



Genetische Identifizierung von Regulatoren der  
Epithelentwicklung im Nematoden  
*Caenorhabditis elegans*

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades  
der Mathematischen-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

**Jennifer Pilipiuk**

aus Rheinberg

Düsseldorf, Dezember 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 Genehmigung der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. Olaf Bossinger  
Koreferent: Prof. Dr. Martin Beye

Tag der mündlichen Prüfung: 25.01.2010

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Pilipiuk, J., Lefebvre, C., Wiesenfahrt, T., Legouis, R., Bossinger, O. (2009). Increased IP<sub>3</sub>/Ca<sup>2+</sup> signaling compensates depletion of LET-413/DLG-1 in *C. elegans* epithelial junction assembly. *Dev Biol* **327**, 34-47.

Die Arbeit wurde durch Mittel des SFB590 und der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) gefördert.

# Inhaltsverzeichnis

<b><i>Inhaltsverzeichnis</i></b>	<b>1</b>
<b><i>Verwendete Abkürzungen</i></b>	<b>6</b>
<b>1 <i>Einleitung</i></b>	<b>8</b>
1.1 Der Nematode <i>Caenorhabditis elegans</i> als Modellorganismus zur Untersuchung der Epithelentwicklung .....	8
1.2 Die molekulare Zusammensetzung der "C. elegans apical junction" .....	13
1.3 Das C. elegans Darmepithel .....	16
1.4 Das Spermathekaepithel und der Prozess der Ovulation in C. elegans .....	19
1.5 Ziele der Arbeit .....	24
<b>2 <i>Ergebnisse</i></b>	<b>25</b>
2.1 <b>Phänotypische Analyse der Postembryogenese nach Funktionsverlust von <i>let-413</i> und <i>dlg-1</i> durch RNAi</b> .....	<b>25</b>
2.1.1 Postembryonale RNAi gegen <i>let-413</i> und <i>dlg-1</i> interferiert nicht mit der Funktionalität der embryonal etablierten Epithelien .....	25
2.1.2 Der postembryonale Funktionsverlust von <i>let-413</i> und <i>dlg-1</i> führt zu stark eingeschränkter Fertilität .....	28
2.1.3 Die postembryonalen <i>let-413</i> und <i>dlg-1</i> RNAi Phänotypen werden durch primäre Defekte im Soma, aber nicht über den Darm vermittelt .....	29
2.1.4 Postembryonale <i>let-413</i> und <i>dlg-1</i> RNAi führt zu Ovulationsdefekten und Endoreplikationen in den Oozyten .....	32
2.1.5 Die postembryonale Herunterregulierung der <i>let-413</i> und <i>dlg-1</i> Genfunktion führt zu Defekten bei der Entwicklung des Spermathekaepithels.....	40
2.1.5.1 Aufbau der Spermatheka .....	40
2.1.5.2 Die Etablierung der „C. elegans apical junction“ in der Spermatheka verläuft defekt .....	42
2.1.5.3 Die Organisation des Aktinzytoskeletts.....	46
2.1.5.4 Elektronenmikroskopische Analyse von Oozyten und Spermatheka nach <i>let-413</i> RNAi .....	48

<b>2.2</b>	<b>Mutationen im <math>IP_3/Ca^{2+}</math> Signalweg supprimieren die durch <i>let-413</i> und <i>dlg-1</i> RNAi induzierten Phänotypen</b>	<b>51</b>
2.2.1	Die <i>ipp-5</i> Mutante ist sensitiv für RNAi	52
2.2.2	Mutationen in <i>ipp-5</i> und <i>itr-1</i> rettet die durch <i>let-413</i> und <i>dlg-1</i> RNAi induzierte Sterilität	56
2.2.3	Die <i>ipp-5</i> Mutante rettet die durch <i>let-413</i> und <i>dlg-1</i> RNAi induzierten Defekte in der „ <i>C. elegans</i> apical junction“ und des Aktinzytoskeletts in der Spermatheka	58
2.2.4	Ein Funktionsverlust von <i>ipp-5</i> und eine funktionsverstärkende Mutation in <i>itr-1</i> können den embryonalen <i>let-413</i> und <i>dlg-1</i> RNAi Phänotyp retten	60
2.2.5	Die <i>ipp-5</i> Mutante kann nicht jeden Funktionsverlust epithelialer Gene retten	64
<b>2.3</b>	<b>Ein Verlust der <i>itr-1</i> Genfunktion und die Zugabe des <math>Ca^{2+}</math>-Chelators EGTA verstärken die <i>let-413</i> und <i>dlg-1</i> RNAi Phänotypen</b>	<b>69</b>
2.3.1	Eine kältesensitive <i>itr-1</i> Mutante verstärkt den <i>let-413</i> (RNAi) Phänotyp	69
2.3.2	RNAi gegen <i>itr-1</i> interferiert mit der DLG-1 Expression	71
2.3.3	Die Zugabe von EGTA verstärkt die durch <i>let-413</i> und <i>dlg-1</i> RNAi induzierte Letalität	72
<b>2.4</b>	<b>Identifikation von <i>let-413</i> Suppressoren durch einen EMS-Mutagenese-Screen</b>	<b>75</b>
<b>3</b>	<b><i>Diskussion</i></b>	<b>82</b>
3.1	Die Spermatheka als Modellsystem für die Untersuchung der Epithelentwicklung in <i>C. elegans</i>	82
3.2	Kompensation <i>let-413</i> und <i>dlg-1</i> RNAi induzierter Defekte durch $IP_3/Ca^{2+}$ Signale	84
3.3	Der Einfluss von Inositolphosphaten, Phospholipiden und $Ca^{2+}$ auf die Zellpolarität	88
3.4	Identifikation von <i>let-413</i> Suppressoren durch klassische Genetik und Ausblick	93
<b>4</b>	<b><i>Zusammenfassung</i></b>	<b>95</b>
<b>5</b>	<b><i>Summary</i></b>	<b>96</b>

---

<b>6</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>97</b>
<b>6.1</b>	<b>Chemikalien, Materialien, Software und Geräte</b>	<b>97</b>
<b>6.2</b>	<b>Molekularbiologische Methoden</b>	<b>99</b>
6.2.1	Medien für Bakterien	99
6.2.2	Bakterienstämme	99
6.2.3	Vektoren	99
6.2.4	Isolierung genomischer DNA aus einer <i>C. elegans</i> Population	100
6.2.5	Phenol-Chloroform Extraktion	100
6.2.6	DNA Fällung	101
6.2.7	Bestimmung der Konzentration einer DNA Probe	101
6.2.8	„Polymerase-chain-reaction“ (PCR)	101
6.2.9	Primer	102
6.2.10	Konstrukte	103
6.2.11	DNA Gelelektrophorese	103
6.2.12	Manipulation von DNA	104
6.2.12.1	Restriktionsverdau von DNA	104
6.2.12.2	Ligation von DNA-Fragmenten	104
6.2.12.3	Fällung von DNA	105
6.2.13	Elution von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen	105
6.2.14	Herstellung elektrokompetenter Bakterien	105
6.2.15	Elektrotransformation kompetenter Zellen mit Plasmid DNA	106
6.2.16	Isolierung von Plasmid-DNA	107
6.2.16.1	Schnellpräparation von Plasmid-DNA (Mini-Präparation)	107
6.2.16.2	Gewinnung größerer Plasmidmengen	107
6.2.17	In vitro Transkription	108
6.2.18	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	108
6.2.19	Coomassie-Färbung von Proteingelen	110
6.2.20	Immuno-Blotting (Western-Blotting)	110
<b>6.3</b>	<b>Zellbiologische Methoden</b>	<b>113</b>
6.3.1	Verwendete <i>C. elegans</i> -Stämme und Haltung	113
6.3.2	Einfrieren zur Konservierung von <i>C. elegans</i> Stämmen	114
6.3.3	Synchronisierung einer <i>C. elegans</i> -Population	114
6.3.4	Herstellung Agarose-beschichteter Objektträger und Deckgläser	115
6.3.4.1	Für <i>in vivo</i> -Beobachtung	115
6.3.4.2	Für Mikroinjektion	115
6.3.5	Herstellung Polylysin-beschichteter Objektträger	115
6.3.6	Präparation von Embryonen	115
6.3.7	<i>In vivo</i> -Beobachtungen	116
6.3.8	Antikörperfärbung an Embryonen/Larven/Gonaden	116
6.3.9	Aktinfärbung an Embryonen	118

6.3.10	Doppelfärbung eines Antikörpers mit Phalloidin .....	119
6.3.11	Die Technik der „RNA-mediated interference“ (RNAi) .....	120
6.3.11.1	RNAi per Mikroinjektion .....	120
6.3.11.2	RNAi über Fütterung von Bakterien .....	120
6.3.12	Ermittlung der Sterilitätsrate mittels statistischer Auszählung der Nachkommen .....	121
6.3.13	EGTA Test .....	122
6.3.14	EMS-Mutagenese- <i>let-413</i> -Suppressor-Screen .....	123
6.3.15	Elektronenmikroskopie .....	124
6.3.16	Anzahl der Auswertungen .....	124
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>125</b>
<b>8</b>	<b>Anhang</b>	<b>137</b>
<b>8.1</b>	<b>Die Zahlen der einzelnen Experimente des Ergebnisteils .....</b>	<b>137</b>
8.1.1	Auszählungen der Nachkommen des N2 Wildtyp Stammes .....	137
8.1.2	Auszählungen der Nachkommen der <i>ipp-5(sy605)</i> Mutante .....	139
8.1.3	Auszählungen der Nachkommen der <i>itr-1(sy290)</i> Mutante .....	140
8.1.4	Auszählungen der Nachkommen des N2 Stammes und der <i>itr-1(sy290)</i> Mutante nach Verdünnung von <i>let-413(RNAi)</i> .....	140
8.1.5	Auszählungen der Nachkommen der <i>rrf-1(pk1417)</i> Mutante .....	141
8.1.6	Auszählungen der Nachkommen der <i>rrf-3(pk1426)</i> Mutante .....	141
8.1.7	Auszählungen der Nachkommen des OLB11 Stammes .....	142
8.1.8	Auszählungen der Nachkommen der <i>rde-1(ne219)</i> Mutante .....	142
8.1.9	Auszählungen der Nachkommen nach Kreuzung mit N2 Wildtyp Männchen .....	143
8.1.10	Auswertung der Letalität von N2, <i>itr-1(jc5)</i> , <i>ipp-5(sy605)</i> und <i>itr-1(sy290)</i> nach <i>let-413(RNAi)</i> .....	144
8.1.11	Auswertung der Letalität durch <i>let-413</i> und <i>dlg-1</i> RNAi mit Zugabe von EGTA .....	146
8.1.12	Detaillierte Ergebnisse des <i>let-413</i> Suppressor Screens .....	147
8.1.13	Auswertung der Suppressoren .....	150
<b>8.2</b>	<b>Sequenzen der eingesetzten RNAi Fütterungskonstrukte .....</b>	<b>152</b>
8.2.1	Kontrolle pPD129.36 (ohne Insert) .....	152
8.2.2	<i>crb-1</i> .....	152
8.2.3	<i>cmd-1</i> .....	153
8.2.4	<i>cyb-3</i> .....	153
8.2.5	<i>dlg-1</i> .....	154
8.2.6	<i>erm-1</i> .....	154
8.2.7	<i>hmp-1</i> .....	154
8.2.8	<i>hmp-2</i> .....	155
8.2.9	<i>hmr-1</i> .....	155

---

8.2.10	<i>itr-1</i> .....	156
8.2.11	<i>let-413</i> .....	156
8.2.12	<i>mklp-1 (zen-4)</i> .....	157
8.2.13	<i>par-3</i> .....	157
8.2.14	<i>par-6</i> .....	158
<b>8.3</b>	<b>Film-Sequenzen</b> .....	<b>159</b>

## Verwendete Abkürzungen

%	Prozent
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
α-	Alpha-
Abb.	Abbildung
Abs.	Abschnitt
AK	Antikörper
As	Aminosäure
β-	Beta-
Bp	Basenpaare
BSA	Bovine Serum Albumin (Rinderserumalbumin)
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
Ca <sup>2+</sup>	Calciumionen
CCC	„catenin-cadherin-complex“
CeAJ	„ <i>C. elegans</i> apical junction“
CFP	„cyan fluorescent protein“
cm	Zentimeter
Cy2	Carbocyanin
Cy3	Indocarbocyanin
Cy5	Indodicarbocyanin
DA	Dalton
DAC	„DLG-1–AJM-1–complex“
DAG	Diacylglycerol
d.h.	das heißt
dH <sub>2</sub> O	demineralisiertes Wasser
DIK	Differential Interferenz Kontrast
DNA	„deoxyribonucleic acid“
dsRNA	doppelsträngige RNA
EGF	„epidermal growth factor“
EGTA	Ethylenglykol-bis(aminoethylether)-N,N,N'N'-Tetraessigsäure
Emo	„endomitotic oocyte“
EMS	Ethylmethansulfonat
EtBr	Ethidiumbromid
F	Filialgeneration
GFP	„green fluorescent protein“
ggf.	gegebenenfalls
gof	„gain of function“
h	Stunde(n)
IP <sub>3</sub>	Inositol 1,4,5 Triphosphat
J	Joule
k	Kilo

---

M	Molarität
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mRNA	„messenger RNA“
n	Anzahl
LB	Luria-Bertani
lof	„loss of function“; Allelbeschreibung
NEBD	„nuclear envelope break down“
ng	Nanogramm
NGM	„nematode growth medium“
nm	Nanometer
OD	optische Dichte
PCR	„polymerase chain reaction“, Polymerasekettenreaktion
pH	potentia Hydrogenii
PIP <sub>2</sub>	Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphat
PLC	Phospholipase C
PPC	„PAR-3–PAR-6–PKC-3 complex“
RNA	„ribonucleic acid“
RNAi	RNA-vermittelte Interferenz
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
s.	siehe
siRNA	small interfering RNA
s.o.	siehe oben
s.u.	siehe unten
Tab.	Tabelle
ü.N.	über Nacht
V	Volt
vgl.	vergleiche
WT	Wildtyp
(w/v)	weight per volume
z.B.	zum Beispiel

# 1 Einleitung

Die Entwicklungsgenetik setzt sich aus den Disziplinen der Genetik, Zell-, Molekular- und Entwicklungsbiologie zusammen, um Fragen, die sich z.B. mit der Entwicklung von Zellgeweben befassen, zu beantworten. Epithelien sind spezialisierte Zellverbände, die Abschlussgewebe aller inneren und äußeren Körperoberflächen darstellen. Epithelzellen sind so differenziert, dass sie verschiedene Funktionen, wie z.B. die Schutzfunktion der Epidermis, Sekretion von Drüsengeweben oder die Absorption durch das Darmepithel, verrichten. Wenn auch die Aufgaben der Epithelien vielfach variieren können, so ist der Aufbau selbst in verschiedenen Organismen prinzipiell gleich, da Komponenten und Proteinkomplexe in Vertebraten und Invertebraten konserviert sind. Somit lassen Untersuchungen in Modellorganismen Rückschlüsse auf die Zellprozesse in anderen Organismen zu, um damit grundsätzliche entwicklungsbiologische Fragen beantworten zu können. Der Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* hat sich in den letzten Jahren als hervorragender Modellorganismus etabliert, um die Entwicklung von Epithelien zu untersuchen.

## 1.1 Der Nematode *Caenorhabditis elegans* als Modellorganismus zur Untersuchung der Epithelentwicklung

Der Molekularbiologe Sydney Brenner befasste sich 1963 mit Fragestellungen der Entwicklungsbiologie. Auf der Suche nach einem idealen Modellorganismus, um die Genetik für die Entwicklung des Nervensystems zu analysieren, entschied er sich letztendlich für die Arbeit mit dem unscheinbaren Fadenwurm *Caenorhabditis elegans*. Sein 1974 erschienenes Werk „The genetics of *Caenorhabditis elegans*“ (Brenner, 1974) ist heute als richtungsweisende Arbeit einzuordnen. Brenner erhielt dafür im Jahre 2002 zusammen mit John Sulston und Robert Horvitz den Nobelpreis für Physiologie oder Medizin. Denn sowohl die Nematodenforschung, als auch die Entwicklungsbiologie, wurden durch diese Arbeiten maßgeblich beeinflusst. So gilt *C. elegans* heute neben Organismen wie der Taufliege *Drosophila melanogaster*, dem Krallenfrosch *Xenopus laevis* oder der Maus *Mus musculus* als ausgezeichneter Modellorganismus für die Entwicklungsbiologie und die Genetik.

*C. elegans* ist ein ca. 1mm großer, frei in der Erde lebender Fadenwurm, der sich von Bakterien und Pilzen ernährt (Wood, 1988). Im Labor kann er auf mit Bakterien (*Escherichia coli*) beimpften Agarplatten gehalten und durch seine kurze Generationszeit (drei Tage bei 25 °C) ähnlich wie ein Mikroorganismus kultiviert werden. Der Nematode existiert entweder als selbst befruchtender Hermaphrodit oder als allerdings nur selten vorkommendes Männchen. Dadurch wird die Durchführung genetischer Kreuzungen mit dem Wurm möglich (Hodgkin und Brenner, 1977). Der adulte Hermaphrodit besitzt eine sehr einfache Anatomie (Abb.1). Seine äußere Hülle besteht aus einer dreischichtigen, kollagenen Kutikula, sezerniert von der darunter liegenden synzytialen Hypodermis. Vier Quadranten der Körpermuskulatur, der Verdauungstrakt, bestehend aus Pharynx, Darm und Hinterdarm und die Gonade befinden sich im Inneren des Wurms, welches eine flüssigkeitsgefüllte Leibeshöhle darstellt.

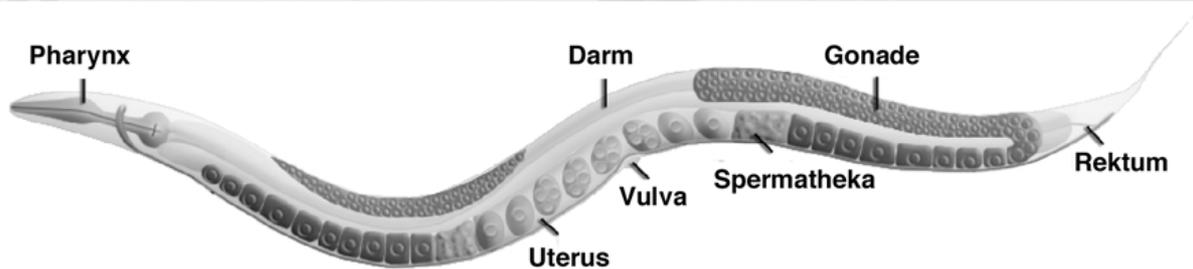


Abb. 1: Schemazeichnung eines lateralen Querschnitts durch einen adulten Hermaphroditen von *Caenorhabditis elegans* (modifiziert nach [www.wormatlas.org](http://www.wormatlas.org)).

Ein großer Vorteil für die Arbeit mit *C. elegans* ist seine Transparenz, sodass die gesamte Entwicklung *in vivo* verfolgt werden kann. Zudem zeigt dieser Organismus das Phänomen der Eutelie und besitzt somit einen invariablen Zellstammbaum (Sulston et al., 1983), d.h. das Entwicklungsschicksal jeder Zelle ist bezogen auf den Zeitpunkt und Zahl der Zellteilungen von Individuum zu Individuum identisch und so können Fehlentwicklungen erkannt werden. Durch die so genannte 4D Mikroskopie ist es möglich, innerhalb kurzer Zeit den kompletten invariablen Zellstammbaum zu analysieren (Schnabel et al., 1997).

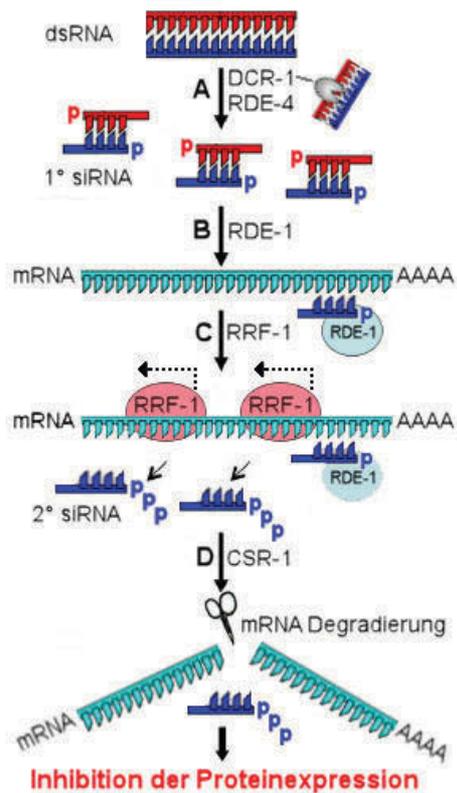
*C. elegans* war der erste multizelluläre Organismus, dessen Genom komplett entschlüsselt wurde (The\_C\_elegans\_Sequencing\_Consortium, 1998). Es ist in etwa

---

100 MB groß und umfasst 20178 kodierende Sequenzen auf 5 Autosomen und einem X-Chromosom (wormpep203, Stand vom 28.05.2009; [http://www.sanger.ac.uk/Projects/C\\_elegans/WORMBASE/current/release\\_notes.txt](http://www.sanger.ac.uk/Projects/C_elegans/WORMBASE/current/release_notes.txt)). Die Internetplattform „Wormbase“ (<http://www.wormbase.org>), enthält die über „Genefinder“ gefundenen Gensequenzen (Favello et al., 1995), DNA- und Proteinsequenzen der vorhergesagten Gene von *C. elegans*. Darüber hinaus bietet „Wormbase“ viele nützliche Hilfsmittel, wie z.B. Beschreibungen von Expressionsmustern, Sequenzanalyse über BLAST, und alle anderen *C. elegans*-relevanten Daten (Rogers et al., 2008).

So können *C. elegans*-Homologe von Genen, die wichtige entwicklungsbiologische Funktionen haben, identifiziert und untersucht werden. Außerdem sind Methoden der reversen Genetik möglich, wie z.B. die der RNA-vermittelten Interferenz (RNAi; Abb.2; Mello und Conte, 2004; Fire et al., 1998; Fraser et al., 2000; Kamath und Ahringer, 2003). Für die wegweisende Aufklärung des RNAi Mechanismus und seiner Nutzung für den experimentellen Ansatz bei Forschungsfragen erhielten Andrew Fire und Craig Mello im Jahre 2006 den Nobelpreis für Physiologie oder Medizin. Mit Hilfe der RNAi kann gezielt die Expression einzelner Gene gehemmt werden, um so den Funktionsverlust des entsprechenden Gens bei *C. elegans* zu untersuchen. Die Methode der RNAi wurde auch im Rahmen dieser Arbeit genutzt um Genfunktionen in embryonalen und postembryonalen Epithelgeweben zu untersuchen.

Während der Embryonalentwicklung werden in *C. elegans* drei Haupt-Epithelien etabliert; die Hypodermis, der Pharynx und der Darm. Nach dem Schlüpfen der L1-Larve werden vier larvale Stadien, die sich durch starkes Wachstum mit anschließenden Häutungen auszeichnen, zum adulten Tier durchlaufen. Während der Larvalentwicklung wird die somatische Gonade differenziert und stellt neben der Vulva, postembryonal etablierte Epithelien dar (Abb.5).



**Abb. 2: Schematische Darstellung des RNAi Mechanismus in *C. elegans*.**

Der Mechanismus der RNAi kann als Methode der reversen Genetik in *C. elegans* genutzt werden.

Dabei wird exogene dsRNA den Würmern zugeführt, welche in den Zellen durch den Dicerkomplex (DCR-1; A) in primäre siRNAs prozessiert wird (Grishok, 2005; Jose und Hunter, 2007). Diese wird von dem Argonaut Protein RDE-1 (B) gebunden. Dadurch kann eine RNA abhängige RNA Polymerase (RRF-1; C) sekundäre siRNAs herstellen. Diese bilden einen „RNA-induzierten Silencing-Complex“ (RISC) und bauen mit Hilfe von CSR-1 (D), ein Protein mit enzymatischer Aktivität, die komplementären Ziel mRNAs ab. Dadurch wird die Translation des entsprechenden Proteins inhibiert. (Abb. modifiziert nach: Habig et al., 2008)

Epitheliale Gewebe zeichnen sich durch eine Reihe von typischen Charakteristika aus. Sie bilden Abschlussgewebe und stehen im direkten Kontakt mit der Außenwelt oder einem Lumen. Der epitheliale Zellverband besteht aus Zellen, welche durch interzelluläre Kontaktstrukturen miteinander verbunden sind, die u. a. die Integrität des Epithels gewährleisten (Knust und Bossinger, 2002). Epithelien üben neben der Funktion des Gewebeabschlusses eine weitere wichtige Funktion aus. Sie dienen als selektive Barrieren, welche den kontrollierten Molekül- und Ionenaustausch zwischen den Zellen und den zu trennenden Kompartimenten des Organismus gewährleisten. Dies wird durch einen stark polaren Aufbau der Zellen ermöglicht, welcher sich durch die asymmetrische Verteilung von Molekülen und Zellorganellen, der polarisierten Organisation des Zytoskeletts und der Verteilung der Membranmoleküle auszeichnet (Lynch und Hardin, 2009; Nejsum und Nelson, 2009; Drubin und Nelson, 1996; Eaton und Simons, 1995; Nelson, 2003). So besitzen die Epithelzellen klar definierte Membrandomänen; eine apikale, die oft in Kontakt mit der Außenwelt oder einem Lumen steht und eine basolaterale Membrandomäne, welche benachbarte Zellen verbindet und oft einer Basallamina (ein Bestandteil der extrazellulären Matrix)

aufgesetzt ist. Die basolaterale Membran besitzt zudem interzelluläre Kontaktstrukturen, welche in verschiedenen Organismen unterschiedlich organisiert sind (Abb.3). Dabei ist allen bisher untersuchten Epithelzellen gemeinsam, dass sich unter der apikalen Membrandomäne ein adhäsiver Gürtel aus Proteinen anschließt. Dieser enthält viel Aktin und stellt zwischen den benachbarten Zellen eine elektronendichte Kontaktstruktur dar und ist somit im Elektronenmikroskop gut sichtbar.

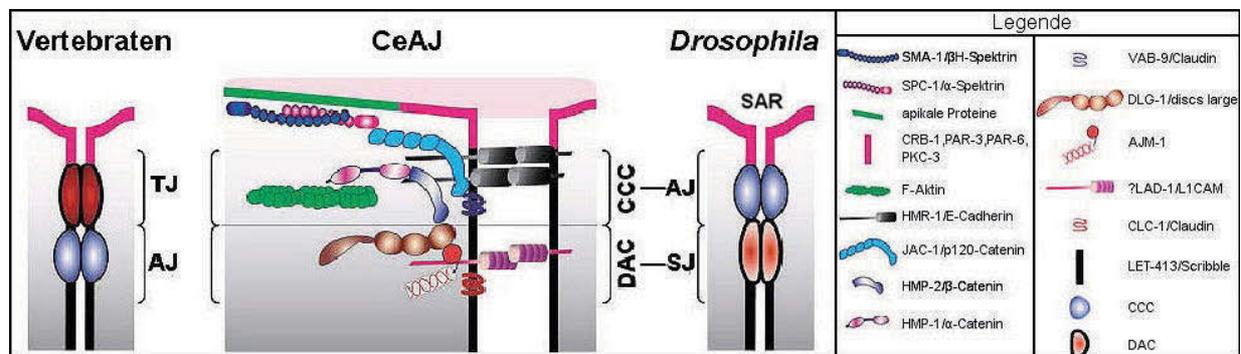
In *Drosophila* und Vertebraten existieren verschiedene epitheliale Kontaktstrukturen (z.B. *Zonula adherens*, „septate junction“, „tight junction“ oder Desmosomen), die unterschiedliche Aufgaben ausüben. Im Gegensatz dazu weisen Epithelien im *C. elegans* Embryo apikal lediglich eine elektronendichte Kontaktstruktur auf, die sog. „*C. elegans* apical junction“ (CeAJ; McMahon et al., 2001). Diese ist der *Zonula adherens* in *Drosophila* und Vertebraten ähnlich (Legouis et al., 2000).

Da die Bildung von Epithelien während der Embryogenese mit hoher Genauigkeit erfolgt, bieten Modellorganismen wie *C. elegans* und *Drosophila* einen ausgezeichneten funktionellen Ansatz zur Analyse der Epithelbildung *in vivo* (Lynch und Hardin, 2009; Labouesse, 2006; Knust, 2002; Müller, 2000). Viele Polaritätsgene wurden somit in Invertebraten-Systemen wie *Drosophila* und *C. elegans* identifiziert und analysiert. So wurden in Bezug auf die Bildung interzellulärer Kontaktstrukturen in *C. elegans* Screens, nach chemischer Mutagenese oder durch Anwendung von RNAi, durchgeführt (Labouesse, 1997; McMahon et al., 2001). Dabei konnten mit *dlg-1/discs large* und *let-413/scribble* zwei Schlüsselgene für die Bildung der CeAJ identifiziert werden (Lynch und Hardin, 2009; Bossinger et al., 2001; Köppen et al., 2001; Legouis et al., 2000).

Mit der schnellen Entdeckung entsprechender Vertebraten-Homologe wurde zwar deutlich, dass viele Proteindomänen, einzelne Proteine oder auch ganze Proteinkomplexe evolutionär konserviert sind, jedoch ihre Funktion von einem Organismus zum anderen variieren kann (Roh und Margolis, 2003; Suzuki und Ohno, 2006). Der Frage, wie die verschiedenen Proteine zusammen wirken, um die notwendige Zellpolarität zu etablieren und aufrecht zu erhalten, ist vielfach nachgegangen worden. Jedoch ist der molekulare Wirkmechanismus der verschiedenen Proteinkomplexe immer noch nicht im Detail verstanden.

## 1.2 Die molekulare Zusammensetzung der „*C. elegans* apical junction“

Die CeAJ formt einen kontinuierlichen Gürtel um den Apex der Epithelzellen und bildet die Grenze zwischen der apikalen und basolateralen Membrandomäne. Auf Immunfluoreszenz-Ebene kann sie molekular in eine apikale und eine basale Einheit unterteilt werden, die eine unterschiedliche Proteinzusammensetzung aufweisen (Abb.3). Die CeAJ enthält Proteinhomologe, die in den oben genannten Zell-Zell-Kontakten der anderen Organismen vorkommen und sich in drei Bereiche einteilen lassen. Hauptkomponenten des apikalen Bereichs der CeAJ sind Crumbs und der Catenin-Cadherin-Komplex (CCC). Basal dazu lokalisiert der DLG-1–AJM-1–Komplex (DAC). Die apikale Expressionsdomäne des PAR-3–PAR-6–PKC-3 Komplexes (PPC) und die basolaterale Lokalisation von LET-413 überlappen wahrscheinlich innerhalb der CeAJ (Lynch und Hardin, 2009; Labouesse, 2006).



**Abb. 3: Schematische Darstellung bekannter Komponenten der „*C. elegans* apical junction“ (CeAJ).**

Die CeAJ bildet im Gegensatz zu der „tight junction“ (TJ) und der „adherens junction“ (AJ) in Vertebraten und der AJ und der „septate junction“ (SJ) in *Drosophila* eine einzelne elektronendichte Struktur und bildet die Grenze zwischen der apikalen und basolateralen Membrandomäne. Auf molekularer Ebene ist sie heterogen und enthält mit dem Catenin-Cadherin-Komplex (CCC), dem DLG-1–AJM-1–Komplex (DAC) und VAB-9/Claudin sowohl Bestandteile der AJ als auch der SJ und der TJ. Mit CRB-1/Crumbs besitzt sie auch eine Komponente der „subapical region“ (SAR) in *Drosophila*; modifiziert nach Labouesse, 2006.

Die *par*-Gene („partitioning defective“) wurden in einem Screen identifiziert, in dem nach Polaritätsdefekten im frühen Embryo gesucht wurde (Gönczy und Rose, 2005; Kemphues et al., 1988; Nance, 2005). Der **PAR-3–PAR-6–PKC-3 Komplex (PPC)** lokalisiert jedoch auch apikal in Epithelzellen (Bossinger et al., 2001; Hurd und Kemphues, 2003; Leung et al., 1999; McMahon et al., 2001). Dennoch war lange Zeit die Rolle des PPC während der Polarisierung von *C. elegans* Epithelien oder der Bildung der CeAJ nicht bekannt, da nach Eliminierung seiner Funktion schon sehr früh im 1-Zellstadium Defekte auftreten. In einer Studie gelang es mit Hilfe gezielter Protein-Degradation sowohl die maternale als auch die zygotische Funktion von PAR-6 (*par-6M/Z*) vor dem Einsetzen der epithelialen Polarisierung zu entfernen (Totong et al., 2007). In so manipulierten Epithelzellen ist die PKC-3 uniform im Zytoplasma verteilt und die Epithelzellen können während der Elongation des Embryos ihre Zell-Zelladhäsion nicht aufrechterhalten. Erstaunlicherweise lokalisieren Proteine der CeAJ noch apikal und demonstrieren so, dass die PAR-6 Funktion und die asymmetrische Verteilung der PKC-3 keine generelle Voraussetzung für die Polarisierung der Epithelzellen ist. Auf Immunfluoreszenz-Ebene treten aber Defekte bei der Bildung der CeAJ auf. So formen die Proteine HMP-1/ $\alpha$ -Catenin, HMR-1/E-Cadherin und DLG-1 keinen kontinuierlichen Gürtel mehr um den Apex der Zellen (Totong et al., 2007). Dieser erscheint stattdessen fragmentiert und zeigt deutliche Ähnlichkeit zum diesbezüglichen Phänotyp in *dlg-1* und *let-413* Embryonen (s.u.). Es lässt sich daher festhalten, dass der PPC in *C. elegans* während der Polarisierung von Epithelien wahrscheinlich eine ähnliche Rolle spielt wie in anderen Modellsystemen (Macara, 2004; Suzuki und Ohno, 2006).

In einem Screen, in dem Gene identifiziert wurden, die für die epidermale Morphogenese, den ventralen Schluss und die Elongation zuständig sind, wurde der **Catenin–Cadherin Komplex (CCC)** gefunden (Costa et al., 1998). Dieser Komplex setzt sich aus den Proteinen E-Cadherin, (HMR-1),  $\alpha$ -Catenin (HMP-1) und einem  $\beta$ -Catenin, (HMP-2) zusammen. Die Eliminierung von  $\alpha$ -,  $\beta$ -Catenin und E-Cadherin in *Drosophila* hat dramatische Effekte in Bezug auf die Bildung der „Zonula adherens“ und die allgemeine epitheliale Polarität (Knust, 2002). In *C. elegans* jedoch zeigen Mutationen im CCC lediglich, dass die ventralen Hypodermiszellen den Embryo während der Morphogenese nicht korrekt verschließen (Costa et al., 1998, Raich et al., 1999). Dabei verursachen sie keine generellen Defekte in Epithelien bezüglich der Zellpolarität und der Zelladhäsion.

Im Gegensatz dazu interferiert die Ausschaltung von Komponenten des CCC zusammen mit DLG-1 jedoch erheblich mit der Integrität des *C. elegans* Darmepithels (Segbert et al., 2004). Wahrscheinlich stabilisiert DLG-1 als wichtiges Adhäsionsmolekül weitere Proteine in der CeAJ, die zusammen mit dem CCC für den korrekten Zusammenhalt der Epithelzellen verantwortlich sind (Asano et al., 2003; Chen et al., 2001; Simske et al., 2003).

Mit der Identifikation von *C. elegans* DLG-1, dem Homolog des *Drosophila* Tumorsuppressorproteins Discs large, wurde demnach eine zentrale Komponente der CeAJ gefunden, die ihre Integrität in allen embryonalen Epithelgeweben gewährleistet (Bossinger et al., 2001; McMahon et al., 2001). DLG-1 ist ein Protein mit einer SH3 Domäne, einer GUK Domäne und drei PDZ Domänen am N-Terminus. Der konservierte N-Terminus von DLG-1 ist für die Lokalisation des Proteins in der CeAJ verantwortlich, wo es mit AJM-1, einem „coiled-coil“ Protein, physikalisch interagiert und den **DLG-1/Discs large-AJM-1 Komplex (DAC)** ausbildet (Lockwood et al., 2008; Firestein und Rongo, 2001; Köppen et al., 2001). Nach Ausschaltung von DLG-1 ist die elektronendichte Struktur der CeAJ größtenteils nicht mehr nachweisbar und auf Immunfluoreszenz-Ebene zeigt sich lediglich ein diskontinuierlicher Gürtel von CeAJ Proteinen (Bossinger et al., 2001; McMahon et al., 2001), der an eine „spot adherens junction“ in *Drosophila* erinnert (Grawe et al., 1996; Tepass, 1996). Wird neben der Funktion von *dlg-1* auch noch die von *let-413* herunterreguliert, so kommt es zur Verstärkung dieses Phänotyps (Köppen et al., 2001).

**LET-413** (Scribble/Erbin) ist das Homolog des *Drosophila* Scribble Proteins, welches zur Familie der LRR/PDZ (leucine-rich repeats und **PDZ domain**) Proteine gehört. Es wird während der Zellproliferation im *C. elegans* Embryo zunächst im gesamten Zellkortex exprimiert. Doch mit dem Einsetzen der Morphogenese wird die Expression von LET-413 auf die basolaterale Membrandomäne in Epithelien beschränkt (Legouis et al., 2000; Legouis et al., 2003). Bei Funktionsverlust von *let-413* kommt es ähnlich wie bei *dlg-1* (s.o.) zur abnormalen Ausbildung einer „spot-like adherens junction“, die im Elektronenmikroskop nachgewiesen werden konnte (Legouis et al., 2000; McMahon et al., 2001). Außerdem verbleiben die apikalen Proteine nicht an der apikalen Membrandomäne, sondern fehllokalisieren nach basolateral. Damit kann LET-413 wahrscheinlich früh während der Epithelbildung eine Rolle für die Etablierung und später eine Funktion für die Aufrechterhaltung der

epithelialen Polarität zugeordnet werden. Allerdings ist der Prozess, wie LET-413 die Lokalisation der apikalen Proteine des DAC und auch des PPC steuert, mechanistisch weitest gehend unbekannt und stellt eine große Herausforderung für das Verständnis der epithelialen Polarität dar.

### 1.3 Das *C. elegans* Darmepithel

Viele Erkenntnisse über die oben beschriebenen epithelialen Gene, wurden im *C. elegans* Embryo gewonnen. Während der Embryogenese werden drei Haupt-Epithelien gebildet: die Hypodermis, der Pharynx und der Darm (Michaux et al., 2001). Vor allem der Darm stellt, aufgrund seiner einfachen Struktur, ein gutes Modell zur Untersuchung der Entstehung der epithelialen Zellpolarität und der Bildung interzellulärer Kontaktstrukturen dar. Da die Epithelentwicklung anhand des *C. elegans* Darms sehr gut untersucht ist, soll im Folgenden die Entwicklung des Darmepithels im Hinblick auf die Polarisierung vorgestellt werden.

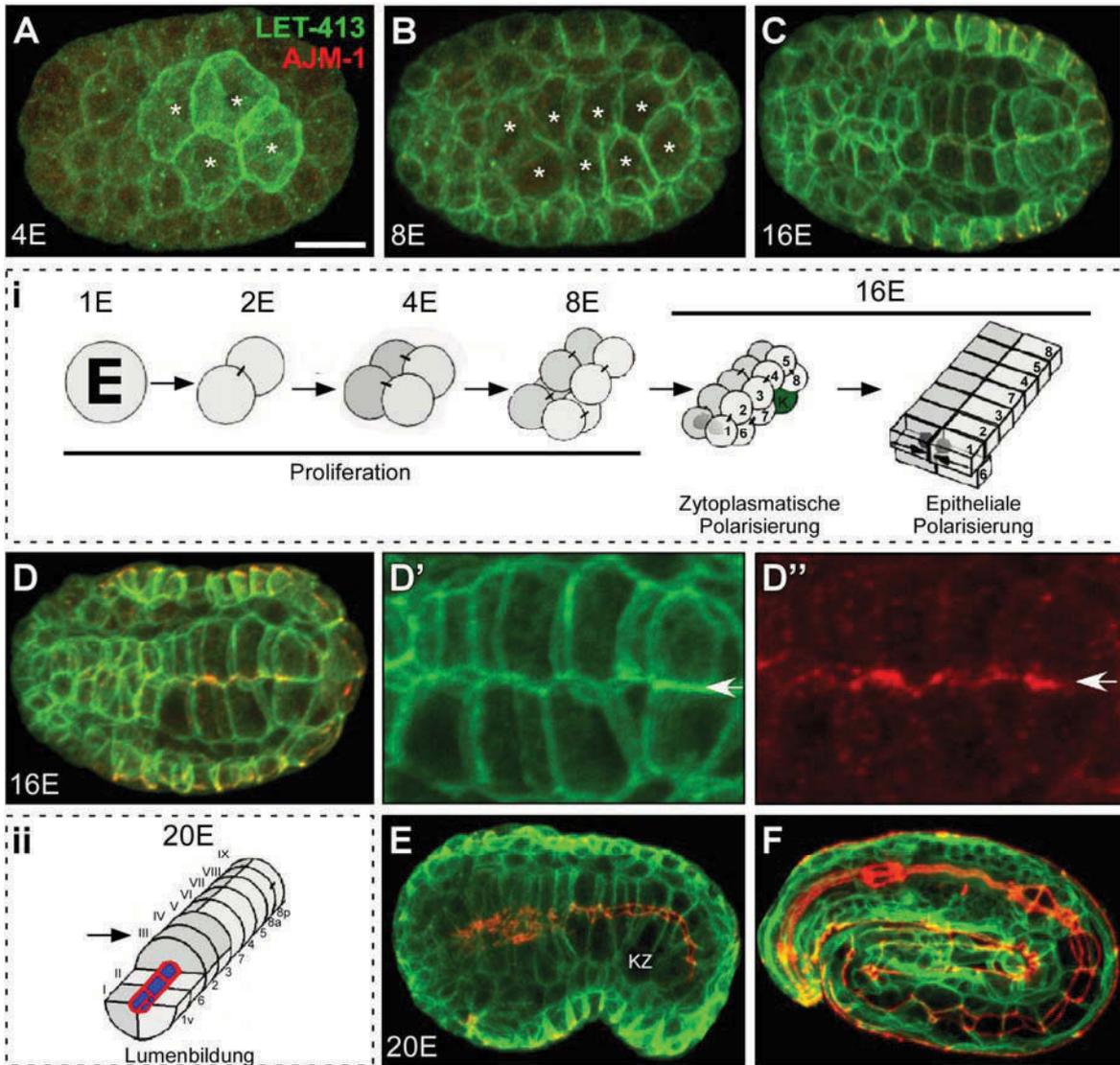
In *C. elegans* besteht der komplette Darm aus nur 20 Zellen, die ein einschichtiges Epithel bilden und das gemeinsame Lumen umschließen (McGhee, 2007; Leung et al., 1999; Sulston et al., 1983; Deppe et al., 1978). Die 20 Zellen sind jeweils zu Zellpaaren gruppiert, die ringartig eine einfache Röhre bilden, außer der erste Darmring, der aus vier Zellen besteht. Alle Darmzellen stammen von einer Vorläuferzelle ab, der so genannten E-Zelle, die im 8-Zellstadium gebildet wird. Die gesamte Entwicklung des Darmepithels ist in Abb.4 dargestellt. Zunächst zeichnet sich die Epithelbildung durch eine Proliferation aus. Die Vermehrung der zunächst unpolaren Zellen steht dabei im Vordergrund. Im 16E-Zell Stadium finden schließlich fundamentale Prozesse für das spätere Epithel statt. Zunächst tritt die zytoplasmatische Polarisierung ein, bei der sich die zuvor im Zentrum befindlichen Darmzellkerne zur apikalen, und der Golgi-Apparat zur basalen Membran bewegen. Kurze Zeit später erfolgt die epitheliale Polarisierung. Dabei lokalisieren Proteine an der apikalen Membran und formen dort zunächst punktuelle Akkumulationen und bilden schließlich die kontinuierliche CeAJ aus. Die CeAJ verbindet die Darmzellen unterhalb des Lumens miteinander und erscheint als ein Strickleiter-ähnliches Muster wenn man eine Antikörperfärbung gegen ein, in der CeAJ lokalisierendes, Protein durchführt, wie z.B. AJM-1 („apical junction moleküle“). Die CeAJ stellt mit ihrem

---

invariablen Muster einen idealen Marker dar, der Abweichungen von der Wildtypentwicklung leicht erkennen lässt.

Dennoch ist der Mechanismus, wie LET-413 den DAC apikal lokalisiert und die polare Verteilung der Proteine aufrechterhält, weitestgehend unbekannt. So kann nicht jede Genfunktion im Hinblick auf ihre Rolle während der Epithelentwicklung im *C. elegans* Darm untersucht werden, da einige Polaritätsgene schon in den ersten inäqualen und somit polarisierten Zellteilungen des Embryos eine lebenswichtige Funktion innehaben. Dem zufolge führt der Funktionsverlust von einigen Polaritätsgenen zu frühen Defekten, sodass es gar nicht erst zur Epithelbildung kommt. Dies ist z.B. bei den *par*-Genen der Fall (Nance, 2005; Nance et al., 2003).

Dieser Umstand machte es sinnvoll ein anderes Modellepithel zur Untersuchung der epithelialen Zellpolarität zu suchen. Dabei birgt die Arbeit mit *C. elegans* einen entscheidenden Vorteil. Es ist möglich, die Methode der RNAi über Fütterung von dsRNA produzierenden Bakterien erst postembryonal einsetzen zu lassen. Somit wird die frühe Genfunktion im Embryo nicht gestört, da die Fütterung und damit der RNAi Effekt erst nach dem Schlüpfen beginnt. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass ein postembryonaler Funktionsverlust von PAR-3 zu Defekten in der CeAJ der Spermatheka führt und damit Sterilität zur Folge hat (Aono et al., 2004).



**Abb. 4: Epithelialisierung und Organogenese des *C. elegans* Darms.**

(i und ii) Schema der Darmbildung in *C. elegans*. Alle Darmzellen stammen von einer Vorläuferzelle ab, der E Zelle. Hier werden schematisch alle Teilungen und Entwicklungsprozesse dargestellt, die die E-Zellen durchlaufen. Die zytoplasmatische und epitheliale Polarisierung finden während des 16E-Zellstadiums statt. Die zytoplasmatische Polarisierung beschreibt u. a. die Umpositionierung des Zellkerns, der zuvor im Zentrum der Darmzellen lokalisiert war, zur apikalen Membran. Während der epithelialen Polarisierung wird die CeAJ ausgebildet. Das Darmlumen ist in blau dargestellt, die CeAJ in rot und die Zellkerne in dunkelgrau (modifiziert nach Leung et al., 1999).

(A-F) Dokumentation der Darmentwicklung mit Hilfe von Immunfluoreszenz Mikroskopie. (A) Im 4E-Zell Stadium wird LET-413 ubiquitär in allen Zellen exprimiert und akkumuliert in den E-Zellen (Sterne) kortikal an den Plasmamembranen. (B) Im 8E-Zell Stadium ist LET-413 gleichmäßig kortikal lokalisiert. (C) Im 16E-Zell Stadium, vor der zytoplasmatischen Polarisierung, beginnt die Polarisierung und CeAJ-Modellierung in der Hypodermis, was an der Expression von AJM-1 in selbiger zu erkennen ist. (D) Beginn der zytoplasmatischen Polarisierung im Darm, detektierbar anhand der asymmetrischen Verteilung von AJM-1, welches apikal akkumuliert (siehe Pfeil in D''). LET-413 ist zu diesem Zeitpunkt sowohl basolateral als auch apikal lokalisiert. (D)-(F) In den anschließenden Morphogenesestadien ist AJM-1 distinkt in der CeAJ lokalisiert, während LET-413 ausschließlich basolateral zu detektieren ist. In den Keimzellen (KZ) ist keine Lokalisierung der beiden Proteine zu erkennen. Orientierung: Anterior links, dorsal oben. Eichstrich 10 µm.

## 1.4 Das Spermathekaepithel und der Prozess der Ovulation in *C. elegans*

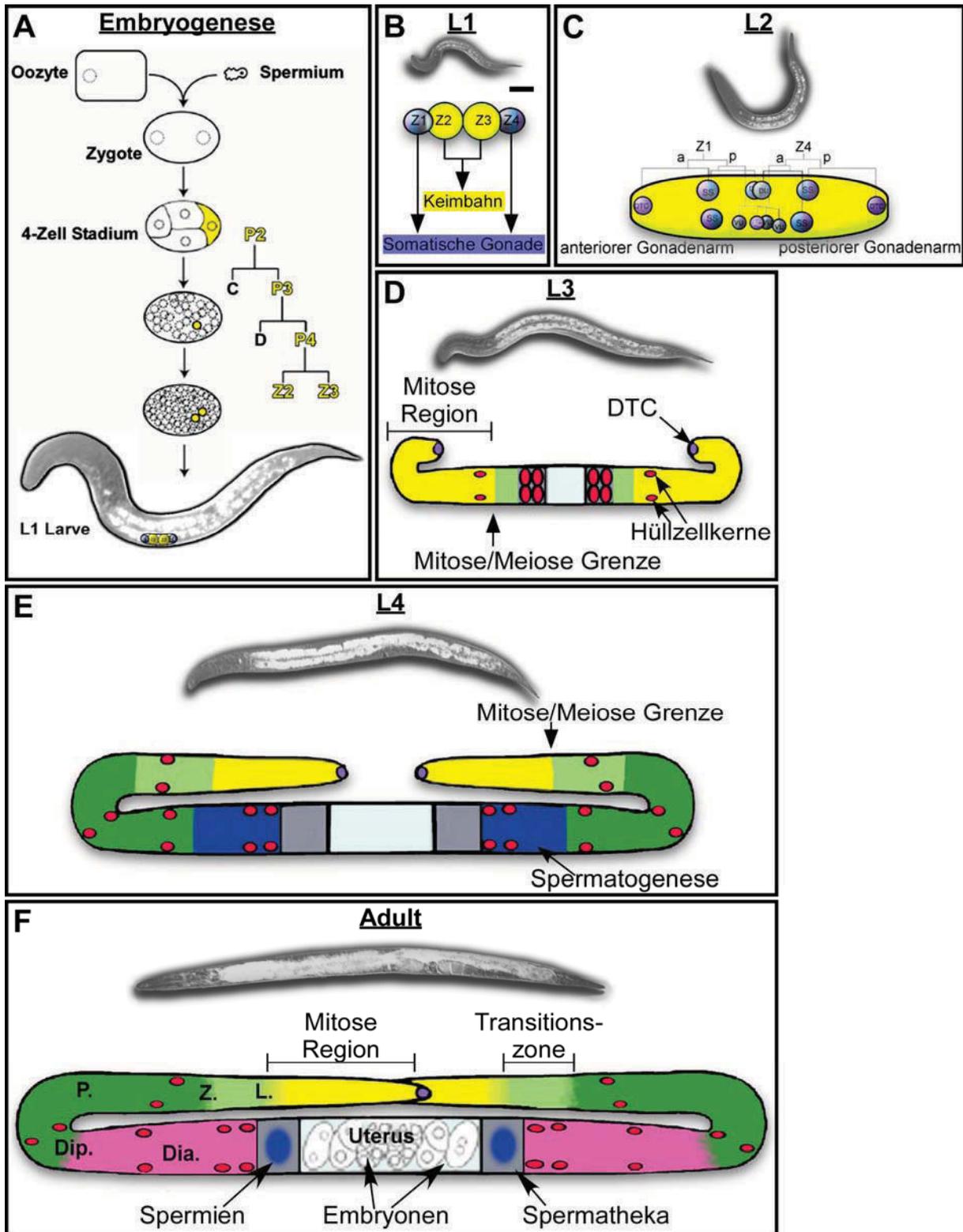
Das Spermathekaepithel ist ein Bestandteil der somatischen Gonade. Die komplette Gonade des *C. elegans* Hermaphroditen besteht aus zwei bilateral symmetrischen Gonadenarmen (Abb.1,5) und wird postembryonal während der Larvalentwicklung im Prozess der Gonadogenese gebildet (Hubbard und Greenstein, 2005; Hubbard und Greenstein, 2000). Währenddessen zeichnet sich die Larvalentwicklung durch starkes Wachstum aus (s. Abb.5). Die somatische Gonade besteht aus den beiden „distal tip cells“ (DTC), die die Proliferation der Keimzellen regulieren (Kimble und Crittenden, 2005), den beiden Spermatheken, dem Uterus und den somatischen Hüllzellen, welche die Keimzellen umgeben. Die Keimzellen teilen sich während der Larvalentwicklung in der gesamten Gonade mitotisch, bis zum Erreichen des späten L3-Larvenstadiums. Dann gehen einige Keimzellen in die Meiose über und die Spermatheka und der Uterus werden etabliert. Die Spermatheka besteht aus 30

Zellen, die eine Röhre bilden. Die Oozyten werden später in dieses Organ hinein transportiert, damit es mit den Spermien, die sich im Inneren der Spermatheka befinden, zur Fertilisation kommt.

Bevor die Oogenese beginnt, findet die Spermatogenese statt. Dabei differenzieren vor der Spermatheka ca. 40 Keimzellen zu Spermatisden, sodass ca. 160 Spermien in jedem Gonadenarm entstehen. Nachdem die Spermatisden gebildet sind, durchläuft die vor der Spermatheka liegende Oozyte die Maturation. Der Vorgang ist durch die Auflösung der Kernmembran (NEBD, „nuclear envelope break down“) gekennzeichnet, stellt den Übergang von der Diakinese zur Prometaphase dar und setzt die Ovulation in Gang. Durch die erste Ovulation gelangen die vor der Spermatheka liegenden Spermatisden ins Innere der Spermatheka und durchlaufen dann erst die letzten Reifungsschritte (z.B. die Fähigkeit der Motilität; Shakes und Ward, 1989). Proximal zur Spermatheka schließt der Uterus an, in dem die frühe Embryonalentwicklung erfolgt, bevor die Embryonen über die Vulva abgelegt werden (Albertson, 1984; Albertson und Thomson, 1993; McCarter et al., 1999).

