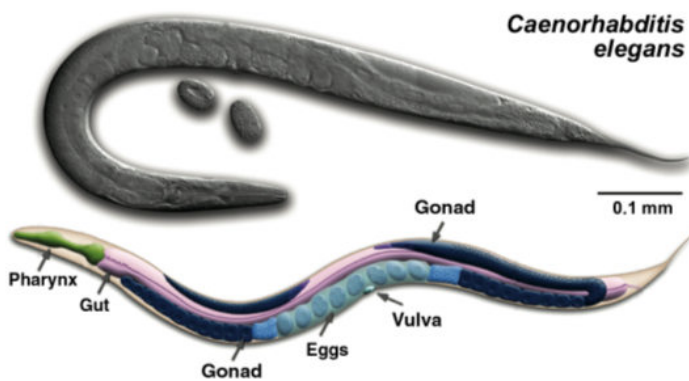


# Caenorhabditis elegans og genetiske teknikker

På Aarhus Universitet anvender vi rundormen *C. elegans* til at studere den genetiske baggrund for aldringsprocessen og udviklingen af aldersrelaterede sygdomme som fx Alzheimers sygdom. Ormens opbygning er vist i figur 1.

Rundormen *C. elegans* er en fantastisk god genetisk og molekylærbiologisk modelorganisme, som har vist sig meget egnet til at studere komplekse biologiske processer. Ormene er ca. 1 mm lange og kan billigt og effektivt håndteres i store populationer. De er hermafroditte, men forekommer også som hanner, hvorfor det er let at lave genetiske kryds. Ormene har en kort livscyklus; udviklingen fra æg til voksen orm tager 3 dage. De lever i gennemsnit 20 dage, hvilket bidrager til deres popularitet i aldringsstudier. De har et simpelt nervesystem bestående af 302 neuroner, og der er voksende evidens for, at gener, som påvirker aldring i orm, også påvirker aldring i mennesker.



Figur 1: Rundormen *C. elegans*

*C. elegans* lever af bakterier, og ormen optager umodificeret fx RNA fra føden. Det er på den måde muligt at inaktivere gener via RNAi. Man kan også relativt let lave transgene orm, som udtrykker humane eller modificerede proteiner. Fx kan styringen (promoter) for et af ormens gener sammenkædes med udtryk af vandmandgenet *pGLO*, så der dannes grøn farve (GFP), når ormens gen er aktivt.

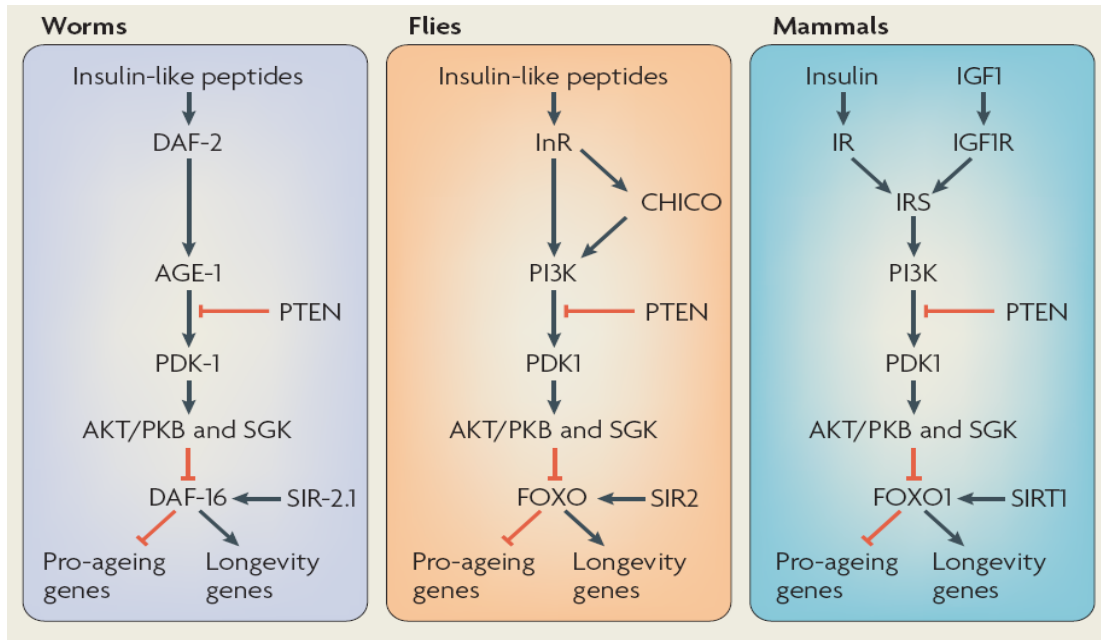
En velkendt signalvej (fælles for mange organismer), der er involveret i aldring, er insulin-signaleringskaskaden - vist for orm, bananfluer og pattedyr i figur 2. For *C. elegans* er mekanismen:

Binding af insulinlignende peptider til proteinet DAF-2 inducerer en kaskade af gener, der til slut hæmmer 'transkriptionsfaktoren' DAF-16, der herved holdes i cellens cytoplasma (i stedet for normalt at binde sig til DNA i cellekernen).

