

**Genetische und molekulare Analyse der
Lumenbildung und Zell-Zelladhäsion im Darmepithel
des Nematoden *Caenorhabditis elegans***

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

vorgelegt von

Daniela van Fürden
aus Düsseldorf

Oktober 2005

Aus dem Institut für Genetik
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

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

Referent: Prof. Dr. Elisabeth Knust

Koreferent: PD Dr. Olaf Bossinger

Tag der mündlichen Prüfung: 6. Dezember 2005

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	DER NEMATODE <i>CAENORHABDITIS ELEGANS</i> ALS MODELLORGANISMUS	1
1.2	DIE TECHNIK DER RNAI IN <i>C. ELEGANS</i>	3
1.3	EPITHELIIEN	5
1.4	DIE EZRIN-RADIXIN-MOESIN(ERM)-PROTEINFAMILIE	9
1.5	MECHANISMEN DER TUBULOGENESE	11
1.6	AUFGABENSTELLUNG	14
2	MATERIAL UND METHODEN	15
2.1	CHEMIKALIEN, MATERIALIEN UND GERÄTE	15
2.2	MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN	16
2.2.1	Generelle Medien	16
2.2.1.1	Medien für Bakterien	16
2.2.1.2	Medien für Hefen	16
2.2.2	Bakterienstämme	17
2.2.3	Hefestämme	17
2.2.4	Vektoren	17
2.2.5	Konstrukte	18
2.2.6	Oligonukleotide	21
2.2.7	Konzentrationsbestimmungen von Nukleinsäuren	22
2.2.7.1	Photometrische Konzentrationsbestimmung	22
2.2.7.2	Konzentrationsbestimmung durch Gelelektrophorese	22
2.2.8	DNA-Gelelektrophorese	22
2.2.9	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	23
2.2.10	RT(Reverse-Transkription)-PCR	24
2.2.11	Manipulation von DNA	25
2.2.11.1	Restriktionsverdau von DNA	25
2.2.11.2	Ligation von DNA-Fragmenten	25
2.2.11.3	Fällung von DNA	25
2.2.12	Elution von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen	26
2.2.13	Herstellung transformationskompetenter Zellen	26
2.2.13.1	Die CaCl ₂ -Methode	26
2.2.13.2	Herstellung elektrokompetenter Bakterien	27
2.2.14	Transformation kompetenter Zellen mit Plasmid-DNA	27
2.2.14.1	Transformation nach der CaCl ₂ -Methode	27
2.2.14.2	Elektrotransformation	28

2.2.15	Isolierung von Plasmid-DNA.....	28
2.2.15.1	Schnellpräparation von Plasmid-DNA (Mini-Präparation)	28
2.2.15.2	Gewinnung größerer Plasmidmengen	28
2.2.15.3	Gewinnung großer Plasmidmengen (Maxipräparation)	29
2.2.16	<i>in vitro</i> Transkription	29
2.2.16.1	Herstellung des Templates	29
2.2.16.2	Transkriptionsreaktion.....	29
2.2.17	Isolierung von poly-A ⁺ -RNA	30
2.2.18	Isolierung von RNA über TRIzol®	30
2.2.19	Denaturierende RNA-Gelelektrophorese	31
2.2.20	Herstellung digoxigenin-markierter RNA-Sonden	31
2.2.21	Northern-Blotting	32
2.2.21.1	RNA-Transfer	32
2.2.21.2	Vorhybridisierung, Hybridisierung und Waschungen.....	33
2.2.21.3	Detektion	33
2.2.22	Isolierung von <i>C.elegans</i> -Proteinen	33
2.2.23	Konzentrationsbestimmung von Proteinen.....	34
2.2.23.1	Bestimmung nach Bradford	34
2.2.23.2	Bestimmung durch Gelelektrophorese	34
2.2.24	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	34
2.2.25	Coomassie-Färbung von Proteingelen	36
2.2.26	Immuno-Blotting (Western-Blotting)	36
2.2.27	Gewinnung polyklonaler Antiseren.....	37
2.2.27.1	Induktion in <i>E.coli</i> M15[pREP4].....	38
2.2.27.2	Bestimmung der Löslichkeit eines Proteins	38
2.2.27.3	Isolierung von unlöslichen His-Fusionsproteinen	38
2.2.27.4	Immunisierung	39
2.2.28	Affinitätsreinigung eines Antikörpers.....	39
2.2.29	<i>In vitro</i> -Translation.....	40
2.2.30	Phagenaufarbeitung	40
2.2.30.1	Titerbestimmung	40
2.2.30.2	<i>in vivo</i> -Excision	40
2.2.30.3	Infektion	41
2.2.30.4	Vorbereitung der Bakterienzellen für die Phagenaufarbeitung	41
2.2.31	Hefe-Zwei-Hybrid.....	41
2.2.31.1	Präparation der Zwei-Hybrid-Phagenbank	41
2.2.31.2	Proteinextraktion aus Hefezellen für Western-Blot Analyse	42
2.2.31.3	Präadsorbition der Antikörper α -GAL4 BD und α -c-Myc	42
2.2.31.4	Transformation von DNA in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> für einen Hefe-Zwei-Hybrid-Screen ..	43
2.2.31.5	Transformation von DNA in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> für direkte Interaktionen oder Rescreens	43
2.2.31.6	X-Gal-Interaktionstest	44

2.2.31.7	Isolation von Plasmid-DNA aus Hefe-Zellen	44
2.2.32	Pulldown-Assay	45
2.3	ZELLBIOLOGISCHE METHODEN	45
2.3.1	Verwendete <i>C.elegans</i> -Stämme und Haltung	45
2.3.2	Herstellung Agarose-beschichteter Objektträger und Deckgläser	46
2.3.2.1	Für <i>in vivo</i> -Beobachtung	46
2.3.2.2	Für Mikroinjektion	46
2.3.3	Herstellung Polylysin-beschichteter Objektträger	46
2.3.4	Präparation von Embryonen	46
2.3.5	<i>in vivo</i> -Beobachtung	47
2.3.6	Antikörperfärbung an Embryonen	47
2.3.7	Aktinfärbung an Embryonen	48
2.3.8	Doppelfärbung eines Antikörpers mit Phalloidin	49
2.3.9	Auswertung von Embryonen	50
2.3.10	Darmfunktionstest an Larven	50
2.3.11	Die Technik der „RNA-mediated interference“ (RNAi)	50
2.3.11.1	Mikroinjektion	50
2.3.11.2	RNAi über Feeding	51
2.3.11.3	Auswertung der RNAi-Tiere	51
3	ERGEBNISSE	52
3.1	DIE ROLLE VON ERM-1 WÄHREND DER DIFFERENZIERUNG DES EMBRYONALEN DARM-EPITHELS VON <i>C. ELEGANS</i>.....	52
3.1.1	Molekulare Charakterisierung von <i>erm-1</i>	52
3.1.2	Das embryonale Expressionsmuster von ERM-1	53
3.1.3	Unter DIK-Optik zeigen <i>erm-1(RNAi)</i> -Embryonen Verschlüsse und eine progressive Weitung des Darmlumens	54
3.1.4	Analyse des <i>erm-1(RNAi)</i> -Phänotyps mittels hochauflösender konfokaler Lasermikroskopie	55
3.1.4.1	Die <i>C.elegans</i> AJ zeigt ein invariables Muster	56
3.1.4.2	Während der Morphogenese von <i>erm-1(RNAi)</i> -Embryonen ist das Remodelling der AJ im Darmepithel gestört	56
3.1.4.3	Die Organisation des F-Aktinzytoskeletts im apikalen Zellkortex des Darmepithels ist abhängig von ERM-1	57
3.1.4.4	In <i>erm-1(RNAi)</i> -Embryonen sind die im Darmlumen auftretenden Defekte unabhängig von der Ausbildung der apikalen Membrandomäne	58
3.1.5	Modellvorstellungen für das AJ-Remodelling im Darmepithel	59
3.2	ANALYSE DES AKTIN-MYOSINNETZWERK IM EMBRYONALEN DARM-EPITHEL VON <i>C. ELEGANS</i>.....	61

3.2.1	Der Verlust der Rho-Kinase LET-502 führt zu einem neuartigen AJ-Phänotypen im Darmepithel	61
3.2.2	Die „leichte Kette“MLC-4 und die „schwere Kette“ NMY-2 des Myosins lokalisieren auch im zellulären Kortex der Darmzellen	63
3.2.3	Darmspezifische RNAi von <i>mlc-4</i> und <i>nmy-2</i> führt zu larvalem Arrest und Darmdefekten	64
3.2.4	<i>act-5(RNAi)</i> -Embryonen zeigen Remodellingdefekte der AJ im embryonalen Darmepithel.....	65
3.3	ENDOZYTOSE SPIELT GENERELL KEINE ROLLE FÜR DAS AJ-REMODELLING	67
3.4	IDENTIFIKATION VON ERM-1-BINDUNGSPARTNERN ÜBER EINEN HEFE-2-HYBRID-SCREEN	69
3.5	ANALYSE GENETISCHER INTERAKTIONEN ZWISCHEN ERM-1 UND GENEN, DIE IN AJ-INTEGRITÄT INVOLVIERT SIND	74
3.5.1	<i>dlg-1</i> , <i>ajm-1</i> und <i>let-413</i> zeigen keine genetische Interaktion mit <i>erm-1</i>	74
3.6	DIE ZELL-ZELLADHÄSION IM EMBRYONALEN DARMEPITHEL VON <i>C. ELEGANS</i>.....	76
3.6.1	<i>erm-1/hmp-1(RNAi)</i> -Embryonen zeigen ein fragmentiertes Darmepithel	76
3.6.2	Die Rolle von LAD-1 während der Entwicklung des embryonalen Darmepithels	77
3.6.2.1	Die Lokalisation von phosphoryliertem LAD-1 im Embryo ist abhängig von DLG-1	78
3.6.2.2	Molekulare Analyse von <i>lad-1(ok1244)</i>	79
3.6.2.3	LAD-1 beeinflusst zusammen mit dem Cadherin-Catenin-Komplex die Integrität des Darmepithels	80
3.6.3	<i>erm-1/dlg-1/hmp-1(RNAi)</i> - und <i>lad-1(ok1244)/dlg-1/hmp-1(RNAi)</i> -Embryonen zeigen eine verstärkte Fragmentierung des embryonalen Darmepithel.....	81
4	DISKUSSION	83
4.1	LUMENBILDUNG UND AJ-REMODELLING IM EMBRYONALEN DARMEPITHEL VON <i>C. ELEGANS</i>.....	83
4.1.1	Stabilisation des apikalen F-Aktinzytokortex des Darmepithels durch ERM-1	83
4.1.2	Die Ausbildung der apikalen Membrandomäne im Darmepithel führt nicht zum Remodelling der AJ	85
4.1.3	Das Aktin-Myosinnetzwerk und die Medium-Ketten des Clathrin-Adapter-Komplex bewirken nur bedingt AJ-Remodelling	86
4.1.4	Alternative Erklärungen für das AJ-Remodelling im Darmepithel	89
4.2	DIE ZELL-ZELLADHÄSION IM EMBRYONALEN DARMEPITHEL VON <i>C. ELEGANS</i> WIRD DURCH REDUNDANTE MECHANISMEN VERMITTELT	91
4.2.1	ERM-1 und der Cadherin-Catenin-Komplex vermitteln Zell-Zelladhäsion im embryonalen Darmepithel.....	91

4.2.2	LAD-1 und der Cadherin-Catenin-Komplex vermitteln Zell-Zelladhäsion im embryonalen Darmepithel.....	93
4.2.3	Die Phosphorylierung von LAD-1 ist abhängig von EGL-15	94
4.2.4	Das Zusammenspiel von ERM-1, DLG-1 und LAD-1 in Bezug auf die Zell-Zelladhäsion im embryonalen Darmepithel von <i>C. elegans</i>	95
5	AUSBLICK	98
6	RESÜMEE	99
7	ZUSAMMENFASSUNG	100
8	ABBILDUNGEN DES ERGEBNISTEILS	102
9	LITERATURVERZEICHNIS	134
10	ANHANG-ABKÜRZUNGEN	145
11	ANHANG-SEQUENZEN	146
11.1	VERIFIZIERTE <i>ERM-1</i> -SEQUENZ.....	146
11.2	SEQUENZEN DER “IN FRAME” HEFE-ZWEI-HYBRID-SCREEN KANDIDATEN.....	146
11.2.1	Sequenzen der mit dem N-terminalen <i>erm-1</i> -Köderkonstrukt identifizierten Gene	146
11.2.2	Sequenzen der mit dem C-terminalen <i>erm-1</i> -Köderkonstrukt identifizierten Gene	150
11.3	SEQUENZIERUNG VON <i>LAD-1(OK1244)</i>	152
11.3.1	Vorwärtssequenz.....	152

1 Einleitung

Wie entwickelt sich aus einer einzelnen Zelle, der befruchteten Eizelle, ein vielzelliger und komplexer Organismus? Wie steuern Gene im befruchteten Ei das Verhalten der Zellen im Embryo und somit dessen Entwicklung? Die verschiedenen biologischen Fachgebiete, allen voran die Entwicklungsbiologie, aber auch die Zell- und Molekularbiologie, arbeiten zusammen, um Antworten auf diese Fragen zu finden. Auch der Molekularbiologe Sydney Brenner befaßte sich 1963 mit entsprechenden Fragestellungen der Entwicklungsbiologie. Auf der Suche nach einem idealen Modellorganismus, um die Genetik der 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) stellte eine wegweisende Arbeit in der Nematodenforschung dar, so daß sich *C. elegans* neben Organismen wie der Taufliege *Drosophila melanogaster* oder der Maus *Mus musculus* als Modellorganismus für die Entwicklungsbiologie und die Genetik etablieren konnte.

1.1 Der Nematode *Caenorhabditis elegans* als Modellorganismus

C. elegans ist ein etwa 1mm großer, frei in der Erde lebender Fadenwurm, der sich von Bakterien und Pilzen ernährt (Wood, 1988). Im Labor ist er einfach auf mit Bakterien (*Escherichia coli*) beimpften Agarplatten zu kultivieren. Der Nematode existiert entweder als selbstbefruchtender Hermaphrodit oder als allerdings nur selten vorkommendes Männchen (Hodgkin und Brenner, 1977). Der adulte Hermaphrodit besitzt eine sehr einfache Anatomie (Abb. 1). Seine äußere Hülle besteht aus einer dreischichtigen, kollagenen Kutikula, die die darunterliegende synzytiale Hypodermis und die 4 Quadranten der Köpermuskulatur umgibt. Das Innere stellt eine flüssigkeitsgefüllte Leibeshöhle dar, in der sich der Verdauungstrakt, bestehend aus Pharynx, Darm und Hinterdarm und die Gonade befindet.

Alle Gewebe und Organe gehen aus Gründerzellen hervor, die während der ersten 100 Minuten der Embryogenese, der sogenannten Proliferationsphase, aus inäqualen Zellteilungen entstehen (Labouesse und Mango, 1999; Sulston et al., 1983). Diese Zellen sind AB, MS, E, C, D und die Keimbahnvorläuferzelle P4. Während der

Morphogenese, die der Proliferationsphase folgt, nimmt der Embryo durch Elongation seine Gestalt an. Hierdurch nimmt er ein vierfaches an Länge zu und wird dafür um zwei Drittel seines ursprünglichen Durchmessers schmaler. Nach 12h bei etwa 25°C ist die Embryogenese abgeschlossen, der Wurm schlüpft und durchläuft anschließend 4 Juvenilstadien, die Larvenstadien L1-L4, deren Übergänge jeweils durch eine Häutung gekennzeichnet sind.

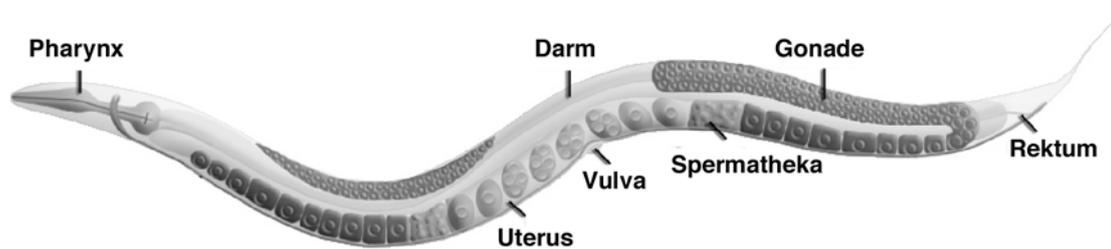


Abb 1: Schemazeichnung eines lateralen Querschnitts durch einen adulten Hermaphroditen von *Caenorhabditis elegans* (modifiziert nach www.wormatlas.org)

Während der Larvalentwicklung bilden sich die Gonaden (Seydoux und Schedl, 2001). Der Hermaphrodit benötigt eine Regulation von Spermatogenese und Oogenese. Diese findet dadurch statt, daß während der Larvalstadien zunächst Spermien gebildet und in der Spermatheka gespeichert werden. Im Adulten werden schließlich Oozyten produziert. Über Selbstbefruchtung können so innerhalb von 4 Tagen bis zu 300 Embryonen gebildet werden (Byerly et al., 1976). 50h nach dem Schlüpfen erreicht der Wurm das Adultstadium. Nun besitzt er eine konstante Anzahl an somatischen Zellen, der Hermaphrodit 959 und das Männchen 1031. Die Anzahl der Keimzellen ist jedoch von Umwelteinflüssen abhängig und somit variabel (Kimble und Hirsh, 1979). Bedingt durch einen invarianten Zellstammbaum des Nematoden wird es ermöglicht, die Position und somit das Schicksal jeder dieser Zellen vorherzusagen (Sulston et al., 1983). Eine etablierte Methode hierfür stellt die sogenannte 4D Mikroskopie dar, durch die innerhalb kürzester Zeit die komplette Zelllinie analysiert werden kann (Schnabel et al., 1997). So können, auch aufgrund der durchsichtigen Kutikula des Wurmes, Entwicklungsvorgänge mikroskopisch ohne

Probleme beobachtet werden, Abweichungen von der Wildtypentwicklung lassen sich leicht erkennen.

Durch Mutationsscreens, also die großangelegte Induktion von Mutationen, z.B. durch EMS (Ethlyenmethansulfonat), können über einen veränderten Phänotyp letztendlich Gene identifiziert werden, die für bestimmte Entwicklungsvorgänge von Bedeutung sind. So wurden durch einen entsprechenden Screen die sogenannten *par*-Gene (“**p**artitioning defective”, Zellteilungsdefekt) entdeckt, die für die asymmetrische erste Zellteilung von Bedeutung sind (Kemphues et al., 1988a; Kemphues et al., 1988b). Mit Hilfe der reversen Genetik kann aber auch über eine schon bekannte Sequenz die Funktion des entsprechenden Gens analysiert werden (Plasterk, 1995). Die seit 1998 vollständige Sequenzierung des *C. elegans* Genoms (Consortium, 1998) bietet hierfür eine solide Grundlage. Mit Hilfe des Computerprogramms Genefinder (Favello et al., 1995) wird die sequenzierte DNA auf offene Leseraster hin analysiert und entsprechende Exon-Intron-Grenzen vorhergesagt. Diese Transkriptionseinheiten können mit ansequenzierten cDNAs einer in Japan existierenden cDNA-Bank (Dr. Y. Kohara; National Institute of Genetics, Mishima, Japan) verglichen und somit überprüft werden. Es besteht so z.B. die Möglichkeit, Wurm-Homologe von Genen zu identifizieren, die in anderen Organismen von zentraler Bedeutung für die Entwicklung sind. Die entsprechenden Gene können dann über RNA-vermittelte Interferenz (RNAi) ausgeschaltet werden, um schließlich den Funktionsverlustphänotypen zu analysieren (s. unten).

1.2 Die Technik der RNAi in *C. elegans*

RNAi ist eine in *C. elegans* etablierte Technik, um den Verlust von Genfunktionen zu studieren. Hierzu wird von dem Zielgen doppelsträngige RNA (dsRNA) z.B. in die synzytiale Gonade eines jungen adulten Hermaphroditen injiziert, so daß die Nachkommen die Phänokopie einer Nullmutation zeigen (Grishok, 2005).

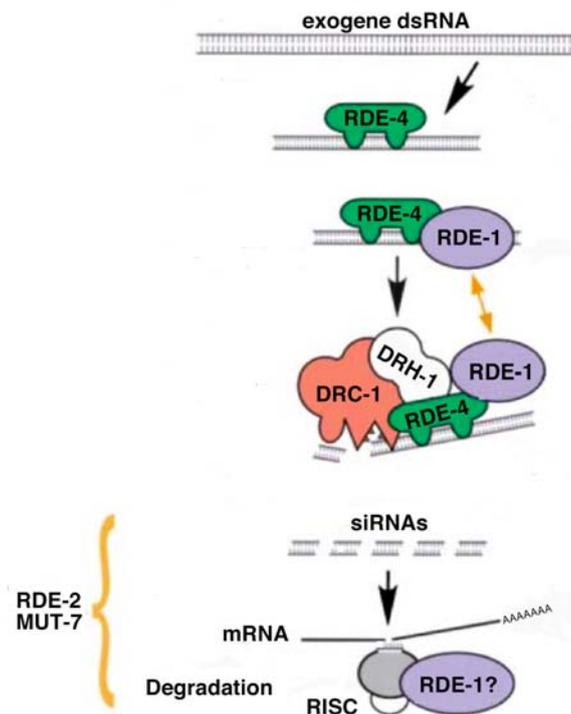


Abb. 2: Hypothetischer Mechanismus der RNA-vermittelten Interferenz (RNAi) in *C. elegans* (modifiziert nach Tabara et al., 2002).

Exogene doppelsträngige RNA (dsRNA) wird durch RNA-Bindeproteine (RDE-4 [RNAi-Defective]) gebunden und durch die RNase DCR-1 (Dicer) in kleinere Fragmente, die “small interfering” RNAs (siRNA) gespalten. Die siRNAs bilden mit RNasen und weiteren Proteinen den RISC (RNAi-induced silencing complex), der zur Erkennung und zum Abbau der endogenen “Ziel-mRNA” führt.

Ausgehend von der Methode des antisense-vermittelten “gene silencing”, bei der antisense RNA über Hybridisierung mit der endogenen mRNA die Translationsreaktion blockiert, führten Guo und Kemphues 1995 erstmals RNAi bei *C. elegans* durch (Guo und Kemphues, 1995; Izant und Weintraub, 1985). Doch zu ihrer Überraschung führte nicht nur die antisense RNA zu einem Funktionsverlust des entsprechenden Gens, sondern auch die eigentlich nur als Kontrolle gedachte sense RNA. Ausgehend von diesen Beobachtungen wurde in weiteren Analysen schließlich dsRNA als eigentlicher Effektor nachgewiesen, die über einen katalytischen Prozess zum Abbau der endogenen mRNA führt (Fire et al., 1998; Montgomery et al., 1998; Parrish et al., 2000). Die biologische Funktion von RNAi stellt vermutlich jedoch einen Verteidigungsmechanismus gegen fremdes genetisches Material dar (Lu et al., 2005; Parrish et al., 2000; Wilkins et al., 2005).

Die dsRNA wird zunächst in einen Komplex mit dem dsRNA-Bindeprotein RDE-4 (“**R**NAi-**d**eficiency”), RDE-1, einem Mitglied der Argonaut-Familie, der RNase DCR-1 (Dicer) und der Helikase DRH-1 (“**D**icer **r**elated **h**elicase”) integriert und so durch DCR-1 in viel kleinere, 21 bp große einzelsträngige siRNAs (“small interfering RNA”) gespalten (Tabara et al., 1999; Tabara et al., 2002). Ein Proteinkomplex, u.a. bestehend aus RNasen, bindet die siRNAs und bildet den sogenannten RISC (“**R**NA induced silencing complex”). Der RISC erkennt die endogene “Ziel-mRNA” und ist schließlich an deren Abbau beteiligt (Abb. 2, Ketting et al., 2001).

Mit der Etablierung der RNAi als effiziente und schnelle Methode wurden genomweite RNAi-Analysen durchgeführt, wobei entweder dsRNA direkt in die Gonade injiziert oder die Methode der dsRNA Fütterung (“RNAi feeding”) verwendet wurde, bei der spezielle Bakterien dsRNA produzieren (Fraser et al., 2000; Gönczy et al., 2000; Kamath und Ahringer, 2003; Kamath et al., 2001). In jüngster Zeit wurden auch genomweite RNAi-Screens durchgeführt, um z.B. Gene für die frühe Zellteilung oder Komponenten des RNAi-Mechanismus selbst zu finden (Kim et al., 2005; Sönnichsen et al., 2005).

Die Tatsache, daß RNAi zum Verlust der maternalen Genfunktion, durch Abbau der vom “Muttertier” bereitgestellten mRNA, und auch zum Abbau von zygotischer mRNA führt, hat zur Folge, daß bei RNAi-Analysen häufig die frühe Funktion eines Genes während der embryonalen Entwicklung die späte überdeckt. So ist dies bei den bereits erwähnten *par*-Genen der Fall (Kemphues, 2000; Nance, 2005). Generell sind sie in *C. elegans* für die Polarität im Einzell-Embryo verantwortlich. Allerdings zeigen sie neben einer Lokalisation im Kortex der Blastomeren auch eine Expression im Darmepithel. Ihre Funktion hier ist aber noch unbekannt, u.a. da über RNAi nur die frühe Funktion eliminiert werden kann (Bossinger et al., 2001; Leung et al., 1999; McMahon et al., 2001; Nance et al., 2003). Im Gegensatz dazu spielen die Homologen der *par*-Gene in anderen Organismen, wie z.B. *Drosophila*, tragende Rollen während der Epithelentwicklung (s. unten, Kemphues, 2000; Pellettieri und Seydoux, 2002).

1.3 Epithelien

Epithelien sind Abschlußgewebe und bilden selektive Barrieren zwischen zwei Kompartimenten eines Organismus, um den vektoriellen Transport von Ionen und

Molekülen zu steuern. Ermöglicht wird dies durch einen polaren Aufbau der Zellen im Epithelverband (Drubin und Nelson, 1996; Eaton und Simons, 1995; Nelson, 2003). So besitzt eine Epithelzelle eine apikale, eine laterale und eine basale Membrandomäne. Während die apikale Seite häufig ein Lumen umschließt und durch Mikrovilli gekennzeichnet ist, stellen die laterale und basale Membrandomäne den Kontakt zu anderen Zellen bzw. zur Basallamina (ein Bestandteil der extrazellulären Matrix) her. Die Ausbildung dieser Kontakte wird durch spezialisierte Zell-Zell- und Zell-Matrixverbindungen ermöglicht.

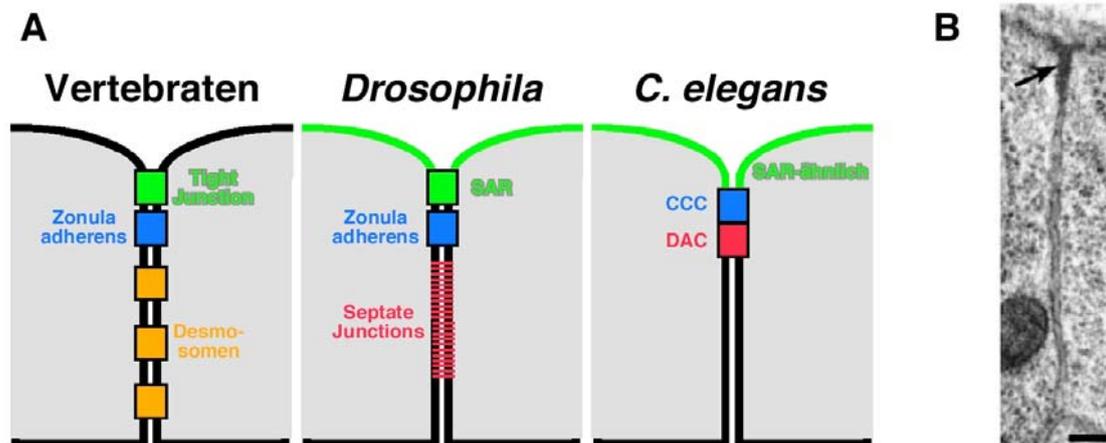


Abb.3: Zell-Zellverbindungen in Vertebraten, *Drosophila melanogaster* und *Caenorhabditis elegans* (mdifiziert nach Cox und Hardin, 2004)

(A) Schematische Darstellung epithelialer Zell-Zellverbindungen. Während in Vertebraten und *Drosophila melanogaster* mehrere Zell-Zellverbindungen existieren, findet sich in *Caenorhabditis elegans* nur eine Struktur, die “apical junction” (AJ) (B) Transelektronenmikroskopische Aufnahme der AJ (Pfeil). Benutzte Abkürzungen: SAR (Subapikale Region), CCC (“cadherin-catenin-complex”), DAC (DLG-1/AJM-1-Complex).

In Vetebraten gliedern sich die Zell-Zellverbindungen in Tight Junction (TJ), Zonula adherens (ZA) und Desmosomen, in Invertebraten wie *Drosophila* finden sich die ZA und die Septate Junctions (SJ) (Müller und Bossinger, 2003). Während die ZA einen durchgehenden Gürtel um den Apex der Zellen bildet und für Zell-Zelladhäsion sorgt, stellt die TJ eine dichte Permeabilitätsbarriere zwischen den Zellen dar. Auch für die SJ wird eine entsprechende Barrierefunktion postuliert (Anderson, 2001; Faivre-

Sarrailh et al., 2004; Genova und Fehon, 2003; Schneeberger und Lynch, 2004). Die TJ bildet außerdem eine Diffusionsgrenze zwischen der apikalen und basalen Membrandomäne und ist apikolateral lokalisiert. Die SJ lokalisieren dagegen an der lateralen Membran (Abb. 3).

Im *C. elegans* Embryo finden sich drei große Epithelien. Die Hypodermis, der Pharynx, und das Darmepithel (Michaux et al., 2001; Simske und Hardin, 2001). Obwohl auf ultrastruktureller Ebene nur eine einzelne elektronendichte Zell-Zellverbindung nachzuweisen ist, konnte auf Immunfluoreszenz(IF)-Ebene gezeigt werden, daß in diesen Epithelien des Nematoden zwei molekular und funktionell unterschiedliche Komplexe existieren (Abb. 3, Asano et al., 2003; Köppen et al., 2001; McMahon et al., 2001; Segbert et al., 2004). Sie werden zusammen die *C. elegans* "apical junction" (AJ) genannt und bestehen aus Multiproteinkomplexen, die ähnlich auch in Vertebraten und *Drosophila* vorkommen (Cox und Hardin, 2004; Hardin und Lockwood, 2004; Knust und Bossinger, 2002)

Die apikale Einheit der AJ bildet der hochkonservierte Cadherin-Catenin-Komplex ("cadherin-catenin-complex", CCC). Er besteht aus einem klassischen E-Cadherin (HMR-1, "hammerhead"), einem β -Catenin (HMP-2, "humpback") und einem α -Catenin (HMP-1) (Costa et al., 1998). Sowohl in Vertebraten als auch in *Drosophila* lokalisiert der CCC in der ZA. Das membranständige E-Cadherin vermittelt über homophile, Ca^{2+} -abhängige Interaktion die Adhäsion zu den Nachbarzellen. Es bindet an β -Catenin, dieses wiederum an α -Catenin. α -Catenin vermittelt schließlich eine direkte, oder indirekte Bindung über z.B. α -Actinin, an das Aktinzytoskelett, so daß epitheliale Adhäsivität und Polarität gewährleistet werden (Cox et al., 1996; Kemler, 1993; Knudsen et al., 1995; Larue et al., 1994; Tepass et al., 1996; Uemura et al., 1996). Dagegen spielt der CCC in *C. elegans* nur eine untergeordnete Rolle. Zwar konnte gezeigt werden, daß der Komplex während des ventralen Schluß der Hypodermis für die Verankerung von Aktinfilamenten an die AJ wichtig ist und damit die Adhäsion der aufeinander zuwandernden Filopodien der Hypodermiszellen stabilisiert, jedoch hat er in den Epithelien des Wurmes keinen generellen Einfluß auf die Zell-Zelladhäsion und die Polarität (Costa et al., 1998; Raich et al., 1999).

Die basale Einheit der AJ stellt der DLG-1/AJM-1-Komplex (DAC) dar, welcher aus den Proteinen DLG-1 (**D**iscs **L**arge), einem Mitglied der MAGUK (**M**embranassozierte-**G**uanylatkinase)-Proteinfamilie (Dimitratos et al., 1999) und

AJM-1 (“**apical junction molecule**”), einem “coiled-coil” Protein, besteht. AJM-1 ist ein neuartiges Protein und im Gegensatz zu DLG-1 sind keine Homologen aus Vertebraten und *Drosophila* bekannt (Bossinger et al., 2001; Firestein und Rongo, 2001; Köppen et al., 2001; McMahon et al., 2001).

In *Drosophila* lokalisiert Discs Large in der SJ und reguliert die Bildung der ZA und somit die apikobasale Polarität (Woods et al., 1996). Auch in *C. elegans* hat DLG-1 eine tragende Funktion für die Etablierung der AJ. So ist DLG-1 für die Ausbildung der elektronendichten Struktur der AJ verantwortlich, außerdem sorgt es über eine direkte Interaktion für die korrekte Verteilung von AJM-1. Andersherum reguliert auch AJM-1 die Ausbildung der elektronendichten AJ-Struktur (Bossinger et al., 2001; Firestein und Rongo, 2001; Köppen et al., 2001; McMahon et al., 2001). Im Darmepithel konnte außerdem gezeigt werden, daß AJM-1 für die Lokalisation von DLG-1 verantwortlich ist (Segbert et al., 2004). Anders als in *Drosophila* spielt der DAC jedoch keine Rolle für die Lokalisation des CCC oder für die Polarität der Epithelzellen (Bossinger et al., 2001; Firestein und Rongo, 2001; Köppen et al., 2001; McMahon et al., 2001; Segbert et al., 2004; Woods et al., 1996).

Eine generelle Funktion für die apikobasale Polarität zeigt das LAP(“**L**eucin-rich-repeat and **P**DZ” [PSD-95, Discs Large, ZO-1])-Protein LET-413 (“**l**ethal”), das *Drosophila* Scribble-Homolog in *C. elegans* (Bilder und Perrimon, 2000; Legouis et al., 2000; Legouis et al., 2003; McMahon et al., 2001). LET-413 findet sich, entsprechend Scribble, an der basolateralen Membrandomäne und ist verantwortlich für die Lokalisation des DAC. Es verhindert außerdem eine Expansion von apikalen und AJ-Komponenten nach lateral und stabilisiert somit die apikale Position der elektronendichten AJ-Struktur. Somit sorgt es für den Erhalt der apikobasalen Polarität (Bilder und Perrimon, 2000; Bossinger et al., 2004; Köppen et al., 2001; Legouis et al., 2000; McMahon et al., 2001).

In *Drosophila* spielen zwei Komplexe eine zentrale Rolle für die Etablierung der apikobasalen Polarität. Beide befinden sich in der subapikalen Region (SAR), also apikal von der ZA: der Bazooka/DmPAR-6/DaPKC-Komplex und der Crumbs/Stardust/DPatj-Komplex. Während Crumbs direkt für die Ausbildung der ZA verantwortlich ist, zeigt der Bazooka-Komplex einen indirekten Einfluß, indem er die Polarität von apikalen Komponenten, also auch Crumbs, steuert (Bachmann et al., 2001; Petronczki und Knoblich, 2001; Tepass, 1996; Tepass et al., 1990; Wodarz et

al., 2000). Der PAR-3/PAR-6/PKC-3-Komplex in *C. elegans* wurde ursprünglich als Regulator für die erste asymmetrische Zellteilung der Zygote entdeckt. Er lokalisiert im anterioren Kortex der Blastomeren und ist auch an der apikalen Membrandomäne des Darmepithel zu finden. Hier konnte ihm bisher jedoch keine Funktion zugeordnet werden (Bossinger et al., 2001; Kemphues et al., 1988b; Leung et al., 1999; McMahon et al., 2001; Nance et al., 2003).

Auch das *C. elegans* Crumbs-Homolog CRB-1 scheint keinen Einfluß auf die Epithelentwicklung zu haben, obwohl gezeigt werden konnte, daß es im Darmepithel, entsprechend wie Crumbs in den Epithelien von *Drosophila*, durch DLG-1 lokalisiert wird. So ist es auch subapikal im Darmepithel zu finden (Bilder et al., 2000; Bossinger et al., 2001; Segbert et al., 2004). In *Drosophila* bindet Crumbs an das Protein DMoesin, welches zur Ezrin-Radixin-Moesin-(ERM)-Proteinfamilie gehört. Der Crumbs-DMoesin Komplex stabilisiert das apikale F-Aktinzytoskelett, in dem es β_{Heavy} -Spektrin rekrutiert, so daß es schließlich zur Ausbildung der ZA kommt (Medina et al., 2002). Das DMoesin ist das einzige ERM-Protein in *Drosophila* und auch *C. elegans* besitzt nur ein einzelnes ERM-Protein, das ERM-1 (s. unten, Göbel et al., 2004; van Fürden et al., 2004).

1.4 Die Ezrin-Radixin-Moesin(ERM)-Proteinfamilie

Die ERM-Proteinfamilie in Vertebraten besteht aus den drei eng verwandten Proteinen Ezrin, Radixin und Moesin, die ursprünglich als strukturelle Komponenten des Zellkortex identifiziert wurden (Abb. 4, Bretscher et al., 2002; Ivetic und Ridley, 2004) In der Literatur als “crosslinker” von Zellmembran und Aktinzytoskelett beschrieben, sind sie für viele fundamentale Prozesse, wie Determination von Zellform und Zelloberflächenstruktur, Zell-Zelladhäsion und Beweglichkeit, von Bedeutung. Die ERM-Proteine gehören zur Superfamilie der B4.1(Band4.1)-Proteine, deren erstmalig beschriebener Prototyp das Erythrozytenprotein Band 4.1 ist (Hoover und Bryant, 2000). Allen gemeinsam ist die N-Terminale B4.1- bzw. FERM(Band Four one, Ezrin, Radixin, Moesin)-Domäne, welche eine direkte Bindung an Transmembranproteine vermittelt (Granes et al., 2000; Helander et al., 1996; Serrador et al., 1997; Tsukita et al., 1994). Die Bindung kann aber auch indirekt über Adaptermoleküle erfolgen (Reczek et al., 1997). C-Terminal besitzen ERM-Proteine

eine F-Aktinbindestelle, die auf die letzten 34 Aminosäuren bestimmt werden konnte (Pestonjampas et al., 1995; Turunen et al., 1994).

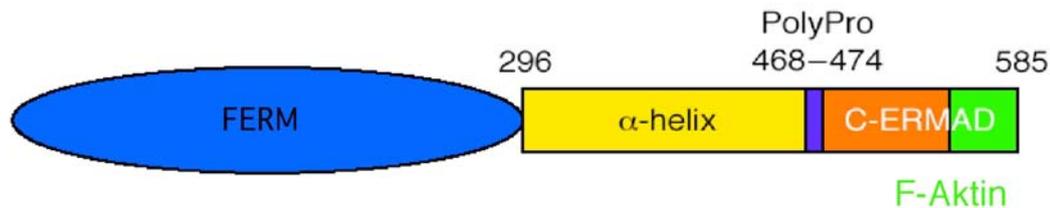


Abb.4: Schematische Darstellung der Struktur eines ERM(Ezrin-Radixin-Moesin)-Proteins (modifiziert nach Mangeat et al., 1999).