Die Ovulation ist durch zwei Prozesse charakterisiert: zum einen kontrahieren die proximalen Hüllzellen und zum anderen kommt es zur Spannungsrelaxation, bzw. der Erweiterung der distalen Spermatheka (McCarter et al., 1999). Anschließend ziehen die proximalen Hüllzellen die geweitete Spermatheka über die Oozyte. Für diesen Vorgang wird ein Signal von der Oozyte durch Inositol 1,4,5 Triphosphat ( $IP_3$ ) zur Spermatheka weitergeleitet. Dies führt zu einer Ausschüttung von  $Ca^{2+}$  aus dem Endoplasmatischen Retikulum (ER) in das Zytoplasma der Spermathekazellen. Die Erhöhung der  $Ca^{2+}$  Konzentration ist nötig für die Kontraktionen bzw. Entspannungen, welche die Ovulation möglich machen (s. Abb.6). Zudem wurde bereits festgestellt, dass Mutationen in diesem Signalweg, die putativ zu einer Erhöhung der  $Ca^{2+}$  Konzentration führen, einen Funktionsverlust in höher geschalteten Komponenten des Signalwegs, wie z.B. dem EGF-Rezeptor (LET-23), supprimieren können (Greenstein 2005; Bui und Sternberg, 2002; Clandinin et al., 1998).

Interessanterweise können diese Mutanten ebenfalls einen postembryonalen *par-3(RNAi)* Phänotyp retten. Dabei wurde postuliert, dass PAR-3 eine Komponente des Signalwegs sein könnte und daher zu Sterilität führt (Aono et al., 2004).

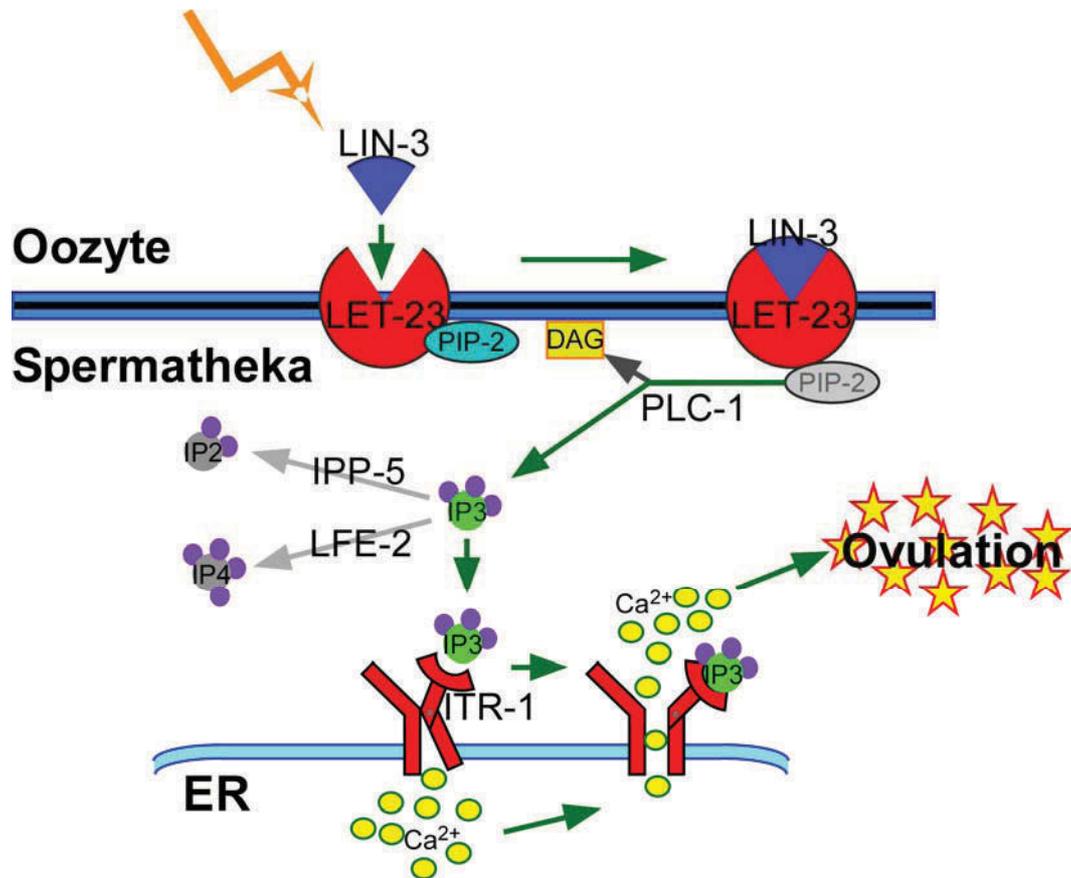


**Abb. 5: Schematische Darstellung der Keimbahnentwicklung und der Gonadogenese sowie Differential-Interferenz-Kontrast (DIK) -mikroskopische Dokumentation des Wachstums bei *C. elegans*.**

(A) Schematische Darstellung der Fertilisation und der embryonalen Keimbahnentwicklung. Die Verschmelzung von Oozyten- und Spermienkern initiiert die Embryonalentwicklung. Die Keimbahn ist in gelb dargestellt. (B-E) Schematische Darstellung der postembryonalen Gonaden- und Keimbahnentwicklung mit einhergehendem Wachstum eines Hermaphroditen bei *C. elegans*. Die Größe der unterschiedlichen Gonadenentwicklungsstadien ist nicht verhältnismäßig zueinander dargestellt.

Schlüpft die L1-Larve so besteht das Gonadenprimordium aus vier Zellen, den beiden Keimbahnvorläuferzellen Z2 und Z3 und den Vorläuferzellen der somatischen Gonade Z1 und Z4 woraus sich die Spermatheka, die Hüllzellen, der Uterus und die „anchor cell“, welche wichtig für die Vulvaentwicklung ist, entwickeln (Kimble und Hirsh, 1979; Sulston et al., 1983). Die Keimbahnvorläuferzellen teilen sich während der Larvalentwicklung mitotisch im Inneren der somatischen Gonade. Im L4-Stadium wird die mitotische Region im distalen Bereich der Gonade durch Interaktion mit den DTCs („distal tip cells“) etabliert und aufrechterhalten. Diese Signaltransduktion wird über den GLP-1 Rezeptor, ein Mitglied der LIN-12/Notch Familie, vermittelt (Austin und Kimble, 1987; Yochem und Greenwald, 1989). Der Ligand, exprimiert von der DTC, ist LAG-2 und dessen Konzentrationsgefälle bestimmt die Mitose/Meiose Grenze (Hansen et al., 2004). Somit proliferieren die Keimbahnzellen in der distalen Region und gehen danach in die Meiose über und differenzieren sich in proximaler Richtung (Hirsh et al., 1976; Kimble und Ward, 1988; Clifford et al., 1994). Nachdem die Spermatogenese abgeschlossen ist, werden im Diplotän-Diakinese Stadium zwischen die Keimzellen Membranen eingezogen.

Farbcode der Keimbahn: gelb mitotische Region, hellgrün Transitionszone (frühe Prophase der Meiose I), dunkelgrün Pachytän, dunkelblau Spermatogenese, pink Oogenese. Die Mitose/Meiose Grenze ist im späten L3- und L4-Stadium durch Pfeile gekennzeichnet. Im Adulten ist die Mitose/Meiose Grenze nicht scharf, was durch den Farbübergang dargestellt ist. Farbcode der somatischen Gonade: violett DTC, blau Hüll- und Spermatheka Vorläuferzellen, hellblau Hüllzellkerne, grau Spermatheka, weiß Uterus. Verwendete Abkürzungen: a anterior; AC „anchor cell“; Dia. Diakinese; Dip. Diplotän; DTC „distal tip cell“; DU „dorsal uterine“ Vorläufer; L. Leptotän; P. Pachytän; p posterior; SS „sheath/spermathecal“ Vorläufer; VU „ventral uterine“ Vorläufer Z. Zygotän. Eichstrich in B gilt von B-F und entspricht 50 µm. (A, D-F modifiziert Hubbard und Greenstein, 2005; B, C modifiziert nach [www.wormatlas.org](http://www.wormatlas.org)).



**Abb. 6: Der IP<sub>3</sub>-vermittelte Signalweg für die Ovulation in *C. elegans*.**

Die Signalkaskade wird durch die Bindung des EGF/LIN-3 Liganden (EGF „epidermal growth factor“), der von der Oozyte sekretiert wird, an den EGF-Rezeptor/LET-23 der Spermatheka induziert. Dies hat die Hydrolyse von PIP<sub>2</sub> durch eine Phospholipase C (PLC-1) zum zytosolischen IP<sub>3</sub> und DAG zur Folge. Der sekundäre Signalvermittler IP<sub>3</sub> bindet an den 1,4,5-Triphosphat Rezeptor (IP<sub>3</sub>R; ITR-1) wodurch eine Ca<sup>2+</sup> Ausschüttung aus dem Endoplasmatischen Retikulum (ER) erfolgt und die nötigen Kontraktionen in der Spermatheka und in den somatischen Hüllzellen stimuliert. IPP-5 kodiert für eine Typ I 5-Phosphatase, die IP<sub>3</sub> zu IP<sub>2</sub> dephosphoryliert und LFE-2 ist eine Inositol 1,4,5 Triphosphat-3-Kinase, die IP<sub>3</sub> zu IP<sub>4</sub> phosphoryliert (Bui und Sternberg, 2002; Clandinin et al., 1998; Kariya et al., 2004; Yin et al., 2004). Verwendete Abkürzungen: DAG Diacylglycerol; ER Endoplasmatisches Retikulum; IP<sub>3</sub> Inositol 1,4,5-Trisphosphat; PIP<sub>2</sub> Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphat; PLC Phospholipase C.

## 1.5 Ziele der Arbeit

Ein essentieller Prozess während der Epithelentwicklung ist die Etablierung interzellulärer Kontaktstrukturen entlang der lateralen Membrandomäne. Das Protein LET-413 (Scribble/Erbin) rekrutiert dabei den DLG-1–AJM-1 Komplex, welcher maßgeblich für die Ausbildung der elektronendichten Struktur der „*C. elegans* apical junction“ verantwortlich ist. Diese formt einen kontinuierlichen Gürtel um den Apex aller embryonalen Epithelzellen, der den Zusammenhalt des Gewebeverbandes gewährleistet. Die zugrunde liegenden Regulationsmechanismen sind wenig erforscht und bedürfen neuer genetischer und molekularer Ansätze.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit stand die Funktion des *let-413* und *dlg-1* Gens während der Postembryogenese von *C. elegans* im Vordergrund. Mit Hilfe der RNAi-Technik sollte zunächst die Genfunktion herunterreguliert und die Auswirkungen auf bereits etablierte und neu zu bildende Epithelien überprüft werden. Postembryonal auftretende Phänotypen im Epithel der Spermatheka sollten dann mit Hilfe verschiedener Mikroskopie-Techniken analysiert und gegebenenfalls statistisch ausgewertet werden, um so die postembryonale Funktion beider Gene mit jener während der Embryogenese zu vergleichen.

Mit Hilfe von Funktionsverlust- und Funktionszugewinn-Mutationen im *C. elegans* IP<sub>3</sub>/Ca<sup>2+</sup> Signalweg [*ipp-5(lof)* und *itr-3(gof)*] und durch die Identifikation neuer Mutanten nach EMS-Mutagenese sollte dann versucht werden die *let-413* und *dlg-1* RNAi-induzierten Phänotypen zu supprimieren.

## 2 Ergebnisse

### 2.1 Phänotypische Analyse der Postembryogenese nach Funktionsverlust von *let-413* und *dlg-1* durch RNAi

Um die postembryonale Funktion von *let-413* und *dlg-1* zu analysieren, wurde die Technik der RNAi über Fütterung von dsRNA produzierenden Bakterien angewendet (s. 6.3.11.2). Die Analyse der postembryonalen Phänotypen erfolgte mit Hilfe von statistischen Auswertungen der Nachkommenproduktion, Differential-Interferenz Kontrast- (DIK-), Fluoreszenz- und Elektronenmikroskopie.

#### 2.1.1 Postembryonale RNAi gegen *let-413* und *dlg-1* interferiert nicht mit der Funktionalität der embryonal etablierten Epithelien

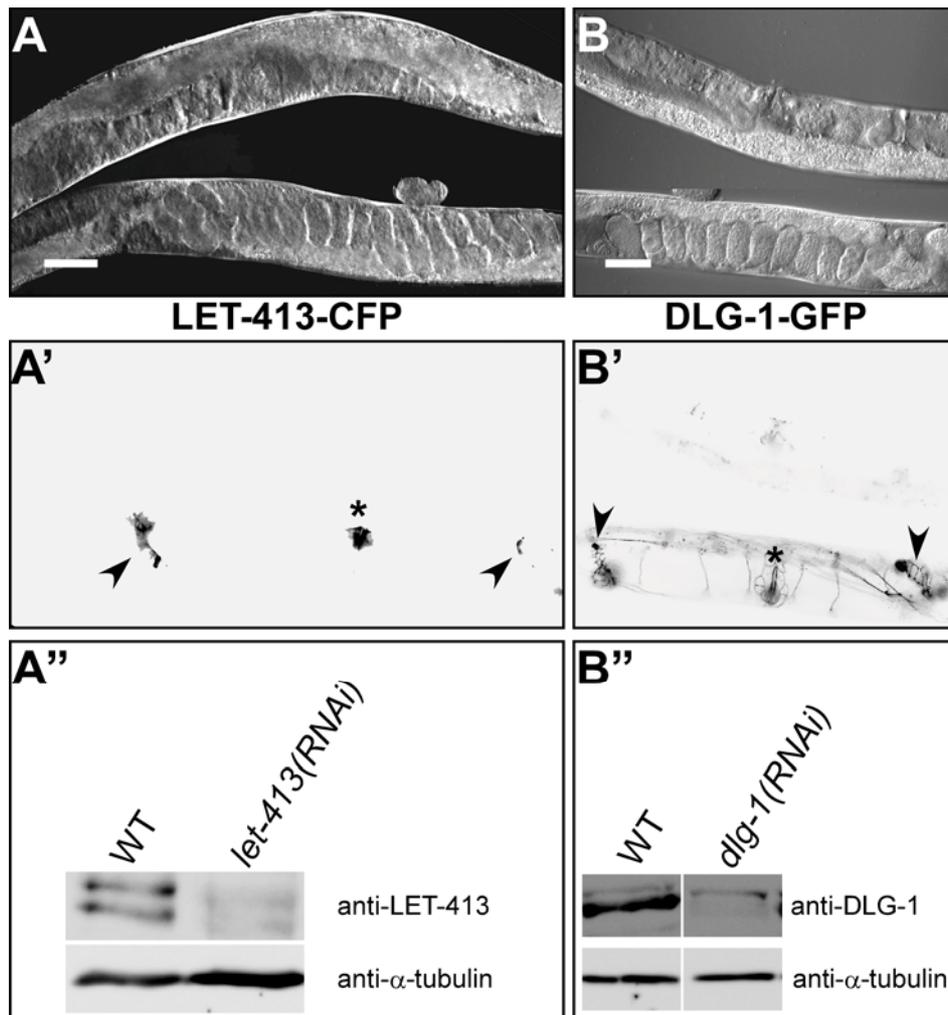
Die Proteine LET-413 und DLG-1 werden während der Larvalentwicklung in Epithelien, die während der Embryogenese gebildet wurden, wie z.B. Pharynx, Darm und Hypodermis, und in postembryonal etablierten Epithelien, wie Spermatheka, Uterus und Vulva, exprimiert (Abb.7; Legouis et al., 2000; McMahon et al., 2001). Nach postembryonaler RNAi gegen *let-413* und *dlg-1* war zu beobachten, dass die Tiere adult wurden und keine erkennbaren Defekte zeigten, die mit der Lebensfähigkeit der Würmer interferierten. Allerdings produzierten die Hermaphroditen nach postembryonaler *dlg-1(RNAi)* weniger Nachkommen oder wurden nach *let-413(RNAi)* sogar steril (s. 2.1.2).

Um die Effizienz der Methode der postembryonalen RNAi zu testen, war es durch den Einsatz von transgenen Reporterstämmen (*let-413::cfp* und *dlg-1::gfp*) möglich, die Proteinexpression *in vivo* unter dem Fluoreszenz-Mikroskop zu überprüfen. Die Aufnahmen wurden mit gleichen Kameraeinstellungen gemacht und zeigen besonders im Bereich der Spermatheken (Abb.7A',7B'; Pfeilköpfe) und der Vulva (Abb.7A',7B'; Stern) ein starkes Fluoreszenzsignal von LET-413 und DLG-1 in der Kontrolle. Im Vergleich dazu zeigen die Hermaphroditen nach postembryonaler *let-413* und *dlg-1* RNAi nahezu keine LET-413 und DLG-1 Fluoreszenz (Abb.7A,B).

Um die Wirksamkeit des RNAi Effekts quantitativ zu verifizieren, wurden Western-Blot Analysen durchgeführt. Diese zeigten ebenfalls, dass durch postembryonale RNAi die Proteinkonzentration von LET-413 und DLG-1 verringert wird (Abb.7C). Die quantitative Messanalyse der Fluoreszenz ergab, dass die Proteinmenge von LET-413 um 88% und die von DLG-1 sogar bis zu 99% reduziert war (durchgeführt von Christophe Lefebvre, Pilipiuk et al., 2009).

Während der Embryogenese ist LET-413 essentiell für die korrekte Lokalisation des DAC und die Aufrechterhaltung der Zellpolarität. Dabei gewährleistet der DAC die Integrität des CeAJ (s. Einleitung 1.2; Legouis et al., 2000; Bossinger et al., 2001; Köppen et al., 2001; McMahon et al., 2001). Somit bleibt die Frage offen, wie die epitheliale Polarität nach einem postembryonalen Funktionsverlust von *let-413* und *dlg-1*, z.B. im Darmepithel während der Larvalentwicklung weiter aufrechterhalten wird. Es sind verschiedene Erklärungen denkbar. Zum einen wäre es möglich, dass die *let-413/dlg-1* Funktion nur eine Rolle bei der Etablierung der epithelialen Polarität spielt. Im Laufe der weiteren Entwicklung könnten andere, noch unbekannte, Proteine und Komplexe redundant wirken um das System zu stabilisieren (Lynch und Hardin, 2009; Nejsun und Nelson, 2009; Assemat et al., 2008).

Zum anderen könnte die embryonal exprimierte Proteinmenge von LET-413 und DLG-1, postembryonal ausreichen, um die Stabilität der Zellpolarität aufrechtzuerhalten. Folgendes Beispiel validiert diese These. Der *dlg-1::gfp* Stamm zeigt eine erhöhte Expression von DLG-1, was sogar dazu führt, dass viele Embryonen nach embryonaler *dlg-1(RNAi)* schlüpfen können. Werden diese Larven anschließend zusätzlich postembryonaler *dlg-1(RNAi)* ausgesetzt, treten Defekte in der Hypodermis und beim Wachstum auf. Im Gegensatz dazu zeigt die Kontrolle, die postembryonal nicht weiter mit *dlg-1(RNAi)* behandelt wird, diese Defekte nicht (Pilipiuk, 2006). Daraus lässt sich schließen, dass DLG-1 eine postembryonale Funktion in der Hypodermis ausübt, jedoch nur Defekte sichtbar werden, wenn auch die embryonale DLG-1 Proteinmenge reduziert wird.



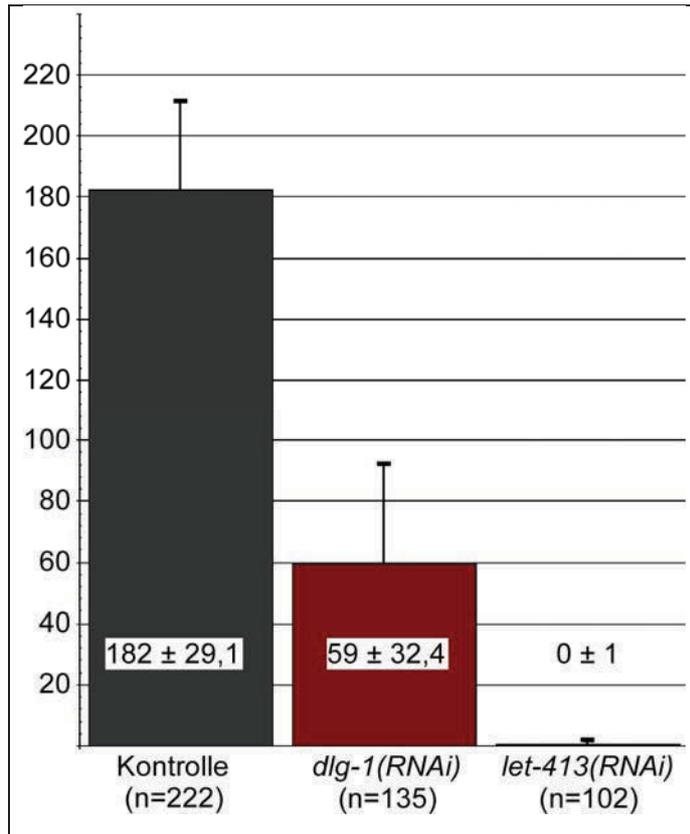
**Abb. 7: Verminderung der Proteinkonzentration von LET-413 und DLG-1 nach postembryonaler RNAi.**

(A,B) DIK-mikroskopische Aufnahme zweier adulter Hermaphroditen des *let-413::cfp* (A) und *dlg-1::gfp* (B) Stammes. Das untere Tier zeigt jeweils die Kontrolle und das obere Tier nach postembryonaler RNAi. (A',B') Fluoreszenzaufnahmen der Proteinexpression von LET-413–CFP (A') und DLG-1–GFP. Beim unteren Tier sind Färbungen in der Vulva (Stern) und den beiden Spermatheken (Pfeilkopf) zu erkennen. Im oberen Tier ist die Fluoreszenz nicht mehr zu detektieren (A') bzw. sehr stark vermindert (B'). Eichstrich: 50  $\mu$ m (A'', B'') Western-Blot Analysen am Wildtyp zeigen bei ca. 75 kDa mit einem LET-413 (A'') oder mit einem DLG-1 Antikörper bei ca. 107 kDa eine Bande, welche im Vergleich nach *let-413* oder *dlg-1* RNAi stark vermindert sind. Als Ladekontrolle diente  $\alpha$ -Tubulin. Abb. B'' Christophe Lefebvre.

### 2.1.2 Der postembryonale Funktionsverlust von *let-413* und *dlg-1* führt zu stark eingeschränkter Fertilität

L1-Larven, die postembryonal *let-413* oder *dlg-1* RNAi ausgesetzt waren, entwickelten sich wie die Kontrolltiere nach ca. 102 h bei 15 °C zu jungen Adulten. Die Beobachtung, dass die adulten *let-413* und *dlg-1* RNAi Tiere eine stark verminderte Anzahl von Nachkommen produzierten, sollte zunächst statistisch verifiziert werden. Dafür wurde die Anzahl der Nachkommen ermittelt und die Sterilitätsrate errechnet (s. 6.3.12). Bei 15 °C benötigt ein adulter Hermaphrodit ca. 67 h um nahezu alle Embryonen, die während der fertilen Lebensphase des Wurms produziert werden, abzulegen (eigene Beobachtungen und bestätigt durch persönliche Mitteilungen anderer Labormitglieder: S. Honnen und T. Wiesenfahrt). Graph 1 zeigt die durchschnittliche Anzahl der abgelegten Nachkommen nach 67 h des N2 Wildtypstammes. Die Ergebnisse der einzelnen Auszählungen sind im Anhang einzusehen.

Der Wildtyp produzierte durchschnittlich 182 Nachkommen und diese Zahl entspricht einer Sterilitätsrate von 0%. Im Gegensatz dazu ist die Zahl der abgelegten Nachkommen nach postembryonaler *dlg-1(RNAi)* mit 59 signifikant verringert (67,5% Sterilität). Der postembryonale Funktionsverlust von *let-413* führte sogar dazu, dass die Hermaphroditen zu 100% steril waren, denn es wurden keine Embryonen abgelegt.



**Graph 1: Durchschnittliche Nachkommenzahlen eines jungen adulten Hermaphroditen nach postembryonaler *dlg-1* und *let-413* RNAi.** Semi-synchrone Embryonenpopulationen wurden auf RNAi Fütterungsplatten gesetzt und nach einer Entwicklungszeit von 102 h bei 15 °C erreichten die Tiere das Adultstadium. Ab diesem Zeitpunkt wurden die abgelegten Nachkommen nach weiteren 67 h ausgezählt und anschließend ein Durchschnitt errechnet.

### 2.1.3 Die postembryonalen *let-413* und *dlg-1* RNAi Phänotypen werden durch primäre Defekte im Soma, aber nicht über den Darm vermittelt

Um die Ursache der induzierten Sterilität nach postembryonaler *let-413* und *dlg-1* RNAi auf ein Gewebe oder Organ eingrenzen und somit bei der anschließenden Analyse der Phänotypen besser untersuchen zu können, wurde eine genetische Analyse mit verschiedenen mutanten Stämmen durchgeführt. Dabei wurden Mutanten eingesetzt, die in verschiedenen Geweben unterschiedlich sensitiv auf RNAi wirken. So können z.B. Defekte in der Keimbahndifferenzierung, die während der Larvalentwicklung erfolgt (s. Einleitung Abb.5), eine mögliche Ursache für Sterilität sein. Um diese Möglichkeit zu überprüfen, wurde ein Stamm mit einer Mutation im *rrf-1* Gen benutzt. Dieses kodiert für eine putative RNA-abhängige RNA Polymerase, deren Funktion für die RNAi Maschinerie in somatischen Geweben, jedoch nicht in der Keimbahn benötigt wird (Sijen et al., 2001; Aoki et al., 2007; s. Abb.2). Wie in Tab.1 aufgeführt ist, lag die durch *dlg-1* und *let-413* RNAi erzeugte

Sterilität in der *rrf-1* Mutante nur noch bei 12% (n=54), bzw. 0% (n=54). Durch eine hohe Standardabweichung ergab ein statistischer t-Test (s. 6.3.12), dass es keinen signifikanten Unterschied zwischen der Kontrolle und den RNAi Experimenten gibt. Dagegen führte der Einsatz einer *rrf-3* Mutante zu einer starken Erhöhung der Sterilitätsrate nach postembryonaler *dlg-1(RNAi)* auf 95% (n=21). Denn im Gegensatz zur *rrf-1* Mutante, wirkt sich eine Mutation im *rrf-3* Gen hypersensitiv auf somatische RNAi aus, da es für eine RNA-abhängige RNA Polymerase kodiert, die eine inhibitorische Funktion auf die RNAi Maschinerie in somatischen Geweben ausübt (Simmer et al., 2002).

Die Ergebnisse, die mittels der *rrf-1* und *rrf-3* Mutanten gewonnen wurden, weisen darauf hin, dass der primäre Defekt, welcher nach postembryonalem Funktionsverlust von *let-413* und *dlg-1* die Sterilität auslöst, nicht in der Keimbahn induziert wird, sondern somatischen Ursprungs ist.

Der Darm ist ein somatisches Organ und für die Dotterproduktion der Oozyten zuständig. Dadurch hat der Darm Einfluss auf die Fertilität (McGhee, 2007). Daher galt es zu prüfen, ob der Darm für die erzeugte Sterilität verantwortlich ist. Dafür wurde ein Stamm benutzt, welcher nur im Darm, nicht aber in anderen Geweben RNAi-sensitiv ist. Dieser Stamm (OLB11; Mc Ghee et al., 2009; Pilipiuk et al., 2009) hat einen *rde-1* mutanten Hintergrund und ist RNAi resistent, trägt allerdings ein Wildtyp Allel des *rde-1* Gens unter der Kontrolle des *elt-2* Promotors. Dieser Promotor ist ab dem 2E-Zellstadium für die gesamte Lebenszeit nur im Darm aktiv (Fukushige et al., 1998). RDE-1 („RNAi defective“) ist ein Argonaut Protein und wird für den RNAi Mechanismus benötigt (s. Abb.2, Tabara et al., 1999). Somit kann die RNAi-Maschinerie im OLB11 Stamm nur im Darm wirksam werden. Die *rde-1* Mutante ohne das *elt-2::rde-1* Konstrukt zeigte, wie durch die RNAi Insensitivität zu erwarten war, keine Sterilität nach postembryonaler *let-413* und *dlg-1* RNAi (Zahlen s. Anhang 8.2.8). Im OLB11 Stamm betrug die induzierte Sterilität nach postembryonalem Funktionsverlust von *dlg-1* und *let-413* 12% (n=15) und 10% (n=15) im Vergleich zur OLB11 Kontrolle (Tab.1). Ein statistischer t-Test zeigte ebenfalls keine signifikante Abweichung zur Kontrolle. Dadurch lässt sich der Darm als somatischer Ursprung der Sterilität verursachenden Defekte weitestgehend ausschließen, da ansonsten eine ähnlich hohe Sterilitätsrate wie im N2 Wildtypstamm aufgetreten wäre.

Wie bereits in der Einleitung erläutert, wird während der Larvalentwicklung das Reproduktionssystem gebildet, welches sich aus Keimbahn und somatischer Gonade zusammensetzt und für die Fertilität zuständig ist. Nach den eben dargestellten Ergebnissen konnte die anschließende Analyse der *let-413* und *dlg-1* RNAi Phänotypen mit Fokus auf die somatische Gonade erfolgen.

Genotyp/RNAi	Durchschnittliche Nachkommenzahl	Sterilitätsrate %
N2	182±29 (222)	0%
N2 <i>dlg-1</i> (RNAi)	59±32 (135)	67,5%
N2 <i>let-413</i> (RNAi)	0±1 (102)	99,8%
<i>rrf-1(pk1417)</i>	167±26 (54)	0%
<i>rrf-1(pk1417) dlg-1</i> (RNAi)	173±29 (54)	0%
<i>rrf-1(pk1417) let-413</i> (RNAi)	147±41 (54)	12%
<i>rrf-3(pk1426)</i>	112±3 (21)	0%
<i>rrf-3(pk1426) dlg-1</i> (RNAi)	6±4 (21)	95%
OLB11	137±30 (30)	0%
OLB11 <i>dlg-1</i> (RNAi)	121±16 (30)	12%
OLB11 <i>let-413</i> (RNAi)	123±19 (30)	10%

**Tab. 1: Vergleich der durchschnittlichen Nachkommenzahlen und Sterilitätsraten in verschiedenen genetischen Hintergründen.**

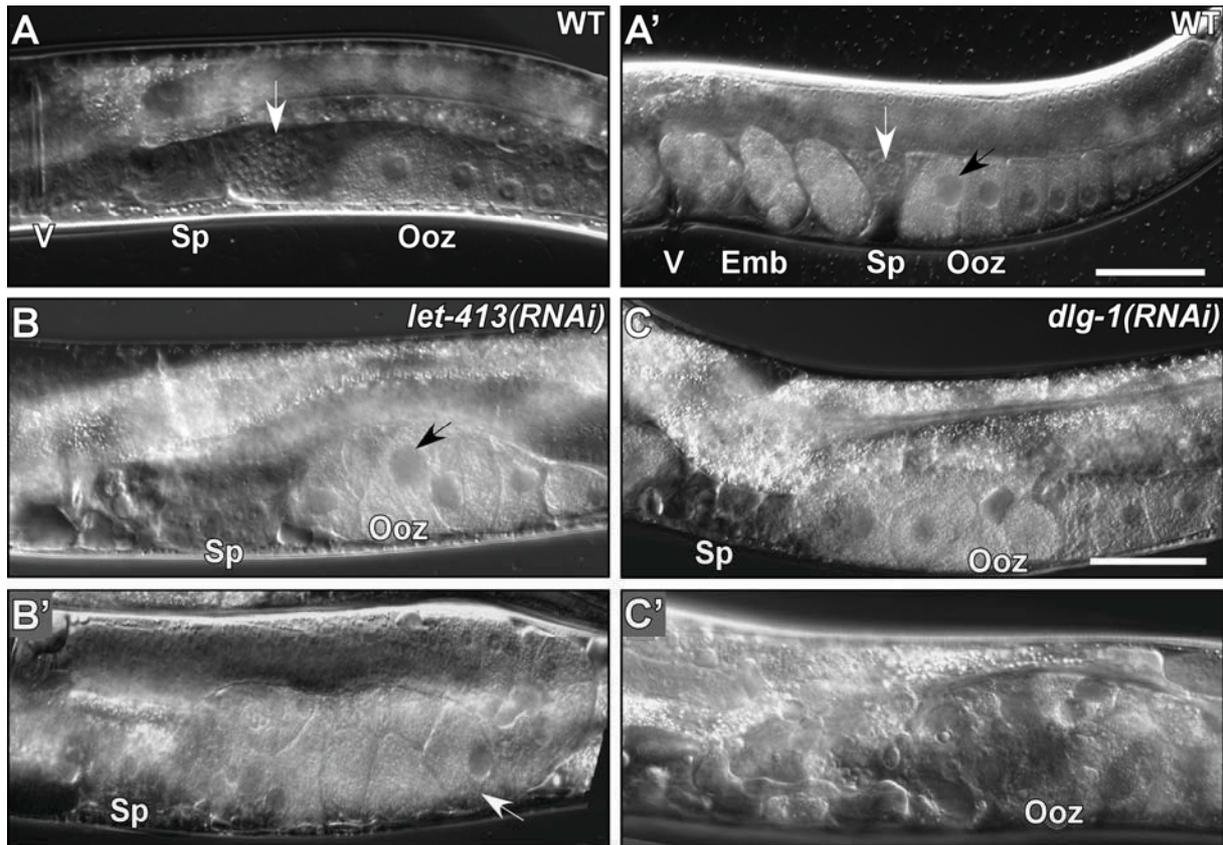
Nach einer Entwicklungszeit von 102 h auf RNAi Fütterungsplatten erreichten die Tiere bei 15 °C das Adultstadium. Ab diesem Zeitpunkt wurden die abgelegten Nachkommen nach weiteren 67 h ausgezählt und anschließend der Durchschnitt mit Standardabweichung errechnet.

### 2.1.4 Postembryonale *let-413* und *dlg-1* RNAi führt zu Ovulationsdefekten und Endoreplikationen in den Oozyten

Um die Ursache für die Sterilität nach postembryonalem Funktionsverlust von *let-413* oder *dlg-1* zu finden, wurden junge adulte Hermaphroditen unter DIK-Optik aufgenommen. Abb.8A zeigt einen adulten Hermaphroditen vor der ersten Ovulation, während Abb.8A' nach der Ovulation aufgenommen wurde. Im Wildtyp liegen die Spermien zunächst proximal vor der Spermatheka (Abb.8A, weißer Pfeil) und gelangen später mit der ersten ovulierenden Oozyte in das Lumen des Spermathekaepithels (Abb.8A', weißer Pfeil). Die Oozyten sind ab der „loop“-Region der Gonade hintereinander vor der Spermatheka aufgereiht (Abb.8A'). Die Größe der Oozyten nimmt dabei von distal nach proximal stark zu. In den Oozyten sind die Zellkerne (Abb.8A'; schwarzer Pfeil) deutlich zu erkennen.

Im Gegensatz dazu liegen in den *let-413* und *dlg-1* RNAi Tieren die Oozyten nicht aufgereiht hintereinander, sondern zeigen eine aberrante Anordnung (Abb.8B'; weißer Pfeil). Bei RNAi Tieren, die wenige Stunden älter sind, sind einige Zellkerne der Oozyten, selbst nach Durchfokussierung, nicht mehr deutlich zu detektieren (Abb.8B'). Auf Abb.8C' sind Vakuolen und granuläre Strukturen anstelle der Spermatheka und den proximal gelegenen Oozyten zu erkennen. Es ist zu vermuten, dass die Ovulation nicht stattfinden kann, da im Uterus keine Embryonen zu sehen sind und die Oozyten bis über die „loop“-Region weiter nach distal aufgestaut liegen (vergleiche Abb.8B' mit 8A'). Wenn Zellkerne der angestauten Oozyten zu erkennen sind, so erscheinen diese zum Teil auch größer als im Wildtyp (Abb.8B, schwarzer Pfeil).

Die *let-413* und *dlg-1* RNAi Phänotypen sehen somit sehr ähnlich aus. Allerdings führt der postembryonale Funktionsverlust von *dlg-1* nicht mit vollständiger Penetranz zu den starken Sterilitätsdefekten. In manchen *dlg-1*(RNAi) Gonadenarmen ist die Ovulation durch die geringere Expressivität des Phänotyps sogar ohne Störungen möglich, was durch die hohe Standardabweichung bei der Nachkommenproduktion in Graph 1 belegt ist.



**Abb. 8: Differential-Interferenz-Kontrast Mikroskopische Dokumentation adulter Hermaphroditen nach postembryonaler *let-413* und *dlg-1* RNAi.**

(A) Junger wildtypischer Hermaphrodit von *C. elegans*. Spermien (weißer Pfeil) befinden sich in der Gonade vor der lang gestreckten Spermatheka. Die Spermien gelangen später während der ersten Ovulation in die Spermatheka und akkumulieren dort. (A') Der Hermaphrodit trägt ca. 2 h später Embryonen im Uterus, welche zuvor im Prozess der Ovulation in der Spermatheka befruchtet wurden. Die Spermatheka (weißer Pfeil zeigt auf die darin enthaltenen Spermien) liegt gestaucht zwischen Uterus und den aufgereihten Oozyten. In den Oozyten sind die Zellkerne (schwarzer Pfeil) deutlich erkennbar.

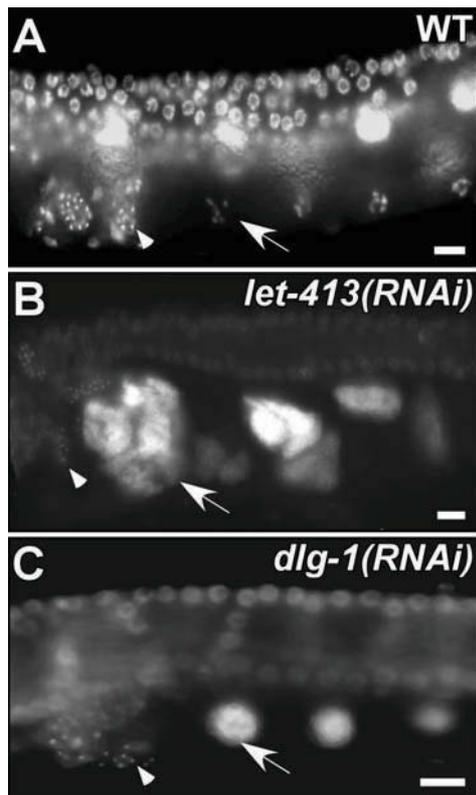
(B) Adulter *let-413(RNAi)* Hermaphrodit, dessen Oozyten unregelmäßig vor der Spermatheka liegen. Teilweise weisen die Oozyten größere Zellkerne auf (schwarzer Pfeil) im Vergleich zum Wildtyp. Ca. 10 h später (B') werden die Oozyten sogar in die „loop“-Region gestaucht, da sie vor der Spermatheka liegen bleiben und die Oozyten schieben sich übereinander (weiße Pfeil zeigt auf eine keilförmige Oozyte).

(C) Adulte *dlg-1(RNAi)* Tiere zeigen einen sehr ähnlichen Phänotyp. Die Oozyten sind ungeordnet und ungleichmäßig groß vor der Spermatheka angesammelt und zeigen als ältere Adulte (C') sogar Vakuolen. Verwendete Abkürzungen: Emb Embryonen; Ooz Oozyten; Sp Spermatheka; V Vulva. Orientierung: proximal-distal von links nach rechts. Eichstriche: 50  $\mu\text{m}$ .

---

Um die zuvor beobachtete Größenzunahme der Zellkerne in den Oozyten (Abb.8B) zu analysieren, wurde eine DNA Färbung durchgeführt. In der wildtypischen Situation treten die Oozyten nach Verlassen der distalen Region der Gonade in die Meiose I ein (Hubbard und Greenstein, 2000). Während der Diakinese sind die sechs Chromosomen als hoch kondensierte Bivalente sichtbar (Abb.9A,10A). In *let-413* und *dlg-1* RNAi Oozyten ist dagegen ein starkes Fluoreszenzsignal zu sehen (Abb.9B,C; Pfeil) und einzelne Bivalente sind nicht mehr zu erkennen.

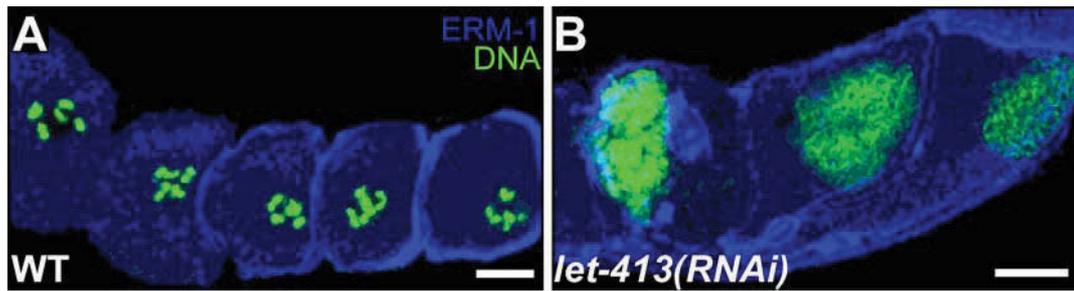
Normalerweise durchläuft die vor der Spermatheka liegende Oozyte die weitere Reifung, nachdem sie ein Signal von den Spermien erhalten hat, das so genannte MSP Signal („major sperm protein“; Miller et al., 2001). Im Anschluss reguliert die Oozyte die anschließende Ovulation über einen  $IP_3/Ca^{2+}$  abhängigen Signalweg (s. Einleitung Abb.6). Ist der Ovulationsprozess allerdings defekt, kommt es zu Endoreplikationen im Oozytenkern, ohne Kern- und Zellteilung. Dies wird als Emo („endomitotic oocyte“; Iwasaki et al., 1996) Phänotyp bezeichnet. Dabei werden die Zellkerne der Oozyten polyploid und nehmen an Größe zu, wie es auf Abb.9 und Abb.10 durch DNA Färbungen deutlich zu erkennen ist. Die DNA Färbung auf Abb.9 zeigt auch, dass die Spermien nicht wie im Wildtyp im Lumen der Spermatheka akkumulieren, sondern sich zusammen mit den Oozyten weiterhin davor befinden (Abb.9A,B; Pfeilkopf). Dies zeigt, dass Spermien zwar gebildet werden, aber keine Ovulation stattgefunden hat, denn durch diese wären die Spermien in die Spermatheka gelangt.



**Abb. 9: DNA Färbungen zur Dokumentation des Emo-Phänotyps.**

DAPI-Färbung an wildtypischen (A), an *let-413(RNAi)* (B) und an *dlg-1(RNAi)* (C) Hermaphroditen. Die Pfeilspitzen zeigen auf die Spermien, die Pfeile auf die kondensierten Chromosomen der proximal gelegenen Oozyte. Deutlich sind die endomitotischen Zellkerne in *let-413* (B) und *dlg-1* (C) RNAi Oozyten erkennbar. Die Spermien, die zu sehen sind, befinden sich nicht im Lumen der Spermatheka, wie dies im Wildtyp der Fall ist. Orientierung: proximal-distal von links nach rechts. Eichstriche: 10 µm.

Da die DIK-Aufnahmen eine abnorme Anordnung der *let-413* und *dlg-1* RNAi Oozyten zeigten, wurde der Kortex der Oozyten mit Hilfe einer immunhistologischen Färbung gegen ERM-1 (Ezrin-Radixin Moesin Homolog; Göbel et al., 2004; van Fürden et al., 2004) markiert, um die Orientierung, Größe und die Zellularisierung der Oozyten detaillierter aufzulösen. Die Abb.10 zeigt, dass die endomitotischen Oozyten in *let-413(RNAi)* Hermaphroditen zellularisiert sind und nur einen Zellkern enthalten. Es ist deutlich zu erkennen, dass das Chromatin einen wesentlich größeren Raum im Zytoplasma einnimmt und die Oozyten vergrößert und aberrant angeordnet sind.



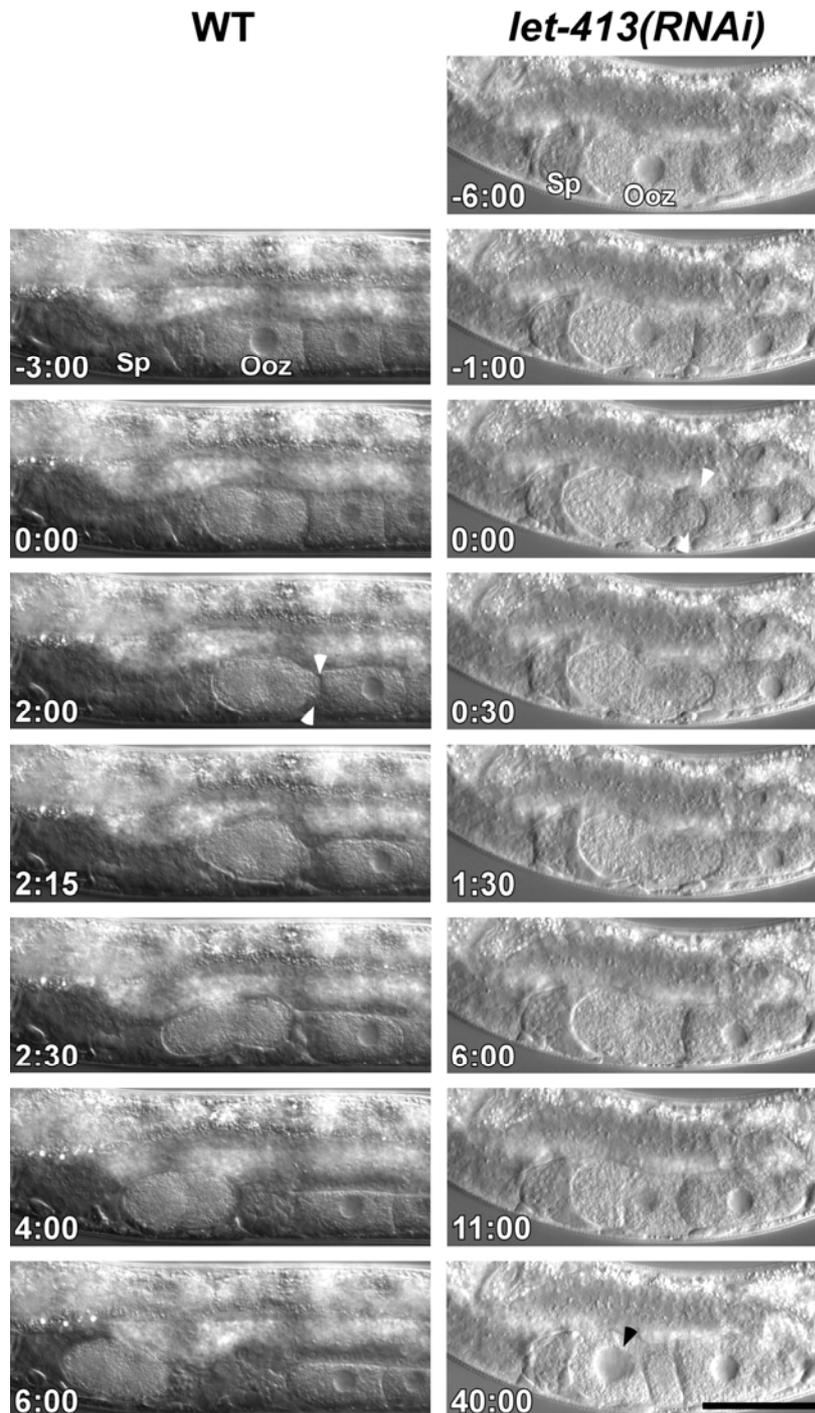
**Abb. 10: DNA- und ERM-1 immunhistologische Färbung zur Dokumentation des Emo Phänotyps.**

DNA Färbungen mit Yoyo und eine Antikörperfärbung gegen den Kortexmarker ERM-1 an präparierten Gonaden zeigen deutlich den Größenunterschied der Oozyten und deren Zellkerne von *let-413(RNAi)* Tieren (B) im Vergleich zum Wildtyp (A). Im Wildtyp sind die Oozyten von proximal nach distal aufgereiht, während in *let-413(RNAi)* Tieren die Oozyten Aufreihung abweichend gegenüber der wildtypischen Situation ist. Durch die DNA Färbung sind die Endoreplikationen in den Oozytenzellkernen in *let-413(RNAi)* Oozyten deutlich zu sehen. Eichstrich: 10  $\mu$ m.

Da nach den Beobachtungen, die durch die DIK-mikroskopische Dokumentation gewonnen wurden, davon auszugehen ist, dass die Ovulation gestört ist, sollte dieser Prozess durch Videobeobachtungen näher untersucht werden. Dafür soll im Folgenden die wildtypische Ovulation mit der Situation nach *let-413(RNAi)* exemplarisch verglichen werden (s. Filme auf der CD im Anhang). Auf Abb.11 sind Einzelbilder der Filmsequenzen dargestellt. Die proximal, vor der Spermatheka, liegende Oozyte wurde bei der ersten Ovulation über die Zeit beobachtet. Die Auflösung der Kernmembran (NEBD) ist ein deutlich sichtbares Zeichen für den Beginn der Ovulation und wurde als Zeitpunkt 0:00 festgelegt (McCarter et al., 1999). Kurz nach diesem Ereignis finden starke Kontraktionen (s. Pfeile Abb.11) der somatischen Hüllzellen der Gonade statt. Diese pressen die Oozyte bei gleichzeitiger Relaxierung der distalen Spermathekazellen ins Innere der Spermatheka. Im Inneren findet dann die Besamung und nach Abschluss der weiblichen Meiose die Befruchtung statt. Anschließend wird der Embryo in den Uterus entlassen, was im Wildtyp ca. 6 min nach dem beobachteten NEBD passiert.

Im *let-413(RNAi)* Hermaphroditen finden der NEBD und die dadurch induzierten Kontraktionen der Hüllzellen normal statt. Doch die Oozyte bleibt vor der Spermatheka liegen und kann trotz starker Kontraktionen nicht in die Spermatheka eindringen. Nach der Auflösung der Kernmembran dauerte es ca. 11 min, bis der

Zellkern wieder sichtbar wurde. Und ca. 40 min nach dem NEBD scheint der Zellkern deutlich größer zu sein (schwarze Pfeilspitze).

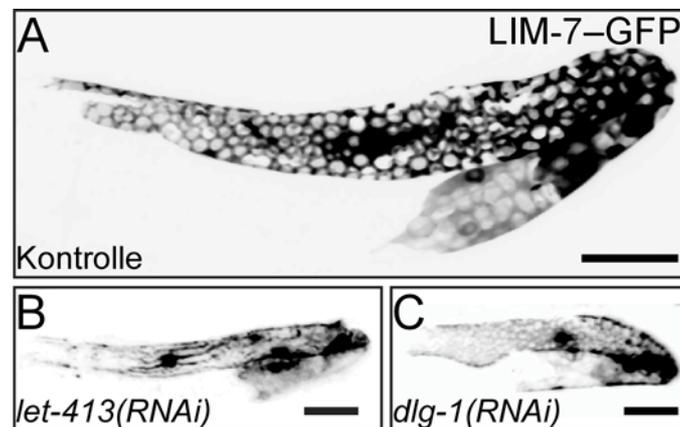


**Abb. 11: Differential-Interferenz-Kontrast Videomikroskopische Dokumentation der ersten Ovulation.**

Die erste ovulierende Oozyte (Ooz) liegt vor der Spermatheka (Sp). Der Zeitpunkt 0:00 zeigt die Auflösung der Kernmembran (NEBD, „nuclear envelope break down“). Kurz darauf zeigen die Hüllzellen im Wildtyp und in *let-413(RNAi)* Tieren starke Kontraktionen (s. Pfeile), welche die Oozyte in die wildtypische Spermatheka eindringen lassen. Nachdem die Fertilisation im Inneren der Spermatheka stattfand, wird im Wildtyp die Zygote ca. 6 min nach dem NEBD in den Uterus transportiert. In *let-413(RNAi)* Tieren findet der NEBD mit anschließenden starken Kontraktionen der Hüllzellen normal statt, jedoch bleibt die

Oozyte vor der Spermatheka liegen und kann nicht eindringen. Ca. 11 min nach dem NEBD wird der Zellkern wieder deutlich sichtbar und nach 40 min ist eine Vergrößerung des Zellkerns (schwarze Pfeilspitze) erkennbar. Verwendete Abkürzungen: Ooz Oozyte; Sp Spermatheka. Orientierung: proximal-distal: von links nach rechts. Aufnahmen fanden bei 21 °C statt. Eichstrich: 50 µm.

Eine Inhibition der Ovulation kann verschiedene Ursachen haben, z.B. durch eine Fehldifferenzierung der somatischen Hüllzellen der Gonade (Hall et al., 1999). Um diese Möglichkeit zu überprüfen, wurde ein Reporterstamm benutzt, der ein *lim-7::gfp* Fusionsprotein exprimiert. Dieses lokalisiert zytoplasmatisch in 8 der 10 Hüllzellen eines Gonadenarms und ist ein Marker für die Differenzierung der somatischen Hüllzellen (Hall et al., 1999). Der Vergleich des Expressionsmusters zwischen der Kontrolle und den *let-413* und *dlg-1* RNAi Gonaden zeigte jedoch keinen deutlichen Unterschied (Abb.12). Sowohl die Expression von LIM-7, als auch die beobachteten Kontraktionen in den Hüllzellen (Abb.11) lassen ausschließen, dass die Blockade der Ovulation durch Defekte in den Hüllzellen ausgelöst wird.



**Abb. 12: Dokumentation der Hüllzellen mit einem *lim-7::gfp* Markerstamm.**

(A) In der Kontrolle markiert der *lim-7::gfp* Reporterstamm die ersten vier der insgesamt fünf Hüllzellpaare. Das erste Zellpaar umschließt den distalen Teil bis zur „loop“-Region der Gonade. Im proximalen Teil der Gonade vor der Spermatheka befindet sich das fünfte Hüllzellpaar, dieses wird jedoch mit diesem Reporterstamm nicht markiert. Nach postembryonaler *let-413(RNAi)* (B) bzw. *dlg-1(RNAi)* (C) ist die Fluoreszenz nicht verändert. Dies lässt den Schluss zu, dass die Differenzierung der Hüllzellen nicht beeinträchtigt ist. Dargestellt ist jeweils der posteriore Gonadenarm. Orientierung: distal oben links, proximal unten links. Eichstriche: 50 µm.

Da die Oozyte vor der Ovulation ein Signal von den Spermien erhält (MSP Signal; s.o.; Miller et al., 2001), galt es zu überprüfen ob eine fehlerhafte Differenzierung oder Funktionalität der Spermien verantwortlich für den Sterilitätsphänotyp nach postembryonaler *let-413(RNAi)* sein könnte. Dazu wurden wildtypische Männchen zu L4-Larven der *let-413(RNAi)* Hermaphroditen gesetzt, damit wildtypische Spermien in die Spermatheka gelangen. Nach der Verpaarung wurden die Hermaphroditen für

24 h vereinzelt und die produzierten Nachkommen ausgezählt und mit der Kontrolle verglichen. Die Ergebnisse sind in Tab.2 dargestellt und zeigen, dass wildtypische Spermien nicht fähig sind, die durch *let-413(RNAi)* verursachte Sterilität zu retten, denn die *let-413(RNAi)* Hermaphroditen bleiben trotz wildtypischer Spermien steril.