Hvis gener opstrøms DAF-16 slås ned/muteres eller bindingen af peptiderne til DAF-2 ophører, vil DAF-16 blive aktiveret. DAF-16 flyttes så til cellekernen, hvor det sætter sig på promotorerne af en lang række gener, der herved udtrykkes. Disse gener er involveret i levetid og stresstolerance. Et eksempel er genet for Heat shock proteinet HSP-16.

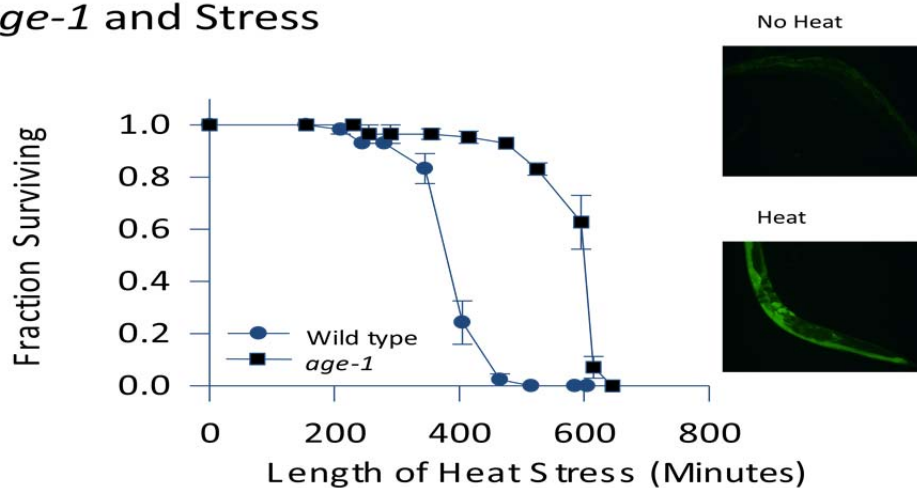
En DAF-2 mutant (hvor funktionen af genet er ødelagt) vil derfor være stressresistent og langt-levende. Det samme gælder effekten af at mangle funktionen af et andet (senere) gen i kaskaden - AGE-1. Figur 3 viser,

at en *age-1* mutant har øget varmemestresstolerance, og på billederne tilknyttet kan aktiviteten af genet *hsp-16* ses udtrykt, via at genets aflæsning er koblet til produktionen af GFP. Figur 4 viser, at *age-1* mutanten ligeledes har kraftigt forlænget levetid.

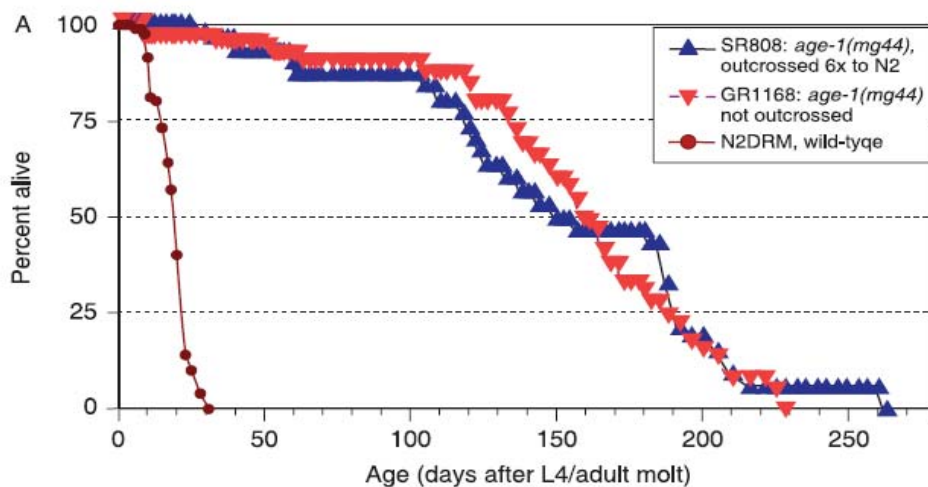


Figur 2: Insulin-signalerings-kaskaden hos forskellige dyr. Sorte pile viser at udtrykket fremmes; Røde at der sker en hæmning.

