

**Gewebe-spezifische RNAi und Analyse von
Intermediärfilament Proteinen in
*Caenorhabditis elegans***

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Tobias Wiesenfahrt

aus Düsseldorf

Düsseldorf, November 2009

Aus dem Institut für Genetik
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
und
dem Institut für Molekulare und Zelluläre Anatomie
der RWTH Aachen, Universität

Gedruckt mit der Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Herr Prof. Dr. Olaf Bossinger

Koreferent: Herr Prof. Dr. Eckhard Lammert

Tag der mündlichen Prüfung: 07.01.2010

Teile der vorliegenden Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Carberry, K., Wiesenfahrt, T., Windoffer, R., Bossinger, O. and Leube, R. E. (2009). Intermediate filaments in *Caenorhabditis elegans*. *Cell Motil Cytoskeleton* **66**, 852-64.

Pilipiuk, J., Lefebvre, C., Wiesenfahrt, T., Legouis, R. and Bossinger, O. (2009). Increased IP₃/Ca²⁺ signaling compensates depletion of LET-413/DLG-1 in *C. elegans* epithelial junction assembly. *Dev Biol* **327**, 34-47.

Hüsken, K., Wiesenfahrt, T., Abraham, C., Windoffer, R., Bossinger, O. and Leube, R. E. (2008). Maintenance of the intestinal tube in *Caenorhabditis elegans*: the role of the intermediate filament protein IFC-2. *Differentiation* **76**, 881-96.

Die Arbeit wurde durch Mittel des SFB590 und der Jürgen Manchot Stiftung gefördert.

Abkürzungen	1
Zusammenfassung	3
1 Einleitung I: Gewebespezifische RNAi in <i>C. elegans</i>	7
1.1 Der Modellorganismus <i>C. elegans</i>	7
1.2 Die Entwicklung des Darmepithels in <i>C. elegans</i>	9
1.3 Der Aufbau interzellulärer Kontaktstrukturen in <i>C. elegans</i> Epithelien.....	11
1.4 Die Methode der RNA vermittelten Interferenz	13
1.5 Fragestellung I.....	18
2 Ergebnisse I: Analyse des Darm-spezifischen RNAi Stamms OLB11	19
2.1 In OLB11 lassen sich Gene mit RNAi über Fütterung in Larven und adulten Tieren herunterregulieren	20
2.2 In OLB11 lassen sich die epithelialen Gene <i>dlg-1</i> , <i>ajm-1</i> und <i>let-413</i> durch Injektion dsRNA spezifisch in den Darmzellen herunterregulieren	22
2.3 <i>let-413</i> zeigt eine hohe Sensitivität gegenüber RNAi.....	26
2.4 <i>let-413</i> RNAi in OLB11 führt erst gegen Ende der Morphogenese zu einer erkennbaren Herunterregulierung des LET-413 Proteins	30
2.5 RNAi gegen die <i>par</i> Gene führt zu keinem erkennbaren Phänotyp in OLB11.....	32
2.6 PAR-3 lässt sich in OLB11 nicht erkennbar herunterregulieren	33
2.7 RNAi gegen maternal exprimierte Gene führt nur im Falle des Zyklins B3 zu einem Phänotyp in OLB11	35
3 Diskussion I	42
3.1 RNAi gegen <i>dlg-1</i> , <i>ajm-1</i> und <i>let-413</i> in OLB11 führt zu larvaler Letalität.....	42
3.2 Effektivität der Darm-spezifischen RNAi im Vergleich zum WT zu anderen gewebespezifischen RNAi Ansätzen in <i>C. elegans</i>	43
3.3 Defekte in allen Zellen nach <i>cyb-3</i> RNAi in OLB11 deuten auf eine Diffusion sekundärer siRNAs.....	46
4 Einleitung II: Die Funktion der Intermediärfilamente im Darmepithel von <i>C. elegans</i>	50
4.1 Allgemeine Eigenschaften von Intermediärfilamenten	50
4.2 Intermediärfilamente in <i>C. elegans</i>	52
4.3 Der Aufbau des adulten Darmepithels in <i>C. elegans</i>	53
4.4 Fragestellung II.....	56

5 Ergebnisse II	57
5.1 Die Rolle des Intermediärfilaments <i>ifc-2</i> im Darmepithel von <i>C. elegans</i>	58
5.1.1 <i>ifc-2</i> RNAi führt zu blasenähnlichen Ausstülpungen der apikalen Membran der Darmzellen.....	58
5.1.2 IFC-2 wird exklusiv im Darm exprimiert und kolokalisiert mit IFB-2.....	59
5.1.3 Der <i>ifc-2</i> RNAi Phänotyp tritt ab dem L3-Larvenstadium auf und nimmt mit dem Alter der Tiere zu	62
5.1.4 Elektronenmikroskopische Aufnahmen der <i>ifc-2</i> RNAi Tieren zeigen starke Veränderungen in der Form des Darmlumens, aber keine erkennbaren Defekte im Aufbau der apikalen Membrandomäne	64
5.1.5 Die interzellulären Kontaktstrukturen der Darmzellen zeigen nach <i>ifc-2</i> RNAi keine erkennbaren Defekte.....	67
5.1.6 Die Polarität der Darmzellen scheint nach <i>ifc-2</i> RNAi nicht gestört zu sein	70
5.2 Identifizierung und Charakterisierung des Intermediärfilament-Organisators <i>ifo-1</i>	72
5.2.1 In den Mutanten BJ133(<i>kc2</i>) und BJ134(<i>kc3</i>) ist das Intermediärfilament IFB-2 fehlverteilt.....	72
5.2.2 BJ133(<i>kc2</i>) und BJ134(<i>kc3</i>) tragen Mutationen im selben Gen: F42C5.10 (<i>ifo-1</i>).....	74
5.2.3 IFO-1 wird exklusiv in den Darmzellen exprimiert und lokalisiert apikal	77
5.2.4 In den <i>ifo-1</i> Mutanten lokalisiert IFB-2 nicht in der Endotube, sondern an den Kontaktstrukturen der Darmzellen.....	80
5.2.5 Die IFB-2 Fehlverteilung in <i>ifo-1(kc2)</i> ist unabhängig von bisher identifizierten Proteinen der interzellulären Kontaktstrukturen in <i>C. elegans</i> ...	83
5.2.6 Elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigen strukturelle Defekte der apikalen Membrandomäne in <i>ifo-1(kc2, kc3)</i> Mutanten.....	85
5.2.7 Die Phalloidin färbung im Darm der <i>ifo-1(kc2)</i> Mutante ist stark geschwächt	87
5.2.8 RNAi gegen das Ezrin-Radixin-Moesin Homolog <i>erm-1</i> in <i>ifo-1(kc2)</i> führt zu Zell-Zelladhäsionsdefekten im Darmepithel.....	90
6 Diskussion II	92
6.1 Die Rolle von IFC-2 bei der Stabilisierung der apikalen Membran der Darmzellen	93

6.2	<i>ifc-2</i> RNAi führt zu keinen erkennbaren Defekten in Funktion oder Polarität der Darmzellen	94
6.3	IFO-1 ist für die korrekte Lokalisierung der Intermediärfilamente und des Aktinzytoskeletts im Darm von <i>C. elegans</i> verantwortlich.....	98
6.4	<i>erm-1</i> und <i>ifo-1</i> haben einen unterschiedlichen Einfluss auf das Aktinzytoskelett und regulieren zusammen die Zelladhäsion der Darmzellen	101
7	Material & Methoden	105
7.1	Chemikalien, Materialien, Geräte und Software.....	105
7.2	Molekularbiologische Methoden	106
7.2.1	Bakterienstämme	106
7.2.2	Medien für Bakterien	106
7.2.3	Vektoren	106
7.2.4	Isolierung genomischer DNA.....	107
7.2.5	Oligonukleotide	107
7.2.6	DNA-Gelelektrophorese	110
7.2.7	siRNAs Gelelektrophorese.....	111
7.2.8	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	111
7.2.9	Herstellung elektrotransformationskompetenter Bakterien.....	112
7.2.10	Elektrotransformation kompetenter Zellen mit Plasmid-DNA	112
7.2.11	<i>in vitro</i> Transkription	113
7.3	Zellbiologische Methoden	115
7.3.1	<i>C. elegans</i> Stämme und ihre Haltung.....	115
7.3.2	Herstellung Agarose-beschichteter Objektträger und Deckgläser	115
7.3.3	Herstellung Polylysin-beschichteter Objektträger.....	116
7.3.4	RNA vermittelte Interferenz (RNAi); Mikroinjektion, Fütterung, Auswertung..	116
7.3.5	Auswertung der Tiere für den RNAi-Screen	117
7.3.6	<i>in vivo</i> -Beobachtungen von Embryonen.....	117
7.3.7	Immunfluoreszenzfärbung an Embryonen	118
7.3.8	Aktinfärbung an Embryonen.....	119
8	Literaturverzeichnis	121
9	Anhang.....	133
9.1	Sequenzen	133

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
AF	Aktinfilament(e)
BLAST	„basic local alignment search tool“
Bp	Basenpaar(e)
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CCK	Cadherin-Catenin-Komplex
cDNA	komplementäre DNA
CeAJ	„ <i>C. elegans</i> apical junction“
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
CFP	„cyan fluorescent protein“
CIAP	„calf intestine alkaline phosphatase“
cm	Zentimeter
cM	Centimorgan
DAK	DLG-1-AJM-1-Komplex
DEPC	Diethylpyrocarbonat
d.h.	das heißt
dH ₂ O	destilliertes Wasser
<i>D. melanogaster</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
dsRNA	doppelsträngige RNA
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EMS	Ethylmethansulfonat
EtBr	Ethidiumbromid
F	Filialgeneration
g	Gramm
GFP	„green fluorescent protein“
h	Stunde(n)
H ₂ O	Wasser
IF	Intermediärfilament(e)
int	„intestinal ring“
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
kB	Kilobasen
kDA	Kilodalton
l	Liter
LB	Luria-Bertani
M	mol/Liter
mRNA	„messenger RNA“
MT	Mikrotubuli
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
mg	Milligramm
min	Minute(n)
ml	Milliliter

Abkürzungen

mm	Millimeter
mM	Millimolar
MW	„molecular weight“
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
PCR	„polymerase chain reaction“
pH	potentia Hydrogenii
RDRP	„RNA dependent RNA polymerase“
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-vermittelte Interferenz
RNase	Ribonuklease
rpm	„rounds per minute“
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SAR	subapikale Region
siRNA	„short interfering RNA“
SJ	„septate junction“
SNP	„single nucleotide polymorphism“
Taq	<i>Thermophilus aquaticus</i>
TJ	„tight junction“
ü.N.	über Nacht
UV	Ultraviolett
V	Volt
WT	Wildtyp
YFP	„yellow fluorescent protein“ (gelb fluoreszierendes Protein)
z.B.	zum Beispiel

Zusammenfassung

RNAi (RNA-vermittelte Interferenz) ist eine effektive Methode, um die Genfunktion gezielt herunterzuregulieren. Dazu wird doppelsträngige RNA eingesetzt, um die komplementäre mRNA komplett abzubauen. Bisher gab es in *C. elegans* jedoch keine Möglichkeit RNAi Organ-spezifisch anzuwenden. Daher wurde im ersten Kapitel dieser Arbeit ein transgener *C. elegans* Stamm, OLB11, generiert und getestet, in dem RNAi nur im Darm funktioniert. Dazu wurde unter der Kontrolle des Darm-spezifischen *elt-2* Promoters eine Pluskopie des *rde-1* Gens im Hintergrund der RNAi-insensitiven Mutante *rde-1(ne219)* exprimiert. Der *C. elegans* Darm bildet eine „einfache“ Röhre, die aus lediglich 20 Zellen besteht, und ist hervorragend geeignet zur Erforschung grundlegender Mechanismen der Epithelentwicklung. So gelang es in OLB11 die Funktion der epithelialen Gene *dlg-1*, *ajm-1* und *let-413* gezielt im Darm auszuschalten. Im Gegensatz zum Wildtyp führt dies nicht zu embryonaler, sondern larvaler Letalität. Darm-spezifische RNAi gegen früh exprimierte, maternale Gene konnte keinen sichtbaren Phänotyp induzieren. Am Beispiel von *par-3* konnte gezeigt werden, dass ein Grund dafür wahrscheinlich die „Stabilität“ früh synthetisierter Proteine ist. RNAi gegen *cyb-3*, welches für ein Zyklin kodiert und während des Zellzyklus schnell auf- und abgebaut wird, führte in OLB11 erstaunlicherweise auch zu Defekten in Nicht-Darmzellen. Dies könnte auf eine bisher nicht beschriebene Diffusion sekundärer siRNAs im *C. elegans* Embryo hinweisen. In weiteren Darm-spezifischen RNAi Experimenten wurde dann die Funktion des ELT-2 Transkriptionsfaktors und des IFB-2 Intermediärfilament-Proteins (IF) während der Larval- und Adultentwicklung herunterreguliert und die resultierenden Phänotypen ausgewertet.

IF bilden neben Aktinfilamenten und Mikrotubuli die dritte, am wenigsten erforschte Komponente des Zytoskeletts. Regulations-Mechanismen zu ihrer Organisation sind nahezu unbekannt und sollten im zweiten Kapitel dieser Arbeit mit Hilfe eines transgenen *ifb-2::cfp* Reporterstamms näher untersucht werden. Im *C. elegans* Darmepithel werden sechs IF exprimiert, die wahrscheinlich alle subapikal in der Endotube, einer speziellen, elektronendichten Struktur des Terminalgeflechts, lokalisieren. RNAi führte nur im Falle von *ifc-2*, zu einem Phänotyp, der sich durch Blasen-förmige Invaginationen der apikalen Membran in das Zytoplasma der Zellen auszeichnet. Dies deutet auf eine Schlüsselfunktion von IFC-2 bei der Organisation der Endotube hin.

In einem EMS-Mutagenese Screen, der mit dem *ifb-2::cfp* Reporterstamm durchgeführt wurde, konnten dann zwei Allele (*kc2*, *kc3*) des *ifo-1* (intermediate filament organizer) Gens isoliert, kartiert und kloniert werden. IFO-1 ist der erste in *C. elegans* identifizierte Organisator für IF und lokalisiert zusammen mit IFC-2 und IFB-2 in der Endotube der Darmzellen. In *ifo-1* kommt es zur Fehlverteilung der beiden IF, die nun um die interzelluläre Kontaktstruktur, die so genannte „*C. elegans* apical junction“ und im Zytoplasma akkumulieren. Durch eine weitere, detaillierte Analyse des *ifo-1* Phänotyps konnten dann gravierende Defekte bezüglich der Organisation des Aktinzytoskeletts aufgedeckt werden. Das Ezrin-Radixin-Moesin Homolog ERM-1 in *C. elegans* interagiert genetisch mit IFO-1. So treten nach *erm-1* RNAi in der *ifo-1* Mutante nicht nur die Einzel-Phänotypen auf, sondern ein dritter, der auf Defekte bei der Zell-Zelladhäsion des Darmepithels hindeutet.

Summary

RNAi (RNA-mediated interference) is an effective method to specifically down regulate gene function using doublestranded RNA to degrade the complementary mRNA. So far it was not possible to apply RNAi only to a certain tissue in *C. elegans*. Hence, in the first chapter of this thesis a transgenic *C. elegans* strain, OLB11, was generated and intensely tested that allows intestine-specific RNAi. Therefore a wild type copy of the *rde-1* gene was expressed under control of the intestine-specific *elt-2* promoter in the RNAi-insensitive *rde-1(ne219)* mutant. The *C. elegans* intestine consists of only 20 cells, which form a simple tube and is ideally suited to study fundamental mechanisms of epithelial development. Intestine specific RNAi against epithelial genes (*dlg-1*, *ajm-1* and *let-413*) induced larval lethal phenotypes instead of embryonic arrest. Depletion of early maternally expressed proteins did not induce any phenotypes in OLB11, probably due to perduring maternal protein, as demonstrated by immunostaining against PAR-3. In contrast, intestine-specific RNAi against cyclin B3 (*cyb-3*), which is quickly synthesized and degraded during the cell-cycle, surprisingly led to defects in non-intestinal cells also. As a possible mechanism the diffusion of secondary siRNAs in the *C. elegans* embryo is discussed. In additional RNAi experiments the function of the ELT-2 transcription factor and the intermediate filament protein (IF) IFB-2 was then analyzed during larval and adult development of OLB11.

While numerous investigations focused on the characterization of microtubules and the F-actin network, comparatively little is known about the organization and regulating mechanisms of IFs in living organisms. In the second chapter of this thesis a transgenic *ifb-2::cfp* reporter strain was used to analyze the role of intestine-specific IFs, of which IFB-2 and IFC-2 localize subapically in the endotube, a specific electron dense structure of the terminal web. Only after RNAi against *ifc-2* bubble-like invaginations of the apical membrane into the cytoplasm appeared, suggesting a key role of IFC-2 for correct lumen formation.

Next, a classical F2 EMS-mutagenesis-screen was performed, to identify mutants with aberrant IFB-2::CFP expression patterns. Two alleles (*kc2*, *kc3*) of the *ifo-1* (intermediate filament organizer) gene were isolated, mapped and cloned. IFO-1 is the first IF organizer identified in *C. elegans*, which co-localizes with IFB-2 and IFC-2 at the endotube. In *ifo-1* IFs become mislocalized, now accumulating at the intercellular junction and in the cytoplasm. Furthermore, a detailed analysis of the *ifo-1* phenotype then revealed severe

defects in the organization of the F-actin cytoskeleton. In *C. elegans ifo-1* genetically interacts with the ezrin-radixin-moesin homolog *erm-1*, another F-actin organizer. RNAi against *erm-1* in the *ifo-1* mutant background, in addition to the single phenotypes, generates a third, new phenotype that suggests loss of cell-cell adhesion in the intestine.

1 Einleitung I: Gewebespezifische RNAi in *C. elegans*

1.1 Der Modellorganismus *C. elegans*

Innerhalb der letzten 25 Jahre hat sich der Nematode *Caenorhabditis elegans* als ein hervorragend geeigneter Modellorganismus auf vielen Gebieten der Biologie etabliert, wie z.B. der Zell- und Entwicklungsbiologie, der Genetik, der Neurobiologie, und der Physiologie (<http://www.wormbook.org>). Sydney Brenner entdeckte den „Wurm“ Mitte der 60er Jahre zunächst als ideales Untersuchungsobjekt für neurobiologische Fragestellungen. Heute ist *C. elegans* neben *Drosophila melanogaster*, *Mus musculus*, *Xenopus laevis* und *Arabidopsis thaliana* einer der am besten erforschten multizellulären Organismen. So wurden bisher dreimal Forscher für ihre Arbeiten mit *C. elegans* mit dem Nobelpreis ausgezeichnet. Im Jahr 2002 die Herren Brenner, Sulston und Horvitz für ihre Forschungen auf dem Gebiet der genetischen Regulation der Organentwicklung und dem programmierten Zelltod, im Jahr 2006 Andrew Fire und Craig Mello für die Beschreibung des RNAi Mechanismus, im Jahr 2008 Martin Chalfie neben Osamu Shimomura und Roger Tsien. Ihm gelang es mit *C. elegans* den ersten transgenen Organismus herzustellen, der das Grün-Fluoreszierende-Protein (GFP) exprimiert (<http://nobelprize.org>).

Seine große Popularität als experimentelles Modell verdankt *C. elegans* seinen herausragenden Eigenschaften. *C. elegans* ist ein etwa 1 mm langer, im Boden lebender, nicht parasitärer Nematode (Fadenwurm). Er zeichnet sich durch eine sehr kurze Generationszeit und eine hohe Nachkommenschaft aus. Bereits 72 h nach der Befruchtung ist der Wurm adult und in der Lage selbst etwa 300 Nachkommen in drei Tagen zu produzieren. Im Labor ist er sehr einfach auf Agarplatten zu halten, auf denen er sich von *E. coli* Bakterien ernährt (Brenner, 1974). Es kommen zwei Geschlechter vor, Hermaphroditen und Männchen, wobei Männchen durch spontanen Verlust eines X-Chromosoms während der Meiose zu 0,2% auftreten (Hodgkin, 1984). *C. elegans* war der erste multizelluläre Organismus, dessen Genom komplett entschlüsselt wurde (Consortium, 1998). Es ist ca. 100 Mb groß und beinhaltet ca. 20.178 Gene, die sich auf fünf Autosomen und ein X-Chromosom verteilen (http://www.sanger.ac.uk/Projects/C_elegans/WORMBASE/release.shtml). Die Sequenzierung des Genoms war die Voraussetzung für die effektive Genfunktionsanalyse

mit Hilfe der RNA-vermittelten Interferenz (RNAi). Diese Methode ist in *C. elegans*, im Vergleich zu anderen Modellorganismen, besonders einfach anwendbar und erlaubt, die Genfunktion gezielt herunterzuregulieren und zu studieren (siehe 1.4).

Ein großer Vorteil von *C. elegans* gegenüber anderen Modellorganismen ist seine Transparenz. Sowohl der adulte Wurm als auch die Embryonen und Larven sind durchsichtig. Außerdem hat *C. elegans* einen invariablen Zellstammbaum (Eutelie). Die Entwicklung im Wildtyp (WT) läuft stets nach demselben festen Muster ab (Sulston, 1983). Da die Embryonen direkt nach der Befruchtung in der Lage sind außerhalb des adulten Tieres in einem Tropfen Wasser zu überleben, lassen sich Defekte während der Entwicklung sehr schnell bereits *in vivo* am Lichtmikroskop beobachten. So konnte ein kompletter Zellstammbaum für die *C. elegans* Entwicklung erstellt werden. Besonders erleichtert wurde dies durch die Einführung der 4D Mikroskopie, mit der sich innerhalb sehr kurzer Zeit Zellstammbäume aufstellen lassen (Schnabel et al., 1997). Bei diesem Verfahren wird die komplette Entwicklung des Embryos auf verschiedenen Zellebenen gleichzeitig dokumentiert. Eine Kamera, die mit einem Computer verbunden ist, nimmt über einen festgelegten Zeitraum Bilder der verschiedenen Ebenen des Embryos auf. So lässt sich das Schicksal einzelner Zellen über die gesamte Entwicklung verfolgen.

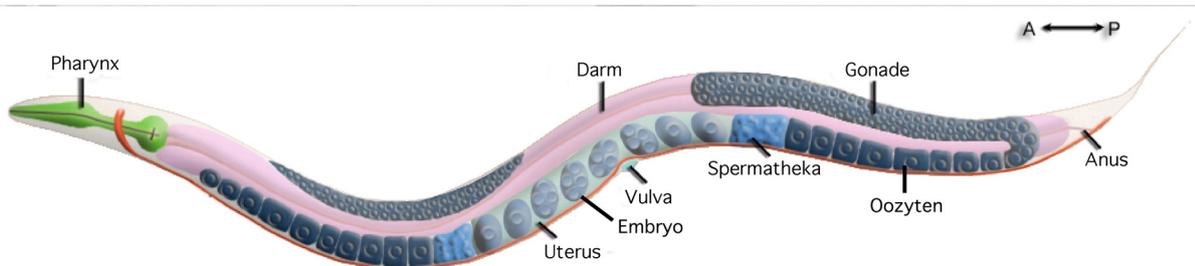


Abb. 1: Schema eines adulten *C. elegans* Hermaphroditen (modifiziert nach: www.wormatlas.org)

Die Embryonalentwicklung dauert etwa 12 h bei 25 °C und lässt sich in zwei Phasen unterteilen: die Proliferationsphase, die etwa 5 h dauert, und die Morphogenese, die etwa 7 h lang ist. Während der Proliferationsphase wird ein Zellhaufen von 558 Zellen gebildet. In den ersten 100 min der Proliferationsphase gehen die fünf somatischen Gründerzellen AB, MS, E, C, D und die Urkeimzelle P₄ aus einer Reihe inäqualer Zellteilungen aus der Zygote P₀ hervor. Während der Morphogenese bilden sich die meisten Organe und der Embryo elongiert auf 250 µm (Sulston, 1983). Der geschlüpfte Wurm entwickelt sich dann über vier Larvenstadien (L1-L4) zum adulten Tier.

Die Anatomie von *C. elegans* ist einfach (Abb.1; <http://www.wormatlas.org>). Er wird von einer Hypodermis mit Kutikula umgeben. Im Inneren der mit Flüssigkeit gefüllten Leibeshöhle (Pseudocoelom) liegen die paarig angelegte Gonade und der Verdauungstrakt, bestehend aus Pharynx, Darm und Hinterdarm. Der Darm ist eines der größten Organe in *C. elegans* und ist in erster Linie für die Nahrungsaufnahme und Verdauung sowie für die Synthese und Speicherung von Makromolekülen verantwortlich (McGhee, 2007). Aufgrund seines einfachen Aufbaus lässt sich an ihm besonders gut die Entwicklung von Epithelien erforschen.

1.2 Die Entwicklung des Darmepithels in *C. elegans*

Epithelien bilden Abschlussgewebe von Organen und Geweben. Zum einen trennen sie verschiedene Gewebe voneinander, und zum anderen ermöglichen sie den kontrollierten Stoffaustausch von Molekülen und Ionen zwischen diesen (Knust and Bossinger, 2002). Um diese Funktionen zu erfüllen, sind epitheliale Zellen polar aufgebaut, was sich an der unterschiedlichen Verteilung von Zellorganellen und Proteinen in der Zelle und in der Komposition ihrer basolateralen und apikalen Membrandomänen widerspiegelt (Mostov et al., 2003; Nelson, 2003; Nelson and Yeaman, 2001).

Die drei großen Epithelien in *C. elegans* sind die Hypodermis, der Pharynx und der Darm (Lynch and Hardin, 2009; Michaux et al., 2001). Der komplette Darm besteht aus nur 20 Zellen, die ein einschichtiges Epithel bilden und ein gemeinsames Lumen umschließen (Abb.2; Leung et al., 1999; Sulston et al., 1983). Aufgrund dieses sehr einfachen Aufbaus lässt sich an ihm besonders gut die Entstehung der epithelialen Zellpolarität und die Bildung interzellulärer Kontaktstrukturen untersuchen (Lynch and Hardin, 2009; Labouesse, 2006).

Die Darmzellen besitzen eine apikale Membrandomäne, die mit dem Lumen in Kontakt steht (grün in Abb.2), eine laterale Membrandomäne, die den Kontakt zu den benachbarten Zellen herstellt und eine basale Membrandomäne, die von einer Basallamina umgeben ist. Die Darmzellen stammen alle von einer Zelle ab, der so genannten E-Zelle, die im 8-Zellstadium gebildet wird (Sulston et al., 1983). Die E-Zelle teilt sich einmal vor Beginn der Gastrulation. Dann wandern die 2E-Zellen in den Embryo ein und bringen dort die 20 Darmzellen hervor. Sie umgeben das Lumen als eine Serie

von 9 Ringen, den so genannten „ints“ („intestinal ring“), wobei der anteriore „int“ von 4 Zellen gebildet wird und die 8 weiteren „ints“ aus je 2 Zellen. (Abb.2; Leung et al., 1999).

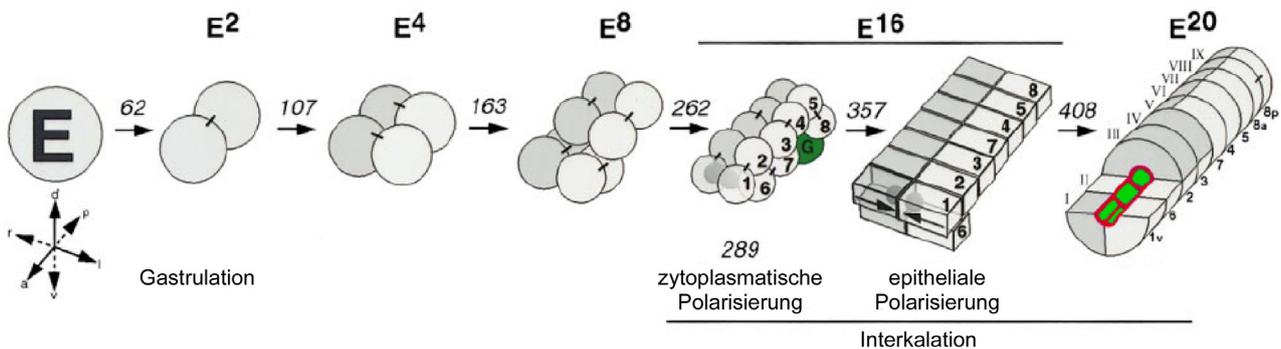


Abb. 2: Darmentwicklung (modifiziert nach Leung et al, 1999)

Schematische Darstellung der Darmentwicklung von *C. elegans*. Alle Darmzellen stammen von der E-Zelle ab, die sich vor der Gastrulation einmal teilt. Die 2E-Zellen wandern während der Gastrulation in den Embryo ein und teilen sich dort drei Mal. So entstehen 16E-Zellen, die in einer dorsalen und ventralen Reihe angeordnet sind. In diesem Stadium polarisieren die Zellen. Der Vorgang wird in zwei Abschnitte, die zytoplasmatische und die epitheliale Polarisierung, unterteilt. Das anteriore und das posteriore Zellpaar teilen sich im Anschluss noch einmal, so dass 20E-Zellen entstehen, die den Darm bilden. Die apikale Membran ist in grün gekennzeichnet und die Kontaktstrukturen (CeAJ) in rot. Die Zahlen über den Pfeilen zeigen die Zeit nach dem 2-Zellstadium in min.

Im 16E-Zellstadium beginnt die Polarisierung der Epithelzellen. Sie lässt sich in zwei Abschnitte unterteilen: die zytoplasmatische und die epitheliale Polarisierung (Abb.2, Leung et al., 1999; Wiesenfahrt, 2005). Die zytoplasmatische Polarisierung findet etwa 30 min nach der Teilung von 8E- zu 16E-Zellen statt. Während dieses Vorgangs wandern die Darmzellkerne aus der Zellmitte zum zukünftigen apikalen Pol. Während der epithelialen Polarisierung kommt es zu einer Reorganisation des Aktin und Mikrotubuli (MT) Zytoskeletts, die an der apikalen Membran akkumulieren. Ebenso akkumulieren erstmalig apikale Proteine und Proteine der Kontaktstrukturen, der „*C. elegans* apical junction“ (CeAJ), an der zukünftigen apikalen Membrandomäne (Leung et al., 1999; Wiesenfahrt, 2005). Welche Funktion die Reorganisation des Zytoskeletts während der Darmentwicklung hat, konnte bisher nicht ausreichend untersucht werden, da Defekte des Zytoskeletts oder assoziierter Proteine in der Regel zu starken Defekten während der ersten Zellteilungen führen. Ebenso konnte die Rolle der meisten CeAJ Proteine bei der Darmentwicklung nicht im Detail analysiert werden, da ihr Verlust zu einem Arrest während der Morphogenese aufgrund von Hypodermisdefekten führt. Eine Methode, mit der sich Gene gezielt in den Darmzellen herunterregulieren lassen, wäre also wünschenswert.

1.3 Der Aufbau interzellulärer Kontaktstrukturen in *C. elegans* Epithelien

Im Gegensatz zu *Drosophila* und Vertebraten wurde im *C. elegans* Embryo auf ultrastruktureller Ebene bisher nur eine elektronendichte Kontaktstruktur identifiziert, die so genannte „*C. elegans* apical junction“ (CeAJ, Abb.3; McMahon et al., 2001). Sie enthält Merkmale und Proteine anderer Kontaktstrukturen in *Drosophila* und Vertebraten (in Abb.3 durch den Farbcode dargestellt).

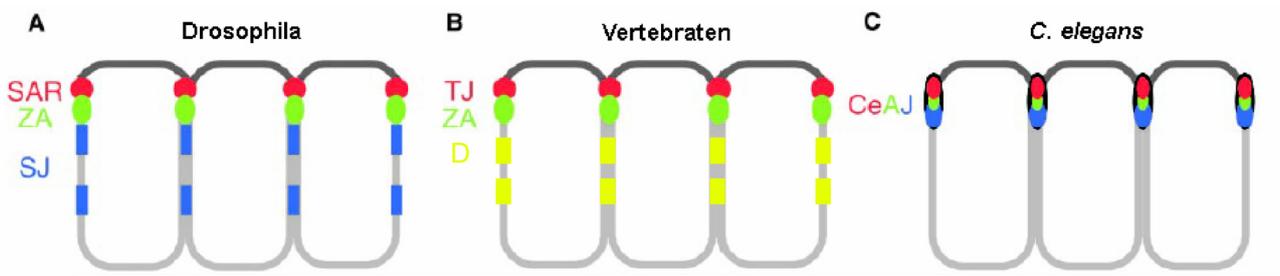


Abb. 3: Epithelien aus verschiedenen Spezies und ihre Kontaktstrukturen

In *Drosophila* und Vertebraten sind die Kontaktstrukturen klar getrennt. *Drosophila* besitzt eine subapikale Region (SAR), eine *Zonula adherens* (ZA) und eine „septate junction“ (SJ), während Vertebraten eine „tight junction“ (TJ), eine ZA und Desmosomen (D) besitzen. Der *C. elegans* Embryo besitzt nur eine Kontaktstruktur, die so genannte „*C. elegans* apical junction“, welche allerdings Charakteristika der anderen Kontaktstrukturen aufweist (modifiziert nach Knust und Bossinger, 2002).

Die CeAJ kann auf Immunfluoreszenzebene in einen apikalen und einen basalen Bereich unterteilt werden. Apikal befindet sich das Protein Crumbs und der Cadherin-Catenin Komplex (CCK, bestehend aus den Proteinen E-Cadherin, HMR-1; α -Catenin, HMP-1 und β -Catenin, HMP-2; Bossinger et al., 2001; Costa et al., 1998). E-Cadherin ist ein Transmembranprotein, welches extrazellulär homophile Interaktionen mit E-Cadherin auf benachbarten Zellmembranen eingeht und intrazellulär an β -Catenin bindet, welches wiederum mit α -Catenin interagiert und so eine Verbindung zum Aktinzytoskelett der Zelle herstellt (Labouesse, 2006). Nach Verlust des CCK kommt es zu embryonaler Letalität zu Beginn der Morphogenese aufgrund von Hypodermisdefekten (Costa et al., 1998).

Im basalen Bereich der CeAJ befindet sich ein Komplex aus DLG-1 (dem Homolog von *Drosophila* Discs Large) und AJM-1, der DLG-1-AJM-1-Komplex (DAK; Bossinger et al., 2001; Köppen et al., 2001; McMahon et al., 2001). DLG-1 ist ein Protein mit mehreren PDZ Domänen und AJM-1 („apical-junction-protein“) ein Protein mit einer „coiled-coil“ Domäne. Während der Embryonalentwicklung werden beide Gene in den drei großen

Epithelien des Embryos, Darm, Hypodermis und Pharynx, exprimiert. Im WT führt RNAi gegen beide Gene zu embryonaler Letalität in der Morphogenese. Die Embryonen weisen starke Hypodermisdefekte auf und sind nicht in der Lage korrekt zu elongieren. Im Falle von *dlg-1* RNAi lässt sich auf Immunfluoreszenzebene ein diskontinuierliches AJM-1 Muster feststellen und es kommt zum Verlust der elektronendichten Struktur (McMahon et al., 2001; Köppen et al., 2001, Bossinger et al., 2001). Nach *ajm-1* RNAi zeigen EM Aufnahmen blasenförmige Lücken im Bereich der CeAJ zwischen den Zellen (Köppen et al., 2001).

Der CCK und der DAK scheinen redundant in Bezug auf die Zelladhäsion zu wirken (Segbert et al., 2004). Bei Verlust des CCK oder des DAK ist weder die Adhäsion noch die Polarität der Epithelzellen stark gestört. Auch die Lokalisation des jeweils anderen Komplexes ist weitgehend unbeeinträchtigt (Lynch und Hardin, 2009; Labouesse, 2006). Bei gleichzeitigem Verlust des CCK und des DAK kommt es allerdings zu einem Verlust der Adhäsion im Darmepithel von *C. elegans* (Segbert et al., 2004).

Für die Aufrechterhaltung der Zellpolarität in Epithelzellen ist das basolateral lokalisierte Protein LET-413 (*lethal-413*; Legouis et al., 2000), das Homolog des *Drosophila* Scribble Proteins, verantwortlich (Bossinger et al., 2004). LET-413 gehört zur LAP1 Proteinfamilie (LRR and PDZ-Domänen). Ein Verlust von LET-413 führt zunächst zu einer verspäteten Anreicherung von DLG-1 und AJM-1 an der apikalen Membran (Segbert et al., 2004). Dort weist ihre Verteilung im Gegensatz zum WT Unterbrechungen auf und sie bilden kein durchgehendes CeAJ Muster aus. Während der Morphogenese kommt es zu einem Polaritätsverlust in den Epithelzellen. CeAJ Komponenten und apikal lokalisierte Proteine breiten sich entlang der basolateralen Membran aus (Bossinger et al., 2004; McMahon et al., 2001).

Unklar ist allerdings, wie die Polarität in den Epithelzellen etabliert wird. Alle apikalen, CeAJ oder basolateralen Proteine, die bisher untersucht wurden (u.a.: ERM-1, HMR-1, DLG-1, LET-413), führen zwar zu starken Defekten in der Epithelentwicklung, beeinträchtigen aber nicht die initiale Polarisierung des Epithels (McGhee, 2007; Lynch and Hardin, 2009). In den Epithelien von Vertebraten und *Drosophila* konnte gezeigt werden, dass Homologe der *par*-Gene für die Etablierung der Polarität und für die korrekte Entwicklung der Kontaktstrukturen essentiell sind. Sie lokalisieren in den TJ bzw. der SAR (Macara, 2004; Müller and Bossinger, 2003; Lynch and Hardin, 2009). Auch in den Epithelien von *C. elegans* werden die *par*-Gene (*par-1*, *-2*, *-3*, *-6*, *pkc-3*) während der

Polarisierung in den Epithelien exprimiert. Allerdings konnte ihre Rolle bei der Epithelentwicklung lange Zeit nicht untersucht werden, da sie auch maßgeblich an der Polarisierung des 1-Zellstadiums beteiligt sind (Cowan and Hyman, 2004; Nance, 2005). Werden die *par*-Gene durch RNAi herunterreguliert, kommt es zu sehr starken Defekten während der ersten Teilungen, so dass sich keine Epithelien entwickeln, die untersucht werden können. Es konnte allerdings in der Arbeitsgruppe von Dr. Nance gezeigt werden, dass zumindest PAR-6 essentiell ist, um CeAJ Proteine zu einer durchgehenden Gürtel-ähnlichen Struktur zu formen, nicht aber für die Polarisierung der embryonalen Epithelien (Totong et al., 2007).

Dazu wurden in den letzten Jahren PAR-Konstrukte entwickelt, die eine C-terminale ZF1 Domäne tragen, die zum Abbau der PAR Proteine ab dem 8-Zellstadium führen. ZF1 ist eine Domäne des PIE-1 Proteins, welches wichtig für die Etablierung der Keimbahn ist (Mello et al., 1996). Die ZF1 Domäne führt zur Degradierung des PIE-1 Proteins in den somatischen Zellen, aber erst, nachdem die frühe Polarisierung abgeschlossen ist (Reese et al., 2000; Tenenhaus et al., 1998). Im frühen Embryo sind die PAR Proteine also vorhanden, lassen sich aber nach dem 50-Zellstadium, also vor der Entwicklung der Epithelien, nicht mehr nachweisen (Nance et al., 2003; Totong et al., 2007). Der Nachteil dieser Methode ist, dass für jedes Gen ein Konstrukt und dann ein transgener Stamm hergestellt werden muss, was sehr zeitaufwendig ist. Eine schnellere, unkompliziertere Lösung zur Untersuchung früh exprimierter Gene während der Epithelentwicklung wäre die gewebespezifische RNAi.

1.4 Die Methode der RNA vermittelten Interferenz

Bei der RNAi wird mit Hilfe von doppelsträngiger (ds) RNA das Gen mit derselben Sequenz herunterreguliert, indem die mRNA des Gens abgebaut wird. Voraussetzung ist also, dass die Gensequenz bekannt ist und dass die dsRNA aus Exons des jeweiligen Gens besteht. Diese Methode ermöglicht es, gezielt Gene herunterzuregulieren und deren Funktion zu studieren (Fire et al., 1998). Gerade auf dem Gebiet der Erforschung des RNAi-Mechanismus hat sich *C. elegans* als besonders wertvoll erwiesen. So erhielten Andrew Fire und Craig Mello für ihre Forschungen an *C. elegans* auf diesem Gebiet 2006 den Nobelpreis für Physiologie oder Medizin.

In *C. elegans* wird RNAi durch lange dsRNA induziert. dsRNA kann *C. elegans* auf drei verschiedenen Wegen zugeführt werden: 1) durch Mikroinjektion, 2) durch Inkubation in einer Lösung, die dsRNA enthält („soaking“), oder 3) durch Fütterung über Bakterien (Ahringer, 2006; Tabara et al., 1998; Timmons et al., 2001). Bei der Fütterung wird ein RNaseIII-defizienter Bakterienstamm (HT115) verwendet, der die dsRNA mit Hilfe eines speziellen Vektors (pPD129.36) produziert. Er besitzt zwei T7-Promotoren, zwischen denen die cDNA des Gens liegt, das herunterreguliert werden soll. So werden „sense“ und „antisense“ Strang der RNA transkribiert, welche sich dann zu dsRNA zusammenlagern. Nach der Aufnahme der Bakterien gelangt die dsRNA direkt aus dem Darmlumen in die Darmzellen. Durch diese Methode wurde es möglich eine große Anzahl von Würmern mit dsRNA zu behandeln und erste, groß angelegte Funktionsanalysen mit Hilfe der RNAi Methode durchzuführen (Fraser et al., 2000; Gönczy et al., 2000; Kamath and Ahringer, 2003; Maeda et al., 2001; Sönnichsen et al., 2005). Die Methode der Fütterung ist allerdings nicht immer so effektiv wie die Injektion von dsRNA, was zu einer geringeren Penetranz und Expressivität der Phänotypen führen kann (Timmons and Fire, 1998). In dieser Arbeit werden ausschließlich die Methode der Fütterung und der Injektion verwendet.

In den letzten Jahren haben intensive Forschungen zu folgendem Modell des RNAi Mechanismus geführt (Aoki et al., 2007; Grishok, 2005; Jose et al., 2009; Pak and Fire, 2007; Sijen et al., 2007; Yigit et al., 2006). Nach Aufnahme der dsRNA in die Zelle wird diese vom Dicer Komplex in Zusammenspiel mit RDE-4 gebunden und in primäre „small interfering“ (si) RNAs zerschnitten. Primäre siRNAs sind 21-23 Nukleotide (nt) lang und besitzen ein Monophosphat am 5'-Ende. Sie werden vom Argonaut Protein RDE-1 gebunden (Tabara et al., 1999), welches sequenzspezifisch die Ziel mRNA bindet. Dort rekrutiert RDE-1 auf noch ungeklärte Weise RNA-abhängige RNA Polymerasen (RDRPs). Sie synthetisieren in einer Primer-unabhängigen Reaktion neue sekundäre siRNAs, wobei ihnen die Ziel-mRNAs als Matrize dienen. Sekundäre siRNAs sind ebenfalls 21-23nt lang, haben immer „antisense“ Polarität (d.h. sie sind komplementär zur mRNA) und weisen ein Triphosphat am 5'-Ende auf. Sie werden vom Argonaut Protein CSR-1 gebunden, welches dann letztlich die Ziel mRNA zerschneidet und die Translation verhindert. RDE-1 und CSR-1 sind die einzigen bisher beschriebenen Argonaut Proteine in *C. elegans* mit einer funktionellen RNase H Domäne. Es konnte jedoch kürzlich gezeigt werden, dass RDE-1 nur den „passenger“ („sense“) Strang, der primären siRNAs zerschneidet (Steiner et al.,

2009), während CSR-1 die Ziel mRNA abbaut (Abb.4). RDE-1 wird als primäres Argonaut Protein bezeichnet, da es vornehmlich primäre siRNAs bindet (Yigit et al., 2006). Es besitzt zwei RNA-bindende Domänen, eine PAZ- und eine PIWI-Domäne, wobei letztere das RNase H Motiv beinhaltet.

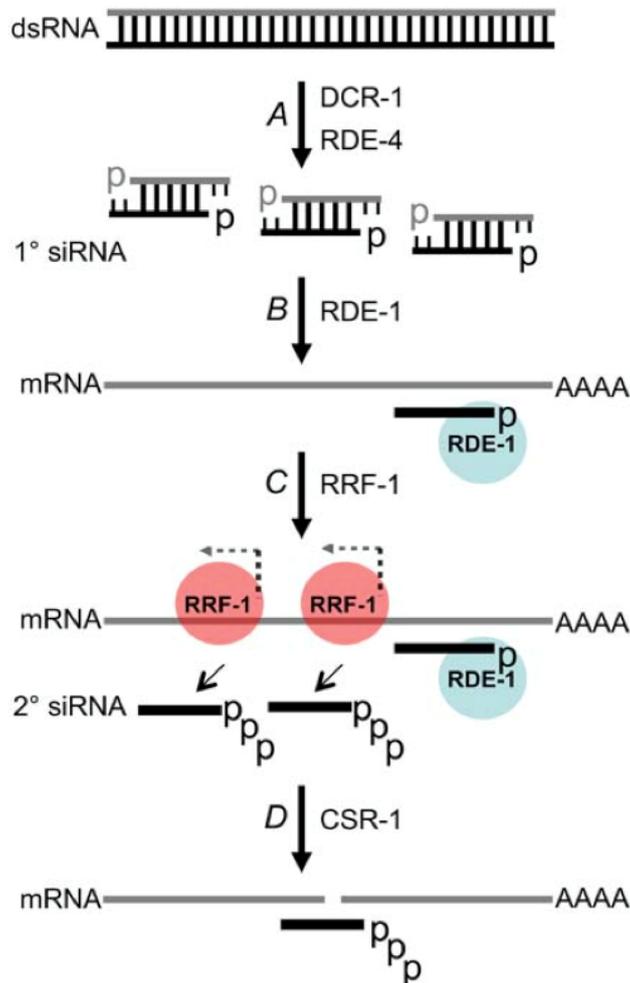


Abb. 4: RNAi-Mechanismus

Die dsRNA wird nach Aufnahme in die Zelle von einem Komplex aus DCR-1 und RDE-4 gebunden und in primäre, 1-fach phosphorylierte, siRNAs zerschnitten (A). Diese werden von RDE-1 gebunden, welches den „sense“-Strang der siRNA abbaut und mit dem „antisense“-Strang an die Ziel-mRNA bindet (B). Dort rekrutiert RDE-1 RRF-1, eine RNA abhängige RNA-Polymerase, die sekundäre siRNAs synthetisiert, wobei die mRNA als Matrize dient (C). Die sekundären, 3-fach phosphorylierten siRNAs werden von CSR-1 gebunden, welches an die Ziel-mRNA bindet und sie abbaut (D). (modifiziert nach Habig et al., 2008)

Im Vergleich zur klassischen Genetik ist die Methode der RNAi ein schnelles und einfaches Verfahren um die Genfunktion zu erforschen, da hier das Gen, dessen Funktion herunterreguliert wird, bekannt ist. Bei der klassischen Genetik dagegen muss nach einer Mutagenese erst nach einem Phänotyp gesucht, und anschließend das mutierte Gen

kloniert werden. Mit RNAi lassen sich, mit Hilfe der Fütterungs- oder „soaking“-Methode, auch das komplette Genom umfassende Screens durchführen (Boutros and Ahringer, 2008). Ein Nachteil eines RNAi Screens ist, dass er einen hohen logistischen Aufwand benötigt um schnell durchgeführt werden zu können. Immerhin müssen etwa 20.000 Gene einzeln herunterreguliert werden. Allerdings gibt es mittlerweile ausgeklügelte Verfahren um solche Screens durchzuführen und auszuwerten (Boutros and Ahringer, 2008).

Eine große Erleichterung bei der Anwendung von RNAi Experimenten, und vor allem bei der Durchführung von RNAi-Screens, ist die Existenz von kommerziell erhältlichen „RNAi feeding libraries“ (RNAi Fütterungs-Bibliotheken). Sie bestehen aus einer Bibliothek von Bakterienkulturen. Jede Kultur enthält den pPD129.36 RNAi Fütterungs-Vektor mit dem Fragment eines anderen Gens, so dass ein Großteil der Gene von *C. elegans* herunterreguliert werden können. In dieser Arbeit wurde die „feeding library“ von Geneservice Ltd (www.geneservice.co.uk) verwendet, die im Labor von Dr. Ahringer hergestellt wurde (Kamath and Ahringer, 2003). Sie besteht aus 16.757 verschiedenen HT155 Bakterien Klonen. Die Library deckt damit 83% der Gene des *C. elegans* Genoms ab. Die Kulturen werden als Glycerin „stocks“ in 52 384er „well-plates“ geliefert und sind sofort für RNAi Experimente einsatzbereit (siehe Material und Methoden). Eine Über-Nacht Kultur der Bakterien wird auf Agarplatten verteilt und nach 12-stündiger Inkubation können bereits Würmer auf die Platten gesetzt werden. Die Bakterien werden als Nahrung gefressen und die dsRNA wird aus dem Darmlumen durch die SID-2 Kanäle in die Epithelzellen aufgenommen. Von dort aus verteilt sie sich im gesamten Wurm und gelangt auch in die Nachkommen (Grishok, 2005; Winston et al., 2002; Winston et al., 2007).

In *C. elegans* existiert das Phänomen der systemischen RNAi (Fire et al., 1998). Dies bedeutet, dass sich der RNAi Effekt von einer Zelle oder einem Gewebe aus im gesamten Wurm ausbreiten kann. Wird etwa dsRNA in den Darm von *C. elegans* injiziert, so führt dies zur Herunterregulierung des Gens in fast allen Zellen, sowie in den Nachkommen des Wurms (Tabara, 1999). In elegant angelegten genetischen Screens konnte unter anderem eine Mutante identifiziert werden, bei der die RNAi Maschinerie zwar in einzelnen Zellen funktioniert, aber die Ausbreitung des RNAi Effekts in benachbarte Zellen gestört ist (Winston, 2002). Das auf diese Weise gefundene Gen *sid-1* („systemic RNAi defective“) kodiert für ein Transmembrankanalanprotein. Durch Experimente in Zellkultur konnte gezeigt werden, dass SID-1 die passive (ATP-unabhängige) Aufnahme von dsRNA vermittelt, für den Export der dsRNA aber nicht gebraucht wird. Die Länge der dsRNAs scheint dabei

keine Rolle zu spielen (Feinberg and Hunter, 2003; Jose et al., 2009; Shih et al., 2009). Allerdings konnte gezeigt werden, dass die Injektion von siRNAs, die die Embryonalentwicklung betreffen, in einen Gonadenarm von *C. elegans* nur in 50% der Fälle zu einem Phänotyp führt. Injektion von dsRNA in einen Gonadenarm, oder von siRNAs in beide Gonadenarme dagegen führt in 100% der Fälle zu einem Phänotyp. Daraus wurde geschlossen, dass *in vivo* wahrscheinlich eher die lange dsRNA für den systemischen Effekt verantwortlich ist und nicht die siRNAs (Tijsterman et al., 2002; Grishok, 2005).

Ein Nachteil des systemischen Charakters des RNAi Mechanismus ist, dass die Gene in fast allen Geweben, außer z.B. dem Nervengewebe, herunterreguliert werden (Grishok, 2005). Das führt dazu, dass z.B. die Rolle der *par*-Gene während der Entwicklung der embryonalen Epithel mit RNAi nicht untersucht werden kann, da sie zu früher embryonaler Letalität führt (Cowan und Hyman, 2005). Ebenso kann die Rolle der CeAJ Proteine im Darmepithel nicht ausreichend untersucht werden, da der Embryo aufgrund von Hypodermisdefekten früh in der Morphogenese arretiert (Lynch und Hardin, 2009). Um diese Probleme zu umgehen wurde 2001 in unserem Labor von Christoph Segbert ein transgener Stamm (OLB11) entwickelt, der Darm-spezifische RNAi erlaubt (McGhee et al., 2009; Pilipiuk et al., 2009).

1.5 Fragestellung I

RNAi ist eine einfache und schnelle Methode, um die Genfunktion in *C. elegans* zu untersuchen. In *C. elegans* wirkt der RNAi Mechanismus systemisch, der Effekt breitet sich also von Zelle zu Zelle aus und überträgt sich von den adulten Tieren auf die Nachkommen. Führt dies jedoch zu früher embryonaler Letalität, lässt sich eine mögliche späte Funktion eines bestimmten Gens nicht mehr untersuchen. Zum anderen wird das Gen in fast allen Geweben herunterreguliert, was dazu führen kann, dass ein Phänotyp in einem Gewebe durch Defekte in anderen Geweben überlagert wird. Daher wurde ein transgener Stamm entwickelt, der gewebespezifische RNAi in den Darmzellen erlaubt. Folgende Experimente sollten im Rahmen dieser Doktorarbeit Arbeit durchgeführt werden.

1. Charakterisierung des Darm-spezifischen RNAi Stamms OLB11. Wirkt die RNAi Methode über Fütterung und Injektion? Reagieren die Darmzellen sensitiv gegenüber RNAi? Bleibt der RNAi Effekt auf die Darmzellen beschränkt? Wie effektiv wirkt die Darm-spezifische RNAi verglichen zu RNAi im WT?
2. Darm-spezifische RNAi gegen epitheliale Gene und Analyse der Phänotypen mit DIK und Immunfluoreszenz Mikroskopie und Bestimmung der Letalitätsrate. Vergleich der Phänotypen nach Darm-spezifischer RNAi mit denen bekannter Phänotypen im WT.
3. Darm-spezifische Herunterregulierung früh exprimierter Gene, z.B. der *par*-Gene, um deren Rolle bei der Entwicklung und Polarisierung der Darmzellen zu analysieren. Kann mit der Etablierung der Polarität in den Darmzellen interferiert werden? Wie sind apikale und CeAJ Proteine verteilt?

2 Ergebnisse I: Analyse des Darm-spezifischen RNAi Stamms OLB11

Um einen Stamm zu kreieren, der Darm-spezifische RNAi erlaubt wurde die *rde-1(ne219)* Mutante (Tabara et al., 1999) benutzt. *rde-1(ne219)* Würmer sind insensitiv gegenüber RNAi, zeigen ansonsten aber keinen Phänotyp. Durch Expression des wildtypischen *rde-1* Gens unter der Kontrolle des Darm-spezifischen *elt-2* Promoters (Fukushige et al., 1998; Hawkins and McGhee, 1995; McGhee et al., 2009) erlangen nur die Darmzellen ihre Sensitivität gegenüber dem RNAi-Mechanismus zurück. *elt-2* kodiert für einen GATA-Typ Transkriptionsfaktor (TF) mit einem einzelnen Zinkfinger und ist der wahrscheinlich vorherrschende TF in den Darmzellen (McGhee et al., 2009). Die Aktivität von ELT-2 lässt sich zum ersten Mal im 2E-Zellstadium nachweisen. Ab diesem Zeitpunkt bleibt der TF aktiv und wird ausschließlich in den Darmzellen exprimiert (Abb.6; McGhee et al., 2009; Fukushige et al., 1998; Hawkins und McGhee, 1995).

Für das *elt-2::rde-1+* Konstrukt wurden von Christoph Segbert 5KB der Promoter Sequenz von *elt-2* mit dem WT *rde-1* Gen fusioniert (Abb.5, Sequenz siehe Anhang). Das *elt-2::rde-1+* Transgen wurde dann von Daniela van den Ecker stabil in die *rde-1(ne219)* Mutante integriert (van den Ecker, 2006).



Abb. 5: *elt-2::rde-1* Konstrukt

5KB der Promoterregion des *elt-2* Gens (rot) sind mit dem WT *rde-1* Gen (grün) in dem Vektor pPD49.78 (schwarz) fusioniert.

Ähnliche Stämme, die gewebespezifische RNAi in der Hypodermis, den Muskeln und den Vulva-Vorläuferzellen erlauben, wurden bereits beschrieben. Sie funktionieren nach dem gleichen Prinzip wie der OLB11 Stamm, nur dass das WT *rde-1* Gen unter der Kontrolle des Vulva-Vorläuferzellen spezifischen *egl-17*, des Hypodermis-spezifischen *lin-26*, oder des muskelspezifischen *hlh-1* Promoters exprimiert wird (Asakura et al., 2007; Qadota et al., 2007).

Das Expressionsmuster des *elt-2* Gens wurde bereits beschrieben (Fukushige et al., 1998), wird hier aber noch mal gezeigt, um das Expressionsmuster des *elt-2::rde-1* Konstrukts zu verdeutlichen. Abb.6 zeigt einen transgenen Embryo, der ein *elt-2::gfp*

Konstrukt exprimiert (JM149, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. McGhee). An diesem Stamm lässt sich erkennen, in welchen Zellen und zu welcher Zeit das *elt-2* Gen exprimiert wird. Die ersten GFP-Signale sind im 2E-Zellstadium zu erkennen (Abb.6A). Das ELT-2::GFP Signal ist während der Embryogenese im 4E-, 8E-, 16E- und 20E-Zellstadium zu sehen. Während der Entwicklung wird die Fluoreszenz stärker, bleibt aber stets auf die E-Zellen beschränkt (Abb.6B-E, Fukushige et al., 1998). Dies legt nahe, dass das *elt-2::rde-1* Konstrukt in OLB11 vermutlich auch nur in den E-Zellen exprimiert wird.

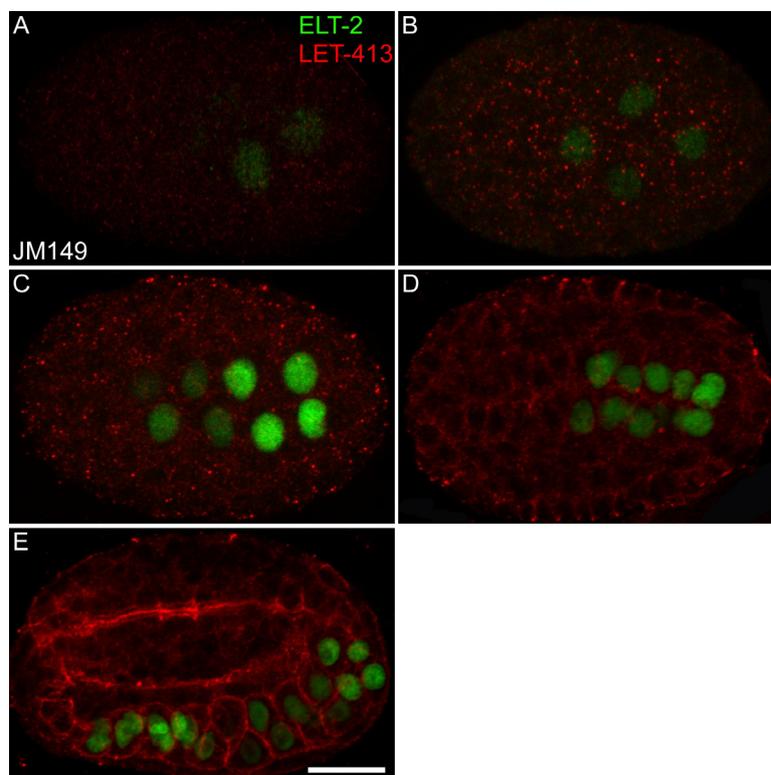


Abb. 6: Die *elt-2* Expression beginnt im 2E-Zellstadium

Embryonen des JM149 Stammes, der ein *elt-2::gfp* Transgen exprimiert, wurden mit Antikörpern gegen LET-413 (rot) und GFP (grün) gefärbt. Die ersten ELT-2::GFP Signale sind im 2E-Zellstadium zu erkennen (A). (B) zeigt ein 4E-, (C) ein 8E- und (D) ein 16E-Zellstadium vor der Morphogenese. (E) zeigt einen Embryo im 2-fach elongierten Stadium mit 20E-Zellen. Anterior ist links, dorsal oben, Eichstrich ist 10 μ m.

2.1 In OLB11 lassen sich Gene mit RNAi über Fütterung in Larven und adulten Tieren herunterregulieren

Um zu testen, ob die Darmzellen in OLB11 sensitiv gegenüber RNAi reagieren, wurden die Darm-spezifischen Gene *elt-2* und *ifb-2* über Fütterung während der Larvalentwicklung herunterreguliert. Dazu wurden WT und OLB11 Embryonen auf Platten mit OP50

Bakterien und mit *elt-2* und *ifb-2* „Fütterungs“-Bakterien (siehe 1.2) gesetzt. Nach fünf Tagen wurde die Entwicklung der Würmer dokumentiert.

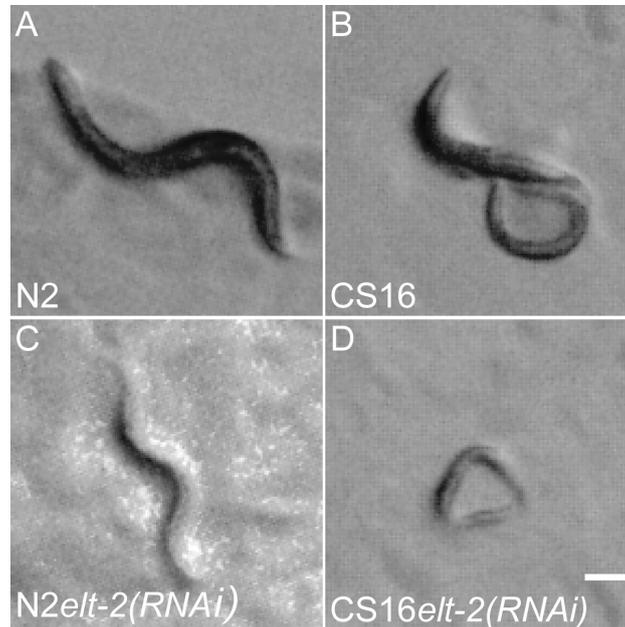


Abb. 7: *elt-2* RNAi im WT und OLB11 führt zu larvaler Letalität

Durchlichtbild von fünf Tage alten WT (A, C) und OLB11 Würmern (B, D), die auf OP50 (A, B) und auf Bakterien, die dsRNA gegen *elt-2* produzieren, (C, D) gehalten wurden. WT und OLB11 Würmer zeigen larvalen Arrest nach *elt-2* RNAi. Eichstrich ist 100 µm.