Verpaarung mit wildtypischen Männchen	Durchschnittliche Nachkommenproduktion	
	Kontrolle	<i>let-413(RNAi)</i>
Verpaarung für 24 h	58,9 (10)	0,3 (10)
Verpaarung für 48 h	72,4 (10)	0 (10)

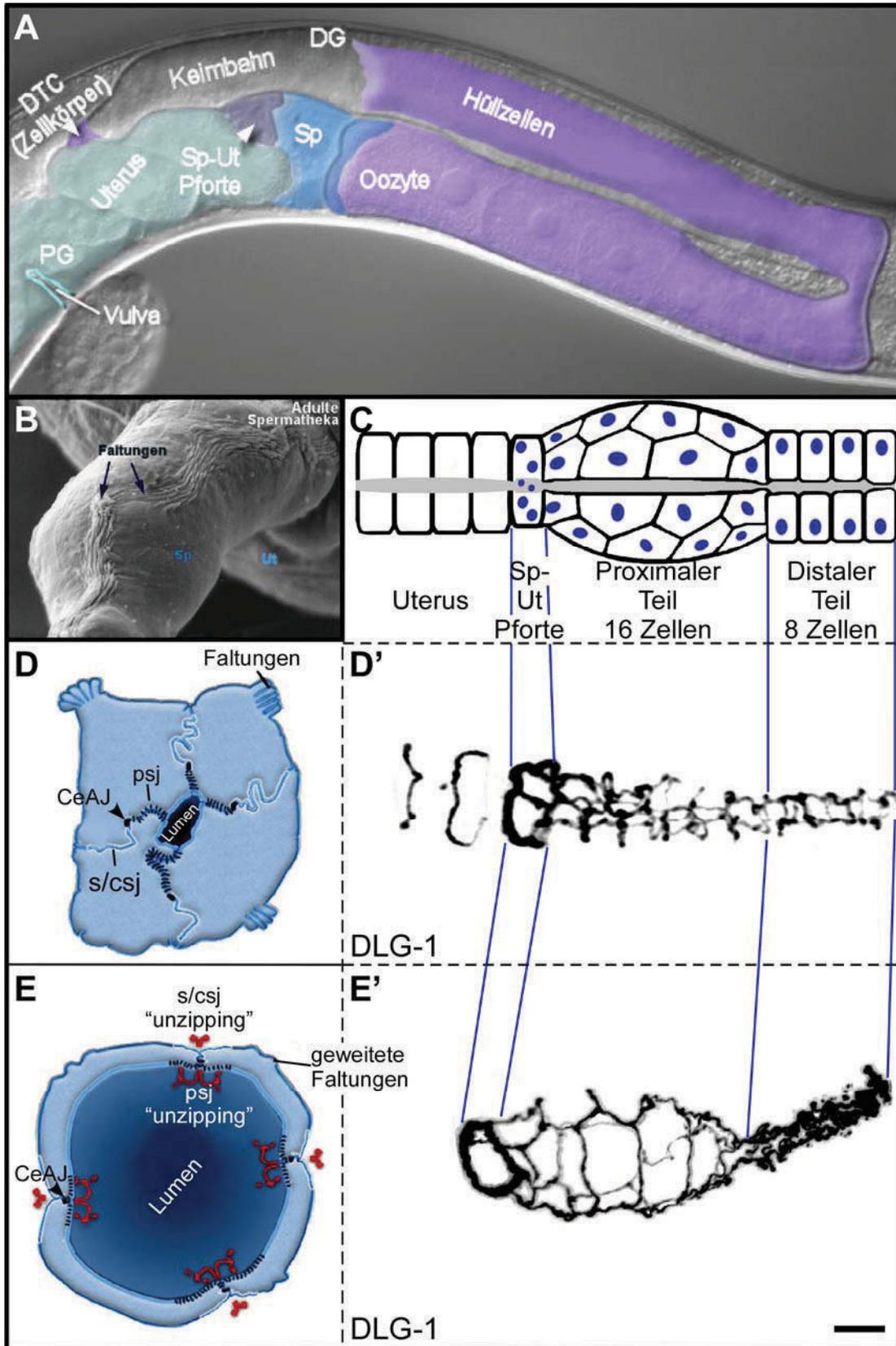
**Tab. 2: Durchschnittliche Nachkommenproduktion verpaarter wildtypischer und *let-413(RNAi)* Hermaphroditen nach 24 h bei 15 °C.**

In zwei unabhängigen Ansätzen wurden über 30 wildtypische Männchen für 24 h oder 48 h zu jungen adulten *let-413(RNAi)* Hermaphroditen gesetzt, bevor die Hermaphroditen für die Auswertung 24h vereinzelt wurden um die produzierten Nachkommen auszuzählen. Das Experiment erfolgte bei 15 °C.

## **2.1.5 Die postembryonale Herunterregulierung der *let-413* und *dlg-1* Genfunktion führt zu Defekten bei der Entwicklung des Spermathekaepithels**

### **2.1.5.1 Aufbau der Spermatheka**

Um die Ursache der *let-413* und *dlg-1* RNAi induzierten Blockade der Ovulation zu analysiert, wurde das Spermathekaepithel mit Hilfe epithelialer Markerproteine auf Fluoreszenzebene untersucht. Zudem wurde es durch den Einsatz epithelialer Marker, die an unterschiedlichen Membrandomänen lokalisieren, möglich, das postembryonal entwickelte, röhrenförmige Epithel als Modellsystem zu beschreiben. Die Spermatheka besteht aus insgesamt 30 Zellen, welche sich in drei Regionen aufteilen. Die distale Region besteht aus acht Zellen, die in zwei Reihen gegenüber angeordnet sind, ähnlich wie die Einheiten im Darmepithel (s. Einleitung Abb.4; Abb.13C). Diesen Zellen kommt die Aufgabe zu, während der Ovulation die Spermatheka zu öffnen und nach Aufnahme der Oozyte wieder zu verschließen. Die 16 Zellen der proximalen Region bilden die Eikammer, welche die Spermien enthält und in der die Besamung stattfindet (Kimble und Hirsh, 1979; McCarter et al., 1997). Enthält die Spermatheka keine Oozyte, so ist das Lumen flach und gewunden, um auf die Spermien adhäsiv zu wirken und sie in dem Lumen der Spermatheka einzuschließen (Abb.13D,D'). Der proximale Teil ist die Pforte zum Uterus und besteht aus sechs Zellen, wobei jeweils zwei Zellen ein ringförmiges Synzytium bilden. Um eine Oozyte aufnehmen zu können, besitzen die Zellen der Spermatheka starke Faltungen in der basalen Membran (Abb.13B) und „septate junctions“, welche jeweils apikal und basal zur CeAJ liegen und sich trennen können (Abb.13D,E; [www.wormatlas.org](http://www.wormatlas.org)). Die Spermatheka kann dadurch ihr Lumen extrem expandieren, um eine Oozyte für die Fertilisation aufzunehmen. Dabei sind die Zellen der Spermatheka stark abgeflacht und werden durch die CeAJ zusammengehalten, während die Oozyte die Spermatheka passiert.



**Abb. 13: Struktur und Aufbau der Spermatheka, ein Organ der somatischen Gonade von *C. elegans*.**

(A) Differential-Interferenz-Kontrast Aufnahme des posterioren Gonadenarms eines Hermaphroditen mit nachträglich gefärbter somatischer Gonade. (B) Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der Spermatheka. Deutlich sind Faltungen der Oberfläche erkennbar. (C) Schematische Darstellung einer lateralen Ansicht der Spermatheka und des Uterus. (D,E) Schematische Darstellung des Zellverbands in der proximalen Spermatheka ohne Oozyte (D) und mit ovulierender Oozyte (E) im Querschnitt. (D') Expressionsmuster von DLG-1, welches die CeAJ markiert. (E) Befindet sich eine Oozyte in der Spermatheka, sind die Faltungen in der basalen Membran geweitet und über die „septate junctions“ getrennt. Dadurch werden die Zellen nur von den CeAJ zusammengehalten (E').

Verwendete Abkürzungen: CeAJ *C. elegans* „apical junction“; DG distale Gonade; DTC „distal tip cell“; PG proximale Gonade; psj „pleated septate junction“; s/csj „smooth/continuous septate junction“; Sp Spermatheka.; Sp-Ut Spermatheka-Uterus; Ut Uterus. Eichstrich: 10 µm. A,B,D,E modifiziert nach [www.wormatlas.org](http://www.wormatlas.org).

Um den Aufbau und die Verteilung verschiedener Marker in der Spermatheka analysieren zu können, ist es notwendig, die Spermatheka kurz vor der ersten Ovulation zu beobachten. Nur dann liegt die Spermatheka als lang gestreckte Röhre vor. Ist die erste Ovulation abgeschlossen, so ist die Spermatheka stark verdreht und Akkordeon-ähnlich zusammengefaltet, so dass die Analyse von Expressionsmustern epithelialer Proteine nicht mehr möglich ist. Es hat sich darüber hinaus bewährt, die Analyse *in vivo* an transgenen Reporterstämmen durchzuführen, da somit eine Fixierung und damit einhergehende Artefakte entfallen.

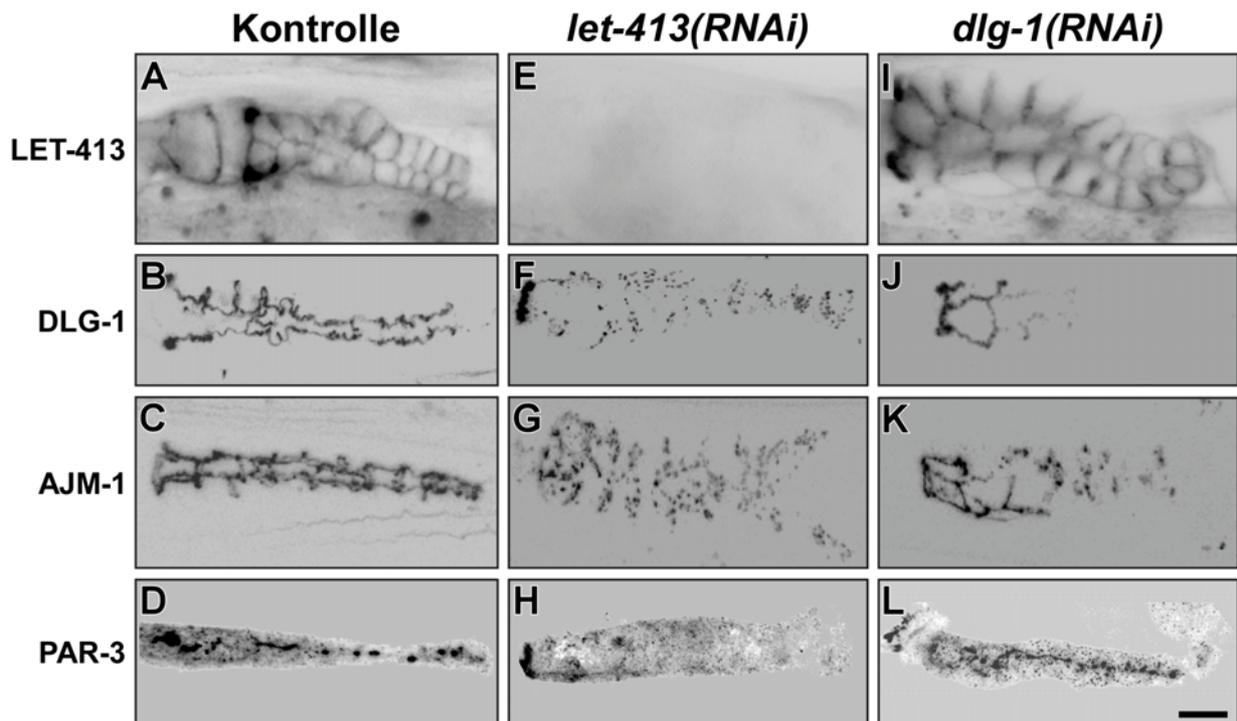
**2.1.5.2 Die Etablierung der „*C. elegans* apical junction“ in der Spermatheka verläuft defekt**

Nachdem der Aufbau und der Organisation der Spermatheka beschrieben wurde, sollten die Expressionsmuster von epithelialen Proteinen mit Hilfe von Fluoreszenzmikroskopie analysiert werden. Die Ergebnisse der Expressionsanalysen der Reporterstämmen *let-413::cfp*, *dlg-1::gfp*, *ajm-1::gfp* in der Spermatheka sind auf Abb.14 dargestellt. In der Kontrolle ist LET-413 an der basolateralen Membrandomäne der Spermathekazellen zu detektieren (Abb.14A), während DLG-1 und AJM-1 in der CeAJ lokalisieren. Nach postembryonaler *let-413(RNAi)* sind die Expressionsmuster von DLG-1 und AJM-1 stark punktiert und erscheinen nach

basolateral disloziert (Abb.14F,G). In der Spermatheka von *dlg-1(RNAi)* Tieren ist AJM-1 dagegen nicht so stark fehllokalisiert wie in *let-413(RNAi)* Tieren. Es ist bekannt, dass die korrekte Lokalisierung von AJM-1 durch DLG-1 vermittelt wird (Firestein und Rongo, 2001; Köppen et al., 2001; Segbert et al., 2004), und die Proteine DLG-1 und AJM-1 beide wiederum von LET-413 abhängig sind (Leguis et al., 2000; McMahon et al., 2001; Bossinger et al., 2004; Segbert et al., 2004). Diese Ergebnisse spiegeln sich auch in den veränderten Expressionsmustern von DLG-1 und AJM-1 in der Spermatheka auf Abb.14 wieder. Die basolaterale Lokalisation von LET-413 ist unabhängig von DLG-1, denn es ist in den Epithelzellen der *dlg-1(RNAi)* Spermatheka wie in der Kontrolle an der basolateralen Membrandomäne zu detektieren (vergl. Abb.14A mit Abb.14I).

Da ein postembryonaler Funktionsverlust von PAR-3 ebenfalls zu einem Emo Phänotyp führt (s. Einleitung; Aono et al., 2004), wurde die PAR-3 Lokalisation ebenfalls analysiert. Dafür wurden immunhistologische PAR-3 Fluoreszenzfärbungen an präparierten Gonaden durchgeführt. PAR-3 akkumuliert an der apikalen Membran in den Epithelzellen der Spermatheka (Abb.14D; Aono et al., 2004). Diese Lokalisierung wird durch *let-413(RNAi)* stark gestört (Abb.14H). Im Gegensatz dazu interferiert *dlg-1(RNAi)* nicht mit der korrekten Verteilung von PAR-3 (Abb.14L).

Ein Vergleich der unterschiedlichen Expressionsmuster auf Abb.14 zeigt, dass im distalen Bereich der *dlg-1(RNAi)* Spermatheka die junctionalen Marker stärkere Defekte aufweisen, als im proximalen Teil. So ist DLG-1 in *dlg-1(RNAi)* Tieren im distalen Bereich nahezu vollständig reduziert, während es im proximalen Teil der Spermatheka, noch zu detektieren ist (Abb.14J). Dadurch zeigt AJM-1 im proximalen Teil ebenfalls eine stärkere Misslokalisierung (Abb.14K). Dies konnte nach postembryonalen RNAi Experimenten gegen die *par*-Gene auch beobachtet werden. So zeigen die Expressionsmuster der apikalen Marker nach *par-3*, *par-6*, *pkc-3* RNAi im distalen Bereich stärkere Defekte (Aono et al., 2004). Folgende Erklärung ist dafür denkbar: Die Akkumulation der apikal lokalisierten Proteine findet während der Entwicklung der Spermatheka zunächst proximal statt und verläuft dann in distaler Richtung (s. Abb.15; Aono et al., 2004). Da die proximalen Zellen der Gonade bereits terminal differenziert sind, während im distalen Bereich die Zellen noch proliferieren (Kimble und Hirsh, 1979), ist es möglich, dass durch RNAi die mRNA in den proliferierenden Zellen durch das erhöhte Protein „turn over“ effizienter abgebaut werden kann (Aono et al., 2004).



**Abb. 14: Vergleich der Expressionsmuster von LET-413, DLG-1, AJM-1 und PAR-3 in der Spermatheka der Kontrolle, *let-413* und *dlg-1* RNAi Hermaphroditen.**

(A-C;E-G;I-K) *In vivo* Fluoreszenz Aufnahmen der Spermatheka in Fluoreszenz markierten Markerstämmen. (D,H,L) Immunhistologische PAR-3 Färbungen an präparierten Gonaden. (A) LET-413-CFP lokalisiert basolateral in den Spermathekazellen der Kontrolle. (B,C) DLG-1-GFP und AJM-1-GFP lokalisieren in der CeAJ, während PAR-3 (D) apikal dazu exprimiert wird. (E-H) Postembryonale *let-413(RNAi)* führt dazu, dass LET-413 (E) nicht mehr zu detektieren ist, DLG-1 (F) und AJM-1 (G) ein stark punktiertes Muster zeigen und PAR-3 (H) fehllokalisiert ist. (I-L) Postembryonale *dlg-1(RNAi)* interferiert nicht mit der LET-413 (I) Expression. (J) Nach *dlg-1(RNAi)* ist das Expressionsmuster des Markers DLG-1-GFP im distalen Bereich der Spermatheka nicht zu erkennen und zeigt in diesem Bereich eine starke Fehllokalisierung von AJM-1 (K). (L) PAR-3 lokalisiert wie in der Kontrolle apikal. Orientierung: proximal-distal: von links nach rechts. Eichstrich: 10  $\mu$ m.

Um die Entwicklung der CeAJ in der wildtypischen Spermatheka zu verfolgen, wurden Hermaphroditen unterschiedlichen Alters aufgenommen und mit der Entwicklung des postembryonalen *let-413(RNAi)* Phänotyps verglichen (Abb.15). Hier ist deutlich zu sehen, dass die CeAJ der Spermatheka von proximal nach distal prozessiert wird. Während in der Kontrolle im distalen Bereich der Spermatheka die Zellen noch polarisieren und DLG-1 punktiert an der apikalen Membran erscheint, so ist das junktionale Expressionsmuster im proximalen Bereich bereits kontinuierlich ausgebildet (Abb.15A). Nach postembryonaler *let-413(RNAi)* ist das DLG-1

Fluoreszenzsignal erst später deutlich zu detektieren und erscheint als diskontinuierliches Muster, welches im distalen Bereich deutlich schwächer zu detektieren war, als im proximalen Bereich (Abb.15D,F).

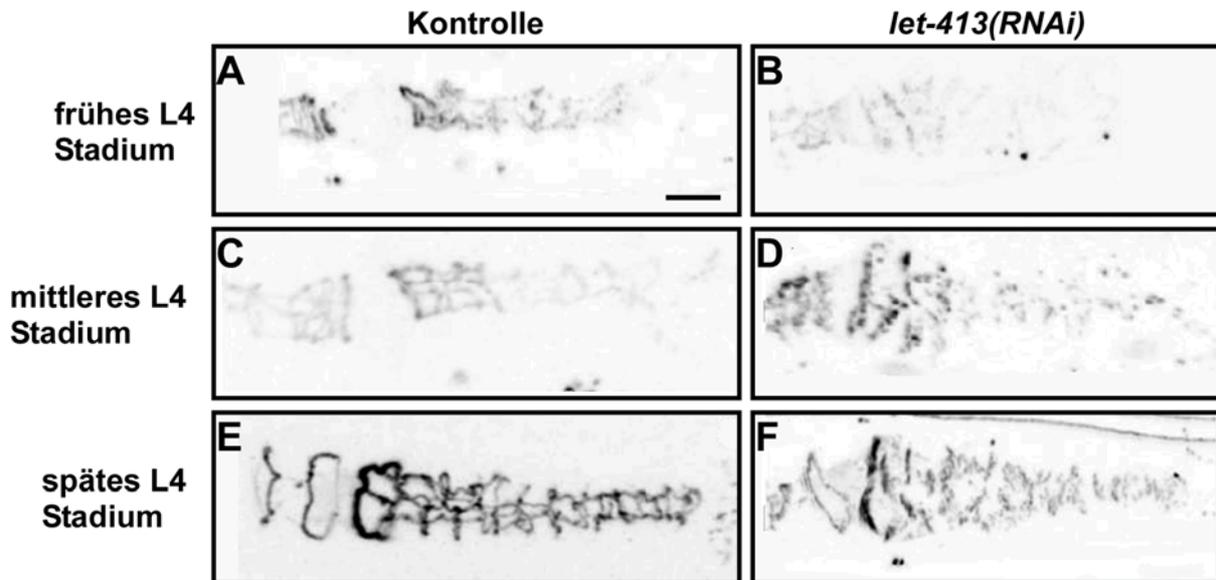
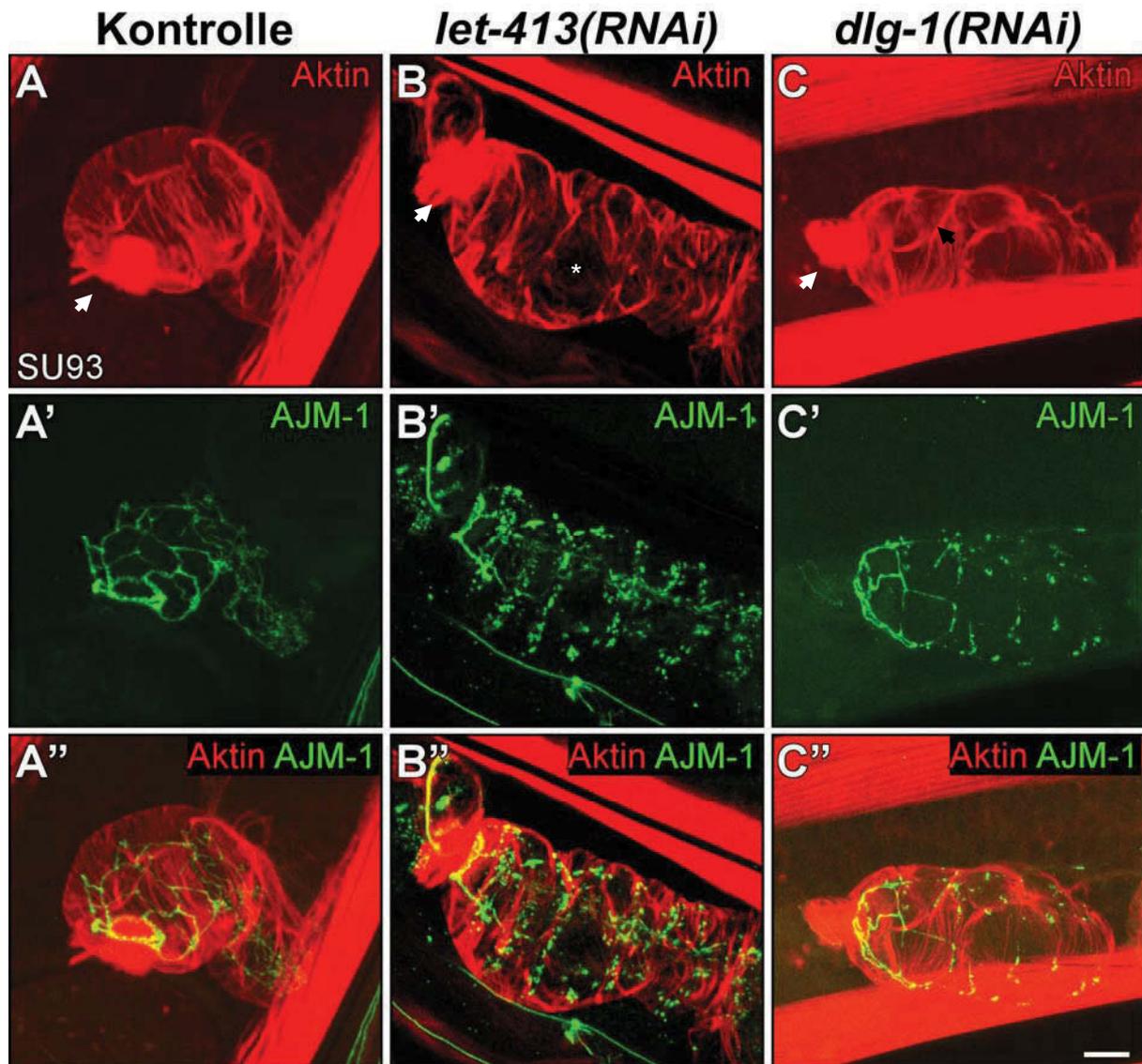


Abb. 15: DLG-1 *in vivo* Fluoreszenzaufnahmen zur Dokumentation der *let-413(RNAi)* Phänotypentwicklung in der *C. elegans* Spermatheka.

Tiere eines *dlg-1::gfp* Markerstammes wurden synchronisiert auf *let-413(RNAi)* Platten bzw. auf die Kontrolle gegeben. Bei 15 °C wurden nach 95 (A,B), 100 (C,D) und 105 h (E,F) Tiere auf Agarose Objektträgern am konfokalen Lasermikroskop ausgewertet. Orientierung: proximal-distal: von links nach rechts. Eichstrich: 10 µm.

### 2.1.5.3 Die Organisation des Aktinzytoskeletts

Für die Ovulation ist die Koordination der Kontraktionen der somatischen Hüllzellen der Gonade und die gleichzeitige Öffnung der distalen Spermatheka notwendig, damit die Oozyte in die Spermatheka gelangt. Dafür wird ein dichtes Netzwerk von Aktinfilamenten in der Spermatheka benötigt (McCarter et al., 1997; Rose et al., 1997; Strome 1986). Um das Aktinzytoskelett in *let-413* und *dlg-1* RNAi Tieren zu untersuchen, wurden die Würmer mit einem Alexa-Fluor 568-gekoppelten Phalloidin gefärbt. Auf Abb.16 ist zu sehen, dass die Polygon-förmigen Zellen in der Kontrolle ein parallel angeordnetes Muster von Aktinfilamenten aufweisen, welche die Spermatheka komplett umspannen (Abb.16A). Durch die Verwendung eines *ajm-1::gfp* Reporterstammes ist zu erkennen, dass die Aktinfilamente von der CeAJ ausgehend die Spermathekazellen nach apikolateral umschließen. Im Gegensatz dazu weist das Muster der Aktinfilamente nach postembryonaler RNAi gegen *let-413* und *dlg-1* starke Unregelmäßigkeiten auf (Abb.18B,C). So sind z.B. Unterbrechungen der Aktinnetzwerks (Stern Abb.16B) oder dickere Bündelungen der Aktinfilamente (schwarzer Pfeil Abb.16C) erkennbar. Dabei scheint ein Zusammenhang zwischen der Stärke der Fehlorganisation des Aktinnetzwerks und der Stärke der Defekte der CeAJ zu bestehen (Abb.16B'',C''). Diese Ergebnisse werden in der Diskussion weiter erörtert.

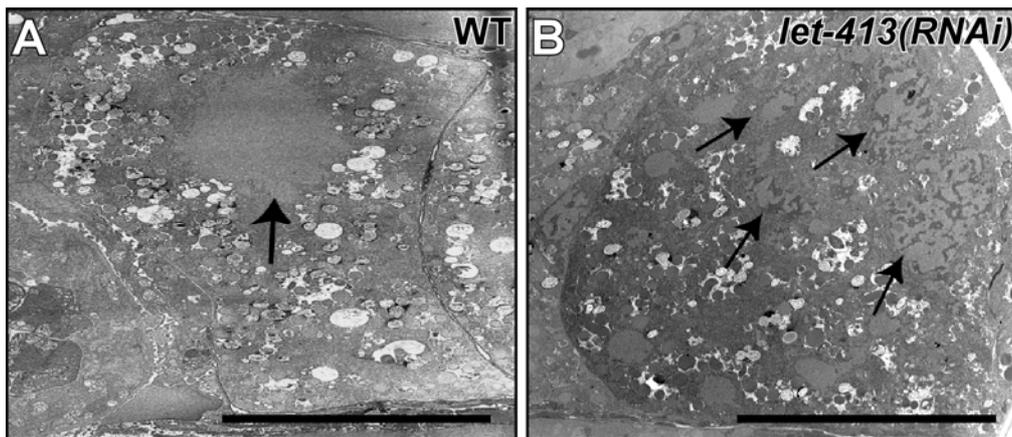


**Abb. 16: Dokumentation der Aktinorganisation in wildtypischen, *let-413* und *dlg-1(RNAi)* Spermatheken.**

(A) Die Kontrolle des Reporterstammes SU93, welcher AJM-1-GFP exprimiert, zeigt eine gleichmäßig parallele und periphere Anordnung des Aktinnetzwerks. Die Aktinfilamente zeigen eine starke Akkumulation zwischen Spermatheka und Uterus (weißer Pfeil). Die Spermatheken von *let-413* (B) und *dlg-1(RNAi)* (C) Tieren zeigen Störungen in der Verteilung der Aktinfilamente. So zeigt das Muster ungleichmäßige Unterbrechungen (Stern in B) oder dickere Bündelungen (schwarzer Pfeil in C) der Aktinfasern. Orientierung: proximal-distal: von links nach rechts. Eichstrich: 10  $\mu$ m. Abb. von Christophe Lefebvre (Pilipiuk et al., 2009).

#### 2.1.5.4 Elektronenmikroskopische Analyse von Oozyten und Spermatheka nach *let-413* RNAi

Um Aufschluss über ultrastrukturellen Veränderungen in den Spermathekazellen nach postembryonaler *let-413(RNAi)* zu erhalten, wurden elektronenmikroskopischen Analysen von Christophe Lefebvre in Kooperation durchgeführt (Pilipiuk et al., 2009). Auf Abb.17 sind zunächst Querschnitte von Oozyten zu sehen und zeigen, dass das Chromatin in wildtypischen Oozyten dicht gepackt ist, erkennbar durch eine einzelne runde, glatte und graue Struktur im Innern der Oozyte (Abb.17A, Pfeil). Im Gegensatz dazu sind in *let-413(RNAi)* Oozyten mehrere graue Strukturen zu erkennen, die stattdessen in der Oozyte fragmentiert vorliegen und ungleichmäßig verteilt sind (Abb.17B, Pfeile).



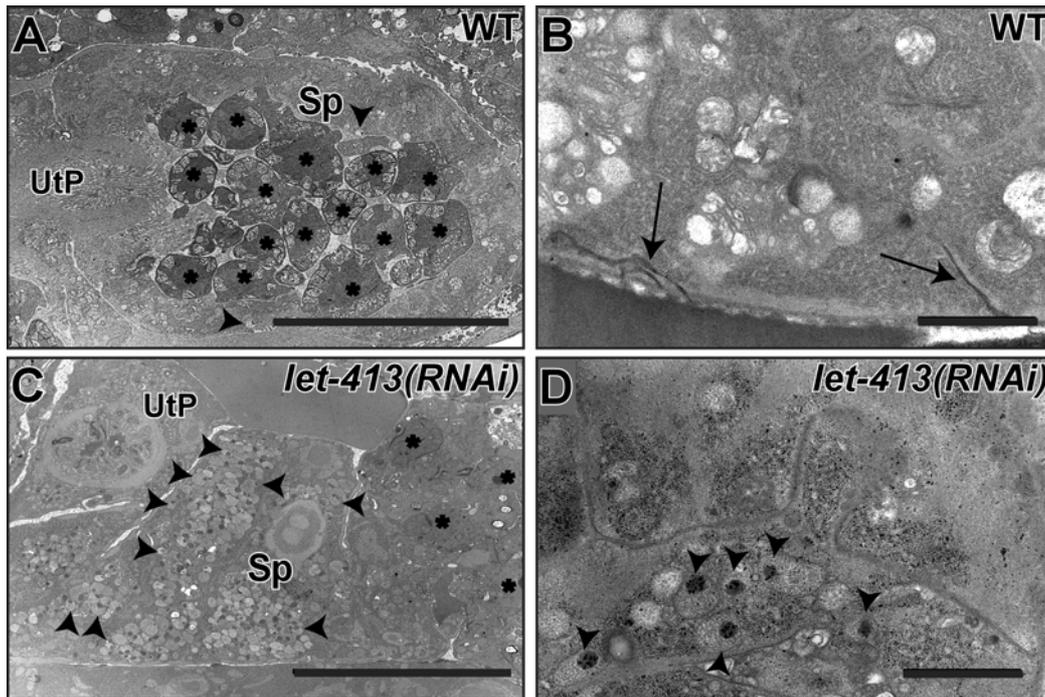
**Abb. 17: Elektronenmikroskopische Analyse der Oozyten.**

Querschnitt durch eine wildtypische (A) und eine *let-413(RNAi)* Oozyte, welche vor der Spermatheka liegen. Das kondensierte Chromatin (Pfeil) ist in der wildtypischen Situation als dichte und gleichmäßig runde Struktur zu sehen, während das Chromatin nach *let-413(RNAi)* fragmentiert und ungleichmäßig erscheint. Eichstriche: 10  $\mu$ m. Abb. von Christophe Lefebvre (Pilipiuk et al., 2009).

Elektronenmikroskopische Aufnahmen von longitudinalen Schnitten ermöglichte die Untersuchung der lateralen Zell-Zell-Kontaktstrukturen. Die Aufnahmen auf Abb.18 zeigen zudem, dass in wildtypischen Hermaphroditen die Spermien sich im Lumen der Spermatheka befinden. Dagegen sind in *let-413(RNAi)* Tieren die Spermien nur proximal vor der Spermatheka und nicht im Lumen zu finden (Abb.18C). Dieses

bestätigt das Ergebnis der DNA Färbungen (s. Abb.9), wo die Spermien ebenfalls proximal vor der Spermatheka liegen. Die wildtypischen Gewebeschnitte zeigen entlang der lateralen Membranen elektronendichte Zell-Zell-Kontaktstrukturen (Abb.18B, Pfeile), die in den Schnitten der *let-413(RNAi)* Spermathekazellen nicht auszumachen sind (Abb.18C,D). Zudem waren auffällig viele vesikuläre Ansammlungen mit amorphem Material in *let-413(RNAi)* Spermathekazellen zu sehen (Abb.18D; Pfeilköpfe). Für eine quantitative Auswertung wurden die Vesikel gezählt. In *let-413(RNAi)* Spermathekazellen waren  $56,0 \pm 27,5$  (n=12) Vesikel pro  $100 \mu\text{m}^2$  zu sehen. Dagegen zeigte die Kontrolle nur  $2,2 \pm 1,1$  (n=9) Vesikel pro  $100 \mu\text{m}^2$  (s. Diskussion).

Zusammenfassend kann nach Interpretation der Expressions- und elektronenmikroskopischen Analysen festgehalten werden, dass postembryonale *let-413(RNAi)* zu einer Fehllokalisierung der apikalen Proteine wie DLG-1, AJM-1 und PAR-3 zum Fehlen der elektronendichten Zell-Kontaktstrukturen führt. Des Weiteren kommt es durch den postembryonalen Funktionsverlust von *let-413* und *dlg-1* zu Defekten bei der Organisation der Aktinzytoskeletts im Spermathekaepithel. Da das dichte Netzwerk der Aktinfilamente für die Ovulation benötigt wird, um die nötigen Kontraktionen und Relaxierungen zu vermitteln, führt dieser Umstand dazu, dass der Ovulationsprozess nahezu vollständig blockiert ist.



**Abb. 18: Elektronenmikroskopische Analyse der Spermathekazellen.**

(A,B) Longitudinale Schnitte einer wildtypischen Spermatheka. Im Lumen (A) kann man die Spermien (Sterne) erkennen und laterale Zell-Zell Verbindungen (Pfeile) als elektronendichte Strukturen.

(C,D) Longitudinale Schnitte von *let-413(RNAi)* Hermaphroditen. Spermien sind nur in dem proximalen Teil der Gonade (Sterne), jedoch nicht im Lumen (C und D) auszumachen. Auffällig ist eine hohe Anzahl von vesikulären Ansammlungen von amorphem Material, welches in den Zellen zu sehen ist (Pfeilköpfe). Elektronendichte Zell-Zell Verbindungen sind dagegen nicht zu erkennen. Verwendete Abkürzungen: Sp Spermathekazelle; UtP Spermatheka-Uterus Pforte. Orientierung: proximal-distal von links nach rechts. Eichstriche: (A,C) 10  $\mu\text{m}$ ; (B,D) 1  $\mu\text{m}$ . Abb. von Christophe Lefebvre (Pilipiuk et al., 2009).

## 2.2 Mutationen im $IP_3/Ca^{2+}$ Signalweg supprimieren die durch *let-413* und *dlg-1* RNAi induzierten Phänotypen

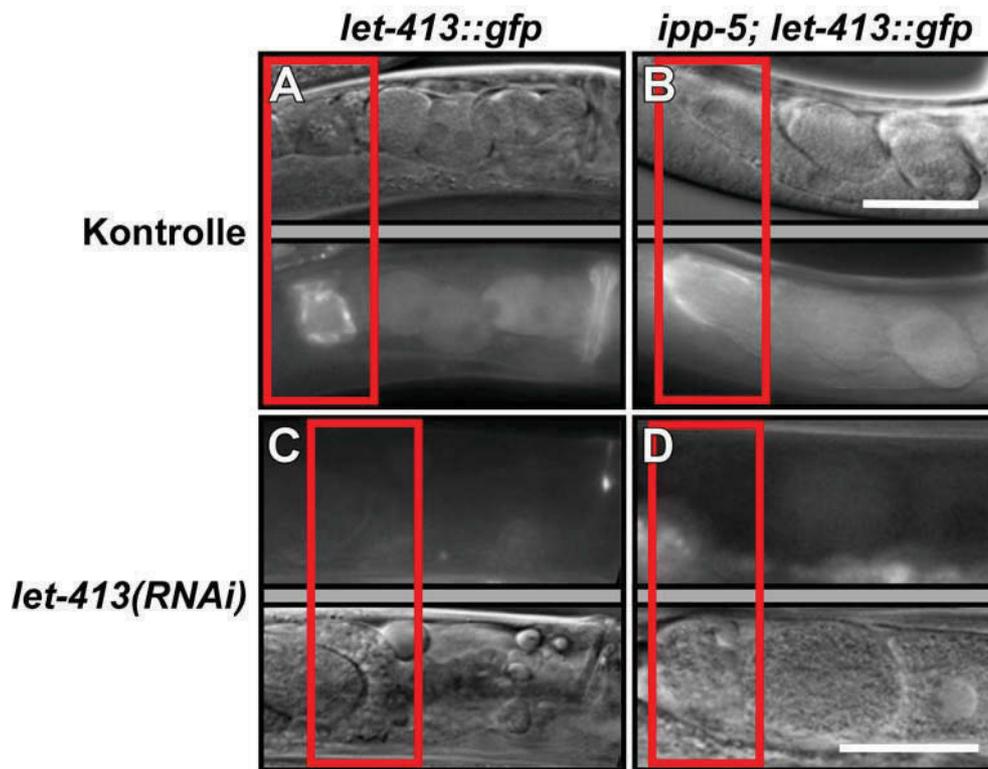
Der Prozess der Ovulation in *C. elegans* wird über den EGF-Signalweg („epidermal growth factor“, LET-23=Rezeptor; LIN-3=Ligand; s. Einleitung Abb.6) reguliert. Mutationen, die einen Funktionsverlust von *lin-3* oder *let-23* verursachen, führen dazu, dass der Ovulationprozess blockiert wird und ein Emo Phänotyp ausgebildet wird. Durch Mutationen in nachgeschalteten („downstream“) Komponenten aus diesem Signalweg ist es jedoch möglich, eine blockierte Ovulation aufzuheben und den Emo Phänotyp zu supprimieren. Dies ist z.B. der Fall, wenn der  $IP_3$ -Rezeptor eine Funktionszugewinn-Mutation (gof, „gain of function“) aufweist oder ein Antagonist des Signalweges ausgeschaltet wird, z.B. *ipp-5* (lof, „loss of function“; Bui und Sternberg, 2002; Clandinin et al., 1998). Das *itr-1* Gen kodiert für einen  $IP_3$ -Rezeptor, der nach Bindung von  $IP_3$ ,  $Ca^{2+}$  aus dem ER ausschüttet. IPP-5 ist eine Inositol Polyphosphat 5-Phosphatase, die  $IP_3$  zu  $IP_2$  dephosphoryliert und somit als Feinregulator und Antagonist in diesem Signalweg fungiert. In diesen Mutationen ist das Signal, vermutlich durch eine erhöhte  $Ca^{2+}$  Konzentration, verstärkt und die Ovulation kann trotz Mutationen in vorgeschalteten Komponenten stattfinden.

Nach Herunterregulierung der *par-3* Genfunktion konnte die Arbeitsgruppe von Ken Kemphues zeigen, dass die apikale Membrandomäne im distalen Teil der Spermatheka nicht mehr korrekt gebildet wird. Dadurch kommt es zu junktionalen Defekten, die eine Blockierung der Ovulation und damit die Ausbildung eines Emo Phänotyps zur Folge haben. Der postembryonale *par-3(RNAi)* Phänotyp kann jedoch durch eine Mutation in *ipp-5* Gen partiell gerettet werden. Es wird dabei postuliert, dass PAR-3 im Wildtyp ein Bestandteil oder eine vermittelnde Komponente der EGF-Signalkaskade ist (Aono et al., 2004).

### 2.2.1 Die *ipp-5* Mutante ist sensitiv für RNAi

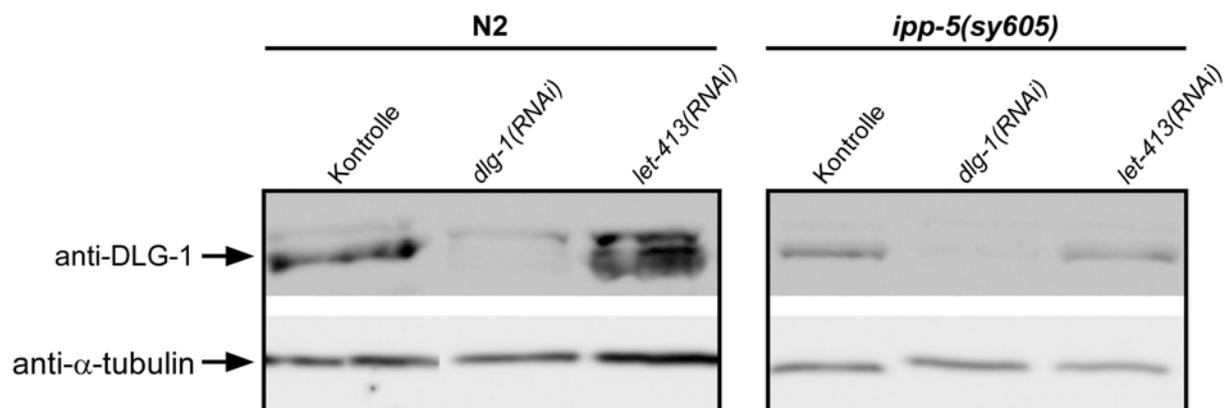
Da in den folgenden Abschnitten dieser Arbeit mit der *ipp-5(sy605)* Mutante gearbeitet wurde, soll hier zunächst gezeigt werden, dass die Mutante sensitiv auf RNAi wirkt. Dazu wurde ein *let-413::gfp* Markerstamm mit der *ipp-5* Mutante gekreuzt (durchgeführt von Christophe Lefebvre; Pilipiuk et al., 2009). Die entstehenden homozygoten F2 Nachkommen wurden nach postembryonaler *let-413(RNAi)* *in vivo* im Hinblick auf die LET-413 Fluoreszenz analysiert und mit den Kontrollen verglichen. Auf Abb.19A ist die Fluoreszenz in der Spermatheka eines adulten Tieres des *let-413::gfp* Markerstammes durch einen roten Rahmen markiert. In *ipp-5* (Abb.19B) ist keine sichtbare Veränderung des Fluoreszenzsignals zu erkennen. Nach postembryonaler *let-413(RNAi)* wird sowohl im *let-413::gfp* Stamm (Abb.19C) als in *ipp-5* (Abb.19D) die LET-413–GFP Fluoreszenz drastisch reduziert. Somit scheint eine Mutation im *ipp-5* Gen keine Auswirkungen auf die postembryonale Proteinverminderung durch RNAi zu haben.

Zur weiteren Verifizierung der RNAi Effizienz in *ipp-5* wurden Western-Blot Analysen durchgeführt (Abb.20). Diese zeigen, dass sowohl im N2 Wildtypstamm als auch in der *ipp-5* Mutante das DLG-1 Signal nach postembryonaler *dlg-1(RNAi)* stark vermindert wird. Als weiteres Ergebnis ist auf dem Western-Blot (Abb.20) zu sehen, dass postembryonale *let-413(RNAi)* keine Auswirkungen auf die DLG-1 Konzentration hat.



**Abb. 19: Dokumentation der LET-413–GFP Expression *in vivo* im *ipp-5* mutanten Hintergrund.**

Ein fluoreszierender *let-413::gfp* Stamm wurde mit der *ipp-5(sy605)* Mutante verpaart um die Mutation hinein zu kreuzen. Die *in vivo* Fluoreszenz zeigt durch die zusätzliche *ipp-5* Mutation keinen Unterschied bei der Effektivität der postembryonalen RNAi. Der Bereich der Spermatheka ist mit einem roten Rahmen gekennzeichnet. Abb. von Christophe Lefebvre (Pilipiuk et al., 2009). Eichstrich: 50  $\mu$ m.



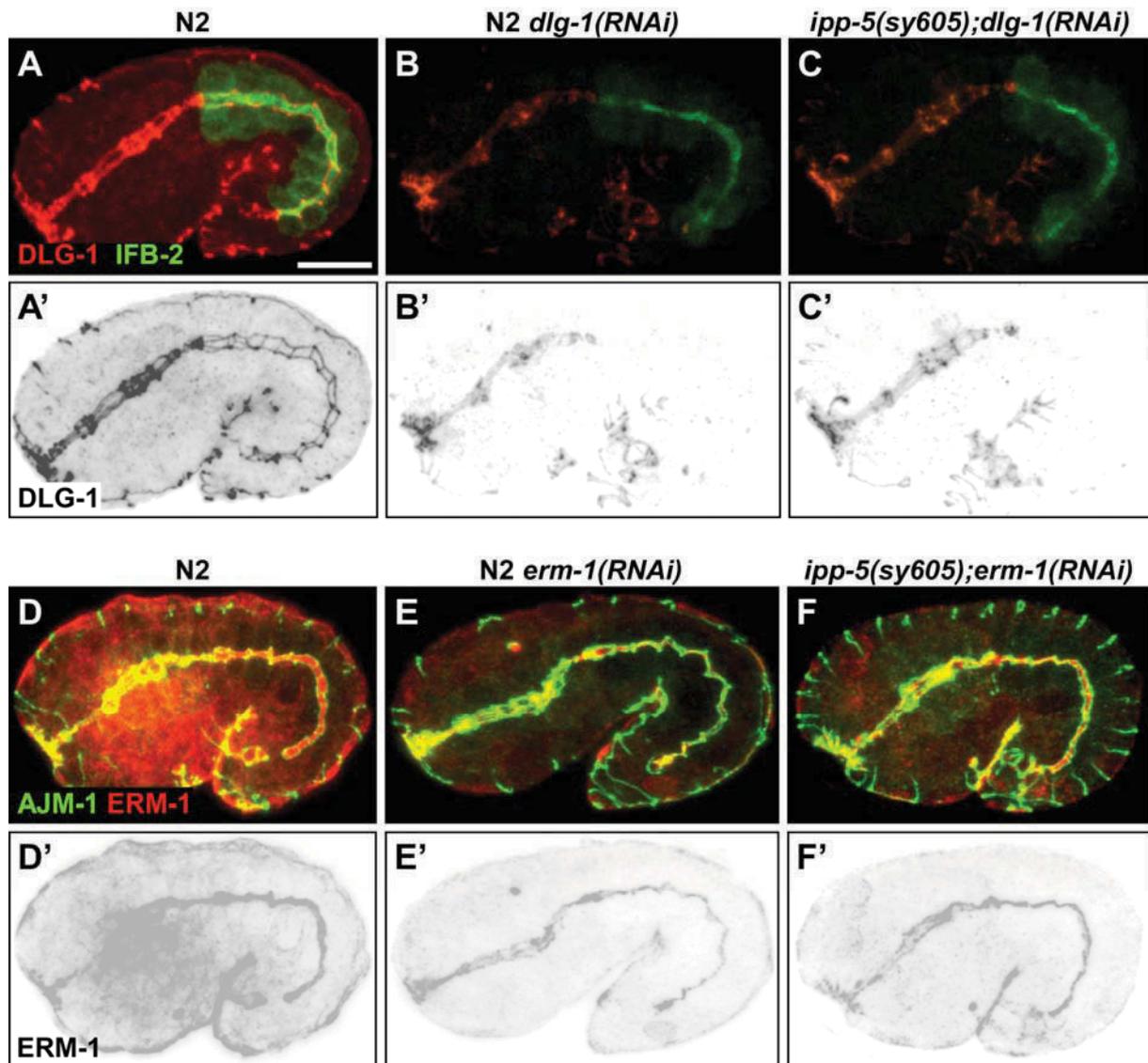
**Abb. 20: Western-Blot Analyse zur Dokumentation der Proteinkonzentration nach RNAi.**

Western-Blot Analysen am Wildtyp und in der *ipp-5(sy605)* Mutante zeigen bei ca. 107 kDa mit einem DLG-1 Antikörper Signale, welche nach *dlg-1(RNAi)* stark vermindert sind. Durch *let-413(RNAi)* wird die DLG-1 Proteinkonzentration nicht beeinflusst. Als Ladekontrolle diente  $\alpha$ -Tubulin. Abb. von Christophe Lefebvre (Pilipiuk et al., 2009).

---

Um die RNAi Sensitivität auch in embryonalen Geweben von *ipp-5(sy605)* zu überprüfen, wurden Immunfluoreszenz Analysen nach embryonaler RNAi durchgeführt. Im Gegensatz zur postembryonalen RNAi wird dafür die Fütterung von dsRNA produzierenden Bakterien an L4-Larven bzw. jungen adulten Hermaphroditen vorgenommen (s. 6.3.11.2). Dadurch kann sowohl die maternale als auch die zygotische Genfunktion ausgeschaltet werden und demzufolge zeigt die F1 die durch RNAi induzierten Effekte. Im Fall von embryonaler *dlg-1(RNAi)* ist das DLG-1 Antikörper Signal sowohl im N2 Stamm (Abb.21B) als auch *ipp-5* (Abb.21C) unter gleichen Aufnahmebedingungen stark verringert. Um dieses Ergebnis mit Hilfe eines weiteren Antikörpers zu verifizieren, wurde embryonale *erm-1(RNAi)* durchgeführt. Mit Hilfe einer ERM-1 Antikörperfärbung wird deutlich, dass das zu detektierende Signal sowohl in *ipp-5* (Abb.21F) als auch im Wildtyp (Abb.21E) reduziert wird. Im Wildtyp und in *ipp-5* ist zudem der typische *erm-1(RNAi)* Phänotyp zu erkennen. Dieser zeigt sich in Form von Verengungen des Darmlumens (Göbel et al., 2004; van Fürden et al., 2004).

Die *ipp-5* Mutante zeigt demnach keine Unterschiede zum N2 Stamm in Bezug auf RNAi. Somit kann weitestgehend ausgeschlossen werden, dass *ipp-5* RNAi induzierte Phänotypen aufgrund einer Insensitivität gegenüber RNAi rettet.

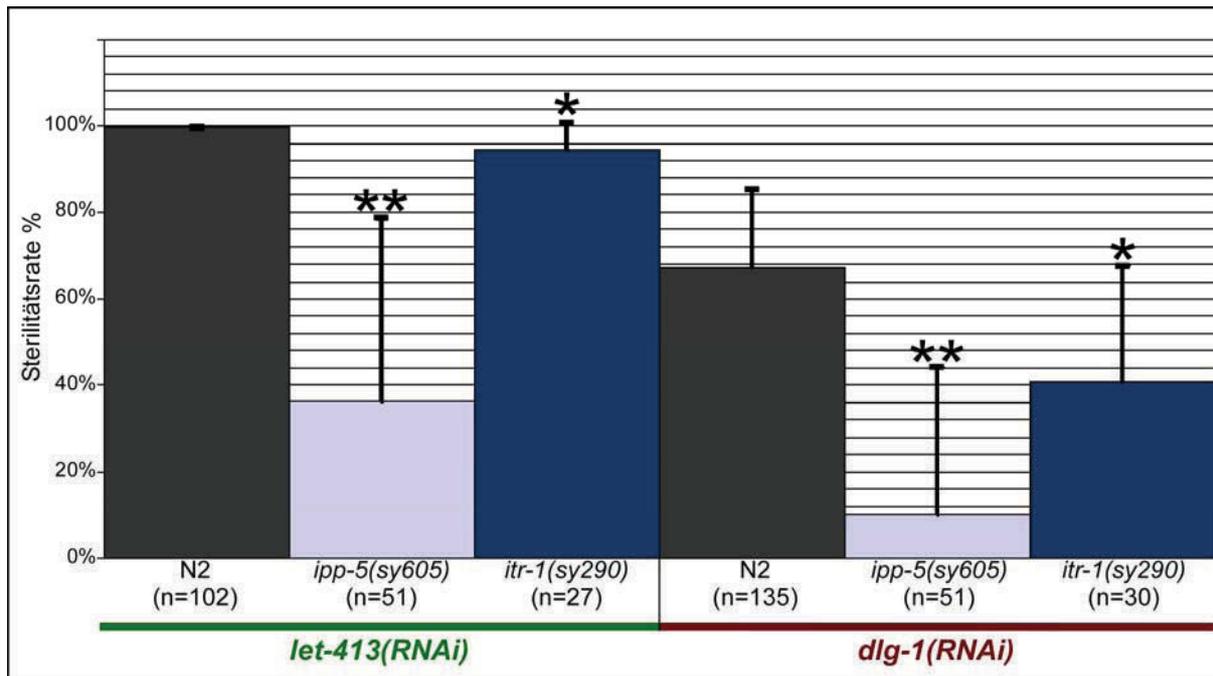


**Abb. 21: Immunfluoreszenz Dokumentation in Embryonen zur Kontrolle der RNAi Effizienz in *ipp-5(sy605)*.**

(A) Im Wildtyp lokalisiert IFB-2 an der apikalen Membran des *C. elegans* Darms, während DLG-1 eine Komponente der CeAJ ist und ein Strickleiter-ähnliches Muster zeigt. (B) in *dlg-1(RNAi)* Embryonen ist das detektierte DLG-1 Signal in Darm und Hypodermis vollständig reduziert und ist lediglich im Pharynx und Hinterdarm noch zu erkennen. (C) In *ipp-5(sy605) dlg-1(RNAi)* Embryonen ist im Darm ebenfalls kein DLG-1 Fluoreszenzsignal zu detektieren. (D) ERM-1 ist in allen Zellen ubiquitär lokalisiert, akkumuliert während der Morphogenese stark an der apikalen Membran. (E) Nach embryonaler *erm-1(RNAi)* ist ERM-1 in allen Geweben stark reduziert, ist aber noch schwach an der apikalen Zellmembran im Darm zu detektieren. (F) *ipp-5(sy605) erm-1(RNAi)* Embryonen zeigen ebenfalls, dass die ERM-1 Proteinkonzentration stark vermindert ist und wie im wildtypischen Hintergrund eine Verengung im Darmlumen zeigt, welches an dem aberranten AJM-1 Muster zu erkennen ist. Orientierung: Anterior links, dorsal oben. Eichstrich 10  $\mu$ m.