Ein typisches ERM-Protein besitzt eine N-Terminale FERM-Domäne (blau) und eine C-Terminale Aktinbindestelle (grün), die eine Bindung zwischen Zytoplasmamembran und Aktinzytoskelett bewerkstelligen. ERM-Proteine weisen eine α -helikale Sequenz im mittleren Bereich des Proteins auf, der C-terminale Bereich wird auch C-ERMAD (**ERM**-Assoziationsdomäne) genannt, da er mit der FERM-Domäne (auch N-ERMAD) wechselwirken kann und somit zur Inaktivierung des Proteins führt (Bretscher et al., 2002). Einige ERM-Proteine besitzen einen prolinreichen Abschnitt (PolyPro), dem bislang noch keine Funktion zugeordnet werden konnte (Matsui et al., 1999).

Die Vertebraten ERM-Proteine sind generell in apikalen Domänen von polarisierten Zellen exprimiert und mit Mikrovilli assoziiert (Amieva et al., 1994; Berryman et al., 1993). Aufgrund ihrer hohen strukturellen Identität läßt sich vermuten, daß sie ähnliche oder sogar redundante Funktionen haben. So konnte durch Suppression der Proteinsynthese in Zellkultur gezeigt werden, daß erst Ezrin, Radixin und Moesin zusammen wichtig für Zelladhäsion und Mikrovillibildung sind (Takeuchi et al., 1994). Und obwohl in der Maus Ezrin für die Morphogenese der Mikrovilli notwendig ist, weisen Knockout-Mutanten von Moesin und Radixin alleine keine signifikanten Phänotypen auf (Doi et al., 1999; Kikuchi et al., 2002; Saotome et al., 2004). Dagegen zeigt das *DMoesin* von *Drosophila* komplexe Funktionen, wie die Organisation des Aktinzytoskeletts in der Oozyte und in den Nährzellen. Hier kommt es nach Funktionsverlust zu einer abnormen Zellform der Nährzellen und zu Defekten in der anterior-posterior Polarität der Oozyte (Jankovics et al., 2002; Polesello et al., 2002). Außerdem konnte gezeigt werden, daß *DMoesin* ebenfalls in somatischen

Gewebe, speziell in der Flügelimaginalscheibe, für epitheliale Polarität verantwortlich ist (Speck et al., 2003).

1.5 Mechanismen der Tubulogenese

Der Darm von *C. elegans* stellt ein simples System für die Erforschung der Epithelentwicklung dar. Er geht klonal aus der sogenannten E-Zelle hervor und formt letztendlich eine einfache Röhre aus 20 Zellen, die mit ihrer apikalen Membranoberfläche das Lumen umgeben, während die basale Membrandomäne in Kontakt zur extrazellulären Matrix steht (Leung et al., 1999; Sulston et al., 1983).

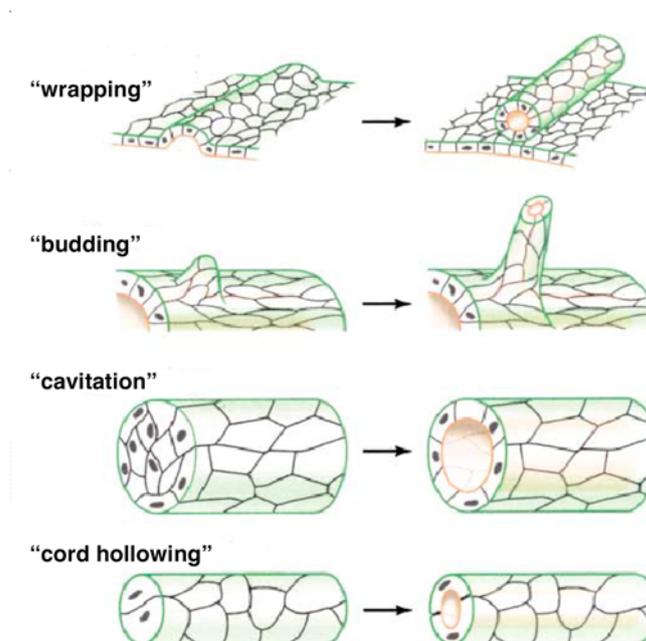


Abb. 5: Morphologische Prozesse während der Ausbildung von epithelialen Röhren (modifiziert nach Lubarsky und Krasnow, 2003)

Die Ausbildung eines epithelialen Lumens kann in verschiedene Prozesse eingeteilt werden. Hier dargestellt sind: “wrapping”, wobei ein Teil einer epithelialen Schicht einwandert; “budding”, d.h. eine Gruppe von Zellen einer bereits bestehenden Röhre wandert aus und bildet eine neue Röhre; “cavitation”, wobei aus einer zylindrischen Zellmasse durch Zelltod im Zentrum eine Röhre entsteht und “cord hollowing”, bei dem ein Lumen “de novo” zwischen zwei Zellen gebildet wird, so wie es auch bei dem Darmlumen von *C. elegans* der Fall ist.

In der Literatur sind mehrere Wege beschrieben, wie epitheliale Röhren entstehen können (Abb. 5, Lubarsky und Krasnow, 2003). So bildet sich das Neuralrohr von

Vertebraten durch “wrapping”, ein Prozeß, der die Invagination und das anschließende Einrollen ganzer Zellschichten des Neuralplattenepithels beschreibt (Colas und Schoenwolf, 2001). Durch Knospung (“budding”) formen sich Verzweigungen aus einer schon bestehenden epithelialen Röhre, wie es z.B. bei den *Drosophila* Tracheen der Fall ist (Metzger und Krasnow, 1999). Im Gegensatz dazu können tubuläre Epithelien auch aus zunächst nicht polarisierten Zellen hervorgehen. Hier wäre “cavitation” zu nennen, wobei ein Lumen im Inneren einer zylindrischen Zellmasse durch Zelltod entsteht. Dieses kann während der Entwicklung von Speicheldrüsen in Vertebraten beobachtet werden (Melnick und Jaskoll, 2000).

Der Vorgang des “cord hollowing” kennzeichnet sich dadurch, daß gegenüberliegende Zellen ein Lumen ohne Zellverlust bilden. In MDCK-Zellen fusionieren z.B. Vesikel an der zukünftigen apikalen Membrandomäne zwischen zwei Zellen und formen so das Lumen (Pollack et al., 1998). Auch die Tubulogenese des *C. elegans* Darms kann in diese letzte Kategorie eingeteilt werden (Leung et al., 1999).

Während der Organogenese des Darmes gibt es 2 wichtige Schritte für die Ausbildung eines polar aufgebauten Epithels. Zunächst die zytoplasmatische Polarisierung, in der die Zellkerne von gegenüberliegenden Zellen zum zukünftigen apikalen Pol wandern, während Zytoplasmakomponenten, wie der Golgi-Apparat, nach basal gelangen. Am zukünftigen apikalen Pol werden zu diesem Zeitpunkt mehrere Mikrolumen sichtbar, die mit dem gleichzeitigen Erscheinen von apikalen Vesikeln einhergehen und als Vorläufer des Darmlumens betrachtet werden können. Die epitheliale Polarisierung schließt sich direkt an die zytoplasmatische Polarisierung an und kennzeichnet sich dadurch, daß auf IF-Ebene Komponenten der AJ, wie z.B. DLG-1 und HMR-1, am zukünftigen apikalen Pol akkumulieren. Während der Ausbildung des Darmlumens gelangt die AJ schließlich nach apikolateral, wo sie das Lumen umschließt und die Darmzellen miteinander verbindet (Leung et al., 1999).

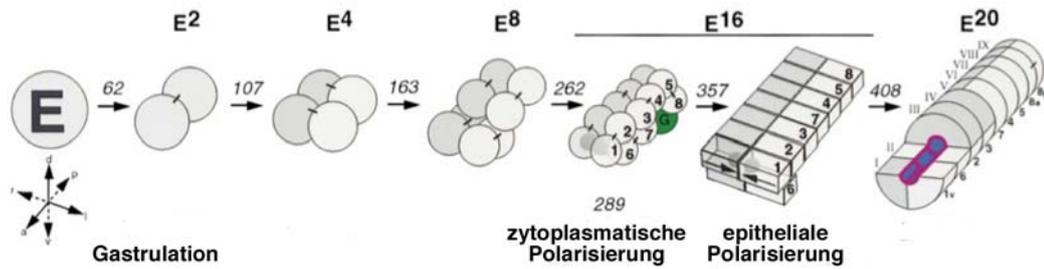


Abb. 6: Organogenese des *C. elegans* Darmepithel (modifiziert nach Leung et al., 1999).

Der Darm von *C. elegans* geht klonal aus der E-Zelle hervor und besteht letztendlich aus 20 Zellen, die röhrenförmig das Lumen umschließen. Während der Organogenese des Epithels können die zytoplasmatische und anschließende epitheliale Polarisierung beobachtet werden. Hierdurch kommt es zunächst zu einer polaren Verteilung von Zytoplasmakomponenten und schließlich zur apikalen Anreicherung von Markern der "apical junction" und apikalen Proteinen.

1.6 Aufgabenstellung

Die Bildung eines Lumens ist eng verknüpft mit der korrekten Ausbildung von Zell-Zellverbindungen. Diese sind neben der Zell-Zelladhäsion auch für die Regulation des parazellulären Transports innerhalb des Epithels verantwortlich.

Das Darmepithel des Nematoden *Caenorhabditis elegans* stellt hierbei ein ideales Modellsystem dar, um mehr über die zugrundeliegende Mechanismen und Signaltransduktionswege der Lumenbildung und Zell-Zelladhäsion zu erfahren. Mit ERM-1, dem einzigen Ezrin-Radixin-Moesin Homolog in *C. elegans*, wurde ein Protein identifiziert, dessen Funktion auf einen engen Zusammenhang zwischen der korrekten Ausbildung des Lumens und der Zell-Zellverbindung (der *C. elegans* “apical junction”, AJ) schließen läßt.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte zunächst geklärt werden, wie es in einem *erm-1(RNAi)*-Hintergrund entlang der anterior-posterior Achse zu Verschlüssen beziehungsweise Verengungen des Darmlumens unter Beteiligung der AJ kommt. Danach sollten mit der Analyse des nicht-muskulären Aktin-Myosinnetzwerks im *C. elegans*-Embryo weitere Proteine identifiziert werden, die nach Ausschaltung einen *erm-1(RNAi)*-ähnlichen Phänotyp hervorrufen. Im Hefe-Zwei-Hybrid-System sollte dann versucht werden Bindungspartner von ERM-1 zu identifizieren, deren Analyse weitere Rückschlüsse über die Funktionsweise des Proteins erlauben. Im letzten Teil dieser Arbeit sollte geprüft werden, inwiefern die Zell-Zelladhäsion im Darmepithel von *C. elegans* durch redundante Mechanismen vermittelt wird, die neben dem Cadherin-Catenin-Komplex weitere Moleküle aus der Superfamilie der Immunglobuline erfordern.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien, Materialien 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; Bio-Rad, München; Difco, Detroit, USA; Fluka, Buks, Schweiz, Gibco/BRL Life Technologies, Karlsruhe, Grüssing, Filsum; Merck, Darmstadt; Riedel-de Haen, Seeize; Roth, Karlsruhe; Serva, Heidelberg; Sigma-Aldrich, Steinheim.

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

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

Allgemeine Geräte:

Elektrotransformationen:	Gene Pulser II und Puls Controller Plus (BioRad, München)
UV-Spektrometer:	Gene Quant II (Pharmarcia Biotech, Cambridge, England)
	und UV-160 (Shizmadzu Deutschland GmbH, Duisburg)
UV-Quervernetzung:	UV Stratalinker 2400 (Stratagene, Heidelberg)
Zentrifugen:	Biofuge pico (Heraeus instruments, Düsseldorf); J21-C (Beckman instruments, Palo Alto, USA)
Mikropipettenpuller:	Sutter P-97 (Science products, Hofheim)
Ultraschallgerät:	Labsonic U (Braun Biotech, Melsungen)
SDS-PAGE & Western-Blotting:	Mini Protean II (BioRad, München)
PCR-Gerät:	PTC-200 (MJ Research, Watertown, USA)

Kitsysteme:

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

Mikroskope:

- Zeiss Axiophot 2 (Zeiss, Oberkochen), gekoppelt mit einer Sony 3 CCD Color Videokamera und einem JVC-Timelapse Videorekorder
- konfokales Lasermikroskop Leica TCS NT (Leica, Heidelberg)
- 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

Bildverarbeitung:

Bilder wurden auf einem McIntosh PowerPC (Apple, Ismaning) mit den Bildverarbeitungsprogrammen Adobe Photoshop CS (Adobe Systems, San Jose; USA) und Canvas 9 (Deneba Systems, Miami, USA) bearbeitet.

Sequenzanalysen:

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

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Generelle Medien

2.2.1.1 Medien für Bakterien

SOB-Mg²⁺: 2% Bactotrypton, 0.5% Bactoyeast, 10mM NaCl, 2.5mM KCl
LB: 1% Bactotrypton, 0.5% Bactoyeast, 1% NaCl
LB-Agar: 6.3g Agar/300ml LB
Ampicillin: 100mg/ml Stammlösung in dH₂O
Kanamycin 50mg/ml Stammlösung in dH₂O
Tetracyclin 12.5mg/ml Stammlösung in dH₂O

2.2.1.2 Medien für Hefen

YPDA: 20g/l Difco peptone, 10g/l Hefe-Extrakt, 300mg/l L-Adenine hemisulfat Salz
YPDA-Agar: 15g Agar pro Liter YPDA
SD: 6.7g Difco "yeast nitrogene base without amino acids" in 850ml dH₂O auflösen, autoklavieren, 100ml 10x Dropout Lösung und 50ml 40%iger Glukose hinzufügen; ggf. 10ml 100x Histidin und/oder 10ml 100x Leucin und/oder 10ml 100x Tryptophan zugeben
SD-Agar: 15g Agar pro Liter SD
10x Dropout Lösung: 300 mg/l L-Isoleuzin, 1500mg/l L-Valin, 300mg/l L-Adenine hemisulfat Salz, 200mg/l L-Arginin HCl, 300mg/l L-Lysin HCl, 200mg/l L-Methionin, 500mg/l L-Phenylalanin, 2000mg/l L- Threonin, 300mg/l L-Tyrosin, 200mg/l L-Urazil
100x Histidin: 2000mg/l L-Histidin HCl monohydrate
100x Leucin: 10g/l L-Leucin
100x Tryptophan: 2000mg/l L-Tryptophan

2.2.2 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 lacI^qZ M15 Tn10(Tet^r)]*. Alle herkömmlichen Klonierungsarbeiten wurden mit diesem Stamm durchgeführt.

SolR (Stratagene, Heidelberg), Genotyp: *e 14-(mcrA-) D(mcrCB-hsdSMR-mrr)171 endA1 supE44 thi-1 sbcC uvrC umuC::Tn5(Kan^r) recJ gyrA96 recA1 lac [F'proAB lacI^qZ DM15]c*. Stamm für Phagenaufarbeitung.

M15[pREP4] (Qiagen, Hilden): Dieser Stamm basiert auf dem *E.coli*-Stamm K12 (Nal^S, Str^S, Rif^S, Lac⁻, Ara⁻, Gal^r, Mtl⁻, F⁻, RecA⁺, Uvr⁺, Lon⁺) und besitzt zusätzlich das Plasmid pREP4. Er dient zur Expression von Fusionsproteinen.

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

2.2.3 Hefestämme

Es wurden folgende Hefestämme der Spezies *Saccharomyces cerevisiae* verwendet:

AH109 (Clontech, Palo Alto, USA), Genotyp: *MATa, trp1-901, leu2-3, 112, ura3-52, his3-200, gal4Δ, gal80Δ, LYS2::GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-HIS3, GAL2_{UAS}-GAL2_{TATA}-ADE2, URA3::MEL1_{UAS}-MEL1_{TATA}-lacZ*. Stamm, der für den Yeast Two Hybrid Screen eingesetzt wurde. Reportergene: *HIS3, ADE2, lacZ*, auxotrophe Marker: *trp1, ura3, leu2*.

Y190 (Clontech, Palo Alto, USA), Genotyp: *MATa, ura3-52, his3-200, ade2-101, lys2-801, trp1-901, leu2-3, 112, gal4Δ, gal80Δ, cyhr2, LYS2::GAL1_{UAS}-HIS3_{TATA}-HIS3, MEL1 URA3::GAL1_{UAS}-GAL-1_{TATA}-lacZ*. Stamm, der für den Test von direkten Interaktionen eingesetzt wurde. Reportergene: *HIS3, lacZ*, auxotrophe Marker: *trp1, ura3, leu2*

2.2.4 Vektoren

pBluescript II KS +/- (2.96kB, Stratagene, Heidelberg). Hierbei handelt es sich um einen Standardvektor u.a. für Klonierungsarbeiten, DNA-Sequenzierungen und *in-vitro* Mutagenesen. Er besitzt einen bakteriellen (ColE1 ori) und einen viralen (f1-origin) Replikationsursprung, ferner läßt er aufgrund eines Ampicillin-Resistenzgenes eine Antibiotikaselektion zu.

Es gibt eine „multiple cloning side“ (MCS), die singuläre Schnittstellen vieler Enzyme besitzt, hierin werden Fremdsequenzen kloniert. Ferner besitzt der Vektor ein für das α-Peptid der β-Galaktosidase 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 +/- (2.96kB, 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.

pQE (3.4kB, Quiagen, Hilden). Ampicillinresistente Vektoren zur Erzeugung von Fusionsproteinen in *E.coli*. Downstream der MCS befindet sich ein „Tag“ aus 6 Histidinresten, so daß nach Klonierung von Fremdsequenzen in das Leseraster der MCS ein His-„getaggetes“ Fusionsprotein exprimiert werden kann. Die Expression wird über den bakteriellen T₅-Promotor geregelt, der durch das Substrat-Analogon IPTG (**I**sopropyl**t**hiogalactosid) induziert wird.

pREP4 (3.74kB, Qiagen, Hilden). Das Plasmid pREP4 besitzt neben einem Resistenzgen für Kanamycin einen konstitutiv exprimierten *lac*-Repressor, der durch das bakterielle *lacI*-Gen auf dem Plasmid kodiert ist. Damit die ektopische Expression des Proteins im Bakterium nicht zu möglichen pathologischen Effekten führt, ist es erwünscht, das Protein kontrolliert zu exprimieren. Durch Zugabe von IPTG wird der Repressor inaktiviert.

pPD129.36 (L4440 „feeding vektor“, 2.79kB, 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.

pME18S-FL3 (3,392kB, Suzuki und Sugano, 2003). Vektor mit Ampicillinresistenz, in den teilweise die von Y.Kohara erhaltenen cDNAs verpackt sind.

pGBT9 (5.5 kB, Clontech, Heidelberg). Hefe-Expressionsvektor, der es ermöglicht Fusionsproteine mit der DNA-Bindedomäne von GAL4 zu erzeugen. Neben einer Ampicillinresistenz codiert der Vektor für *trp1*, so daß auxotrophe Hefen auf Tryptophan-Mangelmedium wachsen können. Die Expression wird über den konstitutiv aktiven ADH1-Promotor geregelt.

pGBKT7 (7.3kB, Clontech, Heidelberg). Hefe-Expressionvektor, der ebenso wie pGBT9 die Expression von Fusionsproteinen mit der GAL4-Bindedomäne ermöglicht, wobei zusätzlich ein Myc-Epitop an das Fusionsprotein gekoppelt wird. Der Vektor besitzt Kanamycinresistenz und codiert für *trp*. Auch hier wird die Expression über den ADH1-Promotor gesteuert.

pACT2 (8.1kB, Clontech, Heidelberg). Hefe-Expressionsvektor zur Herstellung von Fusionsproteinen mit der Aktivierungsdomäne von GAL4. Er besitzt Ampicillinresistenz und das Gen *leu2*, so daß auxotrophe Hefen auf Leucin Mangelmedium wachsen können. Die Expression erfolgt auch über den ADH1-Promotor.

2.2.5 Konstrukte

In Tabelle I sind alle in dieser Arbeit hergestellten Konstrukte aufgelistet, wobei die Klonierung nach den unten beschriebenen Standardmethoden erfolgte. Die Amplifizierung des „Inserts“ erfolgte über PCR bzw. RT-PCR, welches, ebenso wie der Vektor mit den entsprechenden Restriktionsenzymen verdaut wurde. Es erfolgte eine Ligationsreaktion und eine Transformation in *E.coli*.

Die Inserts der „Feedingkonstrukte“ wurden aus den entsprechenden Vektoren (pBluescript SK bzw. pME18S-FL3) in den pPD129.36 umkloniert.

Vektor	Insert	Größe (Bp)	Template	5'RE	3'RE	Verwendung
pQE30	ERM-1 C-Terminus	1068	257f5	BamH1	BamH1	Proteinsynthese
pQE32	LAD-1 C-Terminus	285	1335e06	BamH1	HindIII	Proteinsynthese
pGBKT7	DLG-1 PDZ 1, 2+3	freundlicherweise von M.Hoffmann (Düsseldorf) zur Verfügung gestellt				Hefeinteraktionen
	DLG-1 PDZ- 1-3	freundlicherweise von M.Hoffmann (Düsseldorf) zur Verfügung gestellt				Hefeinteraktionen
	ERM-1 Full length	1691	257f5	BamH1	BamH1	Hefeinteraktionen
	ERM-1 FERM	665	257f5	BamH1	BamH1	Hefeinteraktionen, Two-Hybrid Köder
	ERM-1 C-Terminus	1070	257f5	BamH1	BamH1	Hefeinteraktionen, Two-Hybrid Köder
pGBT9	ERM-1 Full length	1691	257f5	BamH1	BamH1	Hefeinteraktionen
	ERM-1 FERM	665	257f5	BamH1	BamH1	Hefeinteraktionen
	ERM-1 C-Terminus	1070	257f5	BamH1	BamH1	Hefeinteraktionen
	TAG-60 C-Terminus	980	1727b06	BamH1	BamH1	Hefeinteraktionen
pACTII	CRB-1 C-Terminus	116	74b1	BamH1	XhoI	Hefeinteraktionen
	ERM-1 Full length	1691	257f5	BamH1	BamH1	Hefeinteraktionen
	ERM-1 FERM	665	257f5	BamH1	BamH1	Hefeinteraktionen
	HMP-2 N-Terminus + arm repeats	1344	473f7	EcoRI	XhoI	Hefeinteraktionen
	HMR-1 C-Terminus	365	poly A+ RNA	BamH1	XhoI	Hefeinteraktionen
	LAD-1 ΔESAV	272	1335e06	EcoRI	XhoI	Hefeinteraktionen
	LAD-1 C-Terminus	285	1335e06	EcoRI	XhoI	Hefeinteraktionen
	NHX-2 C-Terminus	534	1279f5	EcoRI	EcoRI	Hefeinteraktionen
	SDN-1 C-Terminus	359	174c3	BamH1	XhoI	Hefeinteraktionen

	TAG-60 C-Terminus	979	1727b06	BamHI	XhoI	Hefeinteraktionen
pPD129.36	<i>act-5</i>		MRC Klon			RNAi "Feeding"
	<i>apm-1</i>	785	774e02	NcoI	NcoI	RNAi "Feeding"
	<i>apm-2</i>	1099	328e9	NcoI	BglII	RNAi "Feeding"
	<i>dlg-1</i>	1340	128b7	XhoI	XhoI	RNAi "Feeding"
	<i>erm-1</i>	1638	257f5	XhoI	XhoI	RNAi "Feeding"
	<i>hmp-1</i>	1468	675e4	XhoI	SacI	RNAi "Feeding"
	<i>hmp-2</i>	748	493f7	HindIII	HindIII	RNAi "Feeding"
	<i>hmr-1</i>	1665	611f6	XhoI	SacI	RNAi "Feeding"
	<i>let-413</i>	2202	524b7	XbaI	XBaI	RNAi "Feeding"
	<i>let-502</i>	2223	9b4	XhoI	XhoI	RNAi "Feeding"
	<i>mel-11</i>	1818	571h10	SacI	XhoI	RNAi "Feeding"
	<i>mhc-4</i>	395	572b4	HincII	SacI	RNAi "Feeding"
	<i>nmy-1</i>	829	201b7	SalI	SalI	RNAi "Feeding"
	<i>nmy-2</i>	811	312e4	XhoI	XhoI	RNAi "Feeding"
	<i>vig-1</i>	600	Hefeklon	NcoI	XhoI	RNAi "Feeding"
	Y55F3AM.13	750	Hefeklon	NcoI	XhoI	RNAi "Feeding"
	<i>pas-4</i>	1200	Hefeklon	HindIII	HindIII	RNAi "Feeding"
	<i>lec-1</i>	1700	Hefeklon	HindIII	HindIII	RNAi "Feeding"
	F47G4.2	2000	Hefeklon	HindIII	HindIII	RNAi "Feeding"
	<i>map-1</i>	2000	Hefeklon	HindIII	HindIII	RNAi "Feeding"
	<i>eft-3</i>	1500	Hefeklon	HindIII	HindIII	RNAi "Feeding"
	K10C2.4	750	Hefeklon	HindIII	HindIII	RNAi "Feeding"
	<i>pqn-46</i>	1500	Hefeklon	HindIII	HindIII	RNAi "Feeding"
	<i>hcf-1</i>	750	Hefeklon	XhoI	XhoI	RNAi "Feeding"
	<i>ubq-1</i>	500	Hefeklon	XhoI	XhoI	RNAi "Feeding"
	<i>clp-4</i>	750	Hefeklon	NcoI	XhoI	RNAi "Feeding"
	<i>col-144</i>	900	Hefeklon	NcoI	XhoI	RNAi "Feeding"
	ZK1055.7	750	Hefeklon	NcoI	XhoI	RNAi "Feeding"
	C13B9.3	900	Hefeklon	NcoI	XhoI	RNAi "Feeding"
	<i>ifa-4</i>	1700	Hefeklon	HindIII	HindIII	RNAi "Feeding"
	ZK1098.5	1200	Hefeklon	HindIII	HindIII	RNAi "Feeding"
	<i>ran-2</i>	2000	Hefeklon	XhoI	XhoI	RNAi "Feeding"
	<i>unc-101</i>	(24)1-1269 (1879)	814e10	XhoI	XhoI	RNAi "Feeding"

Tab.I: Überblick über die im Rahmen dieser Doktorarbeit hergestellten Konstrukte.
Benutzte Abkürzungen: RE Restriktionsenzym.

2.2.6 Oligonukleotide

Konstrukt /Verwendung	Primer	Oligonukleotidsequenz (5' - 3')
pQE30_erm-1 C-Terminus	vorwärts	ACGGATCCATCCGCAACAAAAGGGA ACT
	rückwärts	CAGGATCCTTACATATTTTCGTATTGATC
pQE32_lad-1 C-Terminus	vorwärts	CTGGATCCTTGTCTGCCGTCAACGTGGAC
	rückwärts	ATAAGCTTCTAGACAAACGTCGACGTTGA
pGBK77/pGBT9/pACT II, ERM-1 "full length"	vorwärts	TAGGATCCTGTCGAAAAAAGCGATCAATG
	rückwärts	CAGGATCCTTACATATTTTCGTATTGATC
pGBK77/pGBT9, ERM-1 C-Terminus	vorwärts	TTGGATCCAAATCCGCAACAAAAGGGAA
	rückwärts	CAGGATCCTTACATATTTTCGTATTGATC
pGBK77/pGBT9/pACT II, ERM-1 FERM	vorwärts	TTGGATCCAAATCCGCAACAAAAGGGAA
	rückwärts	CAGGATCCTTACATATTTTCGTATTGATC
pGBT9, TAG-60 C-Terminus	vorwärts	TTGGATCCGACTTGCTGAATTGAACAAAG
	rückwärts	GAGGATCCTTACATGTTGCTGACCAATTG
pACTII, LAD-1 C-Terminus	vorwärts	CTGAATTCTTGTCTGCCGTCAACGTGGAC
	rückwärts	ATCTCGAGCTAGACAAACGTCGACGTTGA
pACTII, LAD-1 ΔESAV	vorwärts	CTGAATTCTTGTCTGCCGTCAACGTGGAC
	rückwärts	ACCTCGAGCGACGTTGATCCTTTCTCGGG
pACTII, TAG-60 C-Terminus	vorwärts	TTGGATCCGACTTGCTGAATTGAACAAAG
	rückwärts	GACTCGAGTTACATGTTGCTGACCAATTG
pACTII, HMR-1 C-Terminus	vorwärts	GAGGATCCTGTATACGAGACGATCGCCTG
	rückwärts	TCCTCGAGTTATTGGGCACTTTCGATACT
pACTII, HMP-2 N-Terminus+ arm repeats	vorwärts	CCGAATTCCCATGCTTCTTCACTCTACC
	rückwärts	GTCTCGAGAAGTGC ACTATTTCTAATAAC
pACTII, NHX-2 C-Terminus	vorwärts	AGGAATTCAAAGAATGTTCACTCAAAGA
	rückwärts	TAGAATTCCTATACTCTTTCGTGGAAGCT
pACTII, CRB-1 C-Terminus	vorwärts	CCGAATTCCCATGCTTCTTCACTCTACC
	rückwärts	TTCTCGAGTCAGATAAGACGTTCTTGAGG
pACTII, SDN-1 C-Terminus	vorwärts	TGGGATCCAGAATATTCATAATGA
	rückwärts	AGCTCGAGTTACGCGTAAAATTCTTT
pPD129.36, generelle Sequenzierung/PCR	vorwärts	GATAACCGTATTACCGCCTTTG
	rückwärts	CGATTAAGTTGGGTAACGCCA
<i>lad-1(ok1244)</i> Sequenzierung	vorwärts	GCTCTCCAAGGAAATCAACACAAA
	rückwärts	GCATCCGAAGAATTTGGATCACCT

Tab. II: Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide, die für PCR/RT-PCR-Reaktionen eingesetzt wurden.

Die fettgedruckten Sequenzen stellen die künstlich eingeführten Erkennungssequenzen für die Restriktionsenzyme dar.

2.2.7 Konzentrationsbestimmungen von Nucleinsäuren

2.2.7.1 Photometrische Konzentrationsbestimmung

Bei einer Wellenlänge von 260 nm wird die Extinktion (E) der Nucleinsäurelösung gemessen und so die Konzentration der Nucleinsäuren bestimmt. Die Nucleinsäuren werden dabei in A.dest. verdünnt (RNA in Nuclease-freiem Wasser) und ihre Extinktion im Photometer gegen Wasser als Referenz gemessen. Hierbei gilt das Lambert-Beer'sche Gesetz, welches die Beziehung zwischen Extinktion und Stoffkonzentration wiedergibt:

$E_{260} = \epsilon \cdot c \cdot d$, wobei E die Extinktion bei der entsprechenden Wellenlänge ist, ϵ der Extinktionskoeffizient, c die Stoffkonzentration und d die Dicke der Küvette.

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

2.2.7.2 Konzentrationsbestimmung durch Gelelektrophorese

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

2.2.8 DNA-Gelelektrophorese

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

Die Agarose wird mit 1x TAE in der Mikrowelle aufgeköcht, auf 70°C abgekühlt und mit 1µl einer Ethidiumbromid(EtBr)-Stammlösung auf 100ml Gel versetzt. Es wurden im Durchschnitt immer 1%, horizontale Agarosegele gegossen. Als Laufpuffer diente 1x TAE. Die Gelläufe wurden bei durchschnittlich 100 V durchgeführt.

In die DNA-Proben wird als Auftragspuffer Bromphenolblau und Xylencyanol gegeben, welche als Lauffront sichtbar sind. Ist das Gel weit genug gelaufen, kann es unter UV-Licht ($\lambda = 312\text{nm}$) betrachtet werden. Das Ethidiumbromid, ein DNA-Intercalator, 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 λ -DNA-HindIII/EcoRI Marker 3 oder der Gene-Ruler™ 1kb DNA-ladder (beide MBI Fermentas, St. Leon Rot) verwendet.

Lösungen:

50 x TAE-Puffer: 2M Tris-acetat; 0.1M EDTA; pH7.7
 EtBr-Stammlösung : 10mg/ml
 6 x Auftragspuffer: 0.25% Bromphenoblau; 0.25% Xylencyanol; 40%
 Glycerin

2.2.9 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

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

Die PCR läuft generell in drei sich wiederholenden Schritten ab:

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

PCR-Reaktionen wurden in einem Volumen von 50µl angesetzt.

Folgende Mengen bzw. Konzentrationen wurden dem PCR-Ansatz zugefügt:

Template: Xµl (1-10ng; abhängig von der Konzentration des Templates)
 Primer: 0.5µl (je Primer; Konzentration: 50pmol/µl)
 dNTP's: 1.0µl (aus einem dNTP-Mix; Konzentration: 25mmol/µl)
 10 x Pfu/Tac-Puffer: 5.0µl
 MgCl: 5.0µl (nur für Tac-Polymerase, Konzentration 25mM)
 Pfu/Tac-Polymerase: 1.0µl (10U/µl)
 dH₂O: Xµl (mit dH₂O auf 50µl Gesamtvolumen auffüllen)

Auf Überschichtung des Ansatzes mit Mineralöl wurde verzichtet. Stattdessen wurde der Deckel beheizt.

PCR-Reaktionen wurden mit folgendem Programm durchgeführt:

Schritte	Temperatur (°C)	Dauer
1. Initiale Aktivierung	92	2min
2. Denaturierung der DNA	94	15sek
3. Annealing der Primer	50-65	1min
4. DNA-Synthese	72	pro kB 1min
5.	Wiederholung der Schritte 2 bis 4 (10 Zyklen)	
6. Denaturierung der DNA	94	15sek

7. Annealing der Primer	50-65	1min
8. DNA-Synthese	72	pro kB 1min + 20 sek
9	Wiederholen der Schritte 6 bis 8 (20 Zyklen)	
10. Finale DNA-Synthese	72	8min
11. Reaktionsende	4	endlos

Tab. III: Das im Rahmen dieser Arbeit verwendete PCR-Programm.

2.2.10 RT(Reverse-Transkription)-PCR

Bei der RT-PCR geht der eigentlichen PCR eine reverse Transkription (RT) voraus, in der ausgehend von polyA⁺-RNA einzelsträngige DNA gebildet wird. Ermöglicht wird dies durch reverse Transkriptasen aus RNA-enthaltenden Retroviren wie z.B. dem avian myeloblastosis virus (AMV), dem Monoleukämie murine leukemia virus (MMLV) oder dem human immunodeficiency virus (HIV). Neben ihrer RNA-abhängigen DNA-Polymerase-Funktion besitzen diese eine RNase H-Aktivität zum Abbau der RNA im entstehenden RNA-DNA-Hybrid. Zunächst wird die RNA in der eigentlichen RT-Reaktion revers transkribiert, entweder die gesamte polyA⁺-RNA-Population mithilfe eines Oligo-dT-Primer oder nur die gewünschte Subpopulation durch den Einsatz eines genspezifischen Primer, gefolgt von einer PCR mit genspezifischen Primern. Die Firma *Qiagen*, Hilden, hat ein System entwickelt, um beide Schritte auf einen zu reduzieren. Dieses „OneStep RT-PCR“ System wurde nach Herstellungsangaben verwendet. Das anschließende PCR-Programm wurde aus dem OneStep RT-PCR Kit, *Qiagen*, Hilden, übernommen.

Nachfolgend ist ein typischer Reaktionsansatz dargestellt:

- 1µl Template-RNA (ca. 1µg)
- 2µl dNTP-Mix (je 10mM)
- 10µl 5x *Quiagen* OneStep RT-PCR Puffer
- 0.5µl spezif. vorwärts 'Primer' (25µM)
- 0.5µl spezif. rückwärts 'Primer' (25µM)

- 2µl *Quiagen* OneStep RT-PCR Enzyme Mix
- 0.5µl RNase Inhibitor
- 13µl RNase freies dH₂O (DEPC-H₂O)

Schritte	Temperatur (°C)	Dauer
1. Reverse Transkription	50	30min
2. Initiale Aktivierung	95	15min
3. Denaturieren der DNA	94	30sec
4. Annealing der Primer	50-65	1min
5. DNA-Synthese	72	pro kB 1min
6.	Wiederholung der Schritte 3 bis 5 (35 Zyklen)	
7. Finale DNA-Synthese	72	10min
8. Reaktionsende	4	endlos

Tab. IV: Das im Rahmen dieser Arbeit verwendete RT-PCR-Programm.

Um die Ausbeute zu erhöhen wurde im Anschluss an dieses Programm häufig noch eine weitere PCR (siehe 2.2.9) angewendet.

2.2.11 Manipulation von DNA

2.2.11.1 Restriktionsverdau von DNA

Um DNA zu analysieren, kann diese mit Restriktionsendonukleasen, welche ursprünglich aus Bakterien stammen, geschnitten werden. Die Restriktionsenzyme erkennen spezifische Sequenzen, sogenannte 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:

- xµl DNA-Lösung (je nach Konzentration)
- 1µl 10x Restriktionspuffer
- 1µl Enzym (10U pro µg DNA)
- auf 20µl mit dH₂O auffüllen

Der Restriktionsansatz wird bei 37°C für 2h inkubiert

2.2.11.2 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 3fachem molaren Überschuß eingesetzt werden. Folgende Faustformel kann zur Berechnung der Mengenverhältnisse eingesetzt werden:

$$\frac{X \text{ ng (Vektor)}}{\text{kB (Vektor)}} \times 3 = \frac{Y \text{ ng (Insert)}}{\text{kB (Insert)}}$$

Das Reaktionsvolumen sollte möglichst klein gehalten werden (10 - 30µl).

Die Inkubation erfolgt grundsätzlich über Nacht bei 16 °C im Wasserbad.

Ein Standard-Ligationsansatz sieht folgendermaßen aus:

Xµl Vektor

Yµl Insert

1µl 10xPuffer

1µl T4-DNA-Ligase

auf 10µl mit dH₂O auffüllen

2.2.11.3 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. 3M Natriumacetat pH5.2
- Fällung über Nacht bei -20°C oder 2h bei -70°C
- Zentrifugation für 30min bei 13000rpm
- Überstand verwerfen, Pellet in eiskaltem 70 % Ethanol waschen
- Zentrifugation für 15min bei 13000rpm

- Überstand verwerfen und Pellet lufttrocknen lassen
- Pellet in einem geeignetem Volumen dH₂O bzw. DEPC-dH₂O aufnehmen und resuspendieren

2.2.12 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 30µl dH₂O (auf 65°C vorgeheizt) verwendet.

2.2.13 Herstellung transformationskompetenter Zellen

Um eine Transformation von Plasmid-DNA in Bakterien zu ermöglichen, müssen diese kompetent gemacht werden. Je nach Wahl der Transformationsmethode erfolgt die Herstellung transformationskompetenter Bakterien nach unterschiedlichen Protokollen.