Nach *elt-2* RNAi im WT kommt es zu larvaler Letalität aufgrund von Verschlüssen des Darmlumens (Geissler, 2009; Fukushige et al., 1998). Auch in OLB11 ist nach postembryonaler *elt-2* RNAi 100% larvale Letalität zu beobachten (Abb.7, n>100). IFB-2 kodiert für ein Intermediärfilament, welches apikal in den Darmzellen, in der so genannten „endotube“ (siehe Teil II; Bossinger et al., 2004; Hüsken et al., 2008; Munn and Greenwood, 1983), lokalisiert ist. WT Würmer zeigen nach RNAi gegen *ifb-2* keinen offensichtlichen Phänotyp (Bossinger et al., 2004). OLB11 Würmer wurden als Embryonen auf RNAi Platten gesetzt und nach fünf Tagen als adulte Würmer präpariert und ihre Därme gegen IFB-2 gefärbt. Im Vergleich zum WT ist eine deutliche Reduktion der Fluoreszenz zu erkennen, was zeigt, dass das Gen teilweise ausgeschaltet wurde (Abb.8). Das Restsignal ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass RNAi zu einer Herunterregulierung der Genfunktion, aber nicht zu einer kompletten Ausschaltung führt (Timmons et al., 1998, Ahringer, 2006). Außerdem wird das *ifb-2* Gen bereits während der Embryonalentwicklung exprimiert (Bossinger et al., 2004) und durch RNAi wird die mRNA eines Gens abgebaut, nicht aber bereits synthetisierte Proteine (Fire et al., 1998). Das

IFB-2 Restsignal könnte also auch auf Proteine zurückzuführen sein, die während der Embryogenese synthetisiert wurden. Die RNAi Versuche gegen *ifb-2* und *elt-2* zeigen, dass postembryonale RNAi über Fütterung in OLB11 funktioniert.

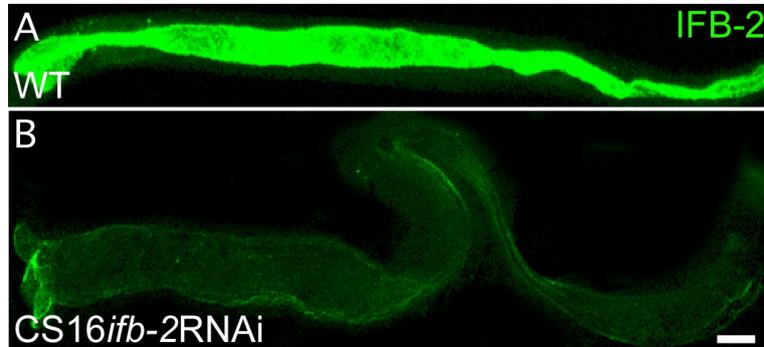


Abb. 8: *ifb-2* ist nach postembryonaler RNAi über Fütterung in OLB11 herunterreguliert

Immunfluoreszenzfärbung an präparierten Därmen eines adulten WT (A) und OLB11 *ifb-2* RNAi (B) Wurms gegen IFB-2. Das IFB-2 Signal im WT ist deutlich stärker als in OLB11 nach *ifb-2* RNAi. Eichstrich ist 10 µm.

2.2 In OLB11 lassen sich die epithelialen Gene *dlg-1*, *ajm-1* und *let-413* durch Injektion dsRNA spezifisch in den Darmzellen herunterregulieren

Als nächstes wurden die Gene *dlg-1*, *ajm-1* und *let-413* in OLB11 Embryonen herunterreguliert. Im WT arretiert die Entwicklung der Embryonen nach *dlg-1*, *ajm-1* und *let-413* RNAi in der Morphogenese, wahrscheinlich aufgrund von Hypodermisdefekten (Labouesse, 2006). Es konnte bisher aber noch nicht gezeigt werden, welcher Phänotyp sich einstellt, wenn die Gene spezifisch im Darmepithel herunterreguliert werden. Wenn RNAi in OLB11 Darm-spezifisch funktioniert, sollte es nicht zu Elongationsdefekten kommen. Da nach *dlg-1*, *ajm-1* und *let-413* RNAi die CeAJ auf ultrastruktureller Ebene Defekte aufweist (Köppen et al., 2001; MacMahon et al., 2001), wäre es möglich, dass die Darmzellen während der Elongation des Embryos ihre Adhäsion zueinander verlieren. Es wäre aber auch denkbar, dass der CCK die Aufgaben des „geschwächten“ DAK im Darmepithel übernimmt und sich die Würmer ohne sichtbare Defekte weiter entwickeln. Zunächst wurde die RNAi über Fütterung angewendet. Dafür werden adulte Tiere auf Fütterungsplatten gesetzt. Da in *C. elegans* das Phänomen der systemischen RNAi existiert (siehe Einleitung), sollte die über Bakterien aufgenommene dsRNA auch in die F1-Nachkommen gelangen und dort die Genfunktion herunterregulieren. In OLB11

allerdings konnte nach RNAi über Fütterung kein Phänotyp induziert werden (Tabelle 1 und Daten nicht gezeigt). Es ist bekannt, dass RNAi über Injektion effektiver sein kann, weil die Konzentration der dsRNA höher ist als bei RNAi über Fütterung (Timmons et al., 1998; Ahringer, 2006). Aus diesem Grund wurde RNAi über Injektion gegen die Gene *dlg-1*, *ajm-1* und *let-413* angewandt. Der Nachteil der Injektionsmethode ist, dass jeder Wurm einzeln mit dsRNA injiziert werden muss, diese also wesentlich zeitaufwendiger als die Fütterungsmethode ist.

RNAi	Verdünnung	Letalität in %	
		N2	OLB11
<i>elt-2</i> (postembryonal)	-	100%	100%
<i>let-413</i> (embryonal)	1:10	0%	0%
	1:5	0%	0%
	1:2	64%	0%
	-	100%	0%
<i>dlg-1</i> (embryonal)	1:10	0%	0%
	1:5	0%	0%
	1:2	16%	0%
	-	97.5%	0%
<i>cyb-3</i> (embryonal)	1:10	100%	0%
	1:5	100%	0%
	1:2	100%	0%
	-	100%	0%

Tabelle 1: Letalität nach RNAi über Fütterung im WT und OLB11

Postembryonale *elt-2* RNAi im WT und in OLB11 führt zu 100% larvaler Letalität, $n > 50$. *cyb-3*, *dlg-1* und *let-413* wurden über Fütterung im WT und in OLB11 herunterreguliert. Die Fütterungsbakterien, die dsRNA exprimieren, wurden dabei mit Fütterungsbakterien, die keine dsRNA exprimieren, in den angegebenen Verhältnissen gemischt. $n > 500$ in allen Experimenten.

Da DLG-1 und AJM-1 in einem Komplex vorliegen (Labouesse, 2006), werden sie hier zusammen abgehandelt. Nach Injektion von dsRNA gegen *dlg-1* und *ajm-1* konnte lediglich larvale, aber keine embryonale Letalität in OLB11 beobachtet werden. Dies zeigt, dass die Embryonen korrekt elongieren können und sich die Hypodermis anscheinend normal entwickelt. Etwa 25% ($n = 2344$) der geschlüpften *dlg-1* RNAi Larven sterben im L1-Larvenstadium mit großen Vakuolen im Darm, während die Hypodermis bei Differential-Interferenz-Kontrast (DIK)-Optik keine Defekte aufweist (Graph: 1, schwarze Pfeile in Abb.9C,10C). Die restlichen 75% der Larven entwickeln sich zu adulten Tieren, die keine offensichtlichen Defekte aufweisen. RNAi in OLB11 scheint gegen *dlg-1* nicht so effektiv wie im WT zu wirken, da *dlg-1* RNAi im WT über Fütterung bereits zu 97,5% embryonaler Letalität führt (Tabelle 1).

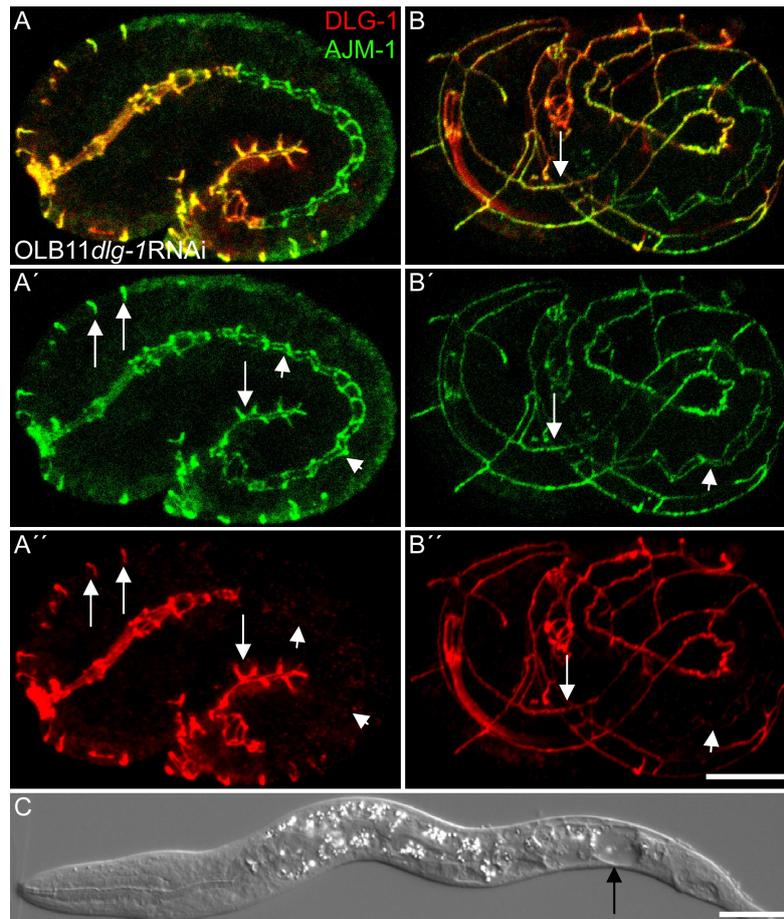


Abb. 9: Der OLB11 Stamm erlaubt gewebespezifisches RNAi

A-B'' zeigt zwei OLB11*dlg-1*RNAi Embryonen im 1,5-fach elongierten Stadium (A-A'') und im 3-fach elongierten Stadium (B-B''). Immunfluoreszenzfärbungen wurden gegen die CeAJ Proteine DLG-1 (rot) und AJM-1 (grün) durchgeführt. Weiße Pfeile zeigen auf die CeAJ der Hypodermis und Pfeilspitzen auf die CeAJ der Darmzellen. DLG-1 wurde im Darm durch RNAi herunterreguliert (vergleiche Pfeilspitzen in A' und A'', B' und B''), in der Hypodermis aber nicht (vergleiche Pfeile in A' und A'', B' und B''). C zeigt eine OLB11*dlg-1*RNAi L1-Larve mit großer Vakuole im Darm (schwarzer Pfeil). Anterior ist links, dorsal oben, Eichstriche sind 10 μ m.

Als nächstes wurden die Embryonen präpariert und gegen DLG-1 und AJM-1 gefärbt, um den RNAi Effekt auf Antikörperebene zu analysieren (Abb.9,10). In den *dlg-1* RNAi Tieren ist zu beobachten, dass das DLG-1 Signal im Vergleich zum AJM-1 Signal bereits im 1,5-fach elongierten Stadium in den Darmzellen stark herunterreguliert ist (vergleiche durch Pfeilspitzen markierte Immunfluoreszenzfärbung in Abb.9A' und 9A''). In den Hypodermiszellen dagegen ist sowohl das DLG-1 als das AJM-1 Signal zu erkennen, was darauf hinweist, dass hier der RNAi Mechanismus nicht gewirkt hat. Abb.9B-B'' zeigt einen OLB11*dlg-1*RNAi Embryo im 3-fach elongierten Stadium kurz vor dem Schlüpfen. Sowohl die Hypodermis (Pfeile) als auch der Darm (Pfeilspitzen) sind im Fokus. Auch hier ist deutlich zu sehen, dass das DLG-1 Signal im Darm verglichen mit dem Signal in der Hypodermis sehr schwach ist (Pfeile und Pfeilspitzen in Abb.9B'').

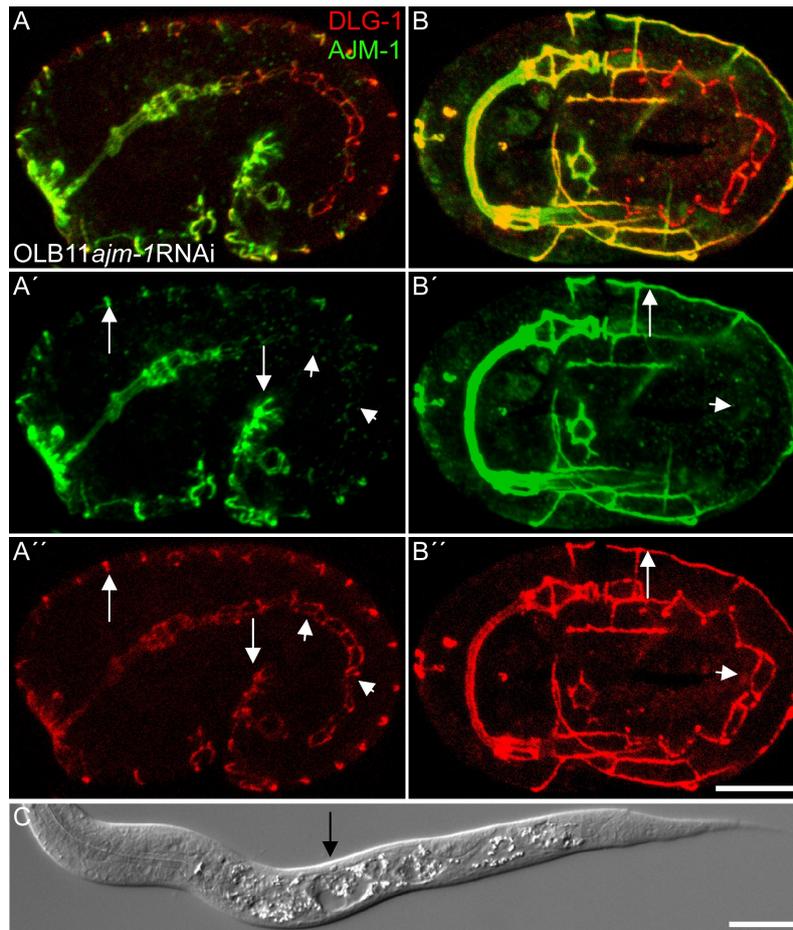


Abb. 10: Der OLB11 Stamm erlaubt gewebespezifisches RNAi

A-B' zeigt zwei OLB11*ajm-1*RNAi Embryonen im 1,5-fach elongierten Stadium (A-A'') und im 3-fach elongierten Stadium (B-B''). Immunfluoreszenzfärbungen wurden gegen die CeAJ Proteine DLG-1 (rot) und AJM-1 (grün) durchgeführt. Weiße Pfeile zeigen auf die CeAJ der Hypodermis und Pfeilspitzen auf die CeAJ der Darmzellen. AJM-1 wurde im Darm durch RNAi herunterreguliert (vergleiche Pfeilspitzen in A' und A'', B' und B''), in der Hypodermis aber nicht (vergleiche Pfeile in A' und A'', B' und B''). C zeigt eine OLB11*ajm-1*RNAi L1-Larve mit großer Vakuole im Darm (schwarzer Pfeil). Anterior ist links, dorsal oben, Eichstriche sind 10 µm.

In den *ajm-1* RNAi Tieren ist ebenfalls zu beobachten, dass das AJM-1 Signal im Vergleich zum DLG-1 Signal bereits im 1,5-fach elongierten Stadium in den Darmzellen stark herunterreguliert ist (vergleiche durch Pfeilspitzen markierte Immunfluoreszenzfärbung in Abb.10A' und 9A''). In den Hypodermiszellen dagegen ist sowohl von AJM-1 als auch von DLG-1 ein starkes Signal zu erkennen. Abb.10B-B'' zeigt einen OLB11*ajm-1*RNAi Embryo im 2,5-fach elongierten Stadium. Sowohl die Hypodermis (Pfeile), als auch der Darm (Pfeilspitzen) sind im Fokus. Auch hier ist deutlich zu sehen, dass das AJM-1 Signal im Darm verglichen mit dem Signal in der Hypodermis sehr schwach ist (vergleiche Pfeile und Pfeilspitzen in Abb.10B'').

Der RNAi Mechanismus scheint also nur in den Darmzellen zu wirken, nicht aber in den Hypodermiszellen. Das DLG-1 und AJM-1 Restsignal in den Darmzellen der OLB11*dlg-1*RNAi und OLB11*ajm-1*RNAi Embryonen ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass RNAi zu einer Herunterregulierung eines Genproduktes führt, nicht aber zu seiner totalen Ausschaltung (Ahringer, 2006). Es ist also immer noch Restprotein vorhanden, welches von einem sensitiven Antikörper detektiert werden kann.

Während der Embryonalentwicklung haben die Darmzellen ihre Adhäsion, auch während des Elongationsvorgangs, zueinander behalten. Dies weist daraufhin, dass die Funktion des CCK alleine, in Bezug auf die Adhäsion der Zellen, ausreichend ist. RNAi gegen Komponenten des CCK führen in OLB11 zu keinem Phänotyp (Tabelle 2; siehe Diskussion). Zusammengenommen zeigen die Ergebnisse, dass RNAi über Injektion in OLB11 während der Embryonalentwicklung funktioniert und dass der RNAi Effekt wahrscheinlich auf die Darmzellen beschränkt bleibt.

2.3 *let-413* zeigt eine hohe Sensitivität gegenüber RNAi

Für die korrekte Lokalisation von DLG-1 und AJM-1 ist das Protein LET-413 wichtig. Es spielt ebenfalls eine essentielle Rolle für die Aufrechterhaltung der Polarität in den Epithelzellen (Labouesse, 2006). LET-413 ist zunächst am gesamten Kortex der E-Zellen lokalisiert (Pilipiuk, 2006). Ab dem Beginn der Morphogenese ist es aber nur noch basolateral zu finden, wobei es sich lateral bis zur CeAJ erstreckt (Legouis et al., 2000). Nach RNAi gegen *let-413* zeigen sich zwei Phänotypen im WT. Zunächst ist die apikale Lokalisation der Proteine DLG-1 und AJM-1 verzögert. Sie sind erst nach Beginn der Morphogenese nachweisbar und zeigen ein diskontinuierliches Muster (Segbert et al., 2004). Im WT sammeln sich diese Proteine während der Polarisierung der Darmzellen, also schon vor der Morphogenese, an der zukünftigen apikalen Membran. Während dieser Zeit ist LET-413 noch an der kompletten Membran der E-Zellen lokalisiert (Abb.11). Dies legt den Schluss nahe, dass die frühe apikale LET-413 Lokalisation für die rechtzeitige Lokalisation von DLG-1 und AJM-1 wichtig ist. Der zweite Phänotyp zeigt sich im 1,5-fach elongierten Stadium. Die Polarität in den Darmzellen kann nicht aufrechterhalten werden, Komponenten des „terminal web“ und CeAJ Proteine breiten sich entlang der basolateralen Membran aus (Abb.12A-A'', Legouis et al., 2000; McMahon et al., 2001; Bossinger et al., 2004). Die Embryonen arretieren aufgrund von Defekten in der

Hypodermis im 1,5-fach elongierten Stadium. Ähnlich wie bei RNAi gegen *dlg-1* und *ajm-1* sollten die Hypodermisdefekte nach *let-413* RNAi in OLB11 nicht auftreten. Es konnte bisher noch nicht gezeigt werden, wie sich der *let-413* RNAi Phänotyp entwickelt, wenn die Embryonen in der Lage sein sollten korrekt zu elongieren. Aufgrund der Funktion von LET-413, nämlich der Aufrechterhaltung der Polarität in den Epithelzellen, wurde nun eine stärkere Fehllokalisierung von DLG-1 und AJM-1 erwartet als nach *dlg-1* oder *ajm-1* RNAi.

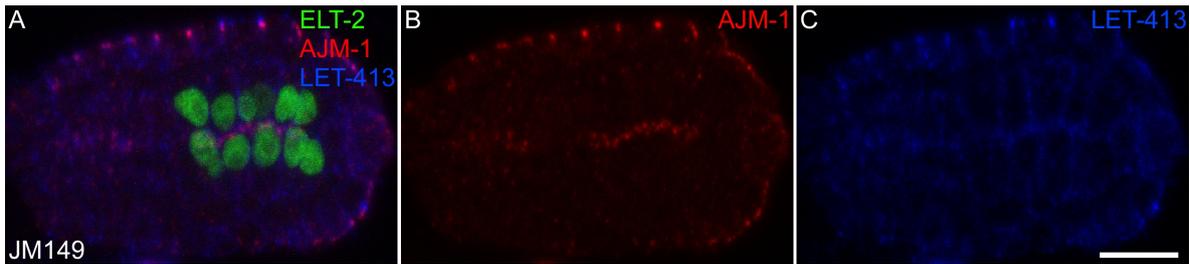
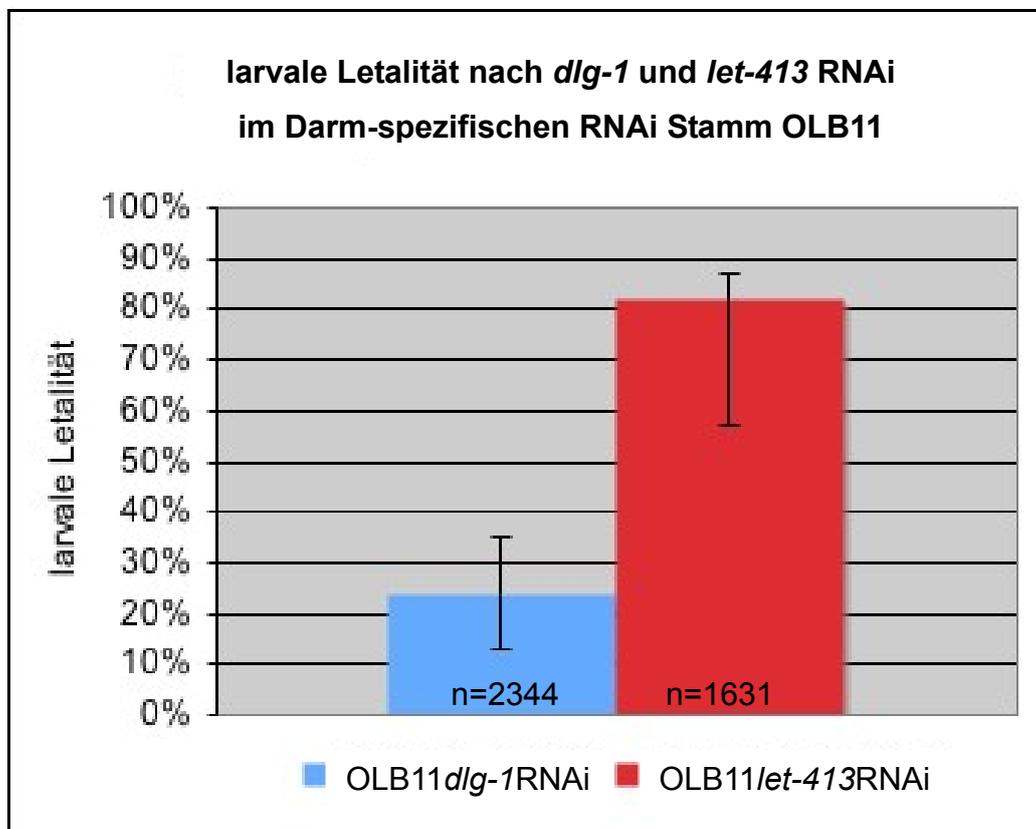


Abb. 11: LET-413 ist während der epithelialen Polarisierung der Darmzellen apikal lokalisiert

Immunfluoreszenzfärbung an einem JM149 Embryo, der ein *elt-2::gfp* Konstrukt exprimiert. Gefärbt sind ELT-2 (grün), AJM-1 (rot) und LET-413 (blau). Der Embryo befindet sich kurz vor der Morphogenese, die E-Zellen sind polarisiert, was an der apikalen Lage der Zellkerne und der apikalen Akkumulation von AJM-1 zu erkennen ist. Zu diesem Zeitpunkt ist LET-413 auch an der apikalen Membran lokalisiert. Anterior ist links, Eichstrich ist 10 µm.



Graph 1: Larvale Letalität im Darm-spezifischen RNAi Stamm OLB11 nach *dlg-1* und *let-413* RNAi

Ergebnisse I

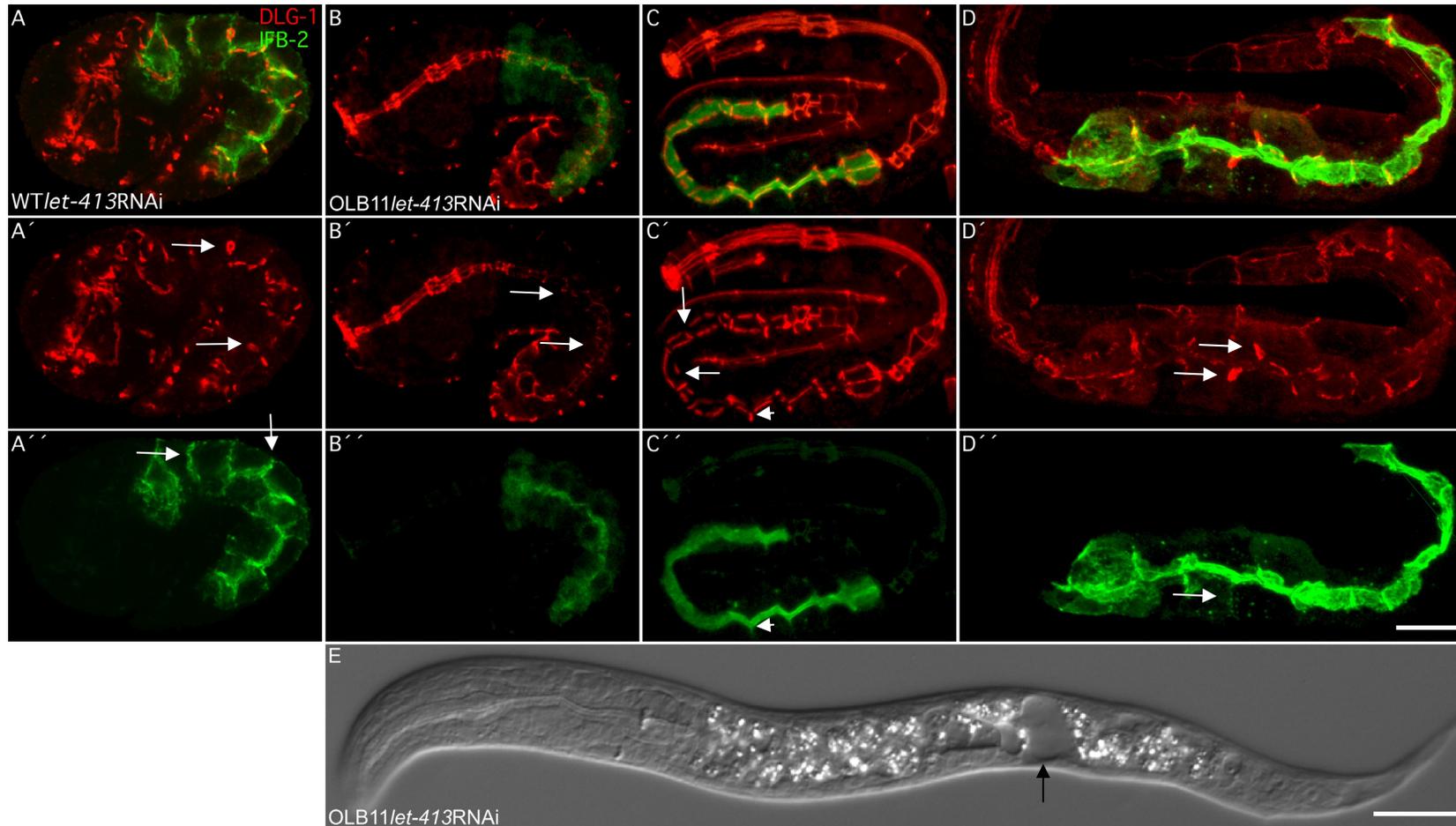


Abb. 12: *let-413* RNAi führt zu larvaler Letalität in OLB11

A-D'' zeigen Immunfluoreszenzfärbungen an *let-413* RNAi Embryonen gegen IFB-2 (grün) und DLG-1 (rot) und eine DIK Aufnahme einer OLB11/*let-413*RNAi Larve (E). (A-A'') WT Embryonen arretieren im 1,5-fach elongierten Stadium. DLG-1 und IFB-2 haben sich in den Darmzellen nach basolateral ausgeweitet (Pfeile in A', A''). In OLB11 ist das DLG-1 Muster im 1,5-fach elongierten Stadium im Darm diskontinuierlich (Pfeile in B'). (C-C'') zeigt einen OLB11 Embryo im 2,5-fach elongierten Stadium. Das DLG-1 Muster im Darm weist Lücken auf (Pfeile in C') und ist an einigen Stellen zusammen mit IFB-2 leicht nach lateral abgerutscht (Pfeilspitze in C', C''). In der L1-Larve ist der Phänotyp deutlicher, aber nicht so stark wie im WT Embryo (vergleiche Peile in A', A'' mit D', D''). E zeigt eine OLB11/*let-413*RNAi L1-Larve mit Vakuolen im Darm (schwarzer Pfeil). Anterior ist links, dorsal oben, Eichstriche sind 10 µm.

Nach Injektion dsRNA gegen *let-413* in OLB11 ist keine embryonale Letalität, sondern lediglich larvale Letalität bei 82% (n=1631) der Nachkommen zu beobachten (Graph: 1). Im Gegensatz zu den 25% Letalität nach *dlg-1* RNAi, zeigt dieses Ergebnis, dass *let-413* deutlich sensitiver auf RNAi reagiert. Bei Untersuchungen am WT wurden ähnliche Beobachtungen gemacht. Im WT führt *let-413* RNAi zu 100% embryonaler Letalität, während *dlg-1* RNAi zu 97% embryonaler Letalität führt.

Werden die Fütterungsbakterien, die dsRNA produzieren, im Verhältnis 1:2 mit Bakterien gemischt, die keine dsRNA exprimieren, wird der Unterschied bezüglich der Sensitivität noch deutlicher. *let-413* RNAi führt dann zu 64%, *dlg-1* RNAi nur noch zu 16% Letalität. (Tabelle 1; siehe Diskussion).

Die OLB11/*let-413*RNAi Tiere sterben, ähnlich wie nach *dlg-1* und *ajm-1* RNAi, im L1- und L2-Larvenstadium mit großen Vakuolen im Darm (siehe Graph 1, Abb.12E). Die Embryonen wurden gegen DLG-1 und IFB-2 gefärbt, um zu analysieren wie sich der *let-413* Phänotyp während der embryonalen Entwicklung des Darmepithels ausprägt. Im 1,5-fach elongierten Stadium zeigt die DLG-1 Färbung den typischen *let-413* RNAi Phänotyp, ein diskontinuierliches CeAJ Muster (Abb.12B-B''): Dies weist darauf hin, dass RNAi gegen *let-413* effektiv war. Im 3-fach elongierten Stadium zeigen sich deutliche „Lücken“ im DLG-1 Muster (Pfeile in Abb.12C'). In diesem Stadium, kurz vor dem Schlüpfen, zeigt sich eine leichte Verlagerung der apikalen sowie der CeAJ Proteine in Richtung basolateral (Pfeilspitzen in Abb.12C',C''). Erstaunlicherweise ist die starke Ausbreitung von DLG-1 und IFB-2 entlang der lateralen Membran, wie sie im WT Embryo zu beobachten ist, hier nicht erkennbar (vergleiche mit Abb.12A).

Sogar der terminale Phänotyp der OLB11 Larven ist im Vergleich zum WT nur schwach ausgeprägt. Es ist nur eine geringe Umverteilung apikaler und CeAJ Proteine entlang der basolateralen Membran zu beobachten (Pfeile in Abb.12D-D''). Diese Fehlverteilung scheint allerdings ausreichend, um 82% larvaler Letalität zu induzieren (Abb.12E). Es ist unklar, wie die Vakuolenbildung durch die Ausbreitung der CeAJ und apikalen Proteine entlang der lateralen Membrandomäne oder das diskontinuierliche CeAJ Muster ausgelöst werden. Da in den OLB11/*dlg-1* und *ajm-1*RNAi Larven aber ein ähnlicher terminaler Phänotyp auftritt (Abb.9C,10C), lässt dies vermuten, dass bereits eine diskontinuierliche CeAJ einen solchen Phänotyp induziert.

2.4 *let-413* RNAi in OLB11 führt erst gegen Ende der Morphogenese zu einer erkennbaren Herunterregulierung des LET-413 Proteins

Da der *let-413* RNAi Phänotyp in OLB11 im Vergleich zum WT relativ schwach ausgeprägt ist, wurden die OLB11/*let-413*RNAi Embryonen gegen LET-413 gefärbt, um zu überprüfen, wie effektiv sich das LET-413 Protein herunterregulieren lässt. Im Gegensatz zu *dlg-1* und *ajm-1*, die sich sehr gut in OLB11 herunterregulieren lassen (Abb.9,10), ist LET-413 nach RNAi sehr lange nachzuweisen (Abb.13).

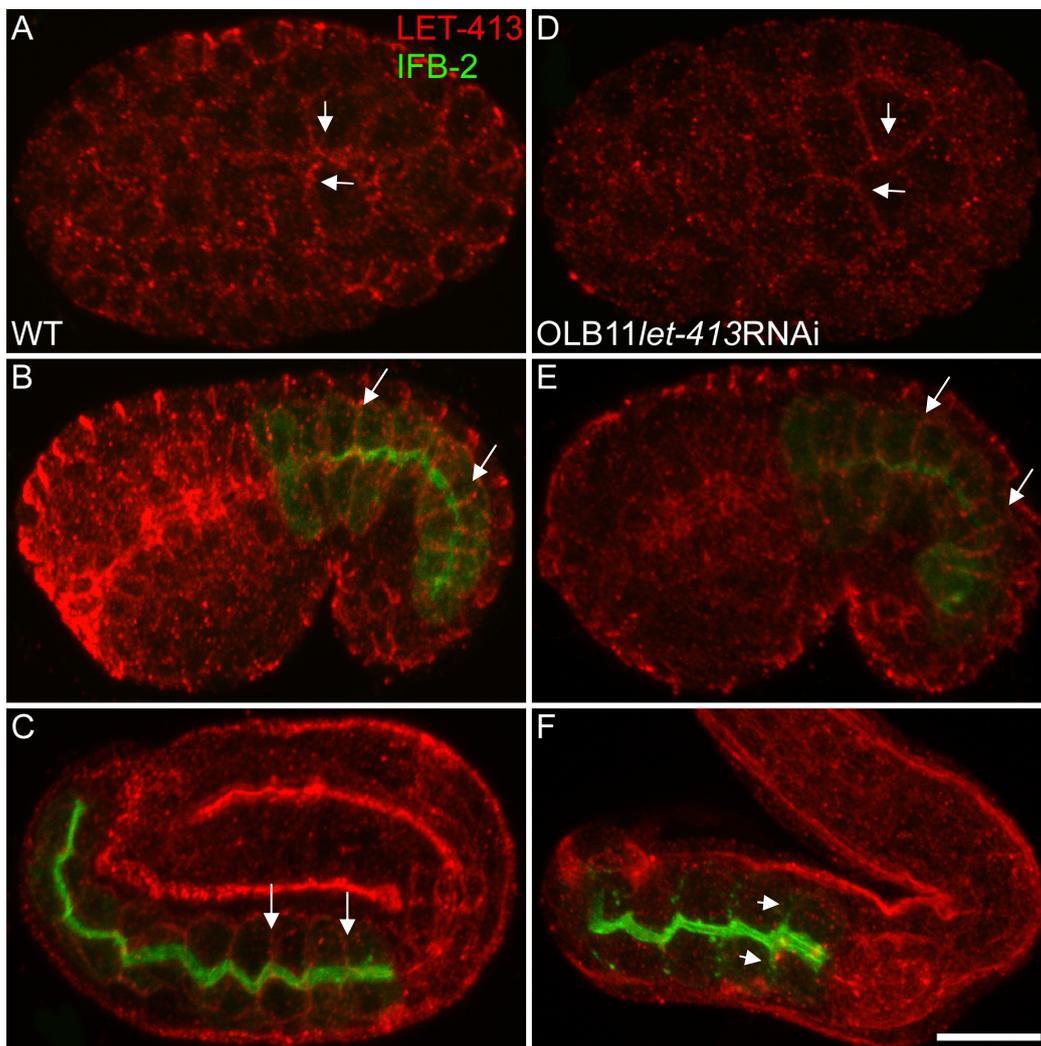


Abb. 13: Das LET-413 Signal wird in OLB11 nach *let-413* RNAi erst zum Ende der Embryogenese herunterreguliert

(A-C) zeigt WT, (D-F) OLB11/*let-413*RNAi Embryonen kurz vor Beginn der Morphogenese (A, D), im 1,5-fach (B, E) und im 3-fach elongierten Stadium (C, F) gefärbt gegen IFB-2 (grün) und LET-413 (rot). Vor Beginn der Morphogenese ist LET-413 am Kortex der Darmzellen lokalisiert (Pfeile in A, D). Im 1,5-fach elongierten Stadium lässt sich kein Unterschied in der LET-413 Verteilung im WT und OLB11/*let-413*RNAi Embryo erkennen (Pfeile, vergleiche B und E). Erst im 3-fach elongierten Stadium ist LET-413 nach RNAi in OLB11 nicht mehr nachweisbar. Zu diesem Zeitpunkt ist auch eine Ausbreitung des IFB-2 Signals entlang der basolateralen Membran zu erkennen (Pfeilspitzen in F). Anterior ist links, dorsal oben, Eichstrich ist 10 μ m.

2.5 RNAi gegen die *par* Gene führt zu keinem erkennbaren Phänotyp in OLB11

Nachdem gezeigt werden konnte, dass RNAi in OLB11 gewebespezifisch wirkt, sollte die Rolle der *par* Gene während der epithelialen Entwicklung näher analysiert werden. Die *par*-Gene sind essentiell für die Etablierung der Polarität und die asymmetrische Zellteilung im 1-Zellstadium von *C. elegans*. PAR-1 und -2 bilden einen Komplex am anterioren Kortex, während PAR-3, -6 und PKC-3 einen Komplex am posterioren Kortex bilden, wo sie die Verteilung von Zellschicksals Determinanten und somit die Teilungsebene festlegen (Cowan and Hyman, 2004).

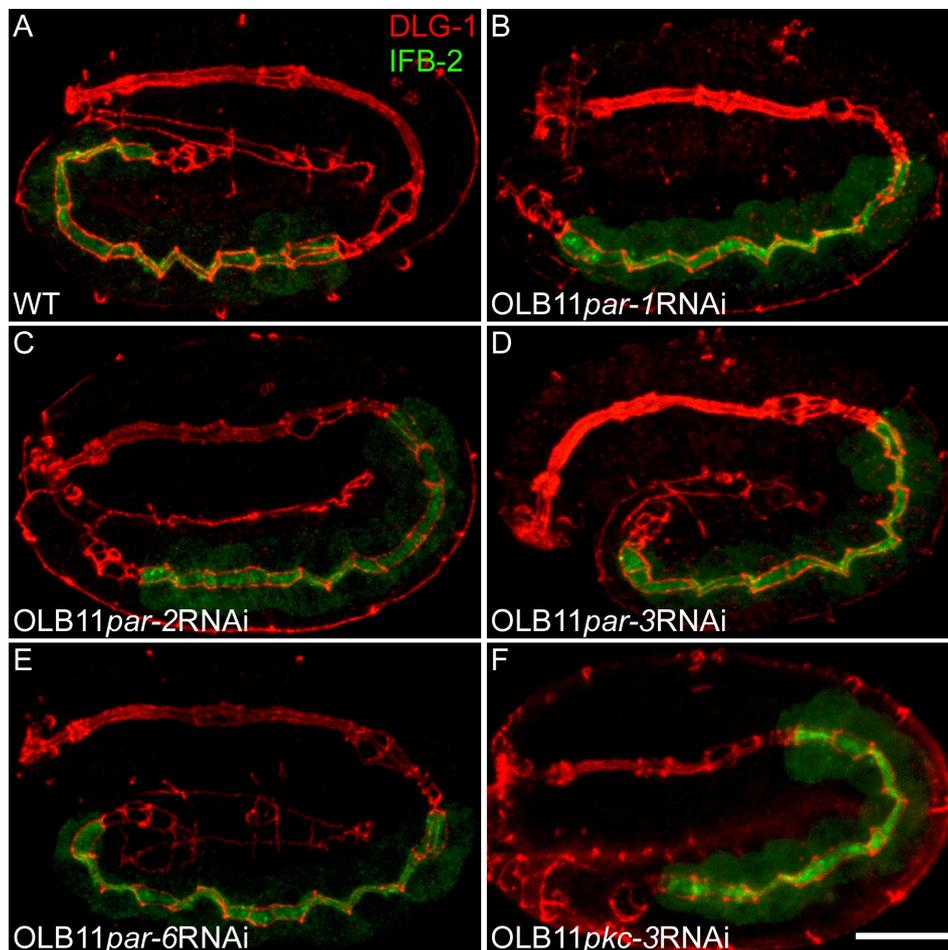


Abb. 15: Nach RNAi gegen die *par* Gene ist in OLB11 kein Phänotyp zu erkennen

Immunfluoreszenzaufnahme gegen das CeAJ Protein DLG-1 (rot) und das apikale Protein IFB-2 (grün). Gezeigt sind ein WT (A) und OLB11 Embryonen, die mit RNAi gegen verschiedene *par* Gene (*par-1*, -2, -3, -6, *pkc-3*) behandelt wurden (B-F). Keiner der Embryonen zeigt erkennbare Defekte. Anterior ist links, dorsal oben, Eichstrich ist 10 μ m.

In Vertebraten und *Drosophila* konnte bereits gezeigt werden, dass ein Komplex aus PAR-3, PAR-6 und aPKC auch während der Polarisierung der Epithelien eine wichtige Rolle spielt und für die korrekte Bildung der Kontaktstrukturen essentiell ist (Müller und Bossinger, 2003, Macara, 2004; Lynch and Hardin, 2009).

In den E-Zellen ist PAR-1 in der CeAJ lokalisiert und PAR-2, -3, -6 und aPKC-3 an der apikalen Membran (Müller und Bossinger, 2003, Nance, 2005). Es wurde dsRNA gegen die Gene *par-1*, -2, -3, -6 und *pkc-3* hergestellt und in junge adulte OLB11 Würmer injiziert. Die Nachkommen wurden auf embryonale und larvale Letalität überprüft. Alle Nachkommen dieser Individuen entwickeln sich jedoch ohne sichtbare Defekte zu adulten Würmern. Auch mit Immunfluoreszenzfärbungen sind keine Defekte zu erkennen. Sowohl die zytoplasmatische, als auch die epitheliale Polarisierung (siehe Einleitung) laufen wie im WT ab (Daten nicht gezeigt). Abb.15A zeigt einen WT Embryo im 2,5-fach elongierten Stadium. Das CeAJ Protein DLG-1 zeigt das im Darm typische strickleiterartige Muster und IFB-2 ist apikal lokalisiert. Die mit dsRNA behandelten OLB11 Embryonen zeigen also keine Letalität und im Vergleich zum WT keine Veränderungen der DLG-1 und IFB-2 Lokalisierung (Abb.15B-F).

2.6 PAR-3 lässt sich in OLB11 nicht erkennbar herunterregulieren

Nach RNAi gegen die *par* Gene sind keine Polaritätsdefekte in den Darmzellen zu erkennen (siehe 2.5). Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung ist, dass die PAR Proteine, welche im frühen Embryo synthetisiert werden, stabil genug sind um eine korrekte Epithelentwicklung zu gewährleisten. Eine andere Möglichkeit ist, dass die *par* Gene zwar herunterreguliert werden können, sie aber für die Darmentwicklung nicht essentiell sind. Um dies zu klären, wurden WT und OLB11*par-3*RNAi Embryonen gegen PAR-3 gefärbt. Dies sollte klären, ob und ab wann das PAR-3 Protein im Darm von OLB11 Embryonen herunterreguliert wird (Abb.16). In beiden Stämmen zeigen die Embryonen aber die gleiche Lokalisation von PAR-3. Zu Beginn der Morphogenese akkumuliert das PAR-3 apikal (Abb. 15A,D). Auch im 1,5-fach elongierten Stadium ist es sowohl im WT wie auch in den OLB11*par-3*RNAi Embryonen apikal im Darm mit etwa gleicher Intensität nachweisbar (Abb.16B,E). Das Signal wird dann langsam schwächer und ist im 3-fach elongierten Stadium in beiden Stämmen nicht mehr zu erkennen (Abb.16C,F). Dies bedeutet, dass, trotz Injektion von dsRNA gegen *par-3*, das Protein in OLB11 nicht

herunterreguliert werden kann. Im WT wird das Protein zum Ende der Morphogenese hin abgebaut. Es handelt sich hier also um einen natürlichen Prozess der nicht auf RNAi zurückzuführen ist. Da bereits gezeigt werden konnte, dass RNAi in OLB11 funktioniert, ist zu vermuten, dass das nachgewiesene PAR-3 Protein während der frühen Embryonalentwicklung synthetisiert wurde. Die Menge und Stabilität des Proteins scheint also ausreichend zu sein, um eine korrekte Embryonalentwicklung zu gewährleisten (siehe Diskussion).

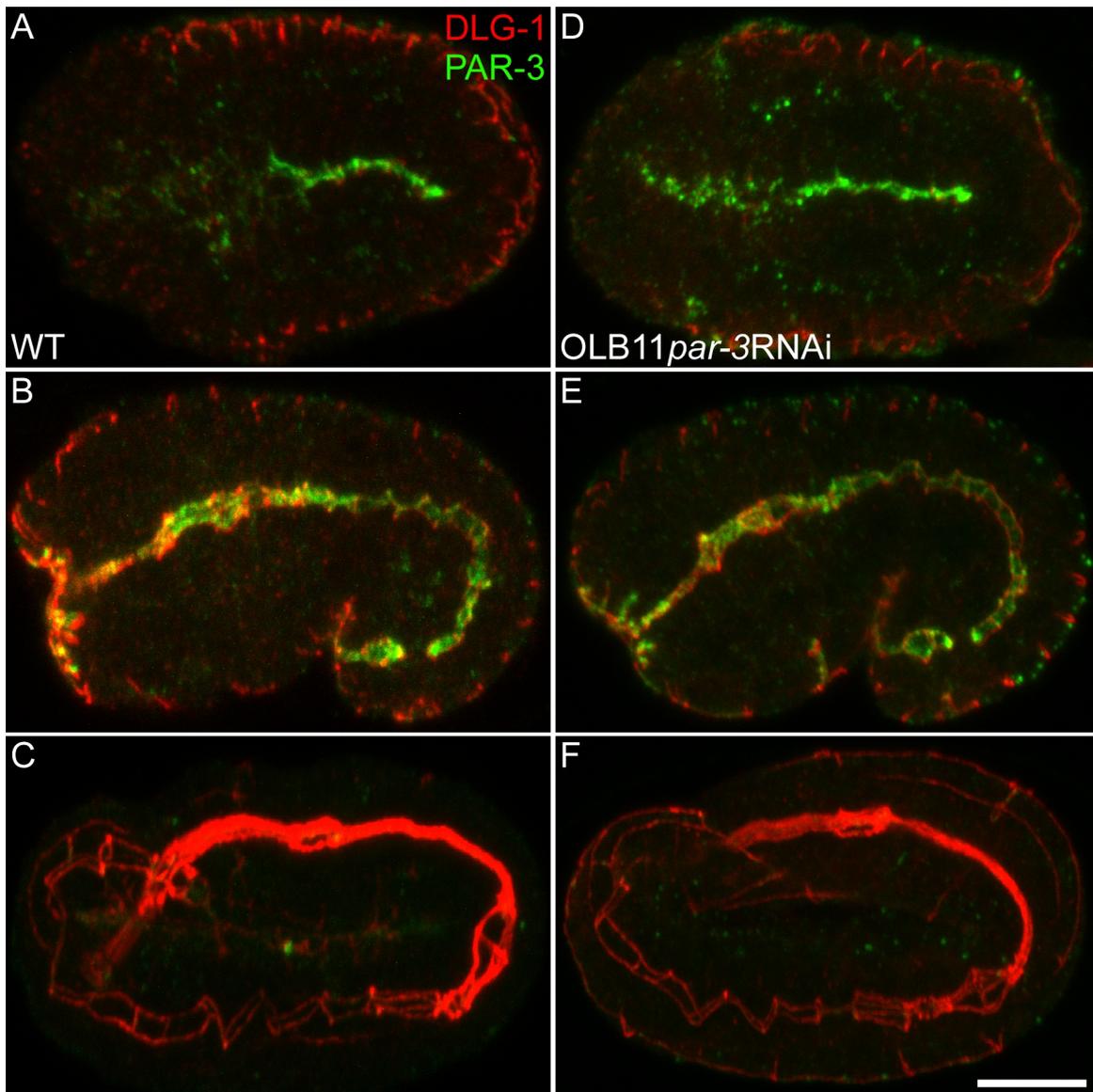


Abb. 16: *par-3* kann durch RNAi in OLB11 nicht herunterreguliert werden

A-C zeigt Immunfluoreszenzfärbungen an WT, D-F an OLB11*par-3*RNAi Embryonen gegen PAR-3 (grün) und DLG-1 (rot). PAR-3 ist im WT zu Beginn der Morphogenese (A) und im 1,5-fach elongierten Stadium (B) apikal in den Darmzellen akkumuliert. Im 3-fach elongierten Stadium (C) ist es nicht mehr nachweisbar. In OLB11*par-3*RNAi Embryonen unterscheidet sich die PAR-3 Lokalisation nicht zum WT. Anterior ist links, dorsal oben, Eichstrich ist 10 μ m.

2.7 RNAi gegen maternal exprimierte Gene führt nur im Falle des Zyklins B3 zu einem Phänotyp in OLB11

Da RNAi gegen die *par* Gene zu keinem Phänotyp führt (siehe 2.5), wurde in weiteren Experimenten RNAi gegen Gene durchgeführt, die eine Rolle bei der Polarisierung des 1-Zellstadiums spielen und essentiell für das Überleben des Embryos sind (siehe Tabelle 2). Die Gene wurden nach ihren RNAi Phänotypen im WT ausgesucht. Es sollten Gene herunterreguliert werden, die, aufgrund ihres Phänotyps und ihrer Funktion im 1-Zellstadium, eine Rolle bei der Polarisierung des Darmepithels spielen könnten (Tabelle 2). dsRNA wurde gegen diese Gene hergestellt und in die Gonade von mindestens 10 adulten OLB11 Würmern injiziert. Die Nachkommen wurden auf embryonale und larvale Letalität überprüft und mit DIK-Optik untersucht.

Es konnte nach RNAi in OLB11 kein embryonal oder larval letaler Phänotyp festgestellt werden. Dies kann mehrere Gründe haben: 1) Die herunterregulierten Gene haben keine essentielle Funktion während der Darmentwicklung. 2) Eine hohe Proteinstabilität der herunterregulierten Gene wie sie bereits bei *let-413* und *par-3* beobachtet werden konnte. Wenn die hohe Lebensdauer der Proteine für das Ausbleiben von Phänotypen verantwortlich ist, müssten sich Gene, deren mRNA eine kurze Lebensdauer besitzen, in OLB11 besser herunterregulieren lassen. Wenn diese Gene auch noch essentiell für das Überleben der Zelle sind, sollte dies zu einem Phänotyp in OLB11 führen.

Gute Kandidaten, die diese Eigenschaften erfüllen, sind die Zykline. Sie sind essentiell für den korrekten Ablauf des Zellzyklus und besitzen eine kurze Lebensdauer bzw. eine hohe „turn-over“ Rate (Fung and Poon, 2005). Laut Wormbase sind nur die Zykline *cyb-1*, *cyb-3* und *cye-1* essentiell für die Embryonalentwicklung. Bei *cyb-1* und *cye-1* ist aber jeweils die maternale Komponente für die korrekte Embryonalentwicklung wichtig (www.wormbase.org, van der Heuvel, 2005). Da in OLB11 die RNAi Maschinerie aber erst relativ spät aktiv wird, kann das maternale Genprodukt nicht abgebaut werden. Also bietet sich das Zyklin *cyb-3* als Kandidat an (Lyczak et al., 2006; Sonnevile and Gonczy, 2004).

Ergebnisse I

Gen	Funktion und RNAi Phänotyp im WT	Referenz
<i>par-1</i>	Polaritätsetablierung im 1-Zellstadium / embryonal letal	Kamath et al., 2000
<i>par-2</i>	Polaritätsetablierung im 1-Zellstadium / embryonal letal	Kamath et al., 2000
<i>par-3</i>	Polaritätsetablierung im 1-Zellstadium / embryonal letal	Kamath et al., 2000
<i>par-6</i>	Polaritätsetablierung im 1-Zellstadium / embryonal letal	Kamath et al., 2000
<i>pkc-3</i>	Polaritätsetablierung im 1-Zellstadium / embryonal letal	Kamath et al., 2000
<i>cdc-42</i>	Polaritätsetablierung im 1-Zellstadium / embryonal letal	Kay et al., 2001; Gottta et al., 2001
<i>cyk-4</i>	Polaritätsetablierung im 1-Zellstadium / embryonal letal	Jantsch-Plunger et al., 2000
<i>zen-4</i>	Beendigung der Zytokinese / embryonal letal	Kamath et al., 2003
<i>dnc-1</i>	Dynaktin, essentiell für die Funktion MT-assoziiertes MP / embryonal letal	Kamath et al., 2000
<i>dhc-1</i>	schwere Dynein Kette, Fehlverteilung der Chromosomen im 1-Zellstadium / embryonal letal	Kamath et al., 2000
<i>zyg-1</i>	Verdopplung der Zentrosomen ab 1-Zellstadium / embryonal letal	O'Connel et al., 2001
<i>spd-2</i>	Verdopplung der Zentrosomen ab 1-Zellstadium / embryonal letal	O'Connel et al., 2000
<i>spd-5</i>	Verdopplung der Zentrosomen ab 1-Zellstadium / embryonal letal	Hamill et al., 2002
<i>ama-1</i>	Untereinheit der RNA-Polymerase II, Transkription im frühen Embryo / embryonal letal	Kamath et al., 2003
<i>hmr-1</i>	CeAJ Protein, Elongation des Embryos / embryonal letal	Maeda et al., 2001
<i>hmp-1</i>	CeAJ Protein, Elongation des Embryos / embryonal letal	Simske et al., 2003
<i>hmp-2</i>	CeAJ Protein, Elongation des Embryos / embryonal letal	Simske et al., 2003
<i>erm-1</i>	Lumenbildung im Darm / larval letal	Van Fürden et al., 2004; Göbel et al., 2004
<i>tbb-1</i>	β -Tubulin / embryonal letal	Gönczy et al., 2000
<i>tbb-2</i>	β -Tubulin / embryonal letal	Gönczy et al., 2000
<i>act-2</i>	Aktin / embryonal letal	Sönnichsen et al., 2005
<i>act-3</i>	Aktin / embryonal letal	Sönnichsen et al., 2005
<i>act-4</i>	Aktin / embryonal letal	Sönnichsen et al., 2005
<i>cye-1</i>	Zellzykluskontrolle / embryonal letal (maternal)	Fay et al., 2000
<i>cyb-1</i>	Zellzykluskontrolle / embryonal letal (maternal)	Simmer et al., 2003
<i>cdk-1</i>	Zellzyklus , M Phase/ embryonal letal	Gönczy et al., 2000

Tabelle 2: RNAi Experimente in OLB11 gegen maternale Gene

Bei keinem der RNAi Experimente konnte embryonale oder larvale Letalität in OLB11 beobachtet werden

Das Zyklin *cyb-3* ist im Wildtyp wichtig für die Beendigung der Metaphase in der Meiose II und der Mitose. Zykline werden während des Zellzyklus auf und abgebaut, abhängig von der Phase des Zellzyklus. Sie haben also eine hohe „turn-over“ Rate. *cyb-3* RNAi führt zu einer Verlängerung der Meiose und Mitose und zu früher embryonaler Letalität. So dauert die Metaphase der Meiose II nicht ~6 min sondern ~24 min (Lyczak et al., 2006; Sonnevile und Gönczy, 2004). Bei der Bestimmung der Letalitätsrate nach *cyb-3* RNAi im WT konnte gezeigt werden, dass *cyb-3* RNAi auch nach einer 1:10 Verdünnung der Fütterungsbakterien noch eine 100%ige Letalität auftritt. Dies zeigt, dass *cyb-3* sehr sensitiv auf RNAi reagiert (Tabelle 1).

In Abb.17 werden Immunfluoreszenzfärbungen an WT und WT*cyb-3*RNAi Embryonen gezeigt. Gefärbt sind die Zentrosomen durch γ -Tubulin, die MT durch α -Tubulin, und die DNA durch YOYO Färbung. Abb.17A zeigt ein Vorkernstadium, der weibliche Vorkern (Pfeil), wandert auf den männlichen Vorkern zu, die Chromosomen sind kondensiert und gut zu erkennen. Nach der Verschmelzung der Kerne beginnt die erste Zellteilung (Abb.17B). Die Zentrosomen sind als rote Punkte im Zentrum der Spindelpole (blau) deutlich zu sehen. Abb.17C zeigt ein 4-Zell Embryo kurz nach der Teilung der Zellen. Es sind zwei Spindelapparate und vier Zentrosomen zu erkennen. Abb.17D zeigt einen Embryo mit ca. 50 Zellen vor der Morphogenese. Die Kerne sind etwa gleich groß. Abb.17E zeigt einen Embryo in der frühen Morphogenese, im 1,25-fach elongierten Stadium. Das Darmprimordium ist deutlich zu erkennen (Pfeile).

Nach *cyb-3* RNAi kommt es im WT zu 100% embryonaler Letalität, da schon die weibliche Meiose, die erst nach Eintritt des männlichen Spermiums beendet wird, Defekte zeigt (Lyczak et al., 2006; Sonnevile und Gönczy, 2004). Die Expressivität der Phänotypen ist relativ hoch (Abb.17F-I). So zeigen manche Embryonen bereits im Vorkernstadium massive Defekte (Abb.17F). Die beiden Vorkerne sind stark vergrößert und die Chromosomen sind nicht wie im WT kondensiert. Abb.17G zeigt einen Embryo während der Metaphase der ersten Zellteilung. Dies ist die Phase, in der der Zellzyklus stark verzögert ist. Die Chromosomen sind nicht korrekt kondensiert. Alle der beobachteten WT*cyb-3*RNAi Embryonen zeigten starke Defekte im 4-Zellstadium ($n > 50$, Abb.17H). Hier wird ein Embryo gezeigt, der drei „DNA-Wolken“ aufweist, aber 9 Zentrosomen-artige Strukturen. Die DNA Färbungen haben nicht die Struktur von WT Zellkernen. Nur wenige Embryonen schaffen es, mehrere Kern- und Zellteilungen zu absolvieren (Abb.17I). Es treten dann im Vergleich zum WT Kerne mit unterschiedlicher Größe und Form auf.