### 2.2.2 Mutationen in *ipp-5* und *itr-1* rettet die durch *let-413* und *dlg-1* RNAi induzierte Sterilität

Der durch postembryonale *par-3* RNAi induzierte Emo Phänotyp kann in einer *ipp-5(lof)* Mutante partiell gerettet werden (s.o. 2.2; Aono et al., 2004). Es galt zu prüfen, ob eine Rettung der *let-413* und *dlg-1* RNAi Phänotypen ebenfalls in *ipp-5(lof)* und *itr-1(gof)* Mutanten möglich ist. Dafür wurden die produzierten Nachkommen von den Mutanten *ipp-5(sy605)* und *itr-1(sy290)* nach *let-413* und *dlg-1* RNAi im Vergleich zur Kontrolle verifiziert. Beide Mutanten zeigen Unterschiede zum Wildtyp bei der Ovulation, z.B. führt die *ipp-5* Mutation zu hyperaktive Kontraktionen während der Ovulation, wobei zwei Oozyten gleichzeitig in die Spermatheka eindringen, jedoch nur eine befruchtet werden kann. Dadurch ist die Nachkommenschaft der Mutanten im Vergleich zum Wildtyp stark reduziert (Bui und Sternberg, 2002). Tiere der *ipp-5(sy605)* Mutante produzierten durchschnittlich 108 Nachkommen in 67 h (n= 66) und *itr-1(sy290)* 85 (n=42; siehe Zahlen im Anhang). Diese Zahlen der Kontrollsituation entsprechen der Sterilitätsrate von 0%. Werden die Sterilitätsraten des N2 Wildtypstammes mit denen der *ipp-5* und *itr-1* Mutanten verglichen, zeigt die *ipp-5(sy605)* Mutante nach postembryonaler RNAi gegen *let-413* und *dlg-1* eine deutlich geringere Sterilitätsrate mit 36,4% und 10,2%, als der N2 Wildtypstamm (100%; 58%; s. Graph 2). Die *itr-1(sy290)* Tiere zeigen nach *dlg-1(RNAi)* ebenfalls nur noch zu 40,8% Sterilität. Nicht so deutlich, aber nach Anwendung eines t-Tests als statistisch signifikant verringert anzusehen, ist auch die Sterilitätsrate im *itr-1(sy290)* funktionsverstärkenden Hintergrund nach *let-413(RNAi)* mit 94,4%.



**Graph 2: Graphische Darstellung der signifikanten Verminderung der Sterilitätsrate durch Mutationen in *ipp-5* und *itr-1*.**

Die *let-413* und *dlg-1* RNAi Tiere wurden nach 102 h Entwicklungszeit auf neue Platten umgesetzt um nach weiteren 67 h die produzierten Nachkommen auszuzählen. Die Entwicklung und Eiablage erfolgte bei 15 °C. Die Sterilitätsrate wurde abhängig von den durchschnittlich produzierten Nachkommen der Kontrolle errechnet. Die Signifikanz wurde mit Hilfe eines t-Tests ermittelt. \* P-Wert < 0,05; \*\* P-Wert < 0,01.

Bei RNAi Experimenten über Fütterung nimmt die Effizienz des RNAi Effekts durch eine Verdünnung der Bakterienkulturen ab, je stärker die Kulturen verdünnt werden (Gönczy et al., 2000). Dieser Umstand wurde methodisch verwendet, um die Stärke der Rettung des Phänotyps nach postembryonaler *let-413(RNAi)* im *itr-1(sy290)* Stamm zu verdeutlichen. So wurden die *let-413(RNAi)* Bakterienkulturen, die zur Fütterung eingesetzt wurden, mit den Kontrollbakterien im Verhältnis 1:2 verdünnt und auf die Platten gegeben. Die induzierte Sterilität im wildtypischen Hintergrund ist dann mit 91,7% (n=21) immer noch sehr hoch, während in der *itr-1(sy290)* Mutante die Sterilität nur noch 66,1% beträgt (n= 24; Zahlen s. Anhang 8.2.4). Somit zeigt die statistische Analyse, dass in *ipp-5(lof)* und *itr-1(gof)* mutanten Stämmen, die durch postembryonale *let-413* und *dlg-1* RNAi induzierte Sterilität signifikant verringert wird. Wird das mit den Ergebnissen von Aono kritisch verglichen, so muss folgendes angemerkt werden.

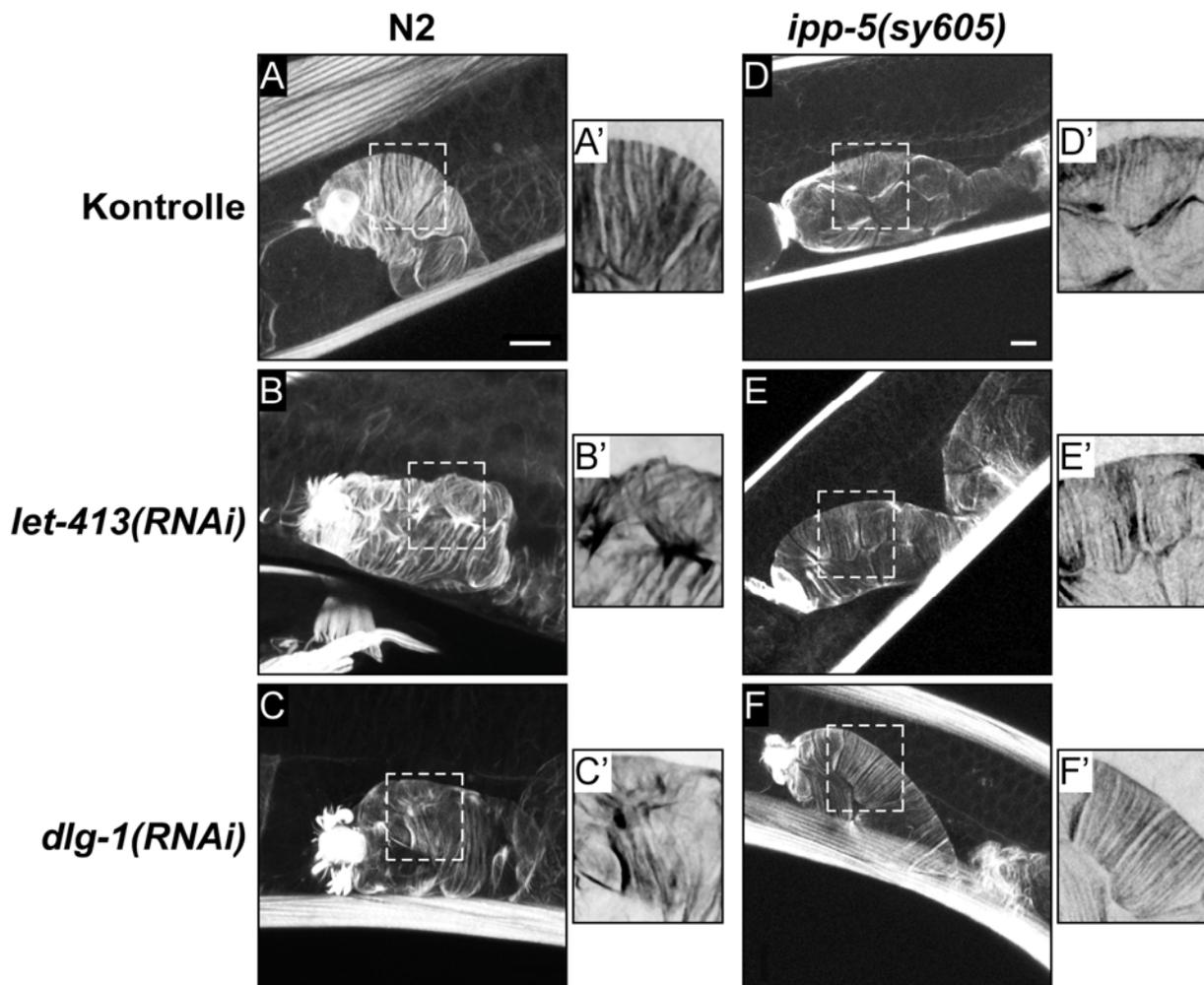
Die Defekte in der Spermatheka sind nach postembryonaler *let-413(RNAi)* drastischer ausgeprägt als nach *par-3(RNAi)*. So sind z.B. laterale interzelluläre Kontaktstrukturen auf elektronenmikroskopischer Ebene nach *let-413(RNAi)* nicht mehr zu detektieren (Abb.18), und das nötige Aktin-Netzwerk weist starke Defekte auf, sodass eine Funktionsausübung der Spermatheka während der Ovulation schwer nachvollziehbar ist (Abb.16). Die CeAJ verläuft in der *let-413(RNAi)* Spermatheka diskontinuierlich um den Apex der Epithelzellen (Abb.14) und es wäre vielmehr zu erwarten, dass das Organ bei dem starken mechanischen Stress, der bei der Ovulation auf die Spermatheka wirken muss, auseinander reißt. Somit wäre die Fertilität im *ipp-5(sy605)*, bzw. im *itr-1(sy290)* Stamm nach postembryonaler *let-413(RNAi)*, lediglich durch eine Verstärkung des EGF-Signals, nicht plausibel zu erklären. Daher galt es die Rettung der Sterilität im Hinblick auf die strukturellen Defekte in der Spermatheka genauer zu analysieren.

### **2.2.3 Die *ipp-5* Mutante rettet die durch *let-413* und *dlg-1* RNAi induzierten Defekte in der „*C. elegans* apical junction“ und des Aktinzytoskeletts in der Spermatheka**

Bei der Analyse der CeAJ mittels immunhistologischen DLG-1 Färbungen an präparierten Gonaden erscheint das DLG-1 Muster im wildtypischen Hintergrund als ein stark punktiertes junktionales Muster in der Spermatheka (Abb 23A). Im Gegensatz dazu zeigt die DLG-1 Färbung in *ipp-5(sy605)* nach *let-413(RNAi)* ein kontinuierliches und zum größten Teil wieder hergestelltes junktionales Muster (Abb.23B). Wenn die Defekte in der CeAJ wieder hergestellt sind, dann galt es auch zu prüfen, ob das Aktinzytoskelett ebenfalls verbesserte Strukturen in der *ipp-5(sy605)* Mutante nach postembryonaler *let-413* bzw. *dlg-1* RNAi annimmt. Die Ergebnisse der dafür durchgeführten Phalloidin Färbung sind auf Abb.22 dargestellt. Die Aktinfilamente sind in der Kontrolle sowohl im N2 Stamm als auch in der *ipp-5(sy605)* Mutante parallel angeordnet und umspannen, von der CeAJ ausgehend, die Spermathekazellen (Abb.22A,D). Wie zuvor schon beschrieben, ist die Anordnung der Aktinfilamente nach postembryonaler *let-413* und *dlg-1* RNAi im wildtypischen Hintergrund unregelmäßig (s.o.; Abb.16B,C; Abb.22B,C). Doch auch diese Defekte sind in der *ipp-5(sy605)* Mutante nach *let-413* und *dlg-1* RNAi

(Abb.22E,F) nicht mehr zu erkennen und die Organisation des Aktinzytoskeletts erscheint wildtypisch.

Demnach wird sowohl das junctionale Muster auf Fluoreszenzebene als auch die Organisation der Aktinfilamente in der Spermatheka der *ipp-5(sy605)* Mutante nach *let-413* und *dlg-1* RNAi gerettet.



**Abb. 22: Aktin Färbung zur Dokumentation des Aktinnetzwerks in *ipp-5(sy605)* im Vergleich zum Wildtyp.**

(A) Wildtypische Aktin Filamente umspannen die Spermathekazellen in einer parallelen Anordnung (A'). Nach postembryonaler *let-413(RNAi)* (B) und *dlg-1(RNAi)* (C) ist die Verteilung der Aktinfilamente ungeordnet. In *ipp-5(sy605)* ist die Aktinstruktur wie im wildtypischen Hintergrund geordnet (D) und zeigt sich durch postembryonale *let-413(RNAi)* (E) und *dlg-1(RNAi)* (F) weiterhin in paralleler Anordnung. Orientierung: proximal-distal: von links nach rechts. Eichstrich: 10  $\mu$ m. Abb. von Christophe Lefebvre (Pilipiuk et al., 2009).

#### 2.2.4 Ein Funktionsverlust von *ipp-5* und eine Funktionszugewinn-Mutation in *itr-1* können den embryonalen *let-413* und *dlg-1* RNAi Phänotyp retten

Die durch *let-413(RNAi)* induzierte Sterilität wird in der *ipp-5(sy605)* Mutante gerettet. Nach postembryonaler *let-413(RNAi)* konnte häufig beobachtet werden, dass die abgelegten Embryonen schlüpfen konnten. Daher galt es zu prüfen, ob durch die *ipp-5* Mutation auch die Defekte durch einen embryonalen Funktionsverlust von *let-413*, bzw. *dlg-1* supprimiert werden. Dafür wurde die Genfunktion von *let-413* und *dlg-1* mit Hilfe embryonaler RNAi eliminiert (s. 6.3.11.2). Die anschließende Auswertung vergleicht die auftretende Letalität des N2 Wildtyp Stammes und die der *ipp-5(sy605)* Mutante (Tab.3). Während die Letalität in N2 nach embryonaler *let-413(RNAi)* 100% beträgt, so beträgt sie nur 93% in *ipp-5(sy605)*. Wie bereits zuvor in Abs. 2.2.2 beschrieben, stellt sich die Rettung des letalen Phänotyps viel deutlicher dar, wenn die *let-413(RNAi)* Bakterienkulturen verdünnt werden (N2 *let-413(RNAi)* 1:2 71%; *ipp-5(sy605) let-413(RNAi)* 1:2 35%; s.u. Graph 3). Die embryonale Letalität nach *dlg-1(RNAi)* beträgt im N2 Stamm 87% und wird durch die Mutation im *ipp-5* Gen auf 35% verringert (Tab.3).

Da die Methode der RNAi nicht zu einem funktionellen Totalverlust der entsprechenden Genfunktion führt (Ahringer, 2006), wurde untersucht, ob die Mutation im *ipp-5* Gen fähig ist, ein *let-413* Null-Allel zu supprimieren. Dazu wurde die *ipp-5(sy605)* Mutante mit verschiedenen putativen *let-413* Null-Mutanten gekreuzt. Die Letalität der F2 Generation, welche homozygot für die *ipp-5* Mutation ist, wurde ausgewertet. Die *ipp-5(sy605); let-413* Doppelmutanten zeigen dennoch zu 25% einen embryonal letalen Phänotyp, welcher durch die auftretende homozygot letale *let-413* Mutation in den Nachkommen der heterozygoten Hermaphroditen verursacht wird (Tab.3). Auch *ipp-5(RNAi)* vermag es nicht, die Letalität der *let-413* Mutante zu verringern. Somit kann die *ipp-5* Mutante zwar einen *let-413(RNAi)* Phänotyp retten, jedoch nicht die getesteten *let-413* Null-Allele (getestete Allele: *s128*; *s1431*; *s1451*; *s1455*; durchgeführt von Christoph Lefebvre, Pilipiuk et al., 2009). Da die *ipp-5(sy605)* Mutante jedoch keine RNAi Insensitivität zeigt (s. 2.2.1), ist es möglich, dass LET-413 in geringen Konzentrationen vorhanden sein muss, damit die putative Erhöhung in der  $IP_3/Ca^{2+}$  Konzentration zu einer Rettung des *let-413(RNAi)* Phänotyps führt (s. Diskussion).

Genotyp/RNAi	Letalität % der F1
N2 Kontrolle	0 (3090)*
<i>ipp-5(sy605)</i> Kontrolle	0 (754)*
N2 <i>let-413(RNAi)</i>	100 (1238)*
<i>ipp-5(sy605) let-413(RNAi)</i>	93,3 (1340)*
N2 <i>dlg-1(RNAi)</i>	87 (373)*; 94 (890)**
<i>ipp-5(sy605) dlg-1(RNAi)</i>	35 (339)*; 85(797)**
<i>let-413(s128)/rol-3(e754)</i>	23 (>100)**
<i>let-413(s128)/rol-3(e754);ipp-5(sy605)</i>	27 (136)**
<i>let-413(s128)/rol-3(e754);ipp-5(RNAi)</i>	32 (>100)**
<i>let-413(s1431)/rol-3(e754)</i>	23 (350)**
<i>let-413(s1431)/rol-3(e754);ipp-5(sy605)</i>	24 (920)**
<i>let-413(s1451)/rol-3(e754)</i>	24 (1747)**
<i>let-413(s1451)/rol-3(e754);ipp-5(sy605)</i>	25 (3594)**
<i>let-413(s1455)/rol-3(e754)</i>	26 (123)**
<i>let-413(s1455)/rol-3(e754);ipp-5(sy605)</i>	23 (107)**

**Tab. 3: Erzeugte embryonale Letalität in unterschiedlichen mutanten Stämmen.**

Die Durchführung der Experimente erfolgte bei 15 °C; \* 18 °C; \*\* 20 °C.

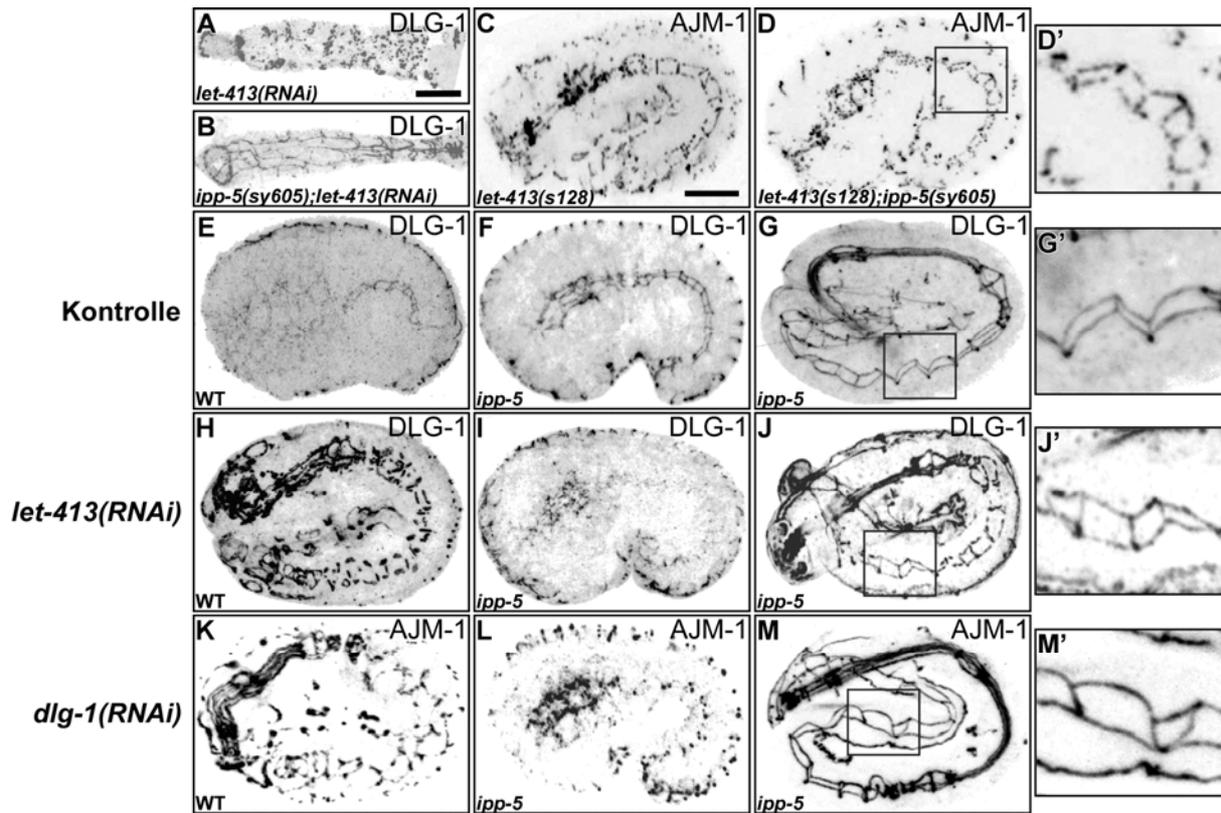
Um die Rettung des embryonalen *let-413(RNAi)* Phänotyps in der *ipp-5* Mutante auch im Hinblick auf das junktionale Expressionsmuster zu untersuchen, wurden immunhistologische DLG-1 und AJM-1 Färbungen durchgeführt. In der wildtypischen Situation gelangen die apikalen Proteine, wie z.B. der DAC, während der frühen Morphogenese in punktierten Aggregaten zur apikalen Membran des Darmepithels (Abb.23E). Im Laufe der Morphogenese elongiert der Wurm und währenddessen wird das Expressionmuster des DAC als Strickleiter-ähnliches und kontinuierliches Muster ausgebildet (Abb.22F,G; Bossinger et al., 2001; Köppen et al., 2001). Wie auf Abb.23F und 23G zu sehen ist, zeigt die *ipp-5(sy605)* Mutante bei der CeAJ Entwicklung keine Abweichung zum Wildtyp.

Nach embryonaler *let-413* und *dlg-1* RNAi im wildtypischen Hintergrund bildet sich ein letal wirkender Phänotyp aus (Abb.23H,K). Dabei zeigen die Proteine der CeAJ in den Epithelien eine starke Fehllokalisierung. So erscheint z.B. die Expression vom DAC als es ein diskontinuierliches Muster, welches sich in der *ipp-5(sy605)* Mutante

---

deutlich verbessert darstellt (Abb.23J',M'), sodass es vielen Embryonen möglich wird zu schlüpfen. Jedoch scheint eine Rettung des DAC Expressionsmusters erst in späteren Morphogenesestadien (über 2-fach elongiert) zu erfolgen. Denn in frühen Morphogenesestadien ist auch in der *ipp-5(sy605)* Mutante der frühe induzierte *let-413(RNAi)* Phänotyp zu sehen, wie er sich auch im wildtypischen Hintergrund zeigt. Dabei akkumulieren die apikalen Proteine erst später an der apikalen Membran als in der Kontrolle (vergl. Abb.23I,E). Ein Funktionsverlust von *dlg-1* führt dazu, dass AJM-1 nicht korrekt lokalisiert wird, da es als physischer Interaktionspartner von DLG-1 abhängig ist (Abb.23K,L; Lockwood et al., 2008; Labouesse, 2006; Bossinger et al., 2001; Köppen et al., 2001; McMahon et al., 2001). Auch nach *dlg-1(RNAi)* kann das punktierte AJM-1 Muster nur im späteren Verlauf der Morphogenese durch die *ipp-5(sy605)* Mutante verbessert werden (Abb.23M).

Die Beobachtung bezüglich des zeitlichen Einsetzens bei der Verbesserung der CeAJ in der *ipp-5(sy605)* Mutante scheint charakteristisch für den Rettungsmechanismus zu sein. Sowohl die frühen Entwicklungsstadien in den untersuchten *let-413* und *dlg-1* RNAi Embryonen, als auch in den Spermatheken, zeigen keine Abweichung von der im Wildtyp induzierten Fehlentwicklung (Embryonen n>150 Abb.23I, L; Spermatheken n> 60; s. Diskussion).



**Abb. 23: Dokumentation der Rettung der *let-413* und *dlg-1* RNAi Phänotypen durch eine Mutation im *ipp-5* Gen in der Spermatheka und im Embryo von *C. elegans*.**

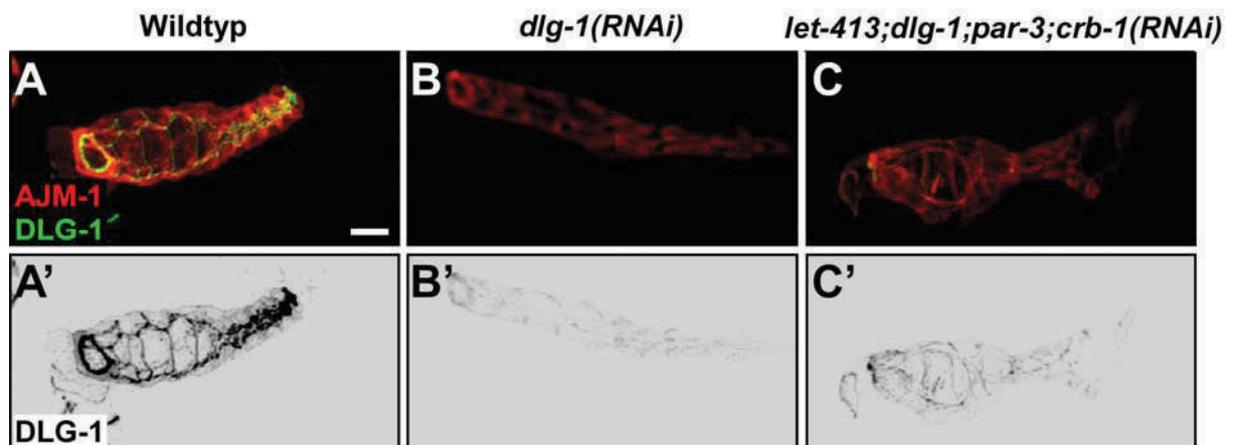
(A) Eine *let-413(RNAi)* Spermatheka gefärbt mit DLG-1 zeigt ein stark punktiertes DLG-1 Muster, welches aber in der *ipp-5(sy605)* Mutante (B) sehr viel besser und kontinuierlicher aussieht. (C) Homozygote *let-413(s128)* Embryonen zeigen in der Hypodermis und im Darm eine punktierte AJM-1 Färbung. (D) Eine zusätzliche *ipp-5(sy605)* Mutation kann im Embryo die *let-413* Nullmutante nicht retten und zeigt im AJM-1 Muster keine Verbesserung (D'). In der Kontrolle lokalisiert DLG-1 im Wildtyp (E) und in *ipp-5(sy605)* (F, G) Embryonen in der CeAJ und zeigt im Darm ein Strickleiterähnliches Muster (G'). (H) Nach *let-413(RNAi)* im Wildtyp ist das DLG-1 Signal diskontinuierlich und disloziert zur lateralen Membrandomäne. (I) In *ipp-5(sy605); let-413(RNAi)* Embryonen ist der Phänotyp zunächst wie im Wildtyp, sodass DLG-1 später zur apikalen Membran lokalisiert (vergl. mit E) und punktiert erscheint. Doch im Verlauf der weiteren Entwicklung verbessert sich das DLG-1 Muster und ein fast kontinuierliches CeAJ Muster ist zu beobachten (J'). (K) Die AJM-1 Lokalisierung ist von DLG-1 abhängig und akkumuliert nur unregelmäßig in der CeAJ. (L) In *ipp-5(sy605); dlg-1(RNAi)* Embryonen ist zu sehen, dass AJM-1 zunächst ein punktiertes Muster zeigt. Doch später ist in vielen Embryonen ein kontinuierliches Strickleitermuster zu detektieren (M, M'). (A, B) Orientierung: proximal-distal: von links nach rechts. (C-M) Orientierung: Anterior links, dorsal oben. Eichstrich 10  $\mu$ m.

### 2.2.5 Die *ipp-5* Mutante kann nicht jeden Funktionsverlust epithelialer Gene retten

Nachdem festgestellt wurde, dass die durch *let-413* und *dlg-1* RNAi induzierten Defekte in der *ipp-5* Mutante supprimiert werden, sollte getestet werden, ob auch der Funktionsverlust anderer epithelialer Gene gerettet werden kann. Durch die gleichzeitige Ausschaltung mehrerer Gene kann sich ein Phänotyp verbessern, verschlechtern oder keine Änderung zeigen. Dadurch wird es möglich, epistatische Zusammenhänge zwischen den Genen aufzudecken. So sollte in der *ipp-5(sy605)* Mutante die Genfunktion von *let-413* und *dlg-1* in Kombination mit anderen epithelialen Genen ausgeschaltet werden, um so redundante Systeme bzw. Komponenten, die ggf. die Rettung vermitteln, aufzudecken.

Es ist bereits bekannt, dass ein gleichzeitiger Funktionsverlust von *let-413* und *dlg-1* zu einer Verstärkung des junktionalen Phänotyps führt (Köppen et al., 2001; McMahon et al., 2001). Werden die *let-413* und *dlg-1* Fütterungsbakterien im Verhältnis 1:1 gemischt, ergab eine Auszählung der Hermaphroditen die nicht ovulieren konnten, dass die Tiere des N2 Wildtypstammes zu 100% steril waren (n=260 Tiere zeigten keine Embryonen im Uterus; siehe Tab.4). Da postembryonale *par-3(RNAi)* ebenfalls zu Ovulationsdefekten führt (Aono et al., 2004), wurde ein Dreifach RNAi Experiment, mit zusätzlichen *par-3(RNAi)* Bakterien (Verhältnis 1:1:1), ausgewertet, was zu 94% bei den N2 *let-413/dlg-1/par-3(RNAi)* Hermaphroditen zu einer blockierten Ovulation führte.

In einem weiteren Ansatz wurde zusätzlich noch *crb-1* ausgeschaltet. CRB-1 ist das Homolog des *Drosophila* Crumbs, dessen Funktion in *C. elegans* noch nicht genau aufgeklärt ist. Jedoch wird postuliert, dass CRB-1 in einem redundanten System für die Lokalisierung des DAC wirkt. (Bossinger et al., 2001; Segbert et al., 2004). In dieser Vierfach RNAi Kombination waren alle N2 Tiere steril (n=45). Da jedoch eine Verdünnung der Bakterienkulturen die RNAi Effizienz beeinträchtigt (Gönczy et al., 2000), wurde eine Antikörperfärbung durchgeführt, um die Herunterregulierung der DLG-1 Proteinkonzentration zu überprüfen. Wie auf Abb.24 zu sehen ist, führt die Verdünnung der *dlg-1(RNAi)* Bakterienkultur nach *let-413/dlg-1/par-3/crb-1(RNAi)* zu keinem deutlichen Unterschied im Hinblick auf die reduzierte DLG-1 Proteinmenge (vergl. 24C' mit 24B').



**Abb. 24: Immunhistologische Fluoreszenzaufnahmen zur Kontrolle der RNAi Effizienz nach *let-413; dlg-1; par-3; crb-1(RNAi)*.**

In präparierten Gonaden wurden AJM-1 und DLG-1 angefärbt. Wird *dlg-1* in Kombination mit *let-413*, *par-3* und *crb-1* ausgeschaltet, ist das DLG-1 Fluoreszenzsignal fast vollständig reduziert (C') und vergleichbar mit der RNAi Effizienz wie nach alleiniger *dlg-1(RNAi)* (B'). Eine AJM-1 Antikörperfärbung detektierte AJM-1 an der lateralen Zellmembran der Spermatheka. Diese laterale Lokalisation kann jedoch bisher nur immunhistologisch und nicht *in vivo* im *ajm-1::gfp* Stamm detektiert werden. Dennoch ist die laterale AJM-1 Antikörperfärbung nach *dlg-1* (B') und nach *let-413/dlg-1/par-3/crb-1(RNAi)* (C') schwächer zu detektieren und zeigt eine Korrelation zu der Stärke der DLG-1 Reduzierung. Orientierung: proximal-distal: von links nach rechts. Eichstrich: 10  $\mu\text{m}$ .

In der *ipp-5(sy605)* Mutante wurden die Ovulationsdefekte im Gegensatz zum N2 Wildtypstamm in allen RNAi-Ansätzen fast vollständig gerettet, denn nach gleichzeitigen Funktionsverlust von *let-413*, *dlg-1* (7% Ovulationsdefekte; n=28; Tab.4), *par-3* (0%; n=107) und *crb-1* (6%; n=50) war die Zahl der sterilen Tiere gering.

Diese Daten lassen den Schluss zu, dass eine putative Erhöhung der  $\text{IP}_3/\text{Ca}^{2+}$  Konzentration Defekte, die durch Fehllokalisierung oder reduzierte Mengen von DLG-1 und LET-413 verursacht werden, supprimieren kann. Selbst wenn ein Funktionsverlust redundant wirkender Systeme, wie dem PAR-3 Komplex oder CRB-1 vorliegt. Dies deutet auf ein weiteres System hin, welches maßgeblich an der epithelialen Integrität beteiligt sein muss.

Der Catenin-Cadherin-Komplex (CCC) setzt sich aus den Proteinen E-Cadherin, (HMR-1),  $\alpha$ -Catenin (HMP-1) und einem  $\beta$ -Catenin, (HMP-2) zusammen (Costa et al., 1998) und die Lokalisation erfolgt unabhängig von LET-413 und DLG-1 (Segbert et al., 2004; Mc Mahon et al., 2001, Köppen et al., 2001). Im *C. elegans* Embryo

führen Mutationen im CCC lediglich dazu, dass die ventralen Hypodermiszellen den Embryo während der Morphogenese nicht korrekt verschließen können, verursachen jedoch keine generellen Defekte bezüglich der epithelialen Zellpolarität und der Zelladhäsion (Costa et al., 1998, Raich et al., 1999; Bossinger et al., 2001). Wird jedoch im *C. elegans* Embryo der DAC und der CCC zusammen ausgeschaltet, kommt es zu drastischen Zelladhäsionsdefekten in den Darmzellen, was auf einen redundanten Wirkmechanismus bei der Aufrechterhaltung der Integrität hindeutet (Segbert et al., 2004). Ein postembryonaler Funktionsverlust des CCC durch *hmr-1(RNAi)* interferiert im N2 Stamm nicht mit der der CeAJ Entwicklung in der Spermatheka und die Hermaphroditen können ovulieren (Tab.4). Jedoch können die Embryonen nicht abgelegt werden, was auf Vulvafekte schließen lässt (Daten nicht gezeigt).

Die *ipp-5(sy650)* Mutante zeigt nach postembryonaler *hmr-1(RNAi)* ein verzögertes Wachstum und einige Tiere arretieren sogar in ihrer postembryonalen Entwicklung (s. Diskussion). Um den Funktionsverlust des CCC im Hinblick auf die Ovulationsdefekte auszuwerten, konnten nur die *ipp-5(sy605)* Würmer, die sich zu adulten Hermaphroditen entwickelt haben, berücksichtigt werden, was die Analyse erschwerte. Im N2 Wildtypstamm werden die Ovulationsdefekte durch *dlg-1(RNAi)* in Kombination mit *hmr-1(RNAi)* von 56% auf 94% erhöht (Tab.4). Würmer der *ipp-5(sy605)* Mutante, die nicht während der Laralentwicklungen arretierten und adult wurden, waren zu 12,6% steril. Dies stellt zwar im Vergleich zum N2 Wildtypstamm eine Verringerung der Sterilität dar, jedoch ist die Sterilität in *ipp-5* durch *dlg-1/hmr-1* im Gegensatz zu *dlg-1 RNAi* erhöht.

Um die problematische Auswertung nach *hmr-1(RNAi)* in der *ipp-5(sy605)* Mutante zu umgehen, wurde der Einfluss des CCC in *ipp-5* Embryonen untersucht. Im N2 Wildtypstamm zeigen 99% der Embryonen nach *hmr-1(RNAi)* Letalität (Tab.5), die durch morphologische Defekte der ventralen Hypodermiszellen verursacht wird (Costa et al., 1998, Raich et al., 1999). Die *ipp-5(sy605)* Mutante ist dagegen nicht fähig, diesen Phänotyp zu retten. Auch die induzierte Letalität nach gleichzeitigem Funktionsverlust von *dlg-1* und *hmr-1* (94% in N2) konnte in der *ipp-5* Mutante nicht supprimiert werden (92%; Tab.5).

Genotyp/RNAi	Ovulationdefekte %
N2 <i>dlg-1(RNAi)</i>	56 (121)
<i>ipp-5(sy605) dlg-1(RNAi)</i>	3 (62)
N2 <i>let-413/dlg-1(RNAi)</i>	100 (260)
<i>ipp-5(sy605) let-413/dlg-1(RNAi)</i>	7 (28)
N2 <i>let-413/dlg-1/par-3(RNAi)</i>	94 (18)
<i>ipp-5(sy605) let-413/dlg-1/par-3(RNAi)</i>	0 (107)
N2 <i>let-413/dlg-1/par-3/crb-1(RNAi)</i>	100 (45)
<i>ipp-5(sy605) let-413/dlg-1/par-3/crb-1(RNAi)</i>	6 (50)
N2 <i>hmr-1(RNAi)</i>	0 (45)
<i>ipp-5(sy605) hmr-1(RNAi)</i>	0 (38) #
N2 <i>dlg-1/hmr-1(RNAi)</i>	94 (50)
<i>ipp-5(sy605) dlg-1/hmr-1(RNAi)</i>	12,6 (63) #

**Tab. 4: Vergleich der ovulationsfähigen Hermaphroditen nach Mehrfach-RNAi Experimenten im Wildtyp und *ipp-5(sy605)*.**

In den Experimenten wurden mehrere Genfunktionen gleichzeitig eliminiert durch Mischung der Bakterienkulturen zu gleichen Teilen. Experimente wurden im Wildtyp und in der *ipp-5(sy605)* Mutante bei 18 °C durchgeführt. Bei der Auswertung wurde überprüft, ob die Ovulation blockiert war, oder ob Embryonen in den Uterus gelangen können. # Postembryonale *hmr-1(RNAi)* führt in der *ipp-5(sy605)* Mutante zu verzögertem Wachstum und zum Teil zu Arretierung in der Larvalentwicklung. Ausgewertet wurden demnach nur Tiere, die adult wurden.

Genotyp/RNAi	Letalität % der F1
N2 <i>hmr-1(RNAi)</i>	99 (254)
<i>ipp-5(sy605) hmr-1(RNAi)</i>	99 (381)
N2 <i>let-413/hmr-1(RNAi)</i>	100 (316)
<i>ipp-5(sy605) let-413/hmr-1(RNAi)</i>	100 (451)
N2 <i>dlg-1/hmr-1(RNAi)</i>	94 (209)
<i>ipp-5(sy605) dlg-1/hmr-1(RNAi)</i>	92 (248)

**Tab. 5: Erzeugte embryonale Letalität nach *hmr-1(RNAi)* in Kombination mit *let-413* und *dlg-1*.**

Experimente wurden bei 15 °C durchgeführt.

---

Aus den Ergebnissen, die durch die gleichzeitige Ausschaltung mehrerer epithelialer Komponenten gewonnen wurden, kann geschlossen werden, dass eine putative Erhöhung der  $IP_3/Ca^{2+}$  Konzentration einen positiven Effekt auf die Epithelzellen der *ipp-5* Mutante zur Folge hat, welcher es ermöglicht, epithiliale Defekte, die durch *let-413* und *dlg-1* RNAi induziert werden, zu supprimieren. Diese Suppression ist selbst nach zusätzlichem Funktionsverlust des PPC und CRB-1 möglich, obwohl diese Komplexe eine putativ redundante Funktion bei der wildtypischen CeAJ Entwicklung ausüben (Segbert et al., 2004; Aono et al., 2004; Totong et al., 2007). Im Gegensatz dazu, können induzierte Defekte nach Ausschaltung des CCC, nicht durch die *ipp-5* Mutation gerettet werden. Wie diese Ergebnisse interpretiert werden können, wird in der Diskussion weiter behandelt.

Wenn die Erhöhung der  $IP_3/Ca^{2+}$  Konzentration ursächlich für die beobachtete Rettung ist, dann sollte im Umkehrschluss eine Verringerung der  $IP_3/Ca^{2+}$  Konzentration zu einer Verstärkung der *let-413* und *dlg-1* RNAi Phänotypen führen. Dieser Hypothese sollte im folgenden Teil dieser Arbeit nachgegangen werden.

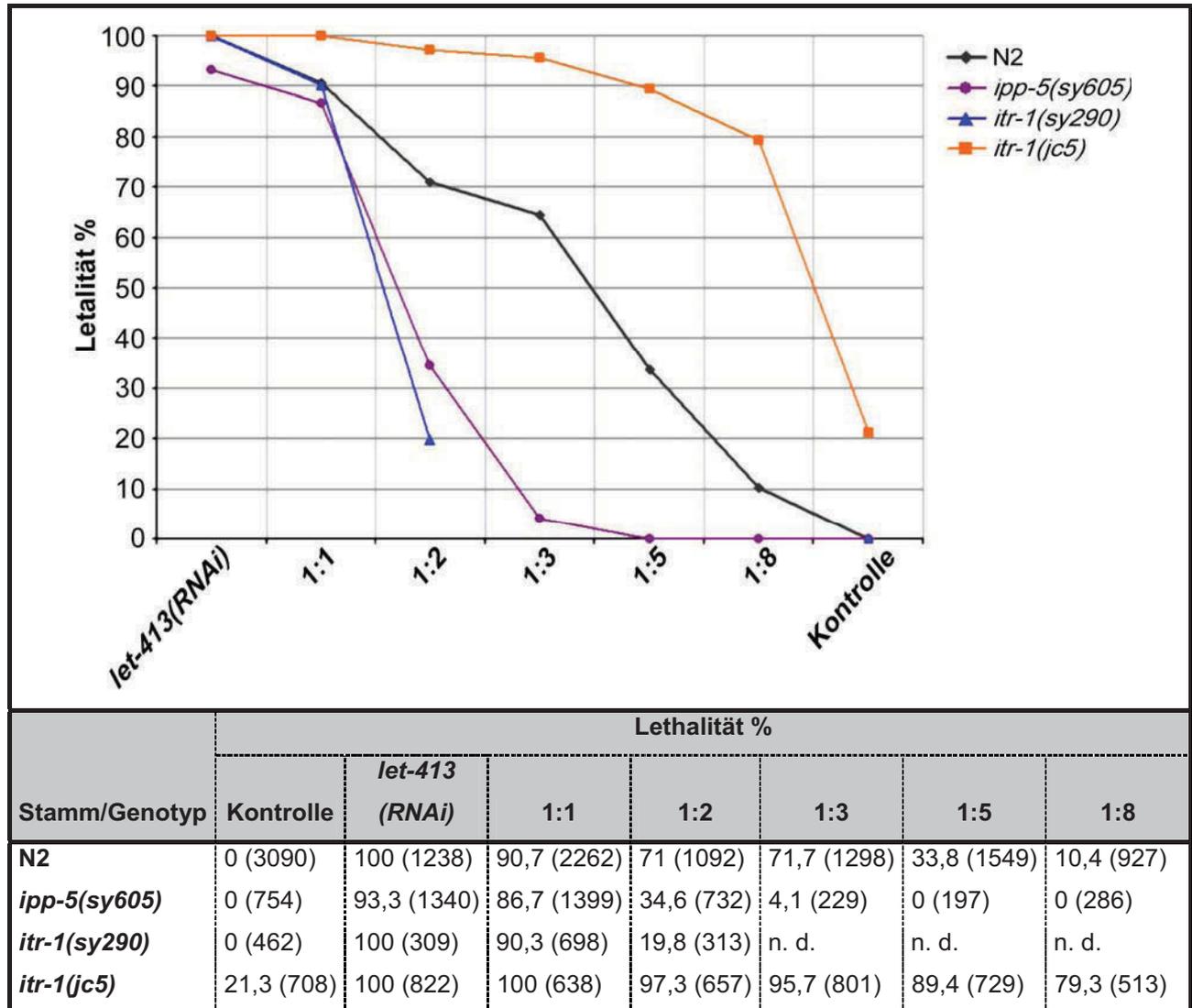
## 2.3 Ein Verlust der *itr-1* Genfunktion und die Zugabe des $\text{Ca}^{2+}$ -Chelators EGTA verstärken die *let-413* und *dlg-1* RNAi Phänotypen

### 2.3.1 Eine kältesensitive *itr-1* Mutante verstärkt den *let-413(RNAi)* Phänotyp

Um der Arbeits-Hypothese (s.o.) und der daraus resultierenden Forderung, dass im Umkehrschluss eine Verringerung der  $\text{IP}_3/\text{Ca}^{2+}$  Konzentration den *let-413(RNAi)* Phänotyp verstärken sollte, nachzugehen, wurde eine kältesensitive (ks) *itr-1(jc5)* Mutante verwendet. Ein Funktionsverlust von *itr-1* führt zu Defekten beim ventralen Schluss (Thomas-Virnig et al., 2004), wodurch die *itr-1(jc5)* Mutante bei 15 °C zu über 90% einen embryonal letalen Phänotyp zeigt. Bei 18 °C sterben nur noch 21,3% der Embryonen (s. Tab. in Graph 3), wobei wahrscheinlich davon auszugehen ist, dass der  $\text{Ca}^{2+}$  Gehalt in den Zellen zum Teil gesenkt ist, jedoch in den meisten Embryonen noch ausreicht, um den ventralen Schluss vollziehen zu können.

Dass die Effizienz der RNAi durch Verdünnung der Bakterienkulturen nachlässt (s.o.; Gönczy et al., 2000), konnte experimentell genutzt werden, um den Einfluss der *itr-1(jc5)* Mutante auf den *let-413(RNAi)* Phänotyp deutlich zu machen. Dafür wurden die *let-413* Bakterienkulturen wiederum mit den Bakterien der Kontrolle gemischt. Die Auswirkungen auf die Letalitätsraten in verschiedenen genetischen Hintergründen sind in Graph 3 dargestellt. Wenn die *let-413(RNAi)* Flüssigkulturen unverdünnt auf die Fütterungsplatten gegeben werden, dann ist die embryonale Letalität im Wildtyp und in den *itr-1(gof; sy290)*, *itr-1(ks; jc5)*, *ipp-5(lof; sy605)* Mutanten sehr hoch (über 90%). Doch je mehr die *let-413* RNAi Fütterungsbakterien verdünnt werden, desto größer sind die Differenzen in den Letalitätsraten der verschiedenen Stämme. Die Mutanten *itr-1(sy290)* und *ipp-5(sy605)* zeigen eine weitaus geringere Letalität als der N2 Wildtyp Stamm, je stärker die Verdünnung ist. Dagegen zeigte die *itr-1(jc5)* Mutante eine sehr stark erhöhte Letalität im Vergleich zum Wildtyp, die sogar bei einer Verdünnung von 1:8 noch bei ca. 80% lag, während im N2 Stamm 10% der Embryonen nicht schlüpfen konnten. Somit konnte dieser experimentelle Ansatz zeigen, dass der Rettungseffekt der Funktionszugewinn-Mutation *itr-1(sy290)*

deutlich signifikant ist und dass die kältesensitive *itr-1(jc5)* Mutante den *let-413(RNAi)* Phänotyp drastisch verstärkt.

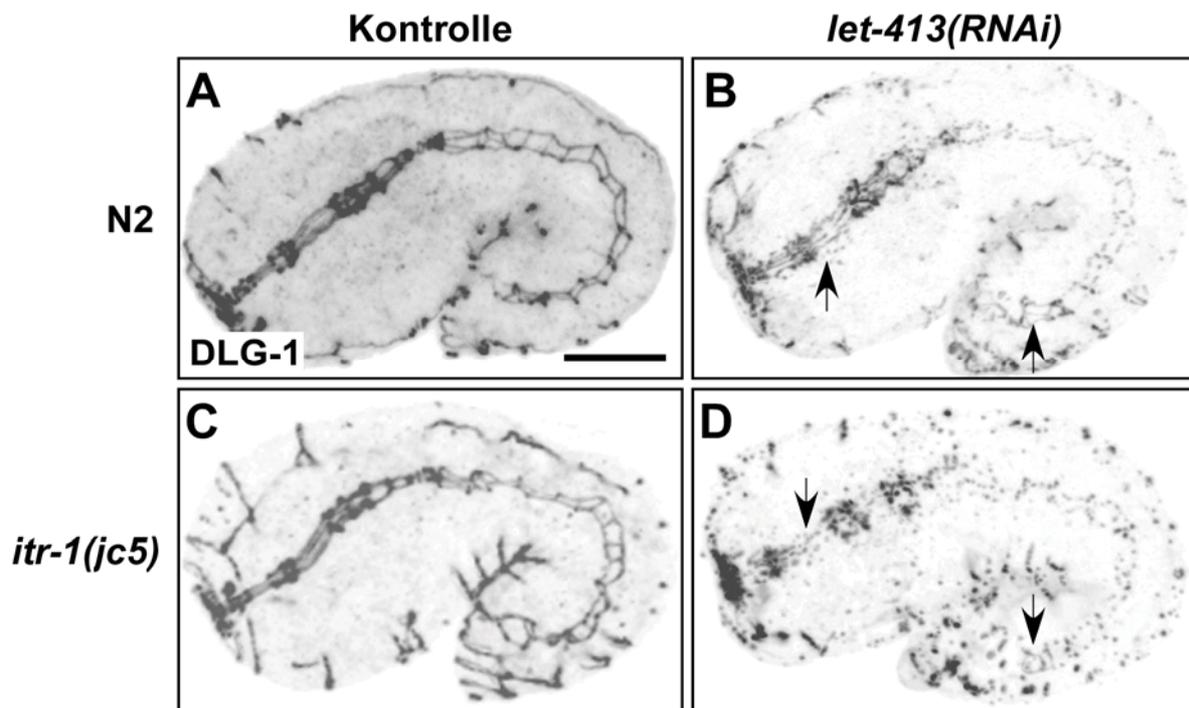


**Graph 3: Auswirkungen auf die induzierte Letalität nach Verdünnung der *let-413(RNAi)* Bakterienkulturen in unterschiedlichen genetischen Hintergründen.**

Alle Experimente wurden bei 18 °C durchgeführt. Verwendete Abkürzungen: n. d. nicht durchgeführt.

Eine Immunfluoreszenz Analyse des DLG-1 Expressionsmusters ergab keine deutlichen Unterschiede in der *itr-1(jc5)* Mutante im Vergleich zum Wildtyp (vergl. Abb.25A mit Abb.25C). Doch in *itr-1(jc5);let-413(RNAi)* Embryonen scheint das Muster in den Bereichen des Pharynx und des Hinterdarms stärker punktiert zu sein als im Wildtyp (Abb.25B;25D; Pfeile). Im Wildtyp sind dies die Epithelien, die

schwächere CeAJ Defekte zeigen (Abb.25B), da Pharynx und der Hinterdarm nicht so sensitiv für *let-413* und *dlg-1* RNAi sind. Dies deutet darauf hin, dass die Epithelien in *itr-1(jc5)* im Vergleich zum Wildtyp stärkere Defekte nach *let-413(RNAi)* zeigen.



**Abb. 25: Immunfluoreszenz Dokumentation des CeAJ Musters in Embryonen der *itr-1(jc5)* Mutante.**

(A) Im Wildtyp lokalisiert DLG-1 in der CeAJ und zeigt ein Strickleiter-ähnliches Muster im Darmepithel. (B) in *let-413(RNAi)* Embryonen ist das detektierte DLG-1 Signal in Darm und Hypodermis stark punktiert und ist lediglich im Pharynx und Hinterdarm (Pfeile) kontinuierlich zu erkennen. (C) In der Kontrolle der *itr-1(jc5)* Mutante ist das Expressionsmuster von DLG-1 wie im Wildtyp zu detektieren. (D) In *itr-1(jc5) let-413(RNAi)* Embryonen ist im Darm, der Hypodermis und darüber hinaus auch in Pharynx und Hinterdarm (Pfeile) das DLG-1 Fluoreszenzsignal punktiert. Orientierung: Anterior links, dorsal oben. Eichstrich 10  $\mu$ m.

### 2.3.2 RNAi gegen *itr-1* interferiert mit der DLG-1 Expression

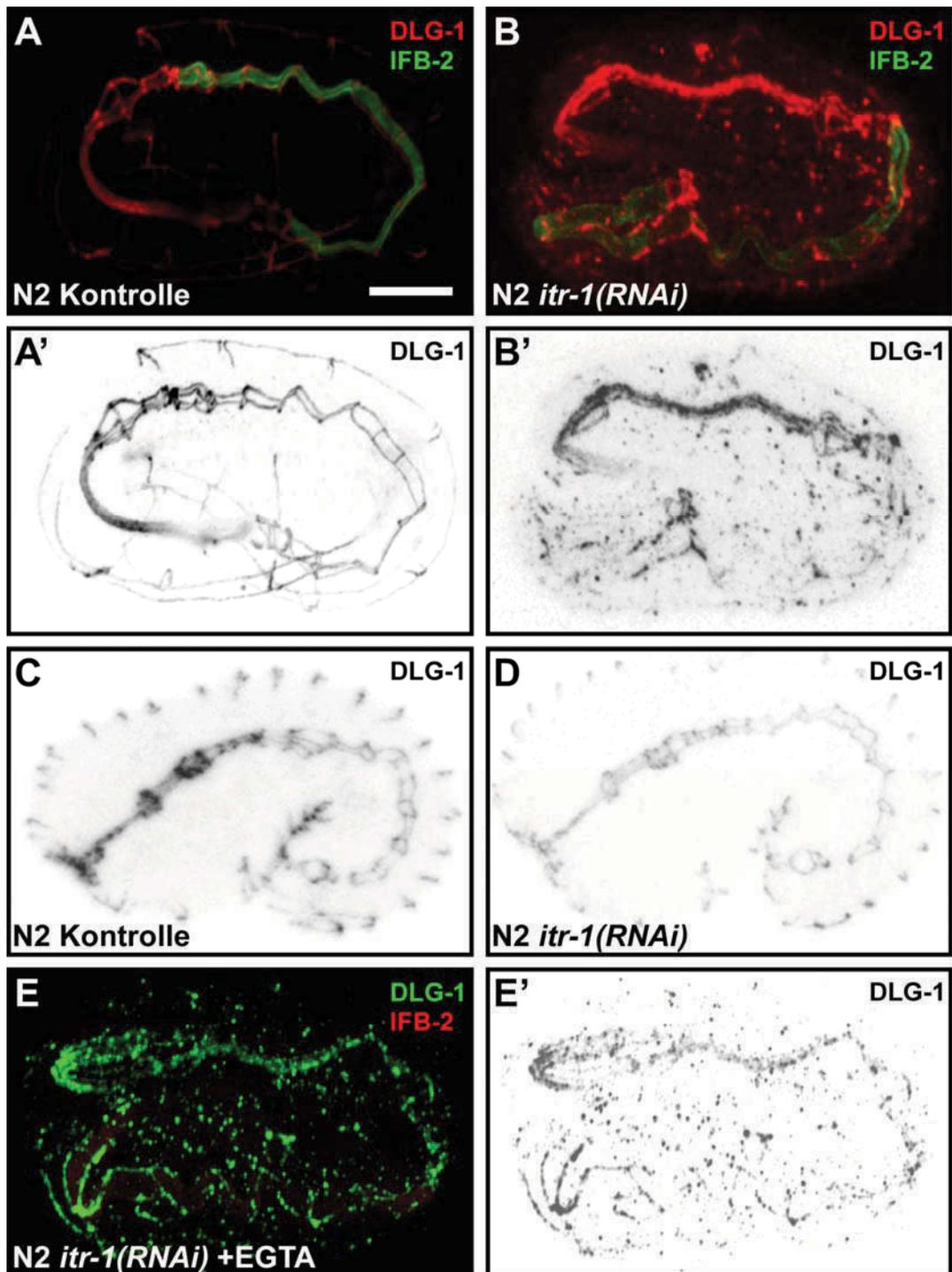
Um die Auswirkung einer putativen Verringerung in der  $IP_3/Ca^{2+}$  Konzentration im Hinblick auf die CeAJ Entwicklung zu analysieren, wurde die DLG-1 Expression in *itr-1(RNAi)* Embryonen dokumentiert. Einige Embryonen sterben dabei an Defekten

beim ventralen Schluss (Thomas-Virnig et al., 2004; N2 14% (n=481); *ipp-5(sy605)* 9% (n=355)). Doch bei der Immunfluoreszenzanalyse fiel auf, dass das DLG-1 Fluoreszenzsignal im Darm schwächer war. Um auszuschließen, dass lediglich eine schlechtere histologische Immunreaktion ursächlich für die schwache DLG-1 Färbung war, wurde die Färbung mehrfach wiederholt. Wie auf Abb.26D zu sehen ist, zeigten viele *itr-1(RNAi)* Embryonen ein deutlich schwächeres DLG-1 Muster im Vergleich zur Kontrolle (Abb.26C). Überraschender Weise war in seltenen Fällen ein stark punktiertes CeAJ Muster, ähnlich wie in nach einem *dlg-1* Funktionsverlust, zu beobachten (ca. 2%; Abb.26B). Eine Steigerung der Häufigkeit dieses Phänotyps wurde erzielt, wenn dem Plattenmedium EGTA hinzu gegeben wurde (Abb.26E), womit wir zum nächsten experimentellen Ansatz kommen.