2.2.13.1 Die CaCl₂-Methode

- 5ml LB-Medium mit 40µl Bakterien-Glycerinstock ü. N. bei 37°C inkubieren
- 1ml der Vorkultur zu 100ml LB-Medium geben und bis zu einer OD von 0.4 bis 0.55 wachsen lassen (~ 1 3/4h)
- Kolben unter Schwenken auf Eis abkühlen lassen (~10min)
- Suspension in Fraktionen von 25ml aliquotieren (sterile „blue caps“, Falcon, USA)
- 10 min bei 5000 rpm und 4°C zentrifugieren
- Überstände verwerfen
- Pellets in je 7.5ml kaltem TFBII luftblasenfrei resuspendieren
- 10min auf Eis inkubieren
- je zwei Ansätze vereinigen und erneut 10min bei 5000rpm und 4°C zentrifugieren
- Überstände verwerfen
- Pellets in je 2ml kaltem TFBII luftblasenfrei resuspendieren
- Aliquots zu 50µl Bakteriensuspension in flüssigem Stickstoff schockgefrieren
- Lagerung bei -70°C (Bakterien frühestens 1 h nach Herstellung benutzen)

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

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

Lösungen:

- TFBI: 30mM Kaliumacetat, 50mM Manganchlorid, 100mM Rubidium-chlorid, 10mM Calciumchlorid, 15% Glycerin; mit 0.2M Essig-säure auf pH 5.8 einstellen, sterilfiltrieren und bei 4 °C lagern.
- TFBII: 10mM MOPS, 75mM Calciumchlorid, 10mM Rubidiumchlorid, 15% Glycerin; mit NaOH auf pH7.0 einstellen, sterilfiltrieren und bei 4°C lagern.

2.2.13.2 Herstellung elektrokompetenter Bakterien

Elektrokompetente Bakterien wurden nach folgendem Protokoll hergestellt:

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

Die Transformationsrate wurde nach dergleichen Vorgehensweise, wie in Abschnitt 2.2.13.1 getestet.

2.2.14 Transformation kompetenter Zellen mit Plasmid-DNA

2.2.14.1 Transformation nach der CaCl₂-Methode

- 50µl kompetente Bakterien auf Eis auftauen lassen
- Zugabe von DNA (z.B. 1µl einer Midi-Präparation (siehe 2.2.15) oder 10µl einer Ligation) und leicht vermischen
- 20-30min auf Eis inkubieren
- Hitzeschock für 2min bei 42°C im Wasserbad
- 5 min auf Eis inkubieren
- mit LB-Medium auf 500µl auffüllen
- 45min. bei 37°C inkubieren
- 50µl auf einer antibiotikahaltigen LB(Luria-Bertoni)-Agarplatte ausstreichen (10%-Platte)
- Bakteriensuspension kurz zentrifugieren, Überstand bis auf 100µl abziehen, Pellet im Restvolumen resuspendieren und ausplattieren (90%-Platte)

- Inkubation der Agarplatten ÜN bei 37°C

2.2.14.2 Elektrotransformation

- 50µl kompetente Bakterien auf Eis auftauen lassen
- Zugabe von 1µl einer verdünnten DNA-Lösung (~20ng/µl)
- Ansatz in die Elektroküvette füllen, so daß das Volumen zwischen den Kondensatorplatten ausgefüllt ist.
- Elektroschock der Bakterien mit 1.8kV, Zeitkonstanten von 4.8 bis 5.0ms sind akzeptabel
- Dem Ansatz 450µl LB-Medium hinzufügen
- 30-45min bei 37°C inkubieren
- Ansatz auf antibiotikahaltigen Agarplatten ausplattieren und über Nacht bei 37°C inkubieren

2.2.15 **Isolierung von Plasmid-DNA**

2.2.15.1 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. 3ml LB (mit dem entsprechendem Antibiotikum) hochwachsen lassen
- ü. N.-Kultur (~ 1,5ml) für ca. 2min bei 13000rpm zentrifugieren
- Bakterienpellet in 300µl Puffer S1 resuspendieren
- 300µl Puffer S2 hinzugeben und 5x invertieren und 5min bei RT inkubieren lassen
- 300µl Puffer S3 hinzugeben und 5x invertieren
- 15min bei 13000rpm zentrifugieren und Überstand in ein frisches Eppendorf-Gefäß überführen
- Fällung mit 300µl Isopropanol
- 30min bei 13000rpm zentrifugieren und Überstand verwerfen
- Pellet in 100µl kaltem 70 % Ethanol waschen und 15min bei 13000rpm zentrifugieren
- Überstand verwerfen, Pellet trocknen lassen und in 20µl dH₂O resuspendieren

Lösungen: (laut Herstellerangaben)

Puffer S1: 50mM Tris/HCl (pH8), 10mM EDTA, 100µg/ml RNase A
Puffer S2: 200mM NaOH, 1% SDS (w/v)
Puffer S3: 2.8M KAc, pH5.1

2.2.15.2 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-1µg pro µl, die DNA wurde in 100µl dH₂O aufgenommen.

Lösungen (laut Herstellerangaben):

S1, S2, S3:	siehe oben
N2:	100mM Tris/H ₃ PO ₄ , 15% Ethanol; 900mM KCl, pH6.3
N3:	100mM Tris/H ₃ PO ₄ , 15% Ethanol; 1150mM KCl, pH6.3
N5:	10 mM Tris/H ₃ PO ₄ , 15% Ethanol; 1000mM KCl, pH8.5

2.2.15.3 Gewinnung großer Plasmidmengen (Maxipräparation)

Um bis zu 5µg Plasmid-DNA pro µl aus Bakterien zu isolieren, wird eine „Maxipräparation“ durchgeführt. Hierbei wurde das Kitsystem von Quiagen (Hilden) verwendet und nach dem Protokoll des Herstellers gearbeitet. Die aufgereinigte DNA wurde schließlich in 200µl dH₂O aufgenommen.

Lösungen (laut Herstellerangaben):

P1, P2, P3:	entsprechen S1, S2, S3
QBT:	750mM NaCl; 50mM MOPS, pH7; 15% Isopropanol, 0.15% Triton X-100
QC:	1.0M NaCl; 50mM MOPS, pH7; 15% Isopropanol
QF:	1.25M NaCl; 50mM Tris-Cl, pH8.5, 15% Isopropanol

2.2.16 *in vitro* Transkription

Doppelsträngige RNA für RNAi-Experimente wird ausgehend von den „Feedingkonstrukten“ (s. 2.2.5), welche 2 T7-Promotoren besitzen in jeweils einer Reaktion durch *in vitro* Transkription hergestellt.

2.2.16.1 Herstellung des Templates

Das Template für die Transkriptionsreaktion wird mittels einer Standard-PCR-Reaktion (s. 2.2.9) mit für den „Feedingvektor“ pPD129.36 spezifischen Primern (s. 2.2.6) hergestellt. Es werden für die Reaktion ca. 2-3µl der unaufgereinigten PCR eingesetzt.

2.2.16.2 Transkriptionsreaktion

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

- 2µl 10x Transkriptionspuffer
- je 1µl rNTP's (also 4µl gesamt)
- 1µg (2-3µl) Template-DNA
- 0.2µl RNase Inhibitor
- 2µl T7-Polymerase
- auf 20µl mit DEPC-H₂O auffüllen

Es folgt eine Inkubation für 2-4 Stunden bei 37 °C. Dann werden je Ansatz 1µl RNase freie DNase hinzugeben und 45min bei 37°C inkubiert. Es folgt eine Zugabe von 115µl DEPC-Wasser und eine Zugabe von 15µl Ammoniumacetat-Stopplösung zum Reaktionsstop und zum Fällen der RNA. Nach Zugabe von 1Vol. Isopropanol fällt die RNA ü. N. bei -20°C (siehe 2.2.11.3) und wird in 15µl DEPC-Wasser resuspendiert. Die RNA wird schließlich in Aliquots von 2µl bei -70°C aufbewahrt.

Lösungen:

Ammoniumacetat-Stopplösung: 5M Ammoniumacetat, 100mM EDTA

2.2.17 Isolierung von poly-A⁺-RNA

An das 3'-Ende eukaryotischer „messenger“-RNA (mRNA) wird posttranskriptionell eine Sequenz von Poly-Adenosin variabler Länge fusioniert. Aufgrund dieser „Poly-A-Schwänze“ wird es ermöglicht, diese RNA aus Geweben und aus RNA-Gemischen zu isolieren.

Zur Isolierung von poly-A⁺-RNA aus *C. elegans* wurde das µMACS mRNA Isolation Kit (Bergisch Gladbach) verwendet.

Die Methode beruht auf magnetischen „beads“, die mit Oligo(dT)-Sequenzen gekoppelt sind. Diese Sequenzen hybridisieren mit dem Poly-A-Schwanz der mRNA. Die mRNA liegt so gekoppelt mit den „beads“ vor und wird durch diese an ein äußeres Magnetfeld gebunden. Die mRNA kann schließlich von den „beads“ eluiert werden.

Um RNA aus den Würmern zu isolieren, werden diese zunächst unter flüssigem Stickstoff zermörsert (ca. 400µl Wurm-Feuchtpellet pro Ansatz) und das Zellysat wird auf die „beads“ gegeben. Die Isolierung erfolgt nach dem Protokoll des Herstellers. Die Ausbeute lag im Durchschnitt bei 150ng/µl in einem Volumen von 75µl.

Lösungen: (laut Herstellerangaben)

Lysis/Binding-Puffer:	Hochsalzpuffer mit 1% SDS
Waschpuffer:	Niedrigsalzpuffer mit NaCl, Tris/HCl und EDTA
Elutionspuffer:	1mM EDTA

2.2.18 Isolierung von RNA über TRIzol[®]

Eine alternative Methode, um RNA zu isolieren, stellt die Aufreinigung über TRIzol[®] (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) dar, wobei nur wenige Würmer benötigt werden. TRIzol[®] ist ein Gemisch bestehend aus einer monophasischen Lösung aus Phenol und Guanidinium Isothiocyanat, es erhält die Stabilität von RNA und ist gleichzeitig wichtig für die Zerstörung von Zellen und Auflösen von Zellkomponenten. Nach Zugabe von Chloroform befindet sich die RNA in der wässrigen Phase, DNA und Proteine sind in der Interphase.

Das verwendete Protokoll setzt sich folgendermaßen zusammen:

- ca. 30 Würmer picken und in ein mit 100µl DEPC-dH₂O gefülltes Eppendorf Gefäß überführen
- 1 min bei 5000rpm zentrifugieren
- Überstand abnehmen und 1ml Trizol hinzufügen
- kurz vortexen und 10min bei RT stehen lassen
- 10min bei 13000rpm und 4°C zentrifugieren
- Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführen und 200µl Chloroform hinzufügen
- 15sek leicht schütteln und 3min bei RT stehen lassen
- 15min bei 13000rpm und 4°C zentrifugieren
- Oberphase in ein neues Eppi überführen und 500µl Isopropanol hinzufügen
- Invertieren und 10min bei RT stehen lassen
- 10min bei 13000rpm und 4°C zentrifugieren
- Überstand verwerfen
- 100µl 75% DEPC-EtOH hinzufügen

- 1µg DNA
- 2µl 10 x DIG-RNA-Labeling Mix
- 2µl 10 x Transkriptionspuffer
- 2µl T7-RNA-Polymerase
- mit dH₂O auf 20µl auffüllen und gut mischen
- Inkubation für 2h bei 37°C
- Verdau des Vektors durch DNase I (2U), 15min bei 37°C
- Abstoppen der Reaktion durch Zugabe von 2ml 0.2M EDTA, pH8
- Fällung der Transkripte (siehe 2.2.11.3)
- Resuspendieren in 20µl dH₂O

Lösungen (laut Herstellerangaben):

10x DIG-RNA-Labeling Mix:	10mM ATP, GTP und CTP; 6.5 mM UTP; 3.5mM DIG-UTP; pH 7.5
10x Transkriptionspuffer:	400mM Tris/Cl pH8.0; 100mM NaCl; 1U RNase-Inhibitor; 60mM MgCl ₂ ; 100mM Dithiothreitol; 20mM Spermidin
T7-RNA-Polymerase:	20U/µl
DNase I (RNase-frei):	10U/µl

2.2.21 Northern-Blotting

2.2.21.1 RNA-Transfer

Bei diesem Verfahren wird RNA von einem denaturierenden Gel auf eine spezielle Membran (Nylon- oder PVDF-Membran) transferiert. Hierbei liegen Gel und Membran zwischen mit Salzlösung befeuchteten und trockenen Tüchern, durch die auftretenden Kapillarkräfte wird die Salzlösung in die trockenen Filter gesogen. Sie durchquert zunächst das Gel, wodurch die RNA-Fragmente gelöst und auf die Membran übertragen werden. Die Anordnung der RNA-Fragmente auf der Membran entspricht der Anordnung auf dem Gel. Schließlich erfolgt die Fixierung der RNA auf der Membran durch „crosslinking“, d. h. die Fixierung durch Bestrahlung mit UV-Licht.

Für den Northern Blot wird die Apparatur folgendermaßen aufgebaut:

Auf eine Glasplatte werden 2 Lagen Filterpapier (Schleicher und Schuell; Daßel) so aufgelegt, daß sie in ein mit 20x SSC gefülltes Flüssigkeitsreservoir hineinreichen. Hierauf wird luftblasenfrei das Gel gelegt und zusätzlich mit Parafilm umrandet, damit ein Flüssigkeitsstrom durch das Gel gewährleistet ist. Auf das Gel wird dann möglichst deckungsgleich eine Nylonmembran (Hybond N+; Amersham Life Science) aufgelegt und hierauf erneut 2 Lagen feuchtes Filterpapier und ein Stapel trockener Papiertücher. Anschließend wird die Apparatur mit einem Gewicht von ca. 500g beschwert. Der Transfer ist nach 18-20h beendet und die RNA wird durch UV-Strahlung mit einer Intensität von 120mJ auf der Membran fixiert.

Lösungen:

20x SSC 3M NaCl, 300mM Natriumcitrat, pH7.0

2.2.21.2 Vorhybridisierung, Hybridisierung und Waschungen

Durch die Vorhybridisierung werden eventuell noch vorhandene Bindestellen für Nukleinsäuren auf der Membran abgesättigt.

Der Blot wird hierzu mit 25 ml Hybridisierlösung in einer verschweißten Plastiktüte bei 68 °C vorbehandelt. Die entsprechende Sonde (siehe 2.2.20) wird bei 100°C denaturiert und anschließend auf Eis abgekühlt. Für die Hybridisierungsreaktion wird 1ml Hybridisierlösung pro 20cm² erwärmt und mit der denaturierten Sonde versetzt. Die Sonde soll eine Endkonzentration von 100ng/ml haben. Nach Entfernen der Vorhybridisierlösung wird die Hybridisierlösung plus Sonde zur Membran gegeben und über Nacht bei 68°C inkubiert.

Im Anschluß wird die Membran 2x5min in je 50ml 2x SSC/0.1% (w/v) bei RT und 2x15 min in je 50ml 0.1x SSC/0.1% (w/v) SDS bei 68°C gewaschen.

Lösungen:

(Vor)Hybridisierungslösung: 5x SSC; 40% deionisiertes Formamid, 0.1% (w/v)
Natrium-Laurylsarcosin, 0.02% (w/v) SDS, 2%
Blocking Reagenz (Boehringer Roche
Diagnostics, Mannheim)

2.2.21.3 Detektion

Die Detektion der mit der RNA hybridisierten digoxigenin-markierten Sonde erfolgt bei RT nach einem abgeänderten Protokoll der Firma Boehringer Roche Diagnostics:

- Äquilibrieren der Membran in 10ml Waschpuffer
- Blocken der Membran in 50ml Blockierlösung für 60min
- Verdünnen des Anti-Digoxigenin-Antikörpers (HRP-gekoppelt) 1:10000 in 30ml Blockierlösung
- Entfernen der Blockierlösung und Hinzugabe der Antikörperlösung
- Inkubation der Antikörperlösung für 60min
- Entfernen der Antikörperlösung und 2x waschen in Waschpuffer
- Chemilumineszenz-Substrate (BM Chemilumineszenz Blotting Substrate [POD]; Boehringer Roche Diagnostics, Mannheim) mischen und auf RT erwärmen lassen
- 2x5 min in TBST waschen
- Inkubation der Membran mit dem Chemilumineszenz-Gemisch für 1min
- Verpacken der Membran in Frischhaltefolie, exponieren der Membran auf einem Röntgenfilm (von einigen Sekunden bis mehrere Minuten)

Lösungen:

Waschpuffer: 100mM Maleinsäure, 150mM NaCl; pH7.5; 0.3% (v/v) Tween 20
Blockierlösung: 100mM Maleinsäure, 150mM NaCl; pH7.5;
1% Blockingreagenz (Boehringer Roche Diagnostics)
TBST: 1x TBS plus 0.2% Tween 20
10 x TBS: 200mM Tris/Cl pH8, 1.5M NaCl

2.2.22 **Isolierung von *C.elegans*-Proteinen**

Die gewünschte Menge an Würmern (Vol.~500 µl Feuchtpellet) wird in 5ml eiskaltem 1x PBS (plus den Protease-Inhibitoren Aprotinin, Pefabloc, Pepstatin und Leupeptin; Verdünnungen der Stamm-Lösungen: 1:500) aufgenommen.

Um die Kutikula der Würmer aufzubrechen wird die Wurm suspension auf Eis für 3x45sek mit einer Ausgangsleistung von 50Watt durch Ultraschall sonifiziert. Zwischendurch 30sek auf Eis abkühlen lassen.

Das Sonifikat wird anschließend für 10min bei 100°C erhitzt und nicht gelöste Wurmreste durch Zentrifugation (13000rpm; 3min) vom proteinhaltigen Überstand getrennt. Der Überstand wird abgenommen und die Konzentration der Proteinlösung bestimmt (s. 2.2.23).

Lösungen:

10x PBS:	37M NaCl, 27mM KCl, 100mM Na ₂ HPO ₄ , 17mM KH ₂ PO ₄ ; pH7.4
Aprotinin-Stammlsg.:	10mg/ml
Pefabloc-Stammlsg.:	1mg/ml
Pepstatin-Stammlsg.:	1mg/ml
Leupeptin-Stammlsg.:	0.5mg/ml

2.2.23 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

2.2.23.1 Bestimmung nach Bradford

Bei der Proteinbestimmung wurde der Farbstoff Coomassie Brilliant Blue-G250 (Roti-Quant, Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe) verwendet. Dieser Farbstoff kommt in drei Zuständen vor, die jeweils bei unterschiedlichen Wellenlängen absorbieren (kationisch: 470nm [rot]; neutral: 650nm [grün] und anionisch: 595nm [blau]). Durch Bindung an ein Protein wird der Farbstoff vom kationischen in den anionischen Zustand überführt und kann bei einer Wellenlänge von 595 nm detektiert werden.

Diese Absorptionsänderung ist nahezu proportional zur Proteinkonzentration. Verglichen wird die Absorption der Probe mit einer BSA-Eichgerade.

Zur Messung einer Proteinkonzentration wird 1µl der Probe in 799µl dH₂O verdünnt. Der Verdünnung werden 200µl 5x Färbelösung zugesetzt, mehrfach invertiert und die Absorption nach 5min gegen einen Nullwert (800µl dH₂O und 200µl 5x Färbelösung) gemessen. Von dem erhaltenen Wert kann anhand einer BSA-Eichgerade (2, 5, 10, 15 und 20µg BSA) die Konzentration ablesen werden.

2.2.23.2 Bestimmung durch Gelelektrophorese

Diese Methode erlaubt die Konzentrationsabschätzung einer einzelnen Proteinbande in einem Proteingel (s. 2.2.24). Zu diesem Zweck wird ebenfalls eine BSA-Reihe mit definierten Konzentrationen aufgetragen. Das Gel wird anschließend gefärbt (s. 2.2.25) und die Farbeintensität der Proteinbande mit den unterschiedlichen BSA-Konzentrationen verglichen.

2.2.24 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 bzw. 12.5% Polyacrylamid/Bisacrylamid (30%; 29:1, BioRad) besaßen.

Folgende Tabelle zeigt die Komponenten von Trenn- und Sammelgel:

Komponenten	Trenngele		Sammelgel
	10%	12.5%	5%
Acrylamid/Bis-	2.5ml	3.1ml	310µl
1M Tris/Cl pH*	2.8ml	2.8ml	235µl
10% SDS	76µl	76µl	20µl
dH ₂ O	2.1ml	1.5ml	1.3ml
10% APS	30µl	30 µl	10µl
TEMED	8µl	8µl	5µl

Tab. V: Gezeigt ist die Zusammensetzung der Komponenten in Trenn- und Sammelgel.

pH*: Trenngele: pH8.8; Sammelgel: pH6.8).

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 zusammgebaut. Das gewünschte Trenngel wird zwischen die Glasplatten bis ca. 1.5cm unterhalb der unteren Randes des Kamms gegossen. Die Lösung wird, um ein Austrocknen zu verhindern, mit ca. 0.5ml 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 5min bei 100°C im Wasserbad erhitzen. Anschließend direkt auf Eis abkühlen lassen. Das Proteingemisch wird in die Probetaschen gefüllt (Konz.: ~ 40µg Proteingemisch/Probetasche). Ebenfalls aufgetragen wird ein Protein-Größenstandard (Benchmark Prestained, Gibco; Standard Protein ladder, BioRad). Der Gellauf erfolgt für ca. 45min bei 200V.

Lösungen:

10x SDS-Elektrophoresepuffer: 1.92M Glycin; 0.25M Tris und 1% (w/v) SDS
 2x SDS-Probenpuffer: 100mM Tris/Cl pH6.8; 200mM Dithiothreitol;
 4% (w/v) SDS; 0.2% Bromphenolblau und 20%
 Glycerin

2.2.25 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 60ml Wasser werden 20ml Methanol und 20ml Coomassie unter Rühren hinzugegeben. Das Gel wird anschließend für ca. 1 Stunde in der Färbelösung (ca. 40ml) inkubiert. Um die gefärbten Proteinbanden gegen den, ebenfalls gefärbten Hintergrund hervorzuheben, wird das Gel anschließend für ca. 2 Stunden in 20% Methanol (ca. 40ml) bei RT entfärbt. Anschließend wird das Gel in Haushaltsfolie mit etwas Wasser eingeschweißt. Die Größen der Proteinbanden lassen sich anhand des mitgelaufenen Standards abmessen.

2.2.26 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/III-Apparatur (BioRad; München) durchgeführt. Eine Lage Nitrozellulosemembran und 4 Lagen Filterpapier werden auf die Größe des Trenngels zurechtgeschnitten. Die Nitrozellulosemembran wird erst in dH₂O und anschließend in 1x Western-Transferpuffer für je 2min äquilibriert. Nach Beendigung des Gellaufs wird das Sammelgel entfernt und das Trenngel nach folgendem Schema in die Blotting-Apparatur eingelegt:

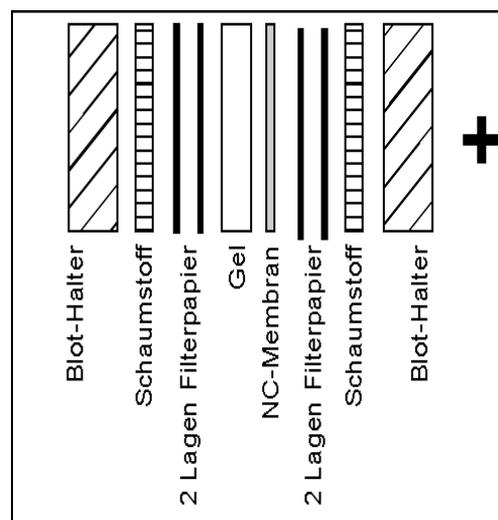


Abb I: Schematische Darstellung des Aufbaus eines Western Blots.

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 100V 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 50ml Blockierlösung 1h bei RT, um unspezifische Binstellen für den Antikörper abzusättigen
- Mischen des gewünschten Antikörpers in der entsprechenden Verdünnung mit 3ml Blockierlösung 1
- Entfernen der 50ml Blockierlösung 1 und Einschweißen von Membran und Antikörperlösung in Haushaltsfolie
- Inkubation des ersten Antikörpers für 2 bis 3h bei RT oder über Nacht bei 4°C
- 3x5min in TBST bei RT waschen
- Zweit-Antikörper (HRP-gekoppelt) 1:10000 in 50ml Blockierlösung 2 verdünnen
- Membran für eine Stunde bei RT mit Zweit-Antikörperlösung inkubieren
- 3x5min in TBST bei RT waschen
- Während des ersten Waschganges Chemilumineszenzsubstrate (3ml) mischen und auf RT erwärmen lassen
- Inkubation der Membran mit dem Chemilumineszenzsubstrat (BM Chemilumineszenz Blotting Substrate (POD), Boehringer Roche Diagnostics, Mannheim) für 1min.
- Membran in Frischhaltefolie verpacken und auf Röntgenfilm exponieren.

Lösungen:

10x Western-Transferpuffer: 1.92M Glycin, 1.5M NaCl; für 1x Puffer mit 20%-Methanol verdünnen

TBST: 20mM Tris/Cl pH8.0
150mM NaCl
0.2% Tween 20

Blockierlösung 1: 3% fettfreies Milchpulver; 1% BSA;
0.02% Natriumazid; gelöst in TBST

Blockierlösung 2: siehe Blockierlösung 1; ohne Natriumazid

2.2.27 Gewinnung polyklonaler Antiseren

Um die zelluläre Lokalisation eines Proteins zu bestimmen, werden polyklonale Antiseren hergestellt, die ein bestimmtes Epitop des entsprechenden Antigens erkennen. Zur Gewinnung von Antiseren muß zunächst ein als Antigen verwendbares Fusionsprotein hergestellt werden, das einen bestimmten Abschnitt des jeweiligen Proteins beinhaltet (s. Konstrukte, 2.2.5). In dieser Arbeit wurde gegen ERM-1 ein polyklonaler Antikörper hergestellt.

2.2.27.1 Induktion in *E.coli* M15[pREP4]

Zur Gewinnung von His-Fusionsproteinen wird der rekombinante pQE30/32-Vektor (s. 2.2.16.1) in *E.coli*-Zellen des Typs M15[pREP4] (siehe 2.2.2) transformiert (s. 2.2.14.1).

- Einzelkolonien beider Ansätze werden in je 10ml LB_{amp, kan}-Medium gegeben und über Nacht bei 37°C und 150rpm inkubiert
- Je 8ml der ÜN-Kultur werden in 400ml frisches, vorgewärmtes LB_{amp, kan}-Medium überführt und bei 37°C und 150rpm inkubiert, bis eine OD₆₀₀ von 0.6 erreicht ist (ca. 3h)
- Die Induktion erfolgt durch Zugabe von IPTG (Endkonzentration: 1mM).
- Die Bakteriensuspensionen werden für weitere 4h bei 37°C und 150rpm inkubiert
- Anschließend werden die Bakterien für 10min bei 5000rpm und 4°C pelletiert; der Überstand wird verworfen.

Die Pellets werden bei -70°C gelagert. Um die Effizienz der Induktion zu überprüfen, werden folgende Proben (je 1ml) im Verlauf der Induktion genommen:

- Probe 0: Entnahme vor IPTG-Zugabe
- Probe 1: Entnahme 4h nach IPTG-Zugabe

Die Bakterien werden für 5min bei 5000rpm und 4°C sedimentiert und der Überstand verworfen. Die Pellets werden in 200µl 1x SDS-Probenpuffer resuspendiert, für 10min bei 100°C erhitzt und anschließend auf ein 12.5% SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen (siehe 2.2.24). Nach Beendigung der Elektrophorese wird das Gel einer Coomassie-Färbung unterzogen (siehe 2.2.25).

In diesem Ansatz sollte eine induzierte Proteinbande (Proben 1) zu erkennen sein, die in der Probe 0 nicht vorhanden ist. Die Größe der induzierten Bande (His-Fusionsprotein) soll dem errechneten Wert entsprechen.

2.2.27.2 Bestimmung der Löslichkeit eines Proteins

Hierfür wird das zu testende Fusionsprotein in 50ml LB_{amp, kan}-Medium induziert. Das gewonnene Bakterienpellet wird in 4ml eiskaltem 1x PBS (+Protease-Inhibitoren: Pepstatin, Pefabloc, Aprotinin und Leupeptin; Verdünnungen der Stamm-Lösungen: 1:500) auf Eis resuspendiert. Die Bakteriensuspension wird für 3x40sek auf Eis mit einer Ausgangsleistung von 50Watt sonifiziert. Zwischendurch jeweils 40sek auf Eis abkühlen lassen. Dann wird die Suspension einer Tritonextraktion (Triton-X-100) unterzogen (d. h. auf 10 % Triton einstellen) und 30min bei RT geschüttelt. Schließlich wird sie 15min bei 8000rpm zentrifugiert, wobei auf einem SDS-Gel (2.2.24 und 2.2.25) getestet wird, ob sich das Protein im Pellet oder im Überstand befindet. Das ERM-1-Fusionsprotein erwies sich als unlöslich, so daß es unter denaturierenden Bedingungen isoliert werden musste (s. Abschnitt 2.2.27.3).

2.2.27.3 Isolierung von unlöslichen His-Fusionsproteinen

Das in Abschnitt 2.2.27.1 gewonnene Bakterienpellet mit induziertem His-Fusionsprotein wird in 5ml Puffer A resuspendiert. Die Bakteriensuspension wird für 3x40sek auf Eis mit einer Ausgangsleistung von 50Watt sonifiziert. Zwischendurch jeweils 40sek auf Eis abkühlen lassen. Dann für 20min bei 12K zentrifugieren. Das His-Fusionsprotein sollte sich nun im Überstand befinden. Zum Überstand werden 2ml einer Ni-NTA-Matrix (Quiagen) hinzugefügt und das ganze 1-4h bei RT geschüttelt. Die Suspension wird schließlich über eine Leersäule (vorher mit Puffer A äquilibrieren) gegeben, 2x mit je 4 ml Puffer B gewaschen und mit 4ml Puffer C eluiert. Nun kann die Konzentration via Bradford-Reaktion bestimmt werden. 2mg

des Eluats werden langsam in 20ml Refolding Puffer getropft und 1h bei 4°C auf einem Magnetrührer gemischt. Es folgt die Dialyse gegen Enhanced Coupling Buffer (ECB) und die Aufkonzentrierung über YM-100 Röhrchen (Millipore).

Die erfolgreiche Aufreinigung des His-Fusionsproteins wird durch Western-Blotting mit einem Anti-Penta-His Antikörper (Qiagen) überprüft.

Lösungen:

Resuspensionspuffer A: 100mM NaH₂PO₄; 10mM Tris-Cl; 6M GuHCl, pH8

Waschpuffer B: 100mM NaH₂PO₄; 10mM Tris-Cl; 6M GuHCl, pH6.3

Elutionspuffer C: 100mM NaH₂PO₄; 10mM Tris-Cl; 6M GuHCl, pH4.5

Refolding Puffer: 50mM Hepes, pH7.5; 200mM NaCl, mMDTT,
1M NDSB201

ECB: 0,01M Natriumcitrat, 0,05M Natriumcarbonat; pH10

2.2.27.4 Immunsierung

Für die Immunsierung einer Ratte und eines Kaninchens wurde die Firma EUROGENTEC Bel S.A. (Herstal, Belgien) beauftragt.

Laut EUROGENTEC wurde im Falle von ERM-1 nach folgendem Zeitplan immunisiert:

Injektion des Antigens		Blutentnahme	
1. Immunisierung	05.11.01	Präimmenserum	05.11.01
1. Boost	19.11.01	1. Blutentnahme	13.12.01
2. Boost	03.12.01	2. Blutentnahme	13.12.01
3. Boost	31.12.01	Entblutung	10.01.02

Tab. VI: Zeitplan der Immunsierung einer Ratte und eines Kaninchens mit dem hergestellten His-Fusionsprotein von ERM-1 (Angaben laut EUROGENTEC).

Die erhaltenen Antiseren wurden sowohl durch Western-Blotting, als auch über Antikörperfärbungen im Vergleich mit den Präimmunseren getestet und verglichen (s. 3.1.2).

2.2.28 Affinitätsreinigung eines Antikörpers

Die Aufreinigung des ERM-1 Antikörpers erfolgte über das AminoLink[®] Plus Immobilization Kit (Pierce, Rockford, Illinois, USA) gemäß Protokoll. Hierbei wird das entsprechende Antigen kovalent an eine Matrix gebunden (erfolgt über eine Säule) und mit dem aufzureinigenden Antiserum inkubiert. Die spezifischen Antikörper binden an das Antigen, unspezifische werden herausgewaschen. Die Elution des Antikörpers von der Matrix erfolgt schließlich über einen Hochsalzpuffer (Puffer C) und einen Niedersalzpuffer (100mM Glycin, pH2.5). Durch Western Blot Analyse wird die Fraktion identifiziert, in der sich der Antikörper befindet. Diese wird gegen PBS dialysiert und mit Centricon-Röhrchen (YM-100, Millipore) aufkonzentriert. Im Falle von ERM-1 befand sich der Antikörper in der Hochsalzfraktion.

Lösungen (laut Herstellerangaben):

Puffer A: 50 mM Na-Hepes, pH 7.5; 150 mM NaCl; 1mM EDTA

Puffer B: Puffer A; 1 M GuHCl

Puffer C: 50 mM Na-Hepes, pH 7.5; 4.5 M MgCl₂

2.2.29 *In vitro*-Translation

Die für *in vitro* Interaktionstests wie den Pulldown (s. 2.2.32) benötigten Peptide können über eine *in vitro* Transkription/Translation gebildet werden. Der Vektor mit dem zu translatierenden Fremdanteil benötigt bei diesem Ansatz einen T7-Promotor.

Ansatz:

- 25µl Retikulozyten Lysat (= 1 Aliquot)
- 2µl TNT-Puffer
- Xµl Vektor (1µg)
- 1µl Aminosäuren-Mix
- 1µl transcend tRNA (baut markiertes K ein)
- 1µl RNase Inhibitor
- 1µl T7-Polymerase

Den Ansatz auf 50µl mit DEPC-H₂O auffüllen und für 2h bei 30°C inkubieren. Ein 4µl Aliquot wird für die Reaktionskontrolle abgenommen, das restliche Volumen wird bis zur Weiterverwendung bei -70°C gehalten.

2.2.30 Phagenaufarbeitung

Einige im Rahmen dieser Arbeit bei Y. Kohara bestellten cDNA's lagen integriert in dem Vektor pBluescript verpackt in -ZAP[®]II-Phagen vor. Um einen Vektor aus Phagen auszuschneiden wird wie folgt vorgegangen:

2.2.30.1 Titerbestimmung

Zunächst wird der Titer der Phagen bestimmt. Hierzu wird die Ausgangskonzentration der Phagen 1:100, 1:1000 und 1:10000 in SM-Puffer verdünnt und jeweils 10µl in 500µl frischen XL1-Blue-Zellen (OD₆₀₀ = 1 in 10mM MgSO₄) pipettiert. Es folgt 20min Inkubation bei 37°C. Die 510µl werden anschließend zu 3ml Topagar (45°C) gegeben und auf eine vorgewärmte NZY-Platte gegossen. Es folgt eine Inkubation bei 37°C ü. N. Aus den entstandenen Phagenplaques wird pro Platte mit einer sterilen Glaspipette ein Plaque ausgestochen und in ein Eppendorf-Gefäß gegeben. Es folgt eine Zugabe von 500µl SM-Puffer und 25µl Chloroform. Gut vortexen und bei 4°C lagern oder bei RT 2h taumeln lassen. Anschließend wird das Eppendorf-Gefäß bei 13000rpm 5min zentrifugiert und der Überstand (= Phagenstock) in ein frisches Gefäß überführt.

Der Phagenüberstand wird 1:100 und 1:1000 verdünnt und wie oben aufgeführt weiterbehandelt. Die erhaltenen Plaques werden ausgezählt, so läßt sich schließlich die Anzahl der Phagen in dem Phagenstock berechnen. Der Titer lag bei durchschnittlich 500 Phagen pro µl.

2.2.30.2 *in vivo*-Excision

Es werden 250µl Phagenstock mit einer Konzentration von 1x10⁵ Phagen (bei Bedarf Phagenstock mit SM-Puffer verdünnen) zu 200µl XL1Blue-Zellen und 1µl ExAssist[™] Helferphage (Konz.>10x10⁶, Stratagene) gegeben und 15min bei 37°C inkubiert. Es erfolgt eine Zugabe von 3ml LB-Medium und eine Inkubation für 2.5-3h bei 37°C im Schüttler. Anschließend folgt eine Inkubation für 20 min bei 65-70 °C und eine Zentrifugation für 15min bei 4000rpm, der Überstand (infektiöser Überstand) wird in ein sauberes Gefäß überführt. Während diesen Schritten erfolgt

durch den Helferphagen eine Excision des Bluescript aus dem Phagengenom und dessen Zirkularisierung. Er wird wieder in Phagen gepackt, die letztendlich in dem infektiösen Überstand enthalten sind. Der Überstand kann bei 4°C 1-2 Monate gelagert werden.

2.2.30.3 Infektion

Jeweils 10µl und 100µl infektiöser Überstand werden mit 200µl SOLR-Zellen ($OD_{600}=1$, in 10mM $MgSO_4$) gemischt und 15min bei 37°C inkubiert, schließlich werden sie auf LB-amp Platten ausplattiert und ü. N. bei 37°C inkubiert. Mit den erhaltenen Kolonien wird eine Midi-Präparation (siehe 2.2.15) durchgeführt.

2.2.30.4 Vorbereitung der Bakterienzellen für die Phagenaufarbeitung

- Je eine Kolonie XL1Blue- oder SOLR-Zellen in LB-Medium ü. N. hochwachsen lassen
- 10min bei 4000rpm zentrifugieren
- Pellet in 10mM $MgSO_4$ resuspendieren, so daß $OD_{600}=1$ ist

Lösungen:

NZY-Medium:	5g NaCl, 2g $MgSO_4 \times 7 H_2O$, 5g Bacto Yeast Extract,
(pro Liter)	10g NZ Amine (casein hydrolysate), 1.2% Agar
Topagar:	NZY-Medium + 0.7% Agarose
SM-Puffer:	100mM NaCl, 8mM $MgSO_4$, 50mM Tris, pH7.5, 0.01% Gelatine

2.2.31 Hefe-Zwei-Hybrid

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Hefe-Zwei-Hybrid-Screen mit verschiedenen Konstrukten von ERM-1 im pGBKT7 (s. Konstrukte 2.2.5) als Köder durchgeführt. Als Beute diente eine Phagenbank (Zheng Zhou, Barstead), welche in dem Phagen lambda ACT2 vorlag. Um mit der Phagenbank-DNA zu arbeiten, muß diese zunächst präpariert werden.