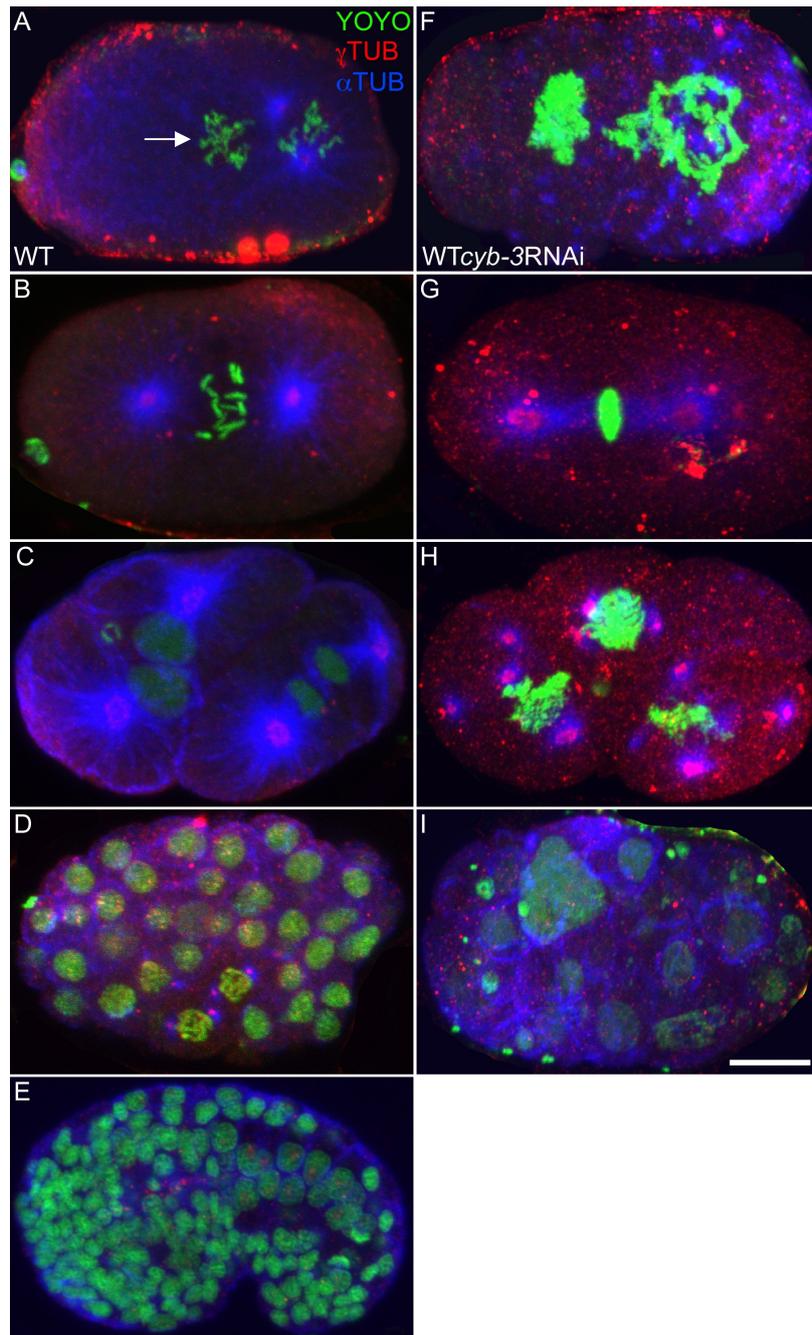


Abb. 17: *cyb-3* RNAi führt im WT zu frühen Zellzyklusdefekten

Immunfluoreszenzfärbungen gegen γ TUB (rot), α TUB (blau) und DNA Färbung mit YOYO (grün) an WT (A-E) und WT*cyb-3*RNAi Embryonen (F-I). A-E zeigt WT Embryonen in verschiedenen Stadien: Ein Vorkernstadium (A, weiblicher Vorkern durch Pfeil markiert), ein 1-Zellstadium während der ersten Zellteilung (B), ein 4-Zellstadium (C), ein 50-Zellstadium (D) und einen Embryo im 1,25-fach elongierten Stadium (E). F-I zeigt verschiedene Phänotypen des WT nach *cyb-3* RNAi: Ein Vorkernstadium mit stark vergrößerten Kernen (F), ein Embryo während der ersten Zellteilung (G), ein 4-Zellstadium mit mindestens 10 Spindelapparaten und abnormal geformten Kernen (H), und ein typisches multizelluläres terminales Stadium (I). Anterior ist links, dorsal oben in E, Eichstrich ist 10 μ m.

Nachdem die *cyb-3* RNAi Defekte für den WT dokumentiert wurden, sollte nun *cyb-3* RNAi an OLB11 durchgeführt werden. Hierfür wurden adulte OLB11 Würmer mit *cyb-3* dsRNA injiziert und deren Embryonen ebenfalls gegen γ TUB, α TUB und mit YOYO gefärbt (Abb.18). Wie erwartet, ist in keinem Embryo vor dem 24-Zellstadium mit dieser Färbemethode ein Defekt zu erkennen ($n>50$), da RNAi in OLB11 erst ab dem 2E-Zellstadium wirken sollte. Als Beispiel wird hier ein 4-Zellstadium gezeigt, das verglichen mit dem WT keine Veränderungen erkennen lässt (vergleiche Abb.18A mit Abb.17C). Nach Aktivierung des *elt-2* Promoters allerdings kommt es zu Zellzyklusdefekten. Abb.18B-B' zeigt drei Ebenen desselben Embryos, der sich etwa im 36-Zellstadium befindet. Es sind etwa 30 Metaphasen zu erkennen. Es scheint, dass nicht nur die E-Zellen, sondern alle Zellen von den Zellzyklusdefekten betroffen sind und eine verlängerte Metaphase zeigen. Im WT treten beispielsweise die AB-Zellen fast gleichzeitig, vor den anderen Zellen, in die Mitose ein (Sulston et al., 1983). In OLB11*cyb-3*RNAi Embryonen scheint die Metaphase der AB-Zellen aber so stark verzögert zu sein, dass die anderen Zellen auch schon in die Mitose eintreten, so dass sich schließlich fast alle Zellen gleichzeitig in der Metaphase befinden (Abb.18B-B'). Die Embryonen zeigen 100% embryonale Letalität und sterben als Zellhaufen, ohne die Morphogenese zu beginnen. Die Zellkerne zeigen dabei eine unterschiedliche Größe und Form (Abb.18C). *cyb-3* RNAi in OLB11 führt also zu Zellzyklusdefekten, allerdings nicht nur in den E-Zellen, sondern überraschenderweise auch in Nicht-Darmzellen.

Um herauszufinden, wann genau die Zellzyklusdefekte auftreten, wurde die Entwicklung eines WT und eines OLB-11*cyb-3*RNAi Embryos im direkten Vergleich mit DIK-Optik dokumentiert (Abb.19). Die Embryonen wurden über einen Zeitraum von 2,5 h im Abstand von 3 min aufgenommen. Anschließend wurde ein Film aus den Bildern erstellt und die Entwicklung der Embryonen verglichen. Abb.19 zeigt einzelne Bilder aus dieser Langzeitaufnahme. Insgesamt wurden auf diese Weise 11 OLB11*cyb-3*RNAi Embryonen analysiert.

Der WT und der OLB11*cyb-3*RNAi Embryo befinden sich beide im 2-Zellstadium, anterior und dorsal der jeweiligen Embryonen ist gekennzeichnet. Der OLB11 Embryo ist etwas älter als der WT Embryo, was daran zu erkennen ist, dass sich die anteriore Zelle, die AB Zelle, bereits teilt (Abb.19A). In Abb.19B ist der OLB11 Embryo bereits im 4-Zellstadium, während sich beim WT die AB Zelle erst jetzt teilt. Dies zeigt, dass der OLB11 Embryo etwa 10 min älter ist. Abb.19C zeigt die Embryonen nach der Geburt der E-Zelle (Kreise in

Abb.18C-F). Es sind noch keine Zellzyklusdefekte im OLB11*cyb-3*RNAi Embryo zu erkennen. Im 2E-Zellstadium allerdings treten erste Zellzyklusdefekte in OLB11 auf, die Zellteilung der AB-Zellen ist verzögert und die Zellen zeigen eine verlängerte Metaphase (Pfeil in Abb.19D).

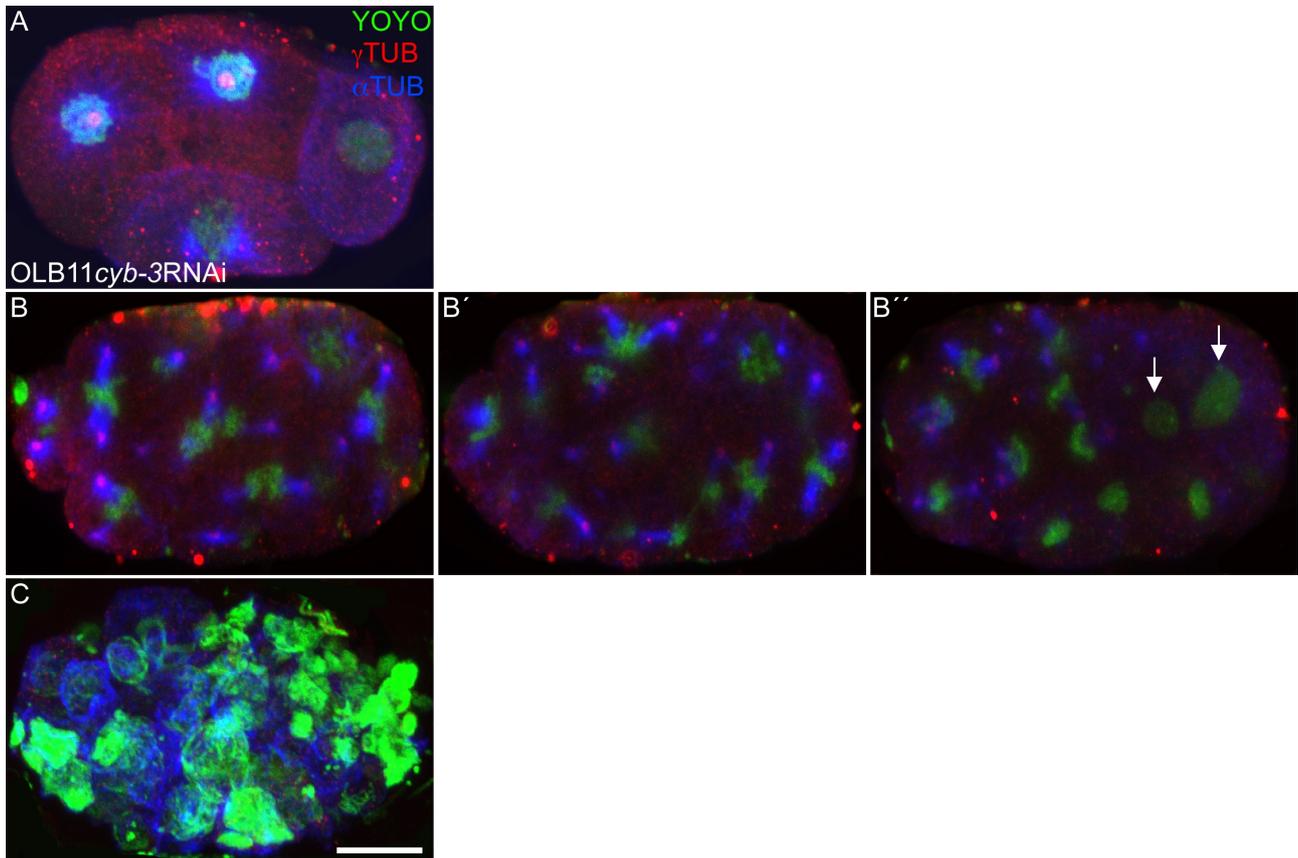


Abb. 18: *cyb-3* RNAi in OLB11 führt zu Zellzyklusdefekten nicht nur in den Darmzellen

Immunfluoreszenzfärbungen an OLB11*cyb-3*RNAi Embryonen gegen γ TUB (rot), α TUB (blau) und DNA Färbung mit YOYO (grün). Im 4-Zellstadium sind keine Defekte zu erkennen (A). In B-B'' werden drei Ebenen des gleichen Embryos gezeigt. Bis auf zwei Zellen (Pfeile in B'') befinden sich alle Zellen in der Metaphase. C zeigt ein typisches terminales Stadium, die Embryonen arretieren als Zellhaufen ohne in die Morphogenese einzutreten. Anterior ist links, dorsal oben in E, Eichstrich ist 10 μ m.

Im 2E-Zellstadium findet die Gastrulation statt. Hier wandern die E-Zellen in den Embryo ein und teilen sich dort (WT in Abb.19F). Im WT sind bereits 4E-Zellen vorhanden, während im OLB11 Embryo immer noch 2E-Zellen zu erkennen sind, die nur teilweise eingewandert sind. Wie in Abb.18 gezeigt, treten die Zellzyklusdefekte auch in Nicht-Darmzellen auf und hier ist zu sehen, dass die Gastrulation nicht korrekt stattfindet. Der Embryo arretiert in diesem Stadium und die E-Zellen wandern nicht weiter ein. Abb.19F ist nach ca. 14 h aufgenommen und es zeigt den terminalen Phänotyp des OLB11*cyb-3*RNAi Embryos neben der WT Larve.

Aus diesen Experimenten lässt sich schließen, dass in OLB11*cyb-3RNAi* Embryonen die Entwicklung bis zum 2E-Zellstadium wie im WT abläuft. Dann allerdings zeigen sich verlängerte Zellteilungen auch in Nicht-Darmzellen. So dauerte im Vergleich zum WT in OLB11*cyb-3RNAi* Embryonen beispielsweise die Teilung der AB-Zellen von 4 nach 8 etwa 2-4 mal so lang (9 min gegenüber 20-40 min, n=20). Zwar treten die Zellen noch zum richtigen Zeitpunkt in die Mitose ein, jedoch sind sie nicht in der Lage diese korrekt zu beenden, so dass sich ein embryonal letaler Phänotyp einstellt (Abb.19). Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse, dass durch *cyb-3* RNAi in OLB11 auch in Nicht-Darmzellen scheinbar spezifische Defekte induziert werden können.

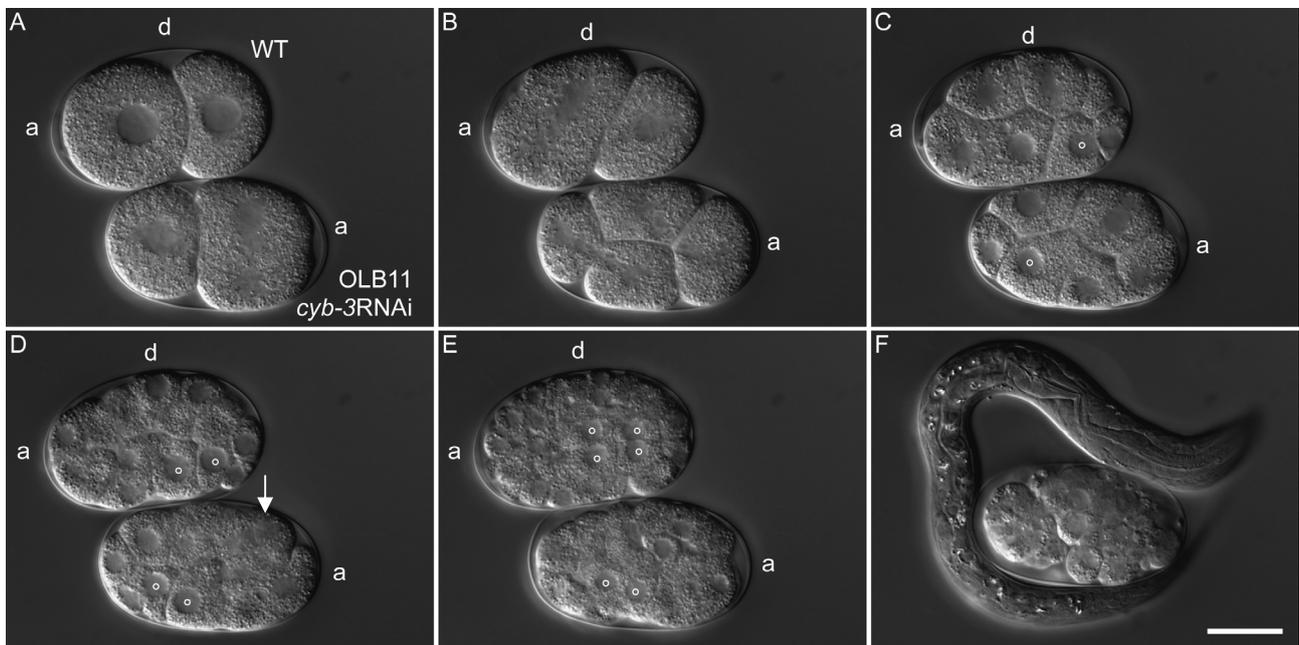


Abb. 19: OLB11*cyb-3RNAi* Embryonen weisen Zellzyklusdefekte in Nicht-Darmzellen auf

Die Entwicklung eines WT und OLB11*cyb-3RNAi* Embryo wird ab dem 2-Zellstadium im direkten Vergleich mit DIK-Optik gezeigt. Der OLB11 Embryo ist etwa 10 min älter als der WT Embryo (A, B). Bis zur Geburt der E-Zelle (gekennzeichnet durch °) sind keine Defekte im OLB11 Embryo zu erkennen (A-C). Im 2E-Zellstadium zeigt eine AB-Zelle eine verlängerte Metaphase in OLB11 (Pfeil in D). Die Zellzyklusdefekte zeigen sich nicht nur in den Darmzellen und die Gastrulation findet nicht korrekt statt. Die E-Zellen teilen sich nicht mehr und wandern auch nicht komplett in den Embryo ein (vergleiche WT und OLB11 in E). Etwa 14 h später ist die WT Larve geschlüpft, während der OLB11 Embryo sich nicht weiter entwickelt hat und die Zellen bereits lysieren. a=anterior, d=dorsal, Eichstrich ist 10 µm.

3 Diskussion I

Im Rahmen dieses Kapitels wurde der transgene Stamm OLB11, der Darm-spezifische RNAi erlaubt, analysiert und getestet. Es konnte gezeigt werden, dass epitheliale Gene gewebespezifisch nur in den Darmzellen herunterreguliert werden können, sie in anderen Geweben aber scheinbar nicht beeinflusst werden. Bei RNAi gegen die früh exprimierten *par*-Gene scheint die Proteinstabilität der Zielgene der größte limitierende Faktor der gewebespezifischen RNAi zu sein. Weiterhin zeigte sich, dass durch RNAi gegen *cyb-3* der RNAi Effekt auch in Nicht-Darmzellen ausgelöst wird, was auf eine Diffusion sekundärer siRNAs in OLB11 Embryonen hinweisen könnte. Im Folgenden werden die Ergebnisse im Bezug auf die Effektivität der Darm-spezifischen RNAi im Vergleich zum WT und anderen gewebespezifischen RNAi Stämmen und die Diffusion sekundärer siRNAs diskutiert.

3.1 RNAi gegen *dlg-1*, *ajm-1* und *let-413* in OLB11 führt zu larvaler Letalität

Nach *let-413* RNAi in OLB11 sind nur Darm-spezifische Defekte zu erkennen, wodurch sich die Embryonen im Gegensatz zum WT bis zur Larve entwickeln können. Sie sterben ähnlich wie nach *dlg-1* und *ajm-1* RNAi im L1-Larvenstadium mit großen Vakuolen im Darm (Abb.12). Nach *let-413* RNAi im WT zeigen sich zwei Phänotypen. Der DAK erscheint verspätet an der apikalen Membrandomäne, weist ein diskontinuierliches Muster auf, und während der späteren Entwicklung, etwa im 1,5-fach elongierten Stadium, breiten sich CeAJ und apikale Proteine entlang der basolateralen Membran aus (Segbert et al., 2004; Labouesse, 2006). Das diskontinuierliche DLG-1 Muster zeigt sich in OLB11/*let-413*RNAi Embryonen (Abb.12B,C; Legouis et al., 2000, Segbert et al., 2004), obwohl in diesem Stadium das LET-413 Signal in OLB11 noch keinen Unterschied zum WT erkennen lässt (Abb.13B,E). Die laterale Ausdehnung von DLG-1 und des apikalen Proteins IFB-2 bleibt allerdings weitgehend aus (Abb.12D). Auch in den Larvalstadien konnte nie eine Fehllokalisierung von CeAJ und apikalen Proteinen entlang der kompletten basolateralen Membran beobachtet werden (n>100). Die korrekte Etablierung des DAK in ein zusammenhängendes CeAJ Muster scheint also sehr stark von der LET-413 Konzentration abhängig zu sein. Für die Aufrechterhaltung der Polarität scheint die LET-

413 Konzentration dagegen nicht so kritisch zu sein. Selbst wenn auf Immunfluoreszenzebene kein LET-413 Protein mehr nachweisbar ist, ist die Ausdehnung von DLG-1 entlang der lateralen Membrandomäne im Vergleich zum WT gering (Abb.13F). Eine mögliche Ursache hierfür könnte sein, dass der RNAi Mechanismus in OLB11 nicht vollständig gerettet wird (siehe 3.2), wodurch mehr LET-413 Protein in OLB11 Darmzellen vorhanden ist als in WT Darmzellen nach *let-413* RNAi. Dieser geringe Unterschied in der Proteinmenge könnte ausreichen, um den vollständigen Verlust der Polarität zu verhindern.

Unklar ist die Ursache für die Vakuolenbildung in den Darmzellen nach *dlg-1*, *ajm-1* und auch *let-413* RNAi. Eine Erklärung für diesen Phänotyp könnten Defekte in der postulierten Barrierenfunktion der CeAJ sein (Labouesse, 2006, Köppen et al., 2001). Für diese Hypothese spricht, dass das *Drosophila* Homolog von DLG-1, Discs large, ein Bestandteil der „septate junction“ ist, von der vermutet wird, dass sie eine Permeabilitätsbarriere sein könnte (Knust und Bossinger, 2002). Besitzt also der DAC in *C. elegans* eine Barrierenfunktion, könnte diese durch *dlg-1*, *ajm-1* oder *let-413* RNAi gestört werden. So könnten Moleküle aus dem Darmlumen in den parazellulären Zwischenraum gelangen und zu Defekten in den Darmzellen führen. Um mehr Aufschluss darüber zu erhalten, wie stark die CeAJ nach *dlg-1*, *ajm-1* und *let-413* RNAi in den Darmzellen geschädigt ist und ob sie in der Hypodermis wirklich keine Defekte aufweist, müssten EM Aufnahmen von den Darmzellen und der Hypodermis gemacht werden. So könnte die Ultrastruktur der CeAJ untersucht werden und mit den Ergebnissen aus früheren Studien verglichen werden (MacMahon et al., 2001; Köppen et al., 2001, Legouis et al, 2000). Leider konnte dies im Rahmen dieser Arbeit nicht verwirklicht werden.

3.2 Effektivität der Darm-spezifischen RNAi im Vergleich zum WT zu anderen gewebespezifischen RNAi Ansätzen in *C. elegans*

Die Methode der gewebespezifischen RNAi wurde bisher im adulten Tier in Vulva- und Muskelzellen und im Embryo nur in der Hypodermis beschrieben (Asakura et al., 2007; Qadota et al., 2007; Sawa et al., 2003). Qadota et al. benutzten ebenfalls die *rde-1(ne219)* Mutante. Sie exprimierten die WT Kopie des *rde-1* Gens aber unter der Kontrolle des Hypodermis-spezifischen *lin-26* Promoters. Der Vorteil des Darm-spezifischen RNAi Stammes OLB11 gegenüber dem Hypodermis-spezifischen RNAi Stamm von Qadota et al.

(NR222) ist, dass in OLB11 bei der Analyse von „epithelialen“ Genen erstmals neue Phänotypen im Vergleich zum WT analysiert werden können. Qadota et al. haben RNAi gegen *ajm-1* durchgeführt, was in NR222 genau wie im WT zu embryonaler Letalität im 2-fach elongierten Stadium führt (Qadota et al., 2007). In OLB11 bleiben die Hypodermisdefekte aber aus, wodurch der Embryo in der Lage ist sich bis zur Larve zu entwickeln. Dadurch konnte hier erstmals nachgewiesen werden, dass *dlg-1*, *ajm-1* und *let-413* essentiell für die Darmentwicklung sind.

Es hat sich gezeigt, dass die Effektivität der RNAi in OLB11 oder auch in NR222 verglichen mit dem WT relativ gering ist. So funktioniert RNAi über Fütterung nur in den Larven und adulten Tieren, aber nicht in den F1-Nachkommen (Qadota et al., 2007). Nach RNAi über Injektion konnten in OLB11 und NR222 zwar Phänotypen in den Nachkommen der Würmer beobachtet werden, allerdings zu einem geringeren Prozentsatz als im WT. So konnte in OLB11 eine Letalitätsrate von 25% und 82% nach *dlg-1* und *let-413* RNAi im Gegensatz zu 97% und 100% im WT beobachtet werden (Graph 1, Tabelle 1). Es stellt sich also die Frage, warum die Effektivität der RNAi in OLB11, oder bei gewebespezifischer RNAi generell, geringer ist als im WT. Es kommen mehrere mögliche Ursachen in Betracht:

Erstens) Es ist bekannt, dass RNAi über Fütterung nicht so effektiv ist, wie RNAi über Injektion. Die Häufigkeit der Phänotypen kann geringer sein und sie können milder ausfallen (Ahringer, 2006).

Zweitens) Wahrscheinlich ist die Rettung der *rde-1* Expression in OLB11 unvollständig. Tabara et al. konnten nämlich zeigen, dass für effektive RNAi sowohl die maternale als auch die zygotische *rde-1* Genfunktion notwendig ist (Tabara et al., 1999, Qadota et al., 2007). Sie injizierten *unc-22* dsRNA in homozygot mutante *rde-1(ne219)* Hermaphroditen und kreuzten diese anschließend mit WT Männchen. Die Nachkommen sind also heterozygot *rde-1(ne219)/+*, ihnen fehlt aber die maternale *rde-1* Komponente. 68% der Nachkommen zeigen den *unc-22* Phänotyp, während Nachkommen von heterozygoten *rde-1(ne219)/+* Hermaphroditen zu 100% den *unc-22* Phänotyp aufweisen. Daraus wurde geschlossen, dass die maternale *rde-1* Komponente für eine komplette Rettung des RNAi Mechanismus nötig ist. Da die maternalen Komponenten in *C. elegans* von den Oogonien produziert werden (Evans and Hunter, 2005) und diese in OLB11 *rde-1* mutant sind, fehlt die maternale *rde-1* Komponente in OLB11, wodurch wahrscheinlich

keine komplette Rettung der *rde-1* Expression in den Darmzellen erreicht wird. Qadota et al. haben bei ihren Hypodermis-spezifischen RNAi Experimenten eine ähnlich verminderte Letalitätsrate beobachtet. So zeigen bei ihren Experimenten nach *ajm-1* RNAi nur 56% der Embryonen Letalität im Gegensatz zu 100% im WT (Qadota et al., 2007). Während der postembryonalen Entwicklung funktioniert RNAi über Fütterung gegen *ifb-2* und *elt-2* zu 100% (Abb.7,8), da hier die maternale *rde-1* Komponente keine große Rolle mehr zu spielen scheint.

Drittens) Ein anderer limitierender Faktor der gewebespezifischen RNAi scheint die Stabilität bereits synthetisierter Proteine zu sein. Bei der RNAi wird nur die mRNA des Zielgens degradiert, bereits synthetisierte Proteine können mit dieser Methode nicht abgebaut werden (Grishok, 2005). Da in OLB11 das *rde-1* Gen unter dem *elt-2* Promoter exprimiert wird, können Proteine, die vor der Aktivierung des *elt-2* Promoters synthetisiert wurden, nicht degradiert werden. So konnte nach RNAi gegen die *par-* und weitere maternale Gene kein Phänotyp induziert werden (Tabelle 1). Immunfluoreszenzfärbungen gegen PAR-3 zeigten, dass es keinen deutlichen Unterschied in der Intensität zwischen OLB11*par-3*RNAi und WT Embryonen gibt (Abb.15,16). In beiden Stämmen ist das Protein bis zum 3-fach elongierten Stadium nachweisbar. Die PAR Proteine scheinen so stabil und in ausreichender Menge vorhanden zu sein, so dass die Embryonalentwicklung nach RNAi in OLB11 ohne erkennbare Defekte abläuft. Diese Ergebnisse sind konsistent mit den Beobachtungen von Totong et al. (2007). Bei ihren Experimenten wurde festgestellt, dass die maternale PAR-6 Proteinmenge ausreicht, um eine korrekte Embryonalentwicklung zu gewährleisten. Es musste sowohl die maternale als auch die zygotische Komponente der Proteine degradiert werden, um Phänotypen während der Epithelentwicklung nachzuweisen. Eine ähnliche Beobachtung wird nach *let-413* RNAi in OLB11 Embryonen gemacht. Anders als DLG-1 und AJM-1 ist LET-413 nach RNAi auch bis ins 3-fach elongierte Stadium nachweisbar (vergleiche Abb.9,10 und Abb.13). Im Gegensatz zu *dlg-1* und *ajm-1* wird *let-413* aber auch bereits maternal exprimiert (Abb.14, Legouis et al., 2000). Damit einhergehend können *dlg-1* und *ajm-1*, die erst nach der *elt-2* Aktivierung exprimiert werden (Wiesenfahrt, 2005; McMahon et al., 2001; Köppen et al., 2001), sehr effektiv in OLB11 herunterreguliert werden (Abb.9,10).

Viertens) Letztlich ist es auch möglich, dass die Darmzellen nicht so sensitiv auf RNAi reagieren wie beispielsweise die Hypodermiszellen. Im WT wird nach RNAi gegen *dlg-1*,

ajm-1 und *let-413* embryonale Letalität aufgrund von Hypodermisdefekten beobachtet (Labouesse, 2006; Lynch und Hardin, 2009). Bei diesem Vorgang umwandern die Hypodermiszellen den Embryo von lateral nach ventral und bilden neue Zell-Zell-Kontakte aus. Es ist möglich, dass dieser Prozess sehr viel sensitiver auf die Herunterregulierung von CeAJ Proteinen reagiert, als Prozesse während der Entwicklung des Darmepithels. So könnte auch erklärt werden warum Qadota et al. (2007) 56% Letalität nach *ajm-1* RNAi beobachtet haben, in OLB11 aber nur etwa 25% Letalität nach *ajm-1* RNAi auftritt. Im WT kann anhand von Immunfluoreszenzaufnahmen beobachtet werden, dass verschiedene Gewebe unterschiedlich stark auf RNAi reagieren (O. Bossinger, persönliche Mitteilung). Nach RNAi gegen *dlg-1* oder *ajm-1* im WT ist das Immunfluoreszenzsignal in Darm- und Hypodermiszellen stark reduziert, während dies im Pharynx oder Hinterdarm nicht der Fall ist.

3.3 Defekte in allen Zellen nach *cyb-3* RNAi in OLB11 deuten auf eine Diffusion sekundärer siRNAs

RNAi gegen *let-413* und besonders gegen die *par*-Gene lassen vermuten, dass sich Proteine mit einer hohen Halbwertszeit nur schwer in OLB11 herunterregulieren lassen (siehe 3.1). Daraus ist zu schließen, dass sich ein Gen, dessen Protein eine kurze Lebensdauer besitzt, sehr gut in OLB11 herunterregulieren lassen sollte. Um dies zu überprüfen, wurde RNAi gegen das Zyklin *cyb-3* durchgeführt. Das Zyklin *cyb-3* wurde ausgewählt, da es laut www.wormbase.org das einzige zygotisch exprimierte Zyklin ist, das essentiell für die Embryonalentwicklung ist. Zykline spielen eine Schlüsselrolle bei der Regulierung des Zellzyklus. Sie bilden mit Zyklin-abhängigen Kinasen (CDK) Komplexe und können so deren Kinase Funktion aktivieren. Die Zykline sind nur zu einem bestimmten Abschnitt des Zellzyklus aktiv und werden nach diesem degradiert (Fung und Poon, 2005). *cyb-3* RNAi im WT führt zu einer verlängerten Metaphase in Meiose und Mitose (Lyczak et al., 2006; Sonnevile und Gönczy, 2003).

In OLB11 wurde erwartet, Zellzyklusdefekte in den Darmzellen zu beobachten, stattdessen zeigen sich auch in anderen Zellen Zellzyklusdefekte (Abb.18). Die Defekte treten wie erwartet erst im 2E-Zellstadium auf, also nach *elt-2* Aktivierung (Abb.18,19). Unerwartet war allerdings, dass sich die Defekte auch auf die Nicht-Darmzellen ausdehnten. Eine Möglichkeit, warum nach *cyb-3* RNAi in OLB11 Defekte in allen Zellen zu beobachten sind,

wäre eine sehr geringe Aktivität des *elt-2* Promoters in allen Zellen. Dadurch würde das *rde-1* Gen in allen Zellen exprimiert und könnte zu einem RNAi Effekt führen. Eine *elt-2* Aktivität in anderen Zellen als den E-Zellen wurde allerdings bisher nicht beschrieben, und auch mit dem *elt-2::gfp* Reporterkonstrukt sind nur Signale in den E-Zellen zu erkennen (Abb.6, McGhee et al., 2007; Fukushige et al., 1998).

Es stellt sich die Frage wie RNAi in Zellen funktionieren kann, in denen kein RDE-1 exprimiert wird. Ohne RDE-1 können die primären siRNAs nicht gebunden werden, es können keine sekundären, 3-fach phosphorylierten siRNAs hergestellt werden und die Ziel-mRNA kann nicht abgebaut werden (Tabara et al., 1999; Yigit et al., 2006). Außer einem funktionsfähigen RDE-1 Protein sind aber alle anderen Komponenten der RNAi Maschinerie in allen Zellen vorhanden, so z.B. CSR-1, das sekundäre siRNAs bindet und die Ziel mRNA degradiert (Aoki et al., 2007). Wenn also sekundäre siRNAs in den Darmzellen produziert werden und in andere Zellen diffundieren, könnten sie dort von CSR-1 gebunden werden und die Ziel mRNA könnte abgebaut werden.

Warum sind dann aber nach *dlg-1*, *ajm-1* und *let-413* RNAi nur Darm-spezifische Defekte zu erkennen? In *C. elegans* wurde gezeigt, dass vor der Morphogenese alle Zellen, über bisher unbekannte Kanäle, miteinander verbunden sind. Wenn Lucifer Yellow (MW: 457) in eine Somazelle injiziert wird, kann es in alle Zellen diffundieren (Bossinger and Schierenberg, 1992). Kurz vor der Morphogenese bilden sich dann aber Kompartimente, so dass nur noch die Zellen eines Gewebes untereinander verbunden sind. So stellen die Darmzellen beispielsweise ein Kompartiment dar. Wird im 17E-Zellstadium ein Farbstoff in eine Darmzelle injiziert, so diffundiert er nur in andere Darmzellen (Bossinger and Schierenberg, 1992). Wenn sich die siRNAs genauso verhalten würden, könnten sie nach *cyb-3* RNAi im 2E-Zellstadium vor der Kompartimentbildung in alle Zellen diffundieren und die Defekte auslösen. Nach *dlg-1* und *ajm-1* RNAi sind dagegen keine Defekten in der Hypodermis zu beobachten, da *dlg-1* und *ajm-1* erst nach der Kompartimentbildung exprimiert werden, so dass die sekundären siRNAs nur noch innerhalb der Darmzellen diffundieren könnten. Es wurde postuliert, dass „gap junctions“ für die Diffusion von Lucifer Yellow verantwortlich sein könnten (Bossinger et al., 1992). In *C. elegans* werden sie wahrscheinlich von Innexinen, den Homologen der Connexinen aus Vertebraten, gebildet (Altun et al., 2009). In Zellkultur wurde bereits beschrieben, dass siRNAs durch „gap junctions“, bestehend aus Connexinen, diffundieren können (Valiunas et al., 2005). Die Innexine sind also ein möglicher Kanal für die Diffusion von siRNAs.

Es ist auch möglich, dass sekundäre siRNAs über die SID-1 Kanäle diffundieren können. Experimente in Zellkultur mit *Drosophila* S2 Zellen, die SID-1 exprimieren, haben gezeigt, dass sie auch die Diffusion von siRNAs vermitteln (Shih et al., 2009). Allerdings konnte gezeigt werden, dass mit den siRNAs keine effektive Herunterregulierung der Zielgene erreicht werden konnte. Shih et al. haben daraus geschlossen, dass siRNAs ein schlechtes Substrat für CSR-1 sind (Shih et al., 2009). Es ist also möglich, dass die sekundären siRNAs immer im Embryo diffundieren können, aber nur so ineffektiv vom RISC gebunden werden, dass es bei RNAi gegen *dlg-1*, *ajm-1* oder *let-413* zu keinem erkennbaren Effekt in anderen Geweben kommt. Bei einem Gen wie *cyb-3*, das sehr sensitiv auf RNAi reagiert (Tabelle 1), ist aber ein starker Effekt in allen Zellen zu beobachten. Es wurde allerdings auch gezeigt, dass Injektion von *pos-1* siRNAs in einen Gonadenarm nur zu 50% embryonaler Letalität führt. Injektion von *pos-1* siRNAs in beide Gonadenarme dagegen führt zu 100% embryonaler Letalität. Dieses Ergebnis spricht eher dafür, dass sekundäre siRNAs *in vivo* im adulten Tier nicht gut diffundieren können, aber RNAi gut induzieren können (Tijsterman et al., 2002).

Eine Kombination der beiden Hypothesen ist auch denkbar. So könnten siRNAs immer über die SID-1 Kanäle diffundieren und bis zur Kompartimentbildung gleichzeitig über die Kanäle, die die Diffusion von Lucifer Yellow vermitteln. Dadurch könnten mehr siRNAs aus den Darmzellen in andere Zellen gelangen und bei einem RNAi-sensitiven Gen wie *cyb-3* einen RNAi Effekt hervorrufen.

Um zu zeigen, dass siRNAs diffundieren können, müssten fluoreszenzmarkierte, sekundäre *cyb-3* siRNAs in den Embryo injiziert werden. Deren Diffusionsverhalten und Fähigkeit Zellzyklusdefekte zu induzieren müsste dann in verschiedenen Entwicklungsstadien dokumentiert werden. Erste Versuche wurden in unserem Labor bereits durchgeführt.

Nach einem Protokoll von Dr. Tabara wurden 10 verschiedene 3-fach phosphorylierte siRNAs gegen *cyb-3* hergestellt und zur Kontrolle ihrer Effektivität zunächst in die Gonade adulter WT Würmer injiziert. Leider konnten keine Defekte in den Nachkommen festgestellt werden (Daten nicht gezeigt, n=20/siRNA). Um zu testen, ob die siRNAs eine 3-fach Phosphorylierung tragen, wurden sie mit einer CIAP („calf intestine alkaline phosphatase“) dephosphoryliert und anschließend zusammen mit nicht dephosphorylierten siRNAs auf ein Gel aufgetragen. Mit Hilfe dieses speziellen Gels mit einem hohen Acrylamid-BisAcrylamid Verhältnis (9:1 Acrylamid:Bis 12%) lassen sich

bereits Unterschiede von nur einer Phosphatgruppe an der Laufgeschwindigkeit ablesen (Pak et al., 2007, siehe Material und Methoden). Es konnte allerdings keine Veränderung in der Laufhöhe zwischen den mit CIAP behandelten und nicht behandelten siRNAs festgestellt werden, was darauf hinweist, dass es nicht gelungen ist 3-fach phosphorylierte siRNAs herzustellen.

In anderen Experimenten wurden fluoreszenzmarkierte, primäre siRNAs über Druck in WT Embryonen injiziert, was das Überleben der Zellen des Embryos allerdings stark beeinträchtigt hat (Kunze, 2007). Eine Injektion in Embryonen sollte besser mit Iontophorese durchgeführt werden, da dies ein besonders schonendes Verfahren für die Zellen ist (Bossinger et al., 1992).

Wenn in zukünftigen Experimenten die Diffusion von siRNAs gezeigt werden könnte, sollte es dann in einem nächsten Schritt auch möglich sein, die Kanäle zu identifizieren, die eine Diffusion von siRNAs im Embryo vermitteln. Dazu müssten fluoreszenzmarkierte siRNAs in Embryonen injiziert werden, die eine Mutation in den möglichen Kanalproteinen tragen. Mögliche Kanalproteine wären SID-1 (Shih et al., 2009) oder die Innexine, wovon im *C. elegans* Darmepithel 12 exprimiert werden (*inx-2, -3, -5, -8, -11, -13, 15, -16, -17, -21, nay-5, unc-7b*; Altun et al., 2009). Hier würde dann nach Würmern gesucht, in denen die siRNAs nicht mehr diffundieren können. Wenn diese Experimente kein positives Ergebnis bringen, könnte mit dem OLB11 Stamm eine Mutagenese durchgeführt werden. Anschließend würde *cyb-3* RNAi durchgeführt und nach Tieren gesucht, die den RNAi Effekt nur noch in den Darmzellen zeigen.

4 Einleitung II: Die Funktion der Intermediärfilamente im Darmepithel von *C. elegans*

4.1 Allgemeine Eigenschaften von Intermediärfilamenten

Intermediärfilamente (IF) bilden zusammen mit den Aktinfilamenten (AF) und den Mikrotubuli (MT) das Zytoskelett der Zelle. Ihr Name leitet sich von ihrer Größe ab, mit 8-12 nm Durchmesser liegen sie zwischen AF (2-5 nm) und MT (25 nm). Die Funktionen des Zytoskeletts sind mannigfaltig, es spielt eine Rolle bei der Zellteilung, der Zellmigration, der Stabilisierung der Zellen, der Stressantwort, dem Transport von Vesikeln, Proteinen und Zellorganellen sowie bei der Etablierung der Zellpolarität.

Von den drei Zytoskelett Komponenten sind IF die am wenigsten erforschten, obwohl sie je nach Zelltyp bis zu 85% des Gesamtproteins ausmachen. Allerdings gestaltet sich die Analyse von IF aufgrund von drei experimentellen Problemen besonders schwierig (Oriolo et al., 2007): **1)** Es gibt keine Drogen, mit denen sie sich manipulieren lassen wie z.B. Nocodazole oder Colchicin für MT und Zytochalasin für AF. **2)** Es gibt keine guten biochemischen Methoden um IF zu analysieren. Immunpräzipitation, „pull-down assays“, Ko-Sedimentation oder Chromatographie lassen sich am besten auf gut lösliche Proteine anwenden, IF sind aber nur schwer löslich. **3)** Außer *C. elegans* und der Maus gibt es keine geeigneten Modellorganismen, an denen sich IF erforschen lassen. *Drosophila* z.B. besitzt, wie alle Arthropoden, keine zytoplasmatischen IF (Rubin et al., 2000).

Im Gegensatz zu AF und MT sind IF nicht polar aufgebaut. Sie besitzen kein wachsendes +Ende und kein schrumpfendes –Ende, sind aber trotzdem dynamisch. IF sind deutlich stabiler als AF oder MT und sorgen, besonders in Epithelzellen, für die Stabilität der Zelle und deren Integrität bei mechanischem Stress (Pekny and Lane, 2007). So können z.B. schon geringe Berührungen an der Haut bei der Krankheit *Epidermolysis bullosa simplex*, bei der die Keratine 5 und 14 mutiert sind, zu Blasen- und Wundenbildung führen (Omary and Ku, 2006). Neueste Untersuchungen deuten auf eine Reihe anderer Funktionen der IF hin, eine zytoprotektive Wirkung (Omary und Ku, 2006), Resistenz gegen Drogen und Schutz vor toxischen Einflüssen (Bauman et al., 1994; Inada et al., 2001). Es wird diskutiert, dass sie eine Rolle bei der Etablierung der Zellpolarität spielen, wobei sie mit dem Aktin-bindenden Ezrin, Komponenten des γ -Tubulin-Ringkomplexes und Faktoren des Vesikeltransports interagieren sollen (Oriolo et al., 2007; Styers et al., 2005; Wald et al.,

2005). Verankert sind IF in Vertebraten in der Regel an Desmosomen und stehen so mit dem Zytoskelett benachbarter Zellen in Kontakt (Kouklis et al., 1994). In einschichtigen Epithelien sind IF apikal oder apiko-lateral am Kortex lokalisiert. Wie es zu dieser polarisierten Lokalisation kommt ist allerdings noch unklar. In nicht polarisierten, mehrschichtigen Epithelien sind IF ubiquitär verteilt. Dynamische Bewegungen des IF-Zytoskeletts in diesen Geweben werden wahrscheinlich durch MT-assoziierte Motorproteine vermittelt (Oriolo et al., 2007). IF Proteine sind nicht sehr hoch konserviert. In Säugern z.B. gibt es ca. 67 verschiedene IF Gene die sich aufgrund ihrer Aminosäuresequenz in fünf Multigenfamilien einteilen lassen. Die Keratine bilden mit 54 Genen die größte dieser Familien (Hesse et al., 2001; Hesse et al., 2004; Rogers et al., 2005; Schweizer et al., 2006). Obwohl IF Proteine nicht sehr hoch konserviert sind, haben IF Monomere einen ähnlichen Grundaufbau. Sie bestehen aus einer α -helikalen Stab Domäne und variablen globulären Kopf- bzw. Schwanzdomänen. Die Stabdomäne besteht aus vier Coiled-coil Domänen (1A, 1B, 2A, 2B) die von den variablen Linkern L1, L12, L2 verbunden werden (Abb.20, Coulombe and Omary, 2002).

Bei der Filamentbildung der IF lagern sich zunächst zwei Monomere mit den Stabdomänen parallel aneinander und bilden eine „coiled-coil“ Struktur aus, wobei regelmäßige hydrophobe Reste für eine starke Bindung sorgen (Godsel et al., 2008; Goldman et al., 2008; Herrmann et al., 2007). Zwei Dimere lagern sich versetzt in antiparalleler Form aneinander und bilden ein Tetramer. Die Tetramere setzen sich zu Protofilamenten zusammen und diese bilden letztlich ein Intermediärfilament (Abb.20, Coulombe and Fuchs, 1990; Herrmann and Aebi, 1998; Herrmann and Aebi, 2004).

Bei der zellulären Organisation scheint der Phosphorylierungszustand der IF eine wichtige Rolle zu spielen (Omary und Ku, 2006, Tao et al., 2006; Windoffer and Leube, 2004; Woll et al., 2007). So sind Kopf- und Schwanzdomäne mit einer Reihe Phosphorylierungsstellen versehen. In Zellkultur konnte gezeigt werden, dass das Keratin-Netzwerk nach Drogen-induzierter Veränderung des Phosphorylierungszustandes eine Reorganisation erfuh. Des Weiteren konnten bei Krankheiten, bei denen es zu Veränderungen der IF Expression kommt, hyperphosphorylierte IF festgestellt werden (Liao et al., 1997; Ridge et al., 2005; Toivola et al., 2002). Die Signalwege, die bei der Phosphorylierung der IF eine Rolle spielen, sind jedoch noch weitgehend unbekannt.

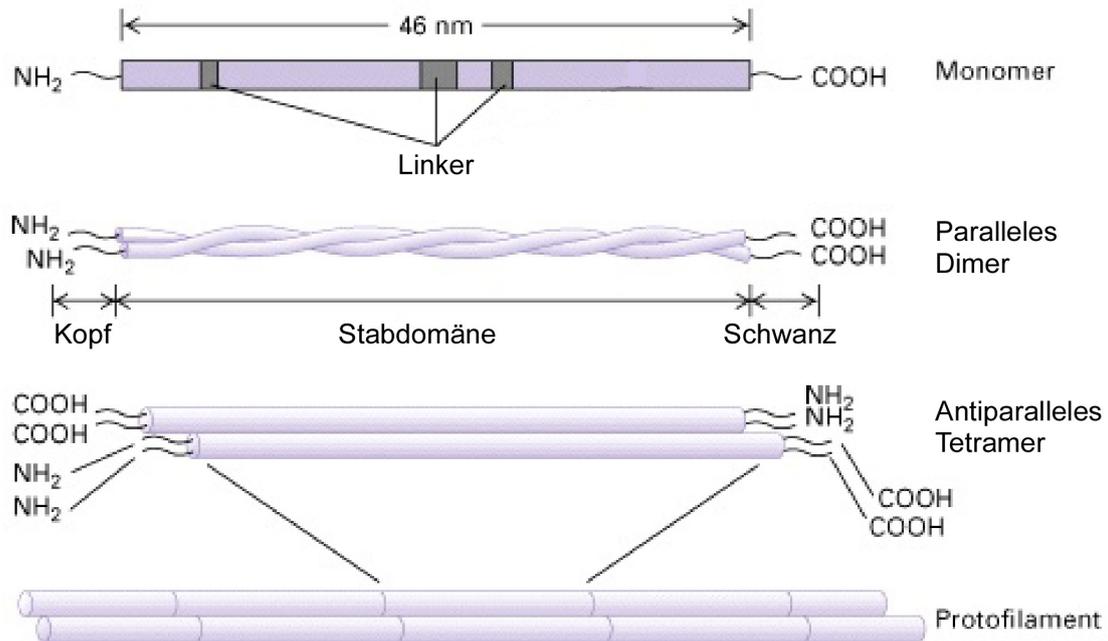


Abb. 20: Aufbau eines IF Monomers und Zusammensetzung eines Intermediärfilamentstrangs (modifiziert nach www.biology.iupui.edu)

4.2 Intermediärfilamente in *C. elegans*

Das *C. elegans* Genom beinhaltet ein Lamin Gen, *Imn-1*, und 11 Gene die für zytoplasmatische IF kodieren. Aufgrund von Sequenzhomologien wurden die IF-Gene in fünf Klassen unterteilt: A (*ifa-1 – ifa-4*), B (*ifb-1, ifb-2*), C (*ifc-1, ifc-2*), D (*ifd-1, ifd-2*) und E (*ifp-1*) (Carberry et al., 2009; Karabinos et al., 2001). Sie alle besitzen den Grundaufbau von IF Proteinen (Abb.20), mit der für Protostomia typischen verlängerten 1b Domäne (Dodemont et al., 1994). IFA und IFB Proteine besitzen weiterhin ein Lamin-Homologie Segment in ihrer Schwanzdomäne. Umfassende Untersuchungen zum Expressionsmuster und zur Funktion der einzelnen IF wurden von Anton Karabinos durchgeführt (Karabinos et al., 2002; Karabinos et al., 2003; Karabinos et al., 2004; Karabinos et al., 2001). Basierend auf diesen Ergebnissen können die IF aufgrund ihrer Expressionsmuster in drei Gruppen unterteilt werden (Carberry et al., 2009). Die erste Gruppe umfasst alle IFAs (IFA1-4) und IFB-1, wobei IFB-1 Heteropolymere mit den IFAs in unterschiedlichen Geweben bildet (Karabinos et al., 2003). Die zweite Gruppe umfasst die restlichen sechs zytoplasmatischen IF *ifb-2, ifc-1, -2, ifd-1, -2* und *ifp-1* (ehemals *ife-1*), welche exklusiv in den Darmzellen exprimiert werden und apikal im „terminal web“ lokalisieren. In der dritten

Gruppe befindet sich *lmn-1*, das in allen Zellen, außer reifen Spermien, exprimiert wird. LMN-1 ist an der Kernmembran lokalisiert.

In den Darmzellen werden also sechs verschiedene IF exprimiert: *ifb-2*, *ifc-1*, *-2*, *ifd-1*, *-2*, und *ifp-1* (Carberry et al., 2009), die alle apikal lokalisiert sind (Karabinos, 2004). In welcher Form diese IF miteinander polymerisieren ist bisher unbekannt. Einzeln sind sie nicht essentiell für die embryonale bzw. larvale Entwicklung. Dies ist wahrscheinlich auf Redundanz zurückzuführen, da die Herunterregulierung mehrerer IF gleichzeitig zu langsamem Wachstum (10%, 20%), kürzeren adulten Würmern (5%, 8%) und embryonaler Letalität (15%, 31%) im Falle von RNAi gegen *ifb-2+ifd-1+ifp-1*, bzw. *ifb-2+ifd-1+ifd-2* führt (Karabinos et al., 2004). Ein anderer Grund für das Ausbleiben von Phänotypen nach RNAi gegen einzelne Gene, könnten die benutzten RNAi Protokolle sein. Die Verwendung eines alternativen RNAi Protokolls führte nämlich zu larvaler und adulter Letalität nach Herunterregulierung von *ifc-1*, *ifc-2* und *ifd-2*. Allerdings zeigten diese Phänotypen eine geringe Penetranz und traten erstaunlicherweise in Geweben auf, in denen die entsprechenden IF nicht exprimiert werden z.B. Muskeldefekte nach *ifc-1* RNAi, oder Riss am Anus oder der Vulva nach *ifc-2* RNAi (Karabinos et al., 2003, 2004). In eigenen Versuchen führte lediglich RNAi gegen *ifc-2*, zu einem sichtbaren Phänotyp in den Darmzellen. Es kam zu blasenähnlichen Verformungen der apikalen Membran (siehe Ergebnisse, Hüsken et al., 2008).

4.3 Der Aufbau des adulten Darmepithels in *C. elegans*

Der Darm ist eines der größten Organe in *C. elegans* und macht ungefähr ein Drittel der somatischen Masse des Wurms aus. Er ist in erster Linie für die Nahrungsaufnahme und Verdauung zuständig, sowie die Synthese und Speicherung von Makromolekülen (McGhee, 2007). Der Darm besteht aus nur 20 Zellen und ist in Einheiten aufgebaut, den so genannten „ints“ („intestinal rings“), welche das Darmlumen umschließen. Das anteriore „int“ besteht aus 4 Zellen, während die weiteren „ints“ aus je 2 Zellen bestehen (Leung et al., 1999). Aufgrund seines einfachen Aufbaus eignet sich der Darm von *C. elegans* besonders gut zur Erforschung der Epithelentwicklung. Aber auch im Bereich der Verdauung, des Stoffwechsels, des vesikulären Transports, der Antwort auf Stress und der Alterung erweist er sich zunehmend als gutes Forschungsobjekt (McGhee, 2007).

Um ihre Aufgaben bei der Verdauung und der Nahrungsaufnahme zu bewältigen besitzen die Darmzellen eine hoch spezialisierte apikale Membran (Abb.21). Apikal, dem Lumen zugewandt, liegt der Mikrovillisaum, der von einer Glykokalyxschicht geschützt wird. Auf ultrastruktureller Ebene konnte gezeigt werden, dass ein Hauptbestandteil der Mikrovilli das Aktin ACT-5 ist. *act-5* Mutanten sterben kurz nach dem Schlüpfen. Sie besitzen keine Mikrovilli und zeigen anstelle des typischen ellipsoiden Darmlumens ein rundes Lumen (MacQueen et al., 2005).

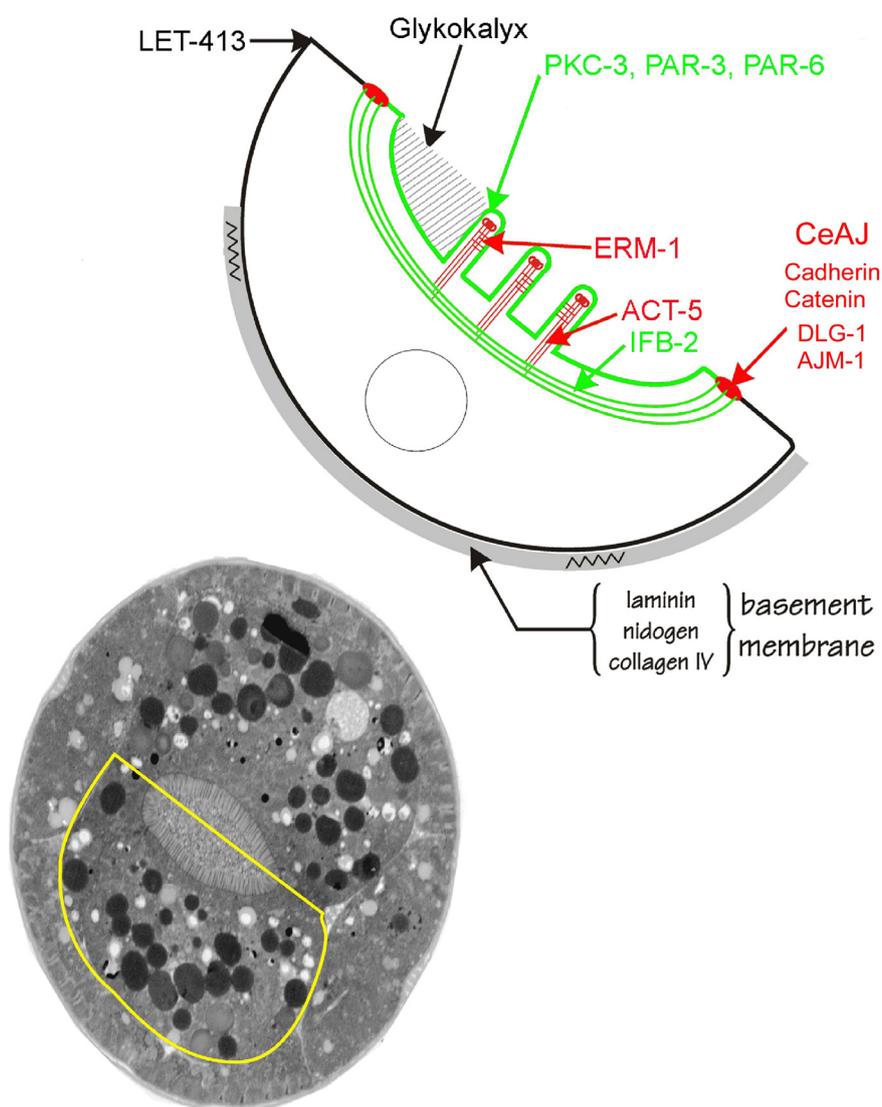


Abb. 21: Darmzelle von *C. elegans*

Schematische Darstellung einer Darmzelle und EM Bild eines Querschnitts von *C. elegans*. CeAJ ist in rot, apikale Membran in grün und basolaterale Membran in schwarz dargestellt. (modifiziert nach http://www.wormbook.org/chapters/www_intestine/intestine.html)

Ebenfalls apikal lokalisiert ist ERM-1, ein Protein aus der Ezrin-Radixin-Moesin Familie, von dem angenommen wird, dass es das Aktinzytoskelett mit der Plasmamembran verbindet. RNAi gegen *erm-1* führt zu larvaler Letalität. Während der Embryonalentwicklung kommt es zu Defekten in der Lumenbildung und ultrastrukturelle Untersuchungen zeigen starke Defekte in der Mikrovillistruktur (Göbel et al., 2004; van Fürden et al., 2004). Unterhalb des Mikrovillisaums liegt die Endotube, eine für Nematoden spezifische Struktur (Munn and Greenwood, 1984; Bossinger et al., 2004). Sie wiederum ist Teil des „terminal web“, der Zellorganell-freien Zone unterhalb der apikalen Membran (Abb.21; Hirokawa et al., 1982). In EM Aufnahmen ist die Endotube als elektronendichte Struktur zu erkennen, die eine direkte Verbindung zur CeAJ besitzt (Bossinger et al., 2004). Sie ist sehr robust und ihre Hauptaufgabe ist es wahrscheinlich, der apikalen Membran Stabilität zu verleihen. Es wird postuliert, dass die Endotube den AF, die ein Hauptbestandteil der Mikrovilli sind, als Verankerung dienen (McGhee, 2007). Die Endotube setzt sich aus Myosin, Spektrin, verschiedenen Aktin-bindenden Proteinen und hauptsächlich Intermediärfilamenten zusammen (Munn and Greenwood, 1984). Von IFB-2 konnte in EM-Aufnahmen gezeigt werden, dass es sowohl in der Endotube als auch in der CeAJ lokalisiert (Abb.21; Bossinger et al., 2004).

4.4 Fragestellung II

Intermediärfilamente (IF) sind neben Mikrotubuli (MT) und Aktinfilamenten (AF) die bisher am wenigsten erforschte dritte Komponente des Zytoskeletts. Über die molekularen Mechanismen der Organisation und der Regulation der IF ist nur sehr wenig bekannt. Außerdem wurden die meisten Experimente zur Erforschung der IF in Zellkultursystemen durchgeführt und nicht im Gewebeverband eines multizellulären Organismus. Daher sollten in diesem Teil der Arbeit die Funktionen der IF im Darmepithel von *C. elegans* untersucht und mögliche Organisatoren identifiziert und analysiert werden. Dafür wurden von Dr. Carberry *C. elegans* Reporterstämme generiert, die ein IFB-2::CFP Transgen exprimieren (BJ49-56, Hüsken et al., 2008; Hüsken, 2008). Folgende Fragen/Aufgaben sollten bearbeitet werden:

1. Welche Rolle spielen die einzelnen Darm-spezifischen IF bei der Etablierung und Stabilisierung der Endotube? Herunterregulierung der Darm-spezifischen IF durch RNAi in einem transgenen *ifb-2::cfp* Reporterstamm. Bestimmung der Nachkommenproduktion, Körpergröße und embryonalen bzw. larvalen Letalitätsrate. Analyse des Phänotyps mit DIK und Immunfluoreszenz Mikroskopie. Wie sind CeAJ, das Aktin- und MT-Zytoskelett und apikale Proteine verteilt. Analyse der apikalen Membrandomäne („terminal web“, „endotube“, Mikrovillisaum) mit Hilfe der Elektronenmikroskopie.
2. Identifizierung von IF-Organisatoren und Regulatoren durch einen EMS Mutagenese-Screen mit Hilfe eines *ifb-2::cfp* Reporterstamms. Identifizierung von Mutanten mit gestörtem IFB-2::CFP Muster. Klonierung der mutierten Gene durch „SNP-mapping“ und RNAi. Expressionsanalyse der mutierten Gene. Funktionsanalyse der Kandidaten durch *in vivo* Beobachtungen, Immunfluoreszenz- und Elektronenmikroskopie. Analyse des Aktin- und MT-Zytoskeletts.

5 Ergebnisse II

Bei diesem Abschnitt der vorliegenden Arbeit handelt es sich um eine Kooperation mit Dr. Carberry (geb. Hüsken) aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Leube (MOCA, RWTH Aachen Universität). Die in 6.1 präsentierten Ergebnisse wurden bereits in Hüsken et al. (2008) veröffentlicht. Experimente die ausschließlich von Dr. Carberry durchgeführt und ausgewertet wurden, sind als solche gekennzeichnet.