### **2.3.3 Die Zugabe von EGTA verstärkt die durch *let-413* und *dlg-1* RNAi induzierte Letalität**

Um negativen Einfluss auf die  $IP_3/Ca^{2+}$  Konzentration zu nehmen, gibt es eine Reihe pharmakologischer Substanzen. Meist ist es nötig die embryonalen Hüllen mit Hilfe von Laserperforation zu penetrieren, um die Substanzen ins Innere des Embryos zu bringen. Da im Rahmen dieser Arbeit die dafür nötige Apparatur leider nicht zur Verfügung stand, wurde in das Medium der Bakterienplatten ein  $Ca^{2+}$ -Chelator gegeben. Dieser sollte dann über die Bakterien von den Würmern aufgenommen werden und in die Oozyten und somit auch in die Embryonen gelangen.

Die Zugabe des  $Ca^{2+}$ -Chelators EGTA (=Ethylenglykol-bis(aminoethylether)-N,N,N'N'-Tetraessigsäure) erfolgte mit einer Endkonzentration von 20 mM im Plattenmedium. Das EGTA wurde über die Bakterien von den Würmern aufgenommen, was postembryonal in N2 zu Sterilität führte. Würmer der *ipp-5(sy605)* Mutante zeigten darüber hinaus Wachstumsdefekte, ähnlich wie nach *hmr-1(RNAi)* (s.o.) und wurden ebenfalls steril (n>50). Daher wurde die embryonale Letalität nach *let-413* und *dlg-1* RNAi mit und ohne EGTA Zusatz experimentell ermittelt. Die Ergebnisse dazu sind in Tab.6 dargestellt.



**Abb. 26: Immunfluoreszenz Dokumentation nach *itr-1(RNAi)*.**

(A) Kontrolle mit einer Antikörperfärbung gegen DLG-1 und IFB-2. (B) Ca 2-3% der Embryonen zeigen nach *itr-1(RNAi)* ein punktiertes CeAJ Muster. Bei ca. 40-50% der gefärbten Embryonen ist eine schwache DLG-1 Färbung zu sehen (D). Im Vergleich dazu die Kontrolle mit denselben Kameraeinstellungen (C). Wird zusätzlich 20 mM EGTA bei den RNAi Fütterungsplatten hinzugegeben, dann ist das punktierte CeAJ Muster sehr häufig zu beobachten. Orientierung: Anterior links, dorsal oben. Eichstrich 10  $\mu$ m.

RNAi ± EGTA	Letalität %	
	N2	<i>ipp-5(sy605)</i>
Kontrolle - EGTA	0 (>2000)	0 (>1500)
Kontrolle + EGTA	0 (>2000)	0 (>1400)
<i>let-413(RNAi)</i> 1:2 - EGTA	74,1 (3847)	57,3 (2406)
<i>let-413(RNAi)</i> 1:2 + EGTA	90,5 (3599)	75,7 (2752)
<i>dlg-1(RNAi)</i> 1:1 - EGTA	74,5 (2479)	47,8 (3219)
<i>dlg-1(RNAi)</i> 1:1 + EGTA	97,0 (1847)	61,7 (1482)

Tab. 6: Letalitätsraten nach embryonaler *let-413* und *dlg-1* RNAi mit und ohne Zugabe von 20 mM EGTA bei 18 °C.

Anhand der Zahlen in Tab.6 ist zu erkennen, dass der Zusatz von EGTA in N2 und in *ipp-5(sy605)* zu einer höheren *let-413* und *dlg-1* induzierten Letalität führt. Demnach scheint eine Reduzierung der  $Ca^{2+}$  Konzentration in den embryonalen Zellen dazu zu führen, dass die Embryonen anfälliger für die durch *let-413* und *dlg-1* RNAi induzierten Defekte sind. Allerdings zeigt die *ipp-5* Mutante immer eine geringere Letalität als der N2 Wildtypstamm. So beträgt z.B. die durch *let-413(RNAi)* induzierte Letalität mit EGTA in *ipp-5(sy605)* 76%, gegenüber 91% in N2. Demnach könnte die putative  $IP_3$  Konzentrationserhöhung in der *ipp-5(sy605)* Mutante nicht nur eine Erhöhung des interzellulären  $Ca^{2+}$  Gehalts zur Folge haben, sondern selbst zur Rettung des *let-413* und *dlg-1* RNAi Phänotyps beitragen. Da die  $IP_3$  Konzentration nicht direkt durch einen  $Ca^{2+}$ -Chelator beeinflusst wird, könnte das  $IP_3$  Molekül auf andere Effektoren in der Zelle wirken, die die Rettung vermitteln (s. Diskussion). Eine andere Möglichkeit ist, dass die  $Ca^{2+}$  Konzentration in der *ipp-5(sy605)* nach Zugabe von EGTA noch immer höher als im Wildtyp ist.

Die Zugabe von EGTA bei gleichzeitigem Funktionsverlust von *itr-1* führt zu einem diskontinuierlichen junktionalen DLG-1 Muster (s. Abb.26E) und deutet auf eine Beteiligung eines  $Ca^{2+}$ -abhängigen Effektors bei der CeAJ Entwicklung hin (s. Diskussion).

## 2.4 Identifikation von *let-413* Suppressoren durch einen EMS-Mutagenese-Screen

Die Tatsache, dass die durch *let-413* und *dlg-1* RNAi induzierten Phänotypen in *C. elegans* Epithelien sowohl postembryonal als auch embryonal durch eine *ipp-5(lop)* und *itr-1(gof)* Mutation gerettet werden kann, hat dazu geführt, in einem Pilot-Screen nach weiteren *let-413* Suppressoren zu suchen. Ein Mutagenese Screen ist ein experimenteller Ansatz der klassischen Genetik, der hier verwendet wurde um Regulationsmechanismen aufzudecken, die z.B. einen Einfluss auf die CeAJ Bildung ausüben. Ein Suppressor Screen ist eine Methode um Komponenten zu identifizieren, die in demselben genetischen Signalweg agieren, und gehört zu den sogenannten „modifier“ Screens. Dies kann ein „enhancer“- oder, wie hier durchgeführt, ein „suppressor“-Screen sein (Jorgensen und Mango, 2002; Dickson et al., 1992; Simon et al., 1991; Sternberg et al., 1993). Ausgangspunkt eines solchen Screens kann entweder eine Mutante mit einem deutlichen Phänotyp oder ein RNAi-induzierter Phänotyp sein. Nach chemischer Mutagenese wird dann nach „*second site*“ Mutationen gesucht, die den ursprünglichen mutanten Phänotyp entweder verstärken („enhancer“) oder abschwächen (Suppressor). Typischerweise erfassen „enhancer“-Screens viel mehr Mutanten als Suppressor-Screens, da viele Gene einen mutanten Phänotyp verstärken können, aber nur Mutationen in wenigen Schlüsselproteinen einen mutanten Phänotyp supprimieren können.

Aus folgenden Gründen sollten zunächst Suppressoren identifiziert werden, die den *let-413(RNAi)* induzierten Phänotyp retten können und nicht z.B. den *dlg-1(RNAi)* Phänotyp. Zum einen führt die postembryonale Herunterregulierung der Genfunktion von *let-413*, aber nicht die von *dlg-1*, zu 100%iger Sterilität (s.o. Graph 1). Dies ist somit ein hervorragender Phänotyp, um nach chemischer Mutagenese in der F2-Generation nach Tieren zu suchen, die Embryonen im Uterus tragen. Das Erkennen der fertilen Tiere stellt dabei einen leicht zu identifizierenden Marker dar, was die Untersuchung vieler Tiere erlaubt.

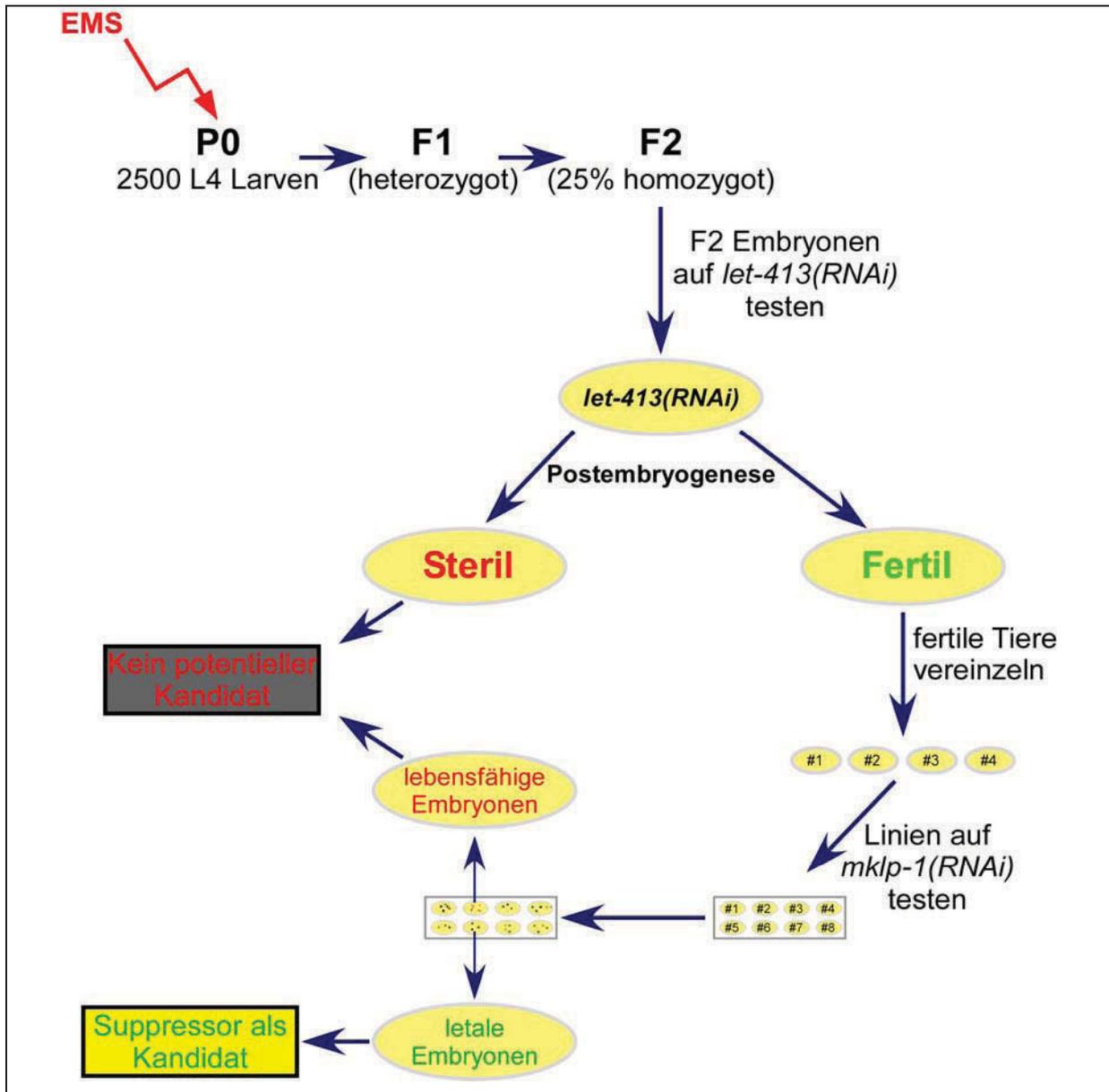
Des Weiteren ist wahrscheinlich davon auszugehen, dass putative *let-413* Suppressoren auch den *dlg-1* RNAi induzierten Phänotyp retten können. Dies trifft für die beiden bereits bekannten Suppressoren *ipp-5(sy506)* und *itr-1(sy290)* zu (s.o. Graph 2). Außerdem stehen LET-413 und DLG-1 in einer engen funktionellen Beziehung, was die Ausbildung der interzellulären Kontaktstruktur in *C. elegans*

Epithelien betrifft. Mit Hilfe des Screens wäre es auch möglich Erkenntnisse über mögliche Effektoren von  $IP_3/Ca^{2+}$  Molekülen zu gewinnen und somit den Mechanismus, der die Rettung in den *ipp-5* und *itr-1* Mutanten vermittelt, aufzudecken.

Da der Screen nur von mir durchgeführt wurde, war die Planung und Design des Screens sehr wichtig, damit rechtzeitig ausreichende Mengen von Platten, Medien und sonstigen Materialien, neben der passenden Zeitplanung, vorhanden waren (Abb.27).

Die Ergebnisse des Screens sind in Tab.7 zur Übersicht zusammengestellt. Nach der Mutagenese von ca. 5000 haploiden Genomen (ca. 2500 L4er) wurden in etwa 6000 F2-Tiere nach postembryonaler *let-413(RNAi)* auf Fertilität hin untersucht. Dabei wurden 134 fertile Tiere vereinzelt um die potentiellen #Screen Linien (s. Anhang 8.2.12) zu erhalten, die zunächst nach embryonaler *mklp-1(RNAi)* im Hinblick auf RNAi Sensitivität geprüft wurden. Ein Funktionsverlust von *mklp-1* („mitotic kinesin-like protein“ oder auch *zen-4* „zygotic epidermal enclosure defective“ genannt) führt bereits während der ersten Zellteilung Zytokinesedefekte (Powers et al., 1998; Raich et al., 1998). Bei diesem Kontroll-Screen wurden 8 Linien aussortiert, da diese lebensfähige *mklp-1(RNAi)* Nachkommen produzierten. Von den verbliebenen 126 Linien konnten 42 potentielle Kandidaten nicht als Linie gehalten werden, da diese Tiere Letalität zeigten. Wie diese Letalität zu Stande kam, kann verschiedene Ursachen haben. So ist es möglich, dass der putative *let-413* Suppressor letal wirkt, wenn dieser keinem Funktionsverlust von *let-413* ausgesetzt ist, oder die # Linie trug eine maternal letale wirkende Mutation.

Nachdem die verbliebenen Linien wiederholt auf *let-413(RNAi)* Fütterungsplatten gesetzt und auf Fertilität hin untersucht wurden, konnten die meisten Linien die Rettung des *let-413(RNAi)* Phänotyps nicht reproduzieren. Um die verbliebenen Suppressoren von anderen Screen Ergebnissen unterscheiden zu können, wurden, die Linien umbenannt (Tab.8). Insgesamt konnten mit Hilfe des Screens 4 Mutanten gefunden werden (*dus8-11*; s.u.), welche die durch postembryonale *let-413(RNAi)* induzierten Defekte in der Spermatheka retten konnten.



**Abb. 27: Übersicht und Zeitplan des EMS-Mutagenese Screens.**

Mindestens 2500 L4-Larven werden mit EMS behandelt. Die F2 zeigt dann homozygote Mutanten. Daher werden mindestens 6000 F2 Embryonen auf *let-413(RNAi)* Platten verteilt und nach Fertilität hin untersucht. Fertile Tiere werden vereinzelt, um Suppressor Linien zu erhalten. Diese Linien müssen schließlich auf RNAi-Sensitivität hin überprüft werden, um RNAi-Mutanten als uninteressante Kandidaten ausschließen zu können. Der Zeitplan des Screens sieht demnach folgendermaßen aus:

- |            |   |
|------------|---|
| Tag 1:     | - Die Mutagenese von L4-Larven findet im Reaktionsgefäß bei RT für 4 h statt.   |
|            | - Die mutagenisierten Würmer werden für 2 h bei RT auf große Platten gesetzt.   |
|            | - Im Anschluss werden jeweils 10-15 mutagenisierte Tiere für 6 h zur Ablage der Embryonen (=F1) auf neue große Platten gesetzt (Haltung bei 25 °C).                                   |
| Tag 4:     | - Die F1 Generation wird adult und beginnt die F2 zu produzieren.   |
|            | - Die adulten F1 Tiere und frisch geschlüpfte L1-Larven der F2 Generation werden von den Platten waschen, so dass nur noch Embryonen zurückbleiben.                                   |
| Tag 5:     | - Die F2 Larven werden auf <i>let-413(RNAi)</i> Fütterungsplatten verteilt.   |
| Tag 7-8:   | - Die RNAi Platten nach fertilen Tieren durchsuchen und dabei fertile Tiere auf kleinen Platten vereinzeln (#Screen-Linien).  |
| Tag 9:     | - Jeweils 5 L4-Larven der erhaltenen Linien auf 24er Mikrotiterplatten mit <i>mkpl-1(RNAi)</i> Fütterungsbakterien setzen. Dabei jede zweite Reihe der Mikrotiterplatten frei lassen. |
| Tag 10:    | - Die adulten Tiere der #Screen Linien auf den Mikrotiterplatten auf die zuvor freigelassenen Felder frisch umsetzen.   |
| Tag 11:    | - Die Mikrotiterplatten werden im Hinblick auf RNAi Sensitivität durchsucht, d.h. #Screen Linien, die lebensfähige Embryonen produzieren, werden verworfen.                           |
| Ab Tag 12: | - Im Anschluss daran findet die Aufzucht der #Screen Linien und die Wiederholung des Screens bei unterschiedlichen Temperaturen statt.  |

Eine Linie fiel zunächst im Screen als *let-413(RNAi)* verstärkende Mutante auf. Auch wenn während des Screens nicht gezielt nach „enhancer“ Mutanten gesucht wurde, wurden jedoch 4 Linien, deren Spermatheken sehr stark geschädigt aussahen, gefunden. Diese Linien wurden ohne weitere Untersuchungen eingefroren, um ggf. später mit diesen zu arbeiten. Eine dieser verstärkenden Linien zeigte jedoch bei niedrigen Temperaturen eine gute Rettung des *let-413(RNAi)* Phänotyps.

Zusammenfassung der Ergebnisse des <i>let-413(RNAi)</i> Suppressor Screens			
P0	Mutagenese von ca. 2500 Hermaphroditen (5000 Genomen)		
F2	Ca. 6000 F2 Hermaphroditen wurden nach postembryonaler <i>let-413(RNAi)</i> auf Fertilität hin untersucht		
	134 #Screen Linien wurden vereinzelt		
	8 #Screen Linien zeigten RNAi Insensitivität nach <i>mklp-1(RNAi)</i>		42 #Screen Linien waren letal
F3/F4	Die verbliebenen 84 #Screen Linien wurden erneut nach <i>let-413(RNAi)</i> auf Fertilität hin getestet		
	4 potentielle Suppressoren	3 potentielle „Enhancer“	77 #Screen Linie konnten die Supprimierung des <i>let-413(RNAi)</i> Phänotyps nicht reproduzieren

**Tab. 7: Zusammenfassung der Ergebnisse des Screens.**

Siehe dazu auch die detaillierte Tabelle im Anhang.

Umbenennung der gefundenen Suppressor-Linien	
Bezeichnung im Screen	Spätere Bezeichnung
#79	<i>dus8</i>
#82	<i>dus9</i>
#28	<i>dus10</i>
#44	<i>dus11</i>

**Tab. 8: Allelbezeichnung der gefundenen Suppressor Linien.**

Die vier gefundenen Linien aus dem Pilot *let-413*-Suppressor Screen wurden mit *dus8-11* als Allelbezeichnungen unbenannt, um eine Verwechslung mit Linien aus anderen Screens zu vermeiden.

Um die Stärke der Suppression quantitativ im Embryo zu untersuchen, wurden die Linien zunächst auf 18 °C gehalten und herangezogen. Die RNAi Experimente wurden dann, nachdem die L4-Hermaphroditen auf die RNAi Fütterungsplatten gesetzt wurden, auf 18 °C weiter gehalten, bzw. auf 15 °C oder 25 °C umgesetzt. Damit sollte herausgefunden werden, ob die Stärke der Suppression temperaturabhängig ist. So kann eine phänotypische Ausprägung eine Temperaturabhängigkeit zeigen, z.B. wenn ein Prozess eher Defekte zeigt, wenn er durch eine höhere Temperatur schneller abläuft. Demnach kann auch ein Rettungseffekt bei verschiedenen Temperaturen unterschiedlich stark wirken.

Die gefundenen Suppressoren sollten im Hinblick auf die Suppression anderer epithelialer Defekte getestet werden. Daher wurde untersucht ob *let-413*, *dlg-1*, *hmp-1*, *par-3* und *par-6* RNAi gerettet werden können. Um die potentiellen Suppressoren im Hinblick auf die RNAi Sensitivität zu prüfen, wurden *mklp-1* und *cyb-3* gewählt, da beide im Wildtyp einen starken embryonal letalen Phänotyp zeigen. CYB-3 ist ein Cyklin B und für die korrekte Trennung der Schwesterchromatiden bei der Mitose verantwortlich (van den Heuvel, 2005).

Die Ergebnisse der RNAi Experimente bei unterschiedlichen Temperaturen sind in Tab.9 aufgeführt. Dabei stellte sich heraus, dass die Suppression der *let-413* und *dlg-1* Phänotypen durch die Stämme *dus8* und *dus9* im Vergleich zu *dus10* und *dus11* um ein Vielfaches geringer war, sodass nur die beiden letzteren Stämme auch gegen *hmp-1*, *par-3* und *par-6* getestet wurden. Es bleibt festzuhalten, dass die Temperatur eine Auswirkung auf die Rettung hat. So konnte für jede Linie und für jedes ausgeschaltete Gen die Temperatur gefunden werden, bei der die Rettung am stärksten ausgeprägt wird. Bei den RNAi Experimenten, in denen der induzierte Phänotyp supprimiert werden kann, zeigen die Stämme bei 18 °C die stärkste Suppression (s. Tab.9). Erstaunlicherweise ist es in *dus10* und *dus11* auch möglich, die *par-3* und *par-6(RNAi)* Phänotypen zu retten. Da in *dus10* nach *cyb-3(RNAi)* nicht die erwartete Letalität auftrat, kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Mutante eine temperaturabhängige RNAi Insensitivität aufweist (s. Diskussion).

Die Linie, die im Screen zunächst durch eine *let-413(RNAi)* Phänotyp-Verstärkung bei 25 °C aufgefallen ist, stellt sich nach weiteren Analysen als die Mutante mit der besten Suppression verschiedener epithelialer Defekte heraus (s. Tab.9 *dus11*). Das könnte darauf hindeuten, dass der Suppressor bei 25 °C nicht wirkt.

Linien von 18 °C		Letalität % (n)				
RNAi	Temp.	N2	<i>dus8</i>	<i>dus9</i>	<i>dus10</i>	<i>dus11</i>
Kontrolle	25 °C	0,0 (1561)	0,0 (320)	1,1 (417)	0,1 (1134)	6,3 (986)
	18 °C	0,0 (1572)	0,0 (456)	0,0 (519)	0,8 (1066)	0,0 (751)
	15 °C	0,0 (320)	0,0 (360)	0,6 (717)	1,1 (417)	1,4 (163)
<i>let-413</i>	25 °C	100,0 (851)	100,0 (571)	100,0 (707)	66,4 (630)	100,0 (1255)
	18 °C	99,5 (1787)	99,4 (1366)	87,8 (1465)	25,4 (1715)	63,3 (1798)
	15 °C	97,8 (904)	100,0 (880)	98,3 (1134)	55,0 (749)	76,2 (486)
<i>dlg-1</i>	25 °C	98,4 (1193)	92,8 (432)	100,0 (251)	99,9 (1094)	100,0 (1101)
	18 °C	97,5 (1365)	100,0 (688)	90,5 (718)	1,4 (1643)	48,3 (1474)
	15 °C	99,9 (1300)	99,5 (402)	97,1 (307)	13,6 (1396)	76,3 (1227)
<i>hmp-1</i>	25 °C	93,7 (538)	96,6 (261)	82,3 (277)	4,5 (490)	96,9 (583)
	18 °C	96,9 (1058)	100,0 (270)	100,0 (315)	65,0 (448)	47,4 (389)
	15 °C	98,5 (607)	100,0 (144)	100,0 (315)	46,3 (142)	50,8 (100)
<i>par-6</i>	25 °C	98,7 (456)	n. d.	n. d.	83,5 (682)	39,9 (351)
	18 °C	99,6 (516)	n. d.	n. d.	48,9 (266)	5,3 (196)
	15 °C	100,0 (385)	n. d.	n. d.	63,0 (438)	72,1 (414)
<i>par-3</i>	25 °C	99,9 (915)	n. d.	n. d.	80,2 (614)	29,1 (231)
	18 °C	100,0 (944)	n. d.	n. d.	29,6 (1039)	31,4 (635)
	15 °C	96,1 (550)	n. d.	n. d.	53,2 (660)	36,9 (376)
<i>cyb-3</i>	25 °C	100,0 (1710)	n. d.	n. d.	98,2 (1387)	100,0 (634)
	18 °C	97,4 (1485)	n. d.	n. d.	56,9 (1503)	95,0 (960)
	15 °C	94,5 (1218)	n. d.	n. d.	46,5 (994)	100,0 (992)
<i>mklp-1</i>	25 °C	100,0 (1163)	100,0 (325)	100,0 (332)	100,0 (424)	100,0 (414)
	18 °C	100,0 (1025)	100,0 (477)	100,0 (481)	100,0 (889)	100,0 (780)
	15 °C	100,0 (708)	100,0 (527)	100,0 (282)	94,0 (947)	100,0 (627)

**Tab. 9: Quantitative Auswertung der Suppression verschiedener RNAi Phänotypen in Abhängigkeit von der Temperatur.**

Die Linien wurden bei 18 °C gehalten und gezüchtet. Mit Beginn des Experiments wurden die RNAi Fütterungsplatten dann entweder auf 18 °C weiter gehalten oder auf 15, bzw. 25 °C umgestellt (=Temperaturshift).

### 3 Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die postembryonale Funktion von *let-413* und *dlg-1* in der Spermatheka untersucht. Dabei wurde die Spermatheka als Modellsystem für die Untersuchung der Epithelentwicklung etabliert, wodurch neue Erkenntnisse über die Epithelentwicklung gewonnen werden konnten (Teil I Diskussion). So war erstmalig möglich *in vivo* einen Einfluss des  $IP_3/Ca^{2+}$  Signalwegs auf die Entwicklung der interzellulären Kontaktstrukturen in Epithelzellen von *C. elegans* nachzuweisen. Durch eine putative Erhöhung der intrazellulären  $IP_3/Ca^{2+}$  Konzentration ist es möglich epitheliale Defekte, die durch *let-413* und *dlg-1* RNAi induziert werden zu retten (Teil II Diskussion). In Teil III der Diskussion werden denkbare  $IP_3/Ca^{2+}$  Effektoren und ein mögliches Arbeitsmodell erörtert (Abb.28). Um den molekularen Wirkmechanismus der *let-413* und *dlg-1* Genfunktion endgültig aufzuklären, wurde im Rahmen dieser Arbeit ein *let-413* Suppressor Screen durchgeführt, dessen Ergebnisse in Teil IV diskutiert werden.

#### 3.1 Die Spermatheka als Modellsystem für die Untersuchung der Epithelentwicklung in *C. elegans*

Die Spermatheka ist ein exzellentes Modellsystem für die Analyse der Epithelentwicklung und bietet gegenüber dem embryonal etablierten Darmepithel entscheidende Vorteile. So ist durch postembryonale RNAi die explizite Untersuchung von Genfunktionen während der Epithelentwicklung der Spermatheka möglich, selbst wenn das Gen früh während der Embryonalentwicklung eine essentielle Rolle spielt (Aono et al., 2004; Pilipiuk et al., 2009). Darüber hinaus ist die Dokumentation der Spermatheka mittels Fluoreszenzmarker *in vivo* möglich, ohne das zu untersuchende Tier durch die Präparation fixieren zu müssen (Abb.7). Die Etablierung der Spermatheka als Modellsystem ermöglichte einen einfachen Mutagenese Screen, bei dem Suppressoren der *let-413* Genfunktion identifiziert wurden, da Sterilität, wie sie durch *let-413(RNAi)* induziert wird, ein leicht identifizierbarer Marker darstellt, der mit Hilfe eines Binokulars schnell zu erkennen ist. Somit war es möglich im Laufe eines Tages ca. 6000 adulte *let-413(RNAi)*

Hermaphroditen nach Suppression der Sterilitätsdefekte zu durchsuchen, da die fertilen Tiere schnell gefunden und vereinzelt werden konnten (s. Abs. 3.4.).

Ein postembryonaler Funktionsverlust von *let-413* und *dlg-1* interferiert nicht mit der Zellpolarität in embryonal angelegten Epithelien, wie Darm, Pharynx oder Hypodermis (s. 2.1.1). Lediglich in larval etablierten Epithelien, wie z.B. in der Spermatheka, dem Uterus und der Vulva, sind nach postembryonaler *let-413* und *dlg-1* RNAi Defekte zu beobachten, wobei jedoch auf die zuletzt genannten Epithelien, im Rahmen dieser Arbeit nicht näher eingegangen wurde. So sind in *let-413(RNAi)* Spermatheken laterale Zell-Kontakte nicht mehr als elektronendichte Strukturen auf Elektronen-mikroskopischer Ebene zu detektieren (Abb.17). Nach *let-413(RNAi)* ist sowohl der DAC als auch PAR-3 in der Spermatheka fehllokalisiert (Abb.14F-H). Dagegen interferiert *dlg-1(RNAi)* nicht mit der korrekten PAR-3 Lokalisation an der apikalen Membran, führt jedoch zu einer Fehllokalisierung von AJM-1 (Abb.14K,L). Daraus ergibt sich ein einfaches Model in dem LET-413 für die Lokalisierung von PAR-3 und DLG-1 und damit auch für die von AJM-1 zuständig ist. Somit sind die Erkenntnisse die durch die induzierten *let-413* und *dlg-1* RNAi Phänotypen in der Spermatheka gewonnen wurden, konform mit dem was aus embryonalen Epithelien bekannt ist, was die Eignung der Spermatheka als Modellsystem bestätigt.

In anderen Modellorganismen, wie *Drosophila*, wurden Erkenntnisse, die im Hinblick auf die Epithelentwicklung im Embryo gewonnen wurden, in postembryonal etablierten Epithelien ebenfalls bestätigt und durch weiterführende Analysen, wie z.B. durch Funktionsanalysen des Crumbs-Komplex in den Photorezeptorzellen, differenzierter aufgeklärt (Bulgakova und Knust, 2009; Bazellieres et al., 2009; Berger et al., 2007). Auch die Untersuchung der planaren Zellpolarität erfolgt sowohl in embryonalen Epithelien, z.B. bei der Entwicklung des Neuralrohrs im Zebrafisch, als auch in postembryonalen Geweben und Organen, wie z.B. Flügel und Ovarien von *Drosophila* (Wu und Mlodzik, 2009; Viktorinová et al., 2009; Jenny und Mlodzik, 2006). Daher sind Untersuchungen der Epithelentwicklung in der larval etablierten Spermatheka von *C. elegans* exzellent um neue Erkenntnisse zu den grundlegenden Wirkmechanismen bei der CeAJ Entwicklung zu gewinnen.

Es war jedoch nicht möglich in der Spermatheka Defekte durch postembryonale *let-413* und *dlg-1* RNAi zu verursachen, wenn die Spermatheka bereits entwickelt war.

Die RNAi musste spätestens im L3-Larvenstadium einsetzen, damit Polaritätsdefekte in der Spermatheka sichtbar wurden (Daten nicht gezeigt). Demnach spielt die Genfunktion von *let-413* und *dlg-1* nur während der Etablierung der CeAJ eine essentielle Rolle, denn danach scheint ein Funktionsverlust von *let-413* und *dlg-1* keine junctionalen Defekte zu verursachen. Dies deutet auf andere, zum Teil redundant, wirkende Systeme hin, die für die Aufrechterhaltung der Zellpolarität zuständig sind.

Diese Systeme könnten den Ergebnissen dieser Arbeit zufolge, durch einen  $IP_3/Ca^{2+}$  Signalweg beeinflusst werden, denn sowohl die embryonalen, als auch die postembryonalen *let-413* und *dlg-1* RNAi Phänotypen lassen sich durch Mutationen in den *ipp-5* und *itr-1* Genen, welche mutmaßlich die  $IP_3/Ca^{2+}$  Konzentration erhöhen, abschwächen und sogar retten.

### 3.2 Kompensation *let-413* und *dlg-1* RNAi induzierter Defekte durch $IP_3/Ca^{2+}$ Signale

Die Analyse des EGF-Signalweges, der die Ovulation mittels  $IP_3/Ca^{2+}$  Signale steuert, deckte die Supprimierung der *let-413* und *dlg-1* RNAi induzierten epithelialen Phänotypen auf. Die Signalkaskade führt zu einer Hydrolyse von  $PIP_2$  durch eine Phospholipase C (PLC) zu zytosolisches  $IP_3$  und DAG. Der sekundäre Signalvermittler  $IP_3$  bindet dann an den 1,4,5-Triphosphat Rezeptor ( $IP_3R$ ; ITR-1) wodurch eine  $Ca^{2+}$  Ausschüttung aus dem ER erfolgt und die nötigen Kontraktionen stimuliert (s. Abb.6; Bui und Sternberg, 2002; Clandinin et al., 1998; Yin et al., 2004). Es konnte festgestellt werden, dass eine Funktionsverlust Mutation in *ipp-5(lop)* und ein Funktionszugewinn-Mutation in *itr-1(gof)* die durch *let-413* und *dlg-1* RNAi induzierten Phänotypen supprimieren. IPP-5 ist eine Typ I 5-Phosphatase und dephosphoryliert  $IP_3$  zu  $IP_2$  und wirkt somit antagonistisch in dem Signalweg. Dadurch kommt es zu hyperaktiven Kontraktionen bei der Ovulation, wodurch zwei Oozyten gleichzeitig in die Spermatheka gelangen. Dies wird wahrscheinlich durch eine Erhöhung der  $IP_3/Ca^{2+}$  Konzentration verursacht (Bui und Sternberg, 2002; Clandinin et al., 1998). Eine Funktionszugewinn-Mutation in *itr-1(gof, sy290)* zeigt eine erhöhte  $IP_3$  Bindungsaffinität, was dazu führt, dass der Rezeptor konstitutiv aktiv ist und mehr  $Ca^{2+}$  ausschüttet (Clandinin et al., 1998; Walker et al., 2002). Somit haben beide Mutanten eine putative Erhöhung der  $IP_3/Ca^{2+}$  Konzentration zu Folge,

welche wahrscheinlich ursächlich für die beobachtbare Rettung der *let-413* und *dlg-1* RNAi Phänotypen in der Spermatheka und überraschender Weise in embryonalen Epithelien ist, denn bisher gab es keinen Hinweis auf eine Beteiligung des LIN-3/EGF-LET-23/EGFR Signalwegs bei der Etablierung der CeAJ (Aroian et al., 1990; Clandinin et al., 1998; Kaech et al., 1998; Simske et al., 1996).

Durch weitere Untersuchungen konnte festgestellt werden, dass nach Funktionsverlust der *ncx*- und *mca*-Gene, welche für  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  Austauscher und membranständige  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasen kodieren und somit eine regulatorische Funktion für die  $\text{Ca}^{2+}$  Konzentration in den Zellen ausüben (Ruknudin und Lakatta, 2007; Bednarek et al., 2007), ebenfalls den *let-413(RNAi)* Phänotyp im Embryo retten (O. Bossinger, persönliche Mitteilung). Im Gegensatz dazu, führt eine Verringerung der  $\text{IP}_3/\text{Ca}^{2+}$  Konzentration durch *itr-1(RNAi)* und Zugabe von EGTA zu junktionalen Defekten, die Ähnlichkeit mit einem *dlg-1* Phänotyp haben (s. Abs. 2.3; Abb.26). Somit kann wahrscheinlich davon ausgegangen werden, dass  $\text{IP}_3/\text{Ca}^{2+}$  Signale nativ in epithelialen Zellen vorkommen und beim Prozess der CeAJ Entwicklung beteiligt sind (s.u. Abs.3.3). Folglich ist es möglich, dass *ipp-5(lof)* und *itr-1(gof)* Mutanten, auf diese nativen  $\text{IP}_3/\text{Ca}^{2+}$  Signale Einfluss nehmen, und somit auch die embryonalen *let-413(RNAi)* Phänotyp supprimieren.

Oszillierende  $\text{Ca}^{2+}$  Signale sind in unzähligen Zelltypen zu beobachten. Dabei wird auf einmal eine größere Menge  $\text{Ca}^{2+}$  aus intrazellulären Speichern entlassen (z.B. vom ER) und über Transporter wieder in die Speicher oder in den interzellulären Raum gebracht (Berridge et al., 2003). Obwohl es bisher nicht möglich war, diesen plötzlichen  $\text{Ca}^{2+}$  Anstieg in der Spermatheka zu messen, so erfolgt wahrscheinlich ein plötzlicher Konzentrationsanstieg des zytoplasmatischen  $\text{Ca}^{2+}$  vor jeder Relaxierung der distalen Spermathekazellen, welche hervorgerufen wird, durch die Aktivierung von PLC-1 durch die LIN-3/LET-23 abhängigen Signalkaskade (Yin et al., 2004). Dieser plötzliche Konzentrationsanstieg ist auch bei anderen biologischen Prozessen, z.B. beim Defäkations-Zyklus des Hinterdarms oder bei Pumpbewegungen des Pharynx, zu beobachten und konnte teilweise durch „patch clamp“ Methoden sichtbar gemacht werden (Peters et al., 2007; Estevez et al., 2003; Espelt et al., 2005; Teramoto und Iwasaki, 2006).

Das ITR-1 Protein wird stark im Embryo exprimiert und reguliert mittels intrazellulärer  $\text{Ca}^{2+}$  Ausschüttungen die epidermalen Zellbewegungen beim ventralen Schluss während der Embryogenese (Thomas-Virnig et al., 2004). Jedoch

war es bisher im *C. elegans* Embryo nicht möglich die  $\text{Ca}^{2+}$  Dynamik sichtbar zu machen, weil der Prozess im Embryo vermutlich einen langsamen Konzentrationsanstieg beinhaltet, da morphogenetische Bewegungen der Hypodermiszellen keine plötzlichen Kontraktionen oder Pumpbewegungen bedarf.

Ein Modell, das die Rettung durch eine putative Erhöhung der  $\text{IP}_3/\text{Ca}^{2+}$  Konzentration erklärt, muss folgende Ergebnisse und Beobachtungen dieser Arbeit berücksichtigen. Es war zum einen nicht möglich eine *let-413* Nullmutante zu retten (Abb.23D, Tab.5). Lediglich nach einem Funktionsverlust von LET-413 der durch RNAi vermittelt wird, kann eine Rettung in der *ipp-5* Mutante stattfinden. Da durch RNAi noch kleinste Mengen Protein exprimiert werden (s. Abs. 2.1.1; Abb.7A";B"; Ahringer, 2006), ist es möglich, dass genau diese Mengen des jeweiligen Proteins ausreichen um mit Hilfe der putativen  $\text{IP}_3/\text{Ca}^{2+}$  Konzentrationserhöhung die beobachtete Rettung zu ermöglichen. Es gilt noch zu prüfen, ob eine *dlg-1* Nullmutante durch *ipp-5(sy605)* gerettet werden kann.

Im *Drosophila* Embryo ist die Bildung der *Zonula adherens* ein Prozess, der in zwei Schritten erfolgt und somit mit der CeAJ Entwicklung in *C. elegans* vergleichbar. Zunächst akkumulieren apikale Proteine in Aggregaten in einem punktierten Muster an der apikalen Membran. Dabei wird in *Drosophila* die Funktion von *baz/par-3*, *aPKC/pkc-3* und *arm/β-Catenin* benötigt, um zunächst eine unreife „*spot adherens junction*“ zu formen. Der Stardust Komplex wirkt dabei redundant, um die „*adherens junctions*“ apikal zu lokalisieren (Cox et al., 1996; Müller und Wieschaus, 1996; Tanentzapf und Tepass, 2003; Wodarz et al., 2000). Dieser erste Schritt ist wahrscheinlich abhängig vom Mikrotubuli (MT) Zytoskelett, denn das Wachstum der MT-Plusenden in das Zytoplasma ist wahrscheinlich notwendig, um das MT-Zytoskelett entlang der lateralen Membrandomänen aufzubauen, welches dann Lipide und Proteine zwecks Bildung der Zellmembran und der anfänglichen apikalen Positionierung von „*adherens junctions*“ nach apikal transportieren (Harris und Peifer, 2005; Lecuit und Wieschaus, 2000; Papoulas et al., 2005). Dies wird auch beim *C. elegans* Darmepithel postuliert (Leung et al., 1999).

In einem zweiten Schritt der junctionalen Reifung kommt es dann zur Zusammenfügung der „*spot adherens junction*“, wodurch eine reife, kontinuierliche *Zonula adherens* entsteht. Für diesen zweiten Schritt ist in *Drosophila* eine Umorganisation des Aktinzytoskeletts durch CDC-42, PAR-6 und aPKC, jedoch

nicht PAR-3 notwendig (Georgiou et al., 2008). Auch in Säugerzellen konnte festgestellt werden, dass der zweite Schritt der junctionalen Reifung eine Umorganisation des Aktins benötigt, welche durch kleinen GTPasen wie Rac und CDC-42 vermittelt wird (Akhtar und Hotchin 2001; Izumi et al., 2004).

In *C. elegans let-413(RNAi)* Tieren gelangen die apikalen Proteine verspätet zur apikalen Membran (Köppen et al., 2001; Segbert et al., 2004) und diesen Phänotyp zeigt die *ipp-5(lof)* Mutante nach Funktionsverlust von *let-413* ebenfalls (Abb.23I). Erst im zweiten Schritt der junctionalen Reifung, in dem die punktuell akkumulierten Proteine sich zu einem kontinuierlichen Gürtel um den Apex der Zellen formen und daraus eine elektronendichte Struktur entsteht (Legouis et al., 2000; McMahon et al., 2001), sind in der *ipp-5* Mutante Unterschiede zu Erkennen, die zur Rettung der Letalität führt. Während im N2 *let-413(RNAi)* Embryo DLG-1 ein diskontinuierliches Muster zeigt und nach basolateral disloziert, so entsteht in vielen *ipp-5* Tieren ein verbessertes, kontinuierliches junctionales Muster (Abb.23). Da die apikalen Proteine im wildtypischen Hintergrund nach Funktionsverlust von *let-413* zur lateralen Membrandomäne fehllokalisieren, scheint LET-413 eine wichtige Funktion bei der Aufrechterhaltung der apikalen Protein Lokalisation im Embryo auszuüben (Bossinger et al., 2001; Köppen et al., 2001; McMahon et al., 2001).

In *dlg-1(RNAi)* Embryonen erscheint das AJM-1 Muster in frühen Morphogenesestadien stark punktiert (Bossinger et al., 2001; McMahon et al., 2001) und besitzt größere Abstände als in *let-413(RNAi)* Embryonen. Nach einem gleichzeitigen Funktionsverlust von *let-413/dlg-1* ist die punktuelle AJM-1 Verteilung noch stärker reduziert (Segbert et al., 2004). Es ist also davon auszugehen, dass DLG-1 essentiell für die „Verschmelzung“ der junctionalen Aggregate zu einer kontinuierlichen CeAJ und somit für den zweiten Schritt der junctionalen Reifung ist. Dadurch, dass die „frühen“ *let-413* und *dlg-1* RNAi Phänotypen in einem *ipp-5* mutanten Hintergrund nicht verbessert werden, und lediglich beim zweiten Schritt der CeAJ Entwicklung eine Verbesserung der junctionalen Muster zu beobachten ist, scheint das System, welches durch  $IP_3/Ca^{2+}$  positiv beeinflusst wird, erst zu diesem Zeitpunkt wirksam zu werden und DLG-1 bei der Funktionsausübung während der junctionalen Reifung zu unterstützen.

### 3.3 Der Einfluss von Inositolphosphaten, Phospholipiden und $\text{Ca}^{2+}$ auf die Zellpolarität

Inositolphosphate und Phosphoinositide spielen eine wichtige Rolle als Signalvermittler in der Signaltransduktion und bei der Regulation von vielzähligen zellulären Prozessen wie Fertilisation, Proliferation, Kontraktionen, Vesikeltransport,  $\text{Ca}^{2+}$  Stoffwechsel, Endo- und Exozytose und der Organisation des Zytoskeletts (Berridge, 2008). Durch die vielfältigen Möglichkeiten der Phosphorylierung des Inositols eignet es sich als eine geeignete Grundsubstanz zur Vermittlung von verschiedenen Signalvorgängen. Aus diesem Grund, ist die endgültige Aufklärung des Moleküls, welches mit Hilfe von  $\text{IP}_3/\text{Ca}^{2+}$  die Rettung des *let-413(RNAi)* Phänotyp vermittelt, schwierig, denn Eingriffe in der  $\text{IP}_3/\text{Ca}^{2+}$  Konzentration können viele Defekte verursachen.

Es gibt jedoch Hinweise, dass z.B. eine lokale  $\text{Ca}^{2+}$  Ausschüttung aus dem ER eine mechanistische Funktion in Epithelzellen ausüben kann. So lokalisiert der  $\text{IP}_3$  Rezeptor in polarisierten MDCK Zellen am Apex der lateralen Membrandomäne zusammen mit Markern der „tight junctions“, ZO-1 und Occludin (Colosetti et al., 2003). In *C. elegans* interagiert ITR-1 während dem Prozess der epithelialen Polarisierung mit dem nicht-Muskel Myosin NMY-2 nahe der apikalen Plasmamembran, was auf eine gezielte lokale Ausschüttung von  $\text{Ca}^{2+}$  hindeutet (Walker et al., 2002; Thomas-Virnig et al., 2004), da  $\text{Ca}^{2+}$  nur begrenzt im Zytoplasma diffundieren kann (Kasai und Petersen, 1994). Demnach könnten sich potentielle Effektoren nahe der zu bildenden CeAJ befinden.

Nach *let-413(RNAi)* sind signifikant viele vesikuläre Strukturen im Zytoplasma der Spermathekazellen zu beobachten (Abb.17). Dies könnte ein Hinweis sein, dass der gerichtete Transport gestört ist. Der gerichtete vesikuläre Transport von membranständigen Proteinen ist unabdingbar für die Aufrechterhaltung der Zellpolarität. (Balla et al., 2009; Nejsum und Nelson 2009). Die N-terminale Leucinreiche Domäne von LET-413/Scribble, die seine basolaterale Lokalisation sowohl in *C. elegans* als auch in *Drosophila* vermittelt, zeigt eine starke Homologie zu jener im SUR-8/SOC-2 Protein (Legouis et al., 2003; Zeitler et al., 2004). Von diesem Protein ist bekannt, dass es an das G-Protein Ras bindet (Sieburth et al., 1998). Mutationen in LET-60/Ras führen in *C. elegans* nicht zu junktionalen Defekten sondern zeigen Änderungen bezüglich der Spezifikation des Zellschicksals (Sternberg und Han,

1998). Da im *let-413* Hintergrund jedoch keine diesbezüglichen Transformationen zu beobachten sind, wurde eine Interaktion von LET-413 mit anderen Mitgliedern aus der Familie der kleinen GTPasen (z.B. Rho, Rac, Cdc42 oder der Rab GTPase) postuliert, deren Aufgabe darin bestehen könnte, das Zytoskelett und/oder den Vesikeltransport zu polarisieren (Jordens et al., 2005; Legouis et al., 2000).

Es gibt Hinweise, dass Proteine, die für die Zellpolarität zuständig sind, abhängig von der Anzahl der Phosphorylierungen (Wertigkeiten) der membranständigen Phosphatidyl-Inositolphosphate lokalisiert werden, indem der vesikuläre Transport beeinflusst wird. Das Phosphatase und Tensin Homolog (PTEN) ist wie DLG-1 ein Tumor Suppressor Gen und in anderen Systemen wichtig für die Zellpolarität. PTEN reguliert die Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K) Signalkaskade, in dem es das Produkt (3,4,5)-Trisphosphat (PIP<sub>3</sub>) zu Phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate (PIP<sub>2</sub>) dephosphoryliert (Rossi und Weissman, 2006). Die Konzentrationen der verschiedenen Wertigkeiten der Phosphoinositide legen ein Grundgerüst für die Membranpolarität fest, indem PIP<sub>2</sub> die apikale und PIP<sub>3</sub> die basolaterale Membrandomäne determiniert (Martin-Belmonte und Mostov, 2007; Martin-Belmonte 2007; Wu et al., 2007; Schill und Anderson, 2009). Interessanterweise konnte kürzlich in einem künstlichen Lipid-System gezeigt werden, dass die Zugabe geringer Ca<sup>2+</sup> Mengen die Organisation des PIP<sub>2</sub> verändert (Levental et al., 2009). Abhängig von der Lokalisation der verschiedenen Phosphoinositide wird z.B. in *Drosophila* CDC-42 oder PAR-3 lokalisiert (Lee und Vasioukhin, 2008; Wu et al., 2007). Es konnte bereits gezeigt werden, dass die zweite PDZ Bindedomäne von PAR-3 mit Inositolphosphaten und die dritte PDZ Bindedomäne mit PTEN interagiert (Wu et al., 2007). Dadurch sind PI3K und PTEN in anderen Systemen wie z.B. *Drosophila* an der apiko-basalen Polarität beteiligt (Pinal et al., 2006; von Stein et al., 2005). Allerdings wird dem *C. elegans* Homolog von PTEN (*daf-18*; „abnormal dauer formation“) bisher nur eine Funktion bei dem Insulin-ähnlichen Signalweg zugesprochen, der u. a. für die Dauerlarven-Entwicklung zuständig ist (Gil et al., 1999; Mihaylova et al., 1999; Ogg und Ruvkun, 1998; Rouault et al., 1999).

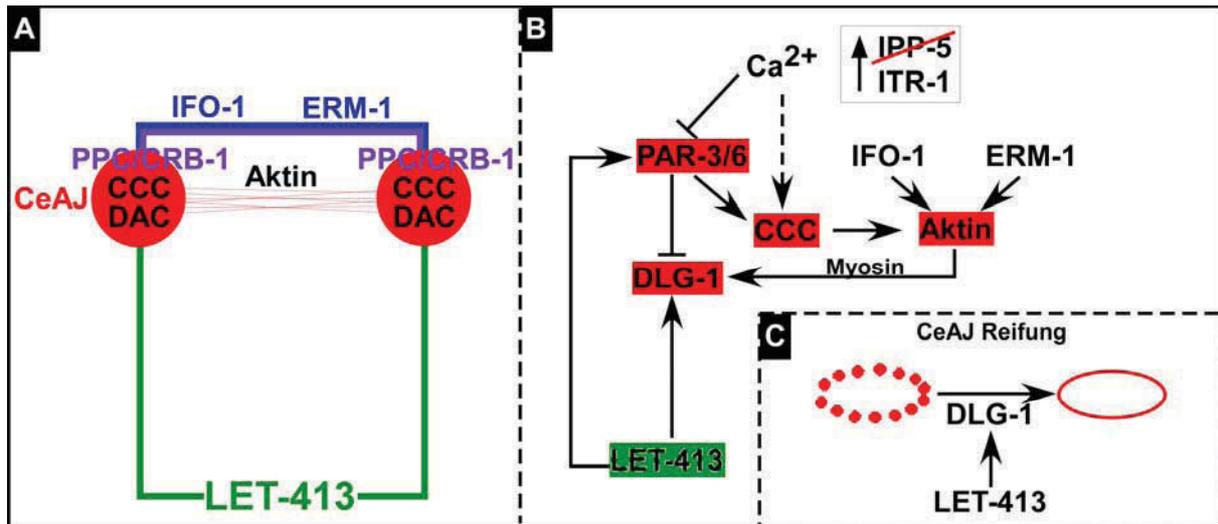
In *Drosophila* wird durch PTEN die GTPase CDC-42 lokalisiert, welche wiederum die Proteine PAR-6 und aPKC rekrutiert. Die Zellen zeigen bei einem Funktionsverlust von CDC-42 eine verkleinerte apikale Membrandomäne und eine punktierte Akkumulation vom E-cadherin und PAR-3. Basolaterale Proteine lokalisieren jedoch normal (Georgiou et al., 2008). In diesem Zusammenhang konnte festgestellt

werden, dass eine Blockierung der *cdc-42* Funktion die Lokalisierung von PAR-6 stört und dadurch auch die Endozytose von E-cadherin hindert (Leibfried et al., 2008). Im *C. elegans* Embryo konnte ebenfalls gezeigt werden, dass eine gezielte Protein-Degradation der maternalen als auch der zygotische Funktion von PAR-6 (*par-6M/Z*) vor dem Einsetzen der epithelialen Polarisierung, zu einer uniformen Verteilung von PKC-3 im Zytoplasma und zu Defekten bei der Zell-Zelladhäsion führt (Totong et al., 2007). Die Proteine der CeAJ lokalisieren dennoch apikal und demonstrieren so, dass die PAR-6 Funktion und die asymmetrische Verteilung der PKC-3 keine generelle Voraussetzung für die Polarisierung der Epithelzellen sind. Jedoch zeigen die Proteine HMP-1/ $\alpha$ -catenin, HMR-1/E-cadherin und DLG-1 auf Immunfluoreszenz-Ebene keinen kontinuierlichen Gürtel um den Apex der Zellen. Dieser scheint stattdessen fragmentiert und zeigt deutliche Ähnlichkeit zum Phänotyp in *let-413* und *dlg-1* Embryonen. Somit ist die Lokalisierung von PAR-6 wichtig für die vesikuläre Anlieferung des E-Cadherins und damit für den zweiten Schritt der junctionalen Reifung. Sowohl der konservierte PAR-3–PAR-6–PKC-3 Komplex (PPC) als auch LET-413 und DLG-1 sind essentiell für die Umwandlung einer diskontinuierlichen „*spot adherens junction*“ in eine kontinuierliche *Zonula adherens*. Da die Rettung des punktierten junctionalen Musters in der *ipp-5* Mutante nur den zweiten Schritt der CeAJ Reifung beeinflusst, könnte die Rettung über PAR-6, bzw. dem (PPC) vermittelt werden, was zu dem in Abb.28 gezeigten Modell führt. Dieses erklärt das Zusammen- und Wechselspiel der zum Teil redundant wirkenden Komplexe (DAC, PPC und CCC) und wie  $\text{Ca}^{2+}$  putativ auf die Zelladhäsion wirken kann.