2.2.31.1 Präparation der Zwei-Hybrid-Phagenbank

Titerbestimmung

a) Phagen

- Einzelkolonie RB3E (kanR) in 50ml LBkan-Medium ÜN 37°C inkubieren
 - Phagenbank: Verdünnungsreihe aufstellen (1:1000 – 1:10 Mio.) in SM-Puffer
 - Bakterien 10min. bei 4000rpm pelletieren; Pellet in 10mM $MgSO_4$ auf $OD_{600}=1$
 - Phagenverdünnung mit 500µl RB3E mischen; 30min. bei 37°C inkubieren
 - Topagar (je 3 ml/Röhrchen) auf 45 °C erwärmen, Bakterien-Phagen Gemisch hinzufügen, mischen und auf NZY-Platte ausschwenken; Inkubation ÜN 37°C
- Titer auszählen

b) Bakterien RB4E

- RB4E Kultur bis $OD_{600}=1$ wachsen lassen
- Verdünnungsreihe erstellen: Beginn 1µl bis 0.0001µl
- Einzelne Verdünnung auf LB-Platte ausplattieren

- ÜN bei 37°C inkubieren
- Titer auszählen

Präparation der cDNA Bank

- 10^8 Phagen mit 3×10^8 RB4E (OD₆₀₀ = 1; in MgSO₄) mischen und für 30 min bei 30°C inkubieren
- 5ml LB-Medium hinzufügen und bei 37°C für 1h schütteln
- Transfektionstiter bestimmen: Verdünnungsreihe des Ansatzes aufstellen und auf LBamp-Platten ausplattieren (Beginn: 1:100 bis 1:100.000). ÜN bei 37°C inkubieren
- Titer auszählen
- 10^8 infizierte Zellen pro großer LBamp-Platte ausplattieren; ÜN bei 37°C inkubieren
- (Konfluente) Platten mit je 5ml LB amp abspülen., Ansätze im Erlenmeyer-Kolben vereinigen und mit LB amp auf 100ml auffüllen.
- 3-4h bei 37°C inkubieren
- Maxipräparation (s. 2.2.15.3)

2.2.31.2 Proteinextraktion aus Hefezellen für Western-Blot Analyse

Die Expression der Fusionsproteine der ERM-1pGBKT7-Konstrukte in der Hefe wurde mittels eines Western Blots überprüft. Hierzu wurde zunächst eine Proteinextraktion nach folgendem Protokoll durchgeführt.

- Einzelkolonie des gewünschten Hefeklons in 10ml Medium (Selektivmedium) auf eine OD₆₀₀ von 1 hochwachsen lassen
- 5min bei 5000rpm zentrifugieren und Pellet in 500µl 1x PBS (+Protease-Inhibitoren) resuspendieren. EISKALT halten!
- 200µl Glas Beads hinzufügen und für 10min im Wasserbad kochen. Auf Eis abschrecken
- 8 x 30s vortexen (dazwischen mindestens 30s auf Eis halten)
- Hefeextrakt (Vol. 500µl) mit einer dünnen Kanüle (Durchmesser 0.4mm) von den Beads entfernen und in ein neues Eppi überführen
- Hefeextrakt für 10 min im Wasserbad kochen und auf Eis abschrecken
- 20µl mit der gleichen Menge an 2x SDS-Loading buffer versetzen und 30µl auf Proteingel auftragen

2.2.31.3 Präadsorbition der Antikörper α-GAL4 BD und α-c-Myc

Die pGBKT7-Fusionsproteine können mit Antikörpern gegen die GAL4-Bindedomäne und gegen den Myc-Tag auf einem Western Blot nachgewiesen werden. Um die Spezifität zu erhöhen, werden beide Antikörper vorher präadsorbiert:

- 100µl Hefeextrakt (nur AH109) mit 100µl Blocking-Reagenz (3% Milchpulver und 1%BSA gelöst in TBST) versetzen
- Gewünschte Menge des Antikörpers (bezogen auf die Gesamtmenge des AK`s bei dem Western Blot) zu den 200µl hinzugeben und ÜN bei 4°C inkubieren
- 3min bei 13000rpm zentrifugieren und Überstand zur 1.AK-Lösung des Western Blots hinzufügen
- Weiterbehandlung gemäß dem konventionellen Western-Blot (s. 2.2.26)

2.2.31.4 Transformation von DNA in *Saccharomyces cerevisiae* für einen Hefe-Zwei-Hybrid-Screen

- Zunächst erfolgt eine Transformation des Köderkonstrukts (ERM-1pGBKT7) in die AH109 Zellen (auf SD^{TRP-}-Platten, s.2.2.31.6)
- Inkubation von 4 Übernachtskulturen je einer Kolonie von AH109 mit Köderkonstrukt in 25 ml SD^{TRP-}-Medium bei 30°C auf dem Schüttler (OD₆₀₀=0.6-0.9).
- 5 min bei RT und 5000rpm zentrifugieren
- Überstand verwerfen und Pellet in 10 ml dH₂O resuspendieren
- 5 min bei RT und 5000rpm zentrifugieren
- Überstand verwerfen und in insgesamt 10ml 1x LiAc resuspendieren
- 5 min bei RT und 5000rpm zentrifugieren
- Überstand verwerfen und Pellets in insgesamt 1.5ml 1x LiAc resuspendieren
- Zellen für 15min bei 30°C resuspendieren
- Vorbereiten von PEG/LiAc Lösung
- 10 Reaktionsgefäße mit je 3µg der cDNA-Bibliothek und 6µl denaturierter Heringssperma-DNA beladen
- je 150µl Hefezellen hinzufügen und gut mischen
- je 900µl PEG/LiAc-Lösung hinzufügen und vortexen
- für 30min bei 30°C im Schüttler inkubieren
- für 20min bei 42°C hitzeschocken
- Quickspin bis 7000rpm
- Überstand verwerfen und Pellet in 1.2ml YPDA resuspendieren
- 1h bei 30°C inkubieren
- Quickspin bis 7000rpm
- um die Transformationseffizienz festzustellen, werden auf einer SD^{TRP-, Leu-}-Platte Hefezellen 1:100 verdünnt, ausplattiert
- je 400µl werden auf einer großen Petrischale (SD^{TRP-, LEU-, HIS-, ADE-, +3AT}) ausplattiert
- Inkubation der Platten bei 30°C für 5-7 Tage
- Die erhaltenen Hefekolonien werden auf kleine Petrischalen (SD^{TRP-, LEU-}) gepickt und einem X-Gal-Test unterzogen. Von den positiven Klonen wird anschließend die DNA isoliert (s. 2.2.31.7).

2.2.31.5 Transformation von DNA in *Saccharomyces cerevisiae* für direkte Interaktionen oder Rescreens

Die aus dem Screen isolierten Klone (die Beutekonstrukte) werden in einem Test mit dem Köderkonstrukt nochmals auf ihre Fähigkeit zur Interaktion geprüft (Rescreen). Dafür werden die Beutekonstrukte zusammen mit dem Köder in die Hefe transformiert und schließlich erneut einem X-Gal-Test unterzogen. Das nachfolgende Protokoll kann aber auch dafür benutzt werden, um verschiedene Konstrukte, z. B. für einen direkten Interaktionstest, in die Hefe zu transformieren.

- ü.N.-Kultur eines beliebigen Hefestammes auf OD₆₀₀ 0.2 verdünnen und dann bis zur exponentiellen Phase wachsen lassen (OD₆₀₀ zwischen 0.6-0.8)
- 50ml dieser Kultur für 5min bei 5000rpm zentrifugieren
- Pellet mit 20ml H₂O waschen und erneut bei 5000rpm für 5min zentrifugieren
- Pellet mit 20ml 0.1M LiAc waschen und zentrifugieren
- Pellet in 0.1M LiAc bis zu einem Endvolumen von 300µl resuspendieren
- 15min bei 30°C inkubieren

- In der Zwischenzeit DNA vorbereiten: 2µl Heringssperm DNA, 1µg zu transformierende Plasmid DNA und 300µl PEG/LiAc/TE Lösung mischen
- 50µl der Hefelösung mit der DNA Lösung mischen und 30min bei 30°C inkubieren
- Mischen und dann bei 42°C 20min hitzeschocken
- 30s bei 7000rpm zentrifugieren
- Pellet in 1ml YPDA resuspendieren und 1Std. bei 30°C inkubieren
- 30sec bei 7000rpm zentrifugieren und Pellet in 50µl H₂O resuspendieren
- Auf selektiver SD-Agarplatte ausplattieren und 2-5 Tage wachsen lassen

Lösungen:

Heringssperma-DNA-Stammlösung: 10mg/ml in dH₂O

PEG/LiAc-Lösung: 8ml PEG 4000, 1ml 10x LiAc, 1ml dH₂O

2.2.31.6 X-Gal-Interaktionstest

Findet in der Hefe zwischen zwei Fusionsproteinen der GAL4-AD und GAL4-BD eine Interaktion statt, so kommen die AD und BD des GAL4 Transkriptionsfaktor in räumliche Nähe und gelangen so in den Zellkern. Hier aktivieren sie die Transkription der β-Galaktosidase, wodurch das β-Galaktosederivat X-Gal umgesetzt wird und ein blauer Niederschlag entsteht. Ein X-Gal-Test wird folgendermaßen durchgeführt:

2ml Z-Puffer + 5,4µl β-Mercaptoethanol + 33,4µl X-Gal mischen und in eine leere Petrischale geben. Anschließend ein zurechtgeschnittenes Stück Whatmanpapier in die Schale legen. NC-Filter auf eine Platte mit gut gewachsenen Hefekolonien legen, ansaugen lassen, dann mit Pipette abziehen und für 10s in flüssigen N₂ legen. Den Filter bei RT auftauen lassen, dann mit Kolonieseite nach oben auf das Whatmanpapier legen und bei 30°C halten. Eine Färbung sollte sich nach 30 in-30h einstellen.

Lösungen

X-Gal Stocklösung: 20mg/ml X-Gal in DMF

Z-Puffer: 60mM Na₂HPO₄; 40 M NaH₂PO₄; 10 M KCl; 1 M MgSO₄; pH 7

2.2.31.7 Isolation von Plasmid-DNA aus Hefe-Zellen

Um die DNA aus die im Hefe-Zwei-Hybrid-Screen (s. 2.2.31.4) isolierten Zellklonen zu gewinnen wird folgendermaßen vorgegangen:

- Einzelkolonie über Nacht in 3ml SD^{Leu-}-Medium (~16h bei 30°C) wachsen lassen (Probe muß saturierend sein)
- 1.5ml der Kultur für 5min bei 130000rpm zentrifugieren
- Überstand verwerfen
- Pellet in einem kleinen Volumen Restüberstand resuspendieren (vortexen)
- 200µl Hefe-Lysis-Lösung hinzugeben
- 200µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (Verhältnis 25:24:1) und 300mg Glassbeads hinzufügen
- 2min vortexen
- 5min bei 13000 rpm zentrifugieren
- Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführen

- DNA fällen (s. 2.2.11.3)
- in 30 µl dH₂O resuspendieren

Die isolierte Hefe-DNA wird 1:10 in dH₂O verdünnt, in Bakterienzellen transformiert, präpariert (2.2.14.3 und 2.2.15.3) und retransformiert (2.2.31.5). Nach einem positiven Rescreen wird die DNA zum Sequenzieren (MWG-BIOTECH AG, Ebersberg) geschickt.

Lösungen:

Hefe-Lysis-Lösung: 2% Triton X-100; 1% SDS; 100mM NaCl; 10mM Tris, pH8; 1mM EDTA

2.2.32 Pulldown-Assay

Ein weiterer Nachweis einer Protein-Protein Interaktion *in vitro* ist die sogenannte Pulldown-Methode, mit der ein His-Tag Protein an eine Ni-NTA Matrix gekoppelt wird. Ein Myc-Tag- Protein wird alternativ über eine *in vitro* Translation (s. 2.2.29) synthetisiert und ebenfalls über die Säule gegeben. Bei einer Interaktion können beide Proteine zusammen von der Säule eluiert werden und über Antikörper gegen den His-Tag bzw. Myc-Tag nachgewiesen werden. In dieser Arbeit wurde eine mögliche Interaktion von LAD-1 und DLG-1, bzw. LAD-1 und ERM-1 über einen Pulldown verifiziert.

Ein Pulldown-Ansatz sieht wie folgt aus:

- 5µg His-Tag Protein mit 20µl Ni-NTA Matrix , 0.25µl Proteaseinhibitoren und 80µl Puffer mischen
- 2h bei RT auf dem Schüttler inkubieren
- 4x mit je 500 µl Puffer waschen (d.h. gut schütteln und bei 1000 rpm ca. 1 min zentrifugieren)
- Zugabe von 20 µl *in vitro* translatiertes Protein, 0.25µl Proteaseinhibitoren und 1mg/ml BSA, auffüllen auf 100µl mit Puffer
- 4h bei 4°C inkubieren, ab und zu schnippen
- Schließlich 4x mit Puffer waschen, in SDS aufkochen und 5min auf Eis geben
- Anschließend kann der Pulldown mittels Western-Blot Analyse ausgewertet werden

Lösungen:

Pulldown-Puffer: 20mM Tris-Hcl (pH7.5), 100mM NaCl, 1mM EDTA, 0.5% Nonidet[®] P-40, 1mM DTT

2.3 Zellbiologische Methoden

2.3.1 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 RT gehalten. Als Nahrungsquelle dient der Uracil bedürftige *E.coli*-Stamm OP50.

kleine Agarplatten

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

angereicherte Agarplatten

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

Lösungen (per Liter):

Lösung A: 5g Cholesterin in EtOH

Lösung B: 110.8g CaCl₂

Lösung C: 246.5g MgSO₄ x 1H₂O

Lösung D: 108.3g KH₂PO₄; 36g K₂HPO₄

2.3.2 Herstellung Agarose-beschichteter Objektträger und Deckgläser

2.3.2.1 Für *in vivo*-Beobachtung

Um Embryonen *in vivo* beobachten zu können (siehe Abschnitt 2.3.5) werden sie auf Agarose-beschichtete Objektträger transferiert. Hierfür wird eine 2-3% Agaroselösung in dH₂O in der Mikrowelle aufgekocht und ein Tropfen dieser Lösung auf einen Objektträger gegeben. Durch Auflegen eines zweiten Objektträgers wird die Agarose gespreizt. Nach dem Erhärten der Agarose wird der zweite Objektträger durch vorsichtiges Hin- und Herschieben entfernt.

2.3.2.2 Für Mikroinjektion

Für die Mikroinjektion (siehe Abschnitt 2.3.11) werden Agarose-beschichtete Deckgläser benötigt. Hierfür wird ebenfalls eine 2-3% Agaroselösung in dH₂O aufgekocht. Diese wird auf einem Deckglas gespreizt und 2-3 Stunden bei 70°C bis zur Austrocknung der Agarose inkubiert.

2.3.3 Herstellung Polylysin-beschichteter Objektträger

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

Die Objektträger werden folgendermaßen angefertigt:

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

2.3.4 Präparation von Embryonen

Um Embryonen zu präparieren, werden adulte Hermaphroditen von einer Agarplatte in einen Tropfen dH₂O 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 ein Schlauch plus Mundstück gekoppelt ist, aufgesaugt und für weitergehende Untersuchungen auf einen Agarose- bzw. Polylysinbeschichteten Objektträger überführt.

2.3.5 *in vivo*-Beobachtung

Für *in vivo*-Beobachtungen werden präparierte Embryonen und Larven mit etwas dH₂O 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 (siehe Abschnitt 2.3.9).

2.3.6 Antikörperfärbung an Embryonen

Präparierte Embryonen werden mit einem Tropfen dH₂O 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:

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

Der primäre Antikörper wird in Blockierlösung nach Bedarf verdünnt und in einem Volumen von 30-40µl auf den Objektträger gegeben. Die Inkubation erfolgt in einer feuchten Kammer über Nacht bei 4°C oder für 2h bei RT. Im Anschluß wird der Objektträger für 2x5min bei RT in TBST gewaschen. Der Sekundärantikörper, gekoppelt mit einem Fluorochrom, wird 1:200 in Blockierlösung verdünnt und auf den Objektträger gegeben (ebenfalls 30-40µl). Die Inkubation erfolgt in einer feuchten Kammer für 2h bei RT. Anschließend wird der Objektträger wieder für 2x5 min bei RT in TBST gewaschen. Ist eine DNA-Färbung erwünscht, wird das Präparat in 30µl DNA-Färbelösung für 30-40min inkubiert und erneut 2x5min 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 bzw. Cy3 gekoppelte Antikörper aus dem Esel verwendet.

Die Auswertung der Präparate erfolgte am konfokalen Lasermikroskop (siehe Abschnitt 2.3.9).

Lösungen:

TBST: 20mM Tris/Cl pH8.0, 150mM NaCl, 0.2% Tween 20
 Blockierlösung: 1% BSA, 1% fettfreies Milchpulver, 0.02% Natriumazid; gelöst in TBST

DNA-Färbelösung: YOYO-1 (1mM, 1: 40000; Molecular Probes, USA) und RNase H (1mg/ml, 1:10000) in TBST

Mowiol: 5g Elvanol (Höchst) in 20ml 1xPBS pH7.4 lösen, 16h rühren, 10mg Glycerin hinzufügen, 16h rühren, 15min bei 12000rpm zentrifugieren und Überstand abnehmen. Jeweils eine Spatelspitze DABCO (1.4-Diazabicyclo[2,2,2]octan) als Ausbleichschutz unter je 1ml Mowiol mischen.

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

Bezeichnung	Ursprung	Erkennt	Eingesetzt	Referenz
anti-4A1	Maus	α -Tubulin	1:50	Piperno und Fuller (1985)
anti-HMP-1	Maus	α -Catenin (HMP-1)	1:2	Costa et al., 1998
MH33 (anti-IFB-2)	Maus	Intermediärfilament (IFB-2)	1:100	Francis und Waterston (1985)
anti-DLG-1 ("unpurified")	Kaninchen	DLG-1	1:400	Segbert et al., 04
anti-LAD-1NP (1162)	Kaninchen	LAD-1 nicht phosphoryliert	1:200	Chen et al., 2001
anti-LAD-1P (1163)	Kaninchen	LAD-1 phosphoryliert	1:50	Chen et al., 2001
anti-LAD-1 (6991)	Kaninchen	LAD-1 cytosolisch	1:200	Chen et al., 2001
anti-PY	Kaninchen	Phosphotyrosin	1:100	Biotrend, Inc.
anti-NMY-2	Kaninchen	NMY-2	1:100	Guo und Kempfues, 1996
anti-MLC-4 (Nr. 667)	Meerschwein	MLC-4	1:100	diese Arbeit
anti-ERM-1	Kaninchen	ERM-1	1:100	diese Arbeit
anti-PKC-3	Kaninchen	PKC-3	1:100	Signal Transduction Laboratories
MH27 (anti-AJM-1)	Maus	AJM-1	1:2000	Francis und Waterston (1985)

Tab VII: Verwendete primäre Antikörper

2.3.7 Aktinfärbung an Embryonen

Präparierte Embryonen werden in einem Tropfen dH₂O auf einen Polylysin-beschichteten Objektträger transferiert und für 2min in einer Fixierlösung mit 4%Paraformaldehyd und 0.1mg/ml Lysolecithin (Sigma) zum Andauen der Eihülle inkubiert. Anschließend erfolgt eine 20minütige Inkubation in der Fixierlösung mit 4% Paraformaldehyd, jedoch ohne Lysolecithin. Danach werden die Embryonen 2x10 min in PBT gewaschen und mindestens 1h 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 2x10min in PBST gewaschen und schließlich mit 10µl ProLong[®] Antifade Kit (Molecular Probes) eingedeckelt. Die Auswertung erfolgt am konfokalen Lasermikroskop Leica TCS NT (Leica, Heidelberg).

Lösungen:

Fixierlösung: 4% Paraformaldehyd in 60mM Pipes, 25mM Hepes, 10mM EGTA, 2mM MgCl₂, pH6.8 , zusätzlich 0.1mg/ml Lysolecithin (Sigma)

PBS (pro Liter): 8g NaCl, 0.2g KCl, 1.44g Na₂HPO₄, 0.24g KH₂PO₄, pH7.4

PBST: PBS plus 0.1% Tween 20

FITC-Phalloidin: 0.1mg/ml in PBS (Sigma Aldrich, Steinheim)

Alexa Fluor[®] 488 Phalloidin: 200U/ml in Methanol (Molecular Probes, Inc., Eugene, USA)

2.3.8 Doppelfärbung eines Antikörpers mit Phalloidin

- Adulte Würmer in einem Tropfen dH₂O zerschneiden, Embryonen mit einer ausgezogenen Pasteurpipette aufsaugen und auf einen mit Poly-L-Lysin beschichteten Objektträger transferieren
- Embryonen **gut** quetschen und in flüssigen Stickstoff tauchen
- Deckglas absprenge
- **Sofort** auf den noch gefrorenen Objektträger das Fixativ/Phalloidin-Gemisch (ca. 100µl) geben, mit einem Deckglas (13x13) bedecken und 30min bei -20°C inkubieren
- 2x10min mit PBST waschen
- 1h mit FITC-Phalloidin (1:100 in PBST) bzw. Alexa-Phalloidin (1:25 in PBST) bei RT nachfärben (ca. 50µl pro Präparat)
- 2x10min mit PBST waschen
- Antikörper entsprechend in PBST verdünnen und ca. 50µl auf den Objektträger geben
- Über Nacht bei 4°C inkubieren
- 2x10min in PBT waschen
- Sekundärantikörper in BSA/Milchpulver verdünnen, ca. 50µl auf jedes Präparat geben und 2h bei RT inkubieren
- 2x10min in PBST waschen
- mit 10µl 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 dH₂O

FITC-Phalloidin: 1mg/ml in PBS gelöst (Sigma-Aldrich, Steinheim)

Alexa Fluor[®] 488 Phalloidin: 200 U/ml in Methanol (Molecular Probes, Inc., Eugene, USA)

2.3.9 Auswertung von Embryonen

Für Beobachtungen mit DIC-Mikroskopie wurde ein Zeiss Axiophot 2 (Zeiss, Oberkochen), gekoppelt mit einer Sony 3 CCD Colour Video-Kamera für Videoaufnahmen (Gerät: JVC Timelapse Videorekorder) benutzt. Falls benötigt, wurden die Bilder direkt auf Video aufgezeichnet oder einzelne Bilder direkt über einen angeschlossenen Macintosh PowerPC in das Bildverarbeitungsprogramm Photoshop importiert.

Die Auswertung der Antikörperfärbungen erfolgte am konfokalen Lasermikroskop Leica TCS NT (Leica, Heidelberg). Von den Embryonen wurden Schnittprojektionen aufgenommen, wobei die Schnitte zwischen 0,5 und 1 µm groß waren.

2.3.10 Darmfunktionstest an Larven

Larven werden auf einer *E.coli*-beschichteten Agarplatte mit einer 0.5%igen Lucifer Yellow-Lösung für 1-2h inkubiert. Die Larven nehmen mit den Bakterien das Lucifer Yellow auf. Anschließend werden die Larven in einem Tropfen dH₂O auf einen mit Agarose beschichteten Objektträger gegeben und eingedeckelt und ausgewertet (s. Abs. 2.3.9).

Lösungen:

Lucifer Yellow (MW 550): 0.5%, in dH₂O gelöst (Sigma Aldrich, Steinheim)

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

2.3.11.1 Mikroinjektion

Um in *C.elegans* mit Hilfe der RNAi Technik (s. Einleitung) ein bestimmtes Gen auszuschalten, wird in die Gonade dsRNA injiziert. Für die Mikroinjektion diente das inverse Mikroskop Leica DM IRB, durch welches das Präparat auf dem Objektisch frei zugänglich für die Injektionsnadel ist. Für die Injektionen werden spezielle Nadeln benötigt (GB 120 F-10, Science Products, Hofheim), die in einem Mikropipettenpuller (Sutter P-97; Science products, Hofheim) fein ausgezogen werden. Die Nadeln sollten möglichst immer „frisch gezogen“ werden. Sie werden mit einer fein ausgezogenen Pasteurpipette von hinten mit der dsRNA gefüllt und in den Halter eingespannt.

L4-Larven oder junge Adulte mit wenig Embryonen im Uterus werden zunächst von der Agarplatte in einen Tropfen dH₂O überführt. Hier werden sie von den *E.coli* gesäubert. Dann wird ein Wurm auf ein mit Agarose beschichtetes Deckglas gegeben, auf dem sich ein Tropfen Voltalef-Öl (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 1 x PBS gebracht, wo er rehydriert und wieder anfängt sich zu bewegen. Mit Hilfe einer fein

ausgezogenen Pasteurpipette wird der Wurm aufgesaugt und auf eine frische Agarplatte überführt.

2.3.11.2 RNAi über Feeding

RNAi kann über das Füttern spezieller RNase III-defizienter Bakterien (HT115, s. 2.2.2) erfolgen. Diese Bakterien müssen die Zielsequenz der RNAi in einem bestimmten Vektor (pPD129.36, s. 2.2.4) enthalten. Zur Induktion der dsRNA werden 40µl IPTG (1mM Endkonzentration) auf einer kleinen Agarplatte (Durchmesser 5.3cm; Ampicillin- und Tetracyclin-Selektion) ausgestrichen. Anschließend werden 120µl einer ü. N. Kultur der HT115-Zellen auf diese IPTG-Agarplatten gegeben und über Nacht bei RT inkubiert. Um das Experiment zu starten werden L4-Larven auf die Platten gegeben und für mindestens 24h bei 15°C gehalten.

2.3.11.3 Auswertung der RNAi-Tiere

Die injizierten Würmer werden 18-20h nach der Injektion vereinzelt, also jeder Wurm wird auf eine eigene Agarplatte gesetzt. 24h später werden die Würmer von den Agarplatten entfernt und erneut auf frische Platten umgesetzt. "Feeding" Würmer werden nach 24h von der Platte entfernt und auf frische Platten gesetzt.

Die abgelegten Embryonen werden beobachtet. Es wird nach embryonaler Letalität geschaut, wenn Tiere schlüpfen nach larvaler Letalität und nach weiteren postembryonalen Entwicklungsdefekten, wie z.B. Sterilität. Wenn die Embryonen einen Phänotypen zeigen, werden weitere Embryonen der entsprechenden Würmer mit einer fein ausgezogenen Pasteurpipette von der mit Wasser beschichteten Agarplatte gesaugt und für *in vivo*-Beobachtungen (s. 2.3.5) und Antikörperfärbungen (s. 2.3.6) verwendet.

3 Ergebnisse

3.1 Die Rolle von *ERM-1* während der Differenzierung des embryonalen Darmepithels von *C. elegans*

Die Entwicklung des embryonalen Darmepithels ist mittels DIK(Differential-Interferenz-Kontrast)-Optik und auf elektronenmikroskopischer Ebene bereits ausführlich beschrieben worden, auf molekularer Ebene ist sie jedoch, speziell mit der einhergehenden Entwicklung von Darmlumen und “apical junction” (AJ), nahezu unerforscht (s. Einleitung, Leung et al., 1999; Sulston et al., 1983). Proteine aus der Ezrin-Radixin-Moesin(ERM)-Familie verbinden das Aktinzytoskelett mit Transmembranproteinen und können so wichtig für epitheliale Polarität und Integrität sein (Bretscher et al., 2002; Ivetic und Ridley, 2004). ERM-1 wurde über Sequenzvergleiche mit der Konsensussequenz des humanen Ezrin, Radixin, Moesin und *Drosophila* Moesin als einziges *C. elegans* ERM-Protein identifiziert (www.wormbase.org und www.smart.embl-heidelberg.de). Im nachfolgenden soll nun die Funktion von ERM-1 in Bezug auf das embryonale Darmepithel mit Hilfe von molekularen Methoden, DIK(Differential-Interferenz-Kontrast)-Optik und hochauflösender konfokaler Lasermikroskopie analysiert werden.

3.1.1 Molekulare Charakterisierung von *erm-1*

Das Gen *erm-1* kodiert für ein Ezrin-Radixin-Moesin Protein. Um die vollständige Sequenz von *erm-1* zu bestimmen, wurden die Sequenzen von überlappenden cDNAs (aus einer cDNA-Bank von Dr. Y. Kohara; National Institute of Genetics, Mishima, Japan) mit der vom Computerprogramm Genefinder (Favella et al., 1995) vorhergesagten Sequenz der Transkriptionseinheit C01G8.5a abgeglichen (Abb. 7A). Die nicht durch die Sequenzen der cDNAs abgedeckten Bereiche wurden über PCR an der cDNA yk257f5 sequenziert (s. M&M und Anhang). Zusätzlich wurde ein Northern Blot mit einer digoxigenierten RNA-Sonde durchgeführt. Hierbei wurde die cDNA 257f5 als Matrize genommen. Es konnte eine einzelne Bande mit einer ungefähren Größe von 2.3 kb detektiert werden, wobei dieser Wert der vorhergesagten Größe (2.331 kb) entspricht (www.wormbase.org, WR[“wormbase release”]130, Abb. 7E). Für *erm-1* wurde eine alternative Spleißvariante vorhergesagt (C01G8.5b), die ebenso durch cDNAs verifiziert werden kann. Die vorhergesagte

Größe entspricht 2.296 kb, wobei sich diese Transkriptionseinheit in der Sequenz des 5'-UTR ("untranslated region", untranslatierter Bereich) von C01G8.5a unterscheidet (www.wormbase.org, WR130).

Das Gen *erm-1* kodiert für ein Protein, welches 563 (C01G8.5a) bzw. 564 As (C01G8.5b) groß ist. Am N-Terminus befindet sich eine hochkonservierte FERM("band four one", Ezrin, Radixin, Moesin)-Domäne, die wiederum in 3 Subdomänen (F1-F3) unterteilt werden kann (Gautreau et al., 2000). Der mittlere Bereich umfaßt eine weniger gut konservierte α -helikale Domäne, am C-Terminus findet sich eine hochkonservierte Aktinbindesequenz (Abb. 7B, C). Hier ebenfalls konserviert ist das Threonin 544, welches generell wichtig für die Aktivierung von ERM-Proteinen ist (Bretscher et al., 2002).

3.1.2 Das embryonale Expressionsmuster von ERM-1

Um die subzelluläre Lokalisation von ERM-1 zu analysieren, wurde im Rahmen dieser Arbeit ein polyklonaler Antikörper gegen den C-Terminus (die letzten 356 As) des Proteins in einem Kaninchen generiert und affinitätsgereinigt (s. M.&M). Auf einem Western Blot einer gemischten, wildtypischen Wurmpopulation (s. M&M) detektiert dieser Antikörper eine einzelne Bande in der erwarteten Höhe von etwa 64 kD (Abb. 8C).

Um die Spezifität des Antikörpers nachzuweisen, wurden 3 verschiedene Methoden benutzt. Zunächst konnte gezeigt werden, daß der Antikörper auf einem Western Blot mit *erm-1(RNAi)*-Würmern keine Bande mehr detektiert (Abb. 8C). Auch auf "whole mount" *erm-1(RNAi)*-Embryonen ist im Vergleich zu WT-Embryonen (Abb. 8D) kein Signal mehr nachzuweisen (Abb. 8F). Schließlich wurde ein Aliquot des ERM-1-Antikörpers mit einem ERM-1-Fusionsprotein (s. M&M) im Überschuß für mehrere Stunden präinkubiert. Ein spezifischer Antikörper sollte das Protein binden, so daß in einer anschließenden Immunfärbung kein Signal mehr zu sehen sein sollte. In der Tat ist auch mit einem präinkubierten ERM-1-Antikörper keine Immunfärbung detektierbar (Daten nicht gezeigt).

In WT-Embryonen ist die erste anti-ERM-1-Färbung im Zweizellstadium sichtbar, die den Zellkortex angrenzender Plasmamembranen kennzeichnet (Abb. 8A, Ausschnitt). Diese subzelluläre Lokalisation bleibt auch für die nächsten Runden der Zellteilung bestehen, obwohl in einigen Zellen, speziell in der Keimbahnvorläuferzelle, ERM-1 ebenso im gesamten Zellkortex zu finden ist (Abb. 8A, Sternchen). Am Anfang der

Morphogenese (Bohnestadium, Abb. 8B) entwickeln viele Gewebe einen polarisierten Phänotyp, und auch ERM-1 wird am apikalen Zellkortex der Hypodermis und des Pharynx- und Darmprimordiums angereichert (Abb. 8B). Während des Kaulquappestadiums (Abb. 8D, 1.5fach elongiert) sind die Darmzellen vollständig polarisiert, wobei ERM-1 am apikalen Pol akkumuliert und mit dem Intermediärfilament IFB-2 kolokalisiert (Bossinger et al., 2004). Das Protein AJM-1 (“apical junction molecule”) lokalisiert in der AJ und trennt somit die apikale von der basolateralen Membrandomäne. Zwischen AJM-1 und ERM-1 besteht zumindestens auf Immunfluoreszenz(IF)-Ebene jedoch keine oder nur eine sehr geringfügige Überlagerung (Abb. 8E). Allerdings ist eine Kolokalisation von ERM-1 mit dem ebenfalls apikal akkumulierten F-Aktin zu sehen (Abb. 8G-F). Die Expression von ERM-1 kann aber auch im exkretorischen System beobachtet werden (Abb. 8G, weißer Kreis). Um welche Zelle es sich im speziellen handelt, wurde im Detail jedoch nicht weiter untersucht.

3.1.3 Unter DIK-Optik zeigen *erm-1(RNAi)*-Embryonen Verschlüsse und eine progressive Weitung des Darmlumens

Um die Aufgabe von ERM-1 besser zu verstehen, ist es von Interesse, den Funktionsverlustphänotypen zu analysieren. Hierfür stellt die RNA-vermittelte Interferenz (RNAi) eine einfache und schnelle Methode dar, um Genfunktionen auszuschalten und daraus resultierende Phänotypen zu untersuchen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde hauptsächlich die Methode des “RNAi feeding” verwendet, um schnell an eine große Menge zu analysierender Embryonen zu gelangen (s. Einleitung und M.&M). Wenn RNAi über Injektion durchgeführt wurde, ist dies angegeben. Generell sollte jedoch sowohl bei “RNAi feeding” als auch bei Injektion kein Unterschied in Bezug auf den Funktionsverlustphänotypen eines Gens auftreten (Kamath et al., 2001).

Der Verlust der Genfunktion von *erm-1* über RNAi ”feeding” führt zu larvaler Letalität. Hierbei arretieren 85% der Tiere im 1. Larvenstadium (n>300). Defekte der “escaper” wurden im näheren nicht analysiert. Im Vergleich zu WT-Larven (Abb. 11A) zeigen *erm-1(RNAi)*-Larven unter DIK-Optik ein abnormes Darmlumen, das Verschlüsse und Weitungen aufzeigt und an das Muster einer Perlenkette erinnert (Abb. 10B, C). Die Embryonalentwicklung verläuft bei *erm-1(RNAi)*-Embryonen zunächst wildtypisch (Abb. 9A). Mit Hilfe von 4D-Mikroskopie (s. Einleitung,

Schnabel et al., 1997) läßt sich jedoch in der späten Morphogenese eine progressive Schwellung des Darmlumens beobachten (Bretzelstadium, 4fach elongiert, Abb. 9): In dem hier gezeigten Embryo tritt eine leichte Schwellung erstmalig etwa 22min vor dem Schlüpfen auf, auch Verschlüsse sind bereits zu erkennen (Abb. 9A, B, Pfeilkopf). Das Darmlumen schwillt ab diesem Zeitpunkt kontinuierlich an, wobei die Schwellung in der Larve ein Maximum erreicht (ca. 2h nach dem Schlüpfen, Abb. 10). Die Verschlüsse reißen, wahrscheinlich durch einen großen Druck im Darmlumen bedingt, teilweise ein, wobei amorphes Material im Lumen sichtbar wird (Abb. 10C, Pfeilkopf). Letztendlich kollabiert das Darmlumen ($t \approx 3h$, Abb. 10D).

Um zu zeigen, daß die Verschlüsse den Transport von Flüssigkeiten und niedermolekularen Stoffen verhindern, wurden gerade geschlüpfte Larven auf Agarplatten mit Lucifer Yellow (LY) gefüttert (s. M&M und Abb. 11). LY ist ein hydrophiler, niedermolekularer Fluoreszenzfarbstoff (MG 550, Stewart, 1981), der normalerweise für sogenannte “dye-coupling”-Studien¹ benutzt wird (Bossinger und Schierenberg, 1992). In Wildtyp-Larven wird der Farbstoff ohne Probleme über den Pharynx aufgenommen und diffundiert sofort von anterior nach posterior durch das Darmlumen ($t < 5$ min, Abb. 11A, B). Im Gegensatz dazu nehmen *erm-1(RNAi)*-Larven LY zwar normal auf, dieses diffundiert jedoch nur bis zum 1. Verschuß (Abb. 11C, D, Pfeilkopf). Auch 3 Stunden nach dem Schlüpfen, nachdem das Darmlumen bereits kollabiert ist, stellen die Verschlüsse für LY eine nahezu undurchdringliche Barriere dar (Abb. 11E, F, Pfeilkopf). In *erm-1(RNAi)*-Larven, die weniger starke Defekte in Bezug auf die Darmverschlüsse aufweisen, ist die Diffusion von LY nicht gestört (Daten nicht gezeigt). Das Darmlumen dieser Larven zeigt statt der o.g. Verschlüsse Verengungen (s. unten).

Die Schwellung des Darmes, die auch hier auftritt, könnte vermutlich sekundär verursacht werden, vielleicht durch einen defekten Flüssigkeitstransport, der durch das teilweise verschlossene bzw. verengte Darmlumen verursacht wird.

3.1.4 Analyse des *erm-1(RNAi)*-Phänotyps mittels hochauflösender konfokaler Lasermikroskopie

Um die eigentliche Ursache für die Blockade des Flüssigkeitstransports zu verstehen und um zu testen, wie die Verschlüsse im Embryo entstehen, wurden *erm-1(RNAi)*-

¹ Als “dye-coupling” wird die Diffusion von Farbstoffen über Gap Junctions bezeichnet.

Embryonen mit Antikörpern gegen verschiedene molekulare Marker des Darmepithels gefärbt.

3.1.4.1 Die *C.elegans* AJ zeigt ein invariables Muster

Der Darm von *C. elegans* ist ein einfach aufgebautes Epithel, bestehend aus 20 Zellen. Diese umgeben röhrenförmig das Lumen und sind in einem regelmäßigen Muster von neun Ringen, den sogenannten “ints” (“intestinal units”) angeordnet (Sulston et al., 1983). Der vorderste Ring (int 1) besteht aus 4 Zellen, die anderen (int 2-9) stellen jeweils Zellpaare dar. Alle Zellen sind gürtelförmig von der AJ umgeben. Am Anfang der Morphogenese (Bohnestadium) lokalisiert die AJ am zukünftigen apikalen Pol der Zellen (Abb. 12A, D, G, Bossinger et al., 2001). Im Verlauf der Morphogenese gelangt die AJ an eine apikolaterale Position und bildet ein typisches Strickleitermuster aus (Abb. 12B, C, E, F, H, I). Dieses Muster entsteht dadurch, daß die AJ benachbarte Zellen miteinander verbindet (grüne Markierung). Sie sorgt aber auch für die Verknüpfung gegenüberliegender Zellen (rote Markierung). Im mittleren Abschnitt des Darmepithels sind die Zellen versetzt, deshalb entsteht hier eine trizelluläre Junction, die mit drei Zellen in Kontakt steht (Abb. 12B, E, H, rote Markierung). Die AJ stellt mit ihrem invariablen Muster einen idealen Marker dar, der Abweichungen von der Wildtypentwicklung leicht erkennen läßt. Deshalb ist sie bestens geeignet, um Darmphänotypen zu analysieren.

3.1.4.2 Während der Morphogenese von *erm-1(RNAi)*-Embryonen ist das Remodelling der AJ im Darmepithel gestört

Im nachfolgenden soll die Entwicklung der AJ in *erm-1(RNAi)*-Embryonen im Vergleich zum WT beschrieben werden. Dazu wurden Embryonen mit Antikörper gegen Marker, wie dem AJM-1/DLG-1(**D**iscs **L**arge)-Komplex (DAC), dem Cadherin-Catenin-Komplex (“**c**adherin-**c**atenin-complex” [CCC], z.B. α -Catenin, HMP-1 [**h**umpback]) und gegen apikale Marker, wie der PKC-3 (**P**roteinkinase **C**) gefärbt (s. Einleitung, Bossinger et al., 2001; Leung et al., 1999).

