphocholine biosynthesis by biochemical and kinetic analysis*. Biochemistry, 2006. **45**(19): p. 6056-65.
63. Harnett, W. and M.M. Harnett, *Inhibition of murine B cell proliferation and down-regulation of protein kinase C levels by a phosphorylcholine-containing filarial excretory-secretory product*. J Immunol, 1993. **151**(9): p. 4829-37.
64. Harnett, W., et al., *Immunomodulatory properties of a phosphorylcholine-containing secreted filarial glycoprotein*. Parasite Immunol, 1999. **21**(12): p. 601-8.
65. Goodridge, H.S., et al., *Signalling mechanisms underlying subversion of the immune response by the filarial nematode secreted product ES-62*. Immunology, 2005. **115**(3): p. 296-304.
66. Al-Qaoud, K.M., B. Fleischer, and A. Hoerauf, *The Xid defect imparts susceptibility to experimental murine filariasis--association with a lack of antibody and IL-10 production by B cells in response to phosphorylcholine*. Int Immunol, 1998. **10**(1): p. 17-25.
67. Houston, K.M., et al., *Presence of phosphorylcholine on a filarial nematode protein influences immunoglobulin G subclass response to the molecule by an interleukin-10-dependent mechanism*. Infect Immun, 2000. **68**(9): p. 5466-8.
68. Mercolino, T.J., et al., *Normal mouse peritoneum contains a large population of Ly-1+ (CD5) B cells that recognize phosphatidyl choline. Relationship to cells that secrete hemolytic antibody specific for autologous erythrocytes*. J Exp Med, 1988. **168**(2): p. 687-98.
69. Deehan, M.R., M.M. Harnett, and W. Harnett, *A filarial nematode secreted product differentially modulates expression and activation of protein kinase C isoforms in B lymphocytes*. J Immunol, 1997. **159**(12): p. 6105-11.
70. Goodridge, H.S., et al., *Subversion of immunological signalling by a filarial nematode phosphorylcholine-containing secreted product*. Cell Signal, 2005. **17**(1): p. 11-6.

71. Harnett, W. and M.M. Harnett, *What causes lymphocyte hyporesponsiveness during filarial nematode infection?* Trends Parasitol, 2006. **22**(3): p. 105-10.
72. Goodridge, H.S., et al., *Subversion of immunological signalling by a filarial nematode phosphorylcholine-containing secreted product.* Cellular Signalling, 2004. **17**: p. 11-16.
73. Harnett, M.M., et al., *Induction of signalling anergy via the T-cell receptor in cultured Jurkat T cells by pre-exposure to a filarial nematode secreted product.* Parasite Immunol, 1998. **20**(11): p. 551-63.
74. Lal, R.B., et al., *Phosphocholine-containing antigens of Brugia malayi nonspecifically suppress lymphocyte function.* Am J Trop Med Hyg, 1990. **42**(1): p. 56-64.
75. Goodridge, H.S., et al., *Immunomodulation via novel use of TLR4 by the filarial nematode phosphorylcholine-containing secreted product, ES-62.* J Immunol, 2005. **174**(1): p. 284-93.
76. Goodridge, H.S., et al., *Phosphorylcholine mimics the effects of ES-62 on macrophages and dendritic cells.* Parasite Immunol, 2007. **29**(3): p. 127-37.
77. Melendez, A.J., M.M. Harnett, and J.M. Allen, *Crosstalk between ARF6 and protein kinase Calpha in Fc(gamma)RI-mediated activation of phospholipase D1.* Curr Biol, 2001. **11**(11): p. 869-74.
78. Napoli, C., C. Lemieux, and R. Jorgensen, *Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into Petunia Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans.* Plant Cell, 1990. **2**(4): p. 279-289.
79. Fire, A., et al., *Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in Caenorhabditis elegans.* Nature, 1998. **391**(6669): p. 806-11.
80. Hamilton, A.J. and D.C. Baulcombe, *A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants.* Science, 1999. **286**(5441): p. 950-2.
81. Lee, R.C., R.L. Feinbaum, and V. Ambros, *The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14.* Cell, 1993. **75**(5): p. 843-54.
82. Lewis, B.P., C.B. Burge, and D.P. Bartel, *Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets.* Cell, 2005. **120**(1): p. 15-20.
83. Gonczy, P., et al., *Functional genomic analysis of cell division in C. elegans using RNAi of genes on chromosome III.* Nature, 2000. **408**(6810): p. 331-6.
84. Maeda, I., et al., *Large-scale analysis of gene function in Caenorhabditis elegans by high-throughput RNAi.* Curr Biol, 2001. **11**(3): p. 171-6.
85. Tabara, H., A. Grishok, and C.C. Mello, *RNAi in C. elegans: soaking in the genome sequence.* Science, 1998. **282**(5388): p. 430-1.
86. Fraser, A.G., et al., *Functional genomic analysis of C. elegans chromosome I by systematic RNA interference.* Nature, 2000. **408**(6810): p. 325-30.
87. Kamath, R.S., et al., *Effectiveness of specific RNA-mediated interference through ingested double-stranded RNA in Caenorhabditis elegans.* Genome Biol, 2001. **2**(1): p. RESEARCH0002.
88. Timmons, L., D.L. Court, and A. Fire, *Ingestion of bacterially expressed dsRNAs can produce specific and potent genetic interference in Caenorhabditis elegans.* Gene, 2001. **263**(1-2): p. 103-12.
89. Kamath, R.S., et al., *Systematic functional analysis of the Caenorhabditis elegans genome using RNAi.* Nature, 2003. **421**(6920): p. 231-7.
90. Sonnichsen, B., et al., *Full-genome RNAi profiling of early embryogenesis in Caenorhabditis elegans.* Nature, 2005. **434**(7032): p. 462-9.

91. Winzeler, E.A., et al., *Functional characterization of the S. cerevisiae genome by gene deletion and parallel analysis*. Science, 1999. **285**(5429): p. 901-6.
92. van Haaften, G., et al., *Gene interactions in the DNA damage-response pathway identified by genome-wide RNA-interference analysis of synthetic lethality*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(35): p. 12992-6.
93. Rauch, P., *Hintergrund bei Immunoassays*. BIOforum, 2005(GIT Verlag GmbH Co. KG): p. 22-24.
94. Arnold A. Raem, P.R., *Immunoassays*. 2007, München: Elsevier, Spektrum, Akad. Verl.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Menschen bedanken, ohne die diese Arbeit nie entstanden wäre:

Meinem Doktorvater PD Dr. Günter Lochnit, für seine ausgezeichnete Betreuung, Geduld und Hilfsbereitschaft.

Dr. Julia Grabitzki für Tricks und Kniffe im Labor, leckeren Kaffee, ihre Fähigkeit zur Motivation und ihre ständige Bereitschaft mitzudenken.

Michael Dreisbach für seine Hilfe bei den Gerätschaften.

Ann-Christin und Erkan für viele gesellige Stunden bei großem Stress drum herum.

Franziska, Steffi und Patricia gegen Langeweile beim Pufferanrühren.

Sebastian für die eine oder andere Runde Basketball während der Inkubationszeiten.

Meinen Eltern für ihre Unterstützung.

Meiner Frau Nada für das Einsortieren loser Pipettenspitzen in Racks, die Verpflegung nach langen Abenden vorm Pipettierroboter und fürs Dasein!