Jedoch scheint ein Gleichgewicht zwischen dem PPC und dem DAC bestehen zu müssen, denn eine Überexpression einer dominant negativen Form der aPKC oder PAR-3 blockiert ebenfalls die Reifung der punktierten zu einer kontinuierlichen „*adherens junction*“ in *Drosophila* und in Vertebraten Zellkultur (Mizuno et al., 2003; Suzuki et al., 2002). In einem Screen in *C. elegans* bei dem Polaritätsgene im Hinblick auf den vesikulären Transport untersucht wurden, konnte CDC-42, PAR-6 und PKC-3 bereits eine Funktion für die Aktin-abhängige Endozytose nachgewiesen werden (Balklava et al., 2007; Georgiou et al., 2008). So könnte PAR-6 ähnlich wie in anderen Systemen den CCC in *C. elegans* stärken, z.B. durch die vesikuläre Anlieferung von HMR-1/E-cadherin.

Zudem konnte beobachtet werden, dass viele N2 Embryonen nach *par-6/let-413(RNAi)* schlüpfen konnten, während dies in *ipp-5* nicht der Fall war (Daten nicht gezeigt). Dieses müsste für eine weitere Aufklärung im Detail statistisch ausgewertet werden. Da wahrscheinlich die Verdünnung der *par-6* Bakterien ursächlich dafür ist, dass der frühe embryonal letale Phänotyp nicht ausgebildet wird, wäre es möglich, dass der gleichzeitige Funktionsverlust von *par-6* und *let-413* während der Epithelentwicklung zu einer Verbesserung bei der CeAJ Bildung führt, ähnlich wie es auch nach gleichzeitigem Verlust der *let-413* und *hmp-1* Genfunktionen zu beobachten ist (Segbert et al., 2004). Dies stellt einen funktionellen Zusammenhang zwischen dem PPC und CCC dar. Außerdem scheint sich die erhöhte  $Ca^{2+}$  Konzentration in der *ipp-5* Mutante negativ nach einem Funktionsverlust des CCC auszuwirken. Denn *ipp-5(sy605)* Hermaphroditen, die postembryonal *hmr-1(RNAi)* ausgesetzt waren, zeigen schwere Wachstumsdefekte, was im N2 Stamm nicht zu beobachten war (vergl. Abschnitt 2.2.5). Es ist auch nicht möglich, Defekte die durch den Funktionsverlust des CCC verursacht werden in der *ipp-5* Mutante zu retten.

Eine andere Beobachtung war, dass ein Funktionsverlust von *jac-1* (p120 Catenin Homolog) in *ipp-5(sy605)* zu einem „humpback“ Phänotyp führt (Daten nicht gezeigt). In einem wildtypisch genetischen Hintergrund führt *jac-1(RNAi)* über Injektion zu keinem erkennbaren Phänotyp, selbst in einer *rrf-3* Mutante nicht, obwohl diese hypersensitiv für RNAi ist. JAC-1 reguliert den CCC positiv, denn es verstärkt die Bindung des CCC an das Aktin Zytoskelett. So verstärkt *jac-1(RNAi)* eine schwache *hmp-1* Mutante und erhöht deren Letalitätsrate (Pettit et al., 2003). Es konnte in Vertebraten gezeigt werden, dass p120 die Aktivität von Rho und kleinen ATPasen reguliert (Anastasiadis et al., 2000; Noren et al., 2000; Grosheva et al., 2001). Zusätzlich kann p120 auch mit Kinesine interagieren und so den Vesikeltransport in den Zellen steuern (Chen et al., 2003). Demnach könnte JAC-1 in *C. elegans* bei der Rettung des *let-413* und *dlg-1* Phänotyps eine Rolle spielen. So ist es durchaus möglich dass das putativ erhöhte  $Ca^{2+}$  Level in der *ipp-5(sy605)* Mutante dazu führt, dass die homophile und  $Ca^{2+}$ -abhängige Interaktion vom CCC beeinflusst wird, sodass es zu einem negativen Effekt während der Morphogenese und des Wachstums kommt, wenn der CCC gestört wird.



**Abb.: 28: Funktionsmodell**

(A) Schematischer Aufbau einer Epithelzelle von *C. elegans*. LET-413 ist mit der basolateralen Membrandomäne assoziiert und ist für die Rekrutierung der apikalen Proteine zuständig. Apikal zu der CeAJ organisieren ERM-1 und IFO-1 („intermediär filament organisator“; persönliche Mitteilung O. Bossinger) das Aktinzytoskelett und sind damit wahrscheinlich für das CeAJ-Remodelling (van Fürden et al., 2004) verantwortlich. Somit stellen LET-413 das basolaterale, und Komponenten der „endotube“ das apikale Grundgerüst, für die dazwischen liegende CeAJ, dar.

(B) Schematisches Netzwerk der molekularen Wirkweisen der verschiedenen Komplexe. Die Lokalisation des CCC ist unabhängig von LET-413 und findet noch vor der Akkumulation des DAC statt (McMahon et al., 2001; Lynch und Hardin, 2009). Der PPC lokalisiert zunächst in der CeAJ und akkumuliert in Laufe der CeAJ Reifung apikal. Es ist gezeigt worden, dass PAR-6 die Lokalisation des CCC stabilisiert (Totong et al., 2007), wahrscheinlich über vesikuläre Anlieferung von HMR-1/E-cadherin mit Hilfe von CDC-42 (Georgiou et al., 2008; Izumi et al., 2004). Der CCC, ERM-1 und IFO-1 organisieren das Aktinzytoskelett (Lynch und Hardin 2009; van Fürden et al., 2004; persönliche Mitteilung O. Bossinger) und dieses unterstützt DLG-1 bei seiner wichtigen Rolle bei der CeAJ Reifung, wobei der zunächst diskontinuierlichen unreife CeAJ zu einem kontinuierlichen junctionalen Gürtel um den Apex der Epithelzellen geschlossen wird (C). Myosine und andere Aktin-bindende Proteine können dabei eine redundante Funktion haben (van Fürden 2007). Die lokale Ausschüttung von  $\text{Ca}^{2+}$  nahe der apikalen Membran (Walker et al., 2002; Thomas-Virnicig et al., 2004) kann zur Aktivierung der PLC, die  $\text{PIP}_2$  zu  $\text{IP}_3$  und DAG katalysiert, führen. Da PAR-3/6  $\text{PIP}_2$ -abhängig lokalisiert wird (Wu et al., 2007; Schill und Anderson, 2009), bewirkt zusätzliches  $\text{Ca}^{2+}$ , z.B. in der *ipp-5(sy605)* Mutante, dass weniger  $\text{PIP}_2$  in der Membran vorhanden ist und somit PAR-3/6 schlechter lokalisiert wird. PAR-3/6 stärkt der CCC durch den vesikulären Transport von HMR-1/E-cadherin, und wirkt dabei hemmend auf die *dlg-1* Funktion. Doch das CCC unterstützt DLG-1 bei der CeAJ Reifung durch das Aktinzytoskelett. Somit findet zwischen dem PPC, DAC und CCC ein ausgewogenes Wechselspiel statt, um die Reifung der diskontinuierlichen CeAJ zu einem geschlossenen adhäsiven Gürtel um den Apex der Zellen zu gewährleisten. Es lässt sich nicht ausschließen, dass eine erhöhte intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration einen verstärkenden Einfluss auf die homophile Interaktion zwischen HMR-1/E-cadherin hat, wenn das  $\text{Ca}^{2+}$  aus den Zellen über Transporter wieder aus den Zellen gepumpt wird.

---

Zusätzlich gibt es Hinweise, dass das  $\text{Ca}^{2+}$  abhängige Protein CMD-1 (Calmodulin) die Lokalisation von DLG-1 in den lateralen Hypodermiszellen steuert (van den Heuvel, persönliche Mitteilung). Daher gilt es zukünftig zu prüfen, ob die *cmd-1* Genfunktion an der Etablierung der CeAJ in *C. elegans* beteiligt ist.

### 3.4 Identifikation von *let-413* Suppressoren durch klassische Genetik und Ausblick

Mit Hilfe eines klassischen F2-Screens nach durchgeführter EMS-Mutagenese, war es im Rahmen dieser Arbeit möglich vier Linien zu isolieren, die den *let-413(RNAi)* Phänotyp supprimieren konnten. Damit sollen Komponenten gefunden werden, die im selbem genetischen Signalweg wie LET-413 agieren. Mutationen, die den Tieren Insensitivität gegenüber RNAi verleihen (Tabara et al., 1999) sollten während des Screens mittels *mklp-1(RNAi)*, was zu einem embryonal letalen Phänotyp während der ersten Zellteilungen führt (Powers et al., 1998), aussortiert werden.

Nach weiteren RNAi Tests bei unterschiedlichen Temperaturen konnte festgestellt werden, dass zwei Linien (*dus8* und *dus9*) den embryonalen *let-413(RNAi)* Phänotyp nicht mit hoher Wahrscheinlichkeit retten können (Tab.10). Die Linien *dus10* und *dus11* zeigen jedoch eine sehr starke Rettung der *let-413* und *dlg-1* RNAi induzierten Letalität. Allerdings zeigt *dus10* auch eine Rettung des *cyb-3(RNAi)* Phänotyps, welches ähnlich wie *mklp-1(RNAi)* zur Kontrolle für RNAi Sensitivität galt und zu einen frühen embryonalen Phänotyp führt, da es für ein Cyclin B exprimiert, welches an der Chromosomen Segregation beteiligt ist (van den Heuvel, 2005). Die Beobachtung, dass sich die *par-3-* und *par-6(RNAi)* Phänotypen durch die Linien *dus10* und *dus11* retten lassen, deutet darauf hin, dass der putative gefundene Suppressor auch maßgeblich an der Etablierung der Zellpolarität beteiligt sein könnte, und somit die frühen Polaritätsdefekte nach einem Funktionsverlust von PAR-3/6 und auch später während der Polarisierung der Epithelien eine Rolle spielt. Es wäre demnach durchaus möglich, dass es einen Regulator gibt der die Funktion der Polaritätsgene supprimiert und damit in der Lage ist, mehrere epitheliale Polaritätsdefekte nach Funktionsverlust verschiedener Gene zu retten.

Bevor die Charakterisierung der gefunden Suppressoren stattfindet, muss jedoch ausgeschlossen werden, dass die Mutation der Linien *dus10* und *dus11* einen

---

temperaturabhängigen Effekt auf die RNAi Effizienz hat. Dies kann durch weitere Kontrollen verschiedener RNAi Experimente erfolgen, bei dem die zu induzierenden Defekte von der Polarität der Zellen unabhängig und das zu erwartende Ergebnis bekannt ist. Zudem kann nicht gänzlich ausgeschlossen werden, ob ein *let-413* Suppressor der über eine erhöhte  $Ca^{2+}$ -Konzentration wirkt, nicht auch einen Effekt auf die RNAi Maschinerie hat. Wenn dem so ist, muss eine supprimierende Wirkung in *let-413* Mutanten getestet werden oder es wird zusätzlich ein *rrf-3* mutantes Gen hineingekreuzt um die supprimierende Wirkung eines Kandidaten unabhängig von der RNAi Effizienz zu prüfen.

Eine Wiederholung des Screens würde sich durchaus lohnen. Da in dem Pilot-Screen sehr viele Linien ausgestorben sind, nachdem sie von den *let-413*-Fütterungsplatten auf die OP50 Bakterien umgesetzt wurden, wäre es bei einer erneuten Durchführung besser, die Linien weiterhin auf *let-413(RNAi)* zu halten. So ist es möglich, dass der Suppressor letal wirkt und nur lebensfähig ist, wenn *let-413* gleichzeitig ausgeschaltet ist.

Darüber hinaus stellt die Spermatheka als Modell ein hervorragendes epitheliales Organ für postembryonale RNAi Screens dar. Dabei kann *in vivo* Fluoreszenz-Mikroskopie an einem Reporterstamm oder der Prozess der Ovulation als exzellente Marker eingesetzt werden, um neue Regulationsmechanismen bei der Epithelentwicklung zu finden. Mit Hilfe der gefundenen *let-413* Suppressoren sollte es in Zukunft möglich sein, wichtige Erkenntnisse zu dem molekularen Wirkmechanismus der *let-413* Genfunktion zu gewinnen.

## 4 Zusammenfassung

Eine herausragende Eigenschaft von Epithelien ist die Ausbildung interzellulärer Kontaktstrukturen entlang der lateralen Membrandomäne der Epithelzellen. Im Nematoden *Caenorhabditis elegans* rekrutiert das LET-413 Protein den DLG-1–AJM-1 Komplex (DAC). Dieser ist letztendlich für die Ausbildung der elektronendichten Struktur der sog. „*C. elegans* apical junction“ verantwortlich. Diese formt einen kontinuierlichen Adhäsions-Gürtel um den Apex aller embryonalen Epithelzellen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde nun zunächst die Rolle des LET-413 Proteins und des DAC während der Postembryogenese von *C. elegans* und dabei besonders bei der Ausbildung des Spermatheka-Epithels analysiert. Dabei zeigte sich, dass die durch RNAi (RNA-vermittelte Interferenz) induzierte Herunterregulierung von LET-413 und des DAC offensichtlich nicht die Funktionen bereits während der Embryonalentwicklung etablierter Epithelien beeinträchtigt. Im Gegensatz dazu wird die Ausbildung „neuer Epithelien“ während der Postembryogenese massiv gestört und führt im Falle der Spermatheka zu einer fast kompletten Sterilität. Der DAC wird wie im Embryo, so auch in der Spermatheka durch LET-413 rekrutiert, was auf eine grundsätzliche Konservierung des Mechanismus der Ausbildung interzellulärer Kontaktstrukturen während der Embryogenese und der Postembryogenese hindeutet. Die molekularen Details dieses Mechanismus sind aber weitestgehend unbekannt.

In dieser Doktorarbeit gelang es nun erstmalig die durch *let-413* und *dlg-1* RNAi induzierten Phänotypen, Sterilität und embryonale Letalität, durch Mutationen in anderen Genen zu supprimieren. Im Falle des *ipp-5* und des *itr-1* Gens handelt es sich dabei um eine Funktionsverlust-Mutation in einer Inositol Polyphosphat 5-Phosphatase beziehungsweise eine Funktionszugewinn-Mutation im Inositol Triphosphat(IP<sub>3</sub>) Rezeptor. Dies deutet auf eine wichtige Funktion des IP<sub>3</sub>/Ca<sup>2+</sup> Signals bei der Rettung der *let-413* und *dlg-1* Phänotypen hin. Nach EMS-Mutagenese konnten dann in einem klassischen F2-Screen weitere Suppressor-Mutanten identifiziert werden, die den *let-413(RNAi)* Phänotyp unterdrücken. Die in dieser Arbeit vorgelegten Ergebnisse legen somit den Grundstein für einen neuen Ansatz, dessen Ziel es ist mit Hilfe weiterer Suppressor-Analysen den molekularen Wirkmechanismus der *let-413* und *dlg-1* Genfunktion endgültig aufzuklären.

## 5 Summary

A hallmark of epithelial differentiation is the formation of highly elaborate cell-cell junctions along the lateral membrane domain of epithelial cells. In the nematode *Caenorhabditis elegans*, the LET-413 protein recruits the DLG-1–AJM-1 complex (DAC), which organizes the electron-dense structure of the so-called “*C. elegans* apical junction” and finally forms a circumferential junctional belt around the epithelial apex.

In this thesis, the *let-413* and *dlg-1* gene functions were analysed by RNAi (RNA-mediated interference) during postembryonic development of *C. elegans*, mainly focusing on the spermatheca, a simple organ that receives and stores sperms. RNAi against *let-413* and *dlg-1* seems not to disrupt functions of epithelia that have been already formed during embryogenesis (e.g. the pharynx, the intestine or the hypodermis). However, the establishment of the spermatheca epithelium is severely disturbed, which in the end causes sterility in *C. elegans*. The recruitment of the DAC by the LET-413 protein suggests a common underlying but so far unknown mechanism that is conserved in postembryonic and embryonic development of *C. elegans*.

This thesis for the first time demonstrates rescue of both embryonic and postembryonic *let-413* and *dlg-1* RNAi-induced phenotypes by a loss-of-function mutation in *ipp-5* and a gain-of-function mutation in *itr-1* encoding for a type I 5-phosphatase and the inositol 1,4,5(IP<sub>3</sub>)-triphosphate receptor, respectively. These results suggest that IP<sub>3</sub>/Ca<sup>2+</sup> signals somehow trigger a so far unknown rescue pathway that nevertheless requires a minimal amount of LET-413 protein function. To further elucidate this pathway, a classical F2 EMS mutagenesis pilot screen identified 4 putative suppressors (*dus8-dus11*) of the *let-413(RNAi)* phenotype in the spermatheca. In addition, *dus8-dus11* also suppress embryonic *let-413* and *dlg-1* RNAi phenotypes, further supporting the idea of a common basic mechanism operating during epithelial development in the embryo and during postembryogenesis.

## 6 Material und Methoden

### 6.1 Chemikalien, Materialien, Software und Geräte

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

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

Alle Lösungen wurden mit demineralisiertem Wasser (dH<sub>2</sub>O) angesetzt und, falls notwendig, anschließend autoklaviert. Bei Arbeiten mit RNA wurden die Lösungen mit Di-Ethylpyrocarbonat-Wasser (0.1% DEPC) angesetzt.

Enzyme für molekularbiologische Arbeiten wurden bei folgenden Firmen bezogen: BioLabs, Schwalbach/Taunus, Deutschland; Boehringer/Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland; MBI Fermentas, St. Leon Rot, New England; Promega, Madison, USA.

#### Allgemeine Geräte:

Elektrotransformationen:	Gene Pulser II und Puls Controller Plus (BioRad, München)
UV-Spektrometer:	Gene Quant II (Pharmacia Biotech, Cambridge, England) und UV-160 (Shizmadzu Deutschland GmbH, Duisburg)
PCR-Gerät:	Primus 25 (PeqLab, Erlangen, Deutschland)
Zentrifugen:	Biofuge pico (Heraeus instruments; Düsseldorf); J21-C (Beckman instruments; Palo Alto, USA)
Mikropipettenpuller:	Sutter P-97 (Science products, Hofheim)
SDS-PAGE & Western-Blotting:	Mini Protean II (BioRad, München)

#### Kitsysteme:

- MACS mRNA Isolation Kit, *Miltenyi Biotec*, Bergisch-Gladbach
- MAXIscript T7, *Ambion*, Austin, USA
- Nucleobond AX, *Machery-Nagel*, Düren, Deutschland
- NucleoSpin Extract, *Machery-Nagel*, Düren, Deutschland
- Qiagen Plasmid Maxi Kit, *Qiagen*, Hilden, Deutschland
- OneStep RT-PCR Kit, *Qiagen*, Hilden, Deutschland

**Mikroskopische Beobachtungen:**

Lebendbeobachtungen,

Differential-Interferenz

Kontrast (DIK): Zeiss Axioplan 2 (Carl Zeiss AG, Oberkochen), mit einer Hamamatsu ORC-ER Digitalkamera

Fluoreszenzaufnahmen: LSM 510 Meta (Carl Zeiss AG, Oberkochen) und Leica TCS NT (Leica, Heidelberg)

Injektionen: 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

**Photoarbeiten:**

Röntgenfilm: Fuji SuperRX, Fuji, Tokyo, Japan

Entwickler: Tenetal Roentogen, Tenetal, Norderstedt

Fixierer: Tenetal Roentogen Superfix, Tenetal, Norderstedt

**Software:**

Bildbearbeitung:

- Adobe Photoshop CS2 9.0 (Adobe Systems Inc., San Jose, Kalifornien, USA)
- Corel Paint Shop Pro 10.01 (Corel Corporation, Ottawa, Kanada)
- Deneba Canvas 9 (ACD Systems Inc., British Columbia, Kanada)
- Quicktime Pro 6 (Apple Inc., Cupertino, Kalifornien, USA)

Statistische und graphische Auswertung:

Sequenzanalysen: - Microsoft Excel 2003

- Lasergene (DNASStar Inc., Madison, USA)

## 6.2 Molekularbiologische Methoden

### 6.2.1 Medien für Bakterien

SOB-Mg <sup>2+</sup> :	2% Bactotrypton, 0,5% Bactoyeast, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl
LB:	1% Bactotrypton, 0,5% Bactoyeast, 1% NaCl
LB-Agar:	6,3 g Agar/300 ml LB
Ampicillin:	100 mg/ml Stammlösung in dH <sub>2</sub> O
Tetracyclin:	12,5 mg/ml Stammlösung in dH <sub>2</sub> O

### 6.2.2 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 lacIqZ\_M15 Tn10(Tetr)]. Alle herkömmlichen Klonierungsarbeiten wurden mit diesem Stamm durchgeführt.
- HT115[DE3]: (CGC, Minnesota), Genotyp: F<sup>-</sup>, mcrA, mcrB, IN(rrnD-rrnE)1, lambda<sup>-</sup>, rnc14::Tn10(DE3 lysogen:lacUV5 promotor-T7 polymerase). Ein RNase III-defizienter Stamm mit zwei die MCS flankierenden T7-Promotoren für die Synthese von dsRNA.

### 6.2.3 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, hier hinein werden Fremdsequenzen kloniert. Ferner besitzt der Vektor ein für das α-Peptid der β-Galaktosidase codierendes 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 vector“, 2.79 kB, Timmons und Fire, 1998). Dieser ampicillinresistente Vektor wird für das sogenannte „feeding“ 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.

#### 6.2.4 Isolierung genomischer DNA aus einer *C. elegans* Population

Um DNA einer *C. elegans* Population zu gewinnen, wird eine Platte mit Wasser in ein Eppendorf Reaktionsgefäß abgewaschen. Dieses wird dann für 1 min bei 5000 rpm zentrifugiert, wonach der Überstand abgenommen und das Pellet mit 0,75 ml Wasser gewaschen wird. Die Zentrifugation wird wiederholt um das Pellet zu waschen. Nach dem Abnehmen des Überstandes wird das Reaktionsgefäß für 10 min in flüssigen Stickstoff gelegt. Anschließend wird die Masse wieder aufgetaut und füllt das Volumen auf 100 µl mit Wasser auf.

Dieser Mischung werden 100 µl TI 2x Lysis Puffer zugesetzt bevor das Reaktionsgefäß für 1 h bei 60 °C inkubiert wird.

Durch anschließende 15 minütige Erhitzung auf 95 °C werden die Proteine deaktiviert. Das erhaltene Lysat ist für PCR Analysen geeignet, jedoch empfiehlt sich eine Aufreinigung mittels einer Phenol-Chloroform Extraktion.

2X Lysis Puffer:	für einen Liter:
5 mM MgCl <sub>2</sub>	1,0 g
0,9% Nonidet P40	10 ml
0,9% Tween-20	10 ml
0,02% Gelatine	0,2 g
120 µg/ml Proteinase K	10 ml
Mit 2x PCR Puffer auffüllen	

#### 6.2.5 Phenol-Chloroform Extraktion

Eine Phenol-Chloroform Extraktion dient dazu eine DNA-Probe von Protein Verunreinigungen zu befreien. Proteine werden denaturiert und sammeln sich in der Interphase, zwischen oberer hydrophiler und unterer hydrophober Phase, an. In der hydrophilen Phase reichert sich die DNA an und kann mit einer Fällung aus ihr extrahiert werden.

- 1 Vol Phenol zur Nukleinsäurelösung hinzugeben und gut vortexen
- 5 min bei 13000 rpm zentrifugieren

- obere Phase abnehmen und in ein neues Reaktionsgefäß überführen
- 1 Vol Chloroform hinzugeben und gut vortexen
- 5 min bei 13000 rpm zentrifugieren
- erneut die obere Phase abnehmen und in ein neues Reaktionsgefäß überführen
- 1 Vol Chloroform hinzugeben und gut vortexen
- 5 min bei 13000 rpm zentrifugieren
- obere Phase abnehmen und mit Zugabe von Alkohol fällen

### 6.2.6 DNA Fällung

Mit der Fällung der DNA erhält man eine sehr reine Probe, welche, während der Resuspension, auf die gewünschte Konzentration DNA  $\mu\text{g/ml}$  verdünnt werden kann. 1 Vol Isopropanol auf die Probe geben, Gemisch zweimal invertieren.

- für 1 h bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  oder ü.N inkubieren
- Probe 30 min bei 13000 rpm zentrifugieren
- Überstand verwerfen
- 70% EtOH hinzugeben und für 15 min bei 13000 rpm zentrifugieren
- Den Überstand wieder verwerfen und anschließend das Pellet unter einer Hitzequelle trocknen
- DNA in  $\text{dH}_2\text{O}$  oder DEPC Wasser (bei anschließenden RNA Arbeiten) resuspendieren

Nun kann die Konzentration bestimmt und ggf. verdünnt werden.

### 6.2.7 Bestimmung der Konzentration einer DNA Probe

Die Konzentration einer DNA-Lösung kann über die Messung der optischen Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 260 nm mit Hilfe eines Photometers erfolgen. Die Konzentration wird nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz ermittelt:

$E_{260} = \lambda \times c \times d$ , wobei E die optische Dichte (Extinktion) bei 260 nm,  $\lambda$  der Extinktionkoeffizient, c die Stoffmengenkonzentration und d die Dicke der Küvette ist. Zusätzlich kann aus dem Quotienten der optischen Dichte bei 260 und 280 nm ( $E_{260}/280$ ) die Reinheit der Nukleinsäuren bestimmt werden. Dieser Wert sollte für DNA bei 1,8 liegen. Wichtig ist das zuvor der Leerwert der Küvette mit Hilfe des vorliegenden Lösungsmittels bestimmt wird.

### 6.2.8 „Polymerase-chain-reaction“ (PCR)

Die PCR dient zur Amplifizierung einzelner Sequenzen. Voraussetzung ist allerdings die Anwesenheit spezifischer Oligonukleotide („Primer“), die an homologe Sequenzen der DNA binden und den Teil der Sequenz flankieren, welcher amplifiziert werden soll. 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.

#### Übersicht eines Standard PCR Ansatzes:

- 5x PCR Puffer 10 µl
- 25 mM MgCl<sub>2</sub> 4 µl
- Vorwärts Primer 1 µl
- Rückwärts Primer 1 µl
- dNTPs 1 µl
- Template (50 ng DNA) 1 µl
- auf 50 µl mit autoklaviertem dH<sub>2</sub>O auffüllen
- Taq-Polymerase 0,25 µl

#### Standard PCR Programm:

Schritte	Temperatur (°C)	Dauer
1. Initiale Aktivierung	92	2 min
2. Denaturierung der DNA	95	15 s
3. Annealing der Primer	49 - 55	1:30 min
4. DNA-Neusynthese	72	1min pro kB
5. Wiederholung der Schritte 2 bis 4		
6. Denaturierung der DNA	95	15 s
7. Annealing der Primer	50-65	1 min
8. DNA-Synthese	72	1 min pro kB +20 s
9. Wiederholung der Schritte 6 bis 8 (20 Zyklen)		
10. Finale DNA-Synthese	72	8 min
11. Reaktionsende	4	endlos

**Tab.: MM1: Ablauf des Standard PCR Programms**

### 6.2.9 Primer

Für die Sequenzierung der RNAi Fütterungskonstrukte:

pPD129.36 „vorwärts“ GATAACCGTATTACCGCCTTTG  
 pPD129.36 „rückwärts“ GTAAAACGACGGCCAGT

Für die Herstellung einer *jac-1* cDNA (T7 Promotor Sequenz ist unterstrichen):

*jac-1* „vorwärts“ TAATACGACTACCTATAGATCCGAACTATGATCCTGCG  
*jac-1* „rückwärts“ TAATACGACTACCTATAGATCGTGAAGCTCCTTGTGCT

### 6.2.10 Konstrukte

Bei den RNAi Fütterungs-Konstrukten wurde die cDNA in den pPD129.36 Vektor kloniert. Sofern nichts anders angegeben wurde, wurden die Konstrukte von C. Segbert, M. Hoffmann oder D. v. Fürden freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Folgende RNAi Fütterungs-Konstrukte wurden im Rahmen dieser Arbeit verwendet:

- Kontrolle pPD129.36 ohne Insert
- *mklp-1* (s. Powers et al., 1998)
- *crb-1* (yk74b1; 0,85 kB, XhoI Fragment)
- *dlg-1* (yk128b7; 1,5 kB, XhoI Fragment)
- *erm-1* (yk257f5; 1,6 kB, XhoI Fragment)
- *hmp-1* (yk675e4; 1,5 kB, XhoI–Sacl Fragment)
- *hmp-2* (yk493f7; 0,7 kB, HindIII Fragment)
- *hmr-1* (yk611f6; 2,0 kB, XhoI–Sacl; Fragment)
- *let-413* (yk524b7; 2,5 kB, XbaI Fragment)
- *par-3* (yk6c1; 1,0 kB, XhoI–HincII Fragment)
- *par-6* (Freundlicherweise von D. v. d. Ecker zur Verfügung gestellt)

Die RNAi Konstrukte für *cmd-1*, *cyb-3* und *itr-1* wurden der Ahringer RNAi Bibliothek (Geneservice Limited) entnommen.

Zur Kontrolle wurden alle Konstrukte sequenziert und das Ergebnis über der Wormbase Blast ([http://wormbase.org/db/searches/blast\\_blat](http://wormbase.org/db/searches/blast_blat)) mit dem *C. elegans* Genom verglichen. Die Ergebnisse der Sequenzierungen sind im Anhang einzusehen (s. 8.3).

### 6.2.11 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 eine netzförmige Struktur 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 Puffer 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 Elektrophorese wurden bei durchschnittlich 100 V durchgeführt.

In die DNA-Proben wird als Auftragspuffer Bromphenolblau und Xylencyanol gegeben, welche als Lauffront sichtbar sind. Ist die Auftrennung lange genug erfolgt, kann das Ergebnis unter UV-Licht ( $\lambda=312$  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 lässt man einen Größenstandard mit DNA-Fragmenten definierter Größe auf dem Gel mitlaufen, so kann man anschließend die Laufstrecke der DNA mit der des Standards vergleichen.

Als Größenstandard wurden der Gene-Ruler™ 1 kB DNA-ladder (MBI Fermentas, St. Leon Rot, New England) verwendet.

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% Bromphenolblau; 0.25% Xylencyanol; 40%  
Glycerin

## 6.2.12 Manipulation von DNA

### 6.2.12.1 Restriktionsverdau von DNA

Um DNA zu analysieren, kann diese mit Restriktionsendonukleasen, welche ursprünglich aus Bakterien stammen, geschnitten werden. Die Restriktionsenzyme erkennen spezifische Sequenzen, so genannte Palindrome, mit einer Länge von 4-8 Basenpaaren. Viele Enzyme schneiden versetzt und hinterlassen überhängende Enden (sticky ends), einige wenige verursachen auch glatte Enden (blunt ends).

Ein Standardreaktionsansatz sieht folgendermaßen aus:

- x  $\mu$ l DNA-Lösung (je nach Konzentration)
- 1  $\mu$ l 10x Restriktionspuffer
- 1  $\mu$ l Enzym (10 U pro  $\mu$ g DNA)
- auf 20  $\mu$ l mit dH<sub>2</sub>O auffüllen

Der Restriktionsansatz wird bei 37 °C für 2 h inkubiert.

### 6.2.12.2 Ligation von DNA-Fragmenten

Geschnittene DNA-Fragmente mit kompatiblen Enden können miteinander verknüpft werden. Dies geschieht mit Hilfe der ATP-abhängigen T4-DNA-Ligase. Von Bedeutung ist dabei die Wahl des korrekten molaren Verhältnisses zwischen Vektor und Insert. Das Insert sollte in etwa 3-fachem molaren Überschuss eingesetzt werden. Folgende Faustformel kann zur Berechnung der Mengenverhältnisse eingesetzt werden:

X ng (Vektor) x kB (Insert)

kB (Vektor) x 3 = Y ng (Insert)

Das Reaktionsvolumen sollte möglichst klein gehalten werden (10–30 µl). Die Inkubation erfolgt grundsätzlich über Nacht bei 16 °C im Wasserbad. Ein Standard-Ligationsansatz sieht folgendermaßen aus:

X µl Vektor

Y µl Insert

1 µl 10x Puffer

1 µl T4-DNA-Ligase

auf 10 µl mit dH<sub>2</sub>O auffüllen

### 6.2.12.3 Fällung von DNA

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 DNA die Wassermoleküle entziehen und so für ihre Aggregation sorgen. Durch die in der Lösung ionisch vorliegenden Salze wird die DNA schließlich stabilisiert.

Die Fällung verläuft folgendermaßen:

- Zugabe von 2,5 Vol 100% Ethanol (-20 °C) oder 1 Vol Isopropanol (RT) und jeweils 1/10 Vol 3 M Natriumacetat pH 5,2
- 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 einem geeignetem Volumen dH<sub>2</sub>O bzw. DEPC-dH<sub>2</sub>O aufnehmen und resuspendieren

### 6.2.13 Elution von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen

Für Klonierungsarbeiten werden DNA-Moleküle mit geeigneten Restriktionsenzymen geschnitten und im Agarose-Gel der Größe nach aufgetrennt, die Fragmente gewünschter Größe können mit entsprechenden Methoden aus der Agarose isoliert werden. Sämtliche Elutionen wurden mit NucleoSpin Extract (Machery-Nagel, Düren) durchgeführt.

Lösungen:

Die Durchführung folgte den Herstellerangaben. Es wurden die mitgelieferten Puffer benutzt. Zur Elution der DNA wurden 30 µl dH<sub>2</sub>O (auf 65 °C vorgeheizt) verwendet.

### 6.2.14 Herstellung elektrokompetenter Bakterien

- 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; OD<sub>550</sub>) anwachsen lassen

- Die Bakterienkultur wird auf zwei 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.

Um die Kompetenzrate der so gewonnenen Bakterien zu testen (sie sollte mindestens  $5 \times 10^6$  betragen), wird folgendermaßen vorgegangen:

- Transformation mit Testvektor (pBluescript, 1 ng/l)
- 50 µl ausplattieren (10%-Platte) auf LB-Agarplatten mit 50-100 µg/ml Ampicillin
- Rest kurz abzentrifugieren, Überstand bis auf ca. 100 µl abziehen, Pellet im Restvolumen resuspendieren und ebenfalls ausplattieren (90%-Platte)
- Kompetenz (bezogen auf 1 µg Vektor) = Anzahl der Kolonien (10%-Platte) x 10 x 1000

Lösungen:

10% Glycerin SOB-Mg<sup>2+</sup>: 2% Bactotrypton, 0,5% Bactoyeast, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl

### 6.2.15 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
- 20-30 min bei 37 °C inkubieren
- Ansatz auf antibiotikahaltigen Agarplatten ausplattieren und ü.N. bei 37 °C inkubieren

## 6.2.16 Isolierung von Plasmid-DNA

### 6.2.16.1 Schnellpräparation von Plasmid-DNA (Mini-Präparation)

Um Bakterien schnell auf die enthaltene Plasmid-DNA zu testen, wird eine sogenannte „Minipräparation“ durchgeführt. Diese erfolgt nach einem modifizierten Rezept der Firma Machery und Nagel (Düren).

- Einzelkolonie ü.N. in ca. 3 ml LB (mit dem entsprechendem Antibiotikum) hochwachsen lassen
- ü.N.-Kultur (~ 1,5 ml) für ca. 2 min bei 13000 rpm zentrifugieren
- Bakterienpellet in 300 µl Puffer S1 resuspendieren
- 300 µl Puffer S2 hinzugeben und 5x invertieren und 5 min bei RT inkubieren lassen
- 300 µl Puffer S3 hinzugeben und 5x invertieren
- 15 min bei 13000rpm zentrifugieren und Überstand in ein frisches Eppendorf-Gefäß überführen
- Fällung mit 300 µl Isopropanol
- 30 min bei 13000 rpm zentrifugieren und Überstand verwerfen
- Pellet in 100 µl kaltem 70% Ethanol waschen und 15 min bei 13000 rpm zentrifugieren
- Überstand verwerfen, Pellet trocknen lassen und in 20 µl dH<sub>2</sub>O resuspendieren

Lösungen: (laut Herstellerangaben)

Puffer S1: 50 mM Tris/HCl (pH 8), 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNase A

Puffer S2 200 mM NaOH, 1% SDS (w/v)

Puffer S3: 2,8 M Kaliumacetat, pH 5,1

### 6.2.16.2 Gewinnung größerer Plasmidmengen

Um größere Mengen an Plasmid-DNA aus Bakterien zu isolieren, wird eine „Midipräparation“ durchgeführt. Hierbei wurde das Kitsystem der Firma Machery und Nagel (Düren) verwendet und nach dem Protokoll des Herstellers gearbeitet. Im Durchschnitt lag die DNA-Ausbeute bei 500 ng-1 µg pro µl, die DNA wurde in 50 µl dH<sub>2</sub>O aufgenommen.

Lösungen: (laut Herstellerangaben)

S1, S2, S3: siehe oben

N2: 100 mM Tris/H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, 15% Ethanol; 900 mM KCl, pH 6,3

N3: 100 mM Tris/H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, 15% Ethanol; 1150 mM KCl, pH 6,3

N5: 10 mM Tris/H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, 15% Ethanol; 1000 mM KCl, pH 8,5

### 6.2.17 In vitro Transkription

Doppelsträngige RNA für RNAi-Experimente wird ausgehend von den Fütterungskonstrukten (s. 6.2.10), welche 2 T7-Promotoren besitzen, oder einer cDNA die mit Primern hergestellt wurde, welche die T7-Promotorsequenz besitzen, in jeweils einer Reaktion durch *in vitro* Transkription hergestellt.

Herstellung des Templates:

Das Template für die Transkriptionsreaktion wird mittels einer Standard-PCR-Reaktion (s. 6.2.8) mit für den "Feedingvektor" pPD129.36 spezifischen Primern (s. 2.2.10) hergestellt. Es werden für die Reaktion ca. 2-3 µl der unaufgereinigten PCR eingesetzt.

Transkriptionsreaktion:

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

- 2 µl 10x Transkriptionspuffer
- je 1 µl rNTP's (also 4 µl gesamt)
- 1 µg (2-3 µl) Template-DNA
- 0,2 µl RNase Inhibitor
- 2 µl T7-Polymerase
- auf 20 µl mit DEPC-H<sub>2</sub>O auffüllen

Es folgt eine Inkubation für 2-4 h bei 37 °C. Dann werden je Ansatz 1 µl RNase freie DNase hinzugeben und 45 min bei 37 °C inkubiert. Es folgt eine Zugabe von 115 µl DEPC-Wasser und eine Zugabe von 15 µl Ammoniumacetat-Stopplösung zum Reaktionsstopp und zum Fällen der RNA. Nach Zugabe von 1 Vol Isopropanol fällt die RNA ü.N. bei -20 °C (siehe 6.2.12.3) und wird in 15 µl DEPC-Wasser resuspendiert.

Die RNA wird schließlich in Aliquots von 2 µl bei -70 °C aufbewahrt.

Lösungen:

Ammoniumacetat-Stopplösung: 5 M Ammoniumacetat,  
100 mM EDTA

### 6.2.18 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE dient dazu, die Proteine aus dem Gemisch nach ihrem Molekulargewicht aufzutrennen. Die Elektrophorese beruht auf einer elektrokinetischen Erscheinung, nämlich der Wanderung gelöster und geladener Teilchen im elektrischen Feld. Aufgrund dieses Effektes wird die Elektrophorese als analytisches Trennverfahren angewendet. Es wird zwischen dem großporigen Sammelgel (5% PAA) und dem engporigen Trenngel (8-18% PAA) unterschieden, wobei der pH-Wert im Sammelgel bei 6,8 und im Trenngel bei 8,8 liegt.

Das Proteinhomogenisat wird mit dem anionischen Detergens SDS behandelt, welches über hydrophobe Wechselwirkungen einen Bindungscharakter zu den Proteinen besitzt. Dadurch erhält der Protein-SDS-Komplex einen anionischen Charakter. Wird Spannung an das Gel gelegt, so kommt es zu einer Wanderung der Proteine in Proportionalität zu ihrer Masse zur Anode. Dabei sollten sich gleichgroße Proteine identisch verhalten, da sie entfaltet vorliegen und dieselbe Menge an SDS gebunden haben. Größere Proteine besitzen aufgrund ihrer Fähigkeit mehr SDS zu binden eine höhere Ladung und sollten sich im elektrischen Feld schneller bewegen als kleinere Proteine. Allerdings sinkt die Mobilität mit zunehmender Molekülgröße, da die immer kleiner werdende Porengröße den größeren Molekülen einen steigenden Widerstand entgegenbringt, so dass im Endeffekt die Proteine nach ihrer Masse getrennt im Gel vorliegen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit Trenngelen gearbeitet, die einen Anteil von 10% Polyacrylamid/Bisacrylamid (30%; 29:1, BioRad) besaßen.

Folgende Tabelle zeigt die Komponenten von Trenn- und Sammelgel:

Komponenten	Trenngel 10%	Sammelgel 5%
Acrylamid/Bis-	2,5 ml	310 µl
1M Tris/Cl pH*	2,8 ml	235 µl
10% SDS	76 µl	20 µl
dH <sub>2</sub> O	2,1 ml	1,3 ml
10% APS	30 µl	10 µl
TEMED	8 µl	5 µl

**Tab. MM2: Gezeigt ist die Zusammensetzung der Komponenten in Trenn- und Sammelgel.**  
pH\*: Trenngel: pH 8,8; Sammelgel: pH 6,8).

Zur Durchführung der SDS-PAGE wurde die Apparatur Mini Protean II oder III (BioRad, München) verwendet. Die Glasplatten, Abstandhalter und der Kamm werden mit Ethanol gereinigt und zusammengebaut. Das gewünschte Trenngel wird zwischen die Glasplatten bis ca. 1,5 cm unterhalb des unteren Randes des Kamms gegossen. Die Lösung wird, um ein Austrocknen zu verhindern, mit ca. 0,5 ml Isopropanol überschichtet. Vor Zugabe des Sammelgels wird das Isopropanol entfernt. Anschließend wird der Kamm luftblasenfrei in das Sammelgel eingehängt. Die Polymerisation des Sammelgels dauert ca. 30-45 min. Anschließend wird das polymerisierte Gel in die Laufkammer gehängt, mit 1x SDS-Elektrophoresepuffer überschichtet und der Kamm entfernt. Die Proteinproben, falls erforderlich, auf Eis auftauen lassen, mit dem gleichen Volumen 2x SDS-Probenpuffer mischen und für 5 min bei 100 °C im Wasserbad erhitzen. Anschließend direkt auf Eis abkühlen lassen. Das Proteingemisch wird in die Probenaschen gefüllt (Konz.: ~40 µg Proteingemisch/Probenasche). Ebenfalls aufgetragen wird ein Protein-

Größenstandard (Benchmark Prestained, Gibco; Standard Protein ladder, BioRad). Der Gellauf erfolgt für ca. 60 min bei 200 V.

Lösungen:

10x SDS-Elektrophoresepuffer:	1,92 M Glycin; 0,25 M Tris und 1% (w/v) SDS
2x SDS-Probenpuffer:	100 mM Tris/Cl pH 6,8; 200 mM Dithiothreitol; 4% (w/v) SDS; 0,2% Bromphenolblau und 20% Glycerin

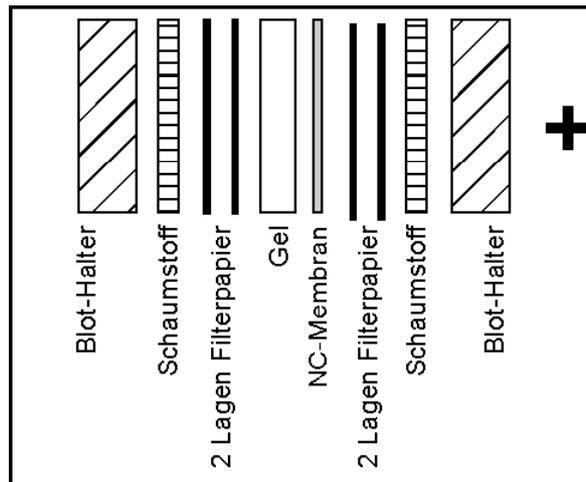
### 6.2.19 Coomassie-Färbung von Proteingelen

Um Proteinbanden in einem SDS-Gel deutlich sichtbar zu machen, wird dieses mit Coomassie-Farbstoff (Roti-Blue; Carl Roth GmbH & Co; Karlsruhe) gefärbt. Zu 60 ml Wasser werden 20 ml Methanol und 20 ml Coomassie unter Rühren hinzu gegeben. Das Gel wird anschließend für ca. 1 h in der Färbelösung (ca. 40 ml) inkubiert. Um die gefärbten Proteinbanden gegen den, ebenfalls gefärbten Hintergrund hervorzuheben, wird das Gel anschließend für ca. 2 h in 20% Methanol (ca. 40 ml) bei RT entfärbt. Anschließend wird das Gel in Haushaltsfolie mit etwas Wasser eingeschweißt. Die Größen der Proteinbanden lassen sich anhand des mitgelaufenen Standards abmessen.

### 6.2.20 Immuno-Blotting (Western-Blotting)

Der Western Blot dient zur Transferierung von Proteinen aus einem Gel auf eine Nitrocellulose-Membran. Die auf die Membran übertragenen Proteine besitzen die gleiche Anordnung wie auf dem Gel. Durch die Übertragung sind die Proteine für die anschließende Immunofärbung durch spezifische Antikörper leichter zugänglich. Die Übertragung verläuft nach elektrophoretischem Muster, d.h. es wird eine Transferierung über das Anlegen von Strom bewirkt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden sämtliche Western Blots mit der Mini Protean II/IIIApparatur (BioRad; München) durchgeführt. Eine Lage Nitrozellulosemembran und 4 Lagen Filterpapier werden auf die Größe des Trenngels zurechtgeschnitten. Die Nitrozellulosemembran wird erst in dH<sub>2</sub>O und anschließend in 1x Western-Transferpuffer für je 2 min äquilibriert. Nach Beendigung des Gellaufs wird das Sammelgel entfernt und das Trenngel nach folgendem Schema in die Blotting-Apparatur eingelegt:



**Abb MM1: Schematische Darstellung des Aufbaus eines Western Blots.**

Die gesamte Apparatur ist mit 1x Western-Transferpuffer überschichtet. Die Polarität der Elektroden ist seitlich mit (+) angegeben. Bei Stromfluß werden die im Gel aufgetrennten Proteine auf die Nitrocellulosemembran (NC-Membran) übertragen. Beide Blot-Halter bilden zusammen eine Klammer, in die die übrigen Komponenten eingespannt sind. Wichtig ist, dass sich keine Luftblasen zwischen Filter, Gel und Membran befinden. Die Blotting-Apparatur wird in die Transferkammer gehängt und mit 1x Western- Transferpuffer überschichtet. Der Immunoblot wird für eine Stunde mit 100 V bei 4 °C durchgeführt. Nach Beendigung des Blottings wird die Apparatur abgebaut und wie folgt vorgegangen:

- NC-Membran mit Wasser waschen, um vorhandene Polyacrylamid-Partikel zu entfernen
- Blocken der Membran in 50 ml Blockierlösung 1 h bei RT, um unspezifische Bindestellen für den Antikörper abzusättigen
- Mischen des gewünschten Antikörpers in der entsprechenden Verdünnung mit 3 ml Blockierlösung 1
- Entfernen der 50 ml Blockierlösung 1 und Einschweißen von Membran und Antikörperlösung in Haushaltsfolie
- Inkubation des ersten Antikörpers für 2 bis 3 h bei RT oder über Nacht bei 4 °C
- 3x5 min in TBST bei RT waschen
- Zweit-Antikörper (HRP-gekoppelt) 1:10000 in 50 ml Blockierlösung 2 verdünnen
- Membran für eine Stunde bei RT mit Zweit-Antikörperlösung inkubieren
- 3x5 min in TBST bei RT waschen
- Während des ersten Waschgangs Chemilumineszenzsubstrate (3 ml) mischen und auf RT erwärmen lassen
- Inkubation der Membran mit dem Chemilumineszenzsubstrat (BM Chemilumineszenz Blotting Substrate (POD), Boehringer Roche Diagnostics, Mannheim) für 1 min.

- Membran in Frischhaltefolie verpacken und auf Röntgenfilm exponieren.

Lösungen:

10x Western-Transferpuffer: 1,92 M Glycin, 1,5 M NaCl; für 1x Puffer mit 20%-Methanol verdünnen

TBST: 20 mM Tris/Cl pH 8,0  
150 mM NaCl  
0.2% Tween 20

Blockierlösung 1: 3% fettfreies Milchpulver; 1% BSA; 0,02% Natriumazid; gelöst in TBST

Blockierlösung 2: wie Blockierlösung 1; ohne Natriumazid

Die quantitative Analyse des Western-Blots, wurde mit Hilfe eines Las3000 Photoimagers (Fuji) und mittels ImageQuant 5.2 Software (Molecular Dynamics) durchgeführt.

## 6.3 Zellbiologische Methoden

### 6.3.1 Verwendete *C. elegans*-Stämme und Haltung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Stamm N2 (Varietät Bristol) als Wildtypstamm verwendet. Er wird unter Standardbedingungen (Brenner, 1974) im Labor auf Agarplatten entweder bei 15 °C, 18 °C oder zur Beschleunigung des Wachstums bei 25 °C gehalten. Als Nahrungsquelle dient der Uracil bedürftige *E.coli*-Stamm OP50. Die Stämme SU93 *ajm-1::gfp* (*jcls1 IV*), NL2099 (*rrf-3(pk1426) II*), NL2098 (*rrf-1(pk1417) I*), (Sijen et al., 2001); und PS3653 (*ipp-5(sy605) X*), (Bui und Sternberg, 2002), NL2099 (*rrf-3(pk1426)II*), (Simmer et al., 2002); SU180 (*itr-1(jc5) jcls1 IV*), und PS2582 (*itr-1(sy290) unc-24(e138)IV*) (Clandinin et al., 1998), WM27 (*rde-1(ne219) V*), (freundlicherweise vom *Caenorhabditis* Genetic Center, CGC zur Verfügung gestellt), OLB11 (*rde-1(ne219); elt-2::rde-1+*; McGhee et al., 2009; Pilipiuk et al., 2009); FZ223 *dlg-1::gfp* (freundlicherweise von M. Labouesse und FJ. Zwartkruis zur Verfügung gestellt); *let-413::cfp* Reporterstamm trägt das pML801 Plasmid (freundlicherweise von M. Labouesse zur Verfügung gestellt) und wurde stabil ins Genom integriert (Pilipiuk, 2006).

Die Mutanten

- *dpy-11(e224) let-413(s128)unc-42(e270)/rol-3(e754);ipp-5(sy605)*
- *dpy-11(e224) let-413(s14531)/unc-42(e270)rol-3(e754);ipp-5(sy605)*
- *dpy-11(e224) let-413(s1451)/unc-42(e270)rol-3(e754);ipp-5(sy605)*
- *dpy-11(e224) let-413(s1455)/unc-42(e270)rol-3(e754);ipp-5(sy605)*
- *ipp-5(sy605); ls[let-413::gfp;rol-6(su1006)]*

wurden über klassische Kreuzungen generiert (Christophe Lefebvre; Pilipiuk et al., 2009).

#### 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 (per Liter):

Lösung A: 5 g Cholesterin in EtOH

Lösung B: 110,8 g CaCl<sub>2</sub>

Lösung C: 246,5 g MgSO<sub>4</sub> x 1H<sub>2</sub>O

Lösung D: 108,3 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 36 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

### 6.3.2 Einfrieren zur Konservierung von *C. elegans* Stämmen

Zur dauerhaften Kryokonservierung werden mehrere Tiere auf eine NGM-Platte überführt und solange inkubiert bis kein Futter mehr auf der Platte befindet und möglichst viele L1- und L2-Tiere vorhanden sind. Die Würmer wurden mit 2 ml M9 Puffer von den NGM-Platten gespült, in 5 Kryoröhrchen mit jeweils 300 µl überführt. Anschließend wird jeweils 300 µl Einfriermedium in die Kryoröhrchen gegeben, welche in einer Styroporbox bei -70 °C eingefriert werden. Durch die Styroporbox wird ein schonendes Einfrieren gewährleistet. Zur permanenten Lagerung werden die Tiere einen Tag später in flüssigen Stickstoff überführt. Bei Bedarf wird der Inhalt eines aufgetauten Kryoröhrchens auf mehrere NGM-Platten verteilt und die lebenden Würmer nach zwei Tagen auf frische Platten umgesetzt.

Lösungen:

M9-Puffer:	41 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
	25 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	10 mM NaCl
	20 mM NH <sub>4</sub> Cl
Einfriermedium	200 mM NaCl
	100 mM KPO <sub>4</sub> (pH 6,0)
	60% Glycerin (v/v)
	0,3 mM MgSO <sub>4</sub>

### 6.3.3 Synchronisierung einer *C. elegans*-Population

Um eine semi-synchrone *C. elegans*-Population zu erhalten wird eine Platte mit vielen adulten Hermaphroditen mit PBS abgewaschen, in ein Reaktionsgefäß überführt und wie folgt behandelt:

- 1 min bei 2000rpm zentrifugieren
- der Überstand wird verworfen
- 1 ml PBS und 500 µl frisch angesetzte Synchronisierungslösung hinzu geben
- Für 8 min inkubieren lassen
- für 2 min bei 2000 rpm zentrifugieren und der Überstand verworfen

Mit dieser Methode werden die Embryonen aus den adulten Tieren isoliert und Larven, bzw. Adulte werden zersetzt. Das erhaltende Pellet, welches lebensfähige Embryonen enthält, wird einmal mit PBS gewaschen und nach einer weiteren Zentrifugation auf frische Agarplatten verteilt (z.B. 2 µl für eine kleine RNAi Fütterungsplatte).