### *age-1* and Stress



Figur 3: Øget stresstolerance og GFP-koblet *hsp-16* - udtryk hos *age-1* – muterede *C. elegans*



Figur 4: Øget levetid hos *age-1* – muterede *C. elegans*.

### Lidt om genetisk analyse

Geners funktion kan undersøges ved at studere organismer med *ændret* genfunktion. Genfunktionen kan ændres ved at behandle individer med mutagener for at introducere DNA-skade (*forward genetics*). Herefter kan man så lede efter mutanter med den fænotype, man er interesseret i at studere (fx lang levetid, høj stressresistens) og identificere, hvilket gen der er muteret. Omvendt kan man starte med selve gensekvensen (*reverse genetics*), hvis man fx ved fra andre organismer, at dette gen har betydning for aldring. På forskellig måde kan genfunktionen ændres og effekten på udvikling eller adfærd mm kan studeres. Genfunktionen kan manipuleres vha. ændringer i genets udtryk (knockdown, overudtryk, udtryk i bestemte væv).

'*Epistasi-analyse*' anvendes herefter til at finde ud af, hvilke molekylære signalveje ens gen er en del af. Hvis man fx har en genmutant med forøget levetid, vil man være interesseret i om den er en del af insulin-signalerings-kaskaden eller om den er en del af en anden, måske ukendt, mekanisme for aldring. Mutanten kan så fx udsættes for RNAi af *daf-16*, og effekten på levetid studeres (eller en *daf-16* mutation kan krydses ind i ens mutant). Hvis effekten på levetid forsvinder, er ens gen sandsynligvis placeret nedstrøms af DAF-16, men ser man ingen effekt (ens mutant lever stadig længere), er ens gen en del af en hel anden signalvej.

### Gen-knockdown vha RNAi i *C. elegans*

Kan gøres ved 1) injektion af dsRNA (Dobbelt-strengt RNA), 2) iblødsætning (soaking) i dsRNA eller 3) fodring med bakterier der udtrykker dsRNA. Genkendelsen af dsRNA i ormen fører så til en reaktion mod dyrets normale mRNA.

Ad Fodring: Ormens naturlige fødekilde er bakterier. Bakterier kan vi genetisk manipulere til at indeholde og udtrykke gener som dsRNA. Når ormen spiser disse bakterier, vil det starte RNAi maskineriet i ormen, og genet bliver "slået ned". Ormens fænotype(r) som følge af den lavere mængde af det pågældende gen/protein kan herefter studeres. Fænotyper kunne fx være antal æg lagt, antal klækkede æg, udseendeændringer, øget følsomhed til varmemstress eller andre stresstyper, øget/sænket levetid, stoppet udvikling, effekt på udtrykket af andre gener (fx vurderet vha. GFP) osv. Der findes firmaer, hvor man køber samlinger af forskellige bakterier (hvert sit gen), der samlet udtrykker over 80 % af alle ormens gener; ellers er det nemt selv at lave sin egen dsRNA bakterie.

### **Besøg i lab**

I kommer til at lave et mini-varmestress på to ormetyper, vildtype (N2) og en *daf-2* mutant. Vi starter varmestresset om morgenen ved at sætte ormene ind i et varmeskab på 35 °C, og så kan I undersøge ormene, når I ankommer og helst igen efter en time (Afhænger af hvor ferme I er til det). Ormene opbevares på små agarplader dryppet med bakterier (*E. coli*). Under stereolup skal I tælle antallet af døde og levende orm på hver plade. Hvis I er i tvivl om, de er døde eller levende, kan I forsigtigt prikke til dem vha. en tynd platintråd.

Desuden har vi samlet en række mutanter, som har forskellige fænotyper. Dem skal I prøve at identificere og flytte til nye agar plader.

Desuden vil vi vise jer forskellige GFP-orme-stammer under mikroskop. En stamme udtrykker GFP sat sammen med proteinet DAF-16. Den vil derfor lyse svagt grønt over hele kroppen ved stuetemperatur, men efter fx varmestress vil DAF-16 gå til kernen.

Alle de transgene orm er omfattet af strenge krav om opbevaring – de må ikke tages med ud af bygningerne, som er særligt klassificerede til at arbejde med sådanne GMO. I skal også altid have kilter på i lab.