In der frühen Morphogenese (Bohnestadium) akkumuliert AJM-1 zusammen mit PKC-3 am apikalen Zellkortex des Darmepithels. Zu diesem Zeitpunkt haben die Darmzellen bereits ihre apikobasale Polarität ausgebildet (Leung et al., 1999). Auch in *erm-1(RNAi)*-Embryonen sind diese beiden Marker apikal zu finden (Abb. 13G, G'). Dies deutet darauf hin, daß ERM-1 weder in die Etablierung der Polarität

involviert ist noch eine konkrete Funktion für den Transport von apikalen und AJ-Proteinen zum apikalen Pol hin hat. Allerdings ist anzumerken, daß in *erm-1(RNAi)*-Embryonen bereits des öfteren eine etwas schwächere Immunfärbung der AJ im Vergleich zum WT beobachtet wurde. Diese ist im Detail aber nie analysiert worden. Im weiteren Verlauf der Morphogenese (Komma-, Kaulquappstadium) bildet sich das spezifische, dreidimensionale Muster der AJ aus (Abb. 13C-F'). Dieses Muster spiegelt zum einen die Adhäsion der epithelialen Zellen wieder, und zum anderen umgrenzt die AJ den Verlauf des Darmlumens (s. Sternchen in Abb. 13D'). Im Gegensatz zum WT zeigen *erm-1(RNAi)*-Embryonen ab dem Kommastadium zwei Phänotypen: erstens, AJ-Proteine, die an vielen verschiedenen Stellen um das zukünftige Darmlumen akkumulieren (Pfeilköpfe in Abb. 13I-L') und zweitens, einen an den dazwischenliegenden Bereichen nur unvollständig separierten AJ-Gürtel. Diese Phänotypen lassen vermuten, daß während der epithelialen Polarisation das Remodelling der AJ-Moleküle vom apikalen Zellkortex zu einer mehr apikolateralen Position gestört ist (s. Diskussion). Diese falsche Position der AJ ist ebenso bis zum Schlüpfen und auch noch danach zu beobachten und führt vermutlich zu den in den Larven beobachteten Darmverschlüssen (s. Abb. 10, 11). Bemerkenswert ist weiterhin die Tatsache, daß dieser Phänotyp weder in der AJ des Pharynx noch in der Hypodermis zu beobachten ist.

3.1.4.3 Die Organisation des F-Aktinzytoskeletts im apikalen Zellkortex des Darmepithels ist abhängig von ERM-1

ERM-Proteine werden generell als Linker zum Aktinzytoskelett beschrieben. Auch ERM-1 besitzt eine hochkonservierte Aktinbindedomäne (s. Abb. 7) und könnte somit organisierend und stabilisierend auf das Aktinzytoskelett wirken. Während der frühen Embryogenese kolokalisieren ERM-1 und F-Aktin an der Membrankontaktseite aller Blastomeren, außerdem akkumulieren beide am apikalen Zellkortex des Darmepithels (vgl. Abb. 8, 14). Um die Verteilung von Aktin in *erm-1(RNAi)*-Embryonen zu analysieren, wurden diese mit fluoreszierendem Phalloidin (FITC bzw. Alexa-gekoppelt) gefärbt. In frühen Blastomeren zeigen sich zunächst keine Unterschiede in der Aktinverteilung oder -menge von WT- und *erm-1(RNAi)*-Embryonen (vgl. Abb. 14A, B). Nach der epithelialen Polarisierung der Darmzellen jedoch kann in *erm-1(RNAi)*-Embryonen im Gegensatz zum WT keine apikale Akkumulation von F-Aktin beobachtet werden (vgl. Abb. 14C-F, Pfeile). Diese dramatische Reduktion in der

Menge des F-Aktin könnte ein Hinweis auf ein verändertes apikales Zytoskelett sein. Es stellt sich die Frage, ob dieser Defekt spezifisch für das Aktinzytoskelett ist oder ob das Zytoskelett generell betroffen ist. Deshalb wurden *erm-1(RNAi)*-Embryonen gegen α -Tubulin (Piperno und Fuller, 1985) gefärbt, die allerdings in der Verteilung des Mikrotubulinnetzwerks keinen Unterschied zum WT aufweisen (vgl. Abb. 14G, H). So könnte das gestörte Remodelling der AJ in *erm-1(RNAi)*-Embryonen möglicherweise durch ein destabilisiertes Aktinzytoskelett verursacht werden (s. Diskussion).

3.1.4.4 In *erm-1(RNAi)*-Embryonen sind die im Darmlumen auftretenden Defekte unabhängig von der Ausbildung der apikalen Membrandomäne

Der Verlust der *erm-1*-Funktion führt dazu, daß das Darmlumen stellenweise verschlossen bzw. verengt ist und so nicht korrekt ausgebildet wird. Auf IF-Ebene korreliert dieser Tubulogenesedefekt mit einer falschen Position der AJ. Die Ursache für diesen Phänotyp könnte ein genereller Defekt in der Anlieferung von apikalem Membranmaterial sein, so daß zumindest partiell kein Darmlumen gebildet werden kann (s. Diskussion). Zur Beantwortung dieser Frage wurden WT und *erm-1(RNAi)*-Embryonen entweder mit Phalloidin (FITC oder Alexa-gekoppelt) gefärbt, um den F-Aktin-reichen apikalen Zellkortex zu markieren oder mit dem monoklonalen Antikörper MH33 (Francis und Waterston, 1985), der das darmspezifische Intermediärfilament IFB-2 in der "endotube" des terminalen Netzwerk ("terminal web") erkennt (Bossinger et al., 2004). Das terminale Netzwerk ist eine subapikale, zytoskeletale Struktur unterhalb der apikalen Mikrovilli des Darmepithels und wird vermutlich benötigt, um die Aktinfilamente der Mikrovilli zu verankern. Die "endotube" ist ein Bestandteil des terminalen Netzwerks, das in dieser Form nur bei Nematoden zu finden ist (Drubin und Nelson, 1996; Munn und Greenwood, 1983).

In *erm-1(RNAi)*-Embryonen sind IFB-2 und F-Aktin wie im WT am apikalen Zellkortex lokalisiert. Und es zeigt sich ebenso nur wenig bzw. keine Kolo-kalisation mit den AJ-Markern Phosphotyrosin (PY, der anti-PY-Antikörper erkennt Phosphotyrosin Epitope, die vermehrt in der AJ vorkommen, Bossinger et al., 2001) oder dem DAC. In unregelmäßigen Abständen entlang der anterior-posterioren Achse des Darms jedoch akkumulieren die Proteine der AJ punktuell und verhindern somit sämtliche apikale Färbung (Pfeilköpfe in Abb. 15B-C', E, E'). Zum Teil wird der apikolaterale Gürtel der AJ auch nur unvollständig separiert (Pfeile in Abb. 15E', F').

Im WT zeigt sich ein durchgehendes Darmlumen (Sternchen in Abb. 15A', D'), welches in *erm-1(RNAi)*-Embryonen verschlossen bzw. verengt ist. An den Verengungen ist aber offensichtlich eine apikale Färbung von IFB-2 und F-Aktin zu sehen, die außerhalb des Fokus der AJ liegt. Dies läßt vermuten, daß die Ausbildung der apikalen Membrandomäne normal verläuft. Allerdings wird sie durch die "verengte" AJ zusammengedrängt und liegt somit gefaltet vor (s. Diskussion, Abb. 41).

Außer diesen AJ-Defekten ist in *erm-1(RNAi)*-Larven eine reduzierte F-Aktin-Färbung im Darm zu beobachten, während Pharynx und Hypodermis wildtypisch gefärbt sind (vgl. Abb. 15D', E'). So bleibt die schon vorher beobachtete Reduktion des apikalen Aktinzytoskeletts (s. Abb. 14) von der frühen Morphogenese bis zum Schlüpfen bestehen.

3.1.5 Modellvorstellungen für das AJ-Remodelling im Darmepithel

Der primäre Defekt in *erm-1(RNAi)*-Embryonen stellt den Verlust der F-Aktinakkumulation im apikalen Zellkortex der Darmzellen dar, der auf eine veränderte Struktur oder Funktion des Aktinzytoskeletts hinweisen könnte. ERM-1 könnte benötigt werden, um die Aktinfilamente zu organisieren. Das defekte Aktinzytoskelett in *erm-1(RNAi)*-Embryonen wäre so vermutlich direkt für das Remodelling der AJ verantwortlich und nicht für die apikale Anlieferung von AJ-Proteinen bzw. für die Anlieferung von Material für die apikale Membrandomäne (s. Diskussion).

So ergeben sich aus den bisher gezeigten Ergebnissen folgende Überlegungen: (1) Basierend auf der Analyse von Zell-Zellkontakt-Ausbildungen in Zellkultur (MDCK-Zellen, Adams et al., 1998), kann eine Anbindung der AJ an das Aktin-Myosinnetzwerk spekuliert werden. Durch eine Kontraktion dieses Netzwerks könnte die AJ dynamisch von apikal nach apikolateral relokalisiert werden. (2) Während der Darmlumenentwicklung von *C. elegans* erscheinen, wahrscheinlich endozytotisch aktive, Vesikel um das zukünftige Darmlumen herum (Gruenberg und Maxfield, 1995; Leung et al., 1999). Hier könnten sie adhäsive AJ-Moleküle, die um das spätere Lumen akkumulieren, entfernen und zur Umlagerung der AJ nach apikolateral und somit zur Lumenausbildung beitragen (Leung et al., 1999). Sowohl (1) als auch (2) erfordern ein organisiertes Aktinzytoskelett, welches durch ERM-1 bewerkstelligt werden könnte (Adams et al., 1998; Engqvist-Goldstein und Drubin, 2003). Eine

detaillierte Erklärung dieser Modelle findet sich in der Diskussion. (3) Um den von ERM-1 vermittelten Mechanismus besser zu verstehen, ist es von Interesse neue Bindungspartner zu identifizieren. Dies kann mittels eines Hefe-2-Hybrid-Screens geschehen.

3.2 Analyse des Aktin-Myosinnetzwerks im embryonalen Darmepithel von *C. elegans*

Aktin-Myosinkontraktionen sind während der Morphogenese von *C. elegans* von Bedeutung für die Elongation des Embryos. Sie bewirken eine Verlängerung von lateralen Hypodermiszellen und somit eine Verlängerung des gesamten Embryos. Die Rho-Kinase LET-502 und die Myosinphosphatase MEL-11 bewerkstelligen die Kontraktionen über die Regulation der Aktivität von Myosin. Die regulatorische Untereinheit des Myosin, die "leichte Kette" (MLC-4, "myosin light chain") wird durch die Phosphorylierung durch LET-502 aktiviert, eine Desphosphorylierung durch MEL-11 führt zur Inaktivierung (Abb. 16, Piekny und Mains, 2003). Da sowohl LET-502 als auch MEL-11 nach der epithelialen Polarisierung in der AJ von Hypodermis und Darm lokalisiert sind (Piekny et al., 2003), stellen sie gute Kandidaten dar, AJ-Remodelling im Darmepithel zu vermitteln. Deshalb wurden *let-502(RNAi)*- und *mel-11(RNAi)*-Embryonen gegen verschiedene molekulare Marker des Darmepithels gefärbt und im Hinblick auf ihren Zusammenhang mit dem AJ-Remodelling analysiert.

3.2.1 Der Verlust der Rho-Kinase LET-502 führt zu einem neuartigen AJ-Phänotyp im Darmepithel

Der Verlust der Genfunktion von *let-502* führt zu Letalität im 1. Larvenstadium. Die Larven wirken unter DIK-Optik klein und gedrunken (Abb. 17A, A'). Dies ist ein Merkmal, welches auf Elongationsdefekte der Hypodermiszellen hindeutet (Piekny et al., 2000). Das Darmlumen ist geschwollen, wobei es mit einer amorphen Masse gefüllt zu sein scheint (Abb. 17A, A', Pfeile). Im Gegensatz zu *erm-1(RNAi)*-Larven sind jedoch keine Lumenverschlüsse zu sehen, auch zeigt die Schwellung nie die in *erm-1(RNAi)*-Larven beobachteten Ausmaße (s. Abb. 10, 11).

Auf IF-Ebene sind neuartige Defekte in der Struktur der AJ des Darms zu erkennen. Während der anfänglichen Morphogenese (Bohnestadium) ist in *let-502(RNAi)*-Embryonen die Akkumulation von apikalen und AJ-Komponenten am zukünftigen apikalen Pol der Darmzellen zunächst nicht vom WT zu unterscheiden (vgl. Abb. 18A-B, F-G). Ab dem Bohne- bzw. Kaulquappestadium ist eine Veränderung der AJ-Struktur zu beobachten, die vermutlich eine Expansion der AJ nach lateral darstellt.

Hierbei ist zunächst nur die AJ zwischen zwei benachbarten Zellen betroffen (vgl. Abb. 18C-D, H-I', Pfeilköpfe). Auch die apikale Membrandomäne, gefärbt gegen IFB-2, expandiert nach lateral (Abb. 19E-F') und korreliert damit mit den AJ-Defekten (Abb. 19B-C). Im Verlauf der Morphogenese ist außerdem eine veränderte IFB-2-Expression zu beobachten. Im Vergleich zu WT-Embryonen erscheint IFB-2 in *let-502(RNAi)*-Embryonen schwächer und diffuser (vgl. Abb. 19C, C, F, F). Auch andere apikale Marker wie F-Aktin und ERM-1 sind in den Darmzellen nach lateral expandiert. (Daten nicht gezeigt). In der späten Morphogenese (Schlingestadium, Abb. 18J, J) erscheint die AJ aller Darmzellen im Vergleich zum WT "geweitet" (vgl. Abb. 18E, E', J, J'). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß die apikale Membrandomäne vergrößert ist und daß die Defekte im Verlauf der Morphogenese stärker werden. Auch der Funktionsverlust von *mel-11* führt zu larvaler Letalität. Im Gegensatz zu *let-502(RNAi)*-Embryonen tritt jedoch keine veränderte AJ des Darmepithels auf (Abb. 20B, B). Es ist beschrieben worden, daß ein gleichzeitiger Verlust von *let-502* und *mel-11* in der Hypodermis zu einer Abschwächung von beiden Funktionsverlustphänotypen führt (Piekny et al., 2000). Ein Doppelknockout von *let-502* und *mel-11* zeigt im Darmepithel jedoch nur die Ausprägung des *let-502(RNAi)*-Phänotyps (Abb. 20D, D').

LET-502 und MEL-11 wirken aktivierend bzw. inhibierend auf MLC-4, welches einen Komplex mit der "schweren Kette" des Myosins bildet. In *C. elegans* gibt es zwei "schwere Ketten", NMY-1 und NMY-2 ("non-muscle-myosin"), die in Bezug auf die Elongation der Hypodermis eine redundante Funktion haben (Piekny et al., 2003). *nmy-1(RNAi)*-Embryonen zeigen, vergleichbar mit *let-502(RNAi)*-Embryonen, eine laterale Expansion der AJ (Abb. 20C, C). Der über RNAi vermittelte Funktionsverlust von *nmy-2* führt, ebenso wie *mlc-4(RNAi)*, zu Zytokinesedefekten (Guo und Kemphues, 1996; Shelton et al., 1999). Hierdurch ist die Analyse der Funktionsverlustphänotypen von *mlc-4* und *nmy-2* über RNAi im embryonalen Darm nicht möglich. Um aber an diese Funktion der beiden Gene zu gelangen, wurde ein Stamm generiert, der insensitive gegenüber dem RNAi-Mechanismus ist, jedoch ein extrachromosomales Array trägt, wodurch RNAi im Darm ermöglicht wird (*rde-1[ne219]*; *elt-2::rde+*, C. Segbert und O. Bossinger, unveröffentlichte Daten).

So wurde in eine vollständig RNAi resistente Mutante, *rde-1(ne219)*, ein Transgen eingeführt wurde, welches unter dem starken, darmspezifischen *elt-2*-Promotor eine Wildtypkopie von *rde-1* trägt (Hawkins und McGhee, 1995; Tabara et al., 1999).

Damit sind nur die Darmzellen RNAi sensitiv und die Funktion von Genen kann ausschließlich im Darm analysiert werden. Mittels dieser Methode wurde im nachfolgenden versucht, die Funktion von MLC-4 und NMY-2 im Darmepithel zu analysieren.

3.2.2 Die „leichte Kette“ MLC-4 und die „schwere Kette“ NMY-2 des Myosins lokalisieren auch im zellulären Kortex der Darmzellen

Da gegen MLC-4 kein Antikörper existiert, wurde im Rahmen dieser Arbeit ein Peptidantikörper aus dem Meerschwein gegen die As 158-172 generiert (Eurogentec, Belgien). Dieser zeigt auf Western Blot mit einer gemischten Wildtyp-Wurmpopulation eine Bande der zu erwartenden Größe von 20 kD, die in *mlc-4(RNAi)*-Wümmern deutlich reduziert ist (Abb. 21G, s. M&M). Als zusätzlicher Beweis für die Spezifität, wurden *mlc-4(RNAi)*-Embryonen mit dem Antikörper gefärbt. Hier war kein Signal mehr zu detektieren (Abb. 21E).

In WT-Embryonen ist die MLC-4-Expression erstmals im Zweizellstadium sichtbar. Hier kennzeichnet sie deutlich die kortikale Zellmembran der anterioren AB-Zelle (Abb. 21A). Im 4-Zellstadium lokalisiert MLC-4 im Kortex sämtlicher Zellen, wobei eine deutliche Anreicherung in den Nachkommen der AB-Zelle (ABa und ABp, Abb. 21B) zu erkennen ist. Während der Gastrulation kann auch im Kortex der Darmvorläuferzellen, den E-Zellen, eine Färbung beobachtet werden (Abb. 21C, Sternchen). In der Morphogenese (Pflaumestadium) wird MLC-4 im apikalen Kortex der Hypodermis- und Pharynxzellen angereichert. Im apikalen Kortex der Darmzellen ist dagegen nur eine sehr geringe MLC-4 Expression zu sehen (Abb. 21D).

NMY-2 ist in WT-Embryonen während der frühen Zytokinese im Kortex sämtlicher Zellen zu finden (4-Zellstadium, Abb. 22A, Guo und Kemphues, 1996). Diese Lokalisation bleibt während der gesamten Proliferationsphase des Embryos bestehen. Am Anfang der Morphogenese (Bohnestadium, Abb. 22A, C) akkumuliert NMY-2 zusätzlich schwach im apikalen Zellkortex des Pharynx- und Darmprimordiums. Somit erinnert diese Expression an das Muster von ERM-1 und F-Aktin in den entsprechenden Stadien (s. Abb. 8, 14). *erm-1(RNAi)*-Embryonen zeigen jedoch weder eine veränderte Expression von MLC-4, noch von NMY-2 (Daten nicht gezeigt). In *mlc-4(RNAi)*- und *nmy-2(RNAi)*-Embryonen sind jeweils

Zytokinesedefekte zu beobachten, d.h. es finden Kernteilungen ohne Zellteilungen statt. Daraus resultiert ein multinukleärer, einzelliger Embryo, in dessen Zellkortex eine Expression von ERM-1 zu sehen ist (Abb. 21F, 22D). Dies deutet darauf hin, daß das Aktin-Myosinnetzwerk nicht direkt von ERM-1 beeinflusst wird und umgekehrt (s. Diskussion).

3.2.3 Darmspezifische RNAi von *mlc-4* und *nmy-2* führt zu larvalem Arrest und Darmdefekten

Um zu zeigen, ob *mlc-4* und *nmy-2* eine darmspezifische Funktion aufweisen, wurde in den bereits erwähnten Stamm *rde⁻; elt-2::rde⁺* (s. oben) doppelsträngige RNA (dsRNA) von *mlc-4* bzw. *nmy-2* injiziert. Darmspezifische RNAi von *mlc-4* und *nmy-2* führt in beiden Fällen zu einem selten auftretenden Arrest im 1. Larvenstadium (n=5/130 bzw. 5/120). Unter DIK-Optik zeigen *mlc-4(RNAi)*-Larven ein nur leicht geweitetes Darmlumen, welches mit amorphem Material gefüllt ist. Damit ähneln sie *let-502(RNAi)*-Larven (Abb.23B, B', Pfeilkopf). Auch *nmy-2(RNAi)*-Larven weisen Darmdefekte auf. Das Darmlumen ist geweitet, mit Bereichen, die als "Verschlüsse" interpretiert werden können (Abb. 23A, A', Pfeilkopf). Somit kann dieser Phänotyp mit dem larvalen *erm-1(RNAi)*-Phänotyp (s. Abb. 10) verglichen werden.

Da sich die Frage stellt, ob auch im Embryo Störungen zu sehen sind, wurden *mlc-4*- und *nmy-2(RNAi)*-Embryonen gegen AJM-1 gefärbt. Es erwies sich als äußerst schwierig, Embryonen zu erkennen, welche das extrachromosomale Array tragen, also RNAi sensitiv sind. Gute Hinweise für die Sensitivität gibt die fehlende Expression des entsprechenden Proteins im Darm, da aber in beiden Fällen die darmspezifische Proteinlokalisierung bereits im WT sehr schwach ist, war es kaum möglich, hierüber eine Aussage zu treffen. So wurden Embryonen nur nach Defekten in der AJ bewertet. In der Tat ist bei 12.5% der Embryonen von *mlc-4(RNAi)* (n=10/80) und bei 11.7% der *nmy-2(RNAi)*-Embryonen (n=14/120) eine leichtere AJ-Disorganisation im Darm zu erkennen, die als AJ-Remodelling Defekt interpretiert werden kann (Abb.21H, H', 22E, E', s. Diskussion).

Das extrachromosomale Array des hier verwendeten Stamm kann während der Mitose, wahrscheinlich durch "non-disjunction", verloren gehen. Dies führt dazu, daß die Tiere dieses Stammes immer Mosaik sind (Yochem und Herman, 2003). Da das Array vermutlich oft nicht in die Darmzellen gelangt ist, zeigte nach Injektion von dsRNA immer nur ein geringer Prozentsatz einen Phänotyp.

3.2.4 *act-5(RNAi)*-Embryonen zeigen Remodellingdefekte der AJ im embryonalen Darmepithel

Die Anbindung an das F-Aktinzytoskelett ist ein essentielles Kriterium für die aktomyosin-basierende Kontraktion (Adams et al., 1998; Piekny et al., 2003). Da auch für ERM-1 eine wichtige Funktion bei der Stabilisierung von F-Aktin gezeigt werden konnte (s. Abb. 14), ist es von Interesse zu analysieren, welche Auswirkungen der Verlust von Aktinproteinen für das Darmepithel hat. In *C. elegans* existieren 12 Aktin- bzw. Aktin-ähnliche Proteine, wobei ACT-5 das einzige ist, welches spezifisch im Darm exprimiert wird (MacQueen et al., 2005; Schriefer et al., 1995). Um zu verstehen, welche Rolle ACT-5 im Darmepithel spielt, soll im nachfolgenden *act-5* mittels RNAi ausgeschaltet und der Funktionsverlustphänotyp mittels DIK-Optik und molekularen Markern des Darmepithels analysiert werden.

Der Funktionsverlust von *act-5* führt zu einem Arrest im 1. Larvenstadium. Hierbei zeigt sich ein Darmphänotyp, mit teilweise leicht geschwollenem Lumen, das mit amorphem Material gefüllt ist (Abb. 24A, A', Pfeilkopf). Um die Permeabilität des Darmlumens und somit die Funktion des Darmes zu testen, wurden Fütterungsexperimente mit LY (s. oben) durchgeführt. LY kann ungehindert von anterior nach posterior durch das Darmlumen diffundieren (Abb. 24B, C, Pfeilköpfe), dies steht im Gegensatz zu *erm-1(RNAi)*-Larven, deren Darm Verschlüsse aufweist und somit für LY undurchlässig ist (s. Abb. 11).

Um die AJ-Struktur zu analysieren wurden *act-5(RNAi)*-Embryonen gegen AJM-1 und ERM-1 gefärbt. Hier sind zwei verschiedene Kategorien von AJ-Disorganisationen zu beobachten. Während der Morphogenese (Kaulquappstadium) ist eine im Vergleich zum WT "verengte" AJ zu sehen (vgl. Abb. 25B, B', E, E'), die dem AJ-Phänotyp von *erm-1(RNAi)*-Embryonen ähnelt (s. Abb. 13, 15). Weiterhin zeigen sich Abweichungen von der geordneten Struktur der AJ, die auf fehlerhafte Darmzellanordnungen hinweisen könnten (Daten nicht gezeigt). Allerdings ist dieser Phänotyp nur in 18.75% der Embryonen zu beobachten (n=6/32). Obwohl die AJ in *act-5(RNAi)*-Embryonen nicht vollständig nach apikolateral gelangt, bleibt die Lokalisation von ERM-1 in den Darmzellen unverändert (vgl. Abb 25A, A', D, D). Dieses deutet darauf hin, daß ACT-5 weder in die Etablierung der Polarität involviert ist, noch eine Funktion für den Transport von apikalen Proteinen zum apikalen Pol hin hat.

Da ACT-5 ein Bestandteil des Aktinzytoskeletts ist, kann eine Disorganisation von F-Aktin in *act-5(RNAi)*-Tieren vermutet werden. Deshalb wurden *act-5(RNAi)*-Embryonen mit fluoreszierendem Phalloidin (Alexa-gekoppelt) gefärbt und analysiert. Im Gegensatz zu *erm-1(RNAi)*-Embryonen tritt in *act-5(RNAi)*-Embryonen während der frühen Morphogenese (Bohnestadium) keine Veränderung der Aktinorganisation und -menge im apikalen Kortex der Darmzellen auf. Es zeigt sich wie im WT eine Anreicherung von F-Aktin (vgl. Abb. 26A, B). Auch im Verlauf der weiteren Morphogenese (Pflaumestadium) ist zunächst kein Unterschied zum WT zu erkennen (vgl. Abb. 26C, D). Erst zum Ende der Morphogenese (im Schlinge- und Bretzelstadium) zeigt sich eine veränderte Aktinlokalisierung im Darmepithel. Während im WT der apikale Zytokortex klar erkennbar ist, ist dieser in *act-5(RNAi)*-Embryonen reduziert (vgl. Abb. 26E, F). Dieses deutet auf ein während der späten Morphogenese verändertes F-Aktinzytoskelett hin. Ein Doppelknockout von *erm-1* und *act-5* führt jedoch nicht zur Verstärkung des *erm-1(RNAi)*-Phänotyps (vgl. Abb. 25C, C', F, F'). Es könnte spekuliert werden, daß ACT-5 von ERM-1 stabilisiert wird. Allerdings deckt die ACT-5-Stabilisierung nur einen Teilbereich der ERM-1-Funktion ab, es wäre möglich, daß noch andere Aktinproteine durch ERM-1 stabilisiert werden und somit an dem Remodelling der AJ beteiligt sind (s. Diskussion).

3.3 Endozytose spielt generell keine Rolle für das AJ-Remodelling

Während der Differenzierung des Darmepithels in *C. elegans* kann Clathrin-vermittelte Endozytose (bzw. “receptor mediated endocytosis” [RME]) in den Darmzellen beobachtet werden (Bossinger et al., 1996). Clathrin-Moleküle werden generell durch einen tetrameren Adapterkomplex an die Plasmamembran rekrutiert, der spezifisch mit den zu internalisierenden Transmembranmolekülen interagiert. Eine zentrale Rolle spielen hierbei die Mediumketten des Komplexes, da sie direkt an die Zielproteine binden. So kommt es schließlich zur Abschnürung eines Clathrin-bedeckten Vesikels (Gundelfinger et al., 2003; Ivanov et al., 2005).

In *C. elegans* gibt es 3 verschiedene Adapterkomplexe (AP-1-3), für deren Mediumketten gezeigt werden konnte, daß sie für embryonale und larvale Entwicklung von Bedeutung sind (Shim und Lee, 2000; Shim und Lee, 2005; Shim et al., 2000). Um die Frage zu beantworten, ob die Clathrin-vermittelte Endozytose auch für das Remodelling der AJ von Bedeutung ist, wurden die Funktionsverlustphänotypen der Mediumketten näher analysiert und resultierende Embryonen mit verschiedenen molekularen Markern des Darmepithels gefärbt.

Der Funktionsverlust von *apm-1*, der Mediumkette von AP-1, zeigt pleiotrope Defekte in vielen Geweben, z.B. in Vulva und Darm, und die Tiere sind teilweise larval letal (Shim et al., 2000). Unter DIK-Optik sind in den Darmzellen Vakuolen zu beobachten, das Darmlumen erscheint jedoch normal (Daten nicht gezeigt). Auf IF-Ebene sind in Bezug auf die AJ-Struktur des Darmepithels keine Defekte zu erkennen (vgl. Abb.28 B, B', F, F'). Es existiert jedoch ein zu *apm-1* homologes Gen, *unc-101*, welches ebenso eine Medium-Kette von AP-1 darstellt und z.T. redundante Funktionen aufweist (Shim et al., 2000).

Nur ein geringer Anteil der *unc-101(RNAi)*-Tiere arretiert embryonal und es sind keine AJ-Defekte zu beobachten (Abb. 27C, C'). Dagegen führt eine Doppelknockout *apm-1* und *unc-101* zu erhöhter embryonaler Letalität (Shim et al., 2000). Hierbei können ebenso Vakuolen in den Darmzellen beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). 25% der *apm-1/unc-101(RNAi)*-Embryonen (n=5/20) zeigen außerdem ein verändertes Muster der AJ in den Darmzellen, vor allem im posterioren Bereich des Mitteldarms ist ein *erm-1(RNAi)*-ähnlicher Phänotyp zu erkennen. Die AJ

akkumuliert, wie in *erm-1(RNAi)*-Embryonen, an der apikalen Membran (Abb.27E, E'), die Lokalisation von ERM-1 entspricht jedoch der WT-Situation (vgl. Abb. 27A, A', D, D'). Die Mediumkette des zweiten Adapterkomplexes, APM-2, hat keinen Einfluß auf die AJ der Darmzellen und auch ein Dreifachknockout von *apm-1/unc-101/apm-2* führt zu keiner Verstärkung des beobachteten AJ-Phänotyp. Eine aktuell identifizierte Mediumkette des dritten Adapterkomplexes, *apm-3* (Shim und Lee, 2005), wurde im Hinblick auf ihre Rolle des AJ-Remodelling bislang nicht untersucht.

Ein weiterer Ansatz, um RME zu analysieren, ist die generelle Inhibition der Endozytose über spezifische Chemikalien. Transferrin, ein Marker für RME, wird während der Morphogenese von *C. elegans* in die Darmzellen internalisiert (Bossinger et al., 1996). Es wurde berichtet, daß die kationische, amphiphile Droge Chlorpromazine die Endozytose von Transferrin blockiert, indem sie die Abschnürung von Clathrin-bedeckten Vesikeln verhindert (Wang et al., 1993). Die Inhibition der RME über Chlorpromazine beeinflusst jedoch nicht das Remodelling der AJ (H. Arts und O. Bossinger, unveröffentlichte Daten). Da jedoch *apm-1/unc-101(RNAi)* zu einem *erm-1(RNAi)*-ähnlichen Phänotyp führt, verbleibt zu testen, ob hier auch generell die RME blockiert ist.

3.4 Identifikation von ERM-1-Bindungspartnern über einen Hefe-2-Hybrid-Screen

Um die Funktion von ERM-1 besser zu verstehen, ist es von Bedeutung, Proteine zu identifizieren, die eine direkte Bindung zu ERM-1 zeigen. Eine etablierte Methode, um neue Interaktionspartner zu finden, ist das Hefe-Zwei-Hybrid-System (H2HS, Abb. 28).

Das H2HS stellt ein einfaches Testsystem dar, welches es ermöglicht, Interaktionspartner des zu analysierenden Proteins zu identifizieren (Durfee et al., 1993; Fields und Song, 1989). Das Prinzip beruht auf Aktivierung des *lac-Z*-Genes (kodiert für die β -Galaktosidase) durch den Transkriptionsfaktor GAL4. Hierbei wird die Sequenz des Köderproteins „in frame“ an die Aktivierungsdomäne von GAL4 (GAL4-AD) kloniert, die Klonierung der „Beute“ erfolgt „in frame“ an die GAL4 Bindedomäne (GAL4-BD). So können beide Konstrukte in der Hefe als Fusionsproteine mit der GAL4-AD bzw. GAL4-BD exprimiert werden. Kommt es nun zur Interaktion von Köder und Beute, gelangen Aktivierungs- und Bindedomäne in räumliche Nähe, werden somit transkriptionell aktiv und regulieren die Expression des *lac-Z*-Gen. In einer Farbreaktion kann nun das Galaktosederivat X-Gal durch die β -Galaktosidase umgesetzt werden, so daß ein blauer Niederschlag sichtbar wird.

Als Köderkonstrukte wurden jeweils die Sequenz der FERM-Domäne (die ersten 221 As) und der C-Terminus (die letzten 356 As einschließlich der konservierten Aktinbindesequenz, s. Abb. 7) von *erm-1* verwendet. Die Trennung in zwei Konstrukte erwies sich als sinnvoll, da N- und C-Terminus miteinander interagieren können und so die Identifizierung anderer Interaktionspartner nicht möglich wäre (Nix et al., 2000). Als Beute diente eine embryonale cDNA-Bibliothek, die das gesamte *C. elegans* Genom umfaßt (Zheng Zhou, Labor Dr. Horvitz).

Insgesamt wurden pro Köderkonstrukt etwa 3×10^6 Klone der embryonalen cDNA-Bibliothek auf eine Interaktion mit ERM-1 getestet (s. M&M). Es konnten 32 verschiedene Gene als Bindungspartner von ERM-1 identifiziert werden (Tab. 1, 2). Die Durchmusterung der Bücherei mit dem N-Terminus resultierte in 19 verschiedenen Genen, hiervon waren 8 nicht im Leseraster. Mit dem C-Terminus wurden 13 verschiedene Gene gefunden, wobei 5 Gene nicht im Leseraster waren

Es stellt sich die Frage, ob ein Zusammenhang zwischen den gefundenen Genen und *erm-1* besteht. Hinweise kann der Verlustphänotyp eines Genes über dessen mögliche Funktion geben. Um die Gene daraufhin zu analysieren, wurde mittels RNAi die Genfunktion ausgeschaltet und die resultierenden Embryonen mit verschiedenen Markern des Darmepithels gefärbt. Im nachfolgenden wurden nur Gene berücksichtigt, die sich im Leseraster befinden.

Von insgesamt 32 identifizierten Genen wurden 18 Gene auf ihren RNAi-Phänotypen hin analysiert. 12 der Gene weisen keinen Funktionsverlustphänotypen auf. Die weiteren Gene zeigen ein Spektrum an Phänotypen, wie langsames Wachstum, larvale Letalität, Arrest in frühen und späten Morphogenesestadien oder frühe Zytokinesedefekte (Tab. 1, 2). Die letalen RNAi-Tiere wurden gegen die AJ-Marker AJM-1 oder DLG-1 und gegen die apikalen Marker ERM-1 oder IFB-2 gefärbt. Bei nahezu allen untersuchten RNAi-Tieren zeigt sich jedoch weder eine Veränderung im AJ-Muster (Abb. 29A, B, D, E), noch sind die apikalen Marker ERM-1 oder IFB-2 fehlverteilt (Tab. 3). Eine Ausnahme bildet *ubq-1(RNAi)* (Abb. 29C, Stringham et al., 1992). Hier erscheint das sonst diagonale Muster der AJ unstrukturiert, welches für eine fehlerhafte Anordnung der Darmzellen sprechen könnte. Allerdings ist die apikale ERM-1-Lokalisation unbeeinträchtigt.

Es stellt sich die Frage, warum es nicht möglich war, den *erm-1(RNAi)*-Phänotyp zu reproduzieren. Bisher wurden generell nur wenige Gene identifiziert, die wichtig für die Ausbildung der AJ sind, dies wären AJM-1, DLG-1 und LET-413 (s. Einleitung). So wurde auch in einem H2H-Screen mit DLG-1 als Köder kein Gen gefunden, welches nach Funktionsverlust den *dlg-1(RNAi)*-Phänotyp reproduziert (M. Hoffmann, persönl. Mitteilung). Um dennoch einen Zusammenhang zu ERM-1 zu finden, besteht die Möglichkeit, entsprechende Genfunktionen postembryonal via RNAi zu eliminieren und resultierende Defekte zu analysieren oder in Doppelknockouts nach genetischen Interaktionen von ERM-1 und den isolierten Proteinen zu suchen.

Cosmid	Gefunden	Frame	Gen	LG	RNAi Phänotyp	Domänen (SMART)	Homologien/Bemerkungen
F56D12.5A	10	in	<i>vig-1</i>	II	WT	Hyaluronan/mRNA-Bindung	Hyaluronan/mRNA-Bindung Familie
Y106G6H.14	2	out	-	I	WT	SH3, Ankyrin-repeat	-
ZC101.2b	2	out	<i>unc-52</i>	II	Pat	LDL-Rezeptor, LamininB, Laminin EGF-like, IGe2, Ig-like	Proteoglykan (Perlecan), Bestandteil der EZM
Y55F3AM.13	1	in	-	IV	WT	-	-
Y111B2A.10a	1	out	-	III	WT	Zinkfinger C2H2	Transkriptionsfaktor
C36b1.4	1	in	<i>pas-4</i>	I	Ste, Emb, Lvl, Gro	Proteasom	Proteasome A-Typ Untereinheit
T05E11.1	4	out	<i>rps-5</i>	IV	Lva	-	Ribosomales Protein
T27A3.1a	1	out	-	I	WT	Coiled-coil, HAP-1	Huntingtin assoziiertes Protein
C06E7.2	1	in	-	IV	WT	-	Ribosomales Protein
W02A11.3	1	out	-	I	WT	Zinkfinger (RING)	Zinkfinger Protein, E3 Ubiquitinligase Aktivität
W09H1.6a	1	in	<i>lec-1</i>	II	WT	Galektin	Lektinähnliches Protein
Y37E11AL.7	1	in	<i>map-1</i>	IV	WT	Peptidase M24	Metallopeptidase
F47G4.2	1	in	-	I	WT	-	Leucinreiches Protein
F31E3.5	1	in	<i>eft-3</i>	III	Lva	-	Elongationsfaktor, exprimiert im larvalen Pharynx, Darm
K10C2.4	1	in	-	X	Gro,Emb	FAA (Fumarylacetoacetat) Hydrolase	FAA Familie, Tyrosinkatabolismus
F57B9.9	1	in	<i>pqn-46</i>	III	WT	-	Homeobox Protein
C46A5.9	1	in	<i>hcf-1</i>	IV	WT	Kelchmotiv, Fibronectin Typ 3	Homologien zum humanen "Host cell Faktor"
C46C2.1	2	out	<i>wnk-1</i>	IV	WT	STYKc (Phosphotransferase)	Tyrosinkinase, Expression in Exkretorischer Zelle
T09A12.4c	1	out	<i>nhr-66</i>	IV	WT	Zinkfinger C4, HOLI (Ligandenbindedomäne von Hormonrezeptoren)	Nuklear Hormonrezeptor Familie

Tab.1: Überblick über die in dem Hefe-Zwei-Hybrid Screen mit dem N-Terminus von ERM-1 als Köder isolierten Kandidaten.