Lösungen:

Synchronisierungslösung:	3 Vol 13% NaOCl, 2 Vol 4 M NaOH
PBS (pro Liter):	8 g NaCl; 0,2 g KCl; 1,44 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; 0,24 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH 7,4

### 6.3.4 Herstellung Agarose-beschichteter Objektträger und Deckgläser

#### 6.3.4.1 Für *in vivo*-Beobachtung

Um Embryonen *in vivo* beobachten zu können (s. 2.3.7) werden sie auf Agarose-beschichtete Objektträger transferiert. Hierfür wird eine 2-3% Agaroselösung in dH<sub>2</sub>O 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.

#### 6.3.4.2 Für Mikroinjektion

Für die Mikroinjektion (s. 6.3.11.1) werden Agarose-beschichtete Deckgläser benötigt. Hierfür wird ebenfalls eine 2-3% Agaroselösung in dH<sub>2</sub>O aufgekocht. Diese wird auf einem Deckglas gespreizt und 2-3 h bei 70 °C bis zur Austrocknung der Agarose inkubiert.

### 6.3.5 Herstellung Polylysin-beschichteter Objektträger

Für Antikörperfärbungen an Embryonen (s. 6.3.6; 6.3.9) 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 dH<sub>2</sub>O auf 60 °C erwärmen
- 400 mg Gelatine darin lösen und auf 40 °C abkühlen lassen
- 40 mg CrK(SO)<sub>2</sub> x 12H<sub>2</sub>O hinzufügen und gut vermischen
- Jeweils 1 ml dieser Lösung mit 1mg 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.

### 6.3.6 Präparation von Embryonen

Um Embryonen zu präparieren, werden adulte Hermaphroditen von einer Agarplatte in einen Tropfen dH<sub>2</sub>O auf einen Objektträger transferiert. Mit Hilfe eines Skalpell werden die Würmer zerschnitten, so dass durch den Innendruck im Nematoden die Embryonen freigesetzt werden. Unter Beobachtung mit dem Binokular werden die isolierten Embryonen mit einer fein ausgezogenen Pasteurpipette, an die einem Schlauch plus Mundstück gekoppelt ist, aufgesaugt und für weitergehende

Untersuchungen auf einen Agarose- bzw. Polylysinbeschichteten Objektträger überführt.

### 6.3.7 *In vivo*-Beobachtungen

Für *in vivo*-Beobachtungen werden präparierte Embryonen und Larven mit etwas dH<sub>2</sub>O auf einen mit Agarose beschichteten Objektträger gegeben. Zum Versiegeln des Präparates wird ein mit Vaseline umrandetes Deckglas aufgelegt. Durch leichten Druck auf die Ränder des Deckglases werden die Embryonen und Larven etwas gequetscht, so dass eine optimale mikroskopische Beobachtung gewährleistet ist. Mit Hilfe der **Differential-Interferenz-Kontrast-Mikroskopie** (DIK-Mikroskopie) werden die Embryonen und Larven beobachtet.

### 6.3.8 Antikörperfärbung an Embryonen/Larven/Gonaden

Präparierte Embryonen werden mit einem Tropfen dH<sub>2</sub>O auf Polylysin-beschichtete Objektträger transferiert. Nach kurzer Zeit kleben die Embryonen am Polylysin fest, was durch Anstrudeln der Embryonen zu überprüfen ist. Anschließend wird ein Deckglas aufgelegt. Die Embryonen werden durch Absaugen des Wassers unter dem Deckglas mit Hilfe eines Zelltuches leicht gequetscht. Dieser Punkt ist besonders kritisch, da die Embryonen bei zu starkem Quetschen platzen und bei zu schwachem Quetschen anschließend die Eihülle nicht weggesprengt wird und so keine Fixierung des Embryos ermöglicht wird.

Sofort nach dem Quetschen wird der Objektträger für einige Minuten in flüssigen Stickstoff getaucht und dann das Deckglas mit einem Skalpell weggesprengt, wobei die Eihülle und Vitellinmembran entfernt werden.

Danach folgt die Fixierung:

- 10 min in Methanol bei -20 °C
- 20 min in Aceton bei -20 °C
- 5 min in 90% Ethanol bei -20 °C
- 5 min in 60% Ethanol bei -20 °C
- 5 min in 30% Ethanol bei RT
- 2x 10 min waschen in TBST bei RT

Der primäre Antikörper wird in Blockierlösung nach Bedarf verdünnt und in einem Volumen von 30-45 µl auf den Objektträger gegeben. Die Inkubation erfolgt in einer feuchten Kammer über Nacht bei 4 °C oder für 2 h bei RT. Im Anschluss wird der Objektträger für 2x5 min bei RT in TBST gewaschen. Der Sekundärantikörper, gekoppelt mit einem Fluorochrom, wird 1:200 in Blockierlösung verdünnt und auf den Objektträger gegeben (ebenfalls 30-45 µl). Die Inkubation erfolgt in einer feuchten Kammer für 2 h bei RT. Anschließend wird der Objektträger wieder für 2x5 min bei RT in TBST gewaschen. Ist eine DNA-Färbung erwünscht, wird das Präparat in 30 µl DNA-Färbelösung für 30-40 min inkubiert und erneut 2x5 min in TBST gewaschen. Schließlich wird ein Tropfen Mowiol auf den Objektträger gegeben und mit einem

Deckglas versiegelt. Die Präparate werden bei 4 °C gelagert. Als Sekundärantikörper werden Cy2, Cy3 bzw. Cy5 gekoppelte Antikörper aus dem Esel verwendet (Jackson ImmunoResearch, Soham, England). Die Auswertung der Präparate erfolgte am konfokalen Lasermikroskop.

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, USA) und RNase H (1 mg/ml, 1:10000) in TBST

Mowiol:

- 5 g Elvanol (Höchst) in 20 ml 1xPBS pH 7,4 lösen
- 16 h rühren
- 10 mg Glycerin hinzufügen
- 16 h rühren
- 15 min bei 12000 rpm zentrifugieren und Überstand abnehmen
- Jeweils eine Spatelspitze DABCO (1.4-Diazabicyclo[2,2,2]octan) als Ausbleichschutz unter je 1 ml Mowiol mischen.

Folgende Tabelle zeigt eine Auflistung der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Antikörper:

Bezeichnung	Ursprung	Erkennt	Eingesetzt	Referenz
anti-4A1	Maus	$\alpha$ -Tubulin	1:50	Piperno und Fuller, 1985
MH27 (anti-AJM-1)	Maus	AJM-1 Komponente der CeAJ	1:10	Francis und Waterston, 1985
MH33 (anti-IFB-2)	Maus	Intermediärfilament IFB-2, apikale Lokalisation in den Darmzellen	1:100	Francis und Waterston, 1985; Bossinger et al., 2004
anti-DLG-1	Kaninchen	DLG-1 Komponente der CeAJ	1:16000	Segbert et al., 2004
anti-ERM-1	Kaninchen	ERM-1	1:200	van Fürden et al., 2004
anti-GFP	Kaninchen	GFP-1	1:100	Molecular Probes, Leiden; NL
anti-GFP	Maus	GFP-1	1:100	Molecular Probes, Leiden; NL
anti-LET-413	Kaninchen	LET-413	1:1000	Aono et al., 2004
anti-PAR-3	Maus	PAR-3	1:50	Nance et al., 2003

Tab. MM3: Tabelle der verwendeten primären Antikörper

### 6.3.9 Aktinfärbung an Embryonen

Präparierte Embryonen werden in einem Tropfen dH<sub>2</sub>O auf einen Polylysinbeschichteten Objektträger transferiert und für 2min in einer Fixierlösung mit 4% Paraformaldehyd und 0,1 mg/ml Lysolecithin (Sigma) zum Andauen der Eihülle inkubiert. Anschließend erfolgt eine 20-minütige 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 Aktinfilamente und verhindert deren Depolymerisation. Anschließend werden die Embryonen erneut 2x10 min in PBST gewaschen und

schließlich mit 10 µl ProLong® Antifade Kit (Molecular Probes) eingedeckelt. Die Auswertung erfolgt am konfokalen Lasermikroskop.

Lösungen:

Fixierlösung:	4% Paraformaldehyd in 60 mM Pipes; 25 mM Hepes; 10 mM EGTA; 2 mM MgCl <sub>2</sub> ; pH 6,8; zusätzlich 0,1 mg/ml Lysolecithin (Sigma)
PBS (pro Liter):	8 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,44 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 0,24 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 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	200 U/ml in Methanol (Molecular Probes, Inc., Eugene, USA)

### 6.3.10 Doppelfärbung eines Antikörpers mit Phalloidin

- Adulte Würmer in einem Tropfen dH<sub>2</sub>O 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 absprennen
- Sofort auf den noch gefrorenen Objektträger das Fixativ/Phalloidin-Gemisch (ca. 100 µl) geben, mit einem Deckglas (18x18 mm) bedecken und 30 min bei -20 °C inkubieren
- 2x10 min mit PBST waschen
- 1 h mit FITC-Phalloidin (1:100 in PBST) bzw. Alexa-Phalloidin (1:25 in PBST) bei RT nachfärben (ca. 50 µl pro Präparat)
- 2x 10min mit PBST waschen
- Antikörper entsprechend in PBST verdünnen und ca. 50 µl auf den Objektträger geben
- ü.N. 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 <sub>2</sub> 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)

### 6.3.11 Die Technik der „RNA-mediated interference“ (RNAi)

#### 6.3.11.1 RNAi per Mikroinjektion

Um in *C. elegans* mit Hilfe der RNAi Technik ein bestimmtes Gen auszuschalten, wird in die Gonade dsRNA injiziert (Fire et al., 1998). 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 dH<sub>2</sub>O 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 (10S) befindet. Mit Hilfe einer an einer Pipette klebenden Wimper wird der Wurm auf die Agarose gedrückt, dadurch dehydratisiert 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-facher 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 1x 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.

#### 6.3.11.2 RNAi über Fütterung von Bakterien

RNAi kann über das Füttern spezieller RNase III-defizienter Bakterien (HT115[DE3], s. 6.2.2) erfolgen (Kamath et al., 2001). Diese Bakterien müssen die Zielsequenz der RNAi in einem bestimmten Vektor (pPD129.36, s. 6.2.3) enthalten. Zur Induktion der dsRNA werden 40 µl IPTG (1 mM Endkonzentration) auf einer kleinen Agarplatte (Durchmesser 5,3 cm; Ampicillin- und Tetracyclin-Selektion) ausgestrichen. Anschließend werden 120 µl einer ü.N. Kultur der HT115[DE3]-Zellen auf diese IPTG-Agarplatten gegeben und über Nacht bei RT inkubiert.

Um ein embryonales RNAi Experiment zu starten werden L4-Larven auf die Platten gegeben und für mindestens 24 h bei 15 °C gehalten und auf neue Platten umgesetzt. Die auf diesen Platten abgelegten Embryonen wurden weiter ausgewertet. Im Gegensatz dazu wird ein postembryonales RNAi Experiment mit L1-

Larven oder einer semi-synchronen Embryonenpopulation (s. 6.3.3) gestartet und nach 72 h auf neue Platten überführt. Die Larven nehmen nach dem Schlüpfen die Bakterien auf und zeigen ggf. während der Postembryogenese Defekte, die weiter beobachtet und dokumentiert werden können. Als Kontrolle wurden die Embryonen auf Platten mit HT115[DE3] Bakterien angesetzt, die den RNAi Vektor (pPD129.36; Kamath et al., 2001) ohne eine Zielsequenz trugen, und entsprechend ausgewertet.

### 6.3.12 Ermittlung der Sterilitätsrate mittels statistischer Auszählung der Nachkommen

Mittels der postembryonalen RNAi kann man einen Phänotyp im adulten Hermaphroditen erzeugen. Dafür werden Embryonen auf RNAi-Platten gegeben und spätestens nach 72 h auf frische Platten umgesetzt, da sonst ein schwächerer RNAi Effekt zu beobachten war. Die Haltung erfolgte standardmäßig bei 15 °C. Nach insgesamt 102 h Entwicklungszeit waren die Tiere späte L4-Larven bzw. junge Adulte. Dann wurden sie zu je 3 Tieren auf neue Platten gesetzt. Nach weiteren 67 h werden die Adulten von den Platten herunter gesammelt und ihre Nachkommen ausgezählt.

Diese Auszählungen wurden vom jeweiligen Versuch öfter durchgeführt und von diesen Zahlen wurde ein Mittelwert pro Hermaphrodit berechnet. Die Standardabweichung wurde mit Hilfe von Microsoft® Office Excel 2003 errechnet. Die Ergebnisse wurden schließlich graphisch mittels Excel ausgewertet.

Mittelwertberechnung:

$$\bar{x} := \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N x_i$$

Standardabweichung:

$$\sigma_{\bar{x}} = \frac{\sigma_x}{\sqrt{N}} = \sqrt{\frac{1}{N(N-1)} \sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}$$

Da unterschiedliche genetische Hintergründe (z.B. in mutanten Stämmen) der Durchschnitt der produzierten Nachkommen variieren kann, war es nötig die Ergebnisse in prozentualen Raten umzurechnen. Dabei war die durchschnittliche Nachkommenzahl der Kontrolle der Grundwert. Somit konnte die Veränderung der Nachkommenproduktion nach postembryonaler RNAi auch in verschiedenen Stämmen miteinander verglichen werden.

Dies wurde wie folgt errechnet.

Jedes Ergebnis einer Auszählung wurde mit dem Durchschnitt der Kontrolle geteilt und mit 100 multipliziert. Damit errechnete sich die Fertilitätsrate in %. Die Sterilitätsrate ist die Differenz des Grundwerts (100%) und der Fertilitätsrate in %.

G = Grundwert = Durchschnittliche Nachkommenproduktion der Kontrolle

E = Anzahl der Nachkommen im Einzelexperiment

F = Fertilitätsrate in % =  $E \times 100 / D$

S = Sterilitätsrate in % =  $100 - ((D/E) \times 100) = 100 - F$

Beispiel zum Verständnis:

Stamm XY legte im Durchschnitt 150 Embryonen und Stamm YZ nur 80 unter gleichen Bedingungen. Um die Auswirkung einer postembryonalen RNAi untersuchen zu können, gelten diese Durchschnittswerte als Grundwert für die prozentualen Angaben der RNAi Auswirkungen. Stamm XY produzierte nach RNAi noch in einem Experiment 30 Nachkommen. Stamm YZ legte 35 Embryonen ab. Um diese Werte vergleichen zu können, werden die Ergebnisse durch den Grundwert dividiert und in Prozent umgerechnet.

Stamm XY =  $30/150 \times 100 = 20\%$  Fertilität = 80% Sterilität

Stamm YZ =  $35/85 \times 100 = 43,8\%$  Fertilität = 56,2% Sterilität

Dies wurde für jedes Einzelexperiment durchgeführt um Standardabweichungen und t-Test zur Signifikanzberechnung durchführen zu können.

t-Test:

Es wurde ein Zweistichproben t-Test durchgeführt, da 2 unabhängige Versuchsreihen auf Signifikanz getestet wurden. Da die Varianz der zwei Stichproben ungleich war (heteroskedastisch) wurde folgende Formel von Excel verwendet:

$$T = \frac{\bar{x} - \bar{y}}{s \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{1}{m}}}$$

### 6.3.13 EGTA Test

EGTA (=Ethylenglykol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-Tetraessigsäure) ist ein  $\text{Ca}^{2+}$ -Chelator und wurde den *C. elegans* Fütterungsplatten hinzu gegeben um Einfluss auf den  $\text{Ca}^{2+}$ -Haushalt der Zellen zu nehmen. Die Endkonzentration in den Platten sollte 20 mM betragen. Dazu wurde zunächst eine 500 mM Stammlösung angesetzt. Damit das EGTA in Wasser löslich ist, musste NaOH hinzugeben werden. Anschließend wurde der pH-Wert auf 7,5 mit HCl eingestellt. Das EGTA wurde direkt vor dem Gießen der Platten in das warme Medium zugesetzt.

### 6.3.14 EMS-Mutagenese-*let-413*-Suppressor-Screen

Im Rahmen dieser Arbeit wurde Ethylmethansulfonat (EMS) verwendet, um Mutationen im *C. elegans* Genom hervorzurufen. EMS verursacht vornehmlich Punktmutationen.

In dem hier durchgeführten Screen wurden L4-Larven der P0-Generation mit EMS behandelt, was in deren Keimbahn Mutationsereignisse erzeugt, so dass die F1-Generation zwei separat mutagenisierte haploide Chromosomensätze aufweist. Rezessive Mutationen werden dementsprechend erst in der F2-Generation ausgeprägt, da dann die Mutationen erstmals homozygot auftreten können. Demzufolge wurde die zweite Filialgeneration auf die Suppression des *let-413(RNAi)* Phänotyps untersucht.

Zunächst wurden große NGM-Agarplatten benötigt, welche eine möglichst dichte Population von vornehmlich jungen L4-Stadien aufwies. Die Tiere wurden mit M9-Medium von den Platten in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt, zweimal mit M9 gewaschen und schließlich in einem Endvolumen von 4 ml aufgenommen. Dazu wurden nun 20 µl EMS gegeben, um eine Endkonzentration von ca. 47 mM zu erhalten. Die Würmer wurden so für 4 h bei Raumtemperatur in einem Taumelschüttler unter einem Abzug inkubiert. Alle mit EMS in Berührung gekommenen Spitzen, Handschuhe und Reaktionsgefäße wurden gesondert gesammelt und anschließend in einer EMS- Inaktivierungslösung dekontaminiert. Nach der Inkubation wurde die EMS-Lösung abgenommen und die Tiere zweimal mit M9-Medium gewaschen. Die Tiere wurden nun auf 2 große NGM-Agarplatten verteilt und für mindestens 2 h bei Raumtemperatur inkubiert.

Anschließend wurden jeweils 10-15 junge Adulte auf 10 große NGM-Platten überführt und lies diese bei 25 °C für ca. 6 h Embryonen ablegen. Nach 3 Tagen ist diese F1 Generation adult und beginnt die F2 abzulegen. Die Adulten und die ersten L1-Larven werden von den Platten gewaschen um möglichst viele F2-Eier auf der Platte zu hinterlassen. Einen Tag später wurden die frisch geschlüpften L1-Larven auf *let-413(RNAi)* Fütterungsplatten Platten verteilt.

Nach 3 Tagen konnten die Platten nach fertilen Tieren überprüft werden um so Suppressionsmutanten zu finden. Die gefundenen fertilen Tiere wurden auf kleine NGM-Platten vereinzelt um so Screen-Linien erhalten zu können. Die erhaltenen Linien wurden auf 24er Mikrotiterplatten mit *mkpl-1(RNAi)* Fütterungsbakterien auf RNAi Resistenz getestet, um so die Mutationen in Genen die für die RNAi Maschinerie nötig sind, aus zu sortieren. Übrig gebliebene potentielle *let-413(RNAi)* Suppressoren wurden wiederholt auf *let-413(RNAi)* getestet.

EMS-Inaktivierungslösung:

0,1 M NaOH

20% NaS<sub>2</sub>O<sub>3</sub>

### **6.3.15 Elektronenmikroskopie**

Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse mittels Elektronenmikroskopie wurden von unserem Kollaborationspartner Christophe Lefebvre aus dem Labor von Renaud Legouis durchgeführt. Die Fixierung erfolgte wie in der Arbeit Legouis et al., 2000. beschrieben. Die Tiere werden auf Agarose-Objektträger mit 4% Glutaraldehyde platziert und mittels Laser-Perforation für das Fixativ durchlässig gemacht. Die Fixierung wird ü.N. inkubiert. Anschließend erfolgen weitere Fixierungsschritte mit Osmiumtetroxide und Uranylacetat. Die anschließende Auswertung wurde an einem Philips EM208 Mikroskop durchgeführt.

### **6.3.16 Anzahl der Auswertungen**

Alle Auswertungen mit DIK-, Fluoreszenz oder hochauflösender konfokaler Lasermikroskopie wurden, wenn nicht anders erwähnt, mindestens 30-mal durchgeführt.

## 7 Literaturverzeichnis

- Ahringer, J. (2006). Reverse genetics. *WormBook*, ed. The C. elegans Research Community, WormBook, doi/10.1895/wormbook.1.47.1, <http://www.wormbook.org>.
- Akhtar, N., Hotchin, N. A. (2001). RAC1 regulates adherens junctions through endocytosis of E-cadherin. *Mol Biol Cell* **12**, 847-62.
- Albertson, D. G. (1984). Formation of the first cleavage spindle in nematode embryos. *Dev Biol* **101**, 61-72.
- Albertson, D. G. und Thomson J. N. (1993). Segregation of holocentric chromosomes at meiosis in the nematode, *Caenorhabditis elegans*. *Chromosome Res* **1**, 15-26.
- Anastasiadis, P. Z. und Reynolds, A. B. (2001). Regulation of Rho GTPases by p120-catenin. *Curr Opin Cell Biol* **13**, 604-10.
- Aoki, K., Moriguchi, H., Yoshioka, T., Okawa, K. und Tabara, H. (2007). In vitro analyses of the production and activity of secondary small interfering RNAs in *C. elegans*. *EMBO J* **26**, 5007-5019.
- Aono, S., Legouis, R., Hoose, W. A. und Kemphues, K.J. (2004). PAR-3 is required for epithelial cell polarity in the distal spermatheca of *C. elegans*. *Development* **131**, 2865-74.
- Aroian, R. V., Koga, M., Mendel, J. E., Ohshima, Y. und Sternberg P. W. (1990). The *let-23* gene necessary for *Caenorhabditis elegans* vulval induction encodes a tyrosine kinase of the EGF receptor subfamily. *Nature* **348**, 693-9.
- Asano, A., Asano, K., Sasaki, H., Furuse, M. und Tsukita, S. (2003) Claudins in *Caenorhabditis elegans*: their distribution and barrier function in the epithelium. *Curr Biol* **13**, 1042-6.
- Assémat, E., Bazellères, E., Pallesi-Pocachard, E., Le Bivic, A. und Massey-Harroche, D. (2008). Polarity complex proteins. *Biochim Biophys Acta* **1778**, 614-30.
- Austin, J. und Kimble, J. (1987). *glp-1* is required in the germ line for regulation of the decision between mitosis and meiosis in *C. elegans*. *Cell* **20**, 589-99.
- Balklava, Z., Pant, S., Fares, H. und Grant, B. D. (2007). Genome-wide analysis identifies a general requirement for polarity proteins in endocytic traffic. *Nat Cell Biol* **9**, 1066-73.
- Balla, T., Szentpetery, Z. und Kim, Y. J. (2009). Phosphoinositide signaling: new tools and insights. *Physiology (Bethesda)* **24**, 231-44.

- Bazellieres, E., Assemat, E., Arsanto, J. P., Le Bivic, A. und Massey-Harroche, D. (2009). Crumbs proteins in epithelial morphogenesis. *Front Biosci* **14**, 2149-69.
- Bednarek, E. M., Schaheen, L., Gaubatz, J., Jorgensen, E. M. und Fares, H. (2007). The plasma membrane calcium ATPase MCA-3 is required for clathrin-mediated endocytosis in scavenger cells of *Caenorhabditis elegans*. *Traffic* **8**, 543-53.
- Berger, S., Bulgakova, N. A., Grawe, F., Johnson, K. und Knust, E. (2007). Unraveling the genetic complexity of *Drosophila stardust* during photoreceptor morphogenesis and prevention of light-induced degeneration. *Genetics* **176**, 2189-200.
- Berridge, M. J., Bootman, M. D. und Roderick, H. L. (2003). Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**, 517-529.
- Bossinger, O., Klebes, A., Segbert, C., Theres, C. und 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., Fukushige, T., Claeys, M., Borgonie, G. und McGhee, J. D. (2004). The apical disposition of the *Caenorhabditis elegans* intestinal terminal web is maintained by LET-413. *Dev Biol* **268**, 448-56.
- Brenner, S. (1974). The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* **77**, 71-94.
- Bui, Y. K. und Sternberg, P. W. (2002). *Caenorhabditis elegans* inositol 5-phosphatase homolog negatively regulates inositol 1,4,5-triphosphate signaling in ovulation. *Mol Biol Cell* **13**, 1641-51.
- Bulgakova, N. A. und Knust, E. (2009). The Crumbs complex: from epithelial-cell polarity to retinal degeneration. *J Cell Sci* **122**, 2587-96.
- Chen, L., Ong, B., Bennett, V. (2001). LAD-1, the *Caenorhabditis elegans* L1CAM homologue, participates in embryonic and gonadal morphogenesis and is a substrate for fibroblast growth factor receptor pathway-dependent phosphotyrosine-based signaling. *J Cell Biol* **154**, 841-55.
- Chen, X., Kojima, S., Borisy, G. G., Green, K. J. (2003). p120 catenin associates with kinesin and facilitates the transport of cadherin-catenin complexes to intercellular junctions. *J Cell Biol* **163**, 547-57.
- Clandinin, T. R., DeModena, J. A. und Sternberg, P.W. (1998). Inositol triphosphate mediates a RAS-independent response to LET-23 receptor tyrosine kinase activation in *C. elegans*. *Cell* **92**, 523-533.
- Colosetti, P., Tunwell, R. E., Cruttwell, C., Arsanto, J. P., Mauger, J. P. und Cassio, D., (2003). The type 3 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor is concentrated at the tight junction level in polarized MDCK cells. *J Cell Sci* **116**, 2791-2803.

- 
- Costa, M., Raich, W., Agbunag, C., Leung, B., Hardin, J. und Priess, J. R. (1998). A putative catenin-cadherin system mediates morphogenesis of the *Caenorhabditis elegans* embryo. *J Cell Biol* **141**, 297-308.
- Cox, R. T., Kirkpatrick, C. und Peifer, M. (1996). Armadillo is required for adherens junction assembly, cell polarity, and morphogenesis during *Drosophila* embryogenesis. *J Cell Biol* **134**, 133-48.
- Dal Santo, P., Logan, M. A., Chisholm, A. D. und Jorgensen, E. M., (1999). The inositol trisphosphate receptor regulates a 50-second behavioral rhythm in *C. elegans*. *Cell* **98**, 757-767.
- Deppe, U., Schierenberg, E., Cole, T., Krieg, C., Schmitt, D., Yoder, B. und von Ehrenstein, G. (1978). Cell lineages of the embryo of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* **75**, 376-380.
- Dickson, B., Sprenger, F., Morrison, D. und Hafen, E. (1992). Raf functions downstream of Ras1 in the Sevenless signal transduction pathway. *Nature* **360**, 600-3.
- Drubin, D. G. und Nelson, W. J. (1996). Origins of cell polarity. *Cell* **84**, 335-44.
- Eaton, S. und Simons, K. (1995). Apical, basal, and lateral cues for epithelial polarization. *Cell* **82**, 5-8.
- Espelt, M. V., Estevez, A. Y., Yin, X. und Strange, K. (2005). Oscillatory Ca<sup>2+</sup> signaling in the isolated *Caenorhabditis elegans* intestine: role of the inositol-1,4,5-trisphosphate receptor and phospholipases C beta and gamma. *J Gen Physiol* **126**, 379-92.
- Estevez, A. Y., Roberts, R. K. und Strange, K. (2003). Identification of store-independent and store-operated Ca<sup>2+</sup> conductances in *Caenorhabditis elegans* intestinal epithelial cells. *J Gen Physiol* **122**, 207-23.
- Favello, A., Hillier, L. und Wilson, R. K. (1995). Genomic DNA sequencing methods. *Methods In Cell Biology* **48**, 551-69.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E. und Mello, C. C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **391**, 806-11.
- Firestein, B. L. und Rongo, C. (2001). DLG-1 is a MAGUK similar to SAP97 and is required for adherens junction formation. *Mol Biol Cell* **12**, 3465-3475.
- Fraser, A., Kamath, R., Zipperlen, P., Martinez-Campos, M., Sohrmann, M. und Ahringer, J. (2000). Functional genomic analysis of *C. elegans* chromosome I by systematic RNA interference. *Nature* **408**, 325-330.
- Fukushige, T., Hawkins, M. G. und McGhee, J. D. (1998). The GATA-factor elt-2 is essential for formation of the *Caenorhabditis elegans* intestine. *Dev Biol* **198**, 286-302.

- Georgiou, M., Marinari, E., Burden, J. und Baum, B. (2008). Cdc42, Par6, and aPKC regulate Arp2/3-mediated endocytosis to control local adherens junction stability. *Curr Biol* **18**, 1631-8.
- Gil, E. B., Malone Link, E., Liu, L. X., Johnson, C. D. und Lees, J. A. (1999). Regulation of the insulin-like developmental pathway of *Caenorhabditis elegans* by a homolog of the PTEN tumor suppressor gene. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* **96**, 2925-2930.
- Göbel, V., Barrett, P. L., Hall, D. H. und Fleming, J. T. (2004). Lumen morphogenesis in *C. elegans* requires the membrane-cytoskeleton linker erm-1. *Dev Cell* **6**, 865-873.
- Gönczy, P., Echeverri, G., Oegema, K., Coulson, A., Jones, S. J., Copley, R. R., Duperon, J., Oegema, J., Brehm, M., Cassin, E., Hannak, E., Kirkham, M., Pichler, S., Flohrs, K., Goessen, A., Leidel, S., Alleaume, A. M., Martin, C., Ozlu, N., Bork, P. und Hyman, A. A. (2000). Functional genomic analysis of cell division in *C. elegans* using RNAi of genes on chromosome III. *Nature* **408**, 331-336.
- Gönczy, P. und Rose, L. S. (2005). Asymmetric cell division and axis formation in the embryo. *WormBook*, ed. The *C. elegans* Research Community, WormBook, doi/10.1895/wormbook.1.30.1, <http://www.wormbook.org>.
- Grawe, F., Wodarz, A., Lee, B., Knust, E. und Skaer, H. (1996). The *Drosophila* genes crumbs and stardust are involved in the biogenesis of adherens junctions. *Development* **122**, 951-9.
- Greenstein, D. (2005). Control of oocyte meiotic maturation and fertilization. *WormBook*, ed. The *C. elegans* Research Community, WormBook, doi/10.1895/wormbook.1.53.1, <http://www.wormbook.org>.
- Grishok, A. (2005). RNAi mechanisms in *Caenorhabditis elegans*. *FEBS Lett* **579**, 5932-9.
- Grosheva, I., Shtutman, M., Elbaum, M. und Bershady, A. D. (2001). p120 catenin affects cell motility via modulation of activity of Rho-family GTPases: a link between cell-cell contact formation and regulation of cell locomotion. *J Cell Sci* **114**, 695-707.
- Habig, J. W., Aruscavage, P. J. und Bass, B. L. (2008). In *C. elegans*, high levels of dsRNA allow RNAi in the absence of RDE-4. *PLoS One* **3**, 4052.
- Hall, D. H., Winfrey, V. P., Blaeuer, G., Hoffman, L. H., Furuta, T., Rose, K. L., Hobert, O. und Greenstein D. (1999). Ultrastructural features of the adult hermaphrodite gonad of *Caenorhabditis elegans*: relations between the germ line and soma. *Dev Biol* **212**, 101-123.
- Hansen, D., Wilson-Berry, L., Dang, T. und Schedl, T. (2004). Control of the proliferation versus meiotic development decision in the *C. elegans* germline through regulation of GLD-1 protein accumulation. *Development* **131**, 93-104.

- 
- Hardin, J. und Lockwood, C. (2004). Skin tight: cell adhesion in the epidermis of *Caenorhabditis elegans*. *Curr Opin Cell Biol* **16**, 486-92.
- Harris, T. J. und Peifer, M., (2005). The positioning and segregation of apical cues during epithelial polarity establishment in *Drosophila*. *J Cell Biol* **170**, 813-823.
- Hirsh, D., Oppenheim, D., Klass, M. (1976). Development of the reproductive system of *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol* **49**, 200-19.
- Hodgkin, J. und Brenner, S. (1977). Mutations causing transformation of sexual phenotype in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* **86**, 275-287.
- Hubbard, E. J. A. und Greenstein, D. (2000). The *Caenorhabditis elegans* gonad: a test tube for cell and developmental biology. *Dev Dyn* **218**, 2-22.
- Hubbard, E. J. A. und Greenstein, D. (2005). Introduction to the germ line. *WormBook*, ed. The *C. elegans* Research Community, WormBook, doi/10.1895/wormbook.1.18.1, <http://www.wormbook.org>.
- Iwasaki, K., McCarter, J., Francis, R. und Schedl, T. (1996). *emo-1*, a *Caenorhabditis elegans* Sec61p gamma homologue, is required for oocyte development and ovulation. *J Cell Biol* **134**, 699-714.
- Izumi, G., Sakisaka, T., Baba, T., Tanaka, S., Morimoto, K. und Takai, Y. (2004). Endocytosis of E-cadherin regulated by Rac and Cdc42 small G proteins through IQGAP1 and actin filaments. *J Cell Biol* **166**, 237-48.
- Jenny, A. und Mlodzik, M. (2006). Planar cell polarity signaling: a common mechanism for cellular polarization. *Mt Sinai J Med* **73**, 738-50.
- Jordens, I., Marsman, M., Kuijl, C. und Neefjes, J. (2005). Rab proteins, connecting transport and vesicle fusion. *Traffic* **6**, 1070-7.
- Jorgensen, E. M. und Mango S. E. (2002). The art and design of genetic screens: *caenorhabditis elegans*. *Nat Rev Genet* **3**, 356-69.
- Jose, A. M. und Hunter, C. P. (2007). Transport of Sequence-Specific RNA Interference Information Between Cells. *Annu Rev Genet* **41**, 305-30.
- Kaech, S. M., Whitfield, C. W. und Kim, S. K. (1998). The LIN-2/LIN-7/LIN-10 complex mediates basolateral membrane localization of the *C. elegans* EGF receptor LET-23 in vulval epithelial cells. *Cell* **94**, 761-71.
- Kamath, R. S., Martinez-Campos, M., Zipperlen, P., Fraser, A. G. und Ahringer, J. (2001). Effectiveness of specific RNA-mediated interference through ingested double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Genome Biol* **2**, research0002.1-0002.10.
- Kamath, R. S. und Ahringer, J. (2003). Genome-wide RNAi screening in *Caenorhabditis elegans*. *Methods* **30**, 313-321.

- Kariya, K., Kim Bui, Y., Gao, X., Sternberg, P. W. und Kataoka, T. (2004). Phospholipase Cepsilon regulates ovulation in *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol* **274**, 201-210.
- Kasai, H. und Petersen, O. H. (1994). Spatial dynamics of second messengers: IP3 and cAMP as long-range and associative messengers. *Trends Neurosci* **17**, 95-101.
- Kimble, J. und Hirsh, D. (1979). The postembryonic cell lineages of the hermaphrodite and male gonads in *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol* **70**, 396-417.
- Kimble, J. und Ward, S. (1988). Germ-Line Development and Fertilization. In *The Nematode Caenorhabditis elegans*, W.B. Wood, ed. (Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory Press), pp. 191-213.
- Kimble, J. und Crittenden, S. L. (2005). Germline proliferation and its control. *WormBook*, ed. The *C. elegans* Research Community, WormBook, doi/10.1895/wormbook.1.13.1, <http://www.wormbook.org>.
- Knust, E. und Bossinger, O. (2002). Composition and formation of intercellular junctions in epithelial cells. *Science* **298**, 1955-9.
- Köppen, M., Simske, J. S., Sims, P. A., Firestein, B. L., Hall, D. H., Radice, A. D., Rongo, C. und Hardin, J. D. (2001). Cooperative regulation of AJM-1 controls junctional integrity in *Caenorhabditis elegans* epithelia. *Nat Cell Biol* **3**, 983-91.
- Labouesse M. (1997). Deficiency screen based on the monoclonal antibody MH27 to identify genetic loci required for morphogenesis of the *Caenorhabditis elegans* embryo. *Dev Dyn* **210**, 19-32.
- 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>.
- Lecuit, T. und Wieschaus, E. (2000). Polarized insertion of new membrane from a cytoplasmic reservoir during cleavage of the *Drosophila* embryo. *J Cell Biol* **150**, 849-60.
- Lee, M. und Vasioukhin, V. (2008). Cell polarity and cancer--cell and tissue polarity as a non-canonical tumor suppressor. *J Cell Sci* **121**, 1141-50.
- Legouis, R., Gansmuller, A., Sookhareea, S., Boshier, J. M., Baillie, D. L. und 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.
- Legouis, R., Jaulin-Bastard, F., Schott, S., Navarro, C., Borg, J. P. und Labouesse, M. (2003). Basolateral targeting by leucine-rich repeat domains in epithelial cells. *EMBO Rep* **4**, 1096-102.
- Leibfried, A., Fricke, R., Morgan, M. J., Bogdan, S. und Bellaiche, Y. (2008). *Drosophila* Cip4 and WASp define a branch of the Cdc42-Par6-aPKC pathway regulating E-cadherin endocytosis. *Curr Biol* **18**, 1639-48.

- Leung, B., Hermann, G. J. und Priess, J. R. (1999). Organogenesis of the *Caenorhabditis elegans* intestine. *Dev Biol* **216**, 114-34.
- Levental, I., Christian, D. A., Wang, Y. H., Madara, J. J., Discher, D. E. und Janmey, P. A. (2009). Calcium-dependent lateral organization in phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP<sub>2</sub>)- and cholesterol-containing monolayers. *Biochemistry* **48**, 8241-8.
- Lockwood, C. A., Lynch, A. M. und Hardin, J. (2008). Dynamic analysis identifies novel roles for DLG-1 subdomains in AJM-1 recruitment and LET-413-dependent apical focusing. *J Cell Sci* **121**, 1477-1487.
- Lynch, A. M. und 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.
- Martin-Belmonte, F. und Mostov, K. (2007). Phosphoinositides control epithelial development. *Cell Cycle* **6**, 1957-61.
- Martin-Belmonte, F., Gassama, A., Datta, A., Yu, W., Rescher, U., Gerke, V. und Mostov, K. (2007). PTEN-mediated apical segregation of phosphoinositides controls epithelial morphogenesis through Cdc42. *Cell* **128**, 383-97.
- McCarter, J., Bartlett, B., Dang, T. und Schedl, T. (1997). Soma-germ cell interactions in *Caenorhabditis elegans*: multiple events of hermaphrodite germline development require the somatic sheath and spermathecal lineages. *Dev Biol* **181**, 121-43.
- McCarter, J., Bartlett, B., Dang, T. und Schedl, T. (1999). On the control of oocyte meiotic maturation and ovulation in *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol* **205**, 111-28.
- 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., Hirst, M., Jones, S. J., Marra, M. A., Ruzanov, P., Warner, A., Zapf, R., Moerman, D. G. und Kalb, J. M. (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. und 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. und Conte, D. (2004). Revealing the world of RNA interference. *Nature* **431**, 338-342.
- Mihaylova, V. T., Borland, C. Z., Manjarrez, L., Stern, M. J. und Sun, H. (1999). The PTEN tumor suppressor homolog in *Caenorhabditis elegans* regulates

- longevity and dauer formation in an insulin receptor-like signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci* **96**, 7427-7432.
- Miller, M. A., Nguyen, V. Q., Lee, M. H., Kosinski, M., Schedl, T., Caprioli, R. M. und Greenstein, D. (2001). A sperm cytoskeletal protein that signals oocyte meiotic maturation and ovulation. *Science* **291**, 2144-2147.
- Miller, M. A., Ruest, P. J., Kosinski, M., Hanks, S. K. und Greenstein, D. (2003). An Eph receptor sperm-sensing control mechanism for oocyte meiotic maturation in *Caenorhabditis elegans*. *Genes Dev* **17**, 187-200.
- Mizuno, K., Suzuki A., Hirose T., Kitamura K., Kutsuzawa K., Futaki M., Amano, Y. und Ohno, S. (2003). Self-association of PAR-3-mediated by the conserved N-terminal domain contributes to the development of epithelial tight junctions. *J Biol Chem* **278**, 31240-31250.
- Müller, H. A. und Wieschaus, E. (1996). armadillo, bazooka, and stardust are critical for early stages in formation of the zonula adherens and maintenance of the polarized blastoderm epithelium in *Drosophila*. *J Cell Biol* **134**, 149-63.
- Nance, J. (2005). PAR proteins and the establishment of cell polarity during *C. elegans* development. *Bioessays* **27**, 126-35.
- Nance, J., Munro, E. M. und 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.
- Nelson, W. J. (2003). Adaptation of core mechanisms to generate cell polarity. *Nature* **422**, 766-74.
- Nejsum, L. N. und Nelson, W. J. (2009). Epithelial cell surface polarity: the early steps. *Front Biosci* **14**, 1088-98.
- Noren, N. K., Liu, B. P., Burrige, K. und Kreft, B. (2000). p120 catenin regulates the actin cytoskeleton via Rho family GTPases. *J Cell Biol* **150**, 567-80.
- Ogg, S. und Ruvkun, G. (1998). The *C. elegans* PTEN homolog, DAF-18, acts in the insulin receptor-like metabolic signaling pathway. *Mol Cell* **2**, 887-893.
- Papoulas, O., Hays, T. S., Sisson, J. C. (2005). The golgin Lava lamp mediates dynein-based Golgi movements during *Drosophila* cellularization. *Nat Cell Biol* **7**, 612-8.
- Peters, M. A., Teramoto, T., White, J. Q., Iwasaki, K. und Jorgensen, E. M. (2007). A calcium wave mediated by gap junctions coordinates a rhythmic behavior in *C. elegans*. *Curr Biol* **17**, 1601-8.
- Pettitt, J., Cox, E. A., Broadbent, I. D., Flett, A. und Hardin, J. (2003). The *Caenorhabditis elegans* p120 catenin homologue, JAC-1, modulates cadherin-catenin function during epidermal morphogenesis. *J Cell Biol* **162**, 15-22.

- Pilipiuk, J. (2006). Die Rolle epithelialer Gene während der Postembryogenese von *Caenorhabditis elegans*. In „Institut für Genetik“. Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf.
- Pilipiuk, J., Lefebvre, C., Wiesenfahrt, T., Legouis, R., Bossinger, O. (2009). Increased IP3/Ca<sup>2+</sup> signaling compensates depletion of LET-413/DLG-1 in *C. elegans* epithelial junction assembly. *Dev Biol* **327**, 34-47.
- Pinal, N., Goberdhan, D. C., Collinson, L., Fujita, Y., Cox, I. M., Wilson, C. und Pichaud, F. (2006). Regulated and polarized PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> accumulation is essential for apical membrane morphogenesis in photoreceptor epithelial cells. *Curr Biol* **16**, 140-9.
- Powers, J., Bossinger, O., Rose, D., Strome, S. und Saxton, W. (1998). A nematode kinesin required for cleavage furrow advancement. *Curr Biol* **8**, 1133-1136.
- Raich, W. B., Agbunag, C. und Hardin, J. (1999). Rapid epithelial-sheet sealing in the *Caenorhabditis elegans* embryo requires cadherin-dependent filopodial priming. *Curr Biol* **9**, 1139-46.
- Rogers, A., Antoshechkin, I., Bieri, T., Blasiar, D., Bastiani, C., Canaran, P., Chan, J., Chen, W. J., Davis, P., Fernandes, J., Fiedler, T. J., Han, M., Harris, T. W., Kishore, R., Lee, R., McKay, S., Müller, H. M., Nakamura, C., Ozersky, P., Petcherski, A., Schindelman, G., Schwarz, E. M., Spooner, W., Tuli, M. A., Van Auken, K., Wang, D., Wang, X., Williams, G., Yook, K., Durbin, R., Stein, L. D., Spieth, J. und Sternberg, P. W. (2008) WormBase 2007. *Nucleic Acids Res* **36**, 612-7.
- Roh, M. H. und Margolis, B. (2003). Composition and function of PDZ protein complexes during cell polarization. *Am J Physiol Renal Physiol* **285**, 377-87.
- Rose, K. L., Winfrey, V. P., Hoffman, L. H., Hall, D. H., Furuta, T. und Greenstein, D. (1997). The POU gene *ceh-18* promotes gonadal sheath cell differentiation and function required for meiotic maturation and ovulation in *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol* **192**, 59-77.
- Rossi, D. J. und Weissman, I. L. (2006). Pten, tumorigenesis, and stem cell self-renewal. *Cell* **125**, 229-31.
- Rouault, J. P., Kuwabara, P. E., Sinilnikova, O. M., Duret, L., Thierry-Mieg, D. und Billaud, M. (1999). Regulation of dauer larva development in *Caenorhabditis elegans* by *daf-18*, a homologue of the tumour suppressor PTEN. *Curr Biol* **9**, 329-332.
- Ruknudin, A. M., Lakatta, E. G. (2007). The regulation of the Na/Ca exchanger and plasmalemmal Ca<sup>2+</sup> ATPase by other proteins. *Ann N Y Acad Sci* **1099**, 86-102.
- Schill, N. J. und Anderson, R. A. (2009). Out, in and back again: PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> regulates cadherin trafficking in epithelial morphogenesis. *Biochem J* **418**, 247-60.

- Schnabel, R., Hutter, H., Moerman, D. und Schnabel, H. (1997). Assessing normal embryogenesis in *Caenorhabditis elegans* using a 4D microscope: variability of development and regional specification. *Dev Biol* **184**, 234-65.
- Segbert, C., Johnson, K., Theres, C., van Fürden, D. und Bossinger, O. (2004). Molecular and functional analysis of apical junction formation in the gut epithelium of *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol* **266**, 17-26.
- Sieburth, D. S., Sun, Q. und Han, M. (1998). SUR-8, a conserved Ras-binding protein with leucine-rich repeats, positively regulates Ras-mediated signaling in *C. elegans*. *Cell* **94**, 119-30.
- Sijen, T., Fleenor, J., Simmer, F., Thijssen, K. L., Parrish, S., Timmons, L., Plasterk, R. H. und Fire, A. (2001). On the role of RNA amplification in dsRNA-triggered gene silencing. *Cell* **107**, 465-76.
- Simmer, F., Tijsterman, M., Parrish, S., Koushika, S. P., Nonet, M. L., Fire, A., Ahringer, J. und Plasterk, R.H. (2002). Loss of the putative RNA-directed RNA polymerase RRF-3 makes *C. elegans* hypersensitive to RNAi. *Curr Biol* **12**, 1317-9.
- Simon, M. A., Bowtell, D. D., Dodson, G. S., Lavery, T. R. und Rubin, G. M. (1991). Ras1 and a putative guanine nucleotide exchange factor perform crucial steps in signaling by the sevenless protein tyrosine kinase. *Cell* **67**, 701-16.
- Simske, J. S., Köppen, M., Sims, P., Hodgkin, J., Yonkof, A. und Hardin, J. (2003). The cell junction protein VAB-9 regulates adhesion and epidermal morphology in *C. elegans*. *Nat Cell Biol* **5**, 619-25.
- Simske, J. S., Kaech, S. M., Harp, S. A. und Kim, S. K. (1996). LET-23 receptor localization by the cell junction protein LIN-7 during *C. elegans* vulval induction. *Cell* **85**, 195-204.
- Sternberg, P. W., Golden, A., Han, M. (1993). Role of a raf proto-oncogene during *Caenorhabditis elegans* vulval development. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **340**, 259-65
- Strome, S. (1986). Fluorescence visualization of the distribution of microfilaments in gonads and early embryos of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *J Cell Biol* **103**, 2241-2252.
- Sulston, J. E., Schierenberg, E., White, J. G. und Thomson, J. N. (1983). The embryonic cell lineage of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol* **100**, 64-119.
- Suzuki, A., Ishiyama, C., Hashiba, K., Shimizu, M., Ebnet, K. und Ohno, S. (2002). aPKC kinase activity is required for the asymmetric differentiation of the premature junctional complex during epithelial cell polarization. *J Cell Sci* **115**, 3565-73.
- Suzuki, A. und Ohno, S. (2006). The PAR-aPKC system: lessons in polarity. *J Cell Sci* **119**, 979-87.

- 
- Tabara, H., Sarkissian, M., Kelly, W. G., Fleenor, J., Grishok, A., Timmons, L., Fire, A. und Mello, C. C. (1999). The rde-1 gene, RNA interference, and transposon silencing in *C. elegans*. *Cell* **99**, 123-132.
- Tanentzapf, G. und Tepass, U. (2003). Interactions between the crumbs, lethal giant larvae and bazooka pathways in epithelial polarization. *Nat Cell Biol* **5**, 46-52.
- Tepass, U. (1996). Crumbs, a component of the apical membrane, is required for zonula adherens formation in primary epithelia of *Drosophila*. *Dev Biol* **177**, 217-25.
- Teramoto, T. und Iwasaki, K. (2006). Intestinal calcium waves coordinate a behavioral motor program in *C. elegans*. *Cell Calcium* **40**, 319-27.
- The\_C\_elegans\_Sequencing\_Consortium. (1998). Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology. *Science* **282**, 2012-8.
- Thomas-Virnig, C. L., Sims, P. A., Simske, J. S. und Hardin, J. (2004). The inositol 1,4,5-trisphosphate receptor regulates epidermal cell migration in *Caenorhabditis elegans*. *Curr Biol* **14**, 1882-1887.
- Totong, R., Achilleos, A. und Nance, J., (2007). PAR-6 is required for junction formation but not apicobasal polarization in *C. elegans* embryonic epithelial cells. *Development* **134**, 1259-1268.
- van den Heuvel, S. (2005). The *C. elegans* cell cycle: overview of molecules and mechanisms. *Methods Mol Biol* **296**, 51-67.
- van Fürden, D. (2005). Genetische und molekulare Analyse der Lumenbildung und Zell-Zelladhäsion im Darmepithel des Nematoden *Caenorhabditis elegans*. In „Institut für Genetik“. Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf.
- van Fürden, D., Johnson, K., Segbert, C. und 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**, 262-276.
- Viktorinová, I., König, T., Schlichting, K. und Dahmann, C. (2009). The cadherin Fat2 is required for planar cell polarity in the *Drosophila* ovary. *Development* **136**, 4123-32.
- von Stein, W., Ramrath, A., Grimm, A., Müller-Borg, M. und Wodarz, A. (2005). Direct association of Bazooka/PAR-3 with the lipid phosphatase PTEN reveals a link between the PAR/aPKC complex and phosphoinositide signaling. *Development* **132**, 1675-86.
- Walker, D. S., Gower, N. J., Ly, S., Bradley, G. L. und Baylis, H. A. (2002). Regulated disruption of inositol 1,4,5-trisphosphate signaling in *Caenorhabditis elegans* reveals new functions in feeding and embryogenesis. *Mol Biol Cell* **13**, 1329-1337.

- 
- Wodarz, A., Ramrath, A., Grimm, A. und Knust, E. (2000). Drosophila atypical protein kinase C associates with Bazooka and controls polarity of epithelia and neuroblasts. *J Cell Biol* **150**, 1361-74.
- Wood, W. B., and the Community of *C. elegans* Researchers, eds. (1988). *In The Nematode Caenorhabditis elegans*, Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, pp. 587-590.
- Wu, J. und Mlodzik, M. (2009). A quest for the mechanism regulating global planar cell polarity of tissues. *Trends Cell Biol* **19**, 295-305.
- Yin, X., Gower, N. J., Baylis, H. A. und Strange, K. (2004). Inositol 1,4,5-trisphosphate signaling regulates rhythmic contractile activity of myoepithelial sheath cells in *Caenorhabditis elegans*. *Mol Biol Cell* **15**, 3938-4399.
- Yochem, J. und Greenwald, I. (1989). *glp-1* and *lin-12*, genes implicated in distinct cell-cell interactions in *C. elegans*, encode similar transmembrane proteins. *Cell* **58**, 553-63.
- Zeitler, J., Hsu, C. P., Dionne, H. und Bilder, D. (2004). Domains controlling cell polarity and proliferation in the *Drosophila* tumor suppressor Scribble. *J Cell Biol* **167**, 1137-46.

## 8 Anhang

### 8.1 Die Zahlen der einzelnen Experimente des Ergebnisteils

#### 8.1.1 Auszählungen der Nachkommen des N2 Wildtyp Stammes

Stamm RNAi	N2		
	Kontrolle	<i>dlg-1(RNAi)</i>	<i>let-413(RNAi)</i>
	265	201	0
	432	228	0
	672	185	3
	531	89	4
	287	324	10
	596	248	0
	639	219	0
	673	156	0
	770	144	0
	713	359	0
	797	491	0
	397	185	3
	369	131	0
	539	95	0
	679	220	0
	596	96	0
	588	177	0
	632	40	3
	508	145	0
	442	133	0
	521	331	2
	591	315	0
	610	297	0
	517	207	7
	531	230	0
	481	188	0
	533	197	6
	480	111	0
	602	172	0
	551	207	0
	487	137	3
	557	0	0
	531	113	0
	592	181	0
	602	132	
	519	258	
	531	175	
	562	244	

503	94	
597	58	
556	100	
561	93	
502	17	
550	252	
489	30	
586		
542		
563		
527		
581		
598		
613		
602		
584		
541		
592		
517		
536		
548		
559		
613		
497		
535		
456		
468		
524		
423		
562		
566		
576		
605		
528		
418		
514		

**Tab. Anhang I: Originalzahlen der Nachkommenauszählungen des N2 Wildtyp Stammes.**

Ein Experiment wurde mit 3 Tieren bei 15 °C durchgeführt. Nach 102 h postembryonaler Entwicklungszeit wurden die Hermaphroditen zu je 3 Tieren auf neue Platten umgesetzt. Nach weiteren 67 h wurden die abgelegten Nachkommen ausgezählt.

### 8.1.2 Auszählungen der Nachkommen der *ipp-5(sy605)* Mutante

Stamm	<i>ipp-5 (sy605)</i>		
	RNAi	Kontrolle	<i>dlg-1(RNAi)</i>
	376	282	158
	348	513	23
	266	368	95
	369	380	210
	437	425	119
	432	236	444
	404	125	378
	266	219	232
	413	131	474
	325	292	274
	388	187	152
	288	247	125
	193	271	103
	194	379	45
	238	186	108
	264	436	353
	402	263	206
	241		
	270		
	312		
	311		
	382		

**Tab. Anhang II: Originalzahlen der Nachkommenauszahlungen der *ipp-5(sy605)* Mutante.**

Ein Experiment wurde mit 3 Tieren bei 15 °C durchgeführt. Nach 102 h postembryonaler Entwicklungszeit wurden die Hermaphroditen zu je 3 Tieren auf neue Platten umgesetzt. Nach weiteren 67 h wurden die abgelegten Nachkommen ausgezählt.