Die Hauptaufgabe des Darms in *C. elegans* ist die Nahrungsaufnahme und Verwertung. Um diese Funktion zu erfüllen besitzt er eine hochspezialisierte apikale Membran, bestehend aus einem apikalen Mikrovillisaum und dem darunter liegenden „terminal web“ (McGhee, 2007; Carberry et al., 2009). Eine Besonderheit des „terminal web“ bei Nematoden ist die Endotube, ein elektronendichter Bereich direkt unterhalb des Mikrovillisaums. Sie ist lateral an der CeAJ verankert, sehr resistent gegenüber mechanischem Stress und besonders reich an IF (Munn und Greenwood, 1984; Bossinger et al., 2004). Es werden sechs IF in den Darmzellen exprimiert (*ifb-2*, *ifc-1*, *ifc-2*, *ifd-1*, *ifd-2*, *ifp-1*), die alle an der apikalen Membran lokalisiert sind (Carberry et al., 2009).

Zunächst sollte die Rolle der Darm-spezifischen IF bei der Entwicklung und Aufrechterhaltung der apikalen Membrandomäne untersucht werden (**5.1**). Des Weiteren sollten in einem genomweiten genetischen Screen Gene gefunden werden, die eine Rolle bei der Organisation der intestinalen IF spielen (**5.2**). Zu diesem Zweck wurden von Dr. Carberry *C. elegans* Reporter Stämme generiert, die ein IFB-2:CFP Transgen exprimieren (BJ49-56, Hüsken et al., 2008; Hüsken, 2008). Abb. 22 zeigt ein Schema des IFB-2::CFP Konstrukts. Das komplette Konstrukt besteht aus einer 1994 Basenpaar (Bp)-großen Promoterregion, die upstream des Start-Kodons des *ifb-2* Genlokus liegt und einer 1646 Bp-großen cDNA von *ifb-2*. Diese Abschnitte wurden in den *cfp* tragenden Expressionsvektor pVH10.10 kloniert (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Hutter). Das so entstandene Genkonstrukt wurde in WT Würmer injiziert und mit Hilfe von UV-Strahlung stabil integriert (Hüsken et al., 2008; Hüsken, 2008).

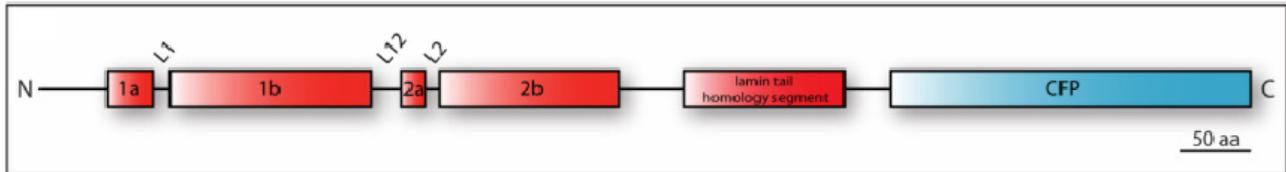


Abb. 22: Schematische Darstellung des IFB-2::CFP Fusionsproteins

Das Fusionsprotein besteht aus dem kompletten IFB-2 Protein mit der N-terminalen Kopfdomäne, der Stabdomäne (bestehend aus 1a, L1, 1b, L12, 2a, L2, 2b), der C-terminalen Schwanzdomäne mit dem Lamin-Homologie Segment (Domänenzuordnung nach Dodemont et al., 1994), sowie dem CFP Modul.

5.1 Die Rolle des Intermediärfilaments *ifc-2* im Darmepithel von *C. elegans*

5.1.1 *ifc-2* RNAi führt zu blasenähnlichen Ausstülpungen der apikalen Membran der Darmzellen

Um zu untersuchen, inwieweit die einzelnen Darm-spezifischen IF zur Etablierung und Stabilisierung der Endotube beitragen, wurden von Dr. Carberry RNAi Experimente gegen die im Darm exprimierten IF in BJ49 durchgeführt. Dafür wurden nacheinander die IF, *ifb-2*, *ifc-1*, *ifc-2*, *ifd-1*, *ifd-2* und *ifp-1* durch RNAi in BJ49 ausgeschaltet. RNAi gegen *ifb-2* führte, wie erwartet, zum Verlust der IFB-2:CFP Fluoreszenz (Daten nicht gezeigt). RNAi gegen die übrigen IF führte nur im Falle von *ifc-2* zu einer Veränderung im IFB-2:CFP Muster (Hüsken et al., 2008). In adulten Würmern weist die apikale Membran nicht länger eine gleichmäßige glatte Form auf, sondern bildet blasenähnlichen Invaginationen aus, die in das Zytoplasma der Darmzellen reichen (Pfeile Abb.23B'). Auch RNAi gegen verschiedene Kombinationen von IF führt zu keinem Phänotyp, es sei denn *ifc-2* wird mit herunterreguliert, dann zeigen sich wieder die blasenähnlichen Verformungen. Um den Phänotyp und die Funktion von *ifc-2* näher zu analysieren, wurde zunächst die *ifc-2* Expression mit Antikörperfärbungen untersucht.

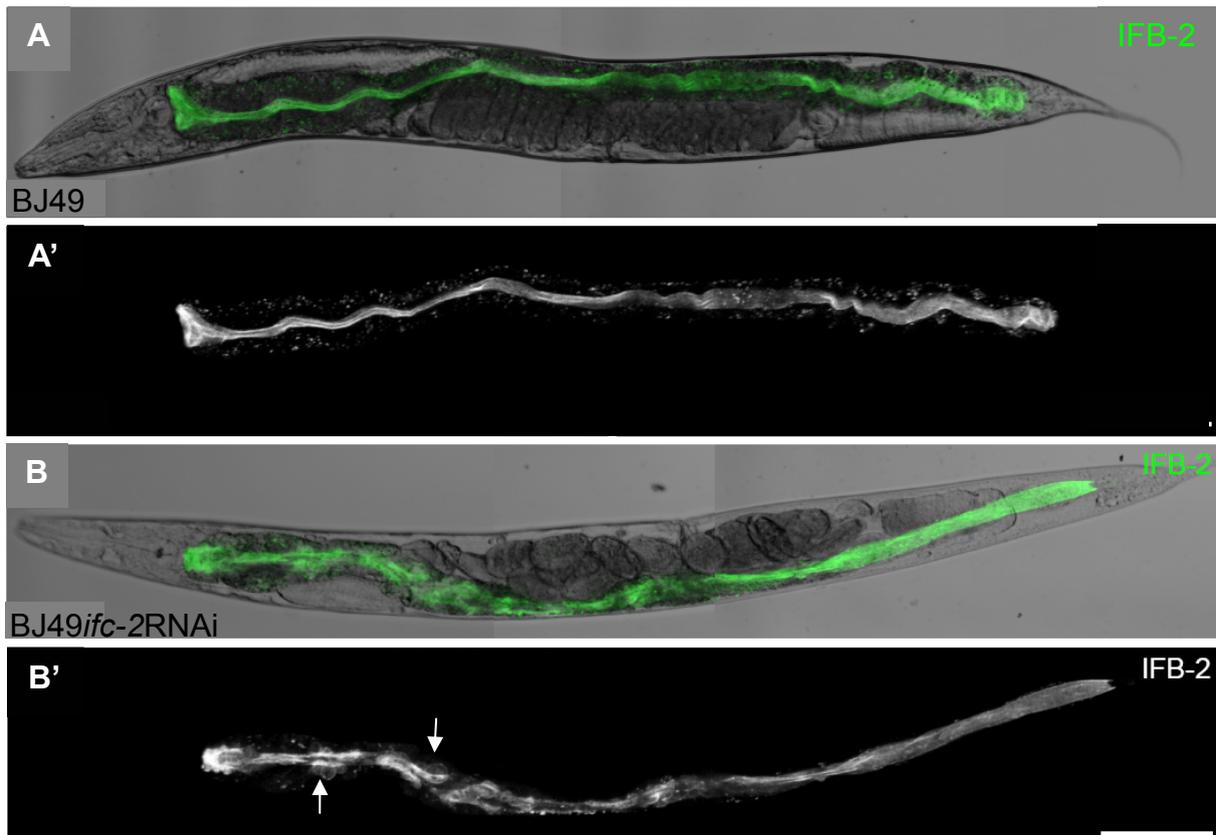


Abb. 23: *ifc-2* RNAi führt zu blasenförmigen Invaginationen der apikalen Membran

A zeigt einen adulten BJ49 Wurm, der ein IFB-2::CFP Transgen exprimiert. A' zeigt nur die IFB-2-CFP Färbung. IFB-2 ist an der kompletten apikalen Membran und in zytoplasmatischen Aggregaten im Darm lokalisiert. Die Oberfläche des Darmlumens ist ebenmäßig und glatt. B zeigt einen BJ49 Wurm nach RNAi gegen *ifc-2*. Das Darmlumen zeigt mehrere blasenförmige Ausstülpungen die in das Zytoplasma der Darmzellen reichen (Pfeile in B'). Anterior ist links, Eichstrich ist 100 μm . (modifiziert nach Hüsken et al., 2008)

5.1.2 IFC-2 wird exklusiv im Darm exprimiert und kolokalisiert mit IFB-2

Um das Expressionsmuster von *ifc-2* zu analysieren, sollten Immunfluoreszenzfärbungen gegen IFC-2 an verschiedenen Stadien von *C. elegans* vorgenommen werden. In Karabinos et al. (2002) wurde mit Immunfluoreszenzfärbungen gezeigt, dass IFC-2 apikal im Darm und an den Kontaktstrukturen des Darms und des Pharynx, aber nicht der Hypodermis lokalisiert. Im Gegensatz dazu konnte in eigenen Immunfluoreszenzfärbungen am WT mit demselben IFC-2 AK (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Karabinos) ein Signal auch in der CeAJ der embryonalen Hypodermis nachgewiesen werden (Abb.25A).

Um zu klären ob diese Färbung spezifisch ist, wurden Tiere mit RNAi gegen *ifc-2* behandelt und anschließend Immunfluoreszenzfärbungen mit dem IFC-2 AK durchgeführt

(Abb.24). Als Marker für die apikale Membran der Darmzellen wurde der IFB-2 AK verwendet (Bossinger et al., 2004, Francis and Waterston, 1985). Nach *ifc-2* RNAi ist die IFC-2 Färbung im Darm nicht mehr nachzuweisen (vergleiche durch Pfeilspitzen markiertes IFB-2 Signal mit IFC-2 Signal in Abb24B und C). Es ist allerdings ein Signal des IFC-2 AK in einem CeAJ ähnlichem Muster in der Hypodermis und dem Pharynx des Embryos (Abb.24A,B), sowie in der Spermatheka adulter Würmer zu erkennen (Abb.24C, Pfeil). Daraus ist zu schließen, dass der IFC-2 AK unspezifisch mit Epitopen in der Hypodermis, dem Pharynx und der Spermatheka reagiert, wobei diese Epitope wahrscheinlich in der CeAJ lokalisiert sind.

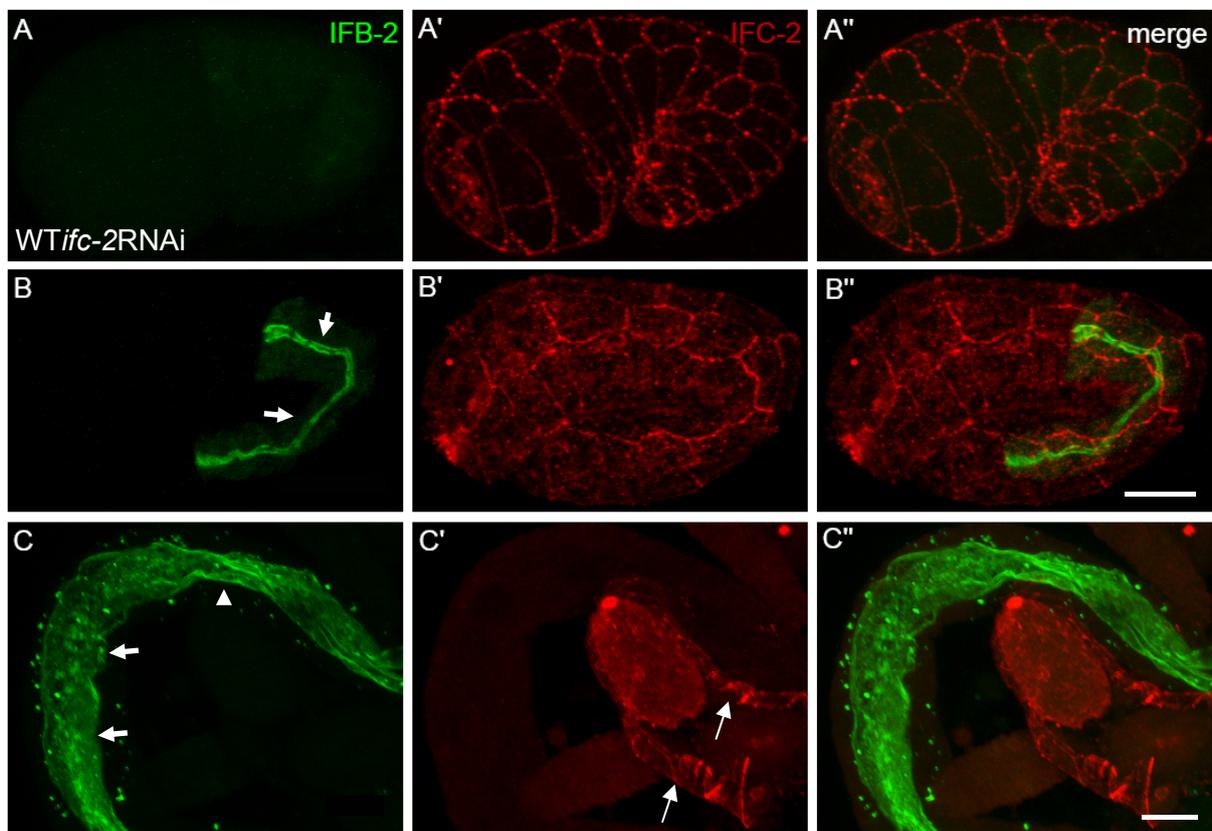


Abb. 24: Das IFC-2 Signal in der CeAJ der Hypodermis und des Pharynx ist unspezifisch

Immunfluoreszenzfärbungen von WT *ifc-2* RNAi Embryonen und präparierten Därmen adulter Würmer gefärbt gegen IFB-2 (grün) und IFC-2 (rot). Im 1,5-fach und 2-fach elongierten Stadium färbt der IFC-2 AK auch nach *ifc-2* RNAi die CeAJ in der Hypodermis und dem Pharynx sehr stark (Pfeile in A', B'). In präparierten adulten Därmen ist dagegen keine Fluoreszenz mehr im Darm zu sehen, wohl aber in der Spermatheka (Pfeile in C'). Anterior ist links, dorsal oben in (A, B), Eichstriche sind 10 µm. (Abb. Hüsken et al., 2008)

Nachdem die Spezifität des IFC-2 AK überprüft wurde, wurde eine Dreifachfärbung an Embryonen, Larven und an präparierten Därmen adulter WT Würmer gegen IFB-2, IFC-2 und DLG-1 durchgeführt (Abb.25). DLG-1 wird als CeAJ Marker benutzt und IFB-2 als

Während der Embryonalentwicklung ist die unspezifische IFC-2 Färbung in der CeAJ der Hypodermis und des Pharynx detektierbar, wo es mit DLG-1 kolokalisiert (Abb.25A',A''). Außerdem ist ein schwaches IFC-2 Signal im Darm zu erkennen (Pfeil in Abb.25A'). Ab dem L1-Larvenstadium ist das IFC-2 Signal apikal in den Darmzellen zu sehen (Abb.25B). In präparierten adulten Därmen ist sehr gut zu erkennen, dass IFC-2 in den Darmzellen apikal, in der CeAJ und in zytoplasmatischen Aggregaten zu finden ist und mit IFB-2 kolokalisiert (Abb.25C,D). Durch die RNAi Experimente gegen IFC-2 (siehe Abb.24) konnte gezeigt werden, dass die Färbung im Darm spezifisch ist. IFC-2 scheint also ausschließlich postembryonal in den Darmzellen exprimiert zu werden und kolokalisiert mit IFB-2.

5.1.3 Der *ifc-2* RNAi Phänotyp tritt ab dem L3-Larvenstadium auf und nimmt mit dem Alter der Tiere zu

Nachdem das Expressionsmuster von *ifc-2* untersucht wurde, sollte nun der Verlauf des *ifc-2* RNAi Phänotyps analysiert werden, um herauszufinden in welchem Entwicklungsstadium die Invaginationen der apikalen Membran auftreten und wie stark sich diese in den verschiedenen Entwicklungsstadien ausprägen (Abb.26).

In *ifc-2* RNAi Embryonen ist noch keine Veränderung der apikalen Membran der Darmzellen im Vergleich zu WT Würmern zu erkennen (Daten nicht gezeigt). Dies war aber zu erwarten, da das Protein erst ab dem L1-Larvenstadium mit Immunfluoreszenzfärbung nachweisbar ist. Während der Larvalentwicklung sind die Formveränderungen der Endotube erstmalig im L3-Larvenstadium erkennbar (Abb.26B). Es kommt zur Bildung von blasenähnlichen Strukturen an der apikalen Membran der Darmzellen, die in das Zytoplasma der Zellen gerichtet sind (Abb.26B'). Im adulten Wurm sind die Invaginationen deutlich größer geworden und während der weiteren Entwicklung nehmen sie an Größe und Anzahl weiter zu (Abb.26C,C'). Der Phänotyp prägt sich also umso stärker aus, je älter der Wurm ist.

Da *ifc-2* RNAi nicht zu Letalität führt, wurden die BJ49 Würmer über mehrere Generationen auf den *ifc-2* RNAi Fütterungsplatten gehalten, so dass zu jeder Zeit Würmer für Analysen vorhanden waren. Dabei wurde festgestellt, dass der Phänotyp nicht nur mit dem Alter der Würmer stärker wird, sondern auch von Generation zu Generation zunimmt, wobei sich die stärksten Phänotypen nach drei Generationen ausprägen

(Hüsken et al., 2008). Dieses Phänomen wurde bisher noch nicht beschrieben. Es legt den Schluss nahe, dass sich einige Phänotypen nach RNAi in der F1 nicht vollständig ausprägen, sondern erst nach Anwendung der RNAi über mehrere Generationen.

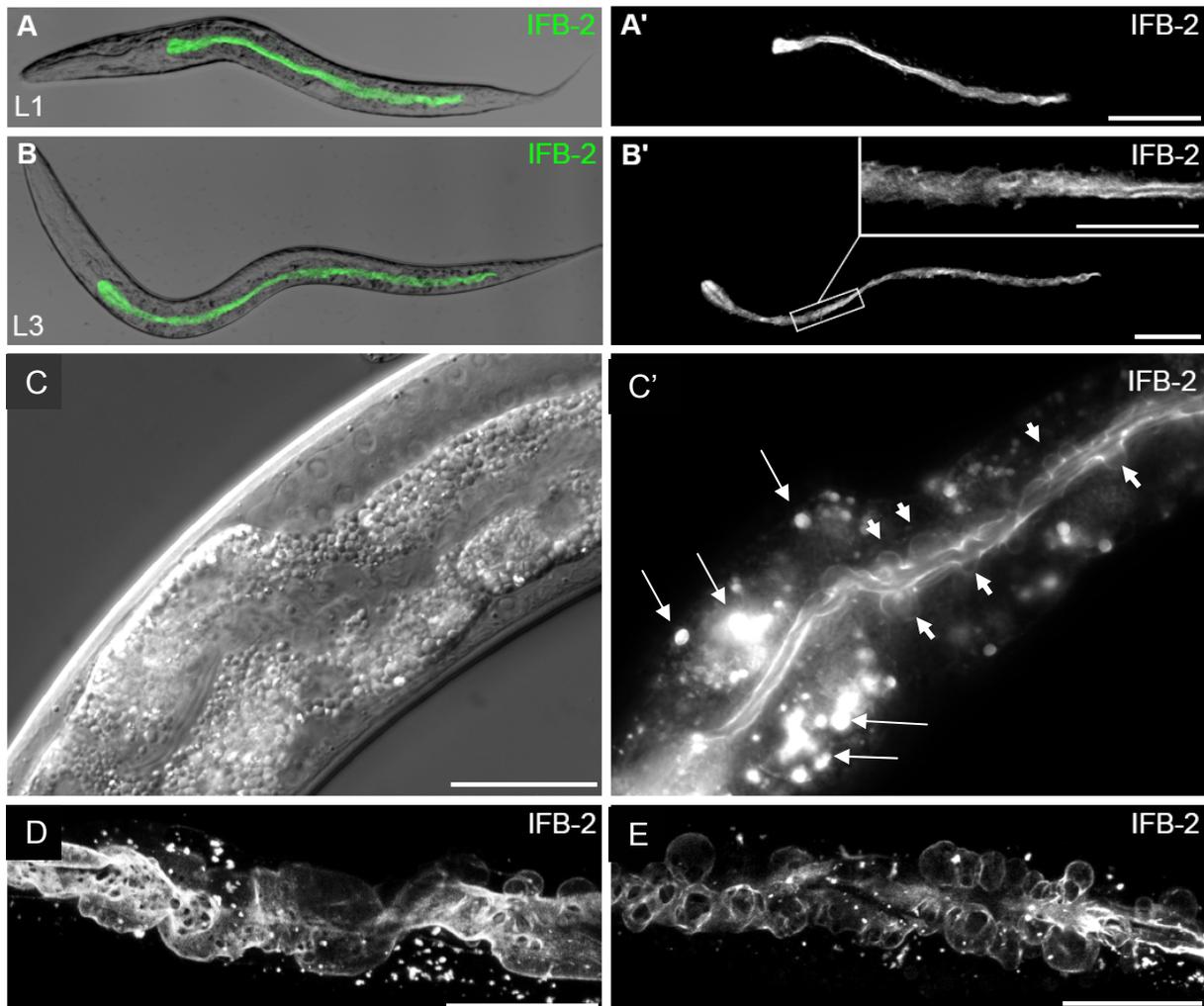


Abb. 26: Der *ifc-2* RNAi Phänotyp tritt ab dem L3-Larvenstadium auf und wird stärker je älter der Wurm wird

DIK (A, B, C) und Fluoreszenz Aufnahmen (A-B', C'-E) von *ifc-2* RNAi Würmern in unterschiedlichen Entwicklungsstadien. Im L1-Larvenstadium sind keine Veränderungen im IFC-2::CFP Muster zu erkennen. Im L3-Larvenstadium erscheint die IFC-2::CFP Fluoreszenz diffuser aufgrund von mehreren Ausstülpungen der apikalen Membran (B', Vergrößerung in B'). In adulten Würmern werden die Lumenveränderungen deutlicher (C, Pfeilspitzen in C'). Fluoreszierende zytoplasmatische Aggregate sind auf Autofluoreszenz der Darmgranula zurückzuführen (Pfeile in C'). Je älter die Würmer werden, umso mehr Invaginationen bilden sich, die auch an Größe zunehmen. In (D, E) sind besonders stark betroffene Regionen gezeigt, die viele blasenähnliche Ausstülpungen entlang der apikalen Membran zeigen. Anterior ist links in (A-C'), Eichstriche sind 10 µm. (Abb. modifiziert nach Hüsken et al., 2008)

Alle weiteren Experimente wurden mit Würmern durchgeführt, die mindestens drei Generationen mit *ifc-2* RNAi behandelt wurden. Abb.26D,E zeigen eine besonders stark betroffene Region des Darms von mehreren Tagen alten Würmern, die über drei

Generationen mit *ifc-2* RNAi behandelt wurden. Nach drei Generationen zeigt der Phänotyp eine Penetranz von 97% (n=60) in drei Tage alten Würmern. 75% der Würmer bilden einen starken Phänotyp aus (Abb.26D,E), während 22% den schwächeren Phänotyp zeigen (Abb.26C,C').

Karabinos et al. postulierten 2001, dass *ifc-2* RNAi zu einem „dumpy“ Phänotyp mit verringerter Körperlänge führt. Um dies zu überprüfen wurde die Körperlänge und –breite der Würmer gemessen. Weder in der Länge ($1,42 \pm 0,07$ mm im WT [n=25], $1,49 \pm 0,03$ mm im BJ49*ifc-2*RNAi [n=39]), noch in der Breite ($81 \pm 0,06$ μ m im WT [n=25], $82 \pm 0,02$ μ m im BJ49*ifc-2*RNAi [n=39]) der *ifc-2* RNAi Würmer konnten signifikante Unterschiede im Vergleich zum WT festgestellt werden (Hüsken et al., 2008).

5.1.4 Elektronenmikroskopische Aufnahmen der *ifc-2* RNAi Tieren zeigen starke Veränderungen in der Form des Darmlumens, aber keine erkennbaren Defekte im Aufbau der apikalen Membrandomäne

Die apikale Membran ist für die Nahrungsverwertung hoch spezialisiert, es müssen Verdauungsenzyme abgegeben und Nährstoffe aus dem Lumen aufgenommen werden. Dafür befinden sich an der apikalen Membran die Mikrovilli, die sich durch einen sehr regelmäßigen Aufbau auszeichnen. Sie sind alle gleich lang und haben einen gleichmäßigen Abstand zueinander. Durch die Bildung blasenförmiger Ausstülpungen der apikalen Membrandomäne nach *ifc-2* RNAi nimmt diese beträchtlich an Größe zu (vergleiche Abb.27A und B). In den besonders stark betroffenen Regionen bilden sich 10 Ausstülpungen pro 10 μ m Darmlumen mit einem Durchmesser von 10 μ m, was den Durchmesser des Darmlumens etwa um das 20-fache vergrößert. Um die Auswirkungen dieses Phänotyps auf den Mikrovillisaum und den kompletten Aufbau der apikalen Membran zu untersuchen, wurden EM Aufnahmen hergestellt.

Die Abb.27C,D zeigen EM Bilder von Querschnitten durch den Wurm, wobei sehr gut das Verhältnis der Größe des jeweiligen Darmlumens zum Rest des Wurms deutlich wird. In Abb.27E,F ist dann speziell nur die Darmregion gezeigt. Auf diesen Bildern wird die starke Formveränderung des Darmlumens sehr deutlich. Im WT besitzt das Darmlumen eine ellipsoide Form mit einem etwa gleichmäßig großen Lumen (McGhee, 2007; Abb.27A,C,E). *ifc-2* RNAi Tiere dagegen weisen ein verzweigtes, zum Teil sehr enges, oder stark geweitetes Lumen auf (Abb.27B,D,F). Die Mikrovilli dagegen scheinen nach *ifc-*

2 RNAi keine Defekte aufzuweisen. Sie besitzen eine ähnliche Länge wie im WT ($603,40 \pm 15,61$ nm im WT [n=11], $585,05 \pm 15,83$ nm im BJ49*ifc-2*RNAi [n=11]), einen ähnlichen Durchmesser ($105,22 \pm 3,15$ nm im WT [n=11], $107,45 \pm 1,84$ nm im BJ49*ifc-2*RNAi [n=11]) und haben auch einen gleichmäßigen Abstand zueinander (Hüsken et al., 2008). Auch in der Endotube, der elektronendichten Struktur direkt basal der Mikrovilli, ist keine Veränderung festzustellen (Abb.27E,F). Ein Unterschied ist allerdings in der Anzahl der Dotter-Granula (Y in Abb.27C-F) im Zytoplasma der Enterozyten erkennbar. Im WT sind es durchschnittlich 63 pro Querschnitt, nach *ifc-2* RNAi nur 24,5. Die Reduktion der Dotterproteine nach *ifc-2* RNAi hat allerdings keine Auswirkungen auf die Nachkommen. Es wurde weder embryonale Letalität, noch eine verringerte Nachkommenschaft festgestellt (Daten nicht gezeigt).

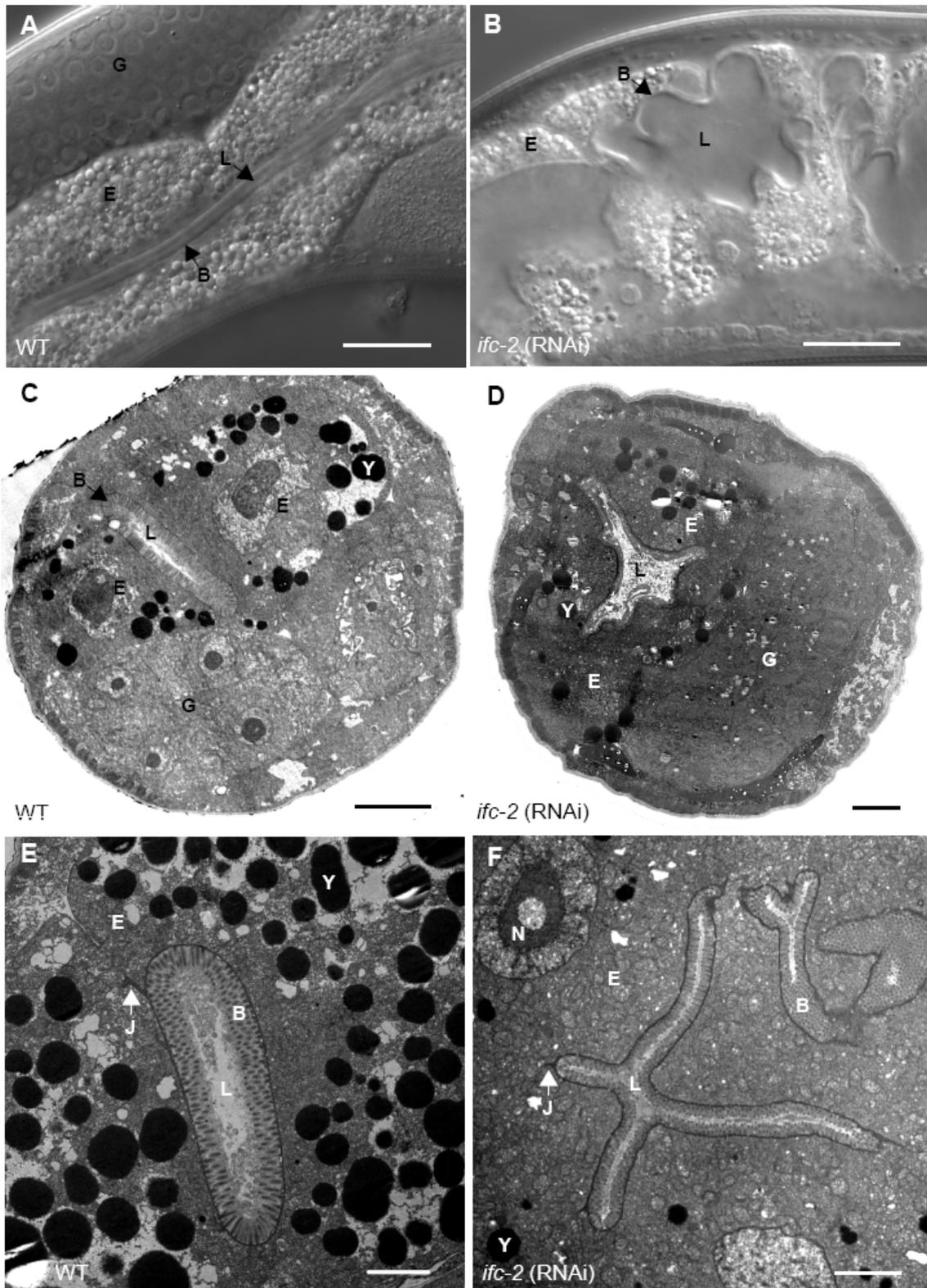


Abb. 27: Auf ultrastruktureller Ebene ist ein verzweigtes Lumen nach *ifc-2* RNAi zu erkennen

DIK (A, B) und EM Aufnahmen (C-F) von WT (A, C, E) und *ifc-2* RNAi Würmern (B, D, F). DIK Aufnahmen zeigen Lumenformveränderungen in *ifc-2* RNAi Würmern, die zu einer starken Weitung des Lumens führen. In den EM Aufnahmen sind die Lumenveränderungen ebenfalls sehr gut zu erkennen, der Mikrovillisaum und die CeAJ zeigen allerdings keine Veränderungen gegenüber dem WT. L= Lumen, G= Gonade, B= Mikrovillisaum, E= Enterozyte, J= Kontaktstruktur, N= Nukleus, Y= Dotterpartikel, Eichstriche sind 25 μ m in (A, B); 5 μ m in (C, D); 2 μ m in (E, F). (Abb. Hüsken et al., 2008)

5.1.5 Die interzellulären Kontaktstrukturen der Darmzellen zeigen nach *ifc-2* RNAi keine erkennbaren Defekte

Auf ultrastruktureller Ebene konnte gezeigt werden, dass IFB-2 nicht nur Bestandteil der Endotube, sondern sehr wahrscheinlich auch der CeAJ ist (Bossinger et al., 2004). Da IFB-2 auf Immunfluoreszenzebene mit IFC-2 in der CeAJ kolokalisiert (Abb.25D-D''), ist wahrscheinlich auch IFC-2 ein Bestandteil der CeAJ. Daher wurde die Lokalisation, Struktur und Funktionalität der CeAJ nach *ifc-2* RNAi im Detail untersucht. Die CeAJ liegt direkt basal zur apikalen Membran und stellt die Grenze zur basolateralen Membrandomäne da. Sie ist unter anderem wichtig für die Adhäsion der Zellen untereinander (Lynch und Hardin, 2009).

Zunächst wurden AK-Färbungen und EM Aufnahmen von adulten *ifc-2* RNAi Würmern analysiert. Abb.28 zeigt einen präparierten Darm eines adulten WT Wurms im Vergleich zu dem eines adulten *ifc-2* RNAi Wurms. Als CeAJ Marker wurde DLG-1 (Labouesse, 2006) und als apikaler Marker IFB-2 (Bossinger et al., 2004) gefärbt. WT Würmer zeigen eine gleichmäßige apikale Membran, DLG-1 befindet sich basal zu IFB-2 und zeigt ein durchgehendes Muster (Abb.28A-A''). Das Lumen der *ifc-2* RNAi Würmer dagegen zeigt viele Ausbuchtungen, die in der IFB-2 Färbung deutlich erkennbar sind. Das DLG-1 Protein weist ein kontinuierliches Muster auf, das direkt basal des IFB-2 Musters liegt und durch die Formveränderung des Lumens eine „gezackte“ Form aufweist (Abb.28C-C''). Auf EM Ebene sind auch bei stärkerer Vergrößerung keine Veränderungen der CeAJ zu erkennen (weiße Pfeile in Abb.28B und D). Ebenso sind keine Veränderungen im Aufbau der Mikrovilli oder der Endotube zu erkennen (schwarze Pfeilspitzen bzw. Pfeile in Abb.28B und D).

Auch wenn die CeAJ in Immunfluoreszenzaufnahmen keine Defekte erkennen lässt, sollte ihre Funktion als Barriere für parazelluläre Diffusion überprüft werden. Eine solche Rolle konnte bisher zwar noch nicht für die CeAJ gezeigt werden, aber für die „tight junctions“ (TJ) in Säugern und für die „septate junctions“ (SJ) in *Drosophila* (Müller and Bossinger, 2003). Da die CeAJ bisher die einzige Kontaktstruktur im Darm ist und sie homologe Proteine der SJ und TJ anderer Systeme beinhaltet, ist es möglich dass die CeAJ auch als parazelluläre Diffusionsbarriere dient. Die große Sequenzähnlichkeit zwischen DLG-1 und Discs Large, welches in *Drosophila* mit SJ assoziiert, legen es nahe, dass die CeAJ eine ähnliche Funktion in *C. elegans* ausübt (Köppen et al., 2001, Labouesse, 2006). Indirekt wird diese Hypothese von der Beobachtung gestützt, dass ein niedrig-molekularer

Farbstoff in CLC-1 Defekten Tieren zwischen die Pharynxzellen von *C. elegans* diffundieren kann. CLC-1 („claudin-like in Caenorhabditis“) ist *C. elegans* Claudin Homolog und eine mögliche DAK Komponente (Asano et al., 2003).

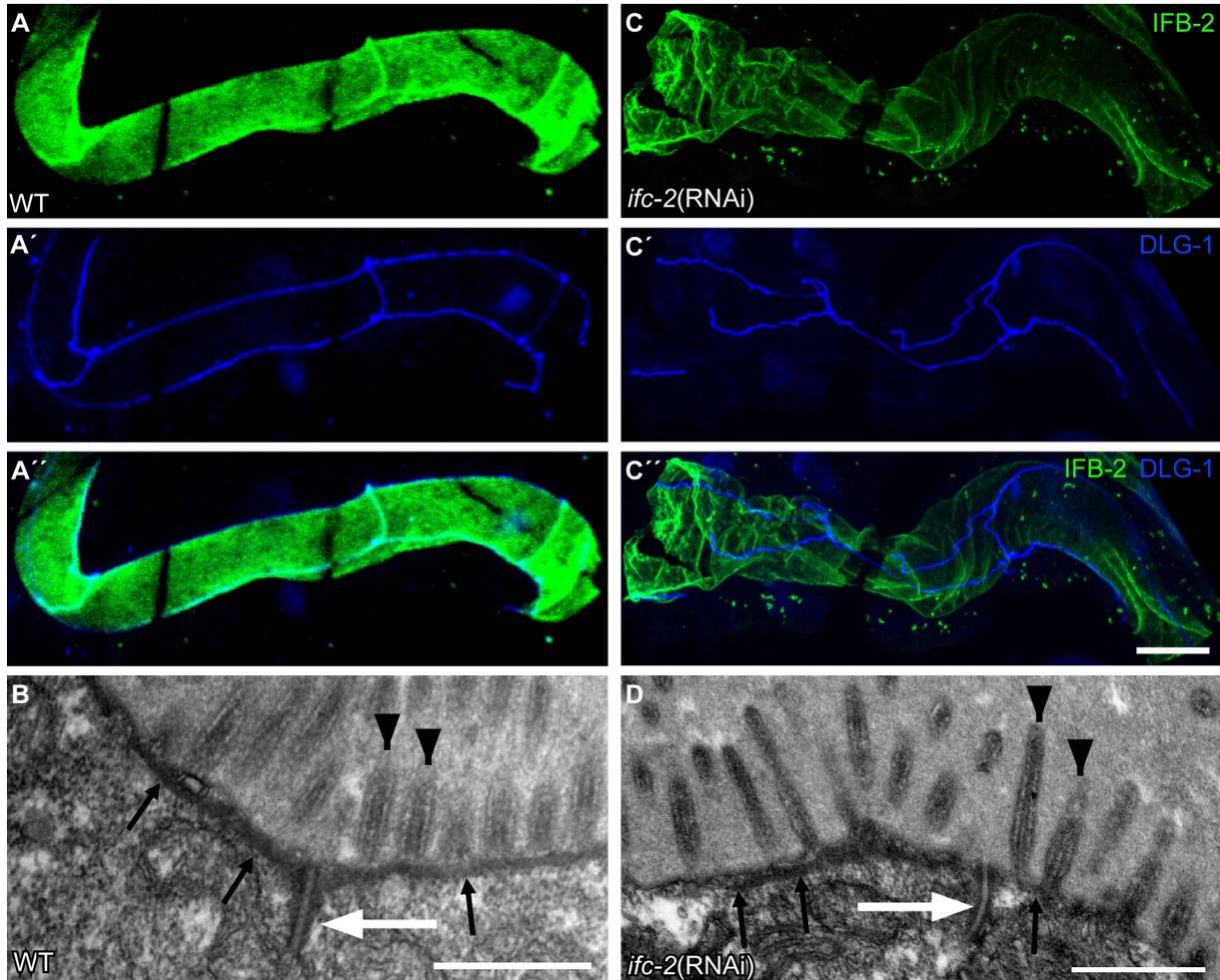


Abb. 28: Die CeAJ weist nach *ifc-2* RNAi keine Defekte auf

Immunfluoreszenz Aufnahmen an präparierten Därfen gegen IFB-2 (grün) und DLG-1 (blau) und EM Aufnahmen der CeAJ (B, D). Trotz starker Verformungen des Darmlumens nach *ifc-2* RNAi, verläuft die CeAJ exakt entlang den Zell-Zell Grenzen. EM Aufnahmen (B, D) decken keine Veränderungen in den CeAJ (weiße Pfeile), den Mikrovilli (schwarze Pfeilspitzen) oder der Endotube (schwarze Pfeile) auf. Eichstriche sind 50 μm in (C'') und 0,5 μm in (B, D). (Abb. Hüsken et al., 2008)

Um die Barrierenfunktion des Darmepithels zu testen, wurden die Würmer mit TRITC-markiertem Dextran gefüttert (MW: 40.000), das Membran-impermeabel ist. Dextrane sind hoch-molekulare Polysaccharide, die unter anderem eingesetzt werden, um Intrazelluläre Kommunikation, Endozytose und Membran Permeabilität zu analysieren (Bossinger and Schierenberg, 1992; Grant et al., 2001; Grant and Sato, 2006; Guo et al., 2008). Im WT ist das Dextran ausschließlich im ellipsoiden Lumen zu finden, ohne in den parazellulären

Raum zu gelangen oder in die Zellen aufgenommen zu werden (Abb.29A-A''). Nach *ifc-2* RNAi ist das Dextran auch in den blasenförmigen Invaginationen zu erkennen, was zeigt, dass diese mit dem Lumen in Verbindung stehen, auch wenn diese Verbindungen in über 50% verengt sind (Abb.29B-B''). Dextran dringt aber auch in den *ifc-2* RNAi Tieren nicht in die Zellzwischenräume oder in die Zellen ein, was zeigt, dass die Barrierenfunktion des Epithels bestehen bleibt (Abb.29B-B'').

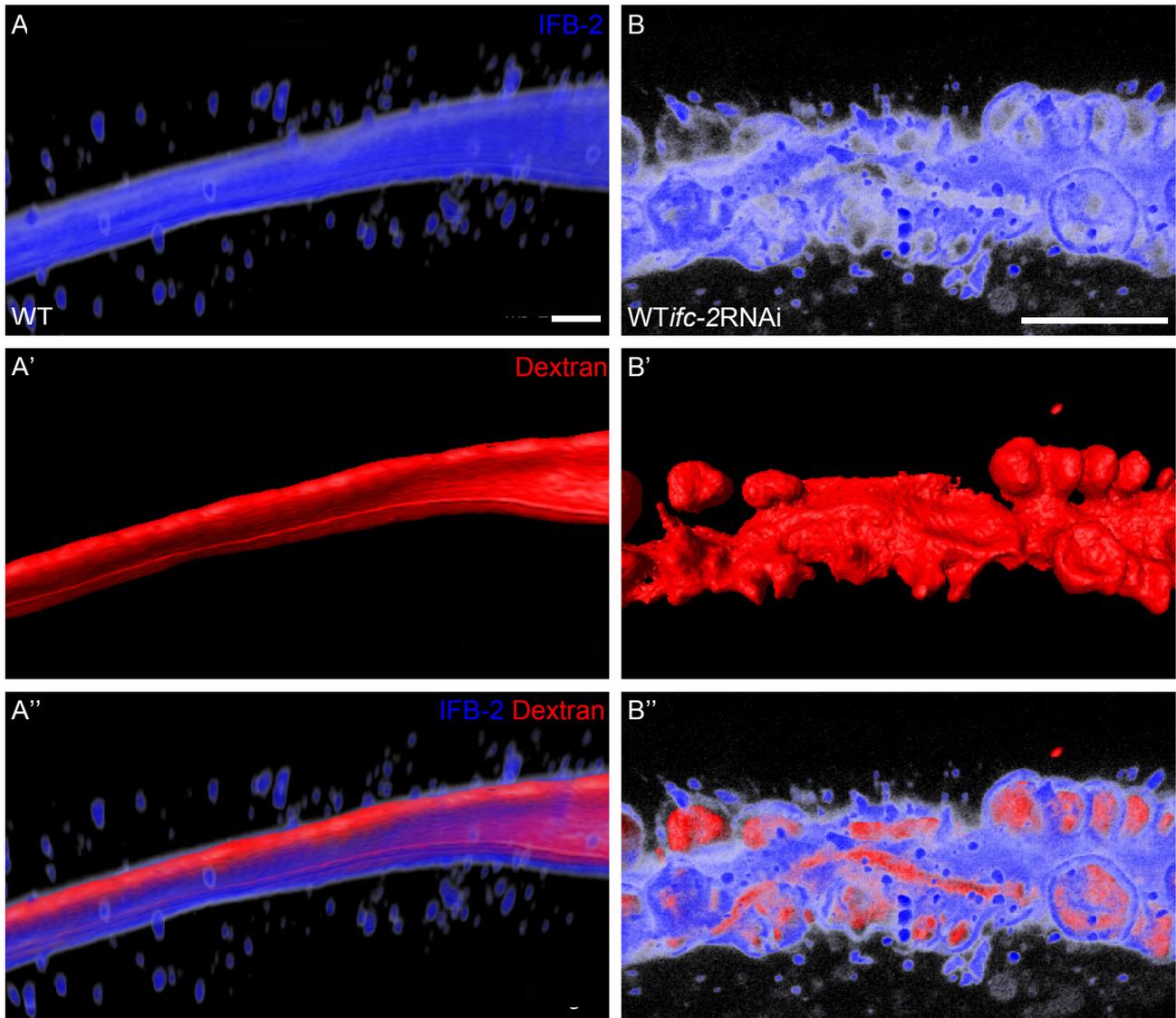


Abb. 29: Die Integrität des Darmepithels ist nach *ifc-2* RNAi nicht gestört

3D-Rekonstruktion von konfokalen Bildern von IFB-2::CFP exprimierenden BJ49 und BJ49*ifc-2*RNAi Würmern die mit Membran-impermeablem, TRITC-konjugiertem Dextran gefüttert wurden. (A, B) zeigen die IFB-2::CFP Fluoreszenz, (A', B') das TRITC-konjugierte Dextran und (A'', B'') die Überlagerung. Die Barrierenfunktion des Epithels ist, trotz der starken Veränderungen des Lumens, vollständig erhalten geblieben. Eichstriche sind 10 μ m. (Abb. Hüsken et al., 2008)

5.1.6 Die Polarität der Darmzellen scheint nach *ifc-2* RNAi nicht gestört zu sein

Mit den bisher verwendeten Markern IFB-2 und DLG-1 konnten keine Polaritätsdefekte in den Darmzellen nach *ifc-2* RNAi entdeckt werden. Da aber bereits gezeigt wurde, dass in Keratin-defizienten Mäusen Komponenten der apikalen Membrandomäne fehlverteilt werden (Ameen et al., 2001; Toivola et al., 2004), wurde hier die Lokalisation von mehreren Proteinen überprüft: OPT-2 (PEPT-1), SPH-1 und Aktin (Abraham et al., 2006; Nehrke, 2003). Zunächst wurde die Verteilung des fluoreszierenden Oligopeptidtransporters OPT-2::GFP betrachtet (Nehrke, 2003). Dieser lokalisiert im WT ausschließlich an der adluminalen Plasmamembran (Abb.30A-A''). In *ifc-2* RNAi Tieren bleibt OPT-2 ebenfalls mit der apikalen Membran assoziiert, auch an den blasenförmigen Ausstülpungen (Abb.30 B-B'').

Weiterhin wurde auch die Verteilung des vesikulären Membranproteins SPH-1 (Synaptophysin) untersucht (Abraham et al., 2006). Im WT ist es apikal zur IFB-2::CFP positiven Endotube lokalisiert (Abb.30D-D''). Dieselbe Verteilung kann auch in *ifc-2* RNAi Tieren beobachtet werden, die Ausstülpungen der apikalen Membrandomäne aufweisen (Abb.30E-E''). Da gezeigt werden konnte, dass ein Verlust von IF einen Einfluss auf andere Zytoskelettkomponenten haben kann (Ameen et al., 2001; Wald et al., 2003; 2005; Oriolo et al., 2007), wurde die Verteilung von Aktin nach *ifc-2* RNAi durch Alexa Fluor 546-konjugiertem Phalloidin untersucht. In WT Würmern ist die Phalloidinfärbung an der apikalen Membrandomäne zu erkennen (van Fürden et al., 2004; Patel et al., 2008). Nach *ifc-2* RNAi scheint die Phalloidinfärbung nicht verändert. Auch in Bereichen, die starke Formveränderungen aufweisen ist es gleichmäßig apikal lokalisiert (Abb.30C, C').

ifc-2 RNAi scheint also lediglich einen Einfluss auf die Form des Darmlumens zu haben, nicht aber auf die Polarität der Darmzellen. In Immunfluoreszenz und DIK Aufnahmen weisen die Därme von *ifc-2* RNAi Würmern zahlreiche blasenförmige Invaginationen auf und in EM Aufnahmen sind starke Verzweigungen des Lumens zu erkennen, was auf eine erhebliche Vergrößerung der apikalen Membran hindeutet. Trotzdem sind mit den hier verwendeten Methoden keine Defekte im Aufbau des Mikrovillisaums, der Endotube, oder der CeAJ zu erkennen. Das Auftreten der blasenähnlichen Invaginationen ist erst ab dem L3-Larvenstadium zu erkennen und verstärkt sich mit der weiteren Entwicklung des Wurms. Dies könnte darauf hin deuten, dass der Phänotyp durch den konstanten Stress

der auf den Darm wirkt, z.B. durch Nahrungsaufnahme und Verwertung, oder die Bewegung des Wurms, verstärkt wird.

Durch die Verwendung des IFB-2::CFP Stamms konnten also Formveränderungen der apikalen Membrandomäne des *C. elegans* Darms schon unter dem Binokular sichtbar gemacht werden, was diesen zu einem geeigneten Kandidaten für einen genetischen Screen macht, um IF Organisatoren in *C. elegans* zu identifizieren.

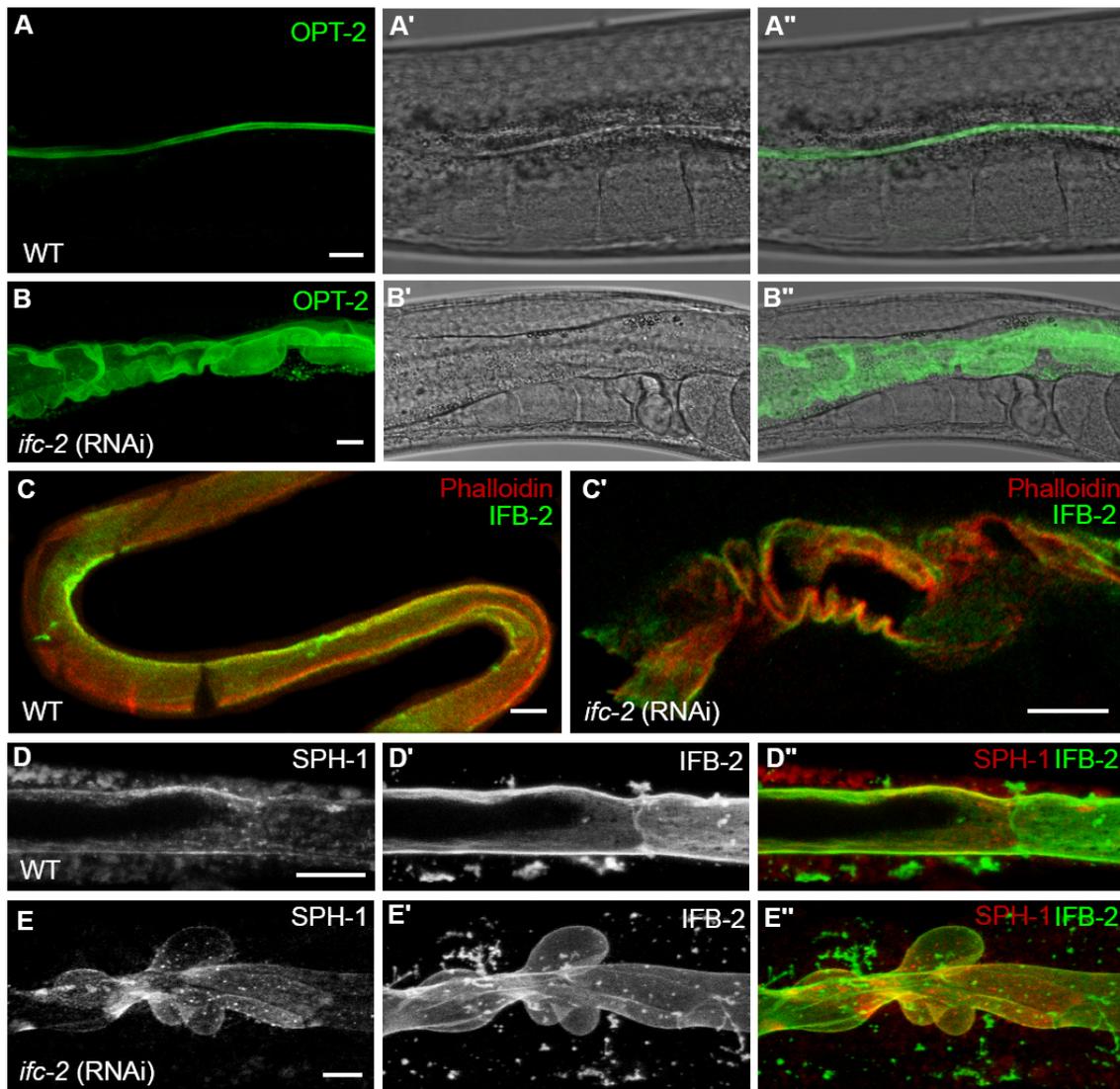


Abb. 30: Die Polarität der Darmzellen nach *ifc-2* RNAi ist nicht gestört

Fluoreszenz (A, B, C-E'') und DIK (A', A'', B', B'') Aufnahmen von *C. elegans* WT und *ifc-2* RNAi Würmern, die verschiedene apikale Marker zeigen. (A, B) Aufnahmen von transgenen Würmern die ein OPT-2::GFP Konstrukt exprimieren. OPT-2, ein Oligopeptidtransporter, bleibt auch nach *ifc-2* RNAi an der apikalen Membran lokalisiert. (C, C') zeigen Immunfluoreszenz Aufnahmen von Därfen eines WT und *ifc-2* RNAi Wurms, die gegen IFB-2 gefärbt wurden. Zusätzlich wurden sie mit Phalloidin gegen Aktin gefärbt, welches sich in der Endotube befindet und Bestandteil der Mikrovilli ist. Es ist keine Veränderung in der Aktinverteilung nach *ifc-2* RNAi zu erkennen. (D-E'') zeigen transgene Würmer die ein SPH-1::GFP Konstrukt exprimieren. SPH-1, ein Vesikelmembranprotein, ist nach *ifc-2* RNAi ebenfalls korrekt apikal lokalisiert. Eichstriche sind 10 μ m. (Abb. Hüsken et al., 2008)

5.2 Identifizierung und Charakterisierung des Intermediärfilament-Organisators *ifo-1*

Die Funktion von IF in Zellen ist weitgehend bekannt: sie sind sehr stabil und in erster Linie für die Stabilität der Zellen bei mechanischem Stress verantwortlich, sie sollen aber auch eine zytoprotektive Wirkung besitzen, Resistenz gegen Drogen und Schutz vor toxischen Einflüssen vermitteln und eine Rolle bei der Polarisierung von Zellen spielen (Oriolo et al., 2007; Carberry et al., 2009). Organisatoren für die IF und molekulare Regulationsmechanismen sind allerdings weitgehend unbekannt. *C. elegans* könnte sich als geeigneter Organismus herausstellen, um diese Organisatoren und Mechanismen zu erforschen. Er besitzt einzigartige Eigenschaften als Modellorganismus (siehe Einleitung, Brenner, 1974) und erste Expressions- und Funktions-Analysen zu IF wurden bereits durchgeführt (Karabinos et al., 2001, 2002, 2003, 2004). Durch die Möglichkeit transgene Tiere herzustellen, die fluoreszierende IF exprimieren und aufgrund seiner Transparenz, lassen sich Veränderungen im Verteilungsmuster der IF in *C. elegans* bereits *in vivo* überprüfen (Chalfie et al., 1994). Der Darm von *C. elegans* ist besonders gut geeignet, um die Organisation von IF und ihre Rolle bei der Entwicklung eines Organs zu studieren. Er besteht aus nur 20 Zellen und weist einen einfachen Aufbau vor (Leung et al., 1999). In den Darmzellen werden sechs IF exprimiert, die alle apikal im „terminal web“ lokalisiert sind (Carberry et al., 2009). Die IFB-2::CFP exprimierenden Würmer stellen ein sehr gutes Werkzeug dar, um in einem optischen Screen nach Organisatoren der IF zu suchen (Hüsken et al., 2008). Im Gegensatz zu Arbeiten in Zellkultur, besteht bei *C. elegans* die Möglichkeit die Folgen für die Entwicklung eines Organs und des gesamten Organismus bei Verlust oder einer Fehlorganisation der IF zu betrachten. Dies könnte neue Erkenntnisse über die Funktion der IF liefern.

5.2.1 In den Mutanten BJ133(*kc2*) und BJ134(*kc3*) ist das Intermediärfilament IFB-2 fehlverteilt

Um Organisatoren für IF des Darmepithels von *C. elegans* zu identifizieren, wurde von Dr. Carberry ein F2 Ethylmethansulfonat (EMS)-Mutagenese-Screen mit einem transgenen *ifb-2::cfp* Stamm durchgeführt (Hüsken, 2008). Es konnten drei verschiedene Mutanten, BJ132(*kc1*), BJ133(*kc2*) und BJ134(*kc3*) isoliert werden, die ein gestörtes IFB-2::CFP

Muster aufweisen. Der Stamm BJ132(*kc1*) trägt eine Mutation im Gen *sma-5*, welches für eine MAP-Kinase kodiert. Sie weist blasenförmige Invaginationen an der apikalen Membran auf, ähnlich wie *ifc-2* RNAi Tiere. Die *sma-5(kc1)* Mutante wird in anderen Arbeiten beschrieben (Gerhardus, 2009; Hüsken, 2008) und hier nicht weiter abgehandelt. Die Mutanten BJ133(*kc2*) und BJ134(*kc3*) zeigen eine Fehlverteilung des IFB-2::CFP. In BJ133(*kc2*) ist das IFB-2::CFP nicht in der kompletten Endotube lokalisiert und in vielen zytoplasmatischen Aggregaten zu erkennen, die an Anzahl und Größe die im WT vorkommenden Aggregate deutlich übertreffen (Abb.31B). Die Mutante BJ134(*kc3*) weist ein diskontinuierliches IFB-2 Muster auf. Auch hier sind im Gegensatz zum WT vermehrt zytoplasmatische IFB-2::CFP Aggregate zu erkennen und das IFB-2 scheint in manchen Darmregionen nicht in der Endotube zu lokalisieren (siehe Pfeile in Abb.31C). Die Mutanten wurden vor weiteren Analysen fünf Mal mit dem WT zurückgekreuzt, um weitere Mutationen auszukreuzen.

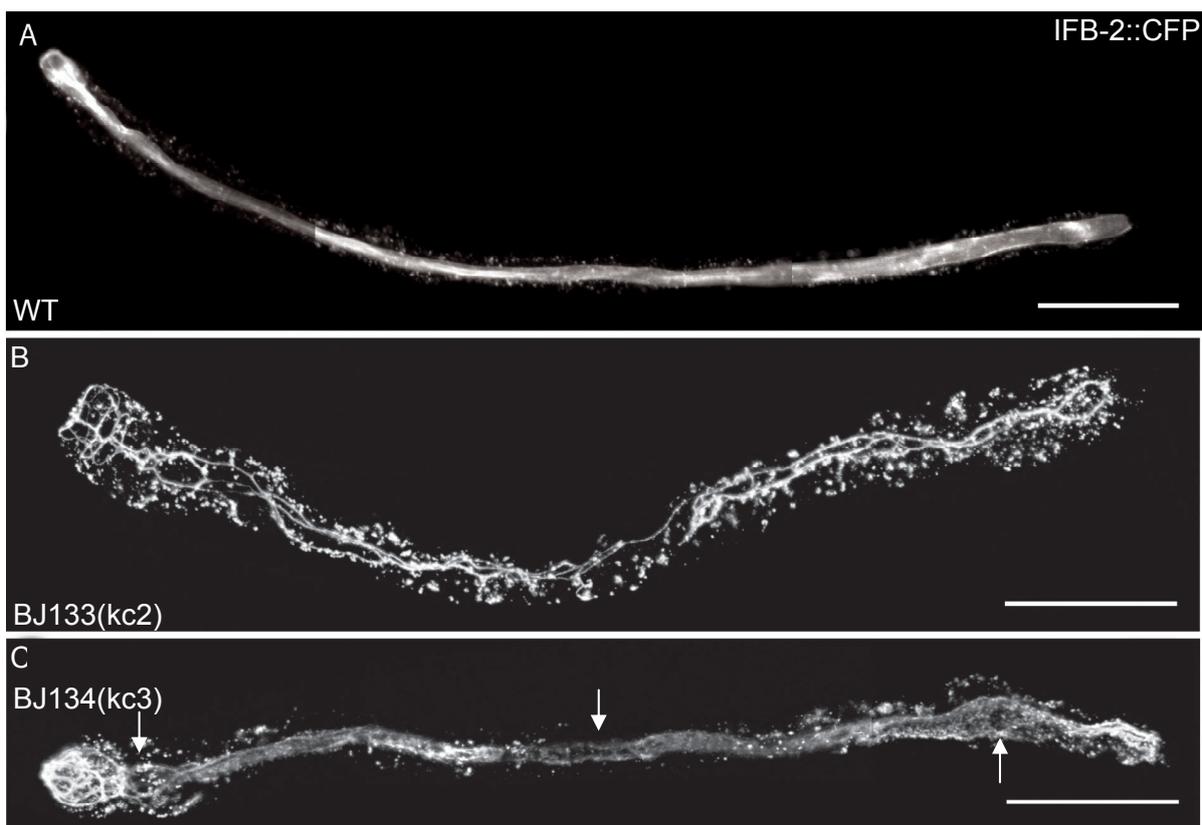


Abb. 31: IFB-2 wird in BJ133(*kc2*) und BJ134(*kc3*) falsch lokalisiert

Fluoreszenzaufnahmen vom BJ49 (A), BJ133(*kc2*) (B) und BJ134(*kc3*) (C) zeigen die Lokalisation von IFB-2::CFP. Im WT ist IFB-2 an der kompletten apikalen Membran der Darmzellen lokalisiert (A). Im BJ133(*kc2*) ist es in dünnen apikalen Streifen und zytoplasmatischen Aggregaten zu finden (B). Im BJ134(*kc3*) weist das IFB-2 Muster Unterbrechungen auf (Pfeile in C). Apikal ist links, Eichstriche sind 100 µm. Abb. Dr. Carberry

5.2.2 BJ133(*kc2*) und BJ134(*kc3*) tragen Mutationen im selben Gen: F42C5.10 (*ifo-1*)

Um die mutierten Gene in BJ133(*kc2*) und BJ134(*kc3*) zu finden, wurde von Dr. Carberry eine „SNP-Kartierung“ durchgeführt (Hüsken, 2008). Bei der „SNP-Kartierung“ werden Einzel-Nukleotid-Polymorphismen (single-nucleotide-polymorphism) zwischen dem *C. elegans* Bristol-Stamm (N2) und dem nah verwandten *C. elegans* Hawaii-Stamm (CB4856) ausgenutzt (Wicks et al., 2001). Nach Kreuzung der beiden Stämme, können die Polymorphismen als genetische Marker bei Restriktionsverdau benützt werden. Eine Mutation kann so zunächst auf ein bestimmtes Chromosom und in einem zweiten Schritt auf einen bestimmten Abschnitt des Chromosoms lokalisiert werden. Die Mutationen in den Stämmen BJ133(*kc2*) und BJ134(*kc3*) konnten so einem Bereich auf Chromosom IV zugeordnet werden, der 174 Gene umfasst. Da die Mutationen beider Stämme in demselben Abschnitt von Chromosom IV kartieren, wurde von Dr. Carberry ein Komplementationstest durchgeführt. Dieser zeigte, dass es sich bei BJ133(*kc2*) und BJ134(*kc3*) um zwei Allele desselben Gens handelt.