Benutzte Abkürzungen: LG (Linakge Group, Chromosom), SMART (Simple Modular Architecture Research Tool, Domänensuchprogramm: <http://smart.embl-heidelberg.de>), Pat (Paralysed at twofold, Arrest im Zweifachstadium), Ste (Steril), Emb (Embryonal letal), Lvl (Larval letal), Gro (Growth defect, verzögertes Wachstum), Lva (Larvaler Arrest), EZM (Extrazelluläre Matrix)

Cosmid	Gefunden	Frame	Gen	LG	RNAi-Phänotyp	Domänen (SMART)	Homologien/Bemerkungen
F25B5.4a/c	1	in	<i>ubq-1</i>	III	Lva, Lvl, Emb	UBQ (Ubiquitin)	Proteolyse, Ubiquitäre Expression
Y39A3CL.5	1	in	<i>clp-4</i>	III	WT	CysPC/Peptidase, Calpain	Proteolyse
T05E11.1	2	out	<i>rps-5</i>	IV	Lva	-	Ribosomales Protein S5
B0222.6	1	in	<i>col-144</i>	V	WT	N-terminale Domäne des Nematoden Küticulakollagen, Kollagen Triplehelix-Motiv	EZM Komponente
F45B8.4	1	out	<i>pag-3</i>	X	WT	Zinkfinger	Transkriptionsfaktor
ZK1055.7	1	in	-	V	WT	-	-
C13B9.3	1	in	-	III	Ste, Lvl, Emb	Adaptor Komplex Medium Untereinheit	Medium Untereinheit des Clathrin-Adapter-Komplexes
K12H4.2	1	out	-	III	WT	-	Uncharakterisiertes, konserviertes Protein
K05B2.3	1	in	<i>ifa-4</i>	X	WT	Filament, Filament tail	Intermediärfilament, exprimiert in exkretorischer Zelle
M142.2	1	out	<i>cut-6</i>	III	WT	ZP-Domain, von Willebrandt-Factor	Expression in Hypodermis und Kutikula
C32D5.9	1	out	<i>lgg-1</i>	II	WT	MAP-1_LC3	Mikrotubuli assoziiertes Protein, Mitglied der LC3, GABARAP and GATE-16 Genfamilie
ZK1098.5	1	in	-	III	WT	-	Homologien zu BET-3 (Vesikeltransport)
C29E4.3a	1	in	<i>ran-2</i>	III	Ste, Emb	LRR (Leuzinreicher "Repeat")	Die GTPase RAN-1 aktivierendes Protein (GAP)

Tab.2: Überblick über die in dem Hefe-Zwei-Hybrid-Screen mit dem C-Terminus von ERM-1 als Köder isolierten Kandidaten.

Benutzte Abkürzungen: LG (Linakge Group, Chromosom), SMART (Simple Modular Architecture Research Tool, Domänensuchprogramm: <http://smart.embl-heidelberg.de>), Pat (Paralyzed at twofold, Arrest im Zweifachstadium), Ste (Steril), Emb (Embryonal letal), Lvl (Larval letal), Lva (Larvaler Arrest), EZM (Extrazelluläre Matrix)

Cosmid	Gen	RNAi-Experiment	DIK-Analyse	IF-Analyse	
				Antikörper	Ergebnisse
F56D12.5A	<i>vig-1</i>	WT	-	-	-
Y55F3AM.13	-	WT	-	-	-
C36b1.4	<i>pas-4</i>	Arrest im Pflaumestadium, Larvale Letalität (L1)	-	α ERM-1, α AJM-1	Normale Erm-1 Lokalisation, normales AJ-Muster
W09H1.6a	<i>lec-1</i>	WT	-	-	-
F47G4.2	-	WT	-	-	-
Y37E11AL.7	<i>map-1</i>	WT	-	-	-
F31E3.5	<i>eft-3</i>	Larval Letalität (L1), verzögertes Wachstum	-	α ERM-1, α AJM-1	Normale Erm-1 Lokalisation, normales AJ-Muster
K10C2.4	-	Verzögertes Wachstum	-	-	-
F57B9.9	<i>pqn-46</i>	WT	-	-	-
C46A5.9	<i>hcf-1</i>	WT	-	-	-
F25B5.4a/c	<i>ubq-1</i>	Embryonale Letalität	Zytokinesedefekte, Arrest im Pflaume- und Schlingestadium	α ERM-1, α AJM-1	Normale ERM-1 Lokalisation, Disorganisation der AJ
Y39A3CL.5	<i>clp-4</i>	WT	-	-	-
B0222.6	<i>col-144</i>	WT	-	-	-
ZK1055.7	-	WT	-	-	-
C13B9.3	-	Maternale Sterilität, embryonale Letalität	Arrest im Schlingestadium, "ventral closure" Defekt	α DLG-1, α IFB-2	Normale IFB-2 Lokalisation, normales AJ-Muster
K05B2.3	<i>ifa-4</i>	WT	-	-	-
ZK1098.5	-	WT	-	-	-
C29E4.3a	<i>ran-2</i>	Embryonale Letalität	Zytokinesedefekte, Arrest im Schlingestadium	α ERM-1, α AJM-1	Normale ERM-1 Lokalisation, normales AJ-Muster

Tab. 3: Übersicht über die durchgeführten Funktionsverlustanalysen der isolierten Kandidaten des Hefe-Zwei-Hybrid-Screens.

Benutzte Abkürzungen: DIK (Differential-Interferenz-Kontrast), IF (Immunfluoreszenz), AJ ("apical junction").

3.5 Analyse genetischer Interaktionen zwischen *erm-1* und Genen, die in AJ-Integrität involviert sind

Durch die Analyse auf IF-Ebene von *erm-1(RNAi)*-Embryonen konnten Defekte in der AJ-Struktur gezeigt werden. So ist es von Interesse zu untersuchen, ob ein Zusammenhang zwischen *erm-1* und den Genen besteht, die die Ausbildung der AJ beeinflussen. Damit stellt die Analyse von genetischen Interaktionen neben der Analyse von direkten Interaktionen im H2HS eine weitere Möglichkeit dar, die Funktion von ERM-1 besser zu verstehen.

3.5.1 *dlg-1*, *ajm-1* und *let-413* zeigen keine genetische Interaktion mit *erm-1*

Während meiner Diplomarbeit konnte ich bereits zeigen, daß keine genetische Interaktion zwischen *dlg-1* und *erm-1* vorliegt. DLG-1 lokalisiert in der basalen Einheit der AJ und sorgt hier für die korrekte Lokalisation von AJM-1 (Bossinger et al., 2001; Firestein und Rongo, 2001; McMahon et al., 2001). In *dlg-1(RNAi)*-Embryonen ist auf IF-Ebene die Verteilung von AJM-1 in der AJ "punktiert" anstatt einen durchgehenden Gürtel um den Apex der Zellen zu formen, die ERM-1-Lokalisation allerdings bleibt unbeeinflusst. Auch der Doppelknockout beider Proteine zeigt nur die Summe beider Einzelphänotypen. Dies sind eine "punktierte" AJM-1-Lokalisation in Hypodermis und Darm und ein gleichzeitiger Remodellingdefekt der AJ im Darmepithel (van Fürden, 2001). Um die Analyse der für AJ-Integrität wichtigen Proteine zu vervollständigen, sollen auch *ajm-1* und *let-413* ("lethal") in Bezug auf eine genetische Interaktion mit *erm-1* untersucht werden.

AJM-1 und DLG-1 kolokalisieren im basalen Teil der AJ, hier sorgt AJM-1 für die Lokalisation von DLG-1 (Köppen et al., 2001; Segbert et al., 2004). Während in *ajm-1(RNAi)*-Embryonen DLG-1 im Darmepithel neben der Expression in der AJ auch an der lateralen Membrandomäne zu finden ist (Abb. 30B, B'), verhält sich die ERM-1-Lokalisation jedoch wildtypisch (Abb. 30A, A'). Auch ein Doppelknockout von *ajm-1* und *erm-1* resultiert nur in Addition der Einzelphänotypen. Hier zeigt sich eine "verengte" AJ und eine gleichzeitige Expansion von DLG-1 entlang der lateralen Membrandomäne (Abb. 30C, C').

LET-413 lokalisiert basolateral in Hypodermis- und Darmepithelzellen und sorgt während der Morphogenese (Pflaumestadien) für die Lokalisation von DLG-1 und AJM-1 (Köppen et al., 2001; Legouis et al., 2000; Segbert et al., 2004). Die Lokalisation von ERM-1 bleibt hiervon zunächst unberührt (Abb. 31A). In *let-413(RNAi)*-Embryonen ist in der späteren Morphogenese (Schlingestadium) eine basolaterale Expansion von apikalen und AJ-Komponenten im Darmepithel zu beobachten. Dies ist ein Hinweis dafür, daß LET-413 in den Epithelzellen eine Diffusionsgrenze von apikal und basal darstellt (Bossinger et al., 2004; McMahon et al., 2001). Auch das am apikalen Zytokortex der Darmzellen lokalisierte ERM-1 expandiert nach basolateral (Abb. 31C).

In *erm-1/let-413(RNAi)*-Embryonen kann während der frühen Morphogenese zunächst keine DLG-1-Lokalisation detektiert werden (Abb. 31D, D'). Diese verzögerte Lokalisation von DLG-1 und auch AJM-1 wurde ebenso in *let-413(RNAi)*-Embryonen beschrieben (Köppen et al., 2001; Segbert et al., 2004). Die Ausprägung des *erm-1(RNAi)*-Phänotypen wird jedoch zu diesem Zeitpunkt anhand der HMP-1-Lokalisation, auf die *let-413* früh keinen Einfluß hat, sichtbar (Abb. 31G, G'). In späteren Stadien jedoch verschiebt sich die zuvor apikal akkumulierte AJ nach apikolateral (Abb. 31E, E', H, H') und ist schließlich, nicht zu unterscheiden von einem *let-413(RNAi)*-Einzelknockout, an der basolateralen Membrandomäne lokalisiert (Abb. 31F, F', I, I'). Somit führt auch der Doppelknockout von *erm-1* und *let-413* zur Ausprägung beider Phänotypen. Es sei aber darauf hingewiesen, daß die durch den Funktionsverlust von *let-413* verursachte laterale Expansion der apikalen und AJ-Komponenten den *erm-1(RNAi)*-Phänotyp aufhebt.

Diese Ergebnisse zeigen, daß ERM-1 vermutlich unabhängig von den AJ-Komponenten der "basalen Einheit" oder LET-413 wirkt. Von Interesse könnte ein gleichzeitiger Funktionsverlust von *erm-1* und dem α -Catenin *hmp-1* sein, da beide als putative "linker" zum Aktinzytoskelett kodieren (s. Abb. 14 und Costa et al., 1998).

3.6 Die Zell-Zelladhäsion im embryonalen Darmepithel von *C. elegans*

Während der Cadherin-Catenin-Komplex („cadherin-catenin-complex“, CCC) in Organismen wie *Drosophila*, eine herausragende Rolle für die epitheliale Zell-Zelladhäsion und die apikobasale Polarität spielt, konnte ihm in *C. elegans* hierfür nur eine untergeordnete Funktion zugewiesen werden. Obwohl der CCC sowohl in der Hypodermis als auch im Darm lokalisiert (s. Abb. 13E), ist er offensichtlich nur für den ventralen Schluß der Hypodermis von Bedeutung (s. Einleitung, Costa et al., 1998; Larue et al., 1994; Tepass et al., 1996; Uemura et al., 1996). Neuere Studien konnten jedoch einen Zusammenhang von DLG-1 und dem CCC im Darmepithel enthüllen. So konnte in *dlg-1/hmp-1(RNAi)*-Embryonen im Darmepithel eine fragmentierte IFB-2- und AJM-1-Lokalisation beobachtet werden, die wahrscheinlich durch einen Verlust der Zell-Zelladhäsion hervorgerufen wird (Segbert et al., 2004, Abb. 39 I, J). Da auf elektronenmikroskopischer Ebene gezeigt wurde, daß IFB-2 in der „endotube“ lokalisiert und ebenso in der elektronendichten Struktur der AJ zu finden ist, stellt auch IFB-2 neben AJ-Proteinen, wie z.B. AJM-1 oder DLG-1, einen hervorragenden Marker dar, um Zell-Zelladhäsionsdefekte sichtbar zu machen (Bossinger et al., 2004). Um nun zu testen, ob eine genetische Interaktion auch zwischen *erm-1* und *hmp-1* besteht, sollen im nachfolgenden *erm-1/hmp-1(RNAi)*-Embryonen mit IFB-2 und DLG-1 gefärbt und analysiert werden.

3.6.1 *erm-1/hmp-1(RNAi)*-Embryonen zeigen ein fragmentiertes Darmepithel

Der gleichzeitige Verlust der *erm-1*- und *hmp-1*-Genfunktion führt während der frühen Morphogenese (Bohne- und Kommastadium) nur zu einem *erm-1(RNAi)*-Phänotyp, die Integrität des Darmepithels erscheint normal (Abb. 32E, F). Allerdings werden ab dem Kaulquappstadium im anterioren Bereich des Darmepithels erste Zell-Zelladhäsionsdefekte sichtbar, indem hier die AJ nicht mehr aneinanderhaftet (Abb. 32G, Pfeil). Dieses geht mit einem gleichzeitigen Verlust des apikalen Markers IFB-2 einher (Abb. 32H, Pfeilköpfe). Mit fortlaufender Elongation verstärkt sich diese Fragmentierung des Darmepithels noch weiter (Abb. 32I, J, Pfeilköpfe) und es treten sogar vereinzelt Zellen aus dem Epithelverband (Abb. 32I, J, Pfeil). Auch im

Pharynx sind Defekte zu sehen (Abb. 32I, Pfeil). Dieser Phänotyp ähnelt dem Zell-Zelladhäsionsdefekt, der in *dlg-1/hmp-1(RNAi)*-Embryonen zu beobachten ist (Abb. 39A, B). Die gleichen Veränderungen treten jeweils bei Verlust des E-Cadherins HMR-1 (“hammerhead”) und des β -Catenins HMP-2 in Verbindung mit *erm-1(RNAi)* bzw. *dlg-1(RNAi)* auf (Daten nicht gezeigt und Segbert et al., 2004). Da in *hmp-1(RNAi)*-Embryonen eine normale DLG-1- und ERM-1-Lokalisation zu beobachten ist, hat der CCC alleine keinen Einfluß auf die Integrität des Darmepithels (Abb. 32A, B). Somit kann eine redundante Funktion von ERM-1 und dem CCC in Bezug auf die Zell-Zelladhäsion des Darmepithels postuliert werden (s. Diskussion). Zell-Zelladhäsion wird generell durch die Anbindung an das Aktinzytoskelett stabilisiert (Jaffe et al., 1990; Rimm et al., 1995). Somit könnte die Fragmentierung des Darmes in *erm-1/hmp-1(RNAi)*-Embryonen durch eine Disorganisation oder Verminderung des Aktinzytoskeletts hervorgerufen werden. Für ERM-1 wurde gezeigt, daß es wichtig für das apikale Aktinzytoskelett im Darmepithel ist (s. Abb. 14). Da für HMP-1 bisher nur in der Hypodermis beschrieben wurde, daß es von Bedeutung ist, um Aktinfilamente zu bündeln (Costa et al., 1998; Raich et al., 1999), stellt sich die Frage, wie die Akkumulation von F-Aktin sich im apikalen Kortex der Darmzellen verhält. Hierfür wurden *hmp-1(RNAi)*-Embryonen mit fluoreszierendem Phalloidin gefärbt und ausgewertet. Während in WT-Embryonen zu Beginn der Morphogenese (Bohnestadium) eine apikale Anreicherung von F-Aktin in den Darmzellen zu sehen ist (Abb. 33A), fehlt diese in *hmp-1(RNA)*-Embryonen (Abb. 33B). Diese Verminderung der apikalen F-Aktin kann auch während der späteren Morphogenese beobachtet werden (vgl. Abb. 33C-F). Dies ist ein Hinweis auf ein gestörtes Aktinzytoskelett, welches in ähnlicher Form auch in *erm-1(RNAi)*-Embryonen zu finden ist. So kann vermutet werden, daß die Anbindung an das Aktinzytoskelett ein wichtiges Kriterium für die Zell-Zelladhäsion im *C. elegans* Darmepithel darstellt (s. Diskussion).

3.6.2 Die Rolle von LAD-1 während der Entwicklung des embryonalen Darmepithels

Da der DAC und der CCC offensichtlich gemeinsam für die Zell-Zelladhäsion der Darmepithelzellen verantwortlich sind (Segbert et al., 2004) und auch für ERM-1 und den CCC eine entsprechende redundante Funktion postuliert werden kann, stellt sich die Frage, ob DLG-1 bzw. ERM-1 zusätzliche Transmembranproteine stabilisieren,

die redundant zum CCC wirken und adhäsive Funktionen übernehmen. In der Literatur finden sich L1CAMs (“cell adhesion molecule”), Transmembranmoleküle, die über Ca^{2+} -unabhängige, homo- oder heterophile Interaktion Zell-Zelladhäsion vermitteln und zur Superfamilie der Immunglobulin(IG)-Proteine gehören (Hutter et al., 2000; Vogel et al., 2003). Sie können sowohl mit ERM-Proteinen als auch mit DLG-1-Homologen wechselwirken (Dickson et al., 2002; Wei et al., 2004).

Ein L1CAM-Homolog in *C.elegans* ist LAD-1 (“L1 like adhesion”), welches eine mögliche Rolle für die Zell-Zelladhäsion spielt. So wurden durch Überexpression eines dominant negativen LAD-1-Konstruktes Adhäsionsdefekte in der Gonade beschrieben, u.a. verlieren hier die Oozyten den Kontakt zueinander und weisen veränderte Formen und Größen auf. Ferner konnten in einem *lad-1*-mutanten Hintergrund, durch einen Adhäsionsverlust verursacht, falsch positionierte Neuronen beobachtet werden. Außerdem wurde eine defekte Anheftung der Körpermuskulatur an die Hypodermis beschrieben (Chen et al., 2001; Wang et al., 2005). Somit stellt LAD-1 einen möglichen Kandidaten dar, der auch an der Zell-Zelladhäsion im Darmepithel beteiligt sein kann.

3.6.2.1 Die Lokalisation von phosphoryliertem LAD-1 im Embryo ist abhängig von DLG-1

LAD-1 lokalisiert kortikal, wobei es, ähnlich zu ERM-1 (s. Abb. 8) auch im Kortex der Darmzellen anzutreffen ist (Abb. 34C, C'). Es interagiert mit Ankyrin und ist so an das Spektrin-Aktinzytoskelett gekoppelt. Durch die Phosphorylierung des konservierten Ankyrin-Bindemotivs (FIGQY) wird die Anbindung an Ankyrin unterbunden und LAD-1 gelangt in die AJ, wo es mit AJM-1 und somit wahrscheinlich mit DLG-1 kolokalisiert (Abb. 34A-B', Chen et al., 2001).

Durch den Verlust von *dlg-1* ist die Verteilung von AJM-1 entlang des Zellapex gestört, es entsteht ein “punktiertes” Muster (s. oben). Auch die Lokalisation von LAD-1 ist “gespottet” (Abb. 34D, D'). Da AJM-1 für die korrekte Lokalisation von DLG-1 verantwortlich ist, könnte es somit auch indirekt LAD-1 beeinflussen. Tatsächlich zeigen *ajm-1(RNAi)*-Embryonen eine stark verminderte Expression von LAD-1 (Abb. 34E, E'). In *erm-1(RNAi)*-Embryonen spiegelt die Verteilung von LAD-1 den Remodellingdefekt der AJ wieder (Abb. 34F, F', Pfeilkopf). In *dlg-1(RNAi)* und *erm-1(RNAi)*-Embryonen konnten jedoch keine Unterschiede in der Expression des nichtphosphorylierten LAD-1 beobachtet werden (Daten nicht

gezeigt). Somit bleibt zu prüfen, ob kortikales LAD-1 von DLG-1 bzw. ERM-1 abhängig ist.

LAD-1 besitzt am C-Terminus ein konserviertes PDZ(PSD-95, Discs Large, ZO-1)-Bindemotiv (-STEV), an das DLG-1 binden könnte. DLG-1 besitzt 3 PDZ-Domänen, die wichtig für Protein-Protein Interaktionen sind. Außerdem findet sich hier ein konserviertes RSLE-Motiv für die Bindung an FERM-1-Domänen, wie sie ERM-1 besitzt (Abb. 35E). Deshalb wurde im H2HS (s. 3.3) eine mögliche Interaktion von LAD-1 mit DLG-1 bzw. ERM-1 getestet.

Hierzu wurden jeweils die Sequenz des N-Terminus von *erm-1* (s. 3.3) und ein Bereich von *dlg-1*, der die drei PDZ-Domänen umfaßt (freundlicherweise von M. Hoffmann zur Verfügung gestellt) „in frame“ in das „Köderplasmid“ und der zytosolische Bereich von *lad-1* „in frame“ in das „Beuteplasmid“ kloniert (s. M&M). Es konnte eine Interaktion von DLG-1 und LAD-1 nachgewiesen werden, die mit Konstrukten der einzelnen PDZ-Domänen (freundlicherweise von M. Hoffmann zur Verfügung gestellt) auf die zweite PDZ-Domäne bestimmt wurde (Abb. 35A). Eine Interaktion mit ERM-1 bleibt, zumindestens im H2HS, aus.

3.6.2.2 Molekulare Analyse von *lad-1(ok1244)*

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Funktionsverlustphänotyp von *lad-1* mittels der Mutante *lad-1(ok1244)* analysiert, da sich die Genfunktion von *lad-1* über RNAi nicht herunterregulieren läßt (Chen et al., 2001). Diese Mutante wurde von dem OMRF (Oklahoma Medical Research Foundation) Knockout Projekt hergestellt und über das CGC (Caenorhabditis Genetic Center, Minneapolis) verteilt.

Auf genomischer Ebene fehlt in *lad-1(ok1244)* ein etwa 1200 Bp großes Fragment. Da allerdings nicht klar ist, welche Auswirkungen diese Deletion auf die gespleißte Sequenz und somit auf das Protein hat, wurde durch eine RT(Reverse Transkription)-PCR-Reaktion (s. M&M) die gespleißte Sequenz ermittelt und mit der durch den Genefinder (Favello et al., 1995) vorhergesagten Sequenz verglichen. Die *lad-1*-Sequenz besteht aus 14 Exons. In *lad-1(ok1244)* ist Exon 9 deletiert (Abb. 35B). Hierbei handelt es sich um eine “out of frame” Deletion, die das Leseraster verändert und zu einem vorzeitigen Stoppkodon führt (s. auch Anhang). Das korrelierende Protein ist somit wahrscheinlich nur 550 Bp anstatt 1144 Bp groß (vgl. Abb. 35E, F). LAD-1 besitzt einen großen extrazellulären Bereich mit 4 Immunglobulin(IG)-ähnlichen Domänen (IGc2) und 5 Fibronektin(FN)-Domänen (FN3) und eine

Transmembrandomäne. In der intrazellulären Sequenz findet sich das konservierte Ankyrin-Bindemotiv (FIGQY). Das vorhergesagte Protein der *lad-1(ok1244)*-Mutante besitzt nur die ersten 4 IG-Domänen, der zytosolische Bereich fehlt (Abb. 35D, F).

Um zu testen, ob lediglich ein trunkiertes Protein gebildet wird, wurden *lad-1(ok1244)*-Embryonen gegen LAD-1 gefärbt. Hierbei wurden 2 unterschiedliche Antikörper benutzt (freundlicherweise von L. Chen zur Verfügung gestellt). Mit dem ersten Antikörper, der die nicht-phosphorylierte Form von LAD-1 erkennt (α -LAD-1 6993), fällt die Färbung von *lad-1(ok244)*-Embryonen negativ aus (Abb. 36B). Dagegen ist mit einem Antikörper gegen die phosphorylierte Form von LAD-1 (α -LAD-1 1163) sehr wohl noch eine Expression des Proteins in der Mutante nachzuweisen (Abb. 36C). Dieses deutet darauf hin, daß in der Mutante immer noch ein Teil des LAD-1-Proteins hergestellt wird.

3.6.2.3 LAD-1 beeinflusst zusammen mit dem Cadherin-Catenin-Komplex die Integrität des Darmepithels

Um zu testen, ob LAD-1 für die Zell-Zelladhäsion im embryonalen Darmepithel verantwortlich ist, wurden *lad-1(ok1244)*-Embryonen mit verschiedenen molekularen Markern des Darmepithels gefärbt und auch auf genetische Interaktion mit *dlg-1*, *erm-1* und dem CCC analysiert.

lad-1(ok1244)-Tiere sind lebensfähig und fertil. Auf IF-Ebene zeigen *lad-1(ok1244)*-Embryonen eine normale Verteilung von AJ-Komponenten, wie z.B. DLG-1 (Abb. 37A), und auch die ERM-1-Lokalisation ist wildtypisch (Abb. 37B). Weiterhin resultiert RNAi von *erm-1* bzw. *dlg-1* an *lad-1(ok1244)* nur in Ausprägung der einzelnen *erm-1*- bzw. *dlg-1(RNAi)*-Phänotypen (Abb. 37C, D). In *lad-1(ok1244)/hmp-1(RNAi)*-Embryonen ist schließlich eine fragmentierte AJ zu beobachten, die gleichzeitig mit einem Verlust von IFB-2 einhergeht (Abb. 37E-H). Diese Zell-Zelladhäsionsdefekte sind zunächst im anterioren Bereich des Darmes zu beobachten (Abb. 37E, F, Kaulquappstadium, Pfeilkopf), während sie sich in der späten Morphogenese entlang der anterior-posterioren Achse des Darmes ausdehnen (Abb. 37G, H, Pflaumestadium, Pfeiköpfe). Auch im Pharynx können entsprechende Adhäsionsverluste beobachtet werden (Abb. 37E, Pfeil, Pfeilkopf). Teilweise ist auch zu sehen, daß Zellen aus dem Epithelverband treten (Abb. 37F, H, Pfeile). Dieser Phänotyp ist identisch zu dem *erm-1/hmp-1(RNAi)*- und *dlg-1/hmp-1(RNAi)*-Phänotyp (s. Abb. 32, 39). So lassen diese Ergebnisse vermuten, daß auch LAD-1 in Bezug auf

die Zell-Zelladhäsion im Darmepithel redundant zum CCC wirkt, da ebenso in einem Doppelknockout von *hmr-1* bzw. *hmp-2* zusammen mit *lad-1(ok1244)* ein entsprechender Phänotyp reproduziert werden kann (Abb. 38, s. Diskussion).

Da phosphoryliertes LAD-1 von DLG-1 stabilisiert wird, stellt sich die Frage, ob speziell diese phosphorylierte Form für die Zell-Zelladhäsion im Darmepithel von Bedeutung ist. Es wurde gezeigt, daß EGL-15, eine FGF(“fibroblast growth factor”)-Rezeptor-Tyrosinkinase, für die Phosphorylierung von LAD-1 verantwortlich ist, so kann in *egl-15(n1456)* Mutanten auch keine LAD-1P-Lokalisation mehr nachgewiesen werden (Abb. 36A, Chen et al., 2001; Szewczyk und Jacobson, 2003). In *egl-15(n1456)/hmp-1(RNAi)*-Embryonen (Abb. 38G, H) tritt ein starker Zell-Zelladhäsionsverlust auf. Es sind aus dem Epithelverband gelöste und abgerundete Zellen zu erkennen (Abb. 38H, Pfeilkopf). In *egl-15(n1456)*-Embryonen tritt dieser Phänotyp nicht auf (persönl. Mitteilung, M. Hoffmann). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß die phosphorylierte Form von LAD-1 eine zum CCC redundante Funktion für die Ausbildung der Zell-Zelladhäsion besitzt (s. Diskussion).

3.6.3 *erm-1/dlg-1/hmp-1(RNAi)*- und *lad-1(ok1244)/dlg-1/hmp-1(RNAi)*-Embryonen zeigen eine verstärkte Fragmentierung des embryonalen Darmepithel

Um zu prüfen, wie DLG-1, ERM-1 und LAD-1 in Zusammenhang mit dem CCC Zell-Zelladhäsion vermitteln, ist es von Interesse, die einzelnen Genfunktionen in verschiedenen Dreifachknockouts auszuschalten und nach Verstärkungen des jeweiligen Funktionsverlustphänotypen zu suchen (s. Tab.4).

Während in einem Dreifachknockout, wie in den entsprechenden Zweifachknockouts, von *erm-1*, *dlg-1* und *hmp-1* in der frühen Morphogenese keine Defekte auftreten (Kaulquappstadium, Abb. 40A), sind jedoch im Verlauf der Elongation verstärkte Zell-Zelladhäsionsdefekte zu beobachten (s. oben). Ein gleichzeitiger Funktionsverlust von *lad-1*, *erm-1* und *hmp-1* führt ebenfalls in der frühen Morphogenese zu geringen Defekten (Kommastadium, Abb. 40C) und im Verlauf der Morphogenese entsteht nur eine Fragmentierung des Darmes, die dem Phänotyp der entsprechenden Zweifachknockouts ähnelt (Abb. 40D). Im Gegensatz dazu zeigt der gleichzeitige Verlust von *lad-1*, *dlg-1* und *hmp-1* bereits ab der frühen Morphogenese (Kommastadium, Abb.40E) eine Fragmentierung des apikalen Pols.

So kann anhand dieser Ergebnisse vermutet werden, daß mehrere parallele Wege existieren, um Zell-Zelladhäsion zu vermitteln wobei der CCC eine zentrale Funktion einnimmt. Da *lad-1(ok1244)/dlg-1/hmp-1(RNAi)* einen stärkeren Phänotyp hervorruft als *lad-1(ok1244)/erm-1/hmp-1(RNAi)*, könnte außerdem ein gemeinsamer “pathway” von *erm-1* und *lad-1* (im Zusammenhang mit *hmp-1*) vermutet werden (s. Diskussion).

Funktionsverlust von	Zelladhäsionsverlust im Bohne/Kommastadium	Zelladhäsionsverlust im Pflaumestadium
ERM-1 und CCC	—	+
DLG-1 und CCC	—	+
LAD-1 und HMP-1	—	+
LAD-1 und HMP-2	—	—
LAD-1 und HMR-1	—	—
EGL-15 und HMP-1	—	+
ERM-1 und DLG-1	—	—
LAD-1 und DLG-1	—	—
LAD-1 und ERM-1	—	—
ERM-1, DLG-1 und HMP-1	—	++
LAD-1, ERM-1 und HMP-1	—	++
LAD-1, DLG-1 und HMP-1	+	++

Tab. 4: Überblick über die Zell-Zelladhäsionsverlust-Phänotypen in verschiedenen genetischen Hintergründen.

Dargestellt ist die Ausprägung des Zelladhäsionsverlust bei Funktionsverlust der entsprechenden Proteine in frühen und späteren Stadien der Morphogenese. — kein Adhäsionsverlust, + Adhäsionsverlust, ++ starker Adhäsionsverlust. Benutzte Abkürzungen: CCC („cadherin-catenin-complex“, HMR-1, HMP-2 und HMR-1).

4 Diskussion

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde zunächst versucht, den Prozeß der Lumenbildung und das damit verbundene “apical junction”(AJ)-Remodelling im embryonalen Darmepithel von *C. elegans* besser zu verstehen. Außerdem konnte gezeigt werden, daß die Zell-Zelladhäsion im embryonalen Darmepithel von *C. elegans* durch redundante Mechanismen kontrolliert wird, wobei der Cadherin-Catenin-Komplex (“cadherin-catenin-complex”, CCC) eine zentrale Funktion einnimmt. Im nachfolgenden sollen nun beide Prozesse diskutiert werden.

4.1 Lumenbildung und AJ-Remodelling im embryonalen Darmepithel von *C. elegans*

ERM-1, ein Mitglied der Ezrin-Radixin-Moesin(ERM)-Proteinfamilie, zeigt nach Funktionsverlust Defekte im Remodelling der AJ von apikal nach apikolateral, so daß die AJ entweder vollständig apikal verbleibt oder nur unvollständig an die apikolaterale Membrandomäne gelangt. Dies führt zu Verschlüssen oder Verengungen des Darmlumens. Um einen tieferen Einblick in den Vorgang des AJ-Remodelling zu bekommen, wurden weitere Komponenten analysiert, die Einfluß auf diesen Mechanismus haben könnten.

4.1.1 Stabilisation des apikalen F-Aktinzytokortex des Darmepithels durch ERM-1

Die Expression von ERM-1 ist mit dem Zellkortex der meisten Zellen assoziiert. Während der ersten Zellteilungen akkumuliert ERM-1 am Zellkortex angrenzender Plasmamembranen (Abb. 8). Trotz dieser frühen Lokalisation konnten weder Defekte in Bezug auf die Zytokinese noch für die Polarität der Zellteilungen in *erm-1(RNAi)*-Embryonen beobachtet werden. Eine Erklärung wäre eine redundante Funktion von FERM(“band four one”, Ezrin, Radixin, Moesin)-Domänen Proteinen. In *C. elegans* gibt es neben ERM-1 noch 15 weitere FERM-Domänen Proteine. Während meiner Diplomarbeit konnte ich jedoch zeigen, daß diese keine Redundanz in Bezug auf eine Funktion von ERM-1 zeigen (van Fürden, 2001).

In der Morphogenese wird ERM-1 apikal in Epithelien, wie Hypodermis, Pharynx und Darm, angereichert (Abb. 8). ERM-1 kolokalisiert deutlich mit F-Aktin und dem

Intermediärfilament IFB-2, eine Überlappung mit der AJ konnte nicht gezeigt werden (Abb.8). Während Färbungen mit Immunogold auf elektronenmikroskopischer Ebene gezeigt haben, daß IFB-2 in der "endotube", ein Bestandteil des terminales Netzwerks, das in dieser Form nur bei Nematoden zu finden ist, und auch in der elektronendichten Struktur der AJ lokalisiert (Bossinger et al., 2004; Munn und Greenwood, 1983), muß die genaue Lokalisation von ERM-1 noch spezifiziert werden. Da ERM-Proteine generell mit Mikrovilli assoziiert sind (Bonilha et al., 1999; Hanzel et al., 1991; Yonemura und Tsukita, 1999), kann nicht ausgeschlossen werden, daß in *C.elegans* auch ERM-1 dort lokalisiert.

Der primäre Defekt, der in *erm-1(RNAi)*-Embryonen beobachtet werden kann, ist der Verlust der Aktin-Akkumulation im apikalen Zellkortex der Darmepithelzellen (Abb.14). ERM-1 wird vielleicht benötigt, um Aktinfilamente zu bündeln, wie die Untersuchungen für *Drosophila* Moesin in den Nährzellen der Oozyte nahelegen (Polesello et al., 2002).

Die Verminderung des F-Aktins führt zu einem defekten AJ-Muster, der Transport von AJ-Molekülen an die apikale Membrandomäne ist aber vermutlich intakt (Abb. 13, 15). Wahrscheinlich ist ERM-1 für die korrekte Organisation von F-Aktin und damit dafür verantwortlich, daß der apikale F-Aktinzytokortex und damit die "endotube" korrekt ausgebildet werden. Dadurch ist der Prozeß des AJ-Remodelling in *erm-1(RNAi)*-Embryonen blockiert oder vorzeitig arretiert (Abb. 13, 15).

Die generelle Ausbildung der AJ bleibt durch ERM-1 jedoch unbeeinflusst, da auf Immunfluoreszenz(IF)-Ebene keine genetische Interaktion von *erm-1* und Genen, die wichtig für die Ausbildung der AJ sind, besteht (Abb. 30, 31). Außerdem konnte gezeigt werden, daß in *erm-1(RNAi)*-Embryonen die elektronendichte Struktur der AJ vorhanden ist (Göbel et al., 2004).

ACT-5 ist das einzige Aktinprotein, welches ausschließlich im Darm exprimiert wird (MacQueen et al., 2005; Schriefer et al., 1995). In *act-5(RNAi)*-Embryonen kann während der späten Morphogenese eine Verminderung der Aktinanreicherung im apikalen Zytokortex des Darmepithels beobachtet werden (Abb. 26). Diese ist auch in *erm-1(RNAi)*-Embryonen zu sehen, tritt allerdings schon in der frühen Morphogenese auf (Abb. 14). Daß der Verlust von *act-5* zu einer veränderten apikalen Aktinorganisation des Darmepithels führt, konnte bereits in anderen Studien gezeigt werden. So wurde in *act-5(RNAi)*-Embryonen eine Reduktion der Darmmikrovilli beschrieben (MacQueen et al., 2005). Auf IF-Ebene kann im Darmepithel von *act-*

5(*RNAi*)-Embryonen eine nur unvollständig separierte AJ beobachtet werden (Abb. 25). Dieses erinnert an den AJ-Phänotypen in *erm-1(RNAi)*-Embryonen (Abb. 13), allerdings ist im Gegensatz zu *erm-1(RNAi)*-Embryonen keine vollständig apikal verbleibende AJ zu sehen. Da ein Doppelknockout von *erm-1* und *act-5* zu keiner Verstärkung des Defekts in der AJ-Remodelling führt (Abb. 25), kann vermutet werden, daß beide in einem "pathway" wirken und ACT-5 somit von ERM-1 stabilisiert wird. Da es in *C. elegans* 12 Aktinproteine bzw. Aktin-ähnliche Proteine gibt (www.wormbase.org), kann so auch eine redundante Funktion von Aktinproteinen vermutet werden.

4.1.2 Die Ausbildung der apikalen Membrandomäne im Darmepithel führt nicht zum Remodelling der AJ

Während der epithelialen Polarisierung des Darmepithels akkumulieren die Moleküle der AJ am zukünftigen apikalen Pol gegenüberliegender Darmzellen. Hier könnten Zell-Zelladhäsionsmoleküle, wie die E-Cadherine, über homophile Interaktion eine Adhäsion über das zukünftige Darmlumen bewerkstelligen. Während der Ausbildung des Darmlumens gelangt die AJ nach apikolateral, wo sie das Darmlumen umgrenzt. In *erm-1(RNAi)*-Embryonen könnten diese Adhäsionsmoleküle weiterhin über das zukünftige Lumen in Kontakt stehen und somit die Lumendefekte verursachen (Abb. 41).

Die Morphogenese eines Lumens erfordert die Ausbildung und Expansion der apikalen Membrandomäne (Lubarsky und Krasnow, 2003; Mostov et al., 2003; Paul und Beitel, 2005). In MDCK-Zellen konnte gezeigt werden, daß zytoplasmatische Vesikel an der Region des Zellkontakts verschmelzen und so die apikale Membran und einen luminalen Raum zwischen Zellen bilden. Auch das exkretorische System von *C.elegans* und die primären Tracheen von *Drosophila* bilden sich so aus (Beitel und Krasnow, 2000; Buechner, 2002; Vega-Salas et al., 1988). Da ebenfalls eine große Anzahl an apikalen Vesikeln in elektronenmikroskopischen Schnitten des *C. elegans* Darmepithels beobachtet wurde (Leung et al., 1999), könnte ein entsprechender Mechanismus auch bei der Ausbildung des *C. elegans* Darmlumens postuliert werden.