### 8.1.3 Auszählungen der Nachkommen der *itr-1(sy290)* Mutante

Stamm RNAi	<i>itr-1 (sy290)</i>		
	Kontrolle	<i>dlg-1(RNAi)</i>	<i>let-413(RNAi)</i>
	132	47	35
	163	142	44
	144	157	0
	127	259	17
	129	204	12
	192	224	3
	148	130	0
	335	72	0
	336	128	4
	424		28
	377		
	351		
	460		
	265		

**Tab. Anhang III: Originalzahlen der Nachkommenauszahlungen der *itr-1(sy290)* Mutante.**

Ein Experiment wurde mit 3 Tieren bei 15 °C durchgeführt. Nach 102 h postembryonaler Entwicklungszeit wurden die Hermaphroditen zu je 3 Tieren auf neue Platten umgesetzt. Nach weiteren 67 h wurden die abgelegten Nachkommen ausgezählt.

### 8.1.4 Auszählungen der Nachkommen des N2 Stammes und der *itr-1(sy290)* Mutante nach Verdünnung von *let-413(RNAi)*

Stamm RNAi	N2	<i>itr-1(sy290)</i>
	<i>let-413/Kontrolle</i> 1:2	<i>let-413/Kontrolle</i> 1:2
	4	16
	159	186
	2	157
	58	47
	21	137
	70	12
	4	60
		79

**Tab. Anhang IV: Originalzahlen der Nachkommenauszahlungen des N2 Wildtyp Stammes und der *itr-1(sy290)* Mutante nach Verdünnung der *let-413(RNAi)* Fütterungskulturen.**

Ein Experiment wurde mit 3 Tieren bei 15 °C durchgeführt. Nach 102 h postembryonaler Entwicklungszeit wurden die Hermaphroditen zu je 3 Tieren auf neue Platten umgesetzt. Nach weiteren 67 h wurden die abgelegten Nachkommen ausgezählt.

### 8.1.5 Auszählungen der Nachkommen der *rrf-1(pk1417)* Mutante

Stamm RNAi	<i>rrf-1(pk1417)</i>		
	Kontrolle	<i>dlg-1(RNAi)</i>	<i>let-413(RNAi)</i>
	477	678	598
	609	563	404
	546	483	494
	533	560	354
	471	539	150
	402	522	228
	574	632	382
	568	377	482
	570	402	501
	598	527	546
	431	669	605
	517	581	518
	582	512	598
	362	437	356
	387	483	387
	424	428	446
	473	517	452
	502	412	412

**Tab. Anhang V: Originalzahlen der Nachkommenauszählungen der *rrf-1(pk1417)* Mutante.**

Ein Experiment wurde mit 3 Tieren bei 15 °C durchgeführt. Nach 102 h postembryonaler Entwicklungszeit wurden die Hermaphroditen zu je 3 Tieren auf neue Platten umgesetzt. Nach weiteren 67 h wurden die abgelegten Nachkommen ausgezählt.

### 8.1.6 Auszählungen der Nachkommen der *rrf-3(pk1426)* Mutante

Stamm RNAi	<i>rrf-3(pk1426)</i>	
	Kontrolle	<i>dlg-1(RNAi)</i>
	331	5
	317	15
	342	42
	339	22
	341	8
	332	13
	340	11

**Tab. Anhang VI: Originalzahlen der Nachkommenauszählungen der *rrf-3(pk1426)* Mutante.**

Ein Experiment wurde mit 3 Tieren bei 15 °C durchgeführt. Nach 102 h postembryonaler Entwicklungszeit wurden die Hermaphroditen zu je 3 Tieren auf neue Platten umgesetzt. Nach weiteren 67 h wurden die abgelegten Nachkommen ausgezählt.

### 8.1.7 Auszählungen der Nachkommen des OLB11 Stammes

Stamm	OLB11			
	RNAi	Kontrolle	<i>dlg-1(RNAi)</i>	<i>let-413(RNAi)</i>
		326	342	325
		320	317	317
		317	324	311
		329	330	332
		337	305	309
		489	428	441
		502	430	429
		517	424	437
		468	366	399
		491	358	403

**Tab. Anhang VII: Originalzahlen der Nachkommenauszählungen des OLB11 Stammes.**

Ein Experiment wurde mit 3 Tieren bei 15 °C durchgeführt. Nach 102 h postembryonaler Entwicklungszeit wurden die Hermaphroditen zu je 3 Tieren auf neue Platten umgesetzt. Nach weiteren 67 h wurden die abgelegten Nachkommen ausgezählt.

### 8.1.8 Auszählungen der Nachkommen der *rde-1(ne219)* Mutante

Stamm	<i>rde-1(ne219)</i>			
	RNAi	Kontrolle	<i>dlg-1(RNAi)</i>	<i>let-413(RNAi)</i>
		539	418	420
		437	433	398
		479	367	323
		483	436	502
		498	451	473
		520	441	485
		453	476	491
		433	488	486
		399	497	501
		412	487	479

**Tab. Anhang VIII: Originalzahlen der Nachkommenauszählungen der *rde-1(ne219)* Mutante.**

Ein Experiment wurde mit 3 Tieren bei 15 °C durchgeführt. Nach 102 h postembryonaler Entwicklungszeit wurden die Hermaphroditen zu je 3 Tieren auf neue Platten umgesetzt. Nach weiteren 67 h wurden die abgelegten Nachkommen ausgezählt.

### 8.1.9 Auszählungen der Nachkommen nach Kreuzung mit N2 Wildtyp Männchen

Verpaarung mit wildtypischen Männchen	Anzahl der Nachkommen	
	Kontrolle	<i>let-413(RNAi)</i>
<b>Ansatz 1</b>	57	0
	59	0
	49	0
	58	0
	60	0
	62	0
	68	0
	57	0
	58	0
	61	3
<b>Ansatz 2</b>	78	0
	75	0
	72	0
	73	0
	73	0
	69	0
	74	0
	77	0
	65	0
	68	0

**Tab. Anhang VIV: Originalzahlen der Nachkommenauszählungen des N2 Wildtyp Stammes nach Kreuzung mit wildtypischen Männchen.**

Hermaphroditen im L4-Larvenstadium wurden mit N2 Männchen verpaart. Im ersten Ansatz wurde die Verpaarung für 24 h, im zweiten Ansatz für 48 h bei 15 °C zusammen gehalten. Danach wurden die Hermaphroditen für 24 h vereinzelt und die Nachkommen ausgezählt.

### 8.1.10 Auswertung der Letalität von N2, *itr-1(jc5)*, *ipp-5(sy605)* und *itr-1(sy290)* nach *let-413(RNAi)*

Stamm	RNAi	% Letalität	n
N2	Kontrolle	0	578
		0	656
		0	445
		0	343
		0	417
		0	54
		0	597
<i>itr-1(jc5)</i>		21,8	339
		24,7	178
		17,3	191
<i>ipp-5(sy605)</i>		0	600
		0	154
<i>itr-1(sy290)</i>		0	462
N2	<i>let-413</i> (unverdünnt)	100,0	790
		100,0	448
<i>itr-1(jc5)</i>		100,0	541
		100,0	281
<i>ipp-5(sy605)</i>		90,2	387
		94,6	466
		100,0	288
		88,4	199
<i>itr-1 (sy290)</i>		100,0	309
N2	<i>let-413</i> (1:1)	81,7	958
		91,3	368
		99,0	936
<i>itr-1 (jc5)</i>		100,0	409
		100,0	229
<i>ipp-5(sy605)</i>		97,2	427
		90,2	420
		72,6	552
<i>itr-1 (sy290)</i>		93,3	698
N2	<i>let-413</i> (1:2)	81,5	728
		60,4	364
<i>itr-1 (jc5)</i>		98,9	469
		95,7	188
<i>ipp-5(sy605)</i>		67,1	301
		24,9	205
		11,9	226
<i>itr-1 (sy290)</i>		19,8	313
N2	<i>let-413</i> (1:3)	79,1	870
		47,0	230
		88,9	198
		42,6	176
<i>itr-1 (jc5)</i>		99,6	539

		89,1	129
		98,5	133
<i>ipp-5(sy605)</i>		8,1	111
		0,0	118
<b>N2</b>	<b><i>let-413 (1:5)</i></b>	11,2	875
		38,6	407
		51,7	267
<i>itr-1 (jc5)</i>		84,6	512
		87,8	148
		95,7	69
<i>ipp-5(sy605)</i>		0,0	197
<b>N2</b>	<b><i>let-413 (1:8)</i></b>	2,9	642
		17,9	285
<i>itr-1 (jc5)</i>		78,0	287
		80,5	226
<i>ipp-5(sy605)</i>		0,0	286

**Tab. Anhang X: Einzelergebnisse der Letalitätsauszählungen des N2 Wildtyp Stammes, der *itr-1(jc5)*, *ipp-5(sy605)* und *itr-1(sy290)* Mutanten nach Verdünnung der *let-413(RNAi)* Fütterungskulturen.**

Die *let-413(RNAi)* Bakterienkulturen wurden mit Bakterien der Kontrolle verdünnt (HT115[DE3] pPD129.36 ohne Insert). Experimente wurden bei 18 °C durchgeführt. L4-Larven wurden auf die RNAi Platten 24 h gelassen, bevor sie für weitere 24 h auf neue Platten umgesetzt wurden. Von den abgelegten Embryonen wurde ein Tag später die Letalitätsrate bestimmt.

### 8.1.11 Auswertung der Letalität durch *let-413* und *dlg-1* RNAi mit Zugabe von EGTA

RNAi mit oder ohne EGTA	Letalität %	
	N2	<i>ipp-5(sy605)</i>
<b>Kontrolle - EGTA</b>	0 (>800)	0 (>500)
	0 (>800)	0 (>600)
	0 (>500)	0 (>400)
<b>Kontrolle + EGTA</b>	0 (>700)	0 (>600)
	0 (>700)	0 (>500)
	0 (>700)	0 (>300)
<b><i>let-413(RNAi)</i> 1:2 - EGTA</b>	91,6 (1469)	82,2 (1408)
	81,5 (1732)	72,7 (752)
	49,4 (646)	17,1 (246)
<b><i>let-413(RNAi)</i> 1:2 + EGTA</b>	98,7 (1630)	93,5 (1423))
	100 (300)	88,1 (1077)
	86,9 (350)	59,5 (126)
	82,4 (721)	61,9 (126)
	84,8 (598)	
<b><i>dlg-1(RNAi)</i> 1:1 - EGTA</b>	99,9 (1352)	82,8 (1225)
	100 (150)	93,7 (678)
	46,9 (482)	15,8 (818)
	54,3 (339)	11,8 (280)
	71,8 (156)	34,9 (218)
<b><i>dlg-1(RNAi)</i> 1:1 + EGTA</b>	100 (222)	100 (198)
	100 (178)	100 (152)
	93,3 (641)	24,1 (449)
	100 (430)	41,8 (505)
	92,1 (367)	42,7 (178)

**Tab. Anhang XI: Einzelergebnisse der Letalitätsauszählungen des N2 Wildtyp Stammes und der *ipp-5(sy605)* Mutante nach *let-413* und *dlg-1* RNAi mit und ohne Zugabe von EGTA.**

Experimente wurden bei 18 °C durchgeführt. L4-Larven wurden auf die RNAi Platten 24 h gelassen, bevor sie für weitere 24 h auf neue Platten umgesetzt wurden. Von den abgelegten Embryonen wurde ein Tag später die Letalitätsrate bestimmt. Die Zugabe vom EGTA erfolgte mit einer Endkonzentration von 20 mM im Plattenmedium.

8.1.12 Detaillierte Ergebnisse des *let-413* Suppressor Screens

# Screen Linie	<i>let-413(RNAi)</i> Platte Nr.	RNAi Kontrolle	Wiederholung <i>let-413(RNAi)</i>	sonstiges
1	2	Sensitiv	STERIL	
2	2	Sensitiv	STERIL	
3	2	Sensitiv	STERIL	
4	2			Letal auf OP50
5	4	Sensitiv	STERIL	
6	5	Sensitiv	STERIL	
7	5	Sensitiv	STERIL	
8	6	RNAi Mutante		
9	6	Sensitiv	STERIL	
10	6	Sensitiv	STERIL	
11	6	Sensitiv	STERIL	
12	7	Sensitiv	STERIL	
13	8	Sensitiv	STERIL	
14	9	Sensitiv	STERIL	
15	10			Letal auf OP50
16	10			Letal auf OP50
17	10			Letal auf OP50
18	11	Sensitiv	STERIL	
19	12	Sensitiv	STERIL	
20	12	Sensitiv	STERIL	
21	12			Letal auf OP50
22	12			Letal auf OP50
23	12	Sensitiv	STERIL	
24	13	Sensitiv	STERIL	
25	14	Sensitiv	STERIL	
26	14	Sensitiv	STERIL	
27	14			Letal auf OP50
28	14	Sensitiv	SUPPRESSOR	
29	14	Sensitiv	STERIL	
30	14	Sensitiv	STERIL	
31	14			Letal auf OP50
32	14			Letal auf OP50
33	17	Sensitiv		
34	18			Letal auf OP50
35	18	Sensitiv	STERIL	
36	18	Sensitiv	STERIL	
37	18	Sensitiv	STERIL	
38	18	Sensitiv	STERIL	
39	18	Sensitiv	STERIL	
40	18	Sensitiv	STERIL	
41	18			Letal auf OP50
42	18			Letal auf OP50
43	19			Letal auf OP50
44	19	Sensitiv	ENHANCER	
45	19			Letal auf OP50
46	19	Sensitiv	STERIL	
47	21	Sensitiv	STERIL	
48	22	Sensitiv	STERIL	
49	22			Letal auf OP50
50	22	Sensitiv	STERIL	

51	24			<b>Letal auf OP50</b>
52	24	<b>Sensitiv</b>	<b>STERIL</b>	
53	17			<b>Letal auf OP50</b>
54	14			<b>Letal auf OP50</b>
55	14	<b>Sensitiv</b>	<b>STERIL</b>	
56	12	<b>Sensitiv</b>	<b>STERIL</b>	
57	10	<b>RNAi Mutante</b>		
58	9	<b>Sensitiv</b>	<b>STERIL</b>	
59	27	<b>Sensitiv</b>	<b>STERIL</b>	
60	35	<b>Sensitiv</b>	<b>STERIL</b>	
61	35	<b>Sensitiv</b>	<b>ENHANCER</b>	
62	35	<b>RNAi Mutante</b>		
63	35	<b>Sensitiv</b>	<b>STERIL</b>	
64	35	<b>Sensitiv</b>	<b>STERIL</b>	
65	33	<b>Sensitiv</b>	<b>STERIL</b>	
66	26	<b>Sensitiv</b>	<b>STERIL</b>	
67	26			<b>Letal auf OP50</b>
68	30	<b>Sensitiv</b>		
69	30			<b>Letal auf OP50</b>
70	30			<b>Letal auf OP50</b>
71	25			<b>Letal auf OP50</b>
72	28	<b>Sensitiv</b>	<b>STERIL</b>	
73	28	<b>Sensitiv</b>	<b>STERIL</b>	
74	28	<b>Sensitiv</b>	<b>STERIL</b>	
75	28			<b>Letal auf OP50</b>
76	28	<b>Sensitiv</b>	<b>STERIL</b>	
77	29	<b>RNAi Mutante</b>		
78	29	<b>Sensitiv</b>	<b>STERIL</b>	
79	33	<b>Sensitiv</b>	<b>SUPPRESSOR</b>	
80	33			<b>Letal auf OP50</b>
81	33			<b>Letal auf OP50</b>
82	33	<b>Sensitiv</b>	<b>SUPPRESSOR</b>	
83	33			<b>Letal auf OP50</b>
84	33	<b>Sensitiv</b>	<b>STERIL</b>	
85	33			<b>Letal auf OP50</b>
86	33	<b>RNAi Mutante</b>		
87	35	<b>Sensitiv</b>	<b>STERIL</b>	
88	35	<b>Sensitiv</b>	<b>STERIL</b>	
89	35			<b>Letal auf OP50</b>
90	35			<b>Letal auf OP50</b>
91	35	<b>Sensitiv</b>	<b>STERIL</b>	
92	35			<b>Letal auf OP50</b>
93	35	<b>Sensitiv</b>	<b>STERIL</b>	
94	35	<b>Sensitiv</b>	<b>STERIL</b>	
95	35	<b>Sensitiv</b>	<b>STERIL</b>	
96	35			<b>Letal auf OP50</b>
97	35			<b>Letal auf OP50</b>
98	35	<b>Sensitiv</b>	<b>STERIL</b>	
99	35	<b>Sensitiv</b>	<b>STERIL</b>	
100	35	<b>Sensitiv</b>	<b>STERIL</b>	
101	35	<b>Sensitiv</b>	<b>STERIL</b>	
102	35	<b>Sensitiv</b>	<b>STERIL</b>	
103	42			<b>Letal auf OP50</b>

104	42	<b>RNAi Mutante</b>		
105	42	<b>RNAi Mutante</b>		
106	42		<b>STERIL</b>	<b>Letal auf OP50</b>
107	26	<b>Sensitiv</b>		
108	26		<b>STERIL</b>	<b>Letal auf OP50</b>
109	26		<b>STERIL</b>	<b>Letal auf OP50</b>
110	40		<b>STERIL</b>	<b>Letal auf OP50</b>
111	40	<b>RNAi Mutante</b>		
112	40	<b>Sensitiv</b>	<b>STERIL</b>	
113	40	<b>Sensitiv</b>	<b>STERIL</b>	
114	39	<b>Sensitiv</b>	<b>STERIL</b>	
115	39	<b>Sensitiv</b>	<b>ENHANCER</b>	
116	39	<b>Sensitiv</b>	<b>STERIL</b>	
117	39			<b>Letal auf OP50</b>
118	39	<b>Sensitiv</b>		
119	41	<b>Sensitiv</b>	<b>STERIL</b>	
120	41	<b>Sensitiv</b>	<b>STERIL</b>	
121	41	<b>Sensitiv</b>	<b>STERIL</b>	
122	41			<b>Letal auf OP50</b>
123	41			<b>Letal auf OP50</b>
124	41			<b>Letal auf OP50</b>
125	36			<b>Letal auf OP50</b>
126	36	<b>Sensitiv</b>		
127	38			<b>Letal auf OP50</b>
128	37	<b>Sensitiv</b>	<b>STERIL</b>	
129	37	<b>Sensitiv</b>	<b>STERIL</b>	
130	37			<b>Letal auf OP50</b>
131	37	<b>Sensitiv</b>	<b>ENHANCER</b>	
132	37	<b>Sensitiv</b>	<b>STERIL</b>	
133	37	<b>Sensitiv</b>	<b>STERIL</b>	
134	37			<b>Letal auf OP50</b>

**Tab. Anhang XII: Detaillierte Ergebnisse des *let-413* Suppressor Screens.**

Bei dem *let-413(RNAi)* Suppressor Screen wurden 134 fertile und adulte Tiere auf OP50 Bakterienplatten vereinzelt um die Linien zu erhalten. Die Kontrolle ob die beobachtete *let-413(RNAi)* Suppression durch eine Mutation in einem RNAi Gen hervorgerufen wurde, wurden alle Linien auf *mklp-1(RNAi)* getestet. Dabei stellten sich acht Linien als RNAi resistent heraus und wurden demnach als uninteressante Kandidaten verworfen. Die verbliebenen Linien wurden erneut postembryonal auf *let-413(RNAi)* Fütterungsplatten gesetzt und untersucht. Viele Linien (42) waren bei der Wiederholung steril und wurden somit aussortiert. Linien, die weiterhin eine Rettung der *let-413(RNAi)* induzierten Sterilität zeigten, und Linien, die eine auffällige Verstärkung des Sterilitätsphänotyps zeigten, wurden für weitere Untersuchungen eingesetzt.

## 8.1.13 Auswertung der Suppressoren

RNAi	Te mp.	N2		<i>dus8</i>		<i>dus9</i>		<i>dus10</i>		<i>dus11</i>	
		let %	n	let %	n	let %	n	let %	n	let %	n
Kontrolle	15°C	0,0	259	0,0	179	0,0	427	0,0	327	2,7	111
		0,0	61	0,0	181	1,1	290	2,2	90	0,0	52
	18°C	0,0	578	0,0	245	0,0	327	1,3	309	0,0	197
		0,0	343	0,0	211	0,0	192	0,0	86	0,0	57
25°C	0,0	597					1,7	344	0,0	163	
	0,0	54					0,0	327	0,0	334	
	0,0	603	0,0	259	0,0	327	0,0	48	1,5	131	
	0,0	471	0,0	61	2,2	90	0,0	597	3,6	110	
25°C	0,0	384					0,5	202	8,0	264	
	0,0	103					0,0	287	12,1	481	
	15°C	100,0	371	100,0	514	100,0	611	18,9	53	92,7	82
		93,5	107	100,0	366	96,5	523	96,2	494	59,4	133
100,0		426					50,0	202	76,4	271	
18°C	100,0	758	100,0	1043	100,0	1048	12,0	432	19,3	746	
	98,4	440	98,8	323	75,5	417	0,0	56	87,7	57	
	100,0	589					78,5	297	77,6	335	
							11,2	930	68,6	660	
25°C	100,0	512	100,0	490	100,0	479	86,4	132	100,0	444	
	100,0	103	100,0	81	100,0	228	8,9	157	100,0	186	
	100,0	236					70,4	142	100,0	187	
							100,0	199	100,0	438	
15°C	100,0	243	99,5	402	97,1	307	13,5	266	58,0	305	
	100,0	273					17,4	461	84,5	322	
	99,7	784					9,9	669	86,3	600	
18°C	100,0	407	100,0	688	90,5	718	1,1	618	26,5	648	
	99,9	677					3,0	603	53,1	595	
	92,5	281					0,0	422	65,4	231	
25°C	100,0	342	92,8	432	100,0	251	99,6	260	100,0	325	
	95,3	450					100,0	473	100,0	460	
	100,0	401					100,0	361	100,0	316	
15°C	99,8	437	100,0	144	96,5	86	25,6	39	14,5	69	
	97,1	170					67,0	103	87,1	31	
18°C	93,7	554	100,0	270	100,0	315	67,6	275	2,3	258	
	100,0	504					62,4	173	92,4	131	
25°C	100,0	129	96,6	261	82,3	277	9,1	99	94,1	222	
	100,0	409					79,8	391	99,7	361	
15°C	100,0	180					100,0	128	66,7	66	
	100,0	85					35,2	154	67,0	188	
	100,0	120					53,7	156	82,5	160	
18°C	100,0	170					45,6	57	0,0	43	
	99,4	155					49,2	126	7,7	91	
	99,5	191					51,8	83	8,1	62	

	25°C	100,0	164					50,4	131	33,3	102
		99,4	172					100,0	251	38,5	126
		96,7	120					100,0	300	47,8	123
<i>par-3(RNAi)</i>	15°C	92,1	152					97,4	392	42,4	191
		100,0	398					9,0	268	31,4	185
	18°C	100,0	631					22,2	230	60,0	515
		100,0	313					37,0	809	29,3	99
	25°C	99,7	603					78,4	333	4,8	21
		100,0	312					81,9	281	53,3	210
<i>cyb-3(RNAi)</i>	15°C	100,0	574					37,3	67	100,0	217
		100,0	417					26,0	242	100,0	112
		95,3	107					84,5	387	100,0	510
		82,5	120					38,3	298	100,0	153
	18°C	100,0	481					35,5	682	82,4	426
		100,0	264					73,7	156	100,0	93
		93,5	429					59,8	318	100,0	210
		96,1	311					58,5	347	97,4	231
	25°C	100,0	526					100,0	468	100,0	217
		100,0	511					92,9	126	100,0	112
		100,0	332					100,0	412	100,0	199
		100,0	341					100,0	381	100,0	106
<i>mklp-1(RNAi)</i>	15°C	100,0	427	100,0	527	100,0	282	88,0	659	100,0	338
		100,0	281					100,0	288	100,0	289
	18°C	100,0	614	100,0	477	100,0	481	100,0	568	100,0	499
		100,0	411					100,0	321	100,0	281
	25°C	100,0	531	100,0	325	100,0	332	100,0	453	100,0	141
		100,0	632					100,0	371	100,0	273

**Tab. Anhang XIII: Ergebnisse der Temperatur-abhängigen RNAi Analyse der Suppressoren.**

Die Linien wurden bei 18 °C gehalten und gezüchtet. Mit Beginn des Experiments wurden L4-Larven auf die die RNAi Fütterungsplatten gesetzt und dann entweder auf 18 °C weiter gehalten oder auf 15, bzw. 25 °C umgestellt (=Temperaturshift).

## 8.2 Sequenzen der eingesetzten RNAi Fütterungskonstrukte

### 8.2.1 Kontrolle pPD129.36 (ohne Insert)

GTGAGCGCGCGTATACGACTCACTATAGGGCGAATTGGGTACCGGGCCCCC  
CCTCGAGGTCGACGGTATCGATAAGCTTGATATCGAATTCCTGCAGCCCGG  
GGGATCCACGCGTCACGTGGCTAGCCATGGAACCGGTGGATCCACTAGTTC  
TAGAGCGGCCGCCACCGCGGTGGAGCTCGAATTCATCGATGATATCAGATC  
TGCCGGTCTCCCTATAGTGAGTCGTATTAATTTTCGATAAGCCAGGTTGCTTC  
CTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTCGTTCCGGCTGCGGCGAGCGGTATC  
AGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCA  
GGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAG  
GCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCAC  
AAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGAT  
ACCAGGCGTTTTCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCC  
TGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGC  
TTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTGCTTCGCTC  
CAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCGTTACGCCCGACCGCTGCGCCTT  
ATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCA  
CTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGT  
GCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACAGCTACACTAGAAGAACAG  
TATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGG  
TAGCTCTTGATCCGGCAACAAACCCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTTGTTT  
GCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAGATCC

### 8.2.2 *crb-1*

AGCCGACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCAACCTGGCTTA  
TCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCGGCAGATCTGATATCATCGA  
TGAATTCGAGCTCCACCGCGGTGGCGGCCGCTCTAGAAGTGGATCCAC  
CGGTTCCATGGCTAGCCACGTGACGCGTGGATCCCCCGGGCTGCAGGAATT  
CGATATCAAGCTTATCGATACCGTCGACCTCGAGTTCTGTAAGAATGGTGCA  
AAATGTCGAGATAAGATCAACGATTATGAGTGTGTTTGTGATGGAACCTGGATT  
TGAAGGAAGAACTGCACAACTGACATCAACGAATGTGCAAATCCAAACAAC  
TGCATCAACGGAGAATGTACGAATACTCTTGAAACTATAAGTGTGCTTGTC  
GCAATGGCTTCATTGGTCCTCGCTGCTCGGTTCCGGAACCCTTGCACCGCGC  
AAATCGCATCAAACAACATCTCAAGTGTCACTTGTGTACATGGAAAATGCGT  
GAACCCCGTTGTCCAAATTGAGAAAAACCGCGAAGTGGCGAAATACGAGTG  
CGCCTGCGATCGAGGTTATACGGGGCCTACGTGTTTCGCAAAGAATAAAAGA  
GTCAGCCATGTCAAACATCAGCTATTTGTTCCGACCAATTATTGCGGTTGTCA  
TCGTGTTTGGCATATTGGGATGTCTGCTGCTGTTCTTTGTGATACGGGGCAA  
TAACGCCATGCATGGTCATTATAGCCCAAGTTCGCACGAATTCACACAGAAT  
CGAATGGCGATGCCAACTGTGATCAAACCTCCACCTCAAGAACGTCTTATCT  
GAACCTGAATACCTGAATTATTTGCTCAAAAAGTGTGTATTTTTGCCCCCCC  
CCCCCACTCACCTT

**8.2.3 *cmd-1***

GTGAGCGCGCGTATACGACTCACTATAGGGCGAATTGGGTACCGGGCCCCC  
CCTCGAGGTTCGACGGTATCGATAAGCTTGATTTGAGAGAAAAGGTGTTGGTG  
ATTCGCAAACGATACGGCGGCTTCAGATCCCGATTGGTGTGATTTACTTGGT  
TGTCATCATGGTGACGAACTCTGAAATATGGGAAATTTGATGAAATTTGAAA  
AAAAAGGTCTTGTAAGGACTCACCTCATAATTGACTTGTCCATCTCCGTCCG  
ATATCGGCTTCACGGATCATCTCGTTCGACCTCTTCGTCCGTTAGCTTCTCTC  
CCAAGTTGGTCATGACGTGGCGCAGTTCAGCGGCCGAGATGAAGCCATTTCC  
CGTCCTTGTGCGAAAACCTGCAAATAGGAAGATTTGAATGAGATTTTCTATACT  
ACATGAGGCTTCTCTATAGTGAATCAAAAATGAATTTATAAATTTCCACAAATC  
TCTTACTCGGAACGCCTCACGAATCTCCTCCTCACTGTCCGTGTCTTTCATC  
TTGCGGGCCATCATCGTCAAGAACTCTGGGAAATCGATGGTTCCGTTTCCGT  
CAGCGTCCACTTCGTTGATCATGTCTGAAGCTCGGCTTCAGTCGGATTTTG  
TCCCAAAGACCGCATAACAGTTCCCAATTCCTTGGTGGTGATTGTGCCATCG  
CCGTCCTTGTGCGAAACAACTGAATGCCTCCTTGAAGCTCTGAAAATTTGGCAA  
AATTGATTTGGTTTTTTCTCGAATTTTGTAGTTTTTTATACAATTGTTGATAGA  
TTTTTCGCCGCGAGAACCAGCCAACATCTGGAATAAAACACACAAAAATAGT  
GGCGCTATACATCTGCTGCTACGGCTAATGTTTCATCCATTAATTTAAATTT  
CTACGCCGCGCCGCTGGGTTTTCTGCTCAATTCGCTTCGAAATGAGAGAGGAT  
TAGATTTCTTCAATCTCCCGGTCTCCGTCCATCAATCAGAATTTAAAAAAGT  
ACCGGCAATTTGCTC

**8.2.4 *cyb-3***

AGCGCGCGTATACGACTCACTATAGGGCGAATTGGGTACCGGGCCCCCCCCT  
CGAGGTTCGACGGTATCGATAAGCTTGATTTGGGAAAGTCGAGAACGAGTAG  
ACGAGACGTCGAGAACCTTCCACCGCAAAAGTCCAGATATGTTGACCCGTGT  
CCTCATTACGATTACGACCTCGAGGAGGCCGGAAACCCGGACAGTATCTCG  
GACTATGCTCAAGGGATTTTTGACTACTACAGACACCGAGAAGTTCACTTTC  
GAGTGAGAAAGTACCTTCACAAACATCCGGAGGTTGACGTCAAGACTCGTGC  
TATCCTCATTGACTGGATGGTTGAGATTCAGGAGACATTTGAGCTCAACCAC  
GAGACCCTTTACAACGCCGTTAAGCTCACGGATATGTACTTGTGCAAGACGA  
AGAATGTTGACAAAAACACCATTTCAGGTGAGATAAAATCCAAAGTAGTCTATT  
ATTTTTATCAATAAATTTTCAGAAGCTTGCATGTGTGCGCCATCTTCATTGCCG  
CCAAGTACGATGAGCGATCTCCACCACTCGTCGATGATCTCATCTACCTTTC  
CGGAGATCGCTTCTCCCGCGATGAGCTTCTTGCCATGGAGCGTGAAGCTTTC  
GCCACCGTCGGATATGATCTCGGCTCACCACTGAGCTATCGGTATCTTCGCC  
GCTTCGGTCGTGTCTGTGCTGTCGATATGAAGACACTCACCATGGGACGCTT  
CATTCTGGAGACATCACTGATGGTCTACGAATACGCTATGGTCTCACAATCC  
CGTCTTGCCGCCGCCGCTTTCGTCTTGCCATGCGTATGCTCGACAAGAATA  
ATGAGTACGAGTGGAATCCAGTGCTCGAGAAGTATTCTGGATTCACTGGAGA  
GGAGGTGATGCCACTGGTGGAGCACATGAACCACATTCTTCATTTTTTCGAAG  
GACAAGTGGGCTCAACTCACATCCGTTCCGCCAGAAG

**8.2.5 *dlg-1***

GACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCAACCTGGCTTATCGAAAT  
TAATACGACTCACTATAGGGAGACCGGCAGATCTGATATCATCGATGAATTC  
GAGCTCCACCGCGGTGGCGGCCGCTCTAGAAGTACTAGTGGATCCACCGGTTCC  
ATGGCTAGCCACGTGACGCGTGGATCCCCCGGGCTGCAGGAATTCGATATC  
AAGCTTATCGATACCGTTCGACCTCGAGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGGCAAT  
AAAATCTTTATTCAAGATAATTTGTATAAAAAGTTTTTTAAAAATAATTA  
AAAAA  
AAAAGTTTGGAACCAATGGATGAAAATAAAATGCTCTCAGAGTAATAAAAGTC  
CCAAAAATAAAAATGAGCCGAAGTTTTTCATCAGTAGAGAGTCGGGAATAT  
GATAATGATTTGCGGTTAGTAGAGACAAATGAAGCGTTGAGAATATCACAAA  
CTGTCCCAATTTCAAGTAAAAAGTGAATTGAGTTGGGGGAGGAAGGAGAGG  
GAAAAAGGAAGGAAAGCTGGGGCGGATTATAAAATGCAAGTATTTGTAAGGG  
GAATTTCAAGATAAAAATGGGCTGTAAAGAAAACAGGCAGTAC

**8.2.6 *erm-1***

CGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCAACCTGGCTTATCGAAA  
TTAATACGACTCACTATAGGGAGACCGGCAGATCTGATATCATCGATGAATT  
CGAGCTCCACCGCGGTGGCGGCCGCTCTAGAAGTACTAGTGGATCCACCGGTTCC  
CATGGCTAGCCACGTGACGCGTGGATCCCCCGGGCTGCAGGAATTCGATAT  
CAAGCTTATCGATACCGTTCGACCTCGAGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCACGTATTC  
ATATTTATCATAATATCATGAGTCATAGTTGAATAACTGTGTTTAACAACGCA  
TAAATGGGAAAATAGAAGAGTCGAATATTTAGATTTGAATAATATCATAATTAA  
TAAATAAAAATAGATAAACATTTTCAGGGGGATGTTCGAGAGTTTGATGGGGG  
GAGAGAGGGGAAAAGCGTAGAATTTGAAGTCTTTGCGCGAGAAATTCGGGG  
TTTTTTGGCGGCGGATTTAACAAGTTACTTGAAAAATTGGATATGACGAATAC  
AAGAAGAGGGGAATAGAGAAACCGAGCATTTTTTTGGAAGAAAACAAATTTCCG  
GATAATATTGTAAGGCACTGATGGGGTGAACAAGGAAGTGAATCGGAACA  
AACCAATAAATTTCAAATTAATAATAATAAATTGTTGTCCTATAAAAAAAA  
CGAGAAAGGGAGAAAAGAGCCAAGATGATGAGCATTTGGAAGTTGGTGGGA  
GACAATTGAGAATATTGTTTAAAAAAATAAAAGGAAATACGATAGAACAATA  
ATTACATATTTTCGTATTGAT

**8.2.7 *hmp-1***

GCGTATACGACTCACTATAGGGCGAATTGGGTACCGGGCCCCCCTCGAGT  
TTTTTTTTTTTTTTTTTTAGGAAAGAATTGAGTTCATCTAATTTGAAAAACTTG  
TG  
CACATAGATCAGGGAGTTTAGAAATCAGAATCATACAGAAAAAATCGTTGAAA  
GGGTGAGGTTGATAGTGCGAAAATAAATTGTAAAGATGTAAAGTTACCTGATT  
TTCAACAGTATGGATTATGATATTCATGGGGGAGAAAAATGAAAAATGCGGT  
GATAATGGTGGCGGTGATGAGCTGATAGAATTTAGAGCATTAAACAGAAATG  
AATACAAAAAATACACAGATACAAATTTCTAGCTGAAGAGAATTGAAAGAATG  
AGAAAATAATAAAGACTCGGGCATATAAAGGATGTGTGGAAAGATTTGGAAG  
GGAAAAGTATGAAGATACATGAATAAAACTGAAATAAATTATCTATAAACGAC  
CGTTTATTCTTTGTTGATGCCGGCGATCAAGTTCCTCGTCGTCACTATCACGA

CCCGTCTCAATCTCGTTACGCGTAAACTCGGCGAGCACTTTAGCTGGTTGCA  
AAGGTCGCCGTTCCGGATGCCCGTCTGCAAACCTCTGATTATAGCATTATTCTTT  
TGTGGTCGAATTAGTGGTTGTTTCTTTGGTGGAGCCATTGCCACTCGACAC  
GTACACTGTTGGCATTAGGACGACGGAACCTGGTACTGGCAATGTATGCAGC  
TTTAACAGTCTGTACAACAGCAGTTAAAAGATTTTCGAGCCGTTTGAATAAGAG  
ACATTGCAGAGTCAAGTGCAGATACGACAAGCTCATTTCCAACCTTGAGTCAC  
ATCAGCTTTCACCTTACTACAAATATTCAGTTGCTGACAATATAGAGTGATTT  
GTGACAAATATGCGAGCAAATCCTTTTTTCGTCTGCGAATCAGCACTTTCTTCT  
CCAATCTGCCGTGCCAATGCATTTAGTTTTGATCCATTAAGTGAGATTTCTTG  
TGCTGCTCGGATAAC

### 8.2.8 *hmp-2*

TGAGCGCGCGTATACGACTCACTATAGGGCGAATTGGGTACCGGGCCCCC  
CTCGAGGTCGACGGTATCGATAAGCTTGATTTTCCGGTGGTTCAAAGTTTCG  
CTGAAACCTCCAATTTTACCCTCTTTCAGCAGGAAATTAATTTGAAATTGCGC  
GTTTTTTGAGAATTTTCCAATAAAAAAGTTCAGAAATTTAAACTTTTCAATATT  
AATTTTTTCTAGGCTGCCTTCCTGCTCTCTACGTGGAGCTCTGCACCGCAA  
AGACGAGCGATCCCAGACGGCGATTCTAGTGGCGATGAGAAATCTGTGCGA  
TTCTGCGACAAACGAGGAAAATCTCACTCAACTGATCATCAAGCTTCTCGAA  
ATCATTCTGTGTCGCCAACGATGGAATGACTGCCTGCGCGTGTGGAACATTGA  
GCAATCTCACCTGCAATAACACTAGAAACAAGCAAACCGTGTGTTCTCACGG  
GGGAATCGATGCTCTCGTCACCGCGATCCGCCGACTACCTGAAGTTGAAGA  
AGTCACCGAACCGGCTCTCTGTGCTCTTCGGCACTGTAAGTCCAGGCACTCA  
CTGGCTGAAGAAGCTCAAAGTGAGCTGAGATTCTGTCAAGCATTCCCAGTGA  
TTTTGGATCAGCTGGAAACTCTTCGTAAGTCCAGTTATCAAGGCAGCTCTCGG  
AGTTATTAGAAATAGTGCACCTTCTTCAAACAAATCTTATCGAGCTGACACAAG  
AACAAACTGCAAATGGGCATACAGCTGTGTCACTGACAATGGATATCTTGAG  
AAGAGCTATCACGGCGATTGAGGAGAATCCTGATATTGCTGTAGATGGAGTT  
CCAATGTGGGGAGTCATCGAAGGAGCTGTCTCGGCTCTTCATCAGCTCGCG  
AATCATCCGGCAGTCGCTGCAGCATGCTGTGATGATATTGGACAAGTCGGAA  
ATCCAGAATGTCCACCATTCTTGGATCTTCTCCATCGTCTTCTGGCTCATCCG  
GACTCGGATC

### 8.2.9 *hmr-1*

GCCGACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCAACCTGGCTTAT  
CGAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCGGCAGATCTGATATCATCGAT  
GAATTCGAGCTCTCGTTCCGGAACAGACTCCAACAGAGTTACGTTTCAACGA  
ATTTGGAATCCGGTCAAATGGAGTCACTGCCGCCGGAAAATTCGATATCGG  
AACCGGAGGACGACGTGCTCGACAGGAACTTCGTGTGTGCGGAGGTGTTGCT  
CAAGGAGAATGCGAGTTATTGGCTCCAATTCACGAGGAATCCGACTCGGGC  
GAGCTTGTGATCGATAATGCGTATACGGTATCTACGCAGTTGGATAAGGGA  
GAACCATTCTCGTTGCAAGTTAATCAGATTACACTTGGCACACAGGGACAGA  
ATAAGGGATTCCAGGGATGCATCGGAACGTATCGTTGGTTCGAAACAGAATCT

CCCCTGAAACGCGGCGGAGCAATGGACGAGAACGAAGAATCGATTGTCTC  
AATTTCCAACATGGCCGGAGTCCAAGACGGTTGTGATCTTCAATCACTTGT  
GCCGACCTTCCAGCCGGTACTGTGGTGGATCGTTCGTCTGTGTGCGATTTCT  
GGAAGGGTCCATTCTGTACGTGCAATGATGGAGCCAACGCGATTCTCGGTG  
ATGATGGACAAGTTGTCGGTTGTGGAGAGACGTTGGCCGTGTGCGAACTCG  
GAATTAGCTCACCGGCGATTATTCTGATTCTTGTCTCGTTGGCGTTGCTTATA  
CTGTTGGTTATGATGATGGTTGTGTATACGAGACGATCGCCTGGTGCATTTG  
AAAATGTTCCGGCCGGGAGGAGATGAATCGTGATAATTTGCGGCAGTATGGTG  
TGGAAGGGAGGTGGCGAGGCGGATAACGATTCACTCAATGGCCGGCCT  
ACGTAAACCAGTAATGCCACTCGACACA

### 8.2.10 *itr-1*

GCGCGCGTATACGACTCACTATAGGGCGAATTGGGTACCGGGCCCCCCTC  
GAGGTCGACGGTATCGATAAGCTTGATTCTTAAAGTTTTCTTCCGGCATTTC  
CTCAATATCAAGAATTGTTGGAAGATTTGAAACAAGTTCAACTTCTAGTATCA  
ATAATGATGTGGAGAACTATCGACAAATTGACAGAGATCTGTTCATTTTGAA  
GAATCTCACTGAAAAATCTGAGTTATGGGTTTCATGGAGATCGTCATCATTCAA  
TTGATACAAAAGAAGTTGACGAGAAGGAGAGAACGACTGAACATGACTTGCT  
GGTAAGGAATTTTAATTAACAATTTATTTAATTCATATAATTTTAATTTAGGATC  
ATGACTTGAAATCACACGAGCTTTCGATTCGGGAGACTCGATGGAAGCTTT  
AATGGCTGTTTTGAATGAACATTATCCAAGTATTCGAAATGAATGCCTCCAAC  
TTCTCAATCGTCTCCTCATTAAAGACGATCGAAATGATGCAGCTGTGGCTCTT  
CAAGAGCTAAGTGATAAAGCTCCTCTCATTGCTTATCCATTAATTCGTCAAAT  
GTTGGTTCGTTTAAACAGGGATGTGTTATCGAAAAGGTGATCCGAAACCTGAC  
ACAATGAATCAACAACCTTTTGAAGAATATGAGAGTATACGAAGTTGTGTTAGA  
GTTCATAAGTGTTCCCTCATGATAAGAAACATGATCATGATATGATGAACTGA  
TCACGTTGTCTCATGAATTTGTGCGAAGCTTCTGCAAGACACACAAGGAGAA  
TCAGAGTAGACTGTACAAGTTTATTTTCATATGAAAAAGATGCAAAAAGAAGGAA  
TGCTCCGAGTGGAG

### 8.2.11 *let-413*

GCCGACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCAACCTGGCTTAT  
CGAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCGGCAGATCTGATATCATCGAT  
GAATTCGAGCTCCACCGCGGTGGCGGCCGCTCTAGACGAAACAAATTCGTT  
ATGGTCAAAAAATAGAAATCAATTTTAGTAAGCTAAGTATACTTTTCGTGAGAG  
AAGAGTTGCCGATTGGTATTCCGATTGGTTGGACATTAAGAGCATAATTA  
TAAATTTATGTTTTCGATACTATCTGAAATTCATTTTTGAACCAAATAGGACAA  
TTTGAGTGTGAAACCACTTGTTTTTTGTGATCAAAAATCCAACTTTTGGCAG  
AGAATAAATATTTTTGAATTATTTTCAAATTTTTAAATTTTTGCCAGTGAATCAC  
GAATGTCAAAAAAAAACGTCTAATGTCTAGTTTTTCAGCCAAAATCGGCCTCA  
ATACTCACATGGCCTACTCACAGATGTTCTCGAACTGGCGATGGGGACCGC  
CTTAACACGACTAATTCTACCGTTTCTCGCTTTTTGATCGCCTCCATTGCATT  
ATCCTGAGATGCGTTGATCATGTTACATCGTTAGCACGAATCAATTTGTCTC  
CTTCACGAAGACCACATCTGTATGCAGCACTTCCAGGTGTGACTTTGGTGAC

AAAAAGTCCTGAATCTCCGTTACTGTTCCGGCGCCGGATCGTTCGAGGTTCCG  
CCAGCGAAGGAAAGTCCCAATTTTCCAGTGTCTCTTTTTGGATTCTGATTGT  
GTGCATGTTTTGAGTGCCTGCGGCAAGATTTGACAACTTGACAAGGAGGTT  
GCCATTCGTTCTTCTCGTTCTGGTGA

### 8.2.12 *mklp-1 (zen-4)*

GACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCAACCTGGCTTATCGAAAT  
TAATACGACTCACTATAGGGAGACCGGCAGATCTGATATCATCGATGAATTC  
GAGCTCCACCGCGGTGGCGGCCGCTCTAGAAGTAGTGGATCCACCGGTTCC  
ATGGCTAGCCACGTGACGCGTGGATCCCCCGGGCTGCAGACCGTCTTTCCA  
CATCACGCGAAATCACTGATCGTTACTGTGAAGCTATAAAGCTGTCAGGCTA  
CAACGACGATATGGTTTGCTCGGTTTTTCGTAACCTACGTCGAAATCTACAAC  
AATTATTGCTACGATTTGTTGGAAGACGCCAGAAATGGTTCCAGAGTATTGA  
CGAAGCGTGAAATTCGTTCATGATCGTTCAGCAACAGATGTACGTCGACGGAG  
CCAAAGATGTTGAAGTCTCGTCAAGCGAGGAAGCTCTCGAAGTGTCTGCCT  
TGGAGAAGAACGTCGTCGTGTATCGTCCACTCTTCTCAACAAAGATTCATCC  
CGTTCTCATTCCGTATTCATCAAAATTGGTTATGGCTCCGAGAGCCTACGA  
GACGAAAAGCGTGTATCCAACAATGGACTCATCGCAAATTATCGTTTTCGCAG  
TTATGTTTGGTAGATTTGGCTGGATCTGAGAGAGCAAAGCGCACACAGAATG  
TTGGTGAACGTCTTTCGGAAGCCAACTCGATCAATCAGTCCCTCATGACTCT  
TCGTCAGTGTATTGAAAGTACTCCGTCGTAACCAAAGAGTTCCTCACAAA  
CCCTT

### 8.2.13 *par-3*

AGCCGACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCAACCTGGCTTA  
TCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCGGCAGATCTGATATCATCGA  
TGAATTCGAGCTCCACCGCGGTGGCGGCCGCTCTAGAAGTAGTGGATCCAC  
CGGTTCCATGGCTAGCCACGTGACGCGTGGATCCCCCGGGCTGCAGGAATT  
CGATATCAAGCTTATCGATACCGTCGACATAGGACGACGTGTTGATCGGTGA  
ATTACCGCTGGTACTCTGTTGTCTGTAAATGTATTCGTCTTCATCGATGATTG  
GGCCCCACGCGGGTGATAGCGATGGGCCGCGTATCGATCGTAGAGCTCAG  
AGTCGGCGTACGACTCATATCCGGAAGTCGTATTATGGGGATACTGTGGAAT  
GAGTCCATATGGTTCACCATAATCTACAAATACATTTCCACCACTTCCACGTC  
GTTGTGATTGATGTGGTGGTAGAGGAGGTGGAGCACGTTTCAGATGATCCATT  
ATTTCTTTCATCAATTATTGATTTAGGTTCGTTCTACAGATCTTAATTGAACTGA  
TTCAGTCGGTGTTTTTTCTGGTGTATGCATCTCTTGATTTGCTTCCGAATCCAA  
AGAAGTTTCGCATCGCACTGAAAGGGTTTCCATACTCTTTCTTCTTGATTTA  
TCTCTTGATCGACTCTCTTCATTCTTCAATCTAAGCAATGCGGCTCCAGGTGG  
AAATGGATGTTGATCAGGACTCGCTGCTTGCATAAATTGAACTTTTTGAAGAT  
GATCCTGTTGGAATTTGCCCGTTCCACGGAGAATGCTCTCCACTGGCCGAT  
TTATACTTTCCATGCTCTGAGAACGGCGATTCA

**8.2.14 par-6**

GAGCGCGCGTATACGACTCACTATAGGGCGAATTGGGTACCGGGCCCCCCC  
TCGAGCACCTCGTCATTAACACCAAGAAGGCCTGTGGACTCGGCGAGCCCA  
CCATCGACAAGCCGGGAAATGAAAATTCCTGAAACTTTGACGACGCCTCGTT  
CTGTCACTCGAACCGATGTTCCGTCACGAATATAGAATCCAAGTGGTCGTTT  
TTGTCCGTGCTTGCAGAGACGGACACGGCGATGAGCTTCTGGCACAATGTC  
CACGTGATGATTGCAGAGACCTGTCGAAAATCTTCGGGATTCGAGATTGAA  
TAACTGCGTTTTCGGTGGTTTTTGTGCCATAAGTGATGAAATTCCTTCCATCG  
TTTATCAGAGTCTGTACCATAACCATATTTCTCTTCCCATGATTCACCGCGGC  
GTTGAATGAGCAAACGGAGCAGTGGGCGAGCCGATTCGAACGATTTTCGGA  
GGTTATCGTCATTTGTGATTGGTAGAAGATCACCGCCAGTCGAGTTGTAGCA  
CAGTGTGAATTGGACACTTTCCAGGTGATGAAGCTTGATATCGAATTCCTGC  
AGCCCGGGGGATCCACGCGTCACGTGGCTAGCCATGGAACCGGTGGATCCA  
CTAGTTCTAGAGCGGCCGCCACCGCGGTGGAGCTCGAATTCATCGATGATA  
TCAGATCTGCCGGTCTCCCTATAGTGAGTCGTATTAATTTGATAAGCCAGG  
TTGCTTCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTCGTTTCGGCTGCGGCGAG  
CGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGA  
TAACGCAGAAAGAACATGTGAGCAAAGGCCAGCAAAGGCCAGGAACCGT  
AAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAG  
CATCACAAAATCGACGCTCAAGTCAGAG

### 8.3 Film-Sequenzen

Die Filme befinden sich auf der beiliegenden CD im „Audio Video Interleave“- (AVI)-Format.

- Film 1:** DIK-mikroskopische Dokumentation der ersten Ovulation eines jungen, wildtypischen Hermaphroditen. Nach 5-10 s wurde jeweils ein Bild aufgenommen und mit Hilfe von Quicktime Pro 6 (Apple Inc., Cupertino, Kalifornien, USA) zu einem Film mit 15 Bilder/s umgewandelt (86 Bilder; 15 Bilder/s; Aufnahmezeitraum 7 min; Filmdauer 5 s).
- Film 2:** DIK-mikroskopische Dokumentation der blockierten Ovulation eines jungen, *let-413(RNAi)* Hermaphroditen. Nach 5-10 s (während der beobachteten Kontraktionen) bzw. nach 60s wurde jeweils ein Bild aufgenommen (86 Bilder; 15 Bilder/s; Aufnahmezeitraum 45 min; Filmdauer 5 s).

---

## Danksagung

Mein Dank für die hilfreiche Unterstützung bei der Erstellung meiner Doktorarbeit geht vor allem an meinen Doktorvater Olaf Bossinger. Ich danke ihm für seine Ratschläge, Diskussionsbereitschaft und sein Vertrauen, mir viele Freiheiten für die Ausgestaltung dieses Projekts zu geben. Ohne seinen tatkräftigen Einsatz die Finanzierung meiner Dr.-Stelle über Anträge zu sichern und ohne seine Hilfe und kritischen Anmerkungen, wäre die vorliegende Arbeit nicht möglich gewesen. Dank auch dafür, dass er es mir ermöglicht hat, die großartigen *C. elegans* Meetings zu besuchen. Olaf, dir sei an dieser Stelle herzlich für alles gedankt.

Herrn Prof. Dr. Martin Beye danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Dr. Renauld Legouis und Christophe Lefebvre danke ich für die produktiven Diskussionen und die sehr gute Zusammenarbeit.

Ich danke allen Mitgliedern des Instituts, die mir mit Rat und Tat zur Seite standen. Und auch wenn die Zeit nur kurz war, so danke ich dem ganzen MOCA-Institut für die freundliche Aufnahme und Unterstützung.

Mein besonderer Dank gilt den Mitgliedern des Wormlabs, die stets für ein tolles Arbeitsklima gesorgt haben und mir mit fachlichem Rat und Hilfe zur Seite standen.

Bedanken möchte ich mich auch bei meinen Freunden und Vereinsmitgliedern, die für einen tollen Ausgleich zu dieser Arbeit gesorgt haben und somit ihren Beitrag geleistet haben.

Ein ganz besonderer Dank geht an Dirk, denn er hat mich, gerade während der Endphase der Promotion, immer wieder mit sehr viel Geduld, Liebe und Verständnis unterstützt und aufgebaut.

Mein letzter Dank gilt jenen, denen ich am meisten zu verdanken habe: meiner Familie, besonders meinen Eltern und meinem Bruder. Ohne den einmaligen familiären Zusammenhalt und ihre Unterstützung wäre all dieses nicht möglich gewesen.

---

## EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich meine Dissertation selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle benutzten Quellen habe ich vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit -einschließlich Tabellen und Abbildungen-, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Fall als Entlehnung kenntlich gemacht.

Die Dissertation wurde in der vorgelegten oder in ähnlicher Form, abgesehen von der unten angegebenen Teilpublikation, noch bei keiner anderen Institution eingereicht oder veröffentlicht. Ich habe keinen anderen Promotionsversuch unternommen. Die Bestimmungen der geltenden Promotionsordnung sind mir bekannt.

Düsseldorf, den 01.12.2009

Jennifer Pilipiuk

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Pilipiuk, J., Lefebvre, C., Wiesenfahrt, T., Legouis, R., Bossinger, O. (2009). Increased IP<sub>3</sub>/Ca<sup>2+</sup> signaling compensates depletion of LET-413/DLG-1 in *C. elegans* epithelial junction assembly. *Dev Biol* **327**, 34-47.

---