Um das mutierte Gen zu finden, wurde mit der Unterstützung von Florian Geisler, Harald Gerhardus und Daniel Überbach, ein RNAi Screen mit der RNAi „feeding library“ aus dem Labor von Dr. Ahringer durchgeführt (Kamath et al.; 2003). Gegen 124 der 174 in Frage kommenden Gene waren „feeding“ Klone in der Library vorhanden (siehe Anhang). Diese wurden im BJ49 Stamm, der ein *ifb-2::cfp* Transgen exprimiert, nacheinander ausgeschaltet. Die Tiere wurden als Embryonen auf die „feeding“ Platten gesetzt. Nach drei Tagen wurden sie am Mikroskop mit DIK-Optik und Fluoreszenz ausgewertet. Nach sechs Tagen wurde sowohl die erste, als auch die zweite Generation am Mikroskop ausgewertet. Dadurch konnten sowohl Tiere analysiert werden, die nur postembryonal mit RNAi behandelt wurden, als auch Tiere die bereits während der embryonalen Entwicklung der RNAi ausgesetzt waren. Falls RNAi gegen das gesuchte Gen zu embryonaler Letalität führt, können so Tiere ausgewertet werden, die während der Larvalentwicklung mit RNAi behandelt wurden. Durch RNAi gegen die vorhergesagte kodierende Sequenz F42C5.10 konnte der BJ133(*kc2*) Phänotyp reproduziert werden (Abb.32B). Sowohl bei embryonaler als auch postembryonaler RNAi kommt es zu einer Fehlverteilung von IFB-2::CFP im Darmepithel von *C. elegans*.

Um die Mutationen in BJ133(*kc2*) und BJ134(*kc3*) auf molekularer Ebene zu identifizieren, wurde die vorhergesagte kodierende Sequenz F42C5.10 in Zusammenarbeit mit Harald

Gerhardus sequenziert. Im BJ133(*kc2*) Stamm wurde ein Basenaustausch von C nach T an Position 79 gefunden. Dieser wandelt ein für Arginin kodierendes Kodon in ein Stop-Kodon um. In BJ134(*kc3*) wurde ein Basenaustausch von G nach A an Position 919 gefunden, der ersten Base im dritten Intron. Möglicherweise wird das Gen dadurch falsch gespleißt (Abb.32A). Daraus ist zu schließen, dass die Mutationen im Gen F42C5.10 für die Fehlverteilungen der IF in BJ133(*kc2*) und BJ134(*kc3*) verantwortlich sind. Das Gen wurde *ifo-1* (Intermediate filament organizer) genannt.

Von Dr. Carberry wurde ein Rettungs-Experiment in BJ133(*kc2*) mit der WT Kopie des *ifo-1* Gens durchgeführt (Abb.32C). Dazu wurde zunächst ein *ifo-1::yfp* Fusionsgen hergestellt und in *ifo-1(kc2)* injiziert. Die 1256 Bp große Promoterregion strangaufwärts des Start-Kodons des *ifo-1*-Genlokus wurde zusammen mit der 3897 Bp großen *ifo-1* cDNA in einen *yfp*-tragenden Expressionsvektor (pVH10.10, Hutter, 2003) kloniert (Hüsken, 2008). Immunfluoreszenzaufnahmen der transgenen Würmer zeigen, dass IFB-2 an der apikalen Membran lokalisiert. Der *ifo-1* Phänotyp kann also mit dem IFO-1::YFP Konstrukt gerettet werden, was zeigt, dass das IFO-1::YFP Konstrukt funktionell ist.

Mit Hilfe der *C. elegans* Datenbank wormbase (www.wormbase.org) konnten folgende Informationen über den genetischen Locus *ifo-1* gewonnen werden: *ifo-1* liegt auf Chromosom IV: 3,32 cM, zwischen den Basen 7328647 und 7320721 und ist bisher nicht charakterisiert. Nicht gespleißt ist es 5927 Bp lang und besteht aus 13 Exons (Abb.32A). Die cDNA ist 3879 Bp lang und wird in ein 1292 Aminosäure langes Protein translatiert, welches eine molekulare Masse von 148,4 kDA besitzt.

Die Datenbank Ace-View sagt eine alternative Spleißvariante für *ifo-1* voraus (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/IEB/Research/Acembly/>). Sie ist 235 AS lang, beginnt an AS Position 918 und reicht bis 1152 (unterstrichen in Abb.32A'). Der genomische Bereich umfasst 850 Bp und beinhaltet 4 Exone.

Folgende Datenbankanalysen mit der Aminosäuresequenz von IFO-1 wurden von Dr. Carberry durchgeführt. Um IFO-1 Homologe in anderen Organismen zu finden, wurden BLAST-Analysen mit verschiedenen Datenbanken durchgeführt (Swiss-Prot auf (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>; <http://ExpASy.org>). Orthologe konnten in den nah verwandten Nematoden *Caenorhabditis briggsae* und *Caenorhabditis japonica* gefunden werden. In anderen Organismen konnten keine Orthologen oder konservierte Proteindomänen gefunden werden. In Wormbase (www.wormbase.org) konnten, mit Hilfe der Datenbank INTERPRO, jedoch zwei konservierte Motive identifiziert werden.

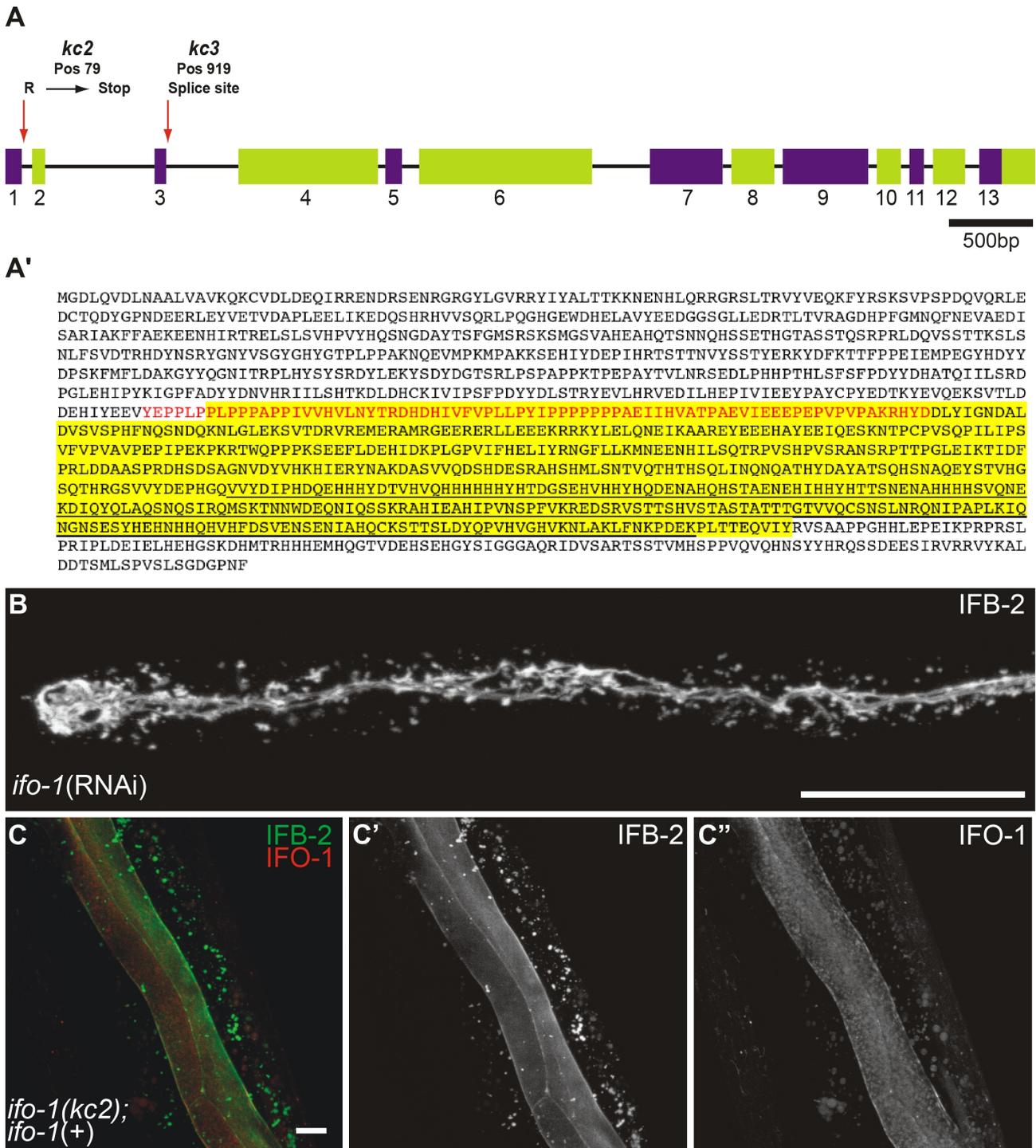


Abb. 32: Das mutierte Gen in BJ133(*kc2*) und BJ134(*kc3*) ist F42C5.10 (*ifo-1*)

(A) zeigt das Intron-Exon Modell von *ifo-1* und die Positionen der Mutationen in BJ133(*kc2*) und BJ134(*kc3*). In (A') ist die Aminosäuresequenz von IFO-1 dargestellt. Eine Prolin-reiche Region ist rot markiert, eine vorhergesagte FH2-Domäne ist gelb hervorgehoben und eine vorhergesagte alternative Spleiß Variante ist unterstrichen. Fluoreszenzaufnahmen von BJ49*ifo-1*RNAi Würmern zeigen den Phänotyp von BJ133(*kc2*) (B). Immunfluoreszenzaufnahmen von IFB-2 (grün) und IFO-1 (rot) zeigen, dass mit dem wildtypischen *ifo-1* Gen der Phänotyp von BJ133(*kc2*) gerettet werden kann (C). Anterior ist links in (B), Eichstriche sind 100 µm in (B), 10 µm in (C). Abb. (A, B, C-C'') Dr. Carberry

Eine Prolin-reiche Region, die 74 Aminosäuren lang ist und 23 Proline enthält (rot markiert in Abb.32A'). Der Prolin Anteil in diesem Abschnitt liegt bei 23% im Gegensatz zu 7,7% Prolin-Gehalt in der Gesamtsequenz. Die Prolin-reiche Region ist Teil einer Aktin-bindenden FH2 („formin-homology“)-Domäne (gelb unterlegt in Abb.32A'). FH2 Proteine sind wichtig für die Reorganisation des Aktinzytoskeletts (Shimada et al., 2004; Wallar und Alberts, 2003). Weiterhin weist F42C5.10 einen hohen Histidin Gehalt von 8,2% auf, im Gegensatz zu durchschnittlich 2,3% bei anderen Proteinen (Doolittle, 1989). Auch bei dem Protein Filaggrin, was an der Bildung von Keratinfilamentbündeln und -aggregaten beteiligt ist, ist ein hoher Histidin Gehalt zu finden (Listwan and Rothnagel, 2004; Steinert et al., 1981).

In einer genomweiten Interaktionsstudie mit der Protein-Interaktionsdatenbank STRING (<http://string.embl.de>) wurden zwei mögliche Interaktionspartner von IFO-1 aufgezeigt, die durch Yeast-Two-Hybrid Versuche identifiziert wurden: Die E2-E3 Ubiquitinligase SEL-10 und die MAP-Kinase MPK-1 (Li et al., 2004; Walhout et al., 2000).

In einem Hydrophobizitätstest nach Kyte und Doolittle mit der Datenbank Swiss-Prot konnten keine hydrophoben Domänen in der Aminosäuresequenz von IFO-1 ausgemacht werden. Dies legt den Schluss nahe, dass IFO-1 keine Transmembrandomäne besitzt und wahrscheinlich ein zytoplasmatisches Protein ist.

5.2.3 IFO-1 wird exklusiv in den Darmzellen exprimiert und lokalisiert apikal

Um die IFO-1 Lokalisation zu bestimmen, wurde das *ifo-1::cfp* Fusionsgen von Dr. Carberry in den WT Stamm injiziert (BJ155). Anschließend wurde die Lokalisation von IFO-1 in *in vivo* Aufnahmen von adulten Würmern und durch Immunfluoreszenzaufnahmen von Embryonen dokumentiert.

Im adulten Wurm wird IFO-1::CFP exklusiv in den Darmzellen exprimiert und lokalisiert an der apikalen Membran (Abb.33A,B). Die IFO-1 Expression beginnt kurz vor der Morphogenese während der epithelialen Polarisierung der Darmzellen. In diesem Stadium akkumulieren erstmalig apikale Proteine und Proteine der CeAJ an der zukünftigen apikalen Membrandomäne (Leung et al., 1999). Auch IFO-1 ist in diesem Stadium an der apikalen Membran, zusammen mit IFB-2, nachzuweisen. Die beiden Proteine kolokalisieren allerdings nicht, da das rote und grüne Signal voneinander zu unterscheiden sind (Abb.33C). Im 1,5-fach elongierten Stadium akkumuliert IFO-1, ähnlich wie IFB-2,

deutlich an der apikalen Membran der Darmzellen. Es ist zusätzlich am gesamten Kortex der Darmzellen detektierbar, im Gegensatz zu IFB-2, das auch noch im Zytoplasma lokalisiert (Abb.33D). Im 3-fach elongierten Stadium sind sowohl IFO-1 als auch IFB-2 fast nur noch apikal nachweisbar (Abb.33E).

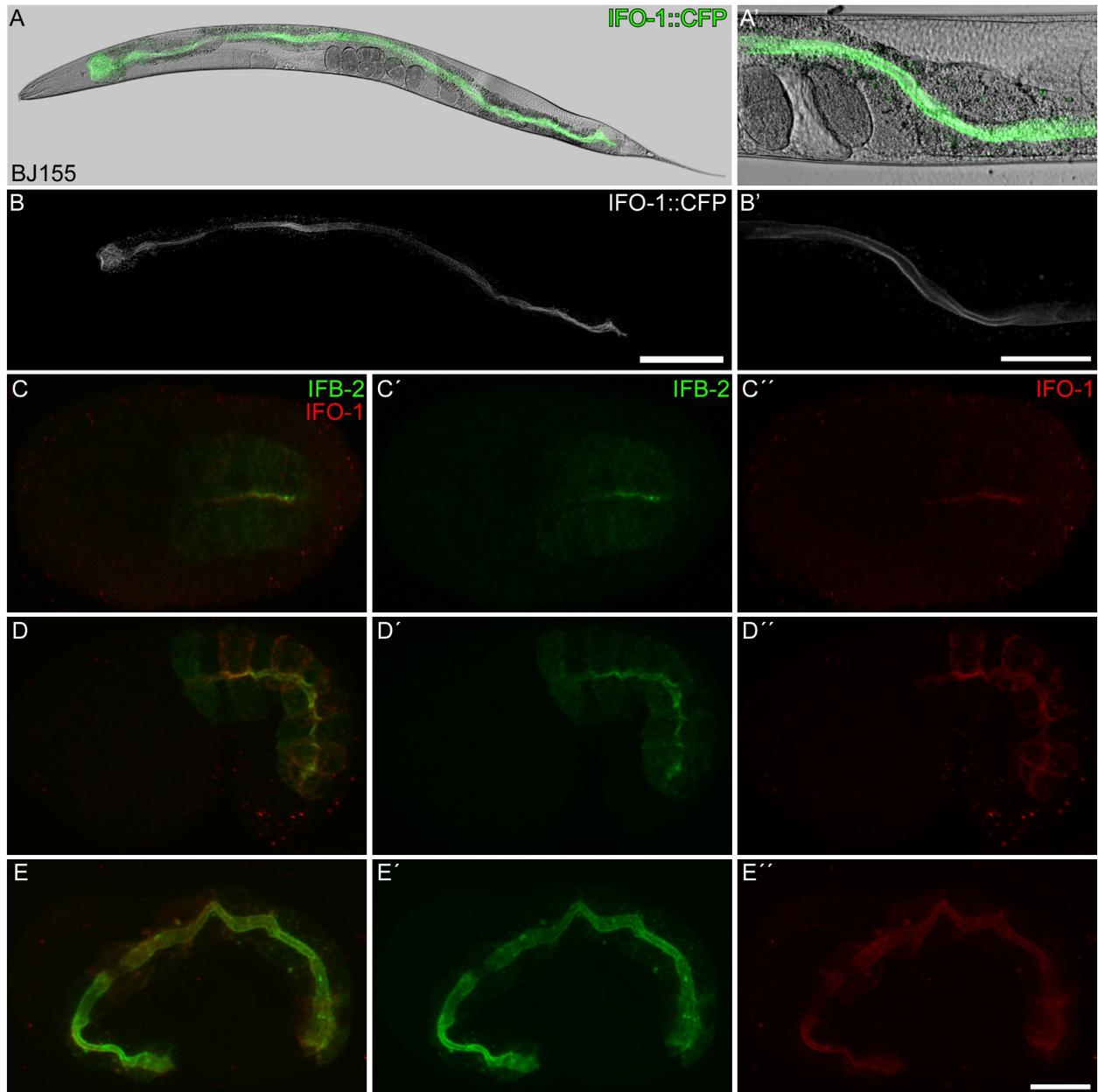


Abb. 33: IFO-1 lokalisiert an der apikalen Membran der Darmzellen

DIK und Fluoreszenz Aufnahmen von adulten BJ155 Würmern zeigen die apikale Lokalisation von IFO-1::CFP (grün) im Darm (A, B). Immunfluoreszenz Aufnahmen von Embryonen gegen IFB-2 (grün) und IFO-1 (rot). Während der zytoplasmatischen Polarisierung akkumuliert IFO-1 an der apikalen Membran mit IFB-2. Die Proteine kolokalisieren aber nicht (C). Im 1,5-fach elongierten Stadium akkumulieren beide Proteine immer mehr an der apikalen Membran, IFB-2 ist zusätzlich im Zytoplasma lokalisiert, während IFO-1 an der lateralen Membran detektierbar ist (D). Im 3-fach elongierten Stadium sind beide Proteine fast ausschließlich apikal lokalisiert (E). Anterior ist links, Eichstriche sind 100 µm in (B), 50 µm in (B'), 10 µm in (E''). Abb. (A-B') Dr. Carberry

Es konnte gezeigt werden, dass das basolateral lokalisierte LET-413 für die Aufrechterhaltung der Polarität in Epithelzellen verantwortlich ist (siehe 1.3, 2.3; Labouesse, 2006). Alle bisher geprüften apikalen und CeAJ Proteine breiten sich nach *let-413* RNAi entlang der basolateralen Membran aus. Außerdem ist *let-413* wichtig für die zeitlich korrekte Lokalisation des DAC während der epithelialen Polarisierung (Segbert et al., 2004). Um zu prüfen, ob die apikale Lokalisation von IFO-1 auch von LET-413 abhängt, wurde *let-413* RNAi im BJ155 Stamm durchgeführt. In Abb.34A ist ein Embryo kurz nach der Polarisierung zu sehen, IFB-2 und IFO-1 sind zu diesem Zeitpunkt wie im WT lokalisiert (vergleiche mit Abb.33C). Während der frühen Morphogenese breiten sich dann aber die apikalen Proteine IFB-2 und IFO-1 entlang der lateralen Membran aus (Abb.34B). Bei der stärksten Ausprägung des Phänotyps ist gut zu erkennen, dass IFO-1 entlang des gesamten Kortex der Darmzellen verteilt ist (Abb.34C). Dies zeigt, dass auch die IFO-1 Lokalisation von LET-413 abhängig ist.

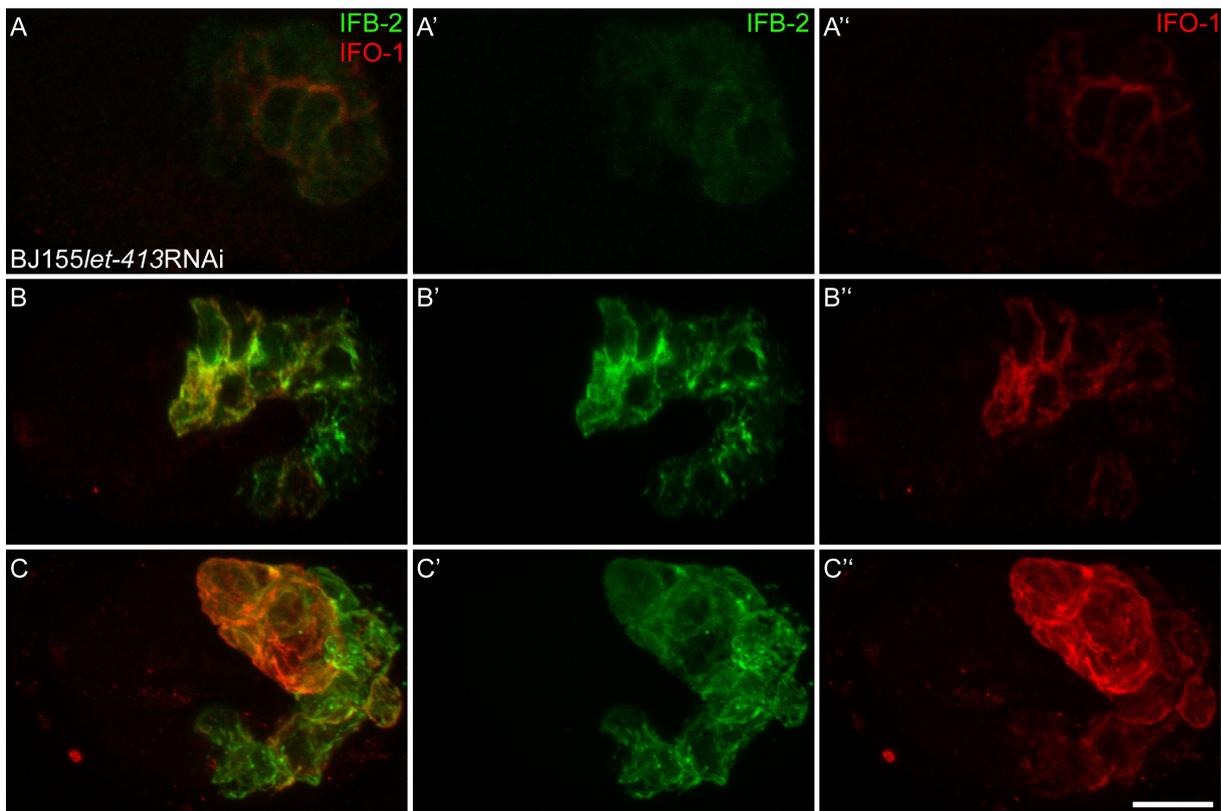


Abb. 34: Nach *let-413* RNAi breitet sich IFO-1 an der gesamten basolateralen Membran aus

Immunfluoreszenzaufnahmen von BJ155/*let-413*RNAi Embryonen gefärbt gegen IFO-1 (grün) und IFB-2 (rot). Zu Beginn der Morphogenese lassen sich keine Defekte in der Proteinverteilung erkennen, beide Proteine akkumulieren an der apikalen Membran der Darmzellen (A, vergleiche mit Abb.27). Im 1,5-fach elongierten Stadium breiten sie sich dann entlang des basolateralen Kortex aus (B). In einem terminalen Stadium haben sich beide Proteine entlang des gesamten Kortex verteilt (C). Anterior ist links, dorsal oben, Eichstrich ist 10 µm.

5.2.4 In den *ifo-1* Mutanten lokalisiert IFB-2 nicht in der Endotube, sondern an den Kontaktstrukturen der Darmzellen

Um herauszufinden, ab wann die IFO-1 Funktion für die Lokalisation der IF benötigt wird, wurde die Fehlverteilung der IF in *ifo-1(kc2)* und *ifo-1(kc3)* dokumentiert. Dazu wurden Immunfluoreszenzfärbungen an *ifo-1(kc2)* und *ifo-1(kc3)* Embryonen und an präparierten Därfen adulter Würmer durchgeführt. Neben IFB-2 wurde das CeAJ Protein DLG-1 angefärbt. Da *ifo-1(kc3)* einen schwächeren Phänotyp zeigt als *ifo-1(kc2)*, wird er hier zuerst beschrieben. Alle weiteren Experimente, mit Ausnahme der Abb.39B,E, wurden dann mit dem stärkeren Allel *kc2* durchgeführt.

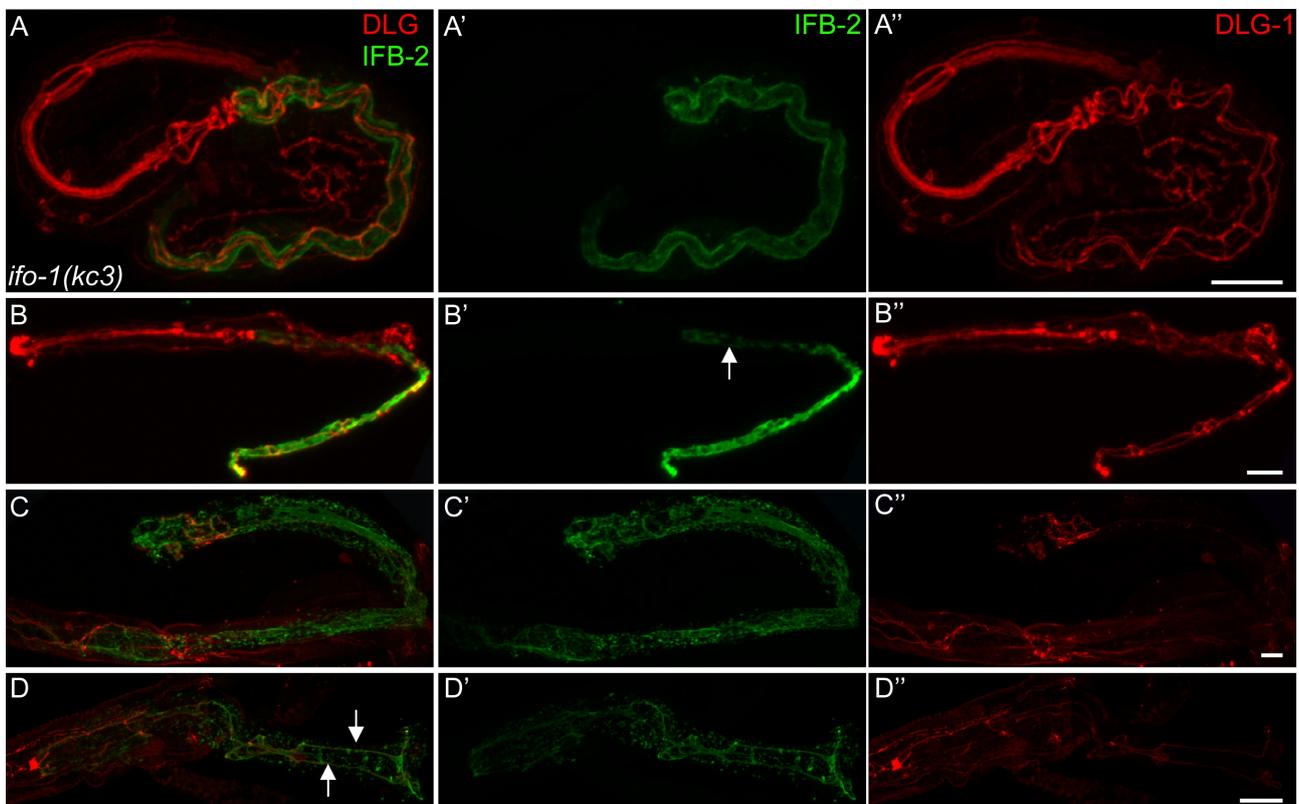


Abb. 35: In BJ134 entwickelt sich der Phänotyp erst nach der Embryogenese und wird mit dem Alter des Wurms immer stärker

Immunfluoreszenz Aufnahmen an *ifo-1(kc3)* Embryonen (A), Larven (B), präparierten adulten Därfen (C, D) gegen IFB-2 (grün) und DLG-1 (rot). Im Embryo weist das IFB-2 Muster noch keine Defekte auf (A). Im L1-Larvenstadium sind kleine Unterbrechungen im IFB-2 Muster zu erkennen (Pfeil in B). Im adulten Wurm entwickeln sich mehr Unterbrechungen, die an Größe zunehmen (C). IFB-2 scheint sich immer weiter von der apikalen Membran zu lösen und die zytoplasmatischen Aggregate nehmen zu, bis der Phänotyp dem von *ifo-1(kc2)* ähnelt (D). Anterior ist links, dorsal ist oben in (A), Eichstriche sind 10 μm .

In *ifo-1(kc3)* wird IFB-2 im Embryo zunächst korrekt an der apikalen Membran der Darmzellen lokalisiert (Abb.35A). Erste Anzeichen der Fehlverteilung von IFB-2 lassen sich im L1-Larvenstadium erkennen. Es sind Bereiche an der apikalen Membran zu erkennen, an denen keine IFB-2 Färbung zu sehen ist (Pfeil in Abb.35B'). Aufnahmen von präparierten Därfen adulter Würmer zeigen, dass diese Unterbrechungen im IFB-2 Muster während der weiteren Entwicklung größer werden und an Zahl zunehmen. Gleichzeitig werden auch mehr zytoplasmatische IFB-2 Aggregate sichtbar (Abb.35C). In besonders stark betroffenen Regionen scheint fast gar kein IFB-2 mehr in der Endotube zu lokalisieren (Abb.35D). Nur noch entlang der DLG-1 Färbung ist eine kontinuierliche apikale IFB-2 Lokalisation zu erkennen (durch Pfeile markiert in Abb.35D). Daraus ist zu schließen, dass IFB-2 entlang der CeAJ akkumuliert. Die IFB-2 Lokalisation entlang der CeAJ persistierte in allen untersuchten adulten *ifo-1(kc3)* Wurmern (n>50).

In *ifo-1(kc2)* zeigt IFB-2 auch im Embryo schon ein gestörtes Lokalisationsmuster (Abb.36A,B). IFB-2 ist im 1,5-fach elongierten Stadium diffus im Zytoplasma lokalisiert, aber nicht an der kompletten apikalen Membran, stattdessen zeigt es ein stark fragmentiertes Muster (Abb.36A,A'). Im 2,5-fach elongierten Stadium ist deutlich zu erkennen, dass IFB-2 mit DLG-1 an den CeAJ kolokalisiert. Weiterhin ist IFB-2 auch in zytoplasmatischen Aggregaten vorhanden, die im WT nicht zu beobachten sind (Abb.36B-B'', vergleiche mit Abb.25,33). Dieses Muster ist auch in den Därfen larvaler und adulter Würmer zu finden, wobei die zytoplasmatischen Aggregate im Darm adulter Würmer stark an Größe und Anzahl zunehmen (Abb.36C-D''). In Abb.36D ist zu erkennen, dass IFB-2, welches mit der CeAJ assoziiert ist, nicht mit DLG-1 kolokalisiert, da die rote und grüne Färbung noch unterschieden werden kann. In *ifo-1(kc2)* Wurmern akkumuliert IFB-2 also nicht wie im WT an der apikalen Membrandomäne, sondern lediglich entlang der CeAJ und in zytoplasmatischen Aggregaten.

Aus diesen Beobachtungen und aufgrund der Tatsache, dass in *ifo-1(kc2)* wahrscheinlich kein funktionsfähiges IFO-1 Protein synthetisiert wird (siehe 5.2.2), ist zu schließen, dass IFO-1 schon während der Embryogenese für die korrekte Lokalisation von IFB-2 verantwortlich ist. In *ifo-1(kc3)* dagegen, scheint IFO-1 teilweise funktionsfähig zu sein, da hier eine IFB-2 Fehllokalisierung erst ab dem L1-Larvenstadium zu beobachten ist.

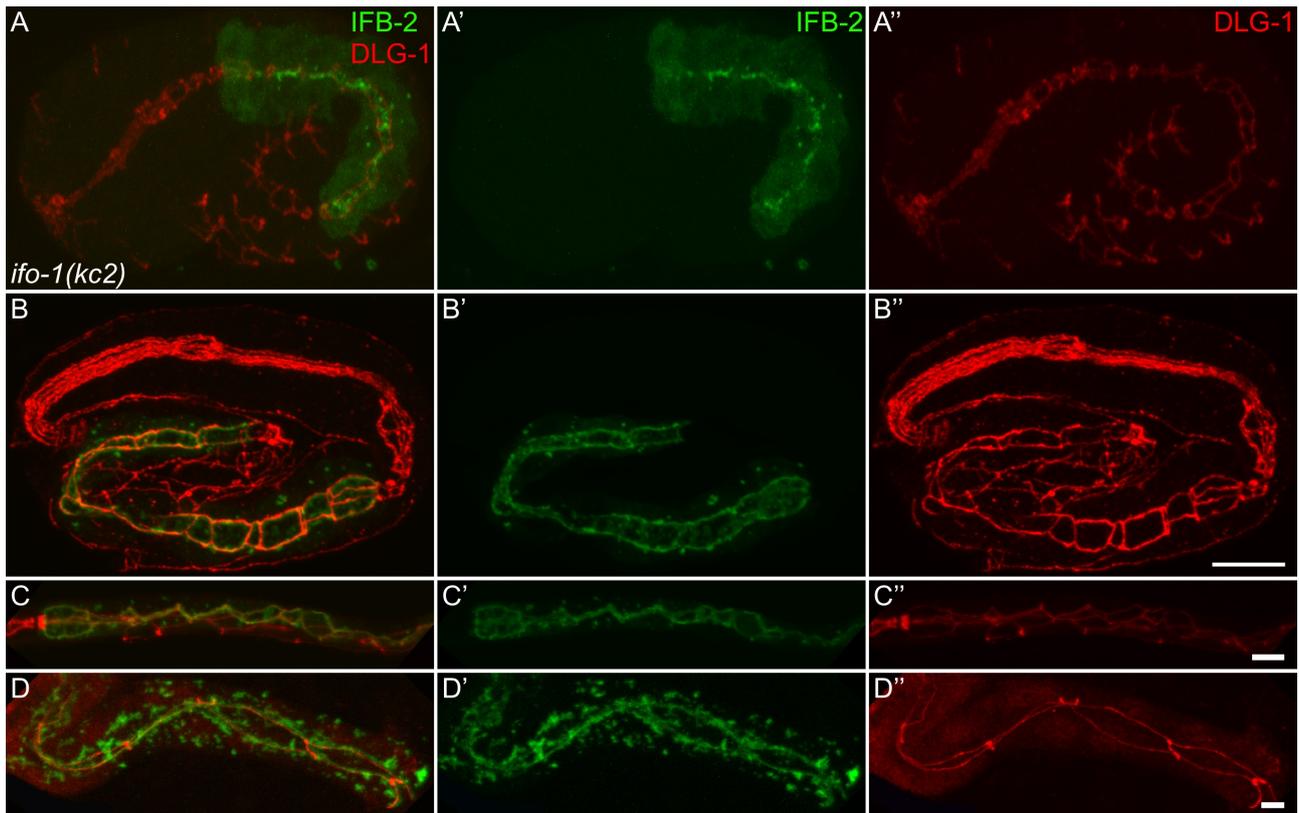


Abb. 36: In *ifo-1(kc2)* lokalisiert IFB-2 bereits im Embryo nur an den Kontaktstrukturen der Enterozyten

Immunfluoreszenz Aufnahmen an *ifo-1(kc2)* Embryonen (A, B), Larven (C), präparierten adulten Därmen (D) gegen IFB-2 (grün) und DLG-1 (rot). Im 1,5-fach elongierten Stadium ist IFB-2 im Zytoplasma nachweisbar und akkumuliert in einem diskontinuierlichen Muster an der apikalen Membran (A). Im 3-fach elongierten Stadium ist es an der CeAJ lokalisiert (B). Dieses Muster zeigt es auch in der Larve (C) und dem adulten Wurm (D). Die zytoplasmatischen IFB-2 Aggregate nehmen während der Entwicklung an Zahl und Größe zu. Das DLG-1 Muster weist keine Defekte auf (A-D). Anterior ist links, dorsal oben in (A, B), Eichstriche sind 10 μm .

Bisher wurde nur die Verteilung von IFB-2 in *ifo-1(kc2)* überprüft. Im Darm von *C. elegans* werden aber insgesamt sechs IF exprimiert, die alle apikal lokalisieren (Carberry et al., 2009). Daher wurde als nächstes die Lokalisation von IFC-2 überprüft. Es konnte bereits gezeigt werden, dass IFC-2 mit IFB-2 an der apikalen Membrandomäne kolokalisiert (siehe Abb.25; Hüsken et al., 2008). Es wurden Immunfluoreszenzaufnahmen von präparierten Därmen adulter *ifo-1(kc2)* Würmer angefertigt, die gegen IFB-2 und IFC-2 gefärbt wurden. Abb.37 zeigt, dass IFC-2 die gleiche Fehlverteilung in *ifo-1(kc2)* aufweist wie IFB-2. Es ist ebenfalls in der CeAJ und in zytoplasmatischen Aggregaten zu finden und zeigt eine komplette Kolokalisation mit IFB-2 (Abb.37A). Daraus ist zu schließen, dass IFO-1 nicht nur für die korrekte Lokalisation von IFB-2 verantwortlich ist, sondern auch IFC-2 positioniert.

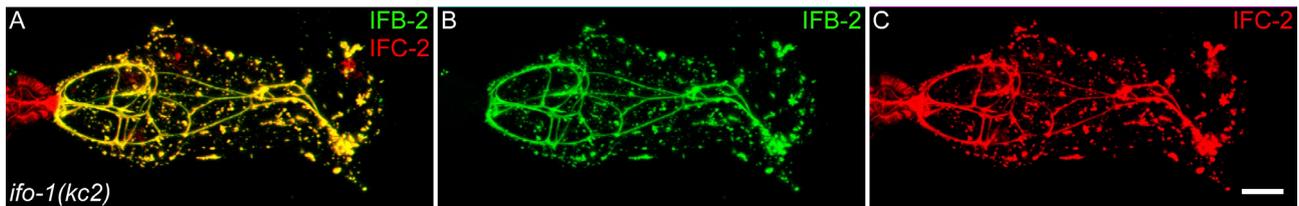


Abb. 37: IFC-2 ist in *ifo-1(kc2)* ebenfalls in den Kontaktstrukturen und in zytoplasmatischen Aggregaten im Darm lokalisiert

Immunfluoreszenz Aufnahmen von IFB-2 (B, grün) und IFC-2 (C, rot) an einem präpariertem Darm eines adulten Wurms. Beide Proteine kolokalisieren an der CeAJ und in zytoplasmatischen Aggregaten. Anterior ist links, Eichstrich ist 10 μm . Abb. Dr. Carberry

5.2.5 Die IFB-2 Fehlverteilung in *ifo-1(kc2)* ist unabhängig von bisher identifizierten Proteinen der interzellulären Kontaktstrukturen in *C. elegans*

Im WT kolokalisieren IFB-2 und IFC-2 an der apikalen Membrandomäne und in der CeAJ (Abb.25, Hüsken et al., 2008). In *ifo-1(kc2)* akkumulieren IFB-2 und IFC-2 apikal an der CeAJ (Abb.37). Daraus ist zu schließen, dass IFO-1 für die Lokalisation von IFB-2 und IFC-2 an der apikalen Membrandomäne verantwortlich ist, nicht aber für die in der CeAJ.

Um zu untersuchen, welches Protein für diese Akkumulation verantwortlich ist, wurden bekannte CeAJ Proteine über RNAi in *ifo-1(kc2)* herunterreguliert und die Lokalisation von IFB-2 dokumentiert. Die CeAJ kann auf Immunfluoreszenzebene in einen apikalen und basalen Bereich unterteilt werden. Apikal lokalisiert das Protein CRB-1 (Segbert et al., 2004) und der Cadherin-Catenin-Komplex (CCK: HMR-1, HMP-1, HMP-2; (Costa et al., 1998), basal befindet sich der DLG-1-AJM-1-Komplex (DAK; Knust und Bossinger, 2002; siehe Einleitung 1.4). Von jedem Komplex sollte zunächst mindestens ein Protein herunterreguliert werden, bevor dann alle Komplexe gleichzeitig herunterreguliert werden. Dafür wurde RNAi gegen *crb-1*, *hmr-1*, *hmp-1* und *dlg-1* einzeln, oder in Kombination in der *ifo-1(kc2)* Mutante durchgeführt (s. Tabelle 3). Daraufhin wurde die Lokalisation des IFB-2::CFPs *in vivo* überprüft. In jedem RNAi Experiment war IFB-2 noch in der CeAJ nachzuweisen (Abb.38A-C), was darauf hinweist, dass keines der untersuchten Gene verantwortlich ist, um IFB-2 an der CeAJ zu akkumulieren.

Ob die RNAi Experimente erfolgreich waren, wurde an der embryonalen Letalität überprüft, die, ausgenommen nach *crb-1* RNAi, auch in allen Fällen beobachtet werden konnte. Es kann allerdings nicht ausgeschlossen werden, dass die Gene nicht stark genug herunterreguliert wurden, um eine Lokalisation von IFB-2 an der CeAJ zu verhindern.

Ergebnisse II

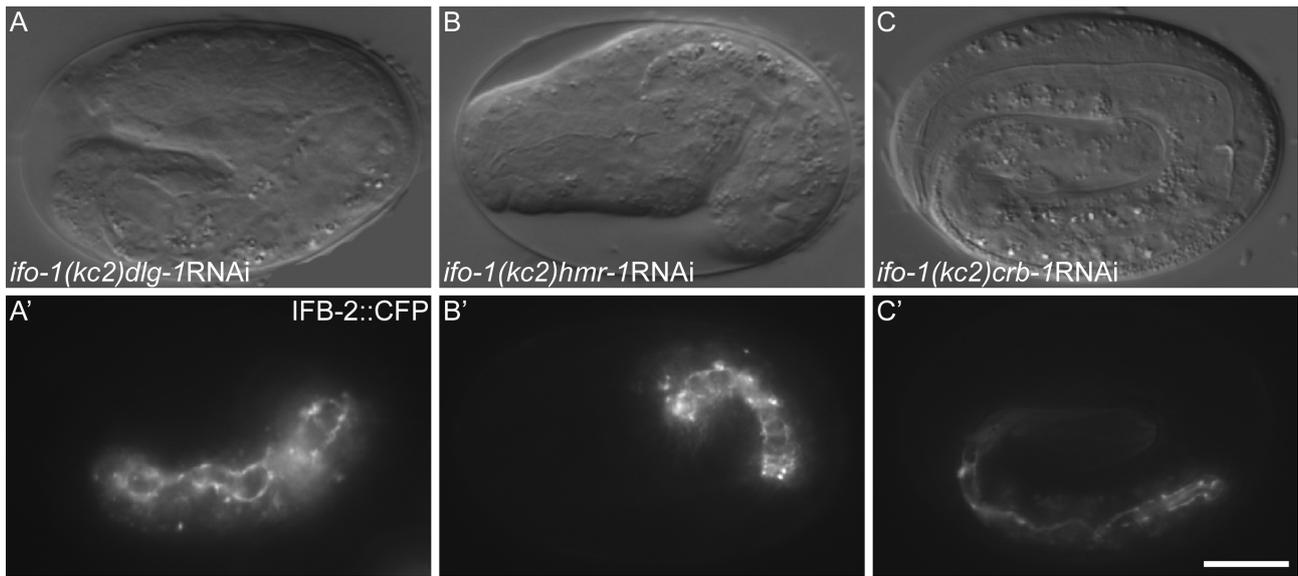


Abb. 38: Auch nach RNAi gegen CeAJ Proteine bleibt IFB-2 an den Kontaktstrukturen lokalisiert

DIK (A-C) und Fluoreszenz Aufnahmen (A'-C') von verschiedenen *ifo-1(kc2)* Embryonen behandelt mit RNAi gegen *dlg-1* (A), *hmr-1* (B) und *crb-1* (C). IFB-2::CFP ist trotz RNAi gegen CeAJ Komponenten an den Kontaktstrukturen akkumuliert. Anterior ist links, dorsal oben, Eichstrich ist 10 μ m.

Gen	RNAi-Phänotyp im WT	IFB-2 Lokalisation in <i>ifo-1(kc2)</i>	Referenz
<i>crb-1</i>	-	CeAJ	Bossinger et al., 2001 Segbert et al., 2004
<i>hmr-1</i>	Elongationsdefekte	CeAJ	Costa et al., 1998
<i>hmp-1</i>	Elongationsdefekte	CeAJ	Costa et al., 1998
<i>dlg-1</i>	Elongationsdefekte, AJM-1 Lokalisation gestört	CeAJ	Bossinger et al., 2001, McMahon et al., 2001, Köppen et al., 2001 (Firestein and Rongo, 2001)
<i>crb-1, hmp-1</i>	siehe <i>hmp-1</i>	CeAJ	-
<i>crb-1, dlg-1</i>	siehe <i>dlg-1</i>	CeAJ	-
<i>hmp-1, dlg-1</i>	Adhäsionsverlust der Darmzellen	CeAJ	Segbert et al., 2004
<i>crb-1, hmp-1, dlg-1</i>	siehe <i>hmp-1, dlg-1</i>	CeAJ	-

Tabelle 3: CeAJ Gene wurden in *ifo-1(kc2)* herunterreguliert, um herauszufinden welches Protein für die CeAJ Lokalisation von IFB-2 und IFC-2 verantwortlich sein könnte

5.2.6 Elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigen strukturelle Defekte der apikalen Membrandomäne in *ifo-1(kc2, kc3)* Mutanten

Auf EM Ebene konnte im WT gezeigt werden, dass IFB-2 in der Endotube und der CeAJ lokalisiert (Bossinger et al., 2004). Da IFB-2 und IFC-2 auf Immunfluoreszenzebene kolokalisieren (Abb.25), ist es wahrscheinlich, dass IFC-2 ebenfalls in der Endotube und der CeAJ lokalisiert. Um herauszufinden, wie stark sich die Fehlverteilung der IF auf die Struktur der apikalen Membrandomäne und der CeAJ auswirkt, sollte der *ifo-1* Phänotyp mit DIK-Optik und EM Aufnahmen (Dr. Carberry) näher analysiert werden.

In den DIK Bildern ist zu erkennen, dass das Darmlumen der *ifo-1(kc2, kc3)* Würmer sehr unregelmäßig geformt ist und starke Weitungen und Verengungen zeigt, ähnlich dem *ifc-2* RNAi Phänotyp (Abb.39A-C). Die Formveränderung ist auch in den EM Bildern von *ifo-1(kc2, kc3)* Würmern gut zu erkennen. Das Darmlumen weist nicht die typische ellipsoide Form des WT auf (Abb.27E), sondern ist verzweigt und gleicht dem der *ifc-2* RNAi Würmer (vergleiche Abb.27F und Abb.39D). Im Gegensatz zu WT und *ifc-2* RNAi Würmern ist in Därmen von *ifo-1(kc2, kc3)* keine elektronendichte Endotube unter dem Mikrovillisaum sichtbar (schwarze Pfeile in Abb.39D,E). Stattdessen ist eine dunkle elektronendichte „Wolke“ um die CeAJ zu erkennen (weiße Pfeile in Abb.39D, weiß umrandete Region in Abb.39E). Hierbei könnte es sich um eine Akkumulation von IF handeln, die auch in Immunfluoreszenzaufnahmen beobachtet werden kann (Abb.36,37). Um dies zu bestätigen, könnte eine Immunogoldfärbung gegen IFB-2 an EM Präparaten durchgeführt werden (Bossinger et al., 2004). Es wird postuliert, dass die Endotube der apikalen Membran strukturelle Stabilität verleiht (McGhee, 2007). Konsistent mit dieser vermuteten Funktion, zeigt das Darmlumen, bei Abwesenheit der Endotube, eine verzweigte Form (Abb.39D) und die apikale Membran scheint wellenförmig, anstatt geradlinig wie im WT, zu verlaufen (vergleiche Abb.28B,D mit Abb.39E). Weiterhin wird vermutet, dass die Endotube als Anker für die AF der Mikrovilli dienen könnte (McGhee, 2007). In *ifo-1(kc2, kc3)* Würmern zeigen die Mikrovilli auch in Abwesenheit der elektronendichten Struktur allerdings keine Defekte auf. Sie erscheinen in Länge und Abstand zueinander wildtypisch (Abb.39D,E), was darauf hinweist, dass die Endotube anscheinend nicht notwendig ist für die korrekte Bildung der Mikrovilli.

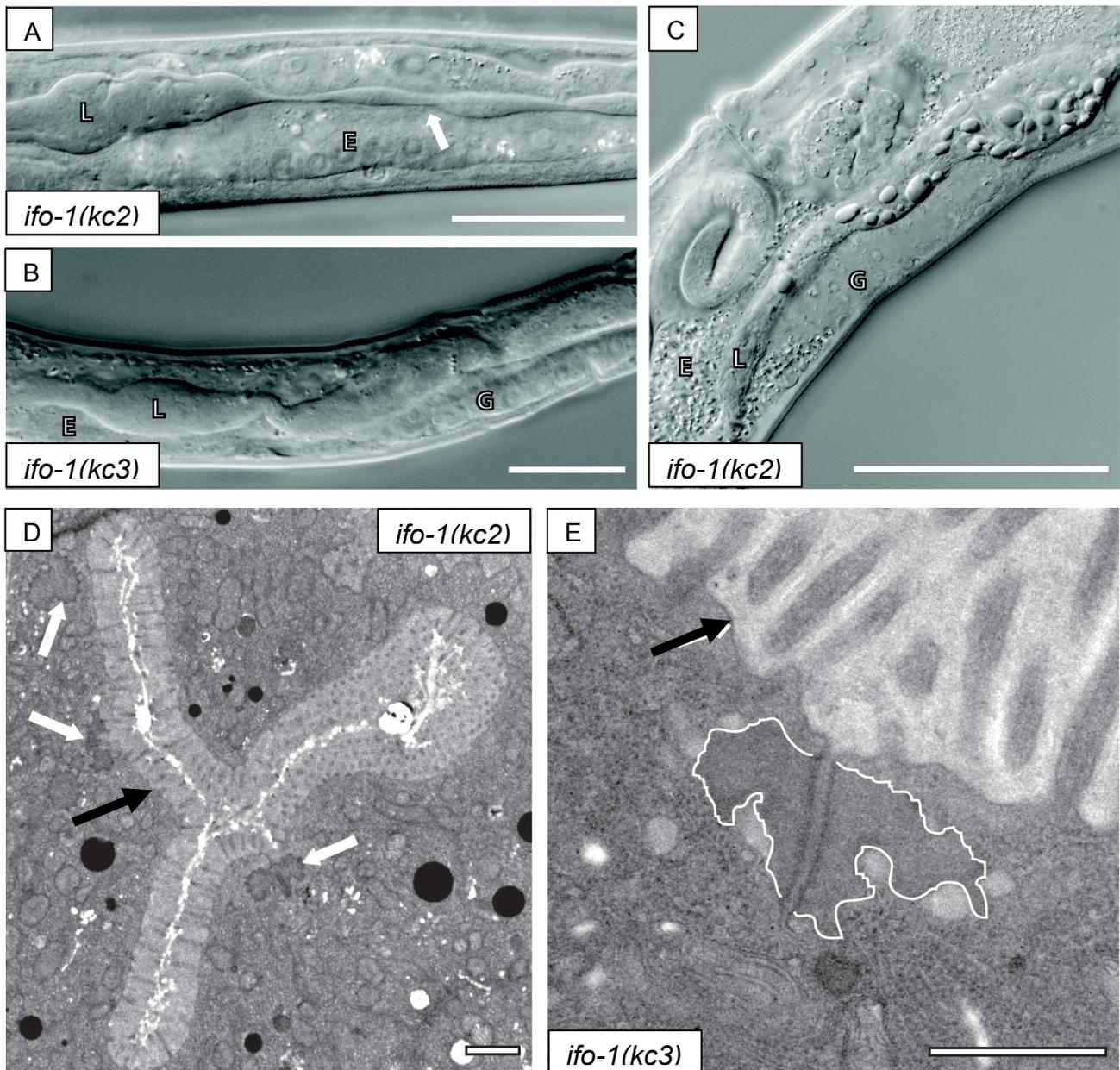


Abb. 39: DIC und EM Aufnahmen zeigen eine strukturell geschwächte Endotube und elektronendichte „Wolken“ um die CeAJ

DIC (A-C) und EM Aufnahmen (D, E) adulter *ifo-1(kc2)* (A, C, D) und *ifo-1(kc3)* (B, E) Würmer. Das Darmlumen weist eine sehr unregelmäßige Form auf. Es sind starke Verengungen und Verbreiterungen zu erkennen (A-C). Die EM Aufnahmen zeigen ein verzweigtes Lumen (D) und elektronendichte „Wolken“ (Pfeile in D, weißumrandete Struktur in E) um die CeAJ. Außerdem fehlt die elektronendichte Struktur der Endotube (Pfeil in D, E). L= Lumen, G= Gonade, E= Enterozyt. Anterior ist links in A-C, Eichstriche sind 100 μ m in A-C, 1 μ m in (D), 500 nm in (E). Abb. (D, E): Dr. Carberry

Für die CeAJ wird eine Funktion als parazelluläre Diffusionsbarriere postuliert (siehe 6.1.5; Köppen et al., 2001; Labouesse, 2006). Da in EM Aufnahmen eine abnormale elektronendichte Anreicherung um die CeAJ zu erkennen ist, sollte geklärt werden, ob die mögliche Barrierenfunktion der CeAJ noch erhalten ist (Lynch and Hardin, 2009). Um dies

zu überprüfen, wurden *ifo-1(kc2)* Würmer mit TRITC-markiertem, Membran-impermeablem Dextran (MW: 40000) gefüttert und mit dem Fluoreszenzmikroskop analysiert (Dr. Carberry). Die Aufnahmen zeigen, dass sich das Dextran im Darmlumen befindet und nicht in die Zellzwischenräume oder ins Zellinnere eingedrungen ist (Abb.40). Die Barrierenfunktion des Epithels scheint also vorhanden und die Integrität der Darmzellen gewährleistet zu sein (vergleiche auch mit Abb.29A).

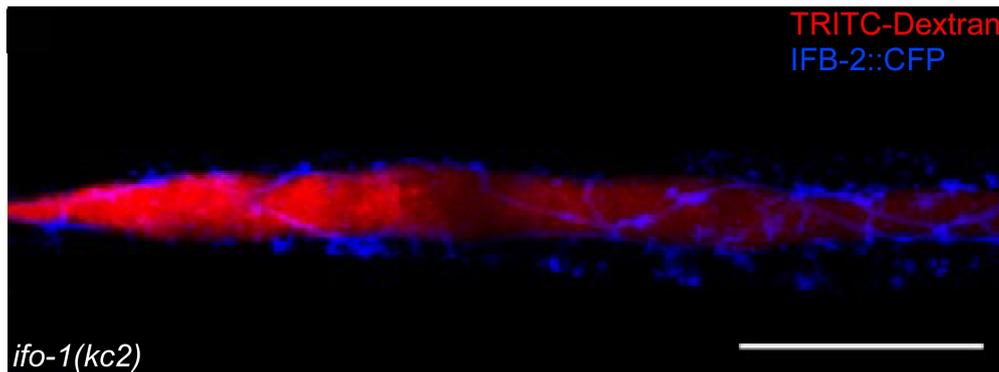


Abb. 40: Die Barrierenfunktion des Darmepithels bleibt in *ifo-1(kc2)* Würmern erhalten

Fluoreszenz Aufnahme eines adulten *ifo-1(kc2)* Wurms, der mit TRITC-Dextran gefüttert wurde. Das Dextran befindet sich ausschließlich im Darmlumen. Anterior ist links, Eichstrich ist 50 µm. Abb. Dr. Carberry

5.2.7 Die Phalloidinfärbung im Darm der *ifo-1(kc2)* Mutante ist stark geschwächt

Immunfluoreszenz- und EM-Aufnahmen der *ifo-1(kc2)* Mutante haben gezeigt, dass IFB-2 und IFC-2 nicht an der kompletten apikalen Membrandomäne lokalisiert sind und die elektronendichte Struktur der Endotube nicht nachweisbar ist. Neben IF sind auch AF ein Bestandteil des „terminal web“ (Khurana et al., 2008). So zeigt eine Phalloidinfärbung im WT eine apikale Akkumulation in den Darmzellen. Das *C. elegans* Genom beinhaltet fünf Aktिंगene (*act-1–act-5*), wobei bisher nur für *act-5* gezeigt werden konnte, dass es spezifisch im Darm exprimiert wird. Dort lokalisiert es allerdings nicht in der Endotube, sondern ausschließlich in den Mikrovilli (MacQueen et al., 2005). Dies legt den Schluss nahe, dass andere Aktिंगene im Darm exprimiert werden, welche im „terminal web“ lokalisieren. Um zu überprüfen, ob neben den IF auch die AF in *ifo-1(kc2)* fehlverteilt sind, wurde F-Aktin in Embryonen und Därmen adulter Würmer mit Phalloidin gefärbt (Abb.41). Im WT ist ab der zytoplasmatischen Polarisierung mit einer Phalloidinfärbung apikal eine subkortikale Akkumulation von F-Aktin an der apikalen Membran der Darmzellen zu

erkennen. Sie bleibt während der gesamten Entwicklung und auch im adulten Wurm bestehen (Abb.41A,C; Leung et al., 1999, Bossinger et al., 2004, van Fürden et al., 2004, Hüsken et al., 2008). In *ifo-1(kc2)* Embryonen ist im 3-fach elongierten Stadium der Embryonalentwicklung zu erkennen, dass die Phalloidin färbung im Darmepithel im Gegensatz zum WT geschwächt ist (Pfeilspitzen in Abb.41A,B). Dies ist auch in präparierten Därmen von adulten *ifo-1(kc2)* Würmern deutlich zu erkennen (Abb.41C,D), was darauf hinweist, dass das Aktinzytoskelett der Darmzellen in *ifo-1(kc2)* deutlich geschwächt ist.

Die Mikrovilli weisen in EM Aufnahmen keine Defekte auf (Abb.38D,E), obwohl auf ultrastruktureller Ebene gezeigt werden konnte, dass ACT-5 in den Mikrovilli lokalisiert ist und dass es essentiell für die Bildung der Mikrovilli ist (MacQueen et al., 2005). Dies kann bedeuten, dass durch die Phalloidin färbung ACT-5 in den Mikrovilli nicht angefärbt wird, sondern ein anderes Aktin (ACT-1-ACT-4), das sich im „terminal web“ befindet. Eine andere Möglichkeit ist, dass ACT-5 in *ifo-1(kc2)* stark geschwächt ist, aber noch ausreichend vorhanden ist, um eine korrekte Entwicklung der Mikrovilli zu gewährleisten. Dies könnte mit einer Immunogoldfärbung gegen ACT-5 an EM Aufnahmen geklärt werden.