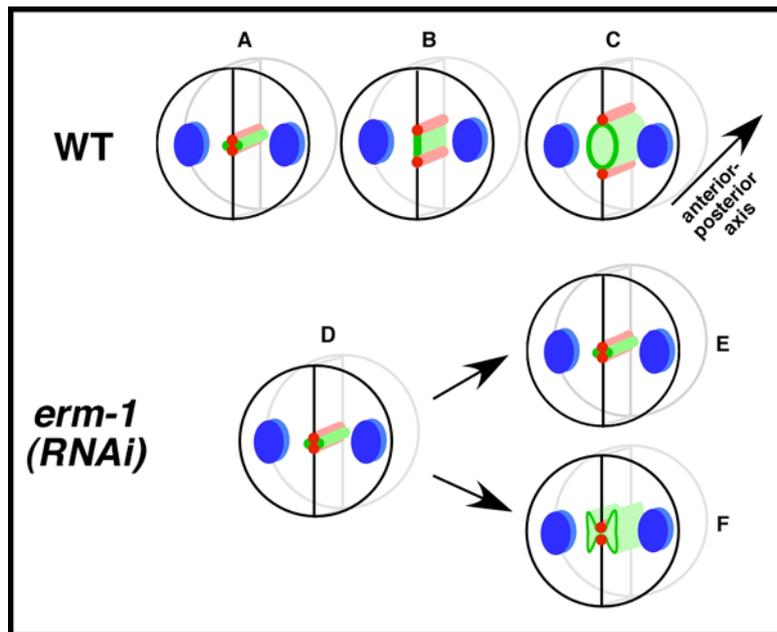


Abb. 41: Schematisches Modell des Remodelling der “apical junction” (AJ) während der Lumenbildung im Darmepithel von WT- und *erm-1(RNAi)*-Embryonen.

Dargestellt ist ein Querschnitt von zwei gegenüberliegenden Zellen. (A) Während der Ausbildung der apiko-basalen Polarität werden AJ-Komponenten und Proteine der apikalen Membrandomäne am zukünftigen apikalen Pol des Darmepithels angereichert. (B) Im Verlauf der Morphogenese expandiert der apikale Pol und die AJ-Komponenten gelangen nach apikolateral. (C) Schließlich formt sich ein Lumen, welches durch zusätzliches Wachstum der apikalen Membran vergrößert wird. (D-F) Der Funktionsverlust von ERM-1 führt jedoch dazu, daß AJ-Komponenten apikal verbleiben und die Ausbildung eines Lumens verhindern. (E) Oder die AJ-Komponenten führen zur Einengung des Darmlumens, ohne daß die Expansion der apikalen Membrandomäne betroffen ist (vgl. Abb. 15).

Die relative Position der AJ würde so als sekundärer Effekt mit der expandierenden apikalen Membrandomäne nach apikolateral gelangen. ERM-1 könnte über die Stabilisierung des Aktinzytoskeletts für die Anlieferung der Vesikel sorgen. Es konnte jedoch gezeigt werden, daß die generelle Ausbildung der apikalen Membrandomäne nicht gestört ist (Abb. 15). Vielmehr kann ein alternativer Mechanismus postuliert werden, wie die AJ nach apikolateral gelangt.

4.1.3 Das Aktin-Myosinnetzwerk und die Medium-Ketten des Clathrin-Adapter-Komplex bewirken nur bedingt AJ-Remodelling

Dieser Mechanismus basiert auf der Analyse der Ausbildung des Zell-Zellkontakts in MDCK-Zellen (Adams et al., 1998). *In vivo* Videoaufnahmen mit einem GFP(Grün

fluoreszierendes Protein)-fusionierten E-Cadherin konnten zeigen, daß dieses dynamisch relokalisiert wird. Zunächst lokalisiert E-Cadherin in “puncta” an der initialen Kontaktzone zweier MDCK-Zellen. Über Catenine bindet es an das Aktinzytoskelett, welches dadurch stabilisiert wird. Schließlich wird durch eine Kontraktion von Aktin zusammen mit Myosin II die Umlagerung von E-Cadherin an die Enden des Zellkontakts bewerkstelligt. In *C. elegans* könnte ERM-1 als “linker” zum Aktinzytoskelett für eine Umlagerung der AJ sorgen (Abb. 42).

Auch in *Drosophila* ist ein entsprechendes Myosin-abhängiges Remodelling von E-Cadherin bekannt (Pilot und Lecuit, 2005). Während der Keimstreifenausstreckung, der Elongation des Embryos, kommt es zur Interkalation von wandernden Zellen. E-Cadherin wird wahrscheinlich hierbei durch eine lokale Aktin-Myosinkontraktion dynamisch relokalisiert. Es wurde aber auch postuliert, daß Aktinfilamente durch Myosin gebündelt werden und so zur polarisierten Endozytose von E-Cadherin führen. Weiterhin konnte gezeigt werden, daß neben Myosin II auch die Rho-Kinase Rok wichtig für diesen Prozeß ist, indem sie Myosin II phosphoryliert und damit aktiviert (Bertet et al., 2004; Winter et al., 2001; Zallen und Wieschaus, 2004). Da auch in *C. elegans* die Komponenten des Aktin-Myosinkontraktion konserviert sind, stellte dieser Mechanismus einen interessanten Kandidaten für das AJ-Remodelling im Darmepithel dar und wurde im Rahmen dieser Arbeit analysiert.

Zwei Schlüsselproteine der Aktin-Myosinkontraktion sind die Rho-Kinase LET-502 und die Myosin-Phosphatase MEL-11, die beide in der AJ von Hypodermis und Darm lokalisieren. Beide wirken antagonistisch auf die Funktion von MLC-4, die regulatorische Untereinheit des Myosins (“**myosin light chain**”), und regulieren somit die Elongation der Hypodermis (Übersichtartikel Piekny und Mains, 2003). Allerdings haben auf IF-Ebene weder LET-502 noch MEL-11 einen direkten Einfluß auf das Remodelling der AJ im Darmepithel, noch auf die Lokalisation von ERM-1 (Abb.18-20), obwohl z.B. auch gezeigt werden konnte, daß Ezrin in Fibroblasten durch eine Rho-Kinase phosphoryliert und lokalisiert wird (Tran Quang et al., 2000). Sowohl RNAi von *mhc-4*, als auch von der “myosin heavy chain” (*nmy-2*), der schweren Kette des Myosin, führt zu frühen Zytokinesedefekten (Abb. 21, 22, Guo und Kempfues, 1996). Mittels eines Stammes, der darmspezifische RNAi ermöglicht, wurde versucht, die Funktion dieser beiden Proteine im Darmepithel zu analysieren.

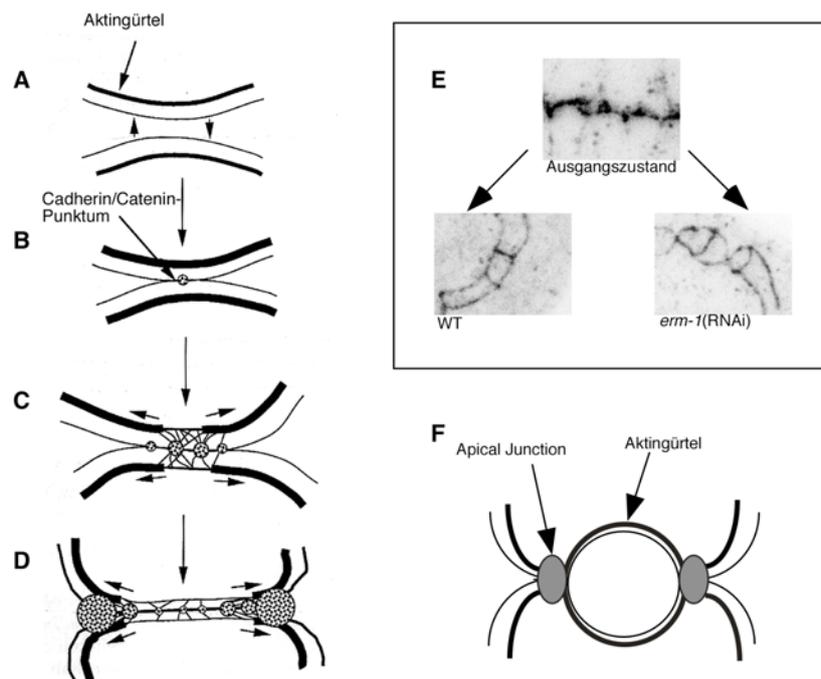


Abb. 42: Die Entwicklung der Cadherin-vermittelten Zell-Zelladhäsion in MDCK-Zellen (modifiziert nach Adams et al., 1998) und das Modell für die Funktion von ERM-1 in *C.elegans*
(A) Die Zellen wandern aufeinander zu und anfängliche Kontakte werden ausgebildet. **(B)** Initiation: Ausbildung der Cadherin-vermittelten Zell-Zelladhäsion. Die Cadherine akkumulieren als „puncta“ **(C)** Die Assoziation über Catenine zum Aktinzytoskelett wird ausgebildet. **(D)** Durch eine Kontraktion des Aktinzytoskeletts über Myosin II gelangt der Cadherin-Catenin-Komplex in den lateralen Bereich. **(E, F)** Immunfluoreszenz-Aufnahmen und das vergleichbare Modell für *C.elegans*. Die Komponenten der „apical junction“ gelangen an die apikolaterale Membrandomäne, wobei ERM-1 durch die Stabilisierung des Aktinzytoskeletts für diese Umlagerung verantwortlich sein könnte.

So sind auf IF-Ebene sowohl bei *mlc-4(RNAi)* als auch bei *nmy-2(RNAi)*-Embryonen schwache Remodellingdefekte der AJ zu sehen (Abb. 21, 22). Und mittels DIK-Optik kann in seltenen Fällen bei *nmy-2(RNAi)*-Larven ein Darmlumen beobachtet werden, das z.T. Verschlüsse aufweist und geschwollen ist (Abb. 23). Ein Phänotyp, der entsprechend auch in *erm-1(RNAi)*-Larven zu beobachten ist. Insofern kann nicht ausgeschlossen werden, daß Myosin an dem Remodelling der AJ des *C. elegans* Darmepithel beteiligt ist.

Eine weiteres Modell für das AJ-Remodelling ist, daß die AJ-Moleküle endozytiert und damit relokaliert werden. Die apikalen Vesikel, die in räumlicher Nähe zum zukünftigen Darmlumen erscheinen, könnten über ein organisiertes apikales Aktinzytoskelett AJ-Moleküle transportieren und damit relokalisieren. Die Tatsache, daß im Darm vermehrt Rezeptor-vermittelte Endozytose (RME, entspricht Clathrin-vermittelter Endozytose) stattfindet, ließ diese Theorie von Interesse sein. Allerdings

konnte gezeigt werden, daß die generelle Inhibition der RME über Chlorpromazine wahrscheinlich keinen Einfluß auf das AJ-Remodelling des Darmepithel hat (H. Aarts und O. Bossinger, unveröffentlichte Daten). Ein Doppelknockout von zwei Hauptkomponenten der RME, *apm-1* und *unc-101*, weist jedoch in seltenen Fällen ein Defekt des AJ-Remodelling im Darm auf. Hier ähneln die Defekte den in *erm-1(RNAi)*-Embryonen beobachteten, die AJ verbleibt teilweise am apikalen Pol der Darmzellen (Abb. 26). Die Internalisierung von Zonula adherens (ZA) bzw. Tight Junction (TJ)-Komponenten über Clathrin-vermittelte Endozytose wurde bereits häufig beschrieben. So konnte z.B. gezeigt werden, daß in MDCK-Zellen bereits internalisiertes E-Cadherin wieder an der Zellmembran erscheint (Le et al., 1999). Auch ist schon oft ein Zusammenhang von Endozytose und dem Aktin-Myosinnetzwerk beobachtet worden. Es wurde z.B. postuliert, daß Myosin II in T84-Epithelzellen für einen gerichteten Transport von Endozytosevesikeln sorgt (Ivanov et al., 2004; Utech et al., 2005). Die Tatsache, daß sowohl ein Funktionsverlust von *nmy-2* also auch von *apm-1* und *unc-101* zu einem *erm-1(RNAi)*-ähnlichen Phänotypen führt, läßt vermuten, daß in *C. elegans* in Bezug auf das AJ-Remodelling ein komplexer Mechanismus existieren könnte.

4.1.4 Alternative Erklärungen für das AJ-Remodelling im Darmepithel

Alternative Erklärungen für das AJ-Remodelling im Darmepithel wären, daß die apikalen Vesikel mit der apikalen Membrandomäne verschmelzen und ihr Inhalt zur Auflösung der adhäsiven Bindungen, wie z.B. den homophilen Cadherin-Bindungen, und damit zur Ausbildung des Darmlumens führt. Durch ein über ERM-1 stabilisiertes Aktinzytoskelett käme es hier zu einem gerichteten Transport der Vesikel (Leung et al., 1999). Oder es sind noch weitere Proteine an dem AJ-Remodelling beteiligt, hier wären z.B. die Zona pellucida(ZP)-Proteine zu nennen, die erstmalig in der ZP der Maus, einer Schutzschicht, die das Äußere des befruchteten Eis umgibt, identifiziert wurden. Die Tracheen von *Drosophila* bilden Verzweigungen aus, wobei aus einer multizellulären eine einzellige Röhre entsteht. Die ZA wird dabei einem dynamischen Remodelling unterzogen. Es konnte gezeigt werden, daß u.a. die ZP-Proteine Piopio und Dumpy für diesen Prozeß zuständig sind. Beides sind apikal sekretierte Proteine und formen eine luminaire, extrazelluläre Matrix, die auf noch nicht geklärte Weise das Remodelling der ZA unterstützen (Affolter et al., 2003;

Jazwinska et al., 2003; Paul und Beitel, 2005). In *C. elegans* gibt es über 20 ZP-Proteine (www.wormbase.org), die somit mögliche Kandidaten darstellen.

Ob diese Spekulationen auch für das von ERM-1 vermittelte AJ-Remodelling zutreffen könnten, verbleibt zu testen.

4.2 Die Zell-Zelladhäsion im embryonalen Darmepithel von *C. elegans* wird durch redundante Mechanismen vermittelt

Die Zell-Zelladhäsion im Darmepithel von *C. elegans* ist sehr rigide. Während in anderen Organismen, wie *Drosophila* der Cadherin-Catenin-Komplex (“cadherin-catenin-complex”, CCC) für die Zell-Zelladhäsion verantwortlich ist, spielt dieser alleine im Darmepithel von *C. elegans* hierfür keine Rolle.

Erst ERM-1 bewirkt zusammen mit dem CCC die Aufrechterhaltung der Zell-Zelladhäsion. Entsprechende Rollen können für das MAGUK-(Membran-assoziierte-Guanylatkinase)-Protein DLG-1 (**D**iscs **L**arge) bzw. für das L1CAM (“cell adhesion molecule”) LAD-1 (“**L**1-like **a**dhesion”) in Zusammenhang mit dem CCC beobachtet werden.

4.2.1 ERM-1 und der Cadherin-Catenin-Komplex vermitteln Zell-Zelladhäsion im embryonalen Darmepithel

Der gleichzeitige Funktionsverlust von *erm-1* und dem CCC führt zu einem Defekt der Zell-Zelladhäsion im Darmepithel. Dieses kann mit Markern, wie den AJ-Proteinen DLG-1 und AJM-1, aber auch mit dem apikalen Protein IFB-2 sichtbar gemacht werden. IFB-2 lokalisiert auf EM-Ebene im terminalen Netzwerk unterhalb der apikalen Mikrovilli, der Endotube, ist aber auch in der elektronendichten Struktur der AJ zu finden (Bossinger et al., 2004). Somit ist auch IFB-2 ein idealer Marker, um Zell-Zelladhäsion zu dokumentieren. Der Verlust der Zell-Zelladhäsion ist ein gradueller Prozeß, erst im Verlauf der Morphogenese sind erste Defekte sichtbar (Abb. 32). Es kann deshalb vermutet werden, daß durch die Elongation des Darmepithels die Adhäsion der AJ in *erm-1/hmp-1(RNAi)*-Embryonen nicht mehr ausreicht und deshalb die AJ zwischen den “ints” der Darmzellen “auseinandergerissen” wird. Die AJ und das Darmlumen erscheinen dadurch fragmentiert. Auch der Pharynx zeigt Zell-Zelladhäsionsdefekte, die im weiteren aber nicht untersucht wurden. Es kann auch nicht ausgeschlossen werden, daß in der Hypodermis Adhäsionsdefekte auftreten, vor allen Dingen, da beide Systeme auch in der Hypodermis lokalisiert sind.

Es wurde gezeigt, daß die Lokalisation von HMP-1 von dem β -Catenin HMP-2 abhängig ist, HMP-2 wird wiederum von HMR-1 lokalisiert (Costa et al., 1998; Raich

et al., 1999). So führt nicht nur der Verlust von *hmp-1*, sondern auch von *hmr-1* bzw. *hmp-2* zusammen mit *erm-1* zu einem Zell-Zelladhäsionsdefekt. Es konnte schon des öfteren gezeigt werden, daß ERM-Proteine in Zell-Zelladhäsion involviert sind. In kultivierten Epithelzellen der Maus wird durch antisense Oligonukleotide Ezrin inaktiviert und die Zell-Zelladhäsion aufgehoben. Die Zellen weisen keinen Kontakt zueinander auf und sind abgerundet. In MDCK-Zellen ist die Rekrutierung von E-Cadherin an die Membran durch die Überexpression von Ezrin inhibiert. Dies führt zu einem Verlust der Zell-Zelladhäsion (Pujuguet et al., 2003; Takeuchi et al., 1994). Wahrscheinlich wirken ERM-1 und der CCC jedoch in zwei parallelen "pathways". Hierfür spricht, daß der Zell-Zelladhäsionsverlust in *C. elegans* erst nach einem Doppelknockout ausgeprägt wird und daß die Lokalisation von ERM-1 bzw. dem CCC unabhängig voneinander ist (Abb. 31).

Wie könnten ERM-1 und der CCC in Bezug auf die Zell-Zelladhäsion zusammenwirken?

Für den CCC wurde bisher nur in der Hypodermis eine Funktion beschrieben. Während des ventralen Schluß der Hypodermis wandern Hypodermiszellen aufeinander zu. Hierbei bilden sie aktinreiche Filopodien aus, die schließlich in Kontakt treten. HMP-1 bündelt Aktinfilamente in den Filopodien und stabilisiert somit die über das membranständige HMR-1 vermittelte Adhäsion der Filopodien (Costa et al., 1998; Raich et al., 1999). ERM-1 könnte an ein zusätzliches Transmembranmolekül binden, welches Zell-Zelladhäsion vermittelt. So ist Ezrin in transfizierten COS-Zellen mit ICAM1 und ICAM2 ("intercellular cell adhesion molecule") assoziiert und in entsprechenden "binding assays" konnte eine Interaktion von Ezrin mit ICAM1 und ICAM2 nachgewiesen werden (Heiska et al., 1998). Da die Zell-Zelladhäsion im Darmepithel von *C. elegans* sehr rigide ist, kommen Defekte wahrscheinlich erst zu tragen, wenn zwei Adhäsionssysteme ausgeschaltet werden. Es kann aber auch vermutet werden, daß die Destabilisierung des apikalen Aktinzytokortex des Darmepithels in *erm-1(RNAi)*-Embryonen dazu führt, daß die "endotube" generell geschwächt ist und erst in dieser besonderen Situation die adhäsive Funktion des CCC im Darmepithel deutlich wird.

Es wurde schon öfters über redundante Mechanismen in Bezug auf die Zell-Zelladhäsion spekuliert (Chen et al., 2001; Costa et al., 1998; McMahon et al., 2001; Segbert et al., 2004; Simske et al., 2003). So vermittelt das Claudin-Homolog VAB-9, welches in der AJ lokalisiert, zusammen mit dem DLG-1/AJM-1-Komplex Zell-

Zelladhäsion in der Hypodermis (Simske et al., 2003). Auch ein gleichzeitiger Funktionsverlust von *dlg-1* und dem CCC verursacht einen Zell-Zelladhäsionsdefekt im embryonalen Darmepithel von *C. elegans*. Marker, wie AJM-1 und IFB-2, sind ähnlich wie in *erm-1/hmp-1(RNAi)*-Embryonen nur noch fragmentiert vorhanden (Abb. 39). So wurde vermutet, daß DLG-1 Transmembranproteine stabilisiert, die zusammen mit dem CCC für Zell-Zelladhäsion verantwortlich sind (Segbert et al., 2004).

4.2.2 LAD-1 und der Cadherin-Catenin-Komplex vermitteln Zell-Zelladhäsion im embryonalen Darmepithel

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß das L1CAM LAD-1 ein möglicher Kandidat für ein Transmembranmolekül ist, welches zusammen mit dem CCC Zell-Zelladhäsion im Darmepithel vermittelt.

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendete Mutante *lad-1(ok1244)* ist lebensfähig und fertil. AJ-Proteine und apikale Proteine, wie IFB-2 und ERM-1 sind im Darmepithel wildtypisch verteilt (Abb. 37). Erst der gleichzeitige Verlust von LAD-1 und dem CCC führt zu einem fragmentierten Darmepithel. Hier ist, wie schon in den beschriebenen Doppelknockouts, ein gradueller Verlust von AJ- und apikalen Markern im Darmepithel zu beobachten (Abb. 37, 38). So sind LAD-1 und der CCC gemeinsam für die Aufrechterhaltung der Zell-Zelladhäsion im Darm verantwortlich.

Es wurde gezeigt, daß LAD-1 für die Entwicklung und speziell für die Positionierung der sensorischen Neuronen verantwortlich ist (Sasakura et al., 2005; Wang et al., 2005; Zallen et al., 1999). L1CAMs sind hauptsächlich in neuronalen Geweben lokalisiert und Mutationen im humanen L1CAM verursachen neurologische Krankheiten, die entsprechend auch in L1CAM Knockout-Mäusen zu finden sind. In Mäusen konnten für L1CAMs aber auch neuronal-unabhängige Funktionen gezeigt werden, die die Nierenentwicklung und Fertilität beeinflussen (Cohen et al., 1998; Dahme et al., 1997; Fransen et al., 1998; Weller und Gartner, 2001).

In letzter Zeit wurde noch häufiger von neuronal-unabhängigen Funktionen von L1CAMs, auch im Bereich der Epithelzelladhäsion, berichtet. In Mutanten von dem *Drosophila*-L1CAM Homologen Neuroglian (Nrg) sind neben neuronalen Defekten auch Defekte in den Septate Junctions (SJ) zu beobachten. Nrg lokalisiert in den SJ der Speicheldrüsen und ist hier wichtig für die Aufrechterhaltung der Barrierefunktion der SJ, so entstehen in *nrg*-Mutanten Lücken zwischen den einzelnen Zellen (Genova

und Fehon, 2003; Hall und Bieber, 1997). Es konnte aber auch gezeigt werden, daß Nrg während der Oogenese von *Drosophila* für die Stabilität des Follikelzellepithels verantwortlich ist. Die “border cells” (BC) sind spezielle Zellen des Follikelzellepithels. Sie delaminieren vom Follikelzellepithel und durchwandern die Nährzellen bis zur Oozyte. Durch den vollständigen Verlust von *nrg* kommt es zu einer vermehrten Delamination von BC, die die epitheliale Polarität verloren haben. Ein ähnlicher Phänotyp ist auch in *discs large(dlg)*-Mutanten zu beobachten. In Doppelmutanten *dlg/nrg* tritt sogar eine verstärkte Delamination der BC auf (Wei et al., 2004).

In *C. elegans* kann bei einem gleichzeitigen Funktionsverlust von *lad-1* und *dlg-1* kein Defekt in der Zell-Zelladhäsion beobachtet werden (Abb. 37). Es konnte in dieser Arbeit aber gezeigt werden, daß phosphoryliertes LAD-1 (LAD-1P) und DLG-1 in der AJ des Darmepithels kolokalisieren und die Lokalisation von LAD-1P abhängig von DLG-1 ist (Abb.33). Ebenfalls wurde im Hefe-2-Hybrid-System eine direkte Bindung von LAD-1 und DLG-1 nachgewiesen (Abb. 35). In *dlg-1(RNAi)*-Embryonen ist die Lokalisation von LAD-1P in der AJ “punktiert”, somit ist DLG-1 wahrscheinlich für die Stabilisierung von LAD-1P in der AJ zuständig. Obwohl z.B. in den *Drosophila* SJ eine Kolokalisation von Nrg und Dlg beobachtet wurde, ist bisher nicht berichtet worden, ob die Nrg-Lokalisation von Dlg abhängig ist (Genova und Fehon, 2003).

4.2.3 Die Phosphorylierung von LAD-1 ist abhängig von EGL-15

LAD-1 wird wahrscheinlich von der FGF (“fibroblast growth factor”)-Rezeptor-Tyrosinkinase EGL-15 phosphoryliert (Chen et al., 2001). So zeigt sich ein Zell-Zelladhäsionsdefekt im Darmepithel, wenn ein gleichzeitiger Verlust von EGL-15 und HMP-1 auftritt (Abb. 39). Außerdem kann in *egl-15(n1456)*-Embryonen LAD-1P nicht nachgewiesen werden (Abb. 36). Die Fehllokalisierung von LAD-1P in *dlg-1(RNAi)*-Embryonen und der Zell-Zelladhäsionsverlust in *egl-15(n1456)/hmp-1(RNAi)* könnten auf eine spezifische Funktion des phosphorylierten LAD-1 für Zell-Zelladhäsion hinweisen, da auch des öfteren schon über verschiedenen Funktionen von unterschiedlichen Spleißvarianten diskutiert wurde (Chen et al., 2001; Sasakura et al., 2005; Wang et al., 2005).

Rezeptor-Tyrosinkinasen (RTK), wie EGL-15, haben wichtige Funktionen für die Weiterleitung von Signalen aus der extrazellulären Umgebung in die Zelle hinein.

Hiermit haben sie Einfluß auf biologische Prozesse wie zelluläre Differenzierung, Proliferation und Migration. Die Bindung eines Liganden an den Rezeptor, in dem Falle eines FGF, führt zur Dimerisierung und Aktivierung der Kinasefunktion (Birnbaum et al., 2005; Huang und Stern, 2005). Für EGL-15 konnten in *C. elegans* bereits vielfältige Funktionen gezeigt werden. So steuert es z.B. die Migration der Sexmyoblasten in Hermaphroditen, wobei der Ligand EGL-17 hierbei als chemotaktisches, richtungsweisendes Signal dient. Ein zweiter Ligand für die RTK ist LET-756, welcher für neuronales Wachstum verantwortlich ist (Burdine et al., 1998; Burdine et al., 1997; Popovici et al., 2004; Roubin et al., 1999; Szewczyk und Jacobson, 2003). Doch welche Rolle könnte ein "FGF-Signalling" für die Aufrechterhaltung der Zell-Zelladhäsion spielen? Obwohl schon mehrmals beschrieben wurde, daß L1CAMs zur Aktivierung von RTK führen (Forni et al., 2004; Islam et al., 2004), ist es in *C. elegans* offensichtlich umgekehrt. Hier wirkt LAD-1 "downstream" von EGL-15. LAD-1 bindet im unphosphorylierten Zustand an Ankyrin, wodurch es an das kortikale Spektrin-Aktinzytoskelett gekoppelt ist. Durch die Phosphorylierung von EGL-15 wird diese Bindung aufgelöst und LAD-1 wird in die AJ rekrutiert (Chen et al., 2001), wo es von DLG-1 stabilisiert wird und redundant zum CCC Zell-Zelladhäsion vermitteln kann. Unterbleibt die Phosphorylierung, wie in *egl-15(n1456)*-Mutanten, so verursacht dies einen Zell-Zelladhäsionsdefekt. Es könnte spekuliert werden, daß extrazelluläre Signale für die Aufrechterhaltung von Zell-Zelladhäsion von Bedeutung sind. Es verbleibt jedoch zu testen, ob auch die Liganden EGL-17 bzw. LET-756 zusammen mit dem CCC in Zell-Zelladhäsion involviert sind oder ob EGL-15 vielleicht ligandenunabhängig für die Phosphorylierung von LAD-1 sorgt.

4.2.4 Das Zusammenspiel von ERM-1, DLG-1 und LAD-1 in Bezug auf die Zell-Zelladhäsion im embryonalen Darmepithel von *C. elegans*

Wie könnte ein Zusammenhang von ERM-1, DLG-1 und LAD-1 in Bezug auf die mit dem CCC vermittelte Zell-Zelladhäsion bestehen? In der Hefe kommt es zu einer Interaktion von DLG-1 und LAD-1 über die 2. PDZ-Domäne und dem PDZ-Bindemotiv (Abb.35). Dies korreliert mit den IF-Daten, wo gezeigt werden konnte, daß LAD-1 in der AJ von DLG-1 stabilisiert wird (Abb. 34). In der Hefe interagiert

ERM-1 nicht mit LAD-1, obwohl gezeigt werden konnte, daß z.B. Erzin an L1CAM *in vitro* und *in vivo* bindet und das entsprechende Bindemotiv konserviert ist (Cheng et al., 2005; Dickson et al., 2002). ERM-1 könnte indirekt über ein Adaptermolekül an LAD-1 binden. So können ERM-Proteine über Adapter, wie z.B. dem EBP50, an Membranproteine gekoppelt werden. EBP50 besitzt eine PDZ-Domäne, die an den C-Terminus von Transmembranproteinen binden kann (Morales et al., 2004; Reczek et al., 1997). Allerdings ist nicht auszuschließen, daß ERM-1 an ein anderes Transmembranmolekül bindet.

Der gleichzeitige Verlust der Genfunktion von *erm-1*, *lad-1* und *hmp-1* führt zu keiner Verstärkung des fragmentierten Darmepithels. Ein verstärkter Phänotyp tritt bei den Kombinationen *erm-1/dlg-1/hmp-1(RNAi)* und *lad-1(ok1299)/dlg-1/hmp-1(RNAi)* auf (Abb. 40, Tab. 4). Dies könnte ein Hinweis sein, daß auch ERM-1 und LAD-1 in einem gemeinsamen "pathway", vielleicht über den o.g. Adapter, Zell-Zelladhäsion im Darmepithel vermitteln.

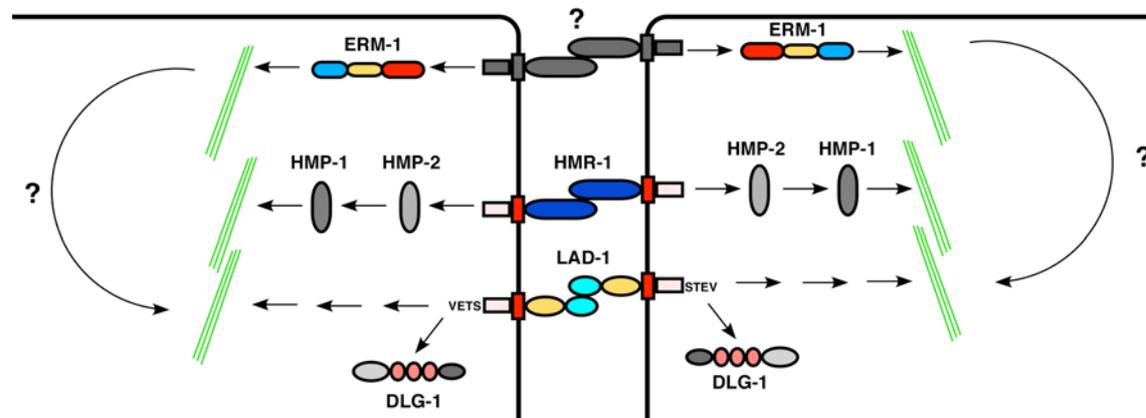


Abb. 43: Schematische Darstellung der Zell-Zelladhäsionssysteme im Darmepithel von *C. elegans*
 Dargestellt ist die apikolaterale Region zweier Darmzellen. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß es redundante Systeme für die Aufrechterhaltung der Zell-Zelladhäsion im Darmepithel von *C. elegans* gibt. Der Cadherin-Catenin-Komplex (CCC), bestehend aus dem E-Cadherin HMR-1, dem β-Catenin HMP-2 und dem α-Catenin HMP-1 vermittelt mit dem L1-CAM ("cell adhesion molecule) LAD-1 Zell-Zelladhäsion. LAD-1 wird über eine direkte Interaktion mit dem MAGUK(Membran-assoziierte Guanylatkinase)-Protein DLG-1 stabilisiert. ERM-1 gehört zur ERM(Ezrin-Radixin-Moesin)-Proteinfamilie und sorgt ebenso mit dem CCC für Zell-Zelladhäsion, wobei eine indirekte Verbindung, evtl. über das Spektrin-Aktinzytoskelett, postuliert werden kann.

Doch wie kann der verstärkte Adhäsionsdefekt in den Dreifachknockouts *erm-1/dlg-1/hmp-1(RNAi)* und *lad-1(ok1244)/dlg-1/hmp-1(RNAi)* erklärt werden? In *lad-1(ok1244)*-Embryonen ist die phosphorylierte Form von LAD-1, im Gegensatz zur unphosphorylierten, immer noch zu detektieren (Abb. 35). Laut Sequenzanalyse von *lad-1(ok1244)* sollte jedoch durch ein vorzeitiges Stoppcodon der komplette C-Terminus der Mutante fehlen. Es ist zu vermuten, daß es zu einem "read trough" des Stoppcodons kommt und doch noch Protein hergestellt wird. Dies ist ein Phänomen, welches auch bei der Analyse einer Mutante von *spe-9*, einem Transmembranprotein im *C. elegans* Spermium, beobachtet werden konnte (Singson et al., 1998). Es könnte spekuliert werden, daß die phosphorylierte Form stabiler und deshalb immer noch vorhanden ist.

So kann vermutet werden, daß die phosphorylierte bzw. die nicht-phosphorylierte Form von LAD-1 jeweils unabhängige Funktionen in Bezug auf die Zell-Zelladhäsion haben. LAD-1P wird in der AJ über DLG-1 stabilisiert und sorgt dort für Adhäsion. Es ist gezeigt worden, daß das nichtphosphorylierte LAD-1 an Ankyrin bindet (Chen et al., 2001). Ankyrine sind Adapterproteine, die z.B. L1CAMs an das Spektrin-Aktinzytoskelett binden (Bennett und Chen, 2001). Auch ERM-Proteine können an das Spektrinzytoskelett geknüpft sein (Medina et al., 2002). Somit könnte ERM-1 indirekt über LAD-1 Zell-Zelladhäsion vermitteln.

5 Ausblick

Im *C. elegans*-Embryo ist ERM-1 (Ezrin-Radixin-Moesin) für die korrekte Organisation des apikalen F-Aktinzytoskeletts im Darmepithel verantwortlich und scheint die Lumenbildung und das korrekte Remodelling der *C. elegans* "apical junction" (AJ) zu beeinflussen. Dabei steht die Frage nach der Auflösung der Zell-Zellkontakte der apikalen Membranen, die über das zukünftige Lumen erfolgt, im Vordergrund. Ein diesbezüglich zu untersuchender Prozeß wäre die Exozytose. So ist aus *Drosophila* bekannt, daß Zona pellucida(ZP)-Proteine eine apikale, extrazelluläre Matrix bilden und somit für die Ausbildung des Lumens und der Zonula adherens unerlässlich sind. In *C. elegans* gibt es über 20 ZP-Proteine, die als mögliche Kandidaten für Lumenbildung und AJ-Remodelling in Frage kämen.

Die Analyse der Zell-Zelladhäsion im Darmepithel von *C. elegans* zeigt, daß hier ein sehr redundantes System am Werk ist, bei dem der Cadherin-Catenin-Komplex zusammen mit ERM-1 und LAD-1 (L1-like **ad**hesion) eine zentrale Rolle spielt. Es bleibt zu prüfen, ob ERM-1 neben seiner Rolle als Aktinorganisator auch direkt an ein Transmembranprotein bindet, welches an der Zell-Zelladhäsion beteiligt ist.

Da auch EGL-15, eine FGF("fibroblast **grow**ht **fact**or")-Rezeptor-Tyrosinkinase, an der Zell-Zelladhäsion beteiligt ist, wird die Frage aufgeworfen, ob auch die FGF-Signaltransduktion bei der Aufrechterhaltung dieses Prozesses eine Rolle spielt. So liegt es nahe, nach potentiellen Liganden für EGL-15 zu suchen, die ebenfalls in Zell-Zelladhäsion involviert sind.

6 Resümee

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde die Lumenbildung und die Zell-Zelladhäsion im embryonalen Darmepithel des Nematoden *Caenorhabditis elegans* analysiert. Es konnte gezeigt werden, daß ERM-1 (Ezrin-Radixin-Moesin) für die Lumenbildung eine zentrale Rolle spielt. In Bezug auf den Wirkmechanismus von ERM-1 konnten jedoch in verschiedenen Ansätzen (Aktin-Myosinnetzwerk, Endozytose und Hefe-2-Hybrid Analyse) keine neuen Komponenten identifiziert werden. Dahingegen konnte gezeigt werden, daß in Bezug auf die Zell-Zelladhäsion im Darmepithel der Cadherin-Catenin-Komplex zusammen mit LAD-1 (“L1-like **adhesion**”) eine wichtige Funktion einnimmt.

7 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Doktorarbeit konnte gezeigt werden, daß es in einem *erm-1* (Ezrin-Radixin-Moesin)*RNAi*-Hintergrund zu Defekten bei der Lumenbildung im Darmepithel des *C. elegans*-Embryos kommt. ERM-1 gehört zur Familie der ERM-Proteine, die generell als “crosslinker” zwischen Transmembranmolekülen und dem Aktinzytoskelett beschrieben werden. Die beobachteten Defekte äußern sich in Form von Verschlüssen und Verengungen entlang der anterior-posterior Achse des Darmepithels. So werden die Verschlüsse wahrscheinlich durch Zelladhäsionsmoleküle (z.B. E-Cadherin) innerhalb der *C. elegans* “apical junction” (AJ) verursacht, die über das zukünftige Lumen hinweg weiterhin miteinander in Kontakt stehen (z.B. durch homophile Adhäsion). Insgesamt deutet das fehlende apikale F-Aktinzytoskelett (Phalloidin-Färbung) im Darmepithel auf eine generelle Destabilisierung des apikalen Kortex hin, die mit dem korrekten Remodelling der AJ und somit der Lumenbildung in *erm-1(RNAi)*-Embryonen interferiert. Es konnte jedoch gezeigt werden, daß die apikale Membrandomäne weiterhin ausgebildet wird. Eine detaillierte Analyse von Schlüsselkomponenten des nicht-muskulären Aktin-Myosinnetzwerk (wie z.B. die Rho-Kinase oder Myosin-Phosphatase) konnte keine konkreten Erkenntnisse in Bezug auf den Mechanismus des AJ-Remodelling liefern. Wahrscheinlich ist die zu beobachtende darmspezifische Rezeptor-vermittelte Endozytose (diese läßt sich durch Transferrin nachweisen) nicht an der spezifischen Entfernung von Zelladhäsionsmolekülen auf der zukünftigen apikalen Oberfläche beteiligt. Auch die Suche und Analyse von Interaktionspartnern von ERM-1 mit Hilfe des Hefe-2-Hybrid-Systems erbrachte keine weiteren Erkenntnisse, so daß insgesamt ein sehr komplexer Mechanismus bezüglich der Lumenbildung und des AJ-Remodellings vermutet werden kann.