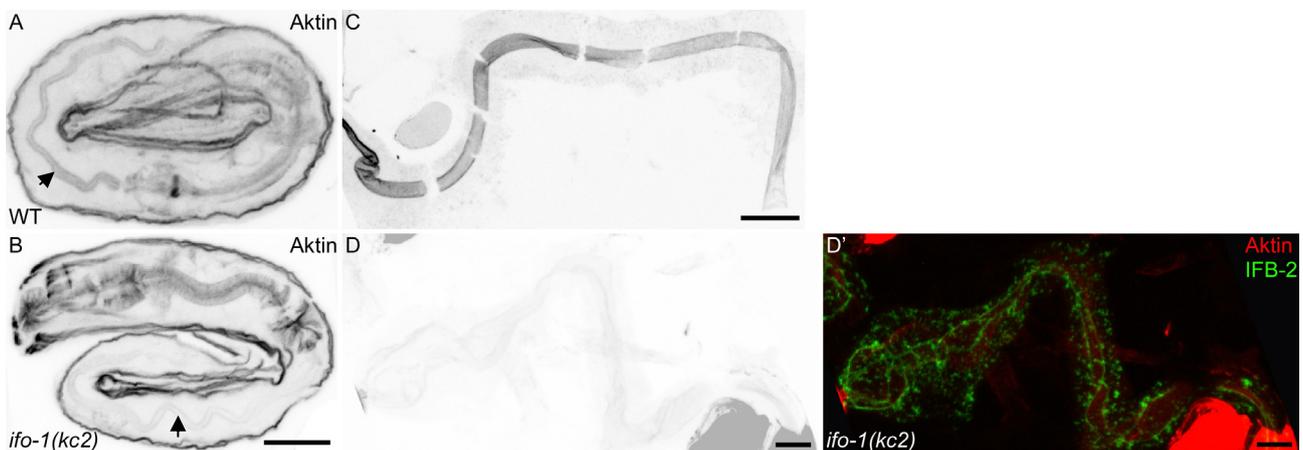


Abb. 41: Das Aktinzytoskelett ist stark geschwächt in *ifo-1(kc2)*

Phalloidin Färbungen an WT (A, C) und *ifo-1(kc2)* (B, D) Embryonen und präparierten adulten Därmen. Im 3-fach elongierten Stadium ist die Aktinfärbung in *ifo-1(kc2)* Embryonen schwächer als im WT (Pfeilspitzen in A, B). In adulten Tieren ist Aktin im Darm fast gar nicht mehr zu detektieren (vergleiche C, D). (D') zeigt den *ifo-1(kc2)* Darm mit Immunfluoreszenzfärbung gegen IFB-2, damit die Lage des Darms nachvollziehbar wird. Alle Bilder sind unter denselben Bedingungen aufgenommen worden. (A-D) werden in Graustufen gezeigt, damit der Unterschied der Signalstärke deutlicher wird. Anterior ist links, dorsal oben in (A, B), Eichstriche sind 10 μ m in (A, B), 50 μ m in (C, D).

Da das Aktinzytoskelett bereits in der Embryogenese geschwächt ist, wurde die Beschaffenheit des Zytoskeletts kurz nach der zytoplasmatischen Polarisierung überprüft. Dazu wurden Embryonen gegen Aktin gefärbt (Abb.42A). Die Phalloidin Färbungen zeigen eine Akkumulation von F-Aktin an der apikalen Membran der Darmzellen, wie dies auch im WT zur Zeit der zytoplasmatischen Polarisierung zu beobachten ist (Abb.42A, van Fürden et al., 2004). Zu diesem Zeitpunkt sind also mit der Phalloidinfärbung noch keine Defekte im Aktinzytoskelett zu erkennen.

van Fürden et al. konnten zeigen, dass die Akkumulation von F-Aktin auf ERM-1 beruht. ERM-1 ist das einzige Ezrin-Radixin-Moesin Homolog in *C. elegans* und lokalisiert ebenfalls apikal (5.3; van Fürden et al., 2004). ERM Proteine werden allgemein als Linkerproteine zwischen dem Aktinzytoskelett und der Plasmamembran betrachtet (McGhee, 2007; Labouesse, 2006). In Immunfluoreszenzfärbungen in *ifo-1(kc2)* Embryonen ist zu erkennen, dass ERM-1 wie im WT an der apikalen Membran der Enterozyten akkumuliert ist (Abb.42B). Die frühe Aktin Organisation in den Darmzellen scheint also von ERM-1 abhängig zu sein, während diese Rolle nach der Polarisierung scheinbar von IFO-1 übernommen wird (siehe Diskussion).

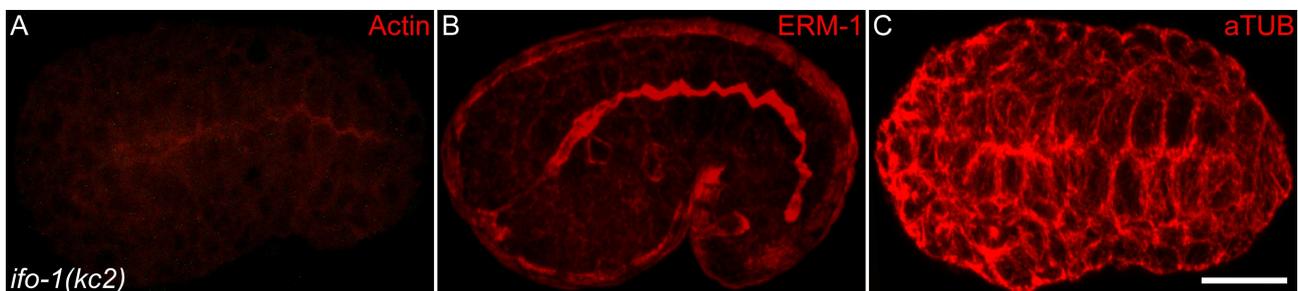


Abb. 42: Zu Beginn der Morphogenese sind keine Defekte im Zytoskelett von *ifo-1(kc2)* Embryonen zu erkennen

Phalloidin (A) und Immunfluoreszenz Aufnahmen (B, C) an *ifo-1(kc2)* Embryonen. Aktin ist zu Beginn der Morphogenese wie im WT apikal akkumuliert (A). ERM-1 und α -Tubulin zeigen dieselben Lokalisationsmuster wie im WT (B, C, Daten nicht gezeigt). Anterior ist links, Eichstrich ist 10 μ m.

Um zu testen, ob IFO-1 auch einen Einfluss auf die korrekte Lokalisation der MT hat, wurde eine Immunfluoreszenzfärbung gegen α -Tubulin durchgeführt. Im WT akkumulieren MT während der Polarisierung und der frühen Morphogenese ebenfalls stark an der apikalen Membran der Darmzellen (Leung et al., 1999; Wiesenfahrt, 2005). In *ifo-1(kc2)* Embryonen zeigen sie in Immunfluoreszenzaufnahmen keine Defekte. Die MT zeigen in *ifo-1(kc2)*, genau wie im WT, während der Polarisierung ein Springbrunnen-ähnliches

Muster mit einer starken Akkumulation von MT apikal, die nach lateral schwächer wird (Abb.42C, Leung et al., 1999). Während der Morphogenese wird die Tubulinfärbung im WT und in *ifo-1(kc2)* kontinuierlich schwächer (Daten nicht gezeigt, Wiesenfahrt, 2005).

5.2.8 RNAi gegen das Ezrin-Radixin-Moesin Homolog *erm-1* in *ifo-1(kc2)* führt zu Zell-Zelladhäsionsdefekten im Darmepithel

ifo-1 RNAi führt zu einer starken Schwächung des Aktinzytoskeletts der Darmzellen zu Beginn der Morphogenese. Um das Aktinzytoskelett in *ifo-1(kc2)* zusätzlich zu schwächen, wurde *erm-1* RNAi durchgeführt (van Fürden et al., 2004). Damit sollte auch die frühe apikale Akkumulation von Aktin verhindert werden. WT *erm-1* RNAi Tiere zeigen neben der Schwächung des Aktinzytoskeletts der Darmzellen Defekte bezüglich der Lumen- und Mikrovillibildung, was zu Letalität im L1-Larvenstadium führt (van Fürden et al, 2004; Göbel et al., 2004).

In *ifo-1(kc2);erm-1*RNAi Embryonen zeigt sich zu Beginn der Morphogenese die für *ifo-1* typische Fehlverteilung von IFB-2 (Abb.43A''). Außerdem ist der *erm-1* Phänotyp zu erkennen, was bedeutet dass die CeAJ über das Lumen hinweg miteinander verbunden ist und es so zu Verschlüssen des Darmlumens kommt (Pfeil in Abb.43A; van Fürden et al., 2004). Die beiden Phänotypen treten also gleichzeitig auf. Im 2,5-fach elongierten Stadium tritt dann ein neuer, dritter Phänotyp auf. Das DLG-1 und IFB-2 Muster weist Unterbrechungen auf, was darauf schließen lässt, dass die Darmzellen hier ihre Zell-Zelladhäsion zueinander verloren haben (Pfeile in Abb.43B).

Dieser Phänotyp konnte bisher nur nach Doppel-RNAi gegen *dlg-1;hmp-1* oder *erm-1;hmp-1* beobachtet werden (Segbert et al., 2004). Die Embryonen dieser Versuche weisen allerdings auch sehr starke hypodermale Defekte auf und sind embryonal letal. Die *ifo-1(kc2);erm-1*RNAi Tiere dagegen weisen nur Defekte im Darm auf und sind in der Lage zu schlüpfen. Sie sterben dann allerdings im L1-Larvenstadium (Abb.43). Erstmalig in *C. elegans* wird hier gezeigt, dass die IF einen Einfluss auf die Zell-Zelladhäsion haben (siehe Diskussion).

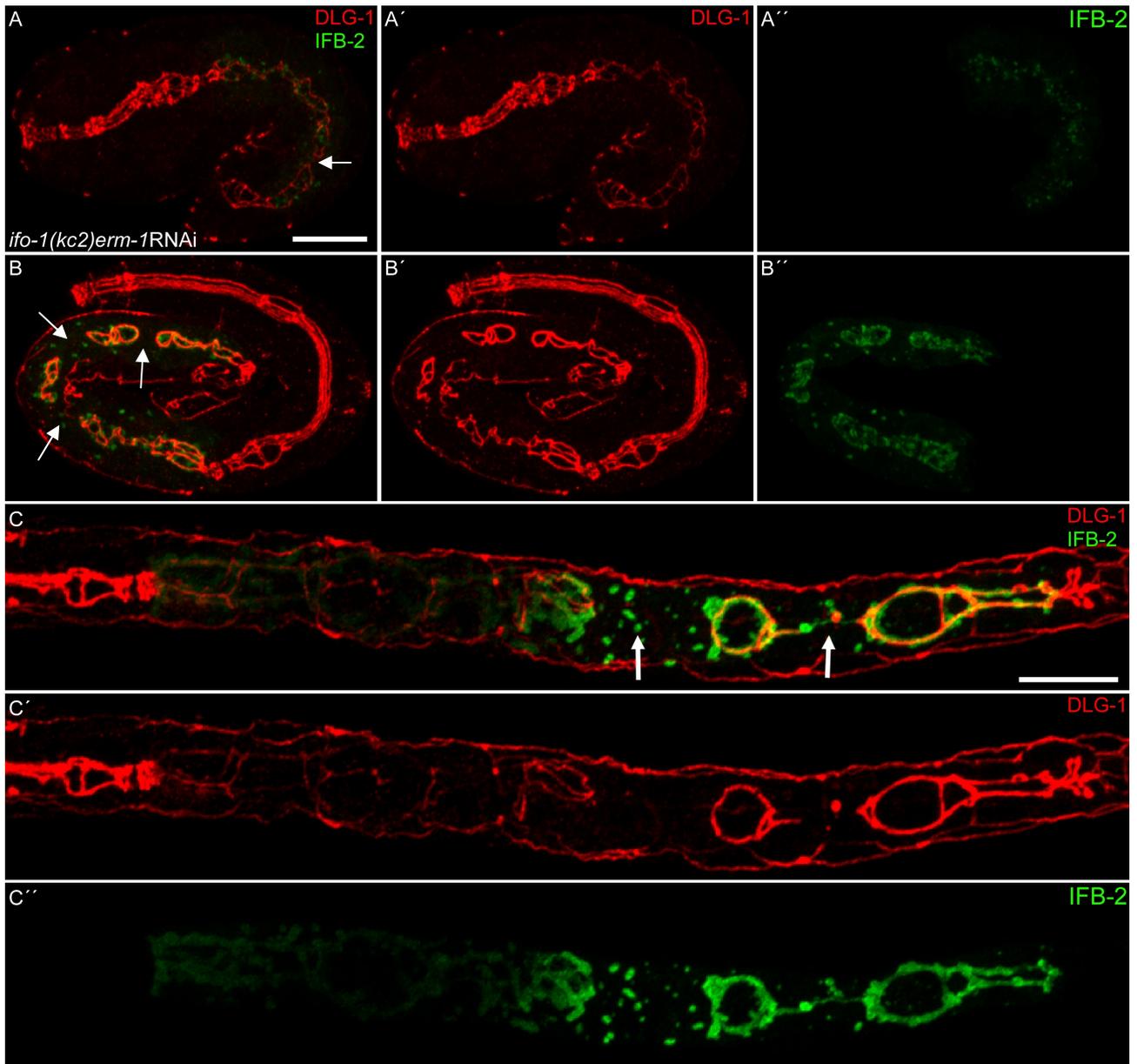


Abb. 43: *erm-1* RNAi in *ifo-1(kc2)* führt zu Zell-Zelladhäsionsverlust im Darmepithel

Immunfluoreszenz Aufnahmen an *ifo-1(kc2)* Embryonen (A, B) und an einer Larve (C-C'') gegen IFB-2 (grün) und DLG-1 (rot). Die Fehlverteilung von IFB-2 zeigt sich in allen Stadien. Im 1,5-fach elongierten Stadium sind noch keine deutlichen Zell-Zelladhäsionsdefekte im Darmepithel auszumachen (A). Der *erm-1* RNAi Phänotyp ist zu Beginn der Morphogenese zu erkennen, die CeAJ Proteine sind über das Lumen miteinander verbunden (Pfeil in A). Im 3-fach elongierten Stadium scheinen die Darmepithelzellen an drei Stellen die Zell-Zelladhäsion verloren zu haben (Pfeile in B). Die Embryonen sind in der Lage zu schlüpfen, aber auch in den Larven lassen sich die Adhäsionsdefekte sehr gut erkennen (Pfeile in C). Anterior ist links, dorsal oben in (A, B), Eichstriche sind 10 μ m.

6 Diskussion II

Mit Hilfe eines IFB-2::CFP Reporterstamms konnte gezeigt werden, dass RNAi gegen *ifc-2* zu blasenähnlichen Invaginationen der apikalen Membran in das Zytoplasma der Darmzellen von *C. elegans* führt. Neben der Formänderung des Lumens konnten keine weiteren Defekte in *ifc-2* RNAi Tieren festgestellt werden. In einem EMS Mutagenese Screen mit dem IFB-2::CFP Reporterstamm, konnten dann zwei Mutanten mit aberrantem IFB-2 Muster isoliert werden. Beide Mutanten tragen eine Mutation im Gen *ifo-1*. IFO-1 wird exklusiv in den Darmzellen exprimiert und scheint auch essentiell für die Organisation des Aktinzytoskeletts zu sein. Im Folgenden werden die Rolle von IFC-2 bei der Stabilisierung der apikalen Membran der Darmzellen und die Rolle von IFO-1 bei der Organisation der IF und des Aktinzytoskeletts der Darmzellen von *C. elegans* diskutiert.

Der *C. elegans* Darm ist von allen Seiten beachtlichem mechanischem Stress ausgesetzt. **Erstens** erzeugen die Aufnahme von Nährstoffen in die Darmzellen und der Transport dieser durch die Zellen einen nach Außen gerichteten Druck. **Zweitens** setzt die sinusförmige Bewegung des Wurms transverse Flexibilität des Darms voraus. **Drittens** führen die Kontraktionen während des Defäkationszyklus zu Verengung und Erweiterung des Darmlumens in anterior-posteriorer Richtung. **Viertens** wirkt durch den hydrostatischen Druck der Leibeshöhle eine Kraft von Außen auf den Darm. Außerdem müssen osmotische Herausforderungen überwunden werden, die durch die hyperosmotische Leibeshöhle und das Darmlumen mit den verschiedenen Nährstoffen erzeugt werden. Der komplette Darm muss also mit einem System ausgerüstet sein, das Schutz bietet gegen diese verschiedenen mechanischen und osmotischen Herausforderungen. Dieses System muss ein Zerreißen des Darms verhindern und die Barrierenfunktion des Epithels gewährleisten. Gleichzeitig muss es ein gleichmäßig geformtes Darmlumen aufrechterhalten, das die schnelle und problemlose Aufnahme und den Transport von Nährstoffen erlaubt und dadurch eine rasche Verdauung und Resorption sichert.

Die Existenz eines solchen Systems wird deutlich, wenn der Darm von *C. elegans* präpariert wird und die Endotube als intakte Einheit auch nach starker mechanischer Stresseinwirkung bestehen bleibt (Munn and Greenwood, 1983; 1984; Bossinger et al., 2004). Die nach dieser Prozedur übrig bleibenden Strukturen, das „terminal web“ mit dem

elektronendichten subapikalen Geflecht der Endotube und dem Mikrovillisaum, enthalten wahrscheinlich die Komponenten die für die bemerkenswerte Stabilität des Darmepithels verantwortlich sind.

6.1 Die Rolle von IFC-2 bei der Stabilisierung der apikalen Membran der Darmzellen

Das IF Zytoskelett des Darms besitzt die notwendigen Eigenschaften eines solchen Systems: es wurde gezeigt, dass es in der Endotube lokalisiert ist (Bossinger et al., 2004) und es ist bekannt, dass IF als mechanischer und osmotischer Stressschutz in zahlreichen Geweben von Säugern und Nichtsäugern fungieren können (Herrmann et al., 2007; Magin et al., 2007; Pekny and Lane, 2007). Außerdem besitzen IF einzigartige biophysikalische Eigenschaften, wie ihre hohe Viskoelastizität und Flexibilität, in Kombination mit der dynamischen Reaktion auf Deformation ohne zu zerreißen und anschließender schneller Wiederherstellung des Ursprungszustandes, die sie zu geeigneten Kandidaten machen, solch ein System zu bilden (Janmey et al., 1991; Ku et al., 1999). Weiterhin ist der *C. elegans* Darm mit sechs transkribierten Genen sehr reich an IF (Karabinos et al., 2003, 2004). Diese Fülle weist sehr deutlich darauf hin, dass die IF in den Darmzellen wahrscheinlich wichtige Funktionen erfüllen. Erstaunlicherweise haben frühere RNAi Experimente gegen diese verschiedenen IF nicht zu erkennbaren Defekten in den Darmzellen geführt. Die Defekte, die gezeigt werden konnten, hatten scheinbar nichts mit spezifischen Darmzellfunktionen zu tun und zeigten nur eine sehr geringe Penetranz (Karabinos et al., 2001, 2003, 2004).

Mit der Hilfe von transgenen Würmern, die ein IFC-2::CFP Konstrukt exprimieren, konnte im Rahmen dieser Arbeit die Entstehung des IF System im Darm während der Entwicklung durchgehend verfolgt und in adulten Würmern mit hoher Auflösung analysiert werden. So konnten in *ifc-2* RNAi Würmern, Veränderungen in der Struktur der Endotube identifiziert werden und die Entstehung dieser Veränderungen bis zu ihrer vollständigen Ausbildung verfolgt werden (Abb.23,26). Im Gegensatz zu vorherigen Studien entwickelten sich die Phänotypen mit 97% Penetranz in verschiedenen Stämmen (BJ49-51, WT). Außerdem wurde festgestellt, dass die Anwendung von RNAi über mehrere Generationen zu stärkeren Phänotypen in Bezug auf Anzahl und Größe der Invaginationen führte. Die stärksten Phänotypen wurden nach drei Generationen RNAi über Fütterung festgestellt

und steigerten sich in folgenden Generationen nicht mehr. Diese Beobachtung weist daraufhin, dass viele schwächere RNAi Phänotypen in genetischen Screens vielleicht nicht gefunden werden, wenn nur die F1-Generation analysiert wird.

Zusammengenommen zeigen die hier präsentierten Ergebnisse, dass das Darmlumen nach Herunterregulierung von *ifc-2* seine zylindrische Form während der postembryonalen Entwicklung verliert und zahlreiche blasenförmige Invaginationen entstehen (Abb.23,26,27). Auf der anderen Seite scheint die frühe Entwicklung des Darmlumens nicht gestört zu sein und die Polarität der Darmzellen korrekt etabliert zu werden (Abb.24,26). Der Phänotyp, der sich erst im adulten Wurm komplett ausbildet, scheint direkte *in vivo* Beweise für die vor Stress schützenden Eigenschaften des IF Systems zu liefern. Die Herunterregulierung einer einzigen Komponente, IFC-2, scheint die Stabilität des IF Netzwerks so stark zu schwächen, dass es den verschiedenen mechanischen und osmotischen Belastungen mit der Zeit nicht mehr widerstehen kann. Wahrscheinlich führen das Zusammenspiel der verschiedenen Stressfaktoren zu den zahlreichen Invaginationen im Darmlumen. Obwohl die meisten Blasen-ähnlichen Veränderungen des Darmlumens ins Zytoplasma zeigen, konnten gelegentlich Invaginationen beobachtet werden, die in das Darmlumen reichen. Dies könnte weiterhin die allgemeine mechanische Instabilität des IFC-2-defizienten IF Zytoskeletts der Darmzellen zeigen. Dies wird weiterhin von der Beobachtung unterstützt, dass die Blasen-ähnlichen Verformungen sich nach Präparation der Därme verändern (Abb.28). Durch die hier gezeigten Ergebnisse kann allerdings nicht ausgeschlossen werden, dass andere nicht mechanische Faktoren die Formveränderungen des Darmlumens hervorrufen, wie z.B. eine Fehlregulation in der Synthese von apikalen Membrankomponenten.

6.2 *ifc-2* RNAi führt zu keinen erkennbaren Defekten in Funktion oder Polarität der Darmzellen

Trotz der starken Veränderungen in der Struktur der Endotube ist es sehr verwunderlich, dass keine funktionellen Defekte zu erkennen sind und dass sich die Polarität der Darmzellen komplett entwickelt und bestehen bleibt. Das IF System ist nämlich wahrscheinlich eins der wichtigsten Zell-Zell verbindenden Komponenten der CeAJ, mit der es eine zellübergreifende Einheit bildet (Bossinger et al., 2004). Offensichtlich sind andere Komponenten des „terminal web“, die nicht von der Herunterregulierung von *ifc-2*

betroffen sind, wie z.B. das Aktinzytoskelett, in der Lage, diese Funktionen im Zusammenspiel mit den restlichen IF zu übernehmen. Außerdem konnten zumindest schwache Defekte bei der Ausbildung der apikalen Membran Domäne erwartet werden, da bei Keratin 8 mutanten Mäusen Defekte bei der Ausbildung des Mikrovillisaums und im Bezug auf das „targeting“ von Membranproteinen gezeigt werden konnten (Wald et al., 2003, 2005; Toivola et al., 2004; Oriolo et al., 2007). Aber detaillierte ultrastrukturelle Analysen und genaue Betrachtung mehrerer polarisierter Zytoskelett- und Membrankomponenten, konnten keine Veränderungen in *ifc-2* RNAi Tieren aufzeigen (Abb.27,28,30).

Interessanterweise konnte aber festgestellt werden, dass IFB-2 nicht nur an der apikalen Membran lokalisiert, sondern auch in zytoplasmatischen Aggregaten zu finden ist, die während der Entwicklung des Wurms akkumulieren (Abb.25) und teilweise mit dem Membranvesikelprotein SPH-1 kolokalisieren (Abb.30, Abraham et al., 2006). Letztere Beobachtung deutet an, dass diese Aggregate eine zytoplasmatische Membran-assoziierte Form von IFB-2 darstellen, die entweder von der apikalen Membran stammen und/oder zur apikalen Membran transportiert werden. Solche Vorgänge würden eine flexible Anpassung des Darmlumens an verschiedene Herausforderungen und Situationen erlauben.

Ein wichtiger Aspekt der durch *ifc-2* RNAi induzierten Veränderungen des Darmlumens, ist die deutliche Vergrößerung der apikalen Membranoberfläche, die eine Produktion aller anderen Komponenten des „terminal web“ und des Mikrovillisaums nötig macht. Alle diese Komponenten weisen auf ultrastruktureller Ebene keine Defekte auf, was auf eine ausgezeichnete kompensatorische Fähigkeit der *C. elegans* Darmzellen hindeutet. Es weist außerdem darauf hin, dass selbst wenn die primären Defekte auf mechanische Schwächung des IF-Systems zurückzuführen sind, doch intrazelluläre Signalwege nötig sind, um die kompensatorischen Veränderungen zu ermöglichen. Die Verbindung zwischen IF und Signalwegen ist in letzter Zeit zu einem wichtigen Punkt der Forschung geworden und wird von vielen Ergebnissen in der Säugetierforschung unterstützt (Pallari and Eriksson, 2006). Es ist allerdings möglich, dass schwache Veränderungen in dem stark vergrößerten Darmlumenregionen auftreten. So wurde z.B. in wenigen begrenzten Regionen eine verringerte Dichte des IFB-2 Netzwerkes beobachtet. Auch die reduzierte Anzahl von Dottergranula (Abb.27), die durch eine verringerte Resorption der Darmzellen hervorgerufen sein könnte, weist auf schwache Defekte in den kompensatorischen

Mechanismen der Darmzellen hin. Eine andere Erklärungsmöglichkeit ist, dass der geschwächte Widerstand gegen mechanischen Stress und/oder die Zunahme an mechanischem Stress zur Aktivierung von Signalkaskaden führt, die verantwortlich für den entstehenden Phänotyp sind. Die beschriebenen Veränderungen haben allerdings keinen Einfluss auf die Ei-Ablagerate, die Anzahl der Nachkommen oder der Entwicklungszeit (Daten nicht gezeigt).

Eine besonders auffällige Ähnlichkeit besteht zwischen der *C. elegans* Endotube und dem urothelialen IF-System der adluminalen Umbrellazellen. In beiden Fällen sind Widerstand gegen osmotischen und mechanischen Stress die primären Voraussetzungen, um Schutz gegen intraluminale Substanzen zu gewährleisten und um deutliche Veränderungen in Oberflächenvergrößerungen zu unterstützen, die entweder die Urin Akkumulation oder den Nahrungstransport begleiten. Diese funktionellen Anforderungen spiegeln sich in ähnlichem strukturellem Aufbau des IF Zytoskeletts wieder, das in beiden Fällen als dichtes Netzwerk direkt unterhalb der apikalen Membran lokalisiert ist und an lateralen Kontaktstrukturen befestigt ist (Veranic and Jezernik, 2002). Des Weiteren treten in beiden Netzwerken regelmäßige Poren auf (vergleiche Abb.23 mit Veranic und Jezernik, 2002; Carberry et al., 2009). Es wurde postuliert, dass diese Poren als Austauschregionen zwischen der Oberflächenmembran und den zytoplasmatischen Vesikeln dienen (Veranic and Jezernik, 2002). Möglicherweise dienen die Lücken in der Endotube (siehe Abb.23) auch als Andockstellen für Vesikel, zur und weg von der apikalen Membran. Außerdem konnte gezeigt werden, dass individuelle IF auf unterschiedliche Weise an beiden Systemen beteiligt sind. So wurde hier und in Hüsken et al, (2007) gezeigt, dass die Herunterregulierung von IFC-2 und nicht IFB-2 zu Veränderungen in der Darmlumenform führt und Veranic et al. (Veranic et al., 2004) haben Beweise aufgezeigt, dass Keratin 20 besondere Eigenschaften mitbringt, die für die Funktion der adulten Blase gebraucht werden. So wird die Herunterregulierung von Keratin 20, bei Patienten mit Wirbelsäulenverletzung und gestörter freiwilliger Blasenleerung, beobachtet (Vaidyanathan et al., 2002).

Obwohl es Unterschiede zwischen dem „terminal web“ der Darmzellen und seinen spezifischen Sub-Domänen zwischen den verschiedenen Organismen gibt, deuten die Anzahl der IF im „terminal web“ der Metazoa, auch beim Menschen, auf ähnliche Funktionen, nämlich um Schutz vor mechanischem Stress zu gewährleisten, in einer

Umgebung die konstanter Deformation durch Darm-spezifische Bewegung ausgesetzt ist, hin.

Es bleibt festzustellen, dass die hier gezeigten Ergebnisse nur durch die Herunterregulierung von einem von sechs IF, IFC-2, erzielt wurden. Es ist vorstellbar, dass RNAi gegen mehrere verschiedene IF gleichzeitig zu stärkeren Phänotypen führt, wie auch schon gezeigt werden konnte (Karabinos et al., 2004), obwohl unsere eigenen ersten Experimente dies nicht unterstützen (Hüsken et al., 2007). Sie deuten eher differentielle Effekte individueller IF in Bezug auf Stärke des Phänotyps und Morphologie an. IF Isoform spezifische Effekte werden auch von der Beobachtung angedeutet, dass weder die polarisierte Verteilung von IFB-2::CFP, noch seine Fluoreszenzstärke oder sein Fluoreszenzmuster nach Herunterregulierung von IFC-2 verändert scheinen. Um verschiedene Phänotypen zu finden, könnte es wichtig sein herauszufinden, ob das Darm-spezifische IF-Netzwerk auch von Heteropolymeren gebildet wird, wie dies schon für das IFA-1/2/3-IFB-1 System gezeigt werden konnte (Karabinos et al., 2003), und welche Polypeptide eine Verbindung miteinander eingehen. Vielleicht verhält sich IFC-2 im Darmepithel ähnlich wie IFB-1 im IFA-IFB-1 System, in dem IFB-2 mit allen anderen IF Heteropolymere bilden kann und so eine Schlüsselrolle einnimmt (Karabinos et al., 2003). Auf jeden Fall zeigen die hier erzielten Ergebnisse, dass IFC-2 eine besondere Rolle im IF Systems des Darms spielt, da sein Verlust nicht durch die anderen IF kompensiert werden kann.

Zusammenfassend zeigen die hier präsentierten Daten, dass ein intaktes Darm-spezifisches IF-System essentiell für die Aufrechterhaltung der Integrität der Endotube ist, die wiederum essentiell für ein korrekt geformtes Lumen ist. Der Gebrauch der stabilen *ifb-2::cfp* Stämme, mit ihrem charakteristischen und leicht detektierbarem IFB-2::CFP Muster ist besonders geeignet, um optische Screens durchzuführen. Sie können eine große Hilfe darstellen, um molekulare Komponenten zu identifizieren, die an der Entwicklung, Aufrechterhaltung und Funktion der prominenten *C. elegans* Endotube, im Zusammenhang mit polarisierter Zellfunktion, beteiligt sind.

6.3 IFO-1 ist für die korrekte Lokalisierung der Intermediärfilamente und des Aktinzytoskeletts im Darm von *C. elegans* verantwortlich

Um Organisatoren oder Modulatoren der IF im Darmepithel von *C. elegans* zu finden, wurde von Dr. Carberry ein EMS-Mutagenese-Screen mit einem IFB-2::CFP exprimierenden Stamm durchgeführt. Dabei wurden drei Mutanten identifiziert, die ein zum WT verändertes IFB-2 Muster aufweisen: *sma-5(kc1)*, *ifo-1(kc2)* und *ifo-1(kc3)*. Die Mutante *sma-5(kc-1)* zeigt blasenähnliche Invaginationen der apikalen Darmzellmembran, die denen von *ifc-2* RNAi Tieren ähnlich sind und wird in anderen Arbeiten beschrieben (Hüsken et al., 2008; Gerhardus, 2009).

Bei den Mutanten *ifo-1(kc2)* und *ifo-1(kc3)* handelt es sich um zwei Allele desselben Gens: F42C5.10. In beiden Mutanten lokalisieren die IF IFB-2 und IFC-2 nicht länger an der apikalen Membran der Darmzellen, sondern bilden vermehrt zytoplasmatische Aggregate und akkumulieren an der CeAJ (Abb.31,36,37). Das Gen wurde, aufgrund der Fehlverteilung von IFB-2 und IFC-2, *ifo-1* (intermediate-filament-organizer) genannt. IFO-1 ist der erste Intermediärfilament Organisator, der in *C. elegans* gefunden wurde. Es handelt sich um ein bisher uncharakterisiertes Protein. Es konnten keine Orthologen Proteine in anderen Organismen, außer in *C. briggsae* und *C. japonica*, gefunden werden. Möglicherweise kommt ein *ifo-1*-ähnliches Gen nur in diesen Organismen vor, da es eine Rolle bei der Organisation der Endotube spielt, welche eine Nematoden-spezifische Struktur ist (McGhee, 2007). Allerdings sind funktionelle Homologe in Säugern denkbar, da in ihrem Darmepithel die IF eine ähnliche Organisation wie die in *C. elegans* aufweisen (Kim and Coulombe, 2007). IFO-1 hat aber nicht nur einen Einfluss auf die IF, sondern auch auf das Aktinzytoskelett der Darmzellen, welches in *ifo-1(kc2)* stark geschwächt zu sein scheint (Abb.41). Durch Immunfluoreszenzfärbungen konnte gezeigt werden, dass IFO-1::YFP an der apikalen Membran der Darmzellen lokalisiert. Aus diesen Daten ist zu vermuten, dass IFO-1 die IF und/oder AF an der apikalen Membran verankert und/oder dort für deren korrekte Organisation bzw. Vernetzung verantwortlich ist. Die verschiedenen Möglichkeiten sollen im Folgenden diskutiert werden.

IFO-1 könnte direkt mit den IF interagieren und für ihre korrekte Organisation an der apikalen Membran sorgen. Das Protein besitzt einen hohen Histidin Gehalt, wie man ihn auch bei Filaggrin findet, welches in Säugern an der Keratinfilament- und Aggregatbildung beteiligt ist (Listwahn und Rotnagel, 2004). Die Fehllokalisierung der IF in *ifo-1(kc2)* könnte sich dann auf das Aktinzytoskelett auswirken. Ähnliche Beobachtungen wurden in Keratin

8 mutanten Mäusen gemacht, wo es zu einer Fehllokalisierung von apikalem F-Aktin in Kolonzellen kommt (Toivola et al., 2004).

Eine andere Möglichkeit ist, dass in *ifo-1* Mutanten die Organisation des Aktinzytoskeletts gestört sein könnte, wodurch es zu einer Fehllokalisierung der IF kommt. Dafür spricht, dass IFO-1 eine mögliche Aktin-bindende FH2 Domäne besitzt (siehe 5.2.2) und FH2 Proteine eine wichtige Rolle bei der Reorganisation von AF spielen (Shimada et al., 2004; Wallar and Alberts, 2003). FH2 Domänen kommen in Forminen vor und sind für die Dimerisierung und für die Nukleation von G-Aktin in vitro notwendig. Sie wirken als Gegenspieler von „capping“ Proteinen, in dem sie am +Ende binden und lineare Aktinfilamente nukleieren (Otomo et al., 2005; Shimada et al., 2004). In anderen Systemen konnte mehrfach gezeigt werden, dass eine Schwächung des Aktinzytoskeletts einen Effekt auf die IF Organisation haben kann (Weber and Bement, 2002; Werner et al., 2004; Woll et al., 2005). Weber und Bement (2002) haben gezeigt, dass AF als Organisationsplattform für Keratine in einem zellfreien System dienen können. So kommt es nach Inhibition von F-Aktin zur Bildung von zytoplasmatischen Keratinaggregaten (Weber und Bement, 2002). Auch in *ifo-1(kc2, kc3)* kann eine Aggregatbildung von IFB-2 und IFC-2 beobachtet werden. Werner et al. konnten zeigen, dass AF eine Rolle bei dem Transport von Keratin Vorläufern spielen (Werner et al., 2004; Wöll et al., 2005). Es wäre also möglich, dass durch die Schwächung des Aktinzytoskeletts, die IF-Vorläufer nicht zur apikalen Membran transportiert werden können und sich im Zytoplasma und an der CeAJ als Aggregate ansammeln.

Gegen die Theorie, dass das geschwächte Aktinzytoskelett für die Fehllokalisierung der IF verantwortlich ist, sprechen Ergebnisse von Patel et al., (2008). Sie konnten zeigen, dass in *wve-1*, *gex-2*, *gex-3* Mutanten und nach *arp-2* RNAi die Phalloidin Färbung im Darm stark geschwächt ist, IFB-2 aber immer noch an der kompletten apikalen Membran lokalisiert ist (Patel et al., 2008). Auch nach *erm-1* RNAi ist die Phalloidinfärbung schwächer als im WT, die Lokalisation von IFB-2 scheint allerdings nicht gestört zu sein (Göbel et al., 2004; van Fürden et al., 2004). Dies spricht dafür, dass eine korrekte Lokalisation der AF keine Voraussetzung für eine korrekte Lokalisation der IF ist.

Da IFO-1 mit Aktin und den IF interagieren könnte, kann es auch als Linkerprotein zwischen den beiden Zytoskelettkomponenten dienen. Ob IFO-1 direkt oder indirekt mit den IF/AF interagiert, muss in zukünftigen Experimenten, z.B. durch Koimmunoprecipitation, FRET oder Yeast-2-Hybrid Experimente, gezeigt werden.

Eine dritte Möglichkeit wie IFO-1 die IF im Darmepithel organisieren könnte, ist über eine Interaktion mit Signalmolekülen. Zytoplasmatische Keratinaggregate wurden in Zellkultur nach Hyperphosphorylierung der Keratine beobachtet, an der die MAP-Kinase p38 beteiligt ist (Woll et al., 2007). Ein möglicher Interaktionspartner von IFO-1 ist die MAP-Kinase MPK-1 (5.2.2). Mutationen in *ifo-1* könnten also indirekt zu Defekten in der Phosphorylierung der IF führen, wodurch es zur Fehllokalisierung und Aggregatbildung kommt. Ein anderer möglicher Interaktionspartner von IFO-1 ist die E2-E3 Ubiquitinligase SEL-10 (5.2.2). Es konnte gezeigt werden, dass das Ubiquitin-System an der Ausbildung pathologischer IF Aggregate, die bei Lebererkrankungen des Menschen auftreten, beteiligt ist (Zatloukal et al., 2007).

Bemerkenswert ist, dass die Mikrovilli in *ifo-1(kc3)* keine Defekte aufweisen, obwohl die elektronendichte Struktur der Endotube abwesend ist und die Phalloidin färbung stark geschwächt ist (Abb.39,41). Es wurde bisher postuliert, dass die Endotube unter anderem als Verankerung für die AF der Mikrovilli dient (McGhee, 2007). Aus den hier gezeigten Ergebnissen kann jedoch geschlossen werden, dass die Endotube als Verankerung für AF nicht essentiell für die Mikrovillientwicklung ist. Für die fünf Aktinogene *act-1-act-5* konnte bisher nur für *act-5* eine Expression in den Darmzellen nachgewiesen werden (MacQueen et al., 2005). Auf ultrastruktureller Ebene konnte gezeigt werden, dass es nicht in der Endotube, sondern ausschließlich in den Mikrovilli lokalisiert ist, und essentiell für deren korrekte Bildung ist (MacQueen et al., 2005). Da die Mikrovilli in *ifo-1(kc3)* keine Defekte aufweisen (Abb.39), kann geschlossen werden, dass ACT-5 nicht stark geschwächt ist. Dies würde bedeuten, dass sich ACT-5 durch Phalloidin im Darm nicht anfärben lässt. Die geschwächte Phalloidin färbung müsste also eine Schwächung der anderen Aktinproteine, die im „terminal web“ lokalisiert sind, widerspiegeln (Carberry et al., 2009). Um dies zu klären, könnten Expressionsanalysen von *act-1-act-4* durchgeführt werden, um herauszufinden, ob sie in den Darmzellen exprimiert werden. Des Weiteren sollte das ACT-5::GFP Signal und Phalloidin färbungen in *ifo-1(kc2)* mit dem WT als Referenz, verglichen werden. Dies könnte Aufschluss darüber geben, ob ACT-5 mit Phalloidin anzufärben ist.

6.4 *erm-1* und *ifo-1* haben einen unterschiedlichen Einfluss auf das Aktinzytoskelett und regulieren zusammen die Zelladhäsion der Darmzellen

Außer für IFO-1 konnte auch für ERM-1 gezeigt werden, dass es wichtig ist für die Organisation des Aktinzytoskeletts der Darmzellen. Die Phänotypen, die sich nach Herunterregulierung der beiden Genprodukte zeigen, unterscheiden sich jedoch deutlich. ERM-1 ist ein Ezrin-Radixin-Moesin Protein, lokalisiert in den Darmzellen subapikal am Kortex (Göbel et al., 2004; van Fürden et al., 2004). Nach *erm-1* RNAi ist das Aktinzytoskelett der Darmzellen bereits während der Polarisierung der Darmzellen gestört. Während der Morphogenese scheinen die Adhäsionsproteine teilweise über das Lumen miteinander verbunden zu bleiben, was zu Verschlüssen des Darmlumens führt (van Fürden et al., 2004). Die Mikrovilli sind zum Teil von unorganisierten Filamenten ersetzt, die aus Aktin bestehen könnten. Das Darmlumen weist eine runde statt ellipsoide Form auf (Göbel et al., 2004).

In *ifo-1(kc-2)* weist die Aktinorganisation während der Polarisierung keine Defekte auf und es sind keine Verschlüsse des Darmlumens zu beobachten (Abb.36,39,41). Die Lumenform ist im Gegensatz zum WT verändert, gleicht aber nicht der von *erm-1* RNAi Tieren. Auch die Mikrovilli weisen keine Defekte auf, allerdings ist die elektronendichte Struktur der Endotube nicht mehr nachweisbar (Abb.39). Dies zeigt, dass ERM-1 und IFO-1 das Aktinzytoskelett auf unterschiedliche Art und Weise organisieren und dass eine Schwächung des Aktinzytoskeletts zu sehr verschiedenen Phänotypen führen kann. ERM-1 scheint schon während der Polarisierung der Darmzellen wichtig für die korrekte Aktin Lokalisierung zu sein (van Fürden et al., 2004), während IFO-1 erst während der Morphogenese essentiell wird. Es ist möglich, dass ERM-1 und IFO-1 unterschiedliche Aktinproteine in den Darmzellen regulieren. ERM-1 wird im Allgemeinen als Linkerprotein zwischen Aktin und der Plasmamembran betrachtet. So könnte es für die Verankerung von ACT-5 in den Mikrovilli wichtig sein (Abb.21; McGhee, 2007). IFO-1 dagegen könnte andere Aktine (ACT-1-4) organisieren, die im „terminal web“ lokalisiert sind.

Wenn *erm-1* RNAi in der *ifo-1(kc2)* Mutante durchgeführt wird, zeigen sich beide Phänotypen nebeneinander, die Fehllokalisierung der IF und die Defekte bei der Lumenbildung (Abb.43). Allerdings entsteht auch ein neuer Phänotyp, es kommt an mehreren Stellen zum Adhäsionsverlust der Darmzellen (Abb.43). Eine Rolle bei der Vermittlung von Zell-Zelladhäsion konnte bisher für die IF in *C. elegans* noch nicht gezeigt

werden. Die hier beobachteten Ergebnisse sprechen dafür, dass der Adhäsionsverlust der Darmzellen auf einer massiven Schwächung des IF- und Aktinzytoskeletts beruht. Die Rolle von ERM-1 und IFO-1 bei der Vermittlung der Zell-Zelladhäsion der Darmzellen wird im Folgenden diskutiert.

Im Gegensatz zu *Drosophila* ist in *C. elegans* der CCK nicht alleine für die Zelladhäsion verantwortlich (Costa et al., 1998), vielmehr beruht die Zelladhäsion in *C. elegans* auf redundanten Systemen, wobei der CCK schon eine zentrale Rolle zu spielen scheint (Labouesse, 2006; van Fürden, 2005; Segbert et al., 2004). Bisher konnte ein kompletter Verlust der Zelladhäsion nämlich nur nach Herunterregulierung einer Komponente des CCK mit entweder LAD-1, DLG-1 oder ERM-1 beobachtet werden (Labouesse, 2006, van Fürden, 2005). Bei LAD-1 handelt es sich um ein Transmembranprotein der L1CAM („cell-adhesion-molecule“) Familie und bei DLG-1 um ein Gerüstprotein der MAGUK Familie (**M**embran-**a**ssoziierte-**G**uanylatkinase). DLG-1 und LAD-1 kolokalisieren in der CeAJ und im Hefe-2-Hybridsystem konnte eine direkte Bindung der beiden Proteine nachgewiesen werden (van Fürden, 2005). Die Lokalisation von LAD-1 scheint in den Darmzellen von DLG-1 stabilisiert zu werden. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass DLG-1 und AJM-1 einen Komplex mit LAD-1 bilden könnten, ähnlich wie HMP-1 und HMP-2 mit HMR-1 (CCK).

Eine Herunterregulierung von ERM-1 mit einer Komponente des CCK führt ebenfalls zu einem Zelladhäsionsdefekt (Segbert et al., 2004). In anderen Systemen konnte auch gezeigt werden, dass ERM-Proteine eine Rolle bei der Zell-Zelladhäsion spielen. So führt die Herunterregulierung von Ezrin in kultivierten Maus Epithelzellen zum Verlust der Zell-Zelladhäsion (Takeuchi et al., 1994). In MDCK Zellen führt eine Expression von mutantern Ezrin zur Fehllokalisierung von E-Cadherin und ebenfalls zum Adhäsionsverlust der Zellen (Pujuguet et al., 2003). In *C. elegans* scheint ERM-1 aber keinen direkten Einfluss auf HMR-1 (Cadherin) zu haben, da sich der Adhäsionsdefekt erst nach doppel-RNAi gegen beide Gene zeigt. ERM-1 könnte also ein noch unbekanntes Zelladhäsionsmolekül stabilisieren und so die Zelladhäsion regulieren. So konnte z.B. eine Kolokalisation von Ezrin mit den Zelladhäsionsmolekülen ICAM1 und ICAM2 in transfizierten COS Zellen gezeigt werden und eine Interaktion dieser Proteine konnte mit verschiedenen Experimenten nachgewiesen werden (Heiska et al., 1998).

Es ist auch möglich das ERM-1 einen indirekten Einfluss auf die Zell-Zelladhäsion, durch die Organisation des Aktinzytoskeletts, hat. Es wird postuliert, dass das Aktin-Myosin

Netzwerk für die Reifung und Stabilisierung des CCK in MDCK Zellen wichtig ist (Nelson, 2008). Hierfür ist eine Reorganisation des Aktinzytoskeletts erforderlich, die von der Rho GTPase RhoA induziert wird. Untersuchungen in *Drosophila* und Säugerzellkultur deuten an, dass Ezrin ein wichtiger Regulator von Rho GTPasen ist (Hughes and Fehon, 2007). So könnte ERM-1 in *C. elegans* eine Rho GTPase, z.B. *rho-1*, die ubiquitär exprimiert wird, regulieren und so einen Einfluss auf das Aktinzytoskelett ausüben, welches den CCK stabilisieren könnte.

IFO-1 könnte ebenfalls durch die Organisation des Aktinzytoskeletts wichtig für die Zell-Zelladhäsion sein. Allerdings könnte auch die Schwächung des IF Netzwerkes eine entscheidende Voraussetzung für den Verlust der Zelladhäsion sein. Die IF IFB-2 und IFC-2 bilden wahrscheinlich über die CeAJ eine zellübergreifende Einheit (Bossinger et al., 2004; Hüsken et al., 2008). Wenn diese Einheit in *ifo-1(kc2)* Würmern gestört ist, könnte dies zu einer generelle Schwächung der Integrität des Darmepithels führen. Eine zusätzliche Schwächung des Aktinzytoskeletts durch *erm-1* RNAi könnte dann zum Verlust der Adhäsion der Darmzellen führen

Es ist also vorstellbar, dass die CeAJ durch die Schwächung des Zytoskeletts, nicht mehr in der Lage ist die Adhäsion der Darmzellen zu vermitteln und das Epithel so „auseinanderreißt“. Im Bezug auf DLG-1 sind keine CeAJ Defekte auf Immunfluoreszenzebene in *ifo-1(kc2)erm-1RNAi* Embryonen zu erkennen (Abb.43). Es kann allerdings nicht ausgeschlossen werden, dass es in bestimmten fokussierten Bereichen, in denen die Adhäsionsdefekte auftreten, zu einer Fehllokalisierung von CeAJ Proteinen kommt, die mit Immunfluoreszenzmikroskopie nicht aufgelöst werden kann (Labouesse, 2006). Allerdings ist es auch möglich, dass nach IFO-1 und ERM-1 Verlust andere CeAJ Marker, wie z.B. das CCK und das Transmembranprotein LAD-1 nicht korrekt lokalisiert sind. HMP-1 zeigt in *ifo-1(kc2)* keine Fehllokalisierung (Daten nicht gezeigt), aber in *ifo-1(kc2)erm-1RNAi* Embryonen wurde die Lokalisation von CCK Komponenten und von LAD-1 noch nicht überprüft. Durch weitere RNAi Experimente gegen verschiedene CeAJ Gene in *ifo-1(kc2)*, sollte die Rolle von IFO-1 für die Vermittlung der Zell-Zelladhäsion weiter aufgeklärt werden können. Aus den hier gezeigten Daten ergibt sich folgendes Modell bezüglich der Zell-Zelladhäsion (Abb.44).

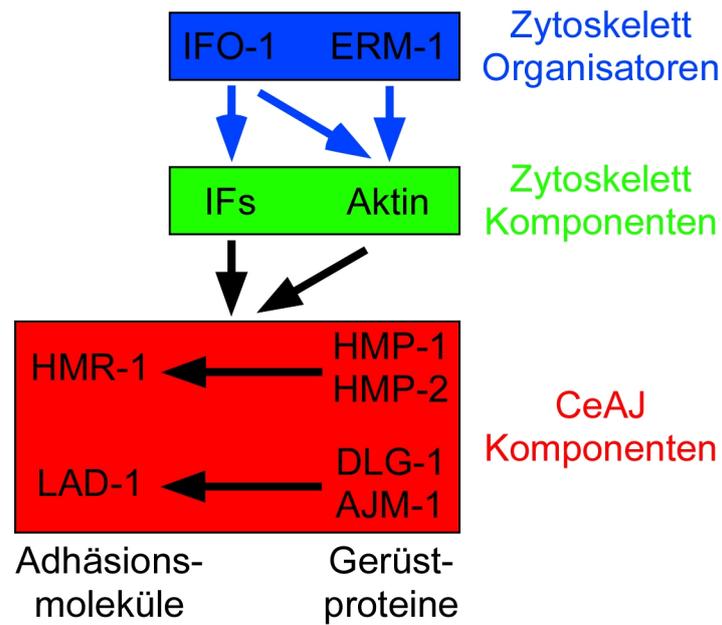


Abb. 44: Modell zur Vermittlung von Zell-Zelladhäsion im Darmepithel von *C. elegans*

IFO-1 und ERM-1 organisieren die IF und AF des Darmepithels von *C. elegans* (blaue Pfeile). Die IF und AF sind an der Ausbildung der Endotube beteiligt, die ein apikales Filamentsystem darstellt, welches die Proteine der CeAJ stabilisieren könnte (schwarze Pfeile). So wird die Akkumulation der CeAJ Proteine an der apikalen Membran ermöglicht. Die intrazellulären Gerüstproteine HMP-1/HMP-2 sowie DLG-1/AJM-1 stabilisieren die Transmembranproteine HMR-1 und LAD-1 (schwarze Pfeile), die letztendlich die Zell-Zelladhäsion vermitteln.

7 Material & Methoden

7.1 Chemikalien, Materialien, Geräte und Software

Sämtliche Verbrauchskemikalien wurden, falls nicht anders erwähnt, in der Qualität *pro analysis* von folgenden Firmen bezogen:

Acros, Geel, Belgien; Baker, Deventer, Niederlande; Biomol, Hamburg; Bio-Rad, München; Difco, Detroit, USA; Fluka, Buks, Schweiz; Gibco/BRL Life Technologies, Karlsruhe; Grüssing, Filsum; Merck, Darmstadt; Riedel-de Haën, Seeize; Roth, Karlsruhe; Serva, Heidelberg; Sigma-Aldrich, Steinheim.

Sämtliche Lösungen wurden mit demineralisiertem Wasser (dH₂O) angesetzt und gegebenenfalls autoklaviert bzw. sterilfiltriert. Bei Arbeiten mit RNA wurden Lösungen mit Diethylpyrocarbonat-Wasser (0.1% DEPC) angesetzt.

Enzyme für molekularbiologische Methoden wurden von folgenden Firmen bezogen: Boehringer/Roche Diagnostics, Mannheim; MBI Fermentas, St. Leon Rot; Promega, Madison, USA.

Allgemeine Geräte:

Elektrotransformationen:	Gene Pulser II und Puls Controller Plus (BioRad, München)
UV-Spektrometer:	Gene Quant II (Pharmarcia Biotech, Cambridge, England) und UV-160 (Shizmadzu Deutschland GmbH, Duisburg)
Zentrifugen:	Biofuge Pico (Heraeus instruments; Düsseldorf); J21-C (Beckman instruments; Palo Alto, USA)
Mikropipettenpuller:	Sutter P-97 (Science Products, Hofheim)
Ultraschallgerät:	Labsonic U (Braun Biotech, Melsungen)
PCR-Gerät:	PTC-200 (MJ Research, Watertown, USA)

Kitsysteme:

- MAXIscript T7, Ambion, Austin, USA
- Nucleobond AX, Machery-Nagel, Düren
- NucleoSpin Extract, Machery-Nagel, Düren
- Qiagen Plasmid Maxi Kit, Qiagen, Hilden

Mikroskopische Beobachtungen:

- Zeiss Axiophot 2 (Zeiss, Oberkochen), gekoppelt mit einer Hamamatsu ORCA-ER Kamera
- konfokales Lasermikroskop Leica TCS NT (Leica, Heidelberg)
- konfokales Lasermikroskop Zeiss LSM 510 Meta (Zeiss, Jena)
- inverses Mikroskop Leica DM IRB, gekoppelt mit einem Mikromanipulator Piezo Manipulator PM10, Science Products, Hofheim

Injektionen wurden mit Druckgas (Stickstoff) durch eine pneumatische Pumpe (Pneumatic Picopump PV820, World Precision-Instruments, Berlin) durchgeführt. Nadeln für Injektionen: GB 120 F-10, Science Products, Hofheim

Bildverarbeitung:

Bilder wurden auf einem McIntosh PowerPC (Apple, Ismaning) mit den Bildverarbeitungsprogrammen Adobe Photoshop CS (Adobe Systems, San Jose, USA) und Canvas 10 (Deneba Systems, Miami, USA) bearbeitet.

Sequenzanalysen:

Sequenzanalysen wurden mit Hilfe des Programms Lasergene (DNASTAR Inc., Madison, USA) durchgeführt.

7.2 Molekularbiologische Methoden

7.2.1 Bakterienstämme

Es wurden folgende Bakterienstämme der Spezies *Escherichia coli* verwendet:

XL1blue (Stratagene, Heidelberg), Genotyp: recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacI^qZ M15 Tn10(Tet^r)] Alle herkömmlichen Klonierungsarbeiten wurden mit diesem Stamm durchgeführt.

HT115(DE) (CGC, Minnesota), Genotyp: F⁻, mcrA, mcrB, IN(rrnD-rrnE)1, lambda⁻, rnc14::Tn10(DE3 lysogen:lacUV5 promotor-T7 polymerase). Ein RNaseIII-defizienter Stamm mit zwei die MCS flankierenden T7-Promotoren für die Synthese von dsRNA.

7.2.2 Medien für Bakterien

LB: 1% Bactotrypton, 0.5% Bactoyeast, 0,5% NaCl
LB-Agar: 6.3 g Agar/300 ml LB
Ampicillin: 100 mg/ml Stammlösung in dH₂O
Kanamycin: 50 mg/ml Stammlösung in dH₂O
Tetracyclin: 12.5 mg/ml Stammlösung in dH₂O

7.2.3 Vektoren

pBluescript II KS +/- (2.96 kB, Stratagene, Heidelberg). Hierbei handelt es sich um einen Standardvektor u.a. für Klonierungsarbeiten, DNA-Sequenzierungen und in-vitro Mutagenesen. Er besitzt einen bakteriellen (ColE1 ori) und einen viralen (f1-origin) Replikationsursprung, ferner lässt er aufgrund eines Ampicillin-Resistenzgenes eine Antibiotikaselektion zu. Es gibt eine „multiple cloning side“ (MCS), die singuläre Schnittstellen vieler Enzyme besitzt, hierin werden Fremdsequenzen kloniert. Ferner besitzt der Vektor ein für das α -Peptid der β -Galaktosidase kodierendes Gen, welches durch Einfügen von Fremdsequenzen zerstört wird. So ist es möglich in Zusammenhang mit einem Bakterienstamm, der nur die N-terminale Sequenz der β -Galaktosidase besitzt, eine Blau-Weiß-Selektion durchzuführen. Weiterhin wird die MCS von zwei Promotoren flankiert, die von den viralen T3- bzw. T7-RNA-Polymerasen

erkannt werden. So wird nach Linearisierung des Vektors eine strangspezifische Transkription der in den Vektor klonierten Fremdsequenzen ermöglicht.

pBluescript II SK +/- (2.96 kB, Stratagene, Heidelberg). Entspricht dem oben beschriebenen pBluescript II KS +/-, jedoch mit invertierter MCS. In diese Vektoren sind teilweise die von Y. Kohara erhaltenen cDNAs integriert.

pPD129.36 (L4440 "feeding vektor", 2.79 kB, Timmons und Fire, 1998). Dieser Ampicillin-resistente Vektor wird für das so genannte „Feeding“ (RNAi über Fütterung) benutzt. Die Fremdsequenz ist hier von zwei T7-Promotoren flankiert und führt über die Transkription zu dsRNA. In RNase defizienten Bakterien wird diese nicht abgebaut. Werden diese Bakterien vom Wurm aufgenommen, kann RNAi erfolgen. pME18S-FL3 (3,392 kB, Suzuki und Sugano, 2003). Vektor mit Ampicillinresistenz, in den teilweise die von Dr. Y. Kohara (National Institute of Genetics, Mishima, Japan) erhaltenen cDNAs verpackt sind.

7.2.4 Isolierung genomischer DNA

Eine gut abgefressene Platte wird mit dH₂O. geflutet, geschwenkt und die Würmer in ein Reaktionsgefäß überführt. Um die Würmer zu pelletieren werden sie für 1min bei 5000 rpm zentrifugiert und soviel Überstand wie möglich abgenommen. Das Pellet wird mit 0,75 ml *A. dest.* gewaschen, wieder bei 5000 rpm für 1 min zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Das Reaktionsgefäß wird nun für 10 min in flüssigen Stickstoff gegeben, anschließend bei RT aufgetaut und das Volumen mit *A. dest.* auf 100 µl aufgefüllt. Es wird 100 µl 2x Lysispuffer hinzu gegeben und für 1 h bei RT inkubiert. Danach werden Enzyme für 15 min bei 95 °C inaktiviert. Das Lysat kann nun bei 4 °C gelagert werden und ist für PCR-Analysen einsetzbar, es wird aber eine Phenol-Chloroform-Extraktion empfohlen.

Lösungen

2x Lysispuffer

	<u>für 1 l</u>	<u>5 ml</u>
• PCR-Puffer	ad 1 l	ad 5 ml
• 5 mM MgCl ₂	1,01 g	5,05 mg
• 0,9% Nonidet P-40	10 ml	45 µl
• 0,02% Gelatine	0,2 g	1 mg
• 120 µg/ml Proteinase K		

7.2.5 Oligonukleotide

pPD129.36	vorwärts	GATAACCGTATTACCGCCTTTG
	rückwärts	CGATTAAGTTGGGTAACGCCA

Tabelle 4: Primer für den Fütterungsvektor pPD129.36 für Sequenzierungen und PCR-Reaktionen um dsRNA herzustellen

Material und Methoden

Gen	Primer Orientierung	Primersequenz
<i>act-2</i>	vorwärts	TAATACGACTCACTATAGAATCCGTAAGGCAGATGACG
	rückwärts	TAATACGACTCACTATAGATGGTCGGTATGGGACAGAA
<i>act-3</i>	vorwärts	TAATACGACTCACTATAGTTTGTATTGCCCAAAGG
	rückwärts	TAATACGACTCACTATAGGTCGGTATGGGACAGAAGGA
<i>act-4</i>	vorwärts	TAATACGACTCACTATAGGAGTAGAGCGAGAGAGGGCA
	rückwärts	TAATACGACTCACTATAGCAAGAGCGGTGATTTCCCTTC
<i>ama-1</i>	vorwärts	TAATACGACTCACTATAGATAACTGGGAGACGTCGGTG
	rückwärts	TAATACGACTCACTATAGATCAATCGTCAGGAGGTTGG
<i>cdc-42</i>	vorwärts	TAATACGACTCACTATAGGTTTTGGCATTTCAGGGAA
	rückwärts	TAATACGACTCACTATAGACGTGTGCGTGACATTTAT
<i>cyb-1</i>	vorwärts	TAATACGACTCACTATAGGAGCTCTCCGAGACACTTGG
	rückwärts	TAATACGACTCACTATAGGAAACTGCGCAAAGTCACA
<i>cyb-2.1</i>	vorwärts	TAATACGACTCACTATAGAATCGAGCAATGCGAGTTCT
	rückwärts	TAATACGACTCACTATAGCCAAGAACAAACCTGGAGGA
<i>cyb-3</i>	vorwärts	TAATACGACTCACTATAGTCCCATGGTGAGTGCTTCA
	rückwärts	TAATACGACTCACTATAGCTGGGAAAGTCGAGAACGAG
<i>cye-1</i>	vorwärts	TAATACGACTCACTATAGAAACGAGACGAAATTCCACG
	rückwärts	TAATACGACTCACTATAGTGAATCCTCTCTCGTTCGCT
<i>cyk-1</i>	vorwärts	TAATACGACTCACTATAGCTTGACCAACGACTCCCAAT
	rückwärts	TAATACGACTCACTATAGTGGTCCCATGAGAAAGTTCC
<i>cyk-4</i>	vorwärts	TAATACGACTCACTATAGAGCATGCGATTACTGCTG
	rückwärts	TAATACGACTCACTATAGCGAGCCGTTTCAATTTGATT
<i>dlg-1</i>	vorwärts	TAATACGACTCACTATAGTGAGGAGCTACGCACAAACCTGG
	rückwärts	TAATACGACTCACTATAGTCCCTTAACCAGATCAATGACGG
<i>dnc-1</i>	vorwärts	TAATACGACTCACTATAGTGATAAGGTCAAACATCTCGAGGA
	rückwärts	TAATACGACTCACTATAGGTTTTCGAGCCCGCTTGAGCAAGTT
<i>emr-1</i>	vorwärts	TAATACGACTCACTATAGGGTGTCCGGCTTTTATACCA
	rückwärts	TAATACGACTCACTATAGAAATCGCCCTTCTCAATTT
<i>eri-1</i>	vorwärts	TAATACGACTCACTATAGCGAACCTATGTCCGACCTGT
	rückwärts	TAATACGACTCACTATAGGTCTGTTTCCAACCTCTCGC
<i>haf-6</i>	vorwärts	TAATACGACTCACTATAGCCGCACGGAGTTTATGTTTT
	rückwärts	TAATACGACTCACTATAGTTTTTCCCAGTTTTCAACCG
<i>inx-3</i>	vorwärts	TAATACGACTCACTATAGGTGTGGAATCCCCAGAGAAA
	rückwärts	TAATACGACTCACTATAGGTTTCATTGATCGGTGGCTCT
<i>ipp-5</i>	vorwärts	TAATACGACTCACTATAGTGAATGCTCACAGCAAGTCC
	rückwärts	TAATACGACTCACTATAGGGGTGCCCTAGTCTTCATCA
<i>itr-1</i>	vorwärts	TAATACGACTCACTATAGCTTAAAGTTTTCTCCGGCATT
	rückwärts	TAATACGACTCACTATAGTGACATTTCAATTCAGTGTTTC
<i>let-502</i>	vorwärts	TAATACGACTCACTATAGTGAAGATGAATGCCAATGGA
	rückwärts	TAATACGACTCACTATAGTTCGGTTAAATGTCTTCGGC
<i>pha-1</i>	vorwärts	TAATACGACTCACTATAGTAAACAAATCCTCAGGCGG
	rückwärts	TAATACGACTCACTATAGTACGAAAAGGAGGCATTTGG
<i>sid-1</i>	vorwärts	TAATACGACTCACTATAGGAAATGGCGCTTAACCAAAA
	rückwärts	TAATACGACTCACTATAGTGTCTTCGCTGGAATTAG
<i>spd-2</i>	vorwärts	TAATACGACTCACTATAGGAATGCATCAATGGCAGATG
	rückwärts	TAATACGACTCACTATAGAATTTTGTGCCGGTACTTCG
<i>spd-5</i>	vorwärts	TAATACGACTCACTATAGGAACGAGAGCAACAGCATGA
	rückwärts	TAATACGACTCACTATAGGATGGCGGATTTTGTGAGTT
<i>tac-1</i>	vorwärts	TAATACGACTCACTATAGTATAAGGCGGAAAGCGAAAA

Material und Methoden

	rückwärts	TAATACGACTCACTATAGTGTGCTCAACACAACCTTC
<i>tba-1</i>	vorwärts	TAATACGACTCACTATAGCTCGAAGCAACTGTTGGTGA
	rückwärts	TAATACGACTCACTATAGATTGAGCCGGAATTGTCAAC
<i>tba-2</i>	vorwärts	TAATACGACTCACTATAGTTTGGAACGACGTCTCCTCT
	rückwärts	TAATACGACTCACTATAGTTGGGCTCACTTTCGTCTCT
<i>tbb-1</i>	vorwärts	TAATACGACTCACTATAGAAATTATCCTGCCCGTTTC
	rückwärts	TAATACGACTCACTATAGTGTGAATACGCCGAATTTGA
<i>tbb-2</i>	vorwärts	TAATACGACTCACTATAGTTAATTTCTTATTTTCGCCGTGA
	rückwärts	TAATACGACTCACTATAGCATTCACTTCACTCAGATGCAAA
<i>tbg-1</i>	vorwärts	TAATACGACTCACTATAGCAGTGCAGCATTATCGAGGA
	rückwärts	TAATACGACTCACTATAGATCTCCAGATGTCCGGTACG
<i>unc-59</i>	vorwärts	TAATACGACTCACTATAGGCGAGGCATTCAAATTTTTC
	rückwärts	TAATACGACTCACTATAGTAGCCTCACCCACTTTTCCA
<i>unc-61</i>	vorwärts	TAATACGACTCACTATAGTCAGACTCAAAGCCCTCGAT
	rückwärts	TAATACGACTCACTATAGTGAACTCGTCTTGATGCTCG
<i>zyg-1</i>	vorwärts	TAATACGACTCACTATAGGGATGACGACCAGCTGTTTT
	rückwärts	TAATACGACTCACTATAGTTCCCAAATGCCAAAAGAAG

Tabelle 5: Verwendete Oligonukleotide die im Rahmen dieser Arbeit für die Herstellung von dsRNA, verwendet wurden.

Primer	Primersequenz
T7	TAATACGACTCACTATAG
<i>cyb-3.1</i>	atccaattgctcagcctgcttCTATAGTGAGTCGTATTA
<i>cyb-3.2</i>	tgagacccttgctgtgttcttCTATAGTGAGTCGTATTA
<i>cyb-3.3</i>	ccagagatgtgtgcgcggagctCTATAGTGAGTCGTATTA
<i>cyb-3.4</i>	tctcactcgaagtgaacttctCTATAGTGAGTCGTATTA
<i>cyb-3.5</i>	tgcagcagtggtggagatcgctCTATAGTGAGTCGTATTA
<i>cyb-3.6</i>	cggtggcgaagagttcacgctcCTATAGTGAGTCGTATTA
<i>cyb-3.7</i>	agtggtagccgagatcatatcCTATAGTGAGTCGTATTA
<i>cyb-3.8</i>	cgtagaccatcagtgatgtctcCTATAGTGAGTCGTATTA
<i>cyb-3.9</i>	gattgtgagaccatagcgtattCTATAGTGAGTCGTATTA
<i>cyb-3.10</i>	aatccacaaccttgagggtatcCTATAGTGAGTCGTATTA

Tabelle 6: Verwendete Primer die zur Herstellung von *cyb-3* siRNAs verwendet wurden. Die T7 Sequenz ist in Großbuchstaben dargestellt.

Gen	Primer Orientierung	Primersequenz
<i>ifo-1</i>	vorwärts	CGAATACGATTTTCAGCATGGGAGA
	rückwärts	GGTCAATGCATAGATGTATCGAC
	vorwärts	CCCCGAATCGCCTACTTCCTTCT
	rückwärts	TTCAGTTCATCCAGTTTATCATC
	vorwärts	ACGACGGAACATCACGACTTCCAT
	rückwärts	ACTACGACGGAACATCACGACTT
	vorwärts	TGAATACTTGACTTGAAATTTA
	rückwärts	CTAGAGGCAATGAAATCAACGGAG

	vorwärts	TCCAGTGCCAGCTAAACGTCATT
	rückwärts	CGTGCCAACTCTCGACCAACGAC
	vorwärts	GACGAGCATATTGACAAGCCACT
	rückwärts	ATTGAGGCACACATTCCGGTTAA
	vorwärts	ACATATTCATCACTATCACACAA
	rückwärts	TAGATGAGCACAGTGAACATGGT
	vorwärts	TGGAACCAGGTATTTGACATTTT
	rückwärts	CAATTTTCATCTCCGTTGATTTCA

Tabelle 7: Primer die für die Sequenzierung von *ifo-1* benutzt wurden

7.2.5.1 Photometrische Konzentrationsbestimmung

Bei einer Wellenlänge von 260 nm wird die Extinktion (E) der Nukleinsäurelösung gemessen und so die Konzentration der Nukleinsäuren bestimmt. Die Nukleinsäuren werden dabei in dH₂O. verdünnt (RNA in Nuklease-freiem Wasser) und ihre Extinktion im Photometer gegen Wasser als Referenz gemessen. Hierbei gilt das Lambert-Beer'sche Gesetz, welches die Beziehung zwischen Extinktion und Stoffkonzentration wiedergibt: $E_{260} = \epsilon \cdot c \cdot d$, wobei E der Extinktionskoeffizient, c die Stoffkonzentration und d die Dicke der Küvette ist.

Die Reinheit der Nukleinsäuren lässt sich weiterhin durch den Quotienten E_{260}/E_{280} bestimmen, bei fast proteinfreien Nukleinsäurelösungen liegt der Quotient bei 1.8 für DNA und 2.0 für RNA.

7.2.5.2 Konzentrationsbestimmung durch Gelelektrophorese

Bei dieser Methode wird ein Teil der zu bestimmenden Nukleinsäure auf ein Agarosegel aufgetragen und die Konzentration wird im Vergleich zu einem Längenstandard bekannter Konzentration aufgrund der Bandendicke abgeschätzt.

7.2.6 DNA-Gelelektrophorese

Bei der Elektrophorese wandert die DNA, da sie aufgrund des Phosphatrückgrats negativ geladen ist, in einem elektrischen Feld von der Kathode (dem Minuspol) zur Anode (dem Pluspol). Die Wanderungsgeschwindigkeit ist dabei abhängig von der Form und Größe der DNA, ihrer Ladung, dem pH-Wert, der Temperatur, der Viskosität und der Feldstärke. Die DNA wird in Agarosegelen aufgetrennt. Agarose ist ein Polysaccharid, welches ein maschiges Netz ausbildet, je höher die Agarose konzentriert ist, desto feinmaschiger ist sie und desto kleinere DNA-Fragmente lassen sich dadurch auftrennen.

Die Agarose wird mit 1x TAE in der Mikrowelle aufgeköcht, auf 70 °C abgekühlt und mit 1 µl einer Ethidiumbromid(EtBr)-Stammlösung auf 100 ml Gel versetzt. Es wurden im Durchschnitt immer 1%, horizontale Agarosegele gegossen. Als Laufpuffer diente 1x TAE. Die Gelläufe wurden bei durchschnittlich 100 Volt (V) durchgeführt. In die DNA-Proben wird als Auftragspuffer Bromphenolblau und Xylencyanol gegeben, welche als Lauffront sichtbar sind. Ist das Gel weit genug gelaufen, kann es unter UV-Licht (~312 nm) betrachtet werden. Das Ethidiumbromid, ein DNA Interkalator, wird durch das UV-Licht angeregt und so wird die DNA auf dem Gel sichtbar. Zur Größenbestimmung der DNA-Fragmente wird ein Größenstandard mit DNA-Fragmenten definierter Größe auf

dem Gel mitlaufen gelassen, so wird anschließend die Laufstrecke der DNA mit der des Standards verglichen. Als Größenstandard wurde die GeneRuler 1 kB DNA-Leiter (Fermentas, St. Leon Rot) verwendet.

Lösungen:

50 x TAE-Puffer:	2 M Tris-acetat; 0.1 M EDTA; pH 7.7
EtBr-Stammlösung :	10 mg/ml
6 x Auftragspuffer:	0.25% Bromphenoblau; 0.25% Xylencyanol; 40% Glycerin

7.2.7 siRNAs Gelelektrophorese

Um den Phosphorylierungszustand der *cyb-3* siRNAs zu überprüfen, wurde eine Gelelektrophorese mit einem 12% Gel mit einem Verhältnis von 9:1 Acrylamid:bis-bisAcrylamid durchgeführt. Das Gel beinhaltet weiter 8M Harnstoff und 100 mM Tris, 90 mM Borsäure, 1 mM EDTA (1 x TBE). Als Laufpuffer wurde 1x TAE verwendet, als Größenstandard die O`RangeRuler 5 Bp DNA Leiter (Fermentas, St. Leon Rot). Die Gelläufe wurden bei 50 V durchgeführt. Um die RNA zu färben wurde die Gele für 30 min. in SYBRGoldlösung (Invitrogen, Molecular Probes, Inc., Karlsruhe) inkubiert, und unter UV Licht betrachtet.

7.2.8 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR dient zur Amplifizierung einzelner Sequenzen. Voraussetzung ist allerdings die Anwesenheit spezifischer Oligonukleotide ("Primer"), die an homologe Sequenzen der DNA binden. Um unspezifische Bindungen der Primer zu vermeiden, wird eine möglichst hohe Annealing-Temperatur gewählt (in Abhängigkeit vom T_m-Wert der verwendeten Primer). Diese Primer dienen wiederum als Startermoleküle für das Enzym Taq Polymerase, einer Polymerase, die aus dem hitzebeständigen Bakterium *Thermus aquaticus* isoliert wurde. Taq-Polymerase ist für die PCR hervorragend geeignet, da sie bei hohen Temperaturen sehr aktiv ist bzw. nicht denaturiert wird. Allerdings besitzt die Taq-Polymerase keine 3'-5'-Exonuclease, ist also nicht zum Korrekturlesen fähig, so dass eine statistische Wahrscheinlichkeit von Fehleinbau gegeben ist.

Die PCR läuft generell in drei sich wiederholenden Schritten ab:

1. Denaturierung (ca. 93 °C) zur Herstellung von Einzelstrang-Templates.
 2. Annealing (variable Temperatur, s.o.) der "sense-" und "antisense-Primer" an die DNA-Einzelstränge.
 3. Elongation der Primer (ca. 72 °C) durch die entsprechende Polymerase.
- Pro Zyklus (=Abfolge aller drei Schritte, s.o.) wird die Menge der DNA-Stränge verdoppelt.

PCR-Reaktionen wurden in einem Volumen von 50 µl in folgender Zusammensetzung angesetzt:

Template:	X µl (1-10 ng Vektor DNA, 50-100 ng genomische DNA; abhängig von der Konzentration des Templates)
Primer:	1 µl (je Primer; Konzentration: 50 pmol/µl)
dNTP´s:	1 µl (aus einem dNTP-Mix; Konzentration: 10 mmol/µl)
5 x Tac-Puffer:	5 µl PCR
MgCl ₂ :	4 µl (nur für Taq-Polymerase, Konzentration 25 mM)

Taq-Polymerase: 0,25 µl (10 U/µl)
dH₂O: X µl (mit dH₂O auf 50 µl Gesamtvolumen auffüllen)

PCR-Reaktionen wurden mit folgendem Programm durchgeführt:

Schritte	Temperatur (C°)	Dauer
1. Initiale Aktivierung	95	1 min
2. Denaturierung der DNA	95	30 s
3. Annealing der Primer	50-65	1 min
4. DNA-Synthese	72	pro kB 1 min
5. Wiederholung der Schritte 2-4 (29 Zyklen)		
6. Finale DNA-Synthese	72	10 min
7. Reaktionsende	8	endlos

Tabelle 8: PCR-Programm, das im Rahmen dieser Arbeit benutzt wurde

7.2.9 Herstellung elektrotransformationskompetenter Bakterien

Um eine Transformation von Plasmid-DNA in Bakterien zu ermöglichen, müssen diese kompetent gemacht werden. Die hier gewählte Transformationsmethode ist die Elektrotransformation.

Elektrokompetente Bakterien wurden nach folgendem Protokoll hergestellt:

- 50 ml SOB-Medium mit einer Einzelkolonie animpfen und über Nacht bei 37 °C inkubieren
- 7.5 ml dieser Bakteriensuspension zu 500 ml SOB-Medium hinzufügen und bis zu einer optischen Dichte von 0.6 (bei 550 nm; OD₅₅₀) anwachsen lassen
- Die Bakterienkultur wird auf 2x 250 ml Zentrifugenbecher verteilt und für 15 min auf Eis abgekühlt
- Zentrifugation bei 3600 rpm und 4 °C für 15 min; Überstand verwerfen
- Bakterienpellets in je 200 ml Glycerin (10%) vollständig resuspendieren
- Zentrifugation bei 3800 rpm und 4 °C für 15 min
- Wiederholung der letzten beiden Schritte
- Überstand verwerfen, Bakterienpellets in je 20 ml Glycerin (10%) resuspendieren und Suspension in zwei JA20-Röhrchen überführen
- Zentrifugation bei 5000 rpm und 4 °C für 10 min; Überstand verwerfen
- Ein Pellet in 3 ml Glycerin (10%) resuspendieren, mit dem zweiten Pellet vereinigen und dieses ebenfalls resuspendieren
- In Volumen von je 50 µl aliquotieren, in flüssigem Stickstoff schockgefrieren und bei -70 °C lagern.

Lösungen:

SOB-Medium: 20 g Bacto-Tryptone, 5 g Bacto-Hefe Extrakt, 8.5 mM NaCl, 2.5 mM KCl, auf pH 7.0 einstellen und autoklavieren.
Vor Gebrauch auf 100 mM MgCl₂ einstellen

7.2.10 Elektrotransformation kompetenter Zellen mit Plasmid-DNA

- 50 µl kompetente Bakterien auf Eis auftauen lassen
- Zugabe von 1 µl einer verdünnten DNA-Lösung (~20 ng/µl)

- Ansatz in die Elektroküvette füllen, so dass das Volumen zwischen den Kondensatorplatten ausgefüllt ist.
- Elektroschock der Bakterien mit 1.8 kV, Zeitkonstanten von 4.8 bis 5.0 ms sind akzeptabel
- Dem Ansatz 450 µl LB-Medium hinzufügen
- 30-45 min bei 37 °C inkubieren
- Ansatz auf antibiotikahaltigen Agarplatten ausplattieren und über Nacht bei 37 °C inkubieren

Lösungen:

LBMedium: 10 g Bactotrypton, 5 g Bacto yeast extract, 10 g NaCl, in 1 l dH₂O auflösen

7.2.11 *in vitro* Transkription

Doppelsträngige RNA für RNAi-Experimente wird entweder von den Fütterungs-Konstrukten (siehe Anhang) hergestellt, welche zwei T7 Promotoren besitzen, oder von genomischer DNA.

7.2.11.1 Herstellung des Templates für dsRNA

Das Template für die Transkriptionsreaktion wird mittels einer Standard-PCR-Reaktion (s. 8.2.8) mit für den "Fütterungsvektor" pPD129.36 spezifischen Primern (Tabelle 4) hergestellt.

Das Template aus genomischer DNA wird mit Primern hergestellt, an die jeweils an das 5'-Ende eine T7 Erkennungssequenz gehängt wurde (siehe Tabelle 5).

7.2.11.2 Herstellung des Templates für siRNAs

Folgende Komponenten werden gemischt:

- 40 µl 100 µM T7 Promoter DNA Oligonukleotid
- 40 µl 100 µM Template DNA Oligonukleotid
- 40 µl 20x TSE (0,1 M Tris-HCL (pH 7,5), 0,4 M NaCl, 2 mM EDTA)

Das Annealing der Oligonukleotide findet anschließend für 7 min. bei 70 °C, für 20 min. bei 37 °C und für 10 min. bei Raumtemperatur statt. Danach werden 100 µl Phenol hinzugegeben und die Lösung für 2 min, bei Raumtemperatur (RT) kräftig geschüttelt. Zur DNA Extraktion werden 200 µl Chloroform hinzugegeben. Die Fällung der Oligonukleotide erfolgt mit Ethanol bei RT für 2 h, oder ü/N bei -20 °C. Die Oligonukleotide werden dann in 100 µl 1x TSE (5 mM Tris-HCL (pH 7,5), 29 mM NaCl und 0,1 mM EDTA) resuspendiert.

7.2.11.3 Transkriptionsreaktion

Die eigentliche Transkriptionsreaktion erfolgt mit dem MAXIscript™ T7 Kit (Ambion), der Transkriptionsansatz sieht wie folgt aus:

- 3 µl unaufgereinigtes PCR-Produkt
- 2 µl 10x Transkriptionspuffer
- je 1 µl rNTP's (also 4 µl gesamt)
- 0.2 µl RNase Inhibitor

- 2 µl T7-Polymerase
- auf 20 µl mit DEPC-H₂O auffüllen

Es folgt eine Inkubation für 2-4 h bei 37 °C. Dann werden je Ansatz 1 µl RNase freie DNase hinzugeben und 15 min bei 37 °C inkubiert. Es folgt eine Zugabe von 115 µl DEPC-Wasser und eine Zugabe von 15 µl Ammoniumacetat-Stopplösung zum Reaktionsstop und zum Fällern der RNA. Nach einer Phenol-Chlorophorm Extraktion wird 1 Vol. Isopropanol zugegeben und die RNA über Nacht (ü. N.) bei -20 °C (siehe unten) gefällt.

7.2.11.4 Transkriptionsreaktion für siRNAs

Die eigentliche Transkriptionsreaktion erfolgt ebenfalls mit dem MAXIscript™ T7 Kit (Ambion), der Transkriptionsansatz sieht wie folgt aus:

- 10 µl DNA Template
- 8 µl 10x Transkriptionspuffer
- je 4 µl rNTP's (also 16 µl gesamt)
- 0.8 µl RNase Inhibitor
- 8 µl T7-Polymerase
- auf 80 µl mit DEPC-H₂O auffüllen

Es folgt eine Inkubation für 4 h bei 37 °C. Dann werden je Ansatz 1 µl RNase freie DNase hinzugeben und 15 min bei 37 °C inkubiert. Es folgt eine Zugabe von 115 µl DEPC-Wasser und eine Zugabe von 60 µl Ammoniumacetat-Stopplösung zum Reaktionsstop und zum Fällern der RNA. Nach einer Phenol-Chlorophorm extraktion wird 1 Vol. Ethanol zugegeben und die RNA ü. N. bei -20 °C (siehe unten) gefällt.

7.2.11.5 Phenol-Chlorophorm Extraktion

Die Phenol-Chlorophorm Extraktion dient dazu, die RNA von Verschmutzungen zu reinigen. Nach Zugabe von gleichem Volumen Phenol wird der Ansatz kurz gevortext und anschließend für 1 min bei 13.000 „rounds per minute“ (rpm) zentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Es wird das gleiche Volumen Chlorophorm zugefügt und verfahren wie oben.

7.2.11.6 Fällung von RNA

Um DNA aufzukonzentrieren, wird diese mit Ethanol bzw. Isopropanol in Gegenwart monovalenter Salze gefällt. Ethanol bzw. Isopropanol verhindern die Ausbildung von Hydrathüllen, indem sie der RNA die Wassermoleküle entziehen und so für ihre Aggregation sorgen. Durch die in der Lösung ionisch vorliegenden Salze wird die RNA schließlich stabilisiert.

Die Fällung verläuft folgendermaßen:

- Zugabe von 1 Vol. Isopropanol/Ethanol
- Fällung über Nacht bei -20 °C oder 2 h bei -70 °C
- Zentrifugation für 30 min bei 13000 rpm
- Überstand verwerfen, Pellet in eiskaltem 70 % Ethanol waschen
- Zentrifugation für 15 min bei 13000 rpm
- Überstand verwerfen und Pellet lufttrocknen lassen
- Pellet in 12 µl DEPC-dH₂O aufnehmen und resuspendieren

7.2.11.7 Dephosphorylieren der siRNAs

Um zu testen, ob die siRNAs (siehe 7.2.10.4) dreifachphosphoryliert sind, sollten sie mit CIAP dephosphoryliert werden und auf einem Gel (siehe 7.2.6) zusammen mit nicht behandelten siRNAs aufgetrennt werden. Mit folgendem Ansatz sollten die siRNAs dephosphoryliert werden:

- 5 µl siRNA
- 1 µl CIAP
- 2,5 µl CIAP Puffer
- 16,5 µl dH₂O

Der Ansatz wurde für 30 min. bei 37 °C inkubiert. Zur Inaktivierung des CIAP Enzyms wurde der Ansatz im Anschluss für 10 min bei 60 °C inkubiert.

7.3 Zellbiologische Methoden

7.3.1 *C. elegans* Stämme und ihre Haltung

Der Wildtyp Stamm N2 (Varietät Bristol) und die transgenen Stämme OLB11, JM149, (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. McGhee, Calgary), BJ49, BJ155 werden im Rahmen dieser Arbeit verwendet. Sie werden unter Standardbedingungen (Brenner, 1974) bei 15 °C, 18 °C oder RT auf Agarplatten gehalten wobei der Uracil-bedürftige *E.coli*-Stamm OP50 als Nahrungsquelle dient. Die mutanten Stämme *ifo-1(kc2)* und *ifo-1(kc3)* wurden bei 15 °C bzw. 18 °C gehalten.

kleine Agarplatten

pro Liter: 20 g Agar, 3 g NaCl, 2.5 g Pepton 140. Nach dem Autoklavieren werden noch hinzu gegeben: 1 ml Lösung A, 0.5 ml Lösung B, 1 ml Lösung C, 25 ml Lösung D

angereicherte Agarplatten

pro Liter: wie kleine Agarplatten, jedoch zusätzlich 5g Bacto-Hefeextrakt

Lösungen (pro Liter):

Lösung A: 5 g Cholesterin in EtOH

Lösung B: 110.8 g CaCl₂

Lösung C: 246.5 g MgSO₄ x 1 H₂O

Lösung D: 108.3 g KH₂PO₄; 36 g K₂HPO₄

7.3.2 Herstellung Agarose-beschichteter Objektträger und Deckgläser

7.3.2.1 Für *in vivo*-Beobachtung

Um Embryonen *in vivo* beobachten zu können werden sie auf Agarose-beschichtete Objektträger transferiert. Hierfür wird eine 2-5% Agaroselösung in dH₂O in der Mikrowelle aufgekocht und ein Tropfen dieser Lösung auf einen Objektträger gegeben. Durch Auflegen eines zweiten Objektträgers wird die Agarose gespreizt. Nach dem Erhärten der Agarose wird der zweite Objektträger durch vorsichtiges Hin- und Herschieben entfernt. Die Embryonen werden dann in 2-5 µl dH₂O auf die

Agaroseschicht gegeben und mit einem Deckglas abgedeckt, welches mit Vaseline abgedichtet wird.

7.3.2.2 Für Mikroinjektion

Für die Mikroinjektion werden Agarose-beschichtete Deckgläser benötigt. Hierfür wird ebenfalls eine 2-3% Agaroselösung in dH₂O aufgeköcht. Diese wird auf einem Deckglas gespreizt und 2-3 h bei 70 °C bis zur Austrocknung der Agarose inkubiert. Für Antikörperfärbungen von Embryonen werden Polylysin-beschichtete Objektträger benötigt. Die positiv geladene Polylysinschicht bewirkt ionische Wechselwirkung mit negativ geladenen Komponenten der Eihülle, so dass diese auf dem Objektträger „festkleben“.

7.3.3 Herstellung Polylysin-beschichteter Objektträger

Für Antikörperfärbungen an Embryonen (siehe Abschnitt 2.3.6) werden diese auf Polylysin-beschichtete Objektträger transferiert. Durch die positiv geladene Polylysinschicht bleiben die Embryonen aufgrund der Wechselwirkung mit negativ geladenen Komponenten der Eihülle des Embryos am Objektträger kleben. Die Objektträger werden folgendermaßen angefertigt:

- 200 ml dH₂O auf 60 °C erwärmen
- 400 mg Gelatine darin lösen und auf 40 °C abkühlen lassen
- 40 mg CrK(SO)₂ x 12H₂O hinzufügen und gut vermischen
- Jeweils 1 ml dieser Lösung mit 1 mg Polylysin mischen
- Lösung für 12 h bei 4 °C stehen lassen

Ein Tropfen der gebrauchsfertigen Lösung wird auf einem sauberen Objektträger gleichmäßig ausgestrichen und luftgetrocknet. Gegen Staub geschützt werden die Objektträger im Kühlschrank aufbewahrt und können so mehrere Monate benutzt werden.

7.3.4 RNA vermittelte Interferenz (RNAi); Mikroinjektion, Fütterung, Auswertung

7.3.4.1 Mikroinjektion

Um in *C. elegans* mit Hilfe der RNAi Technik (s. Einleitung) ein bestimmtes Gen auszuschalten, wird in die Gonade dsRNA injiziert. Für die Mikroinjektion diente das inverse Mikroskop Leica DM IRB, durch welches das Präparat auf dem Objektisch frei zugänglich für die Injektionsnadel ist. Für die Injektionen werden spezielle Nadeln benötigt (GB 120 F-10, Science Products, Hofheim), die in einem Mikropipettenpuller (Sutter P-97; Science products, Hofheim) fein ausgezogen werden. Die Nadeln sollten möglichst immer „frisch gezogen“ werden. Sie werden mit einer fein ausgezogenen Pasteurpipette von hinten mit der dsRNA gefüllt und in den Halter eingespannt. L4-Larven oder junge Adulte mit wenig Embryonen im Uterus werden zunächst von der Agarplatte in einen Tropfen dH₂O überführt. Hier werden sie von den *E. coli* gesäubert. Dann wird ein Wurm auf ein mit Agarose beschichtetes Deckglas gegeben, auf dem sich ein Tropfen Voltalef-Öl (10 S) befindet. Mit Hilfe einer an einer Pipette klebenden Wimper wird der Wurm auf die Agarose gedrückt, dadurch dehydriert und somit immobilisiert. Nun wird das Deckglas auf dem Objektisch der Injektionsapparatur fixiert

und der Wurm bei zehnfacher Vergrößerung in die Fokusebene des Mikroskops gebracht. Die Injektionsnadel wird so justiert, dass sie sich in der Nähe der Gonade befindet. Die Injektion erfolgt schließlich bei 40 x Vergrößerung. Hierbei wird die Nadelspitze in die gleiche Fokusebene wie die Rachis (der Versorgungskanal der Gonade) gebracht und mit Hilfe eines Piezo Mikromanipulators in den Wurm gestochen. Die Injektion erfolgt mit Hilfe von Druck (Stickstoff), wobei es zu einem langsamen, kontinuierlichen Ausstrom der dsRNA kommen sollte. Nach beendeter Injektion wird der Wurm in einen Tropfen 1 x PBS gebracht, wo er rehydriert und wieder anfängt sich zu bewegen. Mit Hilfe einer fein ausgezogenen Pasteurpipette wird der Wurm aufgesaugt und auf eine frische Agarplatte überführt.

7.3.4.2 RNAi über Fütterung

RNAi kann über das Füttern spezieller RNase III defizienter Bakterien (HT115, s. 7.2.1) erfolgen. Diese Bakterien müssen die Zielsequenz in Form einer cDNA in einem speziellen Vektor (pPD129.36, s. 7.2.3) tragen. 50 µl IPTG (0,5 M) wird auf einer kleinen Agarplatte (Durchmesser: 5.3 cm, Ampicillin-, Tetracyclin-selektion) verstrichen und für ca. 30 min. bei RT trocknen gelassen. 120 µl einer über Nacht Kultur der HT115 Bakterien werden dann auf die Agarplatten gegeben und über Nacht bei RT inkubiert. Der RNAi Versuch wird durch Zugabe von L4 Larven oder jungen adulten Würmern gestartet.

7.3.4.3 Auswertung von RNAi-Tieren

Die Würmer werden nach einem Tag auf neue Fütterungsplatten gesetzt. Am nächsten Tag werden sie von den RNAi Fütterungsplatten gepickt. Anschließend können die Embryonen aus den Würmern für die gewünschten Untersuchungen präpariert werden. Als Kontrolle werden die auf den RNAi Fütterungsplatten abgelegten Eier gezählt und nach ca. 20 h wird überprüft, ob Nachkommen geschlüpft sind.

7.3.5 Auswertung der Tiere für den RNAi-Screen

Die Tiere wurden als Embryonen auf die Fütterungs-Platten gesetzt. Die erste Auswertung dieser Tiere erfolgte nach drei Tagen am Fluoreszenz-Mikroskop. Nach 6 Tagen wurden sowohl die Tiere die nur postembryonal RNAi ausgesetzt waren, als auch deren Nachkommen ausgewertet.

7.3.6 *in vivo*-Beobachtungen von Embryonen

Für *in vivo* Beobachtungen werden präparierte Embryonen mit etwas dH₂O. auf einen Agarose-beschichteten Objektträger überführt. Ein mit Vaseline-umrandetes Deckglas wird aufgelegt, wobei die Vaseline zum Versiegeln des Präparates dient. Anschließend werden die Embryonen durch Druck auf die Ränder des Deckglases leicht gequetscht, um am Mikroskop ein optimales DIK Bild zu erhalten. Die Bilder werden mit dem Programm OpenLab der Firma Improvision aufgenommen und anschließend in das Bildverarbeitungsprogramm Photoshop importiert. Auch adulte Würmer konnten so DIK-Mikroskopie beobachtet und dokumentiert werden.

7.3.7 Immunfluoreszenzfärbung an Embryonen

Präparierte Embryonen werden mit einem Tropfen dH₂O auf Polylysin-beschichtete Objektträger überführt. Um sehr frühe Embryonalstadien zu erhalten, empfiehlt es sich die gewünschten Würmer direkt auf dem Polylysin-beschichteten Objektträger zu zerschneiden. Das Festkleben der Embryonen wird dann durch Anstrudeln mit Luft überprüft. Anschließend wird ein Deckglas aufgelegt und die Embryonen durch Absaugen des Wassers mit etwas Zellstoff gequetscht. Dabei ist darauf zu achten, dass nicht zu stark gequetscht wird, da die Embryonen sonst platzen. Direkt nach dem Quetschen wird der Objektträger für ca. 10 min in flüssigen Stickstoff eingetaucht. Die weitere Fixierung der Embryonen läuft dann wie folgt ab:

- absprengen des Deckglases mit Hilfe eines Skalpells
- 10 min in Methanol (-20 °C)
- 20 min in Aceton (-20 °C)
- 5 min in 90 % Ethanol (-20 °C)
- 5 min in 60 % Ethanol (-20 °C)
- 5 min in 30 % Ethanol (RT)
- 2 x 5 min in TBST waschen (RT)

Während der Fixierung wird der primäre Antikörper in der gewünschten Verdünnung in Blockierlösung gegeben. Ein Tropfen der Antikörperlösung (30-40 µl) wird auf das Präparat gegeben und ein Deckglas aufgelegt. Die Inkubation erfolgt über Nacht bei 4 °C in einer feuchten Kammer. Anschließend wird das Präparat für 2 x 5 min in TBST gewaschen. Der sekundäre Antikörper (gekoppelt mit einem Fluoreszenzfarbstoff) wird 1:200 in Blockierlösung verdünnt und ein Tropfen (40 µl) auf das Präparat gegeben. Die Inkubation erfolgt für 1,5 h bei RT. Anschließend wird wieder für 2 x 5 min in TBST gewaschen. Ist DNA-Färbung erwünscht, wird das Präparat in 30 µl DNA-Färbelösung für 30-45 min inkubiert. Darauf wird wieder für 2 x 5 min in TBST gewaschen. Anschließend wird ein Tropfen Mowiol auf das Präparat gegeben und mit einem Deckglas versiegelt. Um ein Ausbleichen des Objekts bei Fluoreszenzanregung zu verhindern, sind dem Mowiol einige Kristalle DABCO (1,4-Diazabicyclo[2,2,2]octan) beigemischt. Die Präparate werden bei 4 °C gelagert. Die Beobachtung der Präparate erfolgte am konfokalen Lasermikroskop Leica TCS NT (Leica, Heidelberg). Embryonen wurden in Schnittprojektionen variabler Anzahl aufgenommen, wobei die Schichtdicke zwischen 0,5 und 1 µm lag. Als sekundäre Antikörper wurden Cy2, Cy3 und Alexa (486 nm) gekoppelte Antikörper aus Esel und Ziege verwendet.

Lösungen:

- TBST: 20 mM Tris/Cl pH 8.0, 150 mM NaCl, 0.2% Tween 20
- Blockierlösung: 1% BSA, 1% fettfreies Milchpulver, 0.02% Natriumazid; gelöst in TBST
- DNA-Färbelösung: YOYO-1 (1 mM; 1:40000; Molecular Probes, Leiden; NL) und RNase H (1 mg/ml; 1:10000) in TBST
- Mowiol: 5 g Eluanol (Hoechst) in 20 ml 1 x PBS pH 7.4 lösen, 16 h rühren
10 ml Glycerin zugeben, 16 h rühren und zu je 1 ml aliquotieren. 15 min bei 12000 rpm zentrifugieren; 1 mg/ml p-Phenylendiamin zum Überstand hinzufügen und lösen. Solange mit Mercaptoethanol versetzen, bis die Lösung wieder hell wird.

Die folgende Tabelle zeigt eine Auflistung der im Rahmen dieser Arbeit für Färbungen verwendeten primären Antikörper:

Bezeichnung	Ursprung	Erkennt	Eingesetzt	Referenz
anti-4A1	Maus	α -Tubulin	1:40	Piperno und Fuller (1985)
anti-HMP-1	Maus	α -Catenin	1:2	Costa et al., 1998
MH33	Maus	IFB-2	1:100	Francis und Waterston (1985)
anti-DLG-1	Kaninchen	DLG-1	1:6000	Segbert et al., 2004
anti-IFC-2	Meerschwein	IFC-2	1:10	Karabinos et al., 2002
anti-ERM-1	Kaninchen	ERM-1	1:100	van Fürden et al., 2004
MH27	Maus	AJM-1	1:10	Francis und Waterston (1985)
anti-LET-413	Kaninchen	LET-413	1:1000	Legouis et al., 2000
anti-PAR-3	Maus	PAR-3	1:50	Nance et al., 2003
ani-GFP	Maus	GFP	1:100	Molecular Probes
ani-GFP	Kaninchen	GFP	1:100	Molecular Probes

Tabelle 9: Antikörper die im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurden

7.3.8 Aktinfärbung an Embryonen

Präparierte Embryonen werden in einem Tropfen dH₂O auf einen Polylysin-beschichteten Objektträger transferiert und für 2 min in einer Fixierlösung mit 4% Paraformaldehyd und 0.1 mg/ml Lysolecithin (Sigma) zum Andauen der Eihülle inkubiert. Anschließend erfolgt eine 20 min Inkubation in der Fixierlösung mit 4% Paraformaldehyd, jedoch ohne Lysolecithin. Danach werden die Embryonen 2x10 min in PBT gewaschen und mindestens 1 h in FITC-Phalloidin (Sigma, verdünnt 1:1000 in PBST) bzw. Alexa Fluor® 488 Phalloidin (Molecular Probes, verdünnt 1:25 in PBST) inkubiert. Das Phalloidin, ein Toxin aus dem Knollenblätterpilz bindet an AF und verhindert deren Depolymerisation. Anschließend werden die Embryonen erneut 2x10 min in PBST gewaschen und schließlich mit 10 μ l ProLong® Antifade Kit (Molecular Probes) eingedeckelt. Die Auswertung erfolgt am konfokalen Lasermikroskop Zeiss LSM 510 Meta (Zeiss, Jena).

Lösungen:

Fixierlösung: 4% Paraformaldehyd in 60 mM Pipes, 25 mM Hepes, 10 mM EGTA, 2 mM MgCl₂, pH 6.8 , zusätzlich 0.1 mg/ml Lysolecithin (Sigma)

PBS (pro Liter): 8 g NaCl, 0.2 g KCl, 1.44 g Na₂HPO₄, 0.24 g KH₂PO₄, pH 7.4
PBST: PBS plus 0.1% Tween 20

FITC-Phalloidin: 0.1 mg/ml in PBS (Sigma Aldrich, Steinheim)
Alexa Fluor® 488 Phalloidin: 200U/ml in Methanol (Molecular Probes, Inc., Eugene, USA)

7.3.8.1 Kombinierte Färbung mit Antikörpern und Phalloidin

- Adulte Würmer in einem Tropfen dH₂O zerschneiden, Embryonen mit einer ausgezogenen Pasteurpipette aufsaugen und auf einen mit Poly-L-Lysin beschichteten Objektträger transferieren
- Embryonen gut quetschen und in flüssigen Stickstoff tauchen
- Deckglas absprenge

Material und Methoden

- Sofort auf den noch gefrorenen Objektträger das Fixativ/Phalloidin-Gemisch (ca. 100 µl) geben, mit einem Deckglas (13x13 mm) bedecken und 30 min bei -20 °C inkubieren
- 2x10 min mit PBST waschen
- 1h mit FITC-Phalloidin (1:100 in PBST) bzw. Alexa-Phalloidin (1:25 in PBST) bei RT nachfärben (ca. 50 µl pro Präparat)
- 2x10 min mit PBST waschen
- Antikörper entsprechend in PBST verdünnen und ca. 50 µl auf den Objektträger geben
- Über Nacht bei 4 °C inkubieren
- 2x10 min in PBT waschen
- Sekundärantikörper in BSA/Milchpulver verdünnen, ca. 50 µl auf jedes Präparat geben und 2 h bei RT inkubieren
- 2x10 min in PBST waschen
- mit 10 µl ProLong® Antifade Kit (Molecular Probes) eindeckeln

Lösungen:

Fixativ:	75% Methanol p.a., 3.7% Paraformaldehyd und 1:100 FITC-Phalloidin bzw 1:25 Alexa-Phalloidin in dH ₂ O
FITC-Phalloidin:	1 mg/ml in PBS gelöst (Sigma-Aldrich, Steinheim) Alexa Fluor® 488
Phalloidin:	200 U/ml in Methanol (Molecular Probes, Inc., Eugene, USA)

8 Literaturverzeichnis

- Abraham, C., Hutter, H., Palfreyman, M. T., Spatkowski, G., Weimer, R. M., Windoffer, R., Jorgensen, E. M. and Leube, R. E.** (2006). Synaptic tetraspan vesicle membrane proteins are conserved but not needed for synaptogenesis and neuronal function in *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 8227-32.
- Altun, Z. F., Chen, B., Wang, Z. W. and Hall, D. H.** (2009). High resolution map of *Caenorhabditis elegans* gap junction proteins. *Dev Dyn* **238**, 1936-50.
- Ameen, N. A., Figueroa, Y. and Salas, P. J.** (2001). Anomalous apical plasma membrane phenotype in CK8-deficient mice indicates a novel role for intermediate filaments in the polarization of simple epithelia. *J Cell Sci* **114**, 563-75.
- Aoki, K., Moriguchi, H., Yoshioka, T., Okawa, K. and Tabara, H.** (2007). In vitro analyses of the production and activity of secondary small interfering RNAs in *C. elegans*. *Embo J* **26**, 5007-19.
- Asakura, T., Ogura, K. and Goshima, Y.** (2007). UNC-6 expression by the vulval precursor cells of *Caenorhabditis elegans* is required for the complex axon guidance of the HSN neurons. *Dev Biol* **304**, 800-10.
- Asano, A., Asano, K., Sasaki, H., Furuse, M. and Tsukita, S.** (2003). Claudins in *Caenorhabditis elegans*: their distribution and barrier function in the epithelium. *Curr Biol* **13**, 1042-6.
- Bauman, P. A., Dalton, W. S., Anderson, J. M. and Cress, A. E.** (1994). Expression of cytokeratin confers multiple drug resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 5311-4.
- Bossinger, O., Fukushige, T., Claeys, M., Borgonie, G. and McGhee, J. D.** (2004). The apical disposition of the *Caenorhabditis elegans* intestinal terminal web is maintained by LET-413. *Dev Biol* **268**, 448-56.
- Bossinger, O., Klebes, A., Segbert, C., Theres, C. and Knust, E.** (2001). Zonula adherens formation in *Caenorhabditis elegans* requires *dlg-1*, the homologue of the *Drosophila* gene discs large. *Dev Biol* **230**, 29-42.
- Bossinger, O. and Schierenberg, E.** (1992). Cell-cell communication in the embryo of *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol* **151**, 401-9.
- Boutros, M. and Ahringer, J.** (2008). The art and design of genetic screens: RNA interference. *Nat Rev Genet* **9**, 554-66.
- Brenner, S.** (1974). The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* **77**, 71-94.
- Carberry, K., Wiesenfahrt, T., Windoffer, R., Bossinger, O. and Leube, R. E.** (2009). Intermediate filaments in *Caenorhabditis elegans*. *Cell Motil Cytoskeleton* **66**, 852-64.
- Consortium, T. C. e. S.** (1998). Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology. *Science* **282**, 2012-8.

- Costa, M., Raich, W., Agbunag, C., Leung, B., Hardin, J. and Priess, J. R.** (1998). A putative catenin-cadherin system mediates morphogenesis of the *Caenorhabditis elegans* embryo. *J Cell Biol* **141**, 297-308.
- Coulombe, P. A. and Fuchs, E.** (1990). Elucidating the early stages of keratin filament assembly. *J Cell Biol* **111**, 153-69.
- Coulombe, P. A. and Omary, M. B.** (2002). 'Hard' and 'soft' principles defining the structure, function and regulation of keratin intermediate filaments. *Curr Opin Cell Biol* **14**, 110-22.
- Cowan, C. R. and Hyman, A. A.** (2004). Asymmetric cell division in *C. elegans*: cortical polarity and spindle positioning. *Annu Rev Cell Dev Biol* **20**, 427-53.
- Dodemont, H., Riemer, D., Ledger, N. and Weber, K.** (1994). Eight genes and alternative RNA processing pathways generate an unexpectedly large diversity of cytoplasmic intermediate filament proteins in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Embo Journal* **13**, 2625-38.
- Doolittle.** (1989). Redundancies in protein sequences. *Prediction of protein structure and the principles of protein conformation*, 599-623.
- Evans, T. C. and Hunter, C. P.** (2005). Translational control of maternal RNAs. *WormBook*, ed. The *C. elegans* Research Community, WormBook, doi/10.1895/wormbook.1.34.1, <http://www.wormbook.org>.
- Feinberg, E. H. and Hunter, C. P.** (2003). Transport of dsRNA into cells by the transmembrane protein SID-1. *Science* **301**, 1545-7.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E. and Mello, C. C.** (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **391**, 806-11.
- Firestein, B. L. and Rongo, C.** (2001). DLG-1 Is a MAGUK Similar to SAP97 and Is Required for Adherens Junction Formation. *Mol Biol Cell* **12**, 3465-75.
- Fraser, A. G., Kamath, R. S., Zipperlen, P., Martinez-Campos, M., Sohrmann, M. and Ahringer, J.** (2000). Functional genomic analysis of *C. elegans* chromosome I by systematic RNA interference. *Nature* **408**, 325-30.
- Fukushige, T., Hawkins, M. G. and McGhee, J. D.** (1998). The GATA-factor elt-2 is essential for formation of the *Caenorhabditis elegans* intestine. *Dev Biol* **198**, 286-302.
- Fung, T. K. and Poon, R. Y.** (2005). A roller coaster ride with the mitotic cyclins. *Semin Cell Dev Biol* **16**, 335-42.
- Geissler, F.** (2009). Genetische Untersuchungen zur Zellpolarität und Zelldifferenzierung im Darmepithel des Nematoden *Caenorhabditis elegans*. Diplomarbeit, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

- Gerhardus, H.** (2009). Charakterisierung der Genfunktion von *sma-5* während der Entwicklung von *C. elegans*. Diplomarbeit, Heinrich-Heine Universität Düsseldorf.
- Gobel, V., Barrett, P. L., Hall, D. H. and Fleming, J. T.** (2004). Lumen morphogenesis in *C. elegans* requires the membrane-cytoskeleton linker *erm-1*. *Dev Cell* **6**, 865-73.
- Godsel, L. M., Hobbs, R. P. and Green, K. J.** (2008). Intermediate filament assembly: dynamics to disease. *Trends Cell Biol* **18**, 28-37.
- Goldman, R. D., Grin, B., Mendez, M. G. and Kuczmarski, E. R.** (2008). Intermediate filaments: versatile building blocks of cell structure. *Curr Opin Cell Biol* **20**, 28-34.
- Grant, B., Zhang, Y., Paupard, M. C., Lin, S. X., Hall, D. H. and Hirsh, D.** (2001). Evidence that RME-1, a conserved *C. elegans* EH-domain protein, functions in endocytic recycling. *Nat Cell Biol* **3**, 573-9.
- Grant, B. D. and Sato, M.** (2006). Intracellular trafficking. *WormBook*, ed. The *C. elegans* Research Community, WormBook, doi/10.1895/wormbook.1.77.1, <http://www.wormbook.org>.
- Grishok, A.** (2005). RNAi mechanisms in *Caenorhabditis elegans*. *FEBS Lett* **579**, 5932-9.
- Guo, Y. M., Chen, S., Shetty, P., Zheng, G., Lin, R. and Li, W. H.** (2008). Imaging dynamic cell-cell junctional coupling in vivo using Trojan-LAMP. *Nat Methods* **5**, 835-41.
- Gönczy, P., Echeverri, G., Oegema, K., Coulson, A., Jones, S. J., Copley, R. R., Duperon, J., Oegema, J., Brehm, M., Cassin, E. et al.** (2000). Functional genomic analysis of cell division in *C. elegans* using RNAi of genes on chromosome III. *Nature* **408**, 331-6.
- Habig, J. W., Aruscavage, P. J. and Bass, B. L.** (2008). In *C. elegans*, high levels of dsRNA allow RNAi in the absence of RDE-4. *PLoS One* **3**, e4052.
- Hawkins, M. G. and McGhee, J. D.** (1995). *elt-2*, a second GATA factor from the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Journal Of Biological Chemistry* **270**, 14666-71.
- Heiska, L., Alfthan, K., Grönholm, M., Vilja, P., Vaheri, A. and Carpén, O.** (1998). Association of ezrin with intercellular adhesion molecule-1 and -2 (ICAM-1 and ICAM-2). Regulation by phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate. *Journal Of Biological Chemistry* **273**, 21893-900.
- Herrmann, H. and Aebi, U.** (1998). Intermediate filament assembly: fibrillogenesis is driven by decisive dimer-dimer interactions. *Curr Opin Struct Biol* **8**, 177-85.
- Herrmann, H. and Aebi, U.** (2004). Intermediate filaments: molecular structure, assembly mechanism, and integration into functionally distinct intracellular Scaffolds. *Annu Rev Biochem* **73**, 749-89.
- Herrmann, H., Bar, H., Kreplak, L., Strelkov, S. V. and Aebi, U.** (2007). Intermediate filaments: from cell architecture to nanomechanics. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 562-73.

- Hesse, M., Magin, T. M. and Weber, K.** (2001). Genes for intermediate filament proteins and the draft sequence of the human genome: novel keratin genes and a surprisingly high number of pseudogenes related to keratin genes 8 and 18. *J Cell Sci* **114**, 2569-75.
- Hesse, M., Zimek, A., Weber, K. and Magin, T. M.** (2004). Comprehensive analysis of keratin gene clusters in humans and rodents. *Eur J Cell Biol* **83**, 19-26.
- Hirokawa, N., Tilney, L. G., Fujiwara, K. and Heuser, J. E.** (1982). Organization of actin, myosin, and intermediate filaments in the brush border of intestinal epithelial cells. *J Cell Biol* **94**, 425-43.
- Hodgkin, J.** (1984). Switch genes and sex determination in the nematode *C. elegans*. *Journal Of Embryology And Experimental Morphology* **83 Suppl**, 103-17.
- Hughes, S. C. and Fehon, R. G.** (2007). Understanding ERM proteins--the awesome power of genetics finally brought to bear. *Curr Opin Cell Biol* **19**, 51-6.
- Hüsken, K., Wiesenfahrt, T., Abraham, C., Windoffer, R., Bossinger, O. and Leube, R. E.** (2008). Maintenance of the intestinal tube in *Caenorhabditis elegans*: the role of the intermediate filament protein IFC-2. *Differentiation* **76**, 881-96.
- Hüsken, K.** (2008). Identifizierung und Charakterisierung von Intermediärfilament-Organisatoren in *Caenorhabditis elegans*. Dissertation, Johannes Gutenberg-Universität Mainz.
- Inada, H., Izawa, I., Nishizawa, M., Fujita, E., Kiyono, T., Takahashi, T., Momoi, T. and Inagaki, M.** (2001). Keratin attenuates tumor necrosis factor-induced cytotoxicity through association with TRADD. *J Cell Biol* **155**, 415-26.
- Janmey, P. A., Euteneuer, U., Traub, P. and Schliwa, M.** (1991). Viscoelastic properties of vimentin compared with other filamentous biopolymer networks. *J Cell Biol* **113**, 155-60.
- Jose, A. M., Smith, J. J. and Hunter, C. P.** (2009). Export of RNA silencing from *C. elegans* tissues does not require the RNA channel SID-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 2283-8.
- Kamath, R. S. and Ahringer, J.** (2003). Genome-wide RNAi screening in *Caenorhabditis elegans*. *Methods* **30**, 313-21.
- Karabinos, A., Schulze, E., Klisch, T., Wang, J. and Weber, K.** (2002). Expression profiles of the essential intermediate filament (IF) protein A2 and the IF protein C2 in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Mech Dev* **117**, 311-4.
- Karabinos, A., Schulze, E., Schunemann, J., Parry, D. A. and Weber, K.** (2003). In vivo and in vitro evidence that the four essential intermediate filament (IF) proteins A1, A2, A3 and B1 of the nematode *Caenorhabditis elegans* form an obligate heteropolymeric IF system. *J Mol Biol* **333**, 307-19.

- Karabinos, A., Schunemann, J. and Weber, K.** (2004). Most genes encoding cytoplasmic intermediate filament (IF) proteins of the nematode *Caenorhabditis elegans* are required in late embryogenesis. *Eur J Cell Biol* **83**, 457-68.
- Karabinos, A., Wang, J., Wenzel, D., Panopoulou, G., Lehrach, H. and Weber, K.** (2001). Developmentally controlled expression patterns of intermediate filament proteins in the cephalochordate *Branchiostoma*. *Mech Dev* **101**, 283-8.
- Khurana, S. and George, SP.** (2008). Regulation of cell structure and function by actin binding proteins: villin's perspective. *FEBS Lett* **582**, 2128-39.
- Kim, S. and Coulombe, P. A.** (2007). Intermediate filament scaffolds fulfill mechanical, organizational, and signaling functions in the cytoplasm. *Genes Dev* **21**, 1581-97.
- Knust, E. and Bossinger, O.** (2002). Composition and formation of intercellular junctions in epithelial cells. *Science* **298**, 1955-9.
- Kouklis, P. D., Hutton, E. and Fuchs, E.** (1994). Making a connection: direct binding between keratin intermediate filaments and desmosomal proteins. *J Cell Biol* **127**, 1049-60.
- Ku, N. O., Zhou, X., Toivola, D. M. and Omary, M. B.** (1999). The cytoskeleton of digestive epithelia in health and disease. *Am J Physiol* **277**, G1108-37.
- Kunze, J.** (2007). Analyse der Innexine während der Entwicklung des Nematoden *Caenorhabditis elegans*. Diplomarbeit, Heinrich-Heine Universität Düsseldorf.
- Köppen, M., Simske, J. S., Sims, P. A., Firestein, B. L., Hall, D. H., Radice, A. D., Rongo, C. and Hardin, J. D.** (2001). Cooperative regulation of AJM-1 controls junctional integrity in *Caenorhabditis elegans* epithelia. *Nat Cell Biol* **3**, 983-91.
- Labouesse, M.** (2006). Epithelial junctions and attachments. *WormBook*, ed. The *C. elegans* Research Community, WormBook, doi/10.1895/wormbook.1.56.1, <http://www.wormbook.org>.
- Legouis, R., Gansmuller, A., Sookhareea, S., Bosher, J. M., Baillie, D. L. and Labouesse, M.** (2000). LET-413 is a basolateral protein required for the assembly of adherens junctions in *Caenorhabditis elegans*. *Nat Cell Biol* **2**, 415-422.
- Leung, B., Hermann, G. J. and Priess, J. R.** (1999). Organogenesis of the *Caenorhabditis elegans* intestine. *Dev Biol* **216**, 114-34.
- Li, S., Armstrong, C. M., Bertin, N., Ge, H., Milstein, S., Boxem, M., Vidalain, P. O., Han, J. D., Chesneau, A., Hao, T. et al.** (2004). A map of the interactome network of the metazoan *C. elegans*. *Science* **303**, 540-3.
- Liao, J., Ku, N. O. and Omary, M. B.** (1997). Stress, apoptosis, and mitosis induce phosphorylation of human keratin 8 at Ser-73 in tissues and cultured cells. *J Biol Chem* **272**, 17565-73.

- Listwan, P. and Rothnagel, J. A.** (2004). Keratin bundling proteins. *Methods Cell Biol* **78**, 817-27.
- Lyczak, R., Zweier, L., Group, T., Murrow, M. A., Snyder, C., Kulovitz, L., Beatty, A., Smith, K. and Bowerman, B.** (2006). The puromycin-sensitive aminopeptidase PAM-1 is required for meiotic exit and anteroposterior polarity in the one-cell *Caenorhabditis elegans* embryo. *Development* **133**, 4281-92.
- Lynch, A. M. and Hardin, J.** (2009). The assembly and maintenance of epithelial junctions in *C. elegans*. *Front Biosci* **14**, 1414-32.
- Macara, I. G.** (2004). Parsing the polarity code. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**, 220-31.
- MacQueen, A. J., Baggett, J. J., Perumov, N., Bauer, R. A., Januszewski, T., Schriefer, L. and Waddle, J. A.** (2005). ACT-5 is an essential *Caenorhabditis elegans* actin required for intestinal microvilli formation. *Mol Biol Cell* **16**, 3247-59.
- Maeda, I., Kohara, Y., Yamamoto, M. and Sugimoto, A.** (2001). Large-scale analysis of gene function in *Caenorhabditis elegans* by high-throughput RNAi. *Curr Biol* **11**, 171-6.
- Magin, T. M., Vijayaraj, P. and Leube, R. E.** (2007). Structural and regulatory functions of keratins. *Exp Cell Res* **313**, 2021-32.
- McGhee, J. D.** (2007). The *C. elegans* intestine. *WormBook*, ed. The *C. elegans* Research Community, WormBook, doi/10.1895/wormbook.1.133.1, <http://www.wormbook.org>.
- McGhee, J. D., Fukushige, T., Krause, M. W., Minnema, S. E., Goszczynski, B., Gaudet, J., Kohara, Y., Bossinger, O., Zhao, Y., Khattra, J. et al.** (2009). ELT-2 is the predominant transcription factor controlling differentiation and function of the *C. elegans* intestine, from embryo to adult. *Dev Biol* **327**, 551-65.
- McMahon, L., Legouis, R., Vonesch, J. L. and Labouesse, M.** (2001). Assembly of *C. elegans* apical junctions involves positioning and compaction by LET-413 and protein aggregation by the MAGUK protein DLG-1. *J Cell Sci* **114**, 2265-77.
- Mello, C. C., Schubert, C., Draper, B., Zhang, W., Lobel, R. and Priess, J. R.** (1996). The PIE-1 protein and germline specification in *C. elegans* embryos. *Nature* **382**, 710-2.
- Michaux, G., Legouis, R. and Labouesse, M.** (2001). Epithelial biology: lessons from *Caenorhabditis elegans*. *Gene* **277**, 83-100.
- Mostov, K., Su, T. and ter Beest, M.** (2003). Polarized epithelial membrane traffic: conservation and plasticity. *Nat Cell Biol* **5**, 287-93.
- Munn, E. A. and Greenwood, C. A.** (1983). Endotube-brush border complexes dissected from the intestines of *Haemonchus contortus* and *Ancylostoma caninum*. *Parasitology* **87 (Pt 1)**, 129-37.

- Müller, H. A. and Bossinger, O.** (2003). Molecular networks controlling epithelial cell polarity in development. *Mech Dev* **120**, 1231-56.
- Nance, J.** (2005). PAR proteins and the establishment of cell polarity during *C. elegans* development. *Bioessays* **27**, 126-35.
- Nance, J., Munro, E. M. and Priess, J. R.** (2003). *C. elegans* PAR-3 and PAR-6 are required for apicobasal asymmetries associated with cell adhesion and gastrulation. *Development* **130**, 5339-50.
- Nehrke, K.** (2003). A reduction in intestinal cell pHi due to loss of the *Caenorhabditis elegans* Na⁺/H⁺ exchanger NHX-2 increases life span. *J Biol Chem* **278**, 44657-66.
- Nelson, W. J.** (2003). Adaptation of core mechanisms to generate cell polarity. *Nature* **422**, 766-74.
- Nelson, W. J.** (2008). Regulation of cell-cell adhesion by the cadherin-catenin complex. *Biochem Soc Trans* **36**, 149-55.
- Nelson, W. J. and Yeaman, C.** (2001). Protein trafficking in the exocytic pathway of polarized epithelial cells. *Trends Cell Biol* **11**, 483-6.
- Omary, M. B. and Ku, N. O.** (2006). Cell biology: skin care by keratins. *Nature* **441**, 296-7.
- Oriolo, A. S., Wald, F. A., Ramsauer, V. P. and Salas, P. J.** (2007). Intermediate filaments: a role in epithelial polarity. *Exp Cell Res* **313**, 2255-64.
- Otomo, T., Tomchick, D. R., Otomo, C., Panchal, S. C., Machius, M. and Rosen, M. K.** (2005). Structural basis of actin filament nucleation and processive capping by a formin homology 2 domain. *Nature* **433**, 488-94.
- Pak, J. and Fire, A.** (2007). Distinct populations of primary and secondary effectors during RNAi in *C. elegans*. *Science* **315**, 241-4.
- Pallari, H. M. and Eriksson, J. E.** (2006). Intermediate filaments as signaling platforms. *Sci STKE* **2006**, pe53.
- Patel, F. B., Bernadskaya, Y. Y., Chen, E., Jobanputra, A., Pooladi, Z., Freeman, K. L., Gally, C., Mohler, W. A. and Soto, M. C.** (2008). The WAVE/SCAR complex promotes polarized cell movements and actin enrichment in epithelia during *C. elegans* embryogenesis. *Dev Biol* **324**, 297-309.
- Pekny, M. and Lane, E. B.** (2007). Intermediate filaments and stress. *Exp Cell Res* **313**, 2244-54.
- Pilipiuk, J.** (2006). Die Rolle epithelialer Gene bei der Postembryogenese von *Caenorhabditis elegans*. Diplomarbeit, Heinrich-Heine Universität Düsseldorf.

- Pilipiuk, J., Lefebvre, C., Wiesenfahrt, T., Legouis, R. and Bossinger, O.** (2009). Increased IP3/Ca²⁺ signaling compensates depletion of LET-413/DLG-1 in *C. elegans* epithelial junction assembly. *Dev Biol* **327**, 34-47.
- Pujuguet, P., Del Maestro, L., Gautreau, A., Louvard, D. and Arpin, M.** (2003). Ezrin regulates E-cadherin-dependent adherens junction assembly through Rac1 activation. *Mol Biol Cell* **14**, 2181-91.
- Qadota, H., Inoue, M., Hikita, T., Koppen, M., Hardin, J. D., Amano, M., Moerman, D. G. and Kaibuchi, K.** (2007). Establishment of a tissue-specific RNAi system in *C. elegans*. *Gene* **400**, 166-73.
- Reese, K. J., Dunn, M. A., Waddle, J. A. and Seydoux, G.** (2000). Asymmetric segregation of PIE-1 in *C. elegans* is mediated by two complementary mechanisms that act through separate PIE-1 protein domains. *Mol Cell* **6**, 445-55.
- Ridge, K. M., Linz, L., Flitney, F. W., Kuczmarski, E. R., Chou, Y. H., Omary, M. B., Sznajder, J. I. and Goldman, R. D.** (2005). Keratin 8 phosphorylation by protein kinase C delta regulates shear stress-mediated disassembly of keratin intermediate filaments in alveolar epithelial cells. *J Biol Chem* **280**, 30400-5.
- Rogers, M. A., Edler, L., Winter, H., Langbein, L., Beckmann, I. and Schweizer, J.** (2005). Characterization of new members of the human type II keratin gene family and a general evaluation of the keratin gene domain on chromosome 12q13.13. *J Invest Dermatol* **124**, 536-44.
- Rubin, G. M., Yandell, M. D., Wortman, J. R., Gabor Miklos, G. L., Nelson, C. R., Hariharan, I. K., Fortini, M. E., Li, P. W., Apweiler, R., Fleischmann, W. et al.** (2000). Comparative genomics of the eukaryotes. *Science* **287**, 2204-15.
- Sawa, M., Suetsugu, S., Sugimoto, A., Miki, H., Yamamoto, M. and Takenawa, T.** (2003). Essential role of the *C. elegans* Arp2/3 complex in cell migration during ventral enclosure. *J Cell Sci* **116**, 1505-18.
- Schnabel, R., Hutter, H., Moerman, D. and Schnabel, H.** (1997). Assessing normal embryogenesis in *Caenorhabditis elegans* using a 4D microscope: variability of development and regional specification. *Dev Biol* **184**, 234-65.
- Schweizer, J., Bowden, P. E., Coulombe, P. A., Langbein, L., Lane, E. B., Magin, T. M., Maltais, L., Omary, M. B., Parry, D. A., Rogers, M. A. et al.** (2006). New consensus nomenclature for mammalian keratins. *J Cell Biol* **174**, 169-74.
- Segbert, C., Johnson, K., Theres, C., van Furden, D. and Bossinger, O.** (2004). Molecular and functional analysis of apical junction formation in the gut epithelium of *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol* **266**, 17-26.
- Shih, J. D., Fitzgerald, M. C., Sutherlin, M. and Hunter, C. P.** (2009). The SID-1 double-stranded RNA transporter is not selective for dsRNA length. *Rna* **15**, 384-90.
- Shimada, A., Nyitrai, M., Vetter, I. R., Kuhlmann, D., Bugyi, B., Narumiya, S., Geeves, M. A. and Wittinghofer, A.** (2004). The core FH2 domain of diaphanous-

related formins is an elongated actin binding protein that inhibits polymerization. *Mol Cell* **13**, 511-22.

Sijen, T., Steiner, F. A., Thijssen, K. L. and Plasterk, R. H. (2007). Secondary siRNAs result from unprimed RNA synthesis and form a distinct class. *Science* **315**, 244-7.

Sonneville, R. and Gonczy, P. (2004). Zyg-11 and cul-2 regulate progression through meiosis II and polarity establishment in *C. elegans*. *Development* **131**, 3527-43.

Steiner, F. A., Okihara, K. L., Hoogstrate, S. W., Sijen, T. and Ketting, R. F. (2009). RDE-1 slicer activity is required only for passenger-strand cleavage during RNAi in *Caenorhabditis elegans*. *Nat Struct Mol Biol* **16**, 207-11.

Steinert, P. M., Cantieri, J. S., Teller, D. C., Lonsdale-Eccles, J. D. and Dale, B. A. (1981). Characterization of a class of cationic proteins that specifically interact with intermediate filaments. *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**, 4097-101.

Styers, M. L., Kowalczyk, A. P. and Faundez, V. (2005). Intermediate filaments and vesicular membrane traffic: the odd couple's first dance? *Traffic* **6**, 359-65.

Sulston, J. E. (1983). Neuronal cell lineages in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Cold Spring Harbor Symposia On Quantitative Biology* **48 Pt 2**, 443-52.

Sulston, J. E., Schierenberg, E., White, J. G. and Thomson, J. N. (1983). The embryonic cell lineage of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol* **100**, 64-119.

Sönnichsen, B., Koski, L. B., Walsh, A., Marschall, P., Neumann, B., Brehm, M., Alleaume, A. M., Artelt, J., Bettencourt, P., Cassin, E. et al. (2005). Full-genome RNAi profiling of early embryogenesis in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **434**, 462-9.

Tabara, H., Grishok, A. and Mello, C. C. (1998). RNAi in *C. elegans*: soaking in the genome sequence. *Science* **282**, 430-1.

Tabara, H., Sarkissian, M., Kelly, W. G., Fleenor, J., Grishok, A., Timmons, L., Fire, A. and Mello, C. C. (1999). The *rde-1* gene, RNA interference, and transposon silencing in *C. elegans*. *Cell* **99**, 123-132.

Takeuchi, K., Sato, N., Kasahara, H., Funayama, N., Nagafuchi, A., Yonemura, S., Tsukita, S. and Tsukita, S. (1994). Perturbation of cell adhesion and microvilli formation by antisense oligonucleotides to ERM family members. *J Cell Biol* **125**, 1371-84.

Tao, G. Z., Toivola, D. M., Zhou, Q., Strnad, P., Xu, B., Michie, S. A. and Omary, M. B. (2006). Protein phosphatase-2A associates with and dephosphorylates keratin 8 after hyposmotic stress in a site- and cell-specific manner. *J Cell Sci* **119**, 1425-32.

Tenenhaus, C., Schubert, C. and Seydoux, G. (1998). Genetic requirements for PIE-1 localization and inhibition of gene expression in the embryonic germ lineage of *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol* **200**, 212-24.

- Tijsterman, M., Ketting, R. F., Okihara, K. L., Sijen, T. and Plasterk, R. H.** (2002). RNA helicase MUT-14-dependent gene silencing triggered in *C. elegans* by short antisense RNAs. *Science* **295**, 694-7.
- Timmons, L., Court, D. L. and Fire, A.** (2001). Ingestion of bacterially expressed dsRNAs can produce specific and potent genetic interference in *Caenorhabditis elegans*. *Gene* **263**, 103-12.
- Timmons, L. and Fire, A.** (1998). Specific interference by ingested dsRNA. *Nature* **395**, 854.
- Toivola, D. M., Krishnan, S., Binder, H. J., Singh, S. K. and Omary, M. B.** (2004). Keratins modulate colonocyte electrolyte transport via protein mistargeting. *J Cell Biol* **164**, 911-21.
- Toivola, D. M., Zhou, Q., English, L. S. and Omary, M. B.** (2002). Type II keratins are phosphorylated on a unique motif during stress and mitosis in tissues and cultured cells. *Mol Biol Cell* **13**, 1857-70.
- Totong, R., Achilleos, A. and Nance, J.** (2007). PAR-6 is required for junction formation but not apicobasal polarization in *C. elegans* embryonic epithelial cells. *Development* **134**, 1259-68.
- Vaidyanathan, S., McDicken, I. W., Ikin, A. J., Mansour, P., Soni, B. M., Singh, G. and Sett, P.** (2002). A study of cytokeratin 20 immunostaining in the urothelium of neuropathic bladder of patients with spinal cord injury. *BMC Urol* **2**, 7.
- Valiunas, V., Polosina, Y. Y., Miller, H., Potapova, I. A., Valiuniene, L., Doronin, S., Mathias, R. T., Robinson, R. B., Rosen, M. R., Cohen, I. S. et al.** (2005). Connexin-specific cell-to-cell transfer of short interfering RNA by gap junctions. *J Physiol* **568**, 459-68.
- van den Ecker, D.** (2006). Analyse der Epithelentwicklung in *C. elegans* unter Anwendung einer Darm-spezifischen RNAi Methode. Diplomarbeit, Heinrich-Heine Universität Düsseldorf.
- van Fürden, D.** (2005). Genetische und molekulare Analyse der Lumenbildung und Zell-Zelladhäsion im Darmepithel des Nematoden *Caenorhabditis elegans*. Dissertation, Heinrich-Heine Universität Düsseldorf.
- van Fürden, D., Johnson, K., Segbert, C. and Bossinger, O.** (2004). The *C. elegans* ezrin-radixin-moesin protein ERM-1 is necessary for apical junction remodelling and tubulogenesis in the intestine. *Dev Biol* **272**, 262-76.
- Veranic, P. and Jezernik, K.** (2002). Trajectorial organisation of cytokeratins within the subapical region of umbrella cells. *Cell Motil Cytoskeleton* **53**, 317-25.
- Veranic, P., Romih, R. and Jezernik, K.** (2004). What determines differentiation of urothelial umbrella cells? *Eur J Cell Biol* **83**, 27-34.

- Wald, F. A., Figueroa, Y., Oriolo, A. S. and Salas, P. J.** (2003). Membrane repolarization is delayed in proximal tubules after ischemia-reperfusion: possible role of microtubule-organizing centers. *Am J Physiol Renal Physiol* **285**, F230-40.
- Wald, F. A., Oriolo, A. S., Casanova, M. L. and Salas, P. J.** (2005). Intermediate filaments interact with dormant ezrin in intestinal epithelial cells. *Mol Biol Cell* **16**, 4096-107.
- Walhout, A. J., Sordella, R., Lu, X., Hartley, J. L., Temple, G. F., Brasch, M. A., Thierry-Mieg, N. and Vidal, M.** (2000). Protein interaction mapping in *C. elegans* using proteins involved in vulval development. *Science* **287**, 116-22.
- Wallar, B. J. and Alberts, A. S.** (2003). The formins: active scaffolds that remodel the cytoskeleton. *Trends Cell Biol* **13**, 435-46.
- Weber, K. L. and Bement, W. M.** (2002). F-actin serves as a template for cyokeratin organization in cell free extracts. *J Cell Sci* **115**, 1373-82.
- Werner, N. S., Windoffer, R., Strnad, P., Grund, C., Leube, R. E. and Magin, T. M.** (2004). Epidermolysis bullosa simplex-type mutations alter the dynamics of the keratin cytoskeleton and reveal a contribution of actin to the transport of keratin subunits. *Mol Biol Cell* **15**, 990-1002.
- Wicks, S. R., Yeh, R. T., Gish, W. R., Waterston, R. H. and Plasterk, R. H.** (2001). Rapid gene mapping in *Caenorhabditis elegans* using a high density polymorphism map. *Nat Genet* **28**, 160-4.
- Wiesenfahrt, T.** (2005). Die Rolle des Mikrotubuli Zytoskeletts während der Polarisierung des Darmepithels von *C. elegans*. Diplomarbeit, Heinrich-Heine Universität Düsseldorf.
- Windoffer, R. and Leube, R. E.** (2004). Imaging of keratin dynamics during the cell cycle and in response to phosphatase inhibition. *Methods Cell Biol* **78**, 321-52.
- Winston, W. M., Molodowitch, C. and Hunter, C. P.** (2002). Systemic RNAi in *C. elegans* requires the putative transmembrane protein SID-1. *Science* **295**, 2456-9.
- Winston, W. M., Sutherlin, M., Wright, A. J., Feinberg, E. H. and Hunter, C. P.** (2007). *Caenorhabditis elegans* SID-2 is required for environmental RNA interference. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 10565-70.
- Woll, S., Windoffer, R. and Leube, R. E.** (2005). Dissection of keratin dynamics: different contributions of the actin and microtubule systems. *Eur J Cell Biol* **84**, 311-28.
- Woll, S., Windoffer, R. and Leube, R. E.** (2007). p38 MAPK-dependent shaping of the keratin cytoskeleton in cultured cells. *J Cell Biol* **177**, 795-807.
- Yigit, E., Batista, P. J., Bei, Y., Pang, K. M., Chen, C. C., Tolia, N. H., Joshua-Tor, L., Mitani, S., Simard, M. J. and Mello, C. C.** (2006). Analysis of the *C. elegans* Argonaute family reveals that distinct Argonautes act sequentially during RNAi. *Cell* **127**, 747-57.

Zatloukal, K., French, S. W., Stumptner, C., Strnad, P., Harada, M., Toivola, D. M., Cadrin, M. and Omary, M. B. (2007). From Mallory to Mallory-Denk bodies: what, how and why? *Exp Cell Res* **313**, 2033-49.

9 Anhang

9.1 Sequenzen

Sequenz des *elt-2::rde-1* Plasmids

ATGACCATGATTACGCCAAGCTTGCATGCCTGCAGGTCGACTCTAGAGGA 50
 TCAAGAGCATTTGAATCAGAATATGGAGAACGGAGCATGAGCATTTTCGA 100
 AGTTTTTTAGATGCACTAGAACAAAGCGTGTTGGCTTCTCTGAGCCCGC 150
 TTTCTTATATACCCGCATTCTGCAGCCTTACAGAATGTTCTAGAAGGTC 200
 CTAGATGCATCCCGCTTTTTTGA AAAATTTTCGAAGCGTTGGTTCGAGCTG
 AATACACGTGCACAAGTCTGCATGCAGCATTTTAGATGAACCATGTCTTT 300
 TTTCAAAGTCTAAGGGTGA AATCACGTCCTTTCTGCATATTGGAGGAGTT
 TTCGTGTA AAAATTTAAACCGTTTTTTTTCTAACATAGTCAAAAAACG 400
 AAAGCAGAATATTAACATGATTGATATGTGTTTTTAGGGGCTTCATTGAC
 ATTTTCAGCAGAAAATTATTCGTCTGTGTCGGTTCAAGTAAACTGTTTCT 500
 TGAAGTTATCGTGATTTTTT CAGAGTATGCCAAAGAAACAAATCAAATAAT
 GTTGTGGTTCTGAGGAAGAAAGTTATCCTCTTTGCCCACTGGCTCCGTTT 600
 CAAAAATAAAACCAAGTATGAACTTTATTTATTTGCATCAGAACTTGGA
 TAGAACATTTTTGCATTTTATCAAATGGACCCAAGTACAAGCTATAATTT 700
 ATTTAAAGAAGTTACACATCGTTTCTTTTCGATTTTCATTTTTAGTAAAT
 AGTTTTTCATGATCTCGCTCACGCCAATATACCGAAAAACGCACCAAATG 800
 AGCATTTTCTTTGGTATATACACTATCCACATGCTGGCGTAATGAATCTT
 CATCACAAAGCGAATCTTCAGCTTTACGAATTTGTGTATAGGAGGACCT 900
 GAGACGGATATACATCGGTTTAGAAGTGCCAAAGAAGATTTAATGTGCGT
 CACAATCATCGTAAAATGCGGCTTCAAGACGGGCCAGGAGCTCATTTTTTC 1000
 AATTTTATACTGCCACCTGTCAACAATTCTTTGTGCATTCCCTAACAAC
 GAGAATTA AAAATGGTAGACATTA AAAACTTTAACTTCCCCTAAAGTTGC 1100
 AATTCCTATTATAGGAATCGTGTTTTAGTGGTCTCAACGTTGGTTCG
 CAATGTTCTATGTTAGGTAATCATTACAATATGATAGGAATTGCCGAAAG 1200
 ATGAATTA CTAATACAGAAACCCAACGGTCACTGATAATATTTTTGG
 CAATGCAAATACGGATGAGAAAGACGCATCAGGGGACTCTCCGCTGGATC 1300
 ATGCTACGCAATCTTCGGTAGGTAATATACACATTGTCCGCAACAAAAGT
 TTGAATTGCAGGTGGGATCTTCTCCTTCCCATGTGCTGCAAACCACAAC
 TCCGGCAGCCACGGAGGTATGTGATAAGTTGAATGAGTCATCATGACGTT 1400
 TGAAAAATTACAACGAATTGATTAATCGACAAAATTT CAGCAGATTCAACC 1500
 ATTTTCGTCAACAACATCTTTGGCATCACCTGTCACTTTACCAATGACTCC
 ATCTTCAGATTCTTCTACTCCAATGCACGCCATCGAACCCGTT CAGCATC 1600
 TCTAATTTGAAATGTATGAACTCCAATTCTTGATAACCAATTCCTGACT
 CTGTAAC TATTATTATAATCCTATTACCCACCTTTTTTTCCCATTCTG 1700
 CTCTTAGTTCTCCCCAACCCGTACATTTTCTCAACTAATAAAGACAATG
 AGAAAGTGAGAGAGAATAAGACGAACTGAAAAGAATGTGTAACAGTTTA 1800
 TTGCCTCTCGATTGTACCATCTAGTGTCTTGTCTGTGCATAACTACTGA
 TAACAGATCGAATGTGAAAGACCCAATAAATGCTTGGAAAGTATCAAATA 1900
 TGTTTAGAAATAGTATTTAGAGACTTATGTGGGACGAAAAAACAGGAGCA
 TTAAGAATACAGTTGCAAACATTCATCAAGTTATAATCTAATAATATAAA 2000
 TTCAAAAATGTTAATGATAAAAAATGATGATCAAAGTAGGAAATTAGTGG
 CGAGAAAACAATAAATCATCAGAAAATGACTGATCTTGAGTAGAGTGCTT 2100
 TTTTTGTAGATTTCTGATTCTAAAAC TAAAAAAAAC TAAAAATGCTCG
 ATGAGTCATACTAATTGAAAAATAATCAGATTGAAAACGTTAAAAATGTA 2200
 CTTGCTAACATACTCCATGGTTATTTTTGAACACAAATAAAGTTATATA
 CATCTTTACCGGACCAGAAAGAAATCACCGCTAACCAATGTT CAGTTTTT 2300
 ACCTGAATATCCCTGAAAGTACAAAAAATCAATGTTCAATCAAGTTTTT
 GCATGCCTTCGTGTGATGGCTCGCACCAAGTATTCTGACAGTTATAAAAT 2400
 GTTTCCTGTGATCATGAATTTGAAAAAAAAGA ACTGATGGGAAAATGTG
 ATATTCATAAATGAAATGTTTAATAAACA AAAAAGAACCGTCATCACAAA 2500
 TCTACTCTGAAACGTTACAGTTCCTAATTGACCAATTCAGAAATTTTTTG

Anhang

TACTGACTTAATAAATATAAATTTACAGTTTTAAGAAACATAAATTGAAT 2600
TATATAAATAAAAAAAAAAAAAAACTAAAATGAAGACGTGATGGAATGTTTC
ACGTATTAATAAAGCTCTCGGACCGTTTGACATCCAGAAATTATGTGAAA 2700
GTGATTTTTCTAACCCTTTGACGTCAAAAAAGTTTTTCTTTTTTGAAAGAT
ACGCTGTTTAGAAATACTTATACAGCTGATTTTAGAATCTCCAAAAAAC 2800
TTCAATTACTTAACAAACTTTCTAAATAAAGAATTTTGATTTTGATTTTC
TTTGAACCTCAAACCCCGTTAAAAAACCAATTAATAAAGATACCA 2900
GATTAATTTTAAAGTGAAAAATATAAATTTATCCCGACTGTAAAAACG
GTTTATAAACGGAGTCACAACACTCATATACAACATCGACACCAATAA 3000
ATAACTTCGAAAGCTAATTGTGTCTATTCGGATATAGAGAGTAGTGTGAG
CAGATGTGTTTTGCAGAATAAATTGATGACACTATTATGGAATATAAT 3100
GACCAAATGTTAAATGTGTTAAGGTTTGATATCAAACCTGTATTTTCTT
TTTATACAGAATTGATAATGTTATCTTCAATTGATTTCTACTTCTGAGCT 3200
ACGGCGATACGAGGACGCATTCTCAACGATAATGTTGCCATTTTGTCTG
ATAATTTTTTTACTGATTGTTTCCAGAACCCCATAGTTTTTCTCTATTAA 3200
ACGTTTCATCCTTGACTTCCCGGAGTTTGCTGGCTGAATAGGAAATTTGAA
GACAAAAAGGAAAGAATCGGCTCAAACGTCATGCAACTGATAAGGCGACC 3300
GTACTTCATTTCAAAGAAGCTCACTTACTGAGCGCAAACATTGAGAAAT
GAGAGCAAAGAAGTGGTTTTACAACATGCTAATGTTTTTAGACCTTGTA 3400
CCCAATAATATTACTGTAGTATACAGTTCCGGAGAGCATATGGTTGAAATC
TTGAAATACCAATTTATCACTAGTTTGATTGTGTTATCGATGTATAAAGA 3500
TATATTTTATCATTTTTGATTATTATCTGATATTGTGGGGTGTGAAGTAA
TATTATGTGCGTGTGTGGCTGATTATCGAAAAAACTGAAAATTATCAAT 3600
TTTTCTACAGGTTATCTTTTTTTGTTTTATTTTTTCATTATTGTATTCTC
ATACTCCTTATCCTGCCCGAATCACAAAAGTTCCAGACAACCTGAAGGTC 3700
GCATCACGTTTTGTTATAAGAATGTTGAACTGGTCAGCTTTGGAGACAG
AACTGTCCTCAAATGTTGAATATGTTCCGTAAAACACACTGTGTAACA 3800
AAAAGCGTACCCTTTGATCCGGTATTCTTGAAAAAACATAGAAGGGCG
TACTTTTCATATCTCACAAATATGCGTTTTTTATTTTATAATAATATCAT 3900
TTATTGATAATTATATGATTTGTATGTTTTCTTGCTTTAAAATTATGG
TGTGACATCACAGTTTAAAAATTATATGAAAATAATGAGTGAAAAGTTA 4000
AAAATGTATAGTTTCCCGTATTTTCTCCATTAGTATTGTATTCAAACCT
ATTTCCAATGGTGAGCACTATAAACTTTGTAGGGTAATTGAGGTTCAAT 4100
ACTAATTTTTGAATATCTAGCTTTTGACAAATTATTCAAGTTTTGACAAT
GATGCCTTATCAAATTAATAAATAATTACCATAAATTCTTGAAAGCTTTTG 4200
ATTTTGTTTCACTCTGTGAAGGATAGTAATTTATCAACATTTTAACTAGA
TACATCTGTTCTGGCAATAAATTAAGCAAGACTATTACTATGTGCAGTA 4300
TTAATAGCTGCATTGCAACTGTTTGAAAGTTTCAAGTAAAACGCAAAAA
CTCAATTTAATTTTCAAGTTTGTGTTGCAAAATTGGATATATGTATCCATC 4400
AAAAGTCTGATCGCCTGTTTTATCTACTTATTGTCTCCTCAGTTGATTTT
TTTGTAGTTATTATAAACGCTACTTTGAAACCAATTTTTCTTCTCCTCATT 4500
CCACTTTTTTCAATTACCAACTACCGTACATGCAATGATGGGCGGACCCG
AGTCCCATGTTTGGCTGGAAGTGGGTGTTGTCTGCGTATATGAGCGACA 4600
GAGGTCGGGGCTGAAACTGATAAGAATAGTCGACACTAACGCCATAATCG
CTAGCCAGCCATCATGCACACCGAGCTCGGTGTGCACACCATCTTTCTTT 4700
TCAAACCAATACGCTTTGTGCCTTCATTGACAATTTTCTTTTTGATAAAA
TCAGCCTATCTATACTTCCCAATCATTTTTAGTCTTATCGTTGAACAGCT 4800
ATCGAGGTGCCACTGTTTTCACTGATATCTTCTAAGTTACTATGGCATT
ACATCTTTGTGTTCTTATTTTATGGGTTATTTAATTAATTTTGCAGTT 4900
AATTTTTGGAATGAGCAAGAAAATGTTAATTGTAATATCTTCGTCTGAAA
ATTGTCTTCAAATAGTTTTAATTTTAAAGGCAGTATTTAAGAAAATACAC 5000
TTCTCGAAGCATTTTTGAATTTTTGAATTTTTAACTGCTTGATGTTTTA
GGTGCCACTGTTTTCAATTGATAAGTTTTGATGTATAAATGCTTGATTTTC 5100
TTGGCATTCTAATAAAATAGAACTAGAAAATAGATTATAGAATGGGTAC
CTCCTCGAATTTTCCCGAATTGGAAAAAGGATTTTATCGTCATTCTCTCG 5200
ATCCGGAGATGAAATGGCTTCCGAGGCCACTGGTAAATGCGACGGCAAA
TTCTGAGAGAAGAAAGTACTTCTTTTGGTAAATTGGTTCAAGTTCTCCAG 5300
CAAATTTTACGATCGGGAATACTACGAGTATGAAGTGAAAATGACAAAGG
AAGTATTGAATAGAAAACCAGAAAACCTTTCCAAAAAAGACAGAAATT 5400

Anhang

CCAATTCCCGATCGTGCAAAACTCTTCTGGCAACATCTTCGGCATGAGAA
GAAGCAGACAGATTTTATTCTCGAAGACTATGTTTTGATGAAAAGGACA 5500
CTGTTTATAGTGTTCGACTGAACACTGTCACATCAAAAATGCTGGTT
TCGGAGAAAGTAGTAAAAAAGGATTCGGAGAAAAAAGATGAAAAGGATTT 5600
GGAGAAAAAAATCTTATACACAATGATACTTACCTATCGTAAAAAATTTT
ACCTGAACTTTAGTCGAGAAAAATCCGGAAAAAGACGAAGAAGCGAATCGG 5700
AGTTACAAATTCCTGAAGAATGTTATGACCCAGAAAAGTTCGCTACGCGCC
TTTTGTGAACGAGGAGATTAAGTACAATTCGCGAAAAATTTTGTGTACG 5800
ATAATAATTCATTTCTGCGAGTTCCTGAATCGTTTCACGATCCAAACAGA
TTCGAACAATCATTAGAAAGTAGCACCAAGAATCGAAGCATGGTTTGAAT 5900
TTACATTTGGAATCAAAGAATTTTCGATGGTGAACCTGTGCTCAATTTT
CAATTGTCGATAAACTATTCTACAATGCACCGAAAAATGTCTCTTCTGGAT 6000
TATCTTCTCCTAATTGTCGACCCCCAGTCGTGTAACGATGATGTACGAAA
AGATCTTAAAACAAAACACTGATGGCGGGAAAAATGACAATCAGACAAGCCG 6100
CGCGGCCAAGAATTCGACAATTATTGGAAAAATTTGAAGCTGAAATGCGCA
GAAGTTTGGGATAACGAAATGTCGAGATTGACAGAACGACATCTGACATT 6200
TCTAGATTTGTGCGAGGAAAACCTCTTGTGTTATAAAGTCACTGGTAAAT
CGGACAGAGGAAGAAATGCAAAAAAGTACGATACTACATTGTTCAAATC 6300
TATGAGGAAAACAAAAGTTCATTGAGTTTCCCCACCTACCACTAGTCAA
AGTTAAAAGTGGAGCAAAAAGAATACGCTGTACCAATGGAACATCTTGAAG
TTCATGAGAAGCCACAAAGATAACAAGAATCGAATTGATCTGGTGATGCAA
GACAAGTTTCTAAAGCGAGCTACACGAAAACCTCACGACTACAAAGAAAA 6500
TACCCTAAAATGCTGAAAGAATTGGATTTCTTCTGAAGAGCTAAATT
TTGTTGAAAGATTTGGATTATGCTCCAAACTTCAGATGATCGAATGTCCA 6600
GGAAAGGTTTTGAAAGAGCCAATGCTTGTGAATAGTGAATGAACAAAT
TAAAATGACACCAGTGATTTCGTGGATTTCAAGAAAAACAATTGAATGTGG
TTCCCGAAAAAGAATTTGCTGTGCTGTTTTTGTAGTCAACGAAACAGCG
GGAAATCCATGCTTAGAAGAGAACGACGTTGTTAAGTTCTACACCGAACT 6800
AATTGGTGGTTGCAAGTTCCGTGGAATACGAATTGGTGCCAATGAAAACA
GAGGAGCGCAATCTATTATGTACGACGCGACGAAAAATGAATATGCCTTC
TACAAAAATTGTACACTAAATACCGGAATCGGTAGATTTGAAATAGCCGC
AACAGAAGCGAAGAATATGTTTGAACGTCTTCCCGATAAAGAACA AAAAAG 7000
TCTTAATGTTCAATTATCATTTCAAAACGACAACCTGAATGCTTACGGTTTT
GCTGAAACATTATTGCGATCACACCATCGGTGTAGCTAATCAGCATATTAC
TTCTGAAACAGTCAAAAAGCTTTGGCATCACTAAGGCACGAGAAAGGAT
CAAAACGAATTTTCTATCAAATTGCATTGAAAATCAACGCGAAATTAGGA 7200
GGTATTAACCAGGAGCTTGACTGGTCAGAAATTGCAGAAATATCACCAGA
AGAAAAAGAAAGACGGAAAACAATGCCATTA ACTATGTATGTTGGAATTG
ATGTA ACTCATCCAACCTCTACAGTGGAAATTGATTATTCTATAGCGGCT
GTAGTAGCGAGTATCAATCCAGGTGGA ACTATCTATCGAAATATGATTGT 7400
GACTCAAGAAGAATGTCGTCCCGGTGAGCGTGCAGTGGCTCATGGACGGG
AAAGAACAGATATTTTGAAGCAAAGTTCGTGAAATTGCTCAGAGAATTC
GCAGAAAACAACGACAATCGAGCACCAGCGCATATTGTAGTCTATCGAGA
CGGAGTTAGCGATTCGGAGATGCTACGTGTTAGTCATGATGAGCTTCGAT 7600
CTTTAAAAGCGAAGTAAAACAATTCATGTCCGAAACGGGATGGAGAAGAT
CCAGAGCCGAAGTACACGTTTCATTGTGATTCAGAAAAGACACAATACACG
ATTGCTTCGAAGAATGAAAAAGATAAGCCAGTGGTCAATAAAGATCTTA
CTCCTGCTGAAACAGATGTCGCTGTTGCTGCTGTTAAACAATGGGAGGAG 7800
GATATGAAAGAAAAGCAAAGAACTGGAATTGTGAACCCATCATCCGGAAC
AACTGTGGATAAACTTATCGTTTCGAAATACAAATTCGATTTTTTCTTGG
CATCTCATCATGGTGTCTTGGTACATCTCGTCCAGGACATTACACTGTT
ATGTATGACGATAAAGGAATGAGCCAAGATGAAGTCTATAAAATGACCTA 8000
CGGACTTGCTTTTCTCTCTGCTAGATGTCGAAAACCCATCTCGTTGCCTG
TTCCGGTTCATTATGCTCATTATCATGTGAAAAAGCGAAAGAGCTTTAT
CGA ACTTACAAGAACATTTACATCGTGACTATGCACAGCCACGGACTCG
ACACGAAATGGAACATTTTCTCAAACCTAACGTGAAGTACCCTGGAATGT 8200
CGTTTCGATAAGATATCTGAGCTCCGATCGGCCGCTGTCATCAGATCGC
CATCTCGCGCCCGTGCCTCTGACTTCTAAGTCCAATTA CTCTTCAACATC
CCTACATGCTCTTTCTCCCTGTGCTCCACCCCTATTTTTGTTATTATC

Anhang

AAAAAACTTCTTCTTAATTTCTTTGTTTTTAGCTTCTTTAAGTCACC 8400
TCTAACAAATGAAATTGTGTAGATTCAAAAATAGAATTAATTCTGTAATAAA
AAGTCGAAAAAAATTGTGCTCCCTCCCCCATTAAATAATAATTCTATCCC
AAAATCTACACAATGTTCTGTGTACTTCTTATGTTTTTTTTACTTCTG
ATAAATTTTTTTTGAACATCATAGAAAAACCGCACACAAAATACCTTA 8600
TCATATGTTACGTTTCAGTTTATGACCGCAATTTTTATTTCTTCGCACGT
CTGGGCCTCTCATGACGTCAAATCATGCTCATCGTGAAAAAGTTTTGGAG
TATTTTTGGAATTTTTCAATCAAGTGAAAGTTTATGAAATTAATTTTCT
GCTTTTGCTTTTTGGGGTTTCCCCTATTGTTTGTCAAGAGTTTCGAGGA 8800
CGGCGTTTTTCTTGCTAAAATCACAAGTATTGATGAGCACGATGCAAGAA
AGATCGGAAGAAGTTTTGGTTTTGAGGCTCAGTGGAAGGTGAGTAGAAGT
TGATAATTTGAAAGTGAGTAGTGTCTATGGGGTTTTTGCCTTAAATGAC
AGAATACATTCCCAATATACCAAACATAACTGTTTCTACTAGTCGGCCG 9000
TACGGGCCCTTTCGTCTCGCGCTTTCGGTGATGACGGTGAAAACCTCTG
ACACATGCAGCTCCCGGAGACGGTCACAGCTTGTCTGTAAGCGGATGCCG
GGAGCAGACAAGCCCGTCAGGGCGCGTCAGCGGGTGTGGCGGGTGTCCG
GGCTGGCTTAACTATGCGGCATCAGAGCAGATTGTAAGTGCACCA 9200
TATGCGGTGTGAAATACCGCACAGATGCGTAAGGAGAAAATACCGCATCA
GGCGGCCTTAAAGGCCTCGTGATACGCCTATTTTTATAGGTTAATGTCAT
GATAATAATGGTTTCTTAGACGTCAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGC
GCGGAACCCCTATTTGTTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCG 9400
CTCATGAGACAATAACCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAA
GAGTATGAGTATTCAACATTTCCGTGTCGCCCTTATTCCCTTTTTTGC GG
CATTTTGCCTTCTGTTTTTGTCCACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAA
GATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTACATCGAACTGGATCT 9600
CAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTCCAA
TGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTATT
GACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTCCCGCATACACTATTCTCAGAATGA
CTTGTTGAGTACTACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGA 9800
CAGTAAGAGAATTATGCAGTGTGCCATAACCATGAGTGATAACACTGCG
GCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTT
TTTGACAACATGGGGGATCATGTAACCTCGCCTTGATCGTTGGGAACCGG
AGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGTA 10000
GCAATGGCAACACGTTGCGCAAACACTATTAACCTGGCGAACTACTTACTCT
AGCTTCCCGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAG
GACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTTATTGCTGATAAA
TCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCC 10200
AGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGG
CAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTG
ATTAAGCATTGGTAACTGTCAGACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGAT
TGATTTAAAACCTTCATTTTTAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTT 10400
TTGATAATCTCATGACCAAATCCCTTAACTGAGTTTTTCGTTCCACTGA
GCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTT
TCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAACCACCGCTACCAGCGG
TGTTTTGTTGCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAAC 10600
GGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATACTGTCTTCTAGTGTAGCCGTA
GTTAGGCCACCCTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCTACATACCTCGCTC
TGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTT
ACCGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTCCGG 10800
CTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACA
CCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCATTGAGAAAGCGCCACGCTTCCC
GAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTTCGGAACAGG
AGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTC 11000
CTGTCCGGTTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCG
TCAGGGGGCGGAGCCATGGA AAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTTTTACG
GTTCTGGCCTTTTGTGCTGCCCCTTTGCTCACATGTTCTTTCTGCGTTAT
CCCCTGATTCTTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACC 11200
GCTCGCCGACGCCAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGC
GGAAGAGCGCCCAATACGCAAACCGCCTCTCCCCGCGGTTGGCCGATTC

ATTAATGCAGCTGGCACGACAGGTTTCCCGACTGGAAAGCGGGCAGTGAG
CGCAACGCAATTAATGTGAGTTAGCTCACTCATTAGGCACCCAGGCTTT 11400
ACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGAATTGTGAGCGGATAAC
AATTTACACAGGAAACAGCT 11471

Legende:

Rot: elt-2 Promoter (Pos.: 210-5146)

Grün: rde-1 (Pos.: 5149-8211)

Schwarz: pPD49.78

Sequenzen der in dieser Arbeit benutzten Fütterungskonstrukte

crb-1

AGCCGACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCAACCTGGCTTATCG
AAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCGGCAGATCTGATATCATCGATGAATTC
GAGCTCCACCGCGGTGGCGGCCGCTCTAGAAGTGGATCCACCGGTTCCATG
GCTAGCCACGTGACGCGTGGATCCCCCGGGCTGCAGGAATTCGATATCAAGCTTA
TCGATACCGTTCGACCTCGAGTTCTGTAAGAATGGTGCAAATGTGAGATAAGATC
AACGATTATGAGTGTGTTTGTGATGGAAGTGGATTTGAAGGAAGAACTGCACAAC
TGACATCAACGAATGTGCAAATCCAAACAAGTGCATCAACGGAGAATGTACGAATA
CTCTTGAAACTATAAGTGTGCTTGTGCAATGGCTTCATTGGTCCCTCGCTGCTCG
GTTTCGGAACCCTTGCACCGCGCAAATCGCATCAACAACATCTCAAGTGTCACTTG
TGTACATGGAAAATGCGTGAACCCCGTTGTCAAATTGAGAAAAACCGCGAAGTG
GCGAAATACGAGTGCGCCTGCGATCGAGGTTATACGGGGCCTACGTGTTTCGCAA
GAATAAAGAGTCAGCCATGTCAAACATCAGCTATTTGTTTCGGACCAATTATTGCG
GTTGTCATCGTGTTTGGCATATTGGGATGTCTGCTGCTGTTCTTTGTGATACGGGG
CAATAACGCCATGCATGGTCATTATAGCCCAAGTTCGCACGAATTCACACAGAATC
GAATGGCGATGCCAACTGTGATCAAACCTCCACCTCAAGAAGCTTATCTGAACC
CTGAATACCTGAATTATTTGCTCAAAAAGTGTGATTTTTTGCACCCACCCACT
CACCTT

dlg-1

GACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCAACCTGGCTTATCGAAATTAAT
ACGACTCACTATAGGGAGACCGGCAGATCTGATATCATCGATGAATTCGAGCTCCA
CCGCGGTGGCGGCCGCTCTAGAAGTGGATCCACCGGTTCCATGGCTAGCCA
CGTGACGCGTGGATCCCCCGGGCTGCAGGAATTCGATATCAAGCTTATCGATACC
GTCGACCTCGAGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGAATAAAATCTTTATTCAAGATAA
TTTGTATAAAAAGTTTTTAAAAATAATTAATAAAAAAAAAAAGTTTGGAAACCAATGGATGA
AAATAAAATGCTCTCAGAGTAATAAAAGTCCCAAAAAATAAAATGAGCCGAAGTTT
TTCATCAGTAGAGAGTCGGGAATATGATAATGATTTGCGGTTAGTAGAGACAAATG
AAGCGTTGAGAATATCACAACTGTCCCAATTTCAAGTAAAAAGTGAATTGAGTTGG
GGGAGGAAGGAGAGGGAAAAAGGAAAGGAAAGCTGGGGCGGATTATAAAATGCAA
GTATTTGTAAGGGGAATTTCAAGATAAAATGGGCTGTAAAGAAAACAGGCAGTAC

erm-1

CGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCAACCTGGCTTATCGAAATTAA
TACGACTCACTATAGGGAGACCGGCAGATCTGATATCATCGATGAATTCGAGCTCC
ACCGCGGTGGCGGCCGCTCTAGAAGTGTGGATCCACCGGTTCCATGGCTAGCC
ACGTGACGCGTGGATCCCCCGGGCTGCAGGAATTCGATATCAAGCTTATCGATAC
CGTCGACCTCGAGTTTTTTTTTTTTTTTTCACGTATTCATATTTATCATAATATCATG
AGTCATAGTTGAATAACTGTGTTTAAACAACGCATAAATGGGAAAATAGAAGAGTC
GAATATTTAGATTTGAATAATATCATAATTAATAAAAATAAAATAGATAAACATTTTCAG
GGGGATGTCGAGAGTTTGTATGGGGAGAGAGAGGGGAAAAGCGTAGAATTTGAAGT
CTTTGCGCGAGAAATTCGGGGTTTTTTTGGCGGCGGATTTAACAAGTTACTTGAAAA
ATTGGATATGACGAATACAAGAAGAGGGGAATAGAGAAACCGAGCATTTTTTTGAA
GAAAACAAATTTTCGGATAATATTGTAAGGCACTGATGGGGTGAACAAGGAAGTG
AATCGGAACAAACCAATAAATTTTCAAATTAATAATAATAAATTGTTGTCCTATAA
AAAAACGAGAAAGGGAGAAAAGAGCCAAGATGATGAGCATTGGAAGTTGGTGG
GAGACAATTGAGAATATTGTTTAAAAAAATAAAAGGAAATACGATAGAACAATAAT
TACATATTTTCGTATTGAT

hmr-1

GCCGACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCAACCTGGCTTATCGA
AATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCGGCAGATCTGATATCATCGATGAATTCG
AGCTCTCGTTCGGAACAGACTCCCAACAGAGTTACGTTTCAACGAATTTGGAATCC
GGTCAAAATGGAGTCACTGCCGCCGAAAATTCGATATCGGAACCGGAGGACGAC
GTGCTCGACAGGAACCTTCGTGTGTCGGAGGTGTTGCTCAAGGAGAATGCGAGTTA
TTGGCTCCAATTCACGAGGAATCCGACTCGGGCGAGCTTGTGCGATCGATAATGCG
TATACGGTATCTACGCAGTTGGATAAGGGAGAACCATTCTCGTTGCAAGTTAATCA
GATTACACTTGGCACACAGGGACAGAATAAGGGATTCCAGGGATGCATCGGAACG
TATCGTTGGTTCGAAACAGAATCTCCCACTGAAACGCGGCGGAGCAATGGACGAGA
ACGAAGAATCGATTGTCTCAATTTCCAACATGGCCGGAGTCCAAGACGGTTGTGAT
CTTCGAATCACTTGTGCCGACCTTCCAGCCGGTACTGTGGTGGATCGTTCGTCTG
TGTCGATTTCTGGAAGGGTCCATTCTGTACGTGCAATGATGGAGCCAACGCGATTC
TCGGTGATGATGGACAAGTTGTGCGTTGTGGAGAGACGTTGGCCGTGTCGAAACT
CGGAATTAGCTCACCGGCGATTATTCTGATTCTTGTCTCGTTGGCGTTGCTTATACT
GTTGGTTATGATGATGGTTGTGTATACGAGACGATCGCCTGGTGCATTTGAAAATG
TTCGGCCGGGAGGAGATGAATCGTGATAATTTGCGGCAGTATGGTGTGGAAGGGA
GGTGGCGAGGCGGATAACGATTCACTCAATGGCCGGCCTACGTAAACCAGTA
ATGCCACTCGACACA

let-413

GCCGACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCAACCTGGCTTATCGA
AATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCGGCAGATCTGATATCATCGATGAATTCG
AGCTCCACCGCGGTGGCGGCCGCTCTAGACGAAACAAATTCGTTATGGTCAAAAA
ATAGAAATCAATTTTAGTAAGCTAAGTATACTTTTCGTCAGAGAAGAGTTGCCGATTG
GTATTCCGATTGGTTGGACATTAAGAGCATAATTAATAAATTTATGTTTTCGATAC
TATCTGAAATTCATTTTTGAACCAAATAGGACAATTTGAGTGTGAAACCACTTGTTT
TTTTGTCATCAAAAATCCAAACTTTTTGGCAGAGAATAAATATTTTTGAATTATTTTCAA
ATTTTTAAATTTTGGCAGTGAATCACGAATGTCAAAAAAAAACGTCTAATGTCTAGT
TTTCAGCCAAAATCGGCCTCAATACTCACATGGCCTACTCACAGATGTTCTCGAAA
CTGGCGATGGGGACCGCCTTAACACGACTAATTCTACCGTTTCTCGCTTTTTGATC
GCCTCCATTGCATTATCCTGAGATGCGTTGATCATGTTACATCGTTAGCACGAAT

CAATTTGTCTCCTTCACGAAGACCACATCTGTATGCAGCACTTCCAGGTGTGACTT
TGGTGACAAAAAGTCCTGAATCTCCGTTACTGTTTCGGCGCCGGATCGTTTCGAGGTT
CCGCCAGCGAAGGAAAGTCCCAATTTCCAGTGTCTGCTTTTTGGATTCTGATTGT
GTGCATGTTTTGAGTGCCTGCGGCAAGATTTGACAACTTGACAAGGAGGTTGCCA
TTCGTTCTTCTCGTTCTGGTGA

elt-2

ATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCGGCAGATCTGATATCATCGATGAATTCGA
GCTCCACCGCGGTGGCGGCCGCTCTAGAAGTAGTGGATCCACCGGTTCCATGGC
TAGCCACGTGACGCGTGGATCCCCGGGCTGCAGGAATTCGATATCAAGCTTATC
GATACCGTCAACTGTTCAACACCAAAAACCACGTATTCTCCTCCAGTCGCGTATAG
CACTTCTTTGGGACAACCCCCGATTCTGGAAATACCTTCAGAGCAGCCAACTGCTA
AAATTGCCAAGCAGTCTCTAAAAAGTCAAGTAGCTCAAATAGGGGGTCAAACGGA
TCTGCGTCCCGTCGGCAGGGACTTGTGTGCTCCAATTGCAATGGTACCAACACAA
CTCTCTGGAGAAGAAATGCTGAAGGAGATCCGGTCTGCAATGCTTGCGGGCTTTA
CTTCAAACCTCATCACATCCCTCGGCCGACCTCAATGAAGAAAGAAGGTGCTTTAC
AGACAAGAAAGAGAAAATCAAAAAGCGGAGACTCTTCCACACCATCAACGTCACG
GGCCCGAGAAAGGAAGTTTGAGAGAGCCTCTTCTTCGACCGAAAAGGCTCAAAGG
TCATCTAACCGGCGTGCGGGAAGTGCAAAGCAGACCGAGAAGTGAAGCACTGCTG
CCGTGCGAGCTGCGACTGCCACATATGTGTACATGCCGACTTGTATCCCGTTTCC
TCAGCTGCCGTCACCTTGCCAGATCAAACGTACAGTAATTAATCAATGGAACAC
TGCCGCTACAGCTGGGTTGATGATGGTTCAAACGATCAAACACTACGTGTATGCAG
CAACAACTACCAGACTGGCCTAAGACCTGCCGATGTGAGTATGAAGCTGTTTGCC
ACTTCTCGCTAATCCCACCGAACATCCAAGTTCTGTGATGCCAGTTCAGGATGAT
GAAACCAAAGCTGCGGCTCGCGATTTGGAAGCGGTGACCTCGA

ifo-1

TGAGCGCGCGTATACGACTCACTATAGGGCGAATTGGGTACCGGGCCCCCCTC
GAGGTGACGGTATCGATAAGCTTGATTATGCACATGCTGGTGTGATTGTGTTCT
GAAATTACGAGATTTATAGAAACACCTCTTTGAAACATGTCATACCGTGATAGGACT
CTGAGTTTTCCGTTTTGAATTTTCAATGGAGCTGGAATATTTTGGCGATTCAACGAGT
TCGAGCACTGAACAACAGTTCCCGTGGTAGTTGCAGTTGAAGCTGTGCTCACATGA
GAAGTGGTGCTAACTCTTGAATCTTCTTTTTCAAAATGGTGAAGTTAACCGGAATG
TGTGCCTCAATGTGAGCTCTTTTGTGATTGAATATTTTGTTCATCCCAGTTGTTG
GTCTTGCTCATTTGTCGAATCGATTGGTTGCTTTGAGCCAGCTGATATTGAATATCT
TTCTCATTTTGAACCGAGTGATGATGGTGAGCATTTTTCAATTTGATGTTGTGTGATAG
TGGTGAATATGTTCAATTTCCAGCTGTGCTGTGTTGATGAGCATTTTTCACTTTGATGA
TAGTGATGAACATGTTCACTGCCATCTGTATGATAATGATGATGATGATGGTGTGGA
ACGTGAACAGTGTCATAATGGTGTGTTCTGAAACAGAAAATTTTATATTTTCAATTA
TAATTTAAATATTTTACCTTGATCGTGTGGAATATCATAGACAAGTGTCCATGTGGT
TCATCATATACTACACTTCTCGATGAGTTTGTGATCCATGAACAGTTGAATACTCT
TGAGCATTGAGTGTTGAGAAGTAGCATAAGCATCATAATGAGTCGCTGATTCTG
ATTGATTAATTGAGAATGTGTATGAGTTTGGACGGTATTTGAAAGCATATGCGAATG
AGCTCGACTCTCGTGTGGGAATCTTGGACACAGAG

ifc-2

TTGAACGATCGTCTCGCGGATTACATTGAGAAGGTTTCGTTTTCTGGAAGCTCAAAA
CCGATGCCTCAGCCACGATATTGATATTCTTCGCAACGGATTCAGCGGTGGAGGT
CATGTATCTGGACTCTTTGACGCTGAGATCAACCAAGCAAAGCAGATTCTTGAGCA

AACAACCGCTCACCGCTCCACATTTGAAAGAGACATCACTGGTCTCTCCGCGGAG
 ATTGAAGTGTTGAGAAAGAAATGGCTGGACGCTGTCAACGCCGTCAAAGCTCATC
 GTGAGGACCATGATGTGGATTTGGACAGACTTGCCAAGATTGAAGCTGAAATTTCA
 CTTTTCAAAGAAAGATCCGTATTGTTGAGGAAGACGTCATCAGAATTCGCAGAGA
 AAATGACGGAATTTACAATGAAATCGCCGGAATCAAGCAGCTTACCCATAACGAAA
 TTGCTCTGAAGAATGAGCGCAGCTTGAATGTCTCCGATCTTCTTCAGCGCATCAAC
 CTCCT

cyb-3

AGCGCGGTATACGACTCACTATAGGGCGAATTGGGTACCGGGCCCCCCTCGAG
 GTCGACGGTATCGATAAGCTTGATTTGGGAAAGTCGAGAACGAGTAGACGAGACGT
 CGAGAACCTTCCACCGCAAAGTCCAGATATGTTGACCCGTGTCCTCATTACGATTA
 CGACCTCGAGGAGGCCGGAACCCGGACAGTATCTCGGACTATGCTCAAGGGATT
 TTTGACTACTACAGACACCGAGAAGTTCACTTTTCGAGTGAGAAAGTACCTTCACAAA
 CATCCGGAGGTTGACGTCAAGACTCGTGCTATCCTCATTGACTGGATGGTTGAGAT
 TCAGGAGACATTTGAGCTCAACCACGAGACCCTTTACAACGCCGTAAAGCTCACGG
 ATATGTACTIONGTGCAAGACGAAGAATGTTGACAAAAACACCATTGAGGTGAGATAAA
 ATCCAAAGTAGTCTATTATTTTTATCAATAAATTTTCAGAAGCTTGCATGTGTGCCAT
 CTTTATTGCCGCAAGTACGATGAGCGATCTCCACCACTCGTCGATGATCTCATCTA
 CCTTCCGGAGATCGCTTCTCCCGCGATGAGCTTCTTGCCATGGAGCGTGAAGTCT
 TCGCCACCGTCGGATATGATCTCGGCTCACCCTGAGCTATCGGTATCTTCGCCCGC
 TTCGGTCGTGTCTGTCTGTCGATATGAAGACACTCACCATGGGACGCTTCATTCT
 GGAGACATCACTGATGGTCTACGAATACGCTATGGTCTCACAATCCCGTCTTGCCG
 CCGCCGCTTTCGTCTTGCCATGCGTATGCTCGACAAGAATAATGAGTACGAGTGG
 AATCCAGTGCTCGAGAAGTATTCTGGATTCACTGGAGAGGAGGTGATGCCACTGGT
 GGAGCACATGAACCACATTCTTCATTTTTCGAAGGACAAGTGGGCTCAACTCACAT
 CCGTTCGCCAGAAG

Durch „SNP-mapping“ gefundene Kandidatengene für *kc2* und *kc3*

WBGene00000292	cap-1	WBGene00016084	C25A8.4
WBGene00000585	cogc-2	WBGene00016085	C25A8.5
WBGene00000687	col-113	WBGene00016397	C34D4.1
WBGene00000688	col-114	WBGene00016398	C34D4.2
WBGene00000888	cyn-12	WBGene00016399	C34D4.3
WBGene00000942	deb-1	WBGene00016400	C34D4.4
WBGene00001090	drh-1	WBGene00016402	C34D4.10
WBGene00001091	drh-2	WBGene00016403	C34D4.11
WBGene00001241	elo-3	WBGene00016404	C34D4.13
WBGene00001713	grl-4	WBGene00016405	C34D4.14
WBGene00001858	hil-7	WBGene00016594	C42D4.1
WBGene00001862	him-3	WBGene00016595	C42D4.2
WBGene00002178	ink-1	WBGene00016596	C42D4.3
WBGene00002228	klp-18	WBGene00016597	C42D4.11
WBGene00003030	lin-45	WBGene00016598	C42D4.13
WBGene00003043	lip-1	WBGene00016739	C48A7.2

Anhang

WBGene00003527	nas-8	WBGene00017050	D2024.1
WBGene00003695	nhr-105	WBGene00017051	D2024.2
WBGene00003841	ocr-4	WBGene00017052	D2024.4
WBGene00003992	pgl-1	WBGene00017053	D2024.5
WBGene00004411	rpc-1	WBGene00017054	D2024.7
WBGene00004458	rpn-1	WBGene00017480	F15B10.1
WBGene00004473	rps-4	WBGene00017481	F15B10.3
WBGene00004477	rps-8	WBGene00018164	F38A5.7
WBGene00004717	rtw-6	WBGene00018165	F38A5.8
WBGene00004822	skr-16	WBGene00018344	F42C5.2
WBGene00004885	smg-7	WBGene00018345	F42C5.3
WBGene00005205	srq-48	WBGene00018346	F42C5.4
WBGene00005206	srq-49	WBGene00018347	F42C5.5
WBGene00005207	srq-50	WBGene00018348	F42C5.6
WBGene00005811	srw-64	WBGene00018349	F42C5.9
WBGene00005910	srx-19	WBGene00018350	F42C5.10
WBGene00005911	srx-20	WBGene00019213	H20E11.1
WBGene00005941	srx-50	WBGene00019214	H20E11.2
WBGene00006052	ssq-3	WBGene00019215	H20E11.3
WBGene00006069	str-1	WBGene00019258	H34C03.1
WBGene00006109	str-44	WBGene00019259	H34C03.2
WBGene00006113	str-48	WBGene00020041	R13A1.1
WBGene00006114	str-49	WBGene00020042	R13A1.3
WBGene00006115	str-50	WBGene00020043	R13A1.5
WBGene00006116	str-51	WBGene00020044	R13A1.7
WBGene00006250	str-219	WBGene00020045	R13A1.8
WBGene00006251	str-220	WBGene00020046	R13A1.9
WBGene00006276	str-249	WBGene00020069	R13H7.2
WBGene00006504	kcc-1	WBGene00020234	T05A12.3
WBGene00006572	lin-9.1	WBGene00020235	T05A12.4
WBGene00006608	tre-2	WBGene00020444	T12B3.1
WBGene00006748	unc-8	WBGene00020445	T12B3.2
WBGene00006917	vha-8	WBGene00020446	T12B3.3
WBGene00015202	B0478.3	WBGene00020447	T12B3.4
WBGene00015278	C01B10.3	WBGene00020680	T22D1.1
WBGene00015279	C01B10.4	WBGene00020681	T22D1.2
WBGene00015280	C01B10.6	WBGene00020682	T22D1.3
WBGene00015281	C01B10.7	WBGene00020683	T22D1.4
WBGene00015282	C01B10.8	WBGene00020684	T22D1.5
WBGene00015283	C01B10.9	WBGene00020685	T22D1.6
WBGene00015284	C01B10.10	WBGene00020686	T22D1.8
WBGene00015530	C06E4.1	WBGene00020687	rvb-2
WBGene00015531	C06E4.2	WBGene00020688	T22D1.11
WBGene00015532	C06E4.3	WBGene00020689	T22D1.12

Anhang

WBGene00015533	C06E4.4	WBGene00021495	Y40C5A.1
WBGene00015534	C06E4.5	WBGene00021496	Y40C5A.3
WBGene00015535	C06E4.6	WBGene00021497	Y40C5A.4
WBGene00015536	C06E4.7	WBGene00021542	Y43B11AL.1
WBGene00015537	C06E4.8	WBGene00021543	Y43B11AR.1
WBGene00015549	C06G3.3	WBGene00021544	Y43B11AR.3
WBGene00015550	C06G3.4	WBGene00022228	Y73B6A.1
WBGene00015551	C06G3.5	WBGene00022229	Y73B6A.2
WBGene00015552	C06G3.6	WBGene00022230	Y73B6A.3
WBGene00015553	lrx-1	WBGene00022617	ZC477.2
WBGene00015554	C06G3.8	WBGene00022618	ZC477.3
WBGene00015555	C06G3.9	WBGene00022619	ZC477.4
WBGene00015556	C06G3.12	WBGene00022620	ZC477.5
WBGene00015927	dycl-1	WBGene00022621	ZC477.7
WBGene00015928	C17H12.2	WBGene00022622	ZC477.10
WBGene00015929	C17H12.3	WBGene00022725	ZK381.2
WBGene00015930	C17H12.4	WBGene00022726	nhr-249
WBGene00015931	C17H12.5	WBGene00022727	prkI-1
WBGene00015932	C17H12.6	WBGene00022912	C06E4.11
WBGene00015933	C17H12.8	WBGene00023238	C17H12.7
WBGene00015934	ceh-43	WBGene00023331	R13H7.3
WBGene00015935	C17H12.10	WBGene00044294	C01B10.11
WBGene00015936	C17H12.11	WBGene00044352	ZK381.8
WBGene00015937	C17H12.12	WBGene00044503	Y73B6A.6
WBGene00015938	C17H12.13	WBGene00044504	R13A1.10
WBGene00016082	C25A8.1	WBGene00044505	D2024.10
WBGene00016083	C25A8.2	WBGene00045086	Y43B11AR.7

Legende:

Grün unterlegt: Gene, die in der „feeding library“ vorhanden sind

Rot unterlegt: Gene, die nicht in der „feeding library“ vorhanden sind

Danksagung:

Diese Dissertation wurde am Institut für Genetik der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf unter Anleitung von Prof. Dr. Olaf Bossinger angefertigt. Für seine Unterstützung, die vielfältigen Ratschläge und kritischen Anmerkungen gilt ihm mein besonderer Dank.

Herrn Prof. Dr. Lammert danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Ich danke Prof. Dr. Leube und Dr. Carberry für die Gelegenheit an einem sehr spannenden Projekt zu arbeiten und für die tolle Kooperation.

Des Weiteren danke ich den Mitgliedern der Arbeitsgruppe, die mir mit Rat und Tat zur Seite standen und mit denen das Arbeiten stets ein Vergnügen war:

Steffi, Harry, Jan, Eva, Herr Honnen, Robinho, Jenny, Florian, Mic, Esther, Dän, Dominik, Johannes und Gisela.

Danke Harry und Steffi fürs Würmer umsetzen.

Vielen Dank an alle ehemaligen Mitglieder des Instituts, vor allem an Andreas, Anna, Nadine, Carmen, Manuel, Tanja, Ines, Sandy, Maggy, Johannes, Kathrin, Ferdi und Andre für schöne Zeiten im Labor und lustige Wanderungen.

Vielen dank auch an alle Mitglieder des MOCA Teams.

Schönen Dank an Carsten für die lustigen Zeiten im Labor und für den besten Haselnuss Shake, den ich je getrunken habe.

Danke an Herrn Kohlert für seine inspirierende Arbeit über *Tritrichomonas*.

Danke Anke fürs Korrektur lesen.

Danke Kat für ein wenig Ablenkung während etlicher Nachtsessions.

Ein besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mir dieses Studium ermöglicht haben.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich vorliegende Arbeit selbst angefertigt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Alle Stellen, die dem Wortlaut oder dem Sinn nach anderen Werken entnommen wurden, habe ich unter Angabe der Quelle als Entlehnung deutlich gemacht. Diese Arbeit wurde in vorgelegter oder ähnlicher Form bei keiner anderen Institution eingereicht.

Düsseldorf, 18. November 2009

Tobias Wiesenfahrt