Neben der Lumenbildung ist auch die Zell-Zelladhäsion im *C. elegans* Darmepithel ein wenig verstandener Prozeß. So ist der Cadherin-Catenin-Komplex (“cadherin-catenin-complex”, CCC) zwar im *Drosophila*- und Vertebraten-Embryo hauptverantwortlich für die Zell-Zelladhäsion, wohingegen er im *C. elegans*-Embryo eher eine untergeordnete Rolle spielt. Im Rahmen dieser Arbeit konnte nun gezeigt werden, daß der gleichzeitige Verlust des CCC und von ERM-1 mit der Aufrechterhaltung der Zell-Zelladhäsion im embryonalen Darmepithel interferiert. Ein entsprechender Defekt konnte bereits durch einen Doppelknockout des CCC

zusammen mit dem MAGUK(Membran-assozierte **G**uanylatkinase)-Protein DLG-1 (Discs large) beschrieben werden. Der CCC vermittelt ebenfalls zusammen mit dem L1CAM (“**c**ell **a**dhesion **m**olecule”) LAD-1 (**L**1-like **a**dhesion) die Zell-Zelladhäsion. LAD-1 interagiert im Hefe-2-Hybrid-System mit DLG-1 jedoch nicht mit ERM-1. Korrelierend dazu ist die Lokalisation von LAD-1 abhängig von DLG-1 und weiterhin von EGL-15, einer FGF-ähnlichen Rezeptortyrosinkinase. Auch die Ausschaltung des CCC zusammen mit EGL-15 führt zu Zell-Zelladhäsionsdefekten im Darmepithel, so daß diese Daten ein komplexes molekulares Netzwerk vermuten lassen, in dem der CCC bezüglich der Zell-Zelladhäsion doch eine zentrale Funktion spielt.

8 Abbildungen des Ergebnisteils

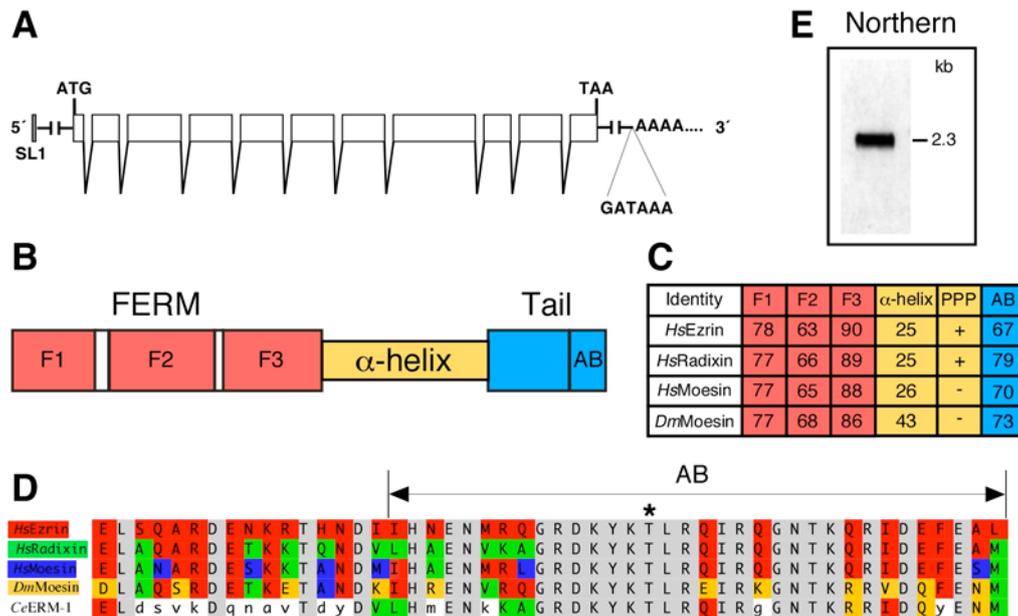


Abb. 7: ERM-1 ist das einzige ERM(Ezrin-Radixin-Moesin)-Protein in *C. elegans*.

(A) Schematische Darstellung des *erm-1* Transkript (2326 bp). Das *erm-1* Gene besteht aus 11 Exons und ist zum 5'-Ende hin SL1 ("splice leader") trans-gespleißt. Das 3'-Ende kennzeichnet sich durch 2 putative Polyadenylierungssignale, die sich "upstream" des Poly-A-Schwanzes befinden. (B) *erm-1* codiert für ein 563 AS großes Protein, welches am N-Terminus eine aus den Subdonänen F1-F3 bestehende FERM("band four one", Ezrin, Radixin, Moesin)-Domäne aufweist (rot, AS 5-298), einen mittleren α -helikalen Bereich (gelb) und einen C-terminale C-ERMAD ("ERM-assoziations-domain")-Domäne mit Aktinbindesequenz (die letzten 34 AS, blau). (C) Sequenzvergleiche zu humanem Ezrin ("accession number" P15311), Radixin (P35241), Moesin (P26038) und zu *Drosophila* Moesin (P46150) zeigen hohe Identität speziell in der FERM-Domäne und in der Aktinbindesequenz. Ein prolinreicher Abschnitt (PPP, Poly-Prolin-Track) ist in ERM-1 nicht zu finden. (D) Ein Alignment der C-terminalen Bereiche von *C. elegans* ERM-1, humanen und *Drosophila* ERM-Proteinen zeigt hohe Homologien in der Aktinbindesequenz, wobei auch der für die Aktivierung der ERM-Proteine (Sternchen, Position 566, 564, 558, 559 in humanem Ezrin, Moesin, Radixin und *Drosophila* Moesin) wichtige Threoninrest konvergiert ist (Position 544 in ERM-1). Charakteristische Bereiche für humanes Ezrin, Radixin, Moesin und *Drosophila* Moesin sind in rot, grün, blau und gelb dargestellt. (E) Ein Northern Blot bestätigt die vorhergesagte mRNA-Sequenz von 2.3 kb.

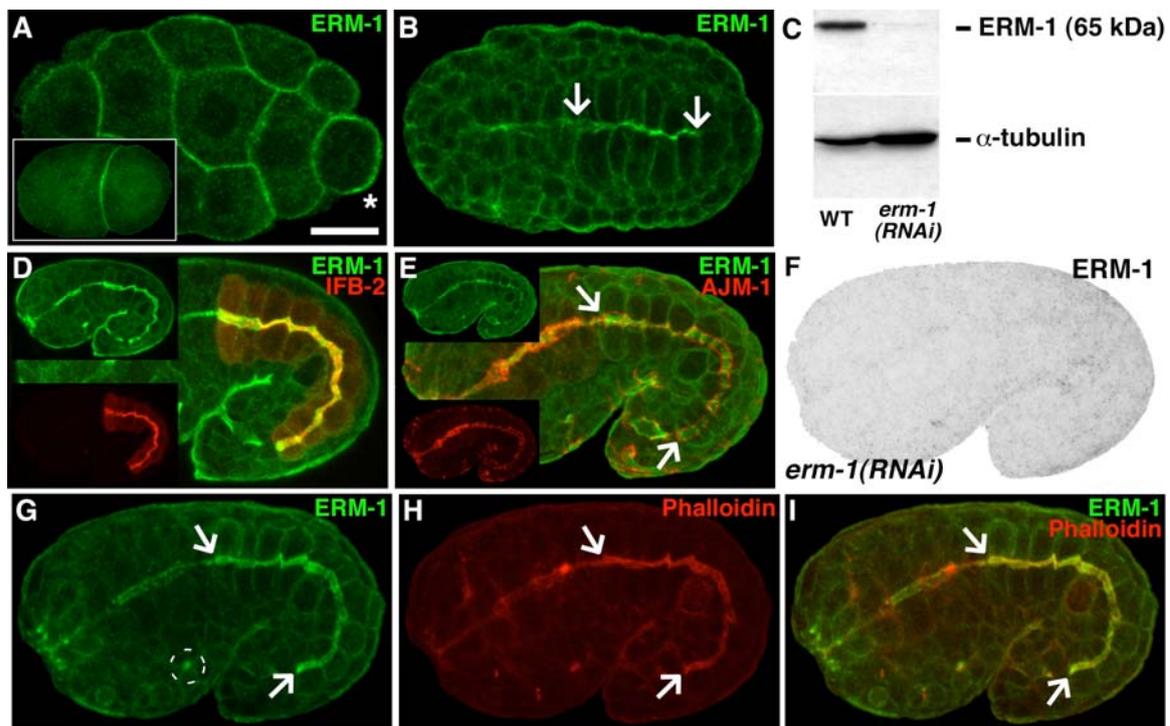


Abb. 8: Das embryonale Expressionsmuster von ERM-1.

(A) Zuerst im Zwei-Zell-Stadium an benachbarten Zellmembranen (Verkleinerung) zu sehen, zeigt sich die ERM-1 Expression später im Kortex nahezu aller Zellen ($n > 18$). (B) Mit beginnender Morphogenese (Bohnestadium, $n > 13$) akkumuliert es am apikalen Pol von Pharynx, Darm (Pfeile) und Hypodermiszellen (Sternchen). (C) Durch Western Blot-Analyse kann im WT eine Bande bei 65 kDa detektiert werden, wobei diese in *erm-1(RNAi)*-Tieren kaum noch nachweisbar ist. Als Ladekontrolle dient α -Tubulin. (D-E) Im Verlauf der Morphogenese zeigt ERM-1 eine Kolokalisation mit dem darmspezifischen Intermediärfilament IFB-2 (D, gelber Bereich, $n = 28$), wobei es sich jedoch apikal von dem AJ-Marker AJM-1 befindet (E, $n > 54$). (F) Im Vergleich hierzu zeigen *erm-1(RNAi)*-Embryonen nahezu keine ERM-1 Färbung ($n > 15$). (G-H) ERM-1 kolokalisiert mit dem apikalen F-Aktin sowohl im apikalen Pharynx- als auch Darmzellen (I, gelber Bereich, $n > 18$).

(A) Das Sternchen kennzeichnet eine Zelle mit ERM-1 Färbung im gesamten Cortex. (B, E und G-I) Pfeile zeigen auf die Pharynx-Darm Übergänge bzw. auf die Darm-Hinterdarm Übergänge. (G) Der Kreis kennzeichnet das Primordium der exkretorischen Zelle. Anterior ist links. Eichstrich 10 μm .

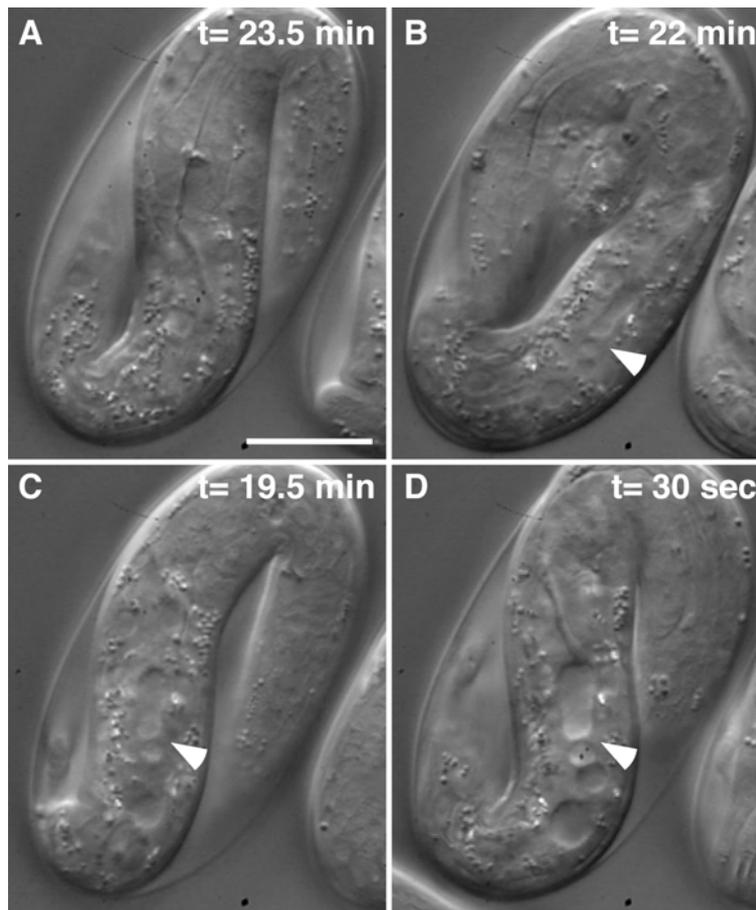


Abb. 9: Analyse des embryonalen *erm-1(RNAi)*-Phänotypen mittels 4D-DIK-Optik (freundlicherweise von O. Bossigner zur Verfügung gestellt).

(A) *erm-1(RNAi)*-Embryonen entwickeln sich bis $t=23.5\text{min}$ vor dem Schlüpfen wildtypisch. (B) Erst ab $t=22\text{min}$ vor dem Schlüpfen wird eine schwache Darmlumenweitung sichtbar, die im Verlauf der Embryogenese zunimmt (C, D), hierbei sind Darmlumenverschlüsse (Pfeilköpfe) zu beobachten. (B-D) Pfeilköpfe zeigen Darmverschlüsse. Eichstrich $10\mu\text{m}$.

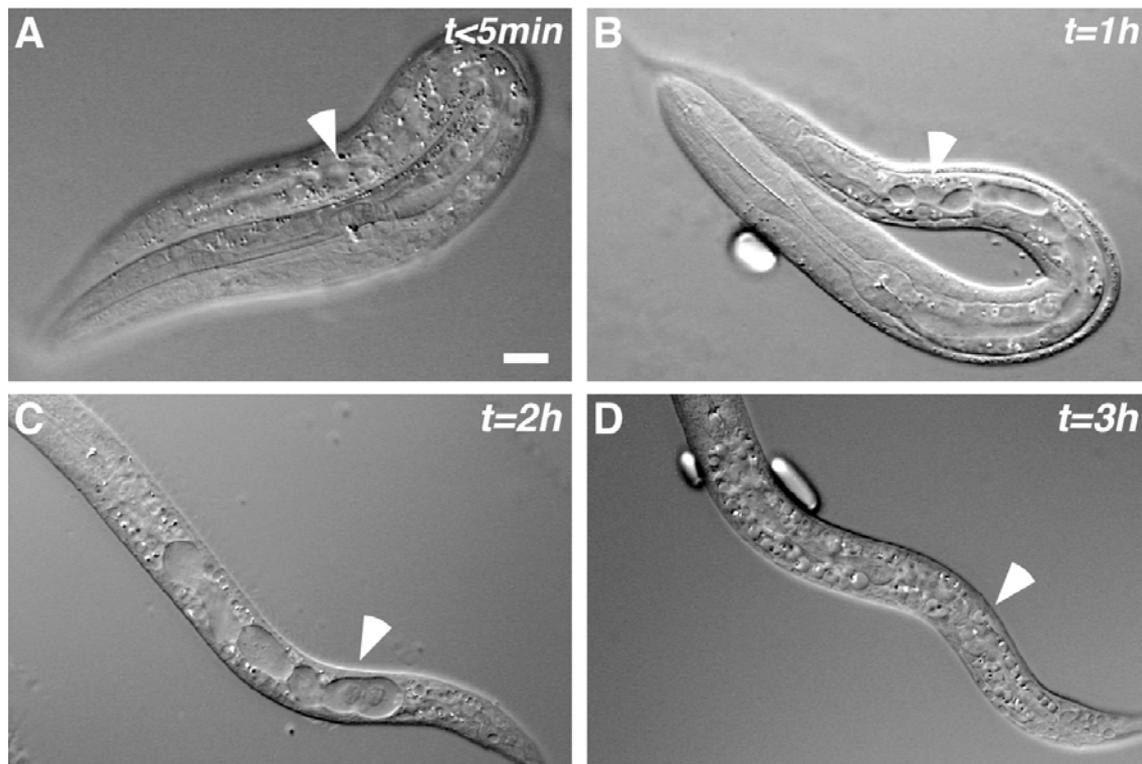


Abb. 10: Analyse des larvalen *erm-1(RNAi)*-Phänotypen mittels DIK-Optik.

(A) Kurz nach dem Schlüpfen ($t=5\text{min}$) zeigen *erm-1(RNAi)*-Larven ein Darmlumen, welches unmerkbar geschwollen ist. (B-D) Im Verlauf der Zeit weitet sich das Darmlumen. Verschlüsse werden deutlich sichtbar (B, $t=1\text{h}$, Pfeil), die nachfolgend teilweise einreißen (C, $t=2\text{h}$, Pfeil). Letztendlich kollabiert das gesamte Darmlumen (D, $t=3\text{h}$, $n=10$).

(B-D) Pfeilköpfe zeigen Verschlüsse. Eichstrich $10\mu\text{m}$.

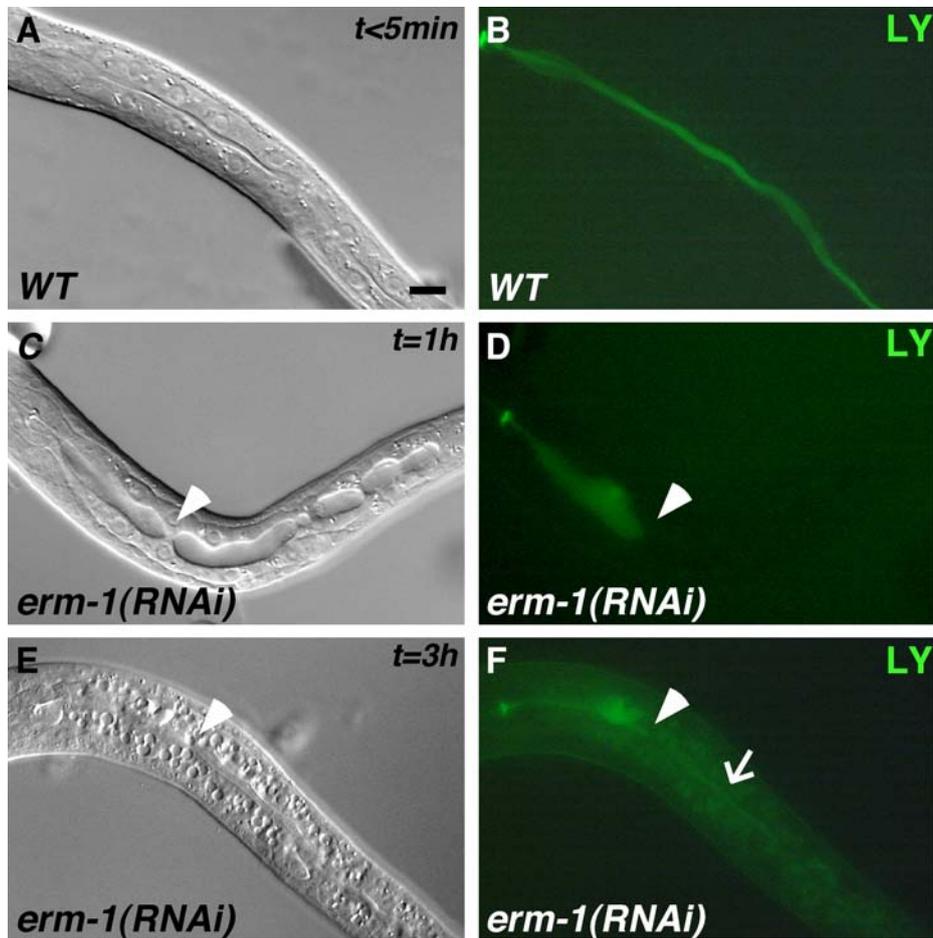


Abb. 11: Analyse des larvalen *erm-1(RNAi)*-Phänotypen durch Fütterungsexperimente.

DIK-Analyse einer *WT*- (A) und *erm-1(RNAi)*-Larve (C, E) und Fluoreszenzaufnahmen nach Fütterung mit Luzifer Yellow (LY) von *WT* (B) und *erm-1(RNAi)*-Larven (D, E).

(B, D, F) Während im *WT* LY innerhalb kurzer Zeit ($t=5\text{min}$) von anterior nach posterior durch das Darmlumen diffundiert (B, $n=6$) zeigt sich in *erm-1(RNAi)*-Tieren eine Blockade der Diffusion, die über die Zeit erhalten bleibt (D, $t=1\text{h}$). Nach dem Kollabieren des Darmes (E) gelangt ein geringer Teil LY (F, $t=3\text{h}$) in den posterioren Darmbereich (Pfeil, $n=8$).

(C-F) Pfeilköpfe zeigen auf Verschlüsse. (F) Pfeilkopf zeigt auf LY im posterioren Darmbereich. Anterior ist links. Eichstrich $10\mu\text{m}$.

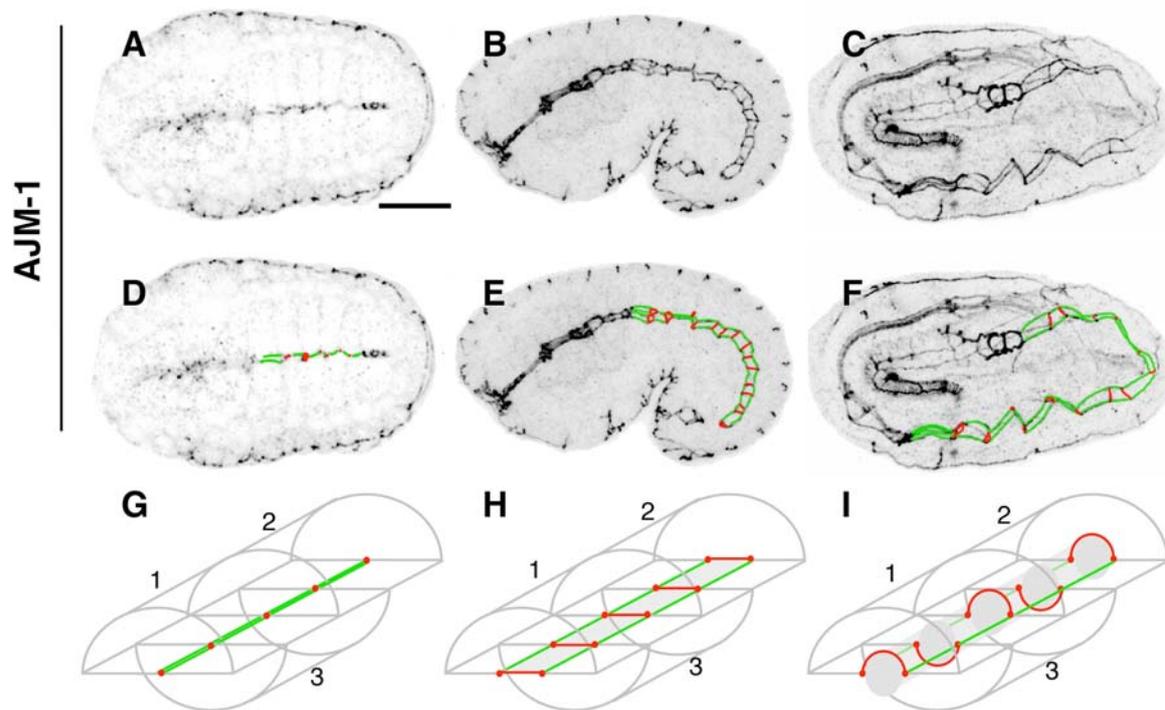


Abb. 12: Organisation des Darmepithels in *C. elegans*-Embryonen.

(A-C) Färbungen an WT-Embryonen in verschiedenen Stadien der Morphogenese gegen AJM-1 als AJ-Marker. (D-E) Die selben Embryonen wie in (A-C) mit colorierter AJ. (G-I) stellen schematische Darstellungen eines mittleren Bereiches des Darmepithels der entsprechenden Entwicklungsstadien dar. Die AJ ist zunächst am apikalen Pol lokalisiert (A, D) und gelangt während der Darmlumenausbildung nach apiko-lateral (B, C, E, F), wobei grün die AJ darstellt, die gegenüberliegende Zellen verbindet und rot die AJ zwischen zwei benachbarten Zellen. Das Darmlumen in *C. elegans* bildet sich “de novo” zwischen zwei Zellen (“cord hollowing”). (H-I) Schematische Darstellung von 3 Zellen des mittleren Darmepithels.

Anterior ist links. Eichstrich 10µm.

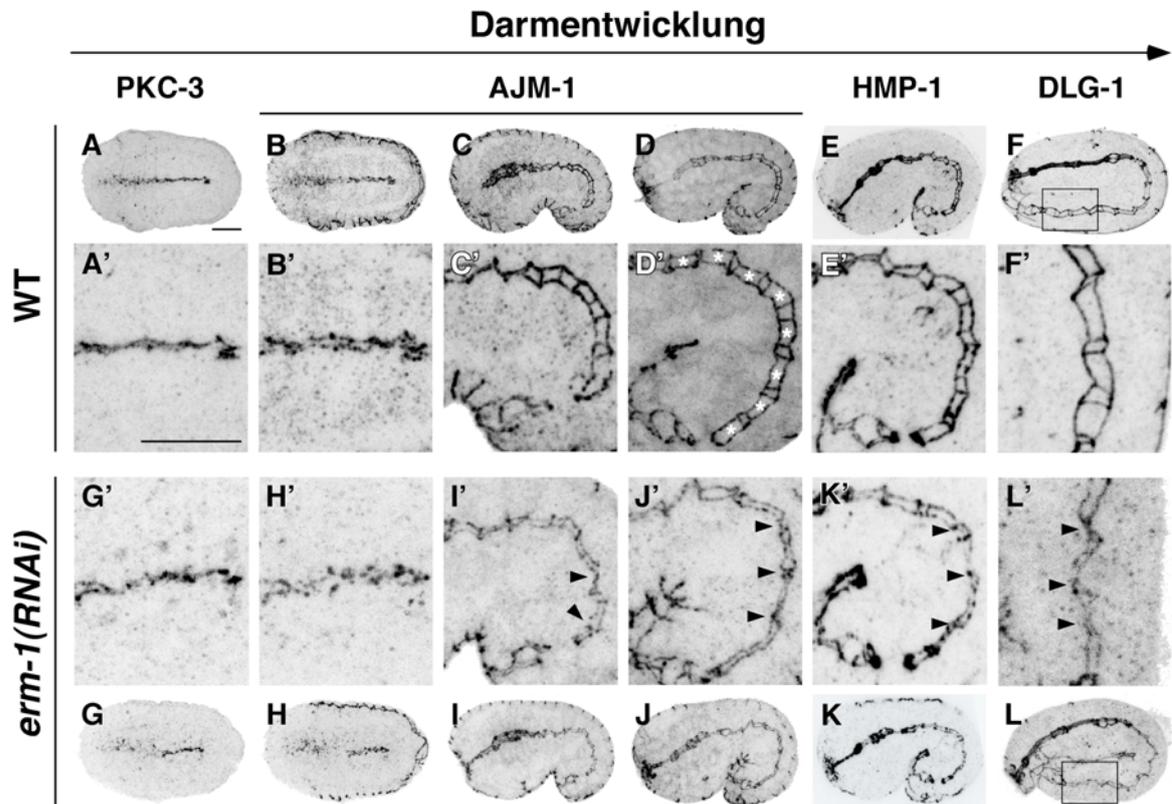


Abb. 13: Vergleichende Analyse des AJ-Musters von WT und *erm-1(RNAi)*-Embryonen während der Morphogenese des Darmepithels.

WT-Embryonen (A-F) und *erm-1(RNAi)*-Embryonen (G-L) in verschiedenen Entwicklungsstadien gefärbt mit dem apikalen Marker PKC-3 (A, G), den AJ-Markern AJM-1 (B-D und H-J), DLG-1 (F und L) und HMP-1. (E und K). (A'-F' und G'-L') stellen die korrespondierenden Herausvergrößerungen dar. (A, B, G, H) Während der frühen Morphogenese (Bohnestadium) ist in Bezug auf die Lokalisation von PKC-3 und AJM-1 kein Unterschied in der apikalen Akkumulation von WT- (A, B, n=13) und *erm-1(RNAi)*-Embryonen (G, H, n=12) zu erkennen. Im Verlauf der WT-Entwicklung (Komma-, Kaulquappe- und Schlingestadien, D-F) gelangen die AJ-Komponenten nach apiko-lateral, wo sie das zukünftige Darmlumen umgrenzen (D', Sternchen, n=43). (I-L) In *erm-1(RNAi)*-Embryonen unterbleibt die Ausbildung einer normalen AJ, die adhäsiven Komponenten sind nur unvollständig separiert, was zu Verengungen oder Verschlüssen des zukünftigen Darmlumens führt (Pfeile, n>57).

(I'- L') Pfeile zeigen auf Verschlüsse. (F, L) Die schwarzen Umrandungen zeigen die herausvergrößerten Regionen in F' und L'. Anterior ist links, dorsal ist oben. Lateralansicht (Ventralansicht in A und B). Eichstrich 10µm.

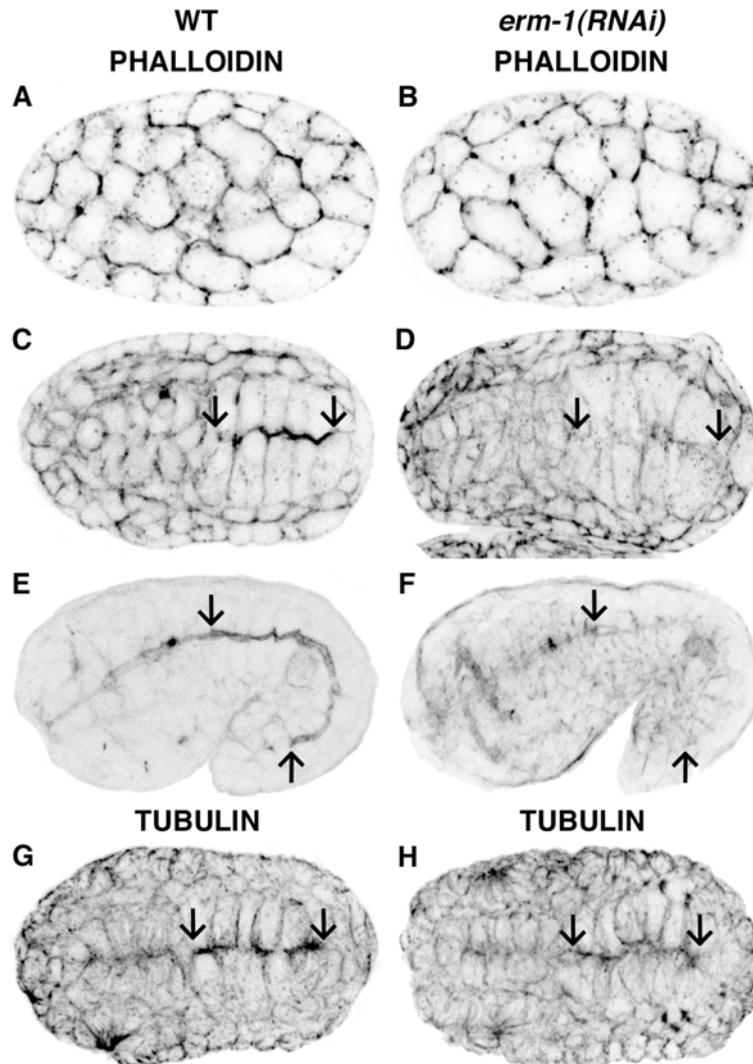


Abb. 14: Analyse des F-Aktin- und Mikrotubulizytoskeletts in WT- und *erm-1(RNAi)*-Embryonen.

Färbungen mit fluoreszierendem Phalloidin an WT- (**A, C, E**) und *erm-1(RNAi)*-Embryonen (**B, D, F**) und mit anti- α -Tubulin (Piperno und Fuller, 1985) an WT (**G**) und *erm-1(RNAi)*-Embryonen (**H**). (**A, B**) Während in frühen Zytokinesestadien keine Unterschiede in der Aktinverteilung von WT- (**A, n=7**) und *erm-1(RNAi)*-Embryonen (**B, n=14**) zu erkennen sind, zeigt sich in der frühen Morphogenese (Bohnestadium) ein erster Unterschied (**C, D**). In WT-Embryonen kommt es im Darmepithel zur apikalen Anreicherung von F-Aktin (**C, n=20**), die in *erm-1(RNAi)*-Embryonen unterbleibt (**D, n=15**). Auch in der späteren Morphogenese (Pflaumestadium) ist in *erm-1(RNAi)*-Embryonen eine drastische Reduktion des apikalen Aktins im Darm zu erkennen (vgl. **E, n=9** und **F, n=13**). Im Gegensatz dazu ist in *erm-1(RNAi)*-Embryonen die apikale Anreicherung von Tubulin im Darmepithel nicht gestört (vgl. **G, n=10** und **H, n=15**).

(**C-H**) Pfeile markieren den Pharynx-Darm und Darm-Hinterdarm Übergang. Anterior ist links, dorsal oben. Lateralansicht. Eichstrich 10 μ m.

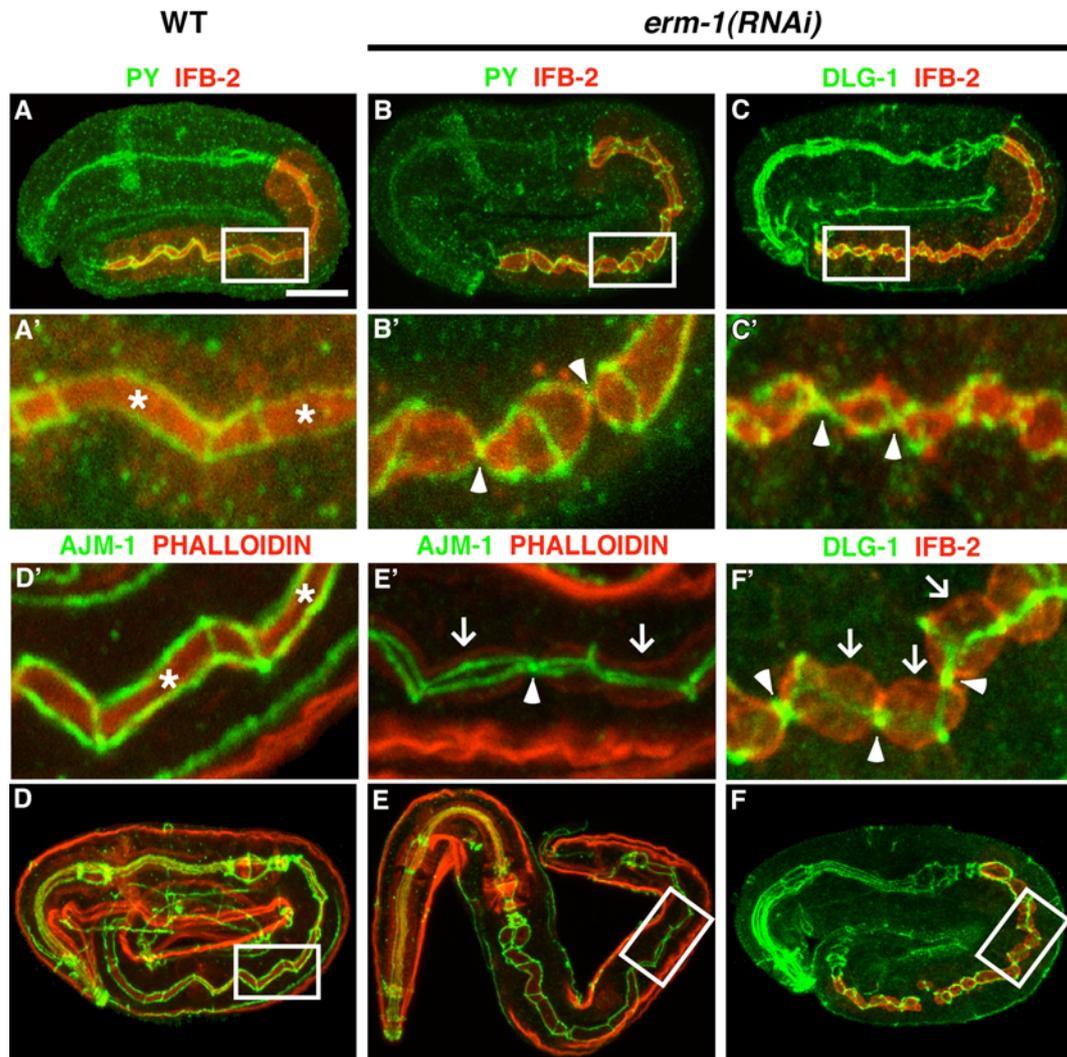


Abb. 15: Der Verlust von ERM-1 führt zu einem veränderten AJ-Muster und gestörter Tubulogenese.

Färbungen von WT- (A, D) und *erm-1(RNAi)*-Embryonen (B, C, E, F) in der späten Morphogenese (Schlinge-, Bretzelstadien) gegen Phosphotyrosin (PY, A, B), DLG-1 (C, F) und AJM-1 (D-F) als AJ-Marker und IFB-2 (A-C) bzw. fluoreszierendes Phalloidin (D-F) als apikale Marker. A'-F' stellen die entsprechenden Herausvergrößerungen dar. In WT-Embryonen kennzeichnen IFB-2 (n=11) und Phalloidin (n=36) das zukünftige Lumen, welches von den AJ-Markern begrenzt wird (A, D). In *erm-1(RNAi)*-Embryonen zeigt sich ein gestörter Verlauf des Darmlumens, da AJ-Komponenten am apikalen Pol akkumulieren (B, n=7; C, n=27; E, n=9; F, n=14) und somit zu Verschlüssen (Pfeilköpfe) oder Verengungen des Darmlumens führen. An den verengten Stellen ist zu vermuten, daß sich die apikale Membrandomäne normal ausgebildet hat und durch die AJ "eingedrückt" wird (E', F', Pfeile). Während die IFB-2 Färbung in *erm-1(RNAi)*-Embryonen unbeeinflusst bleibt, ist die Phalloidinfärbung reduziert (vgl. E und F).

(A', D') Das Sternchen zeigt den normalen Verlauf des Darmlumens. (B', C'; E', F') Die Pfeilköpfe zeigen auf Verschlüsse. (E', F') Pfeile zeigen auf "eingedrückte" Membrandomäne. (A-C; D-F) Die weißen Rahmen kennzeichnen die Herausvergrößerungen in (A'-C') und (D'-F'). Anterior ist links. Lateralansicht. Eichstrich 10 μm .

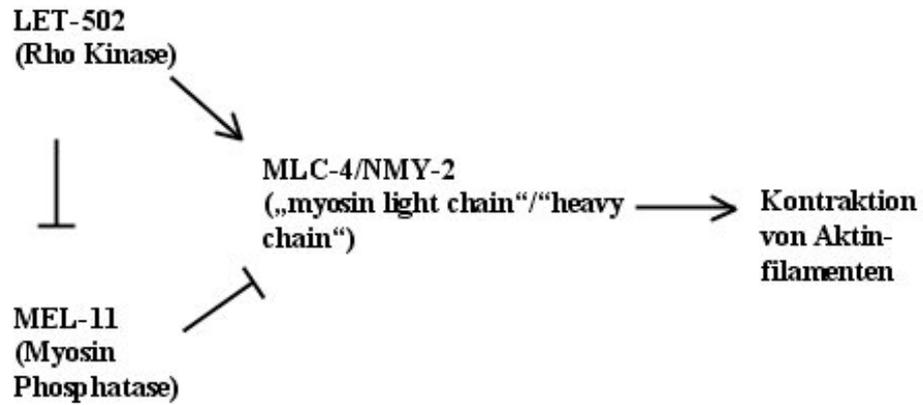


Abb. 16: Übersicht über die an der Aktin-Myosinkontraktion beteiligten Komponenten (modifiziert nach Piekny et al., 2002).

Die Rho-Kinase LET-502 phosphoryliert die „myosin light chain“ MLC-4 (die regulatorische Untereinheit von Myosin) und führt somit zu deren Aktivierung und somit zu einer Kontraktion von Aktinfilamenten. Die Phosphatase MEL-11 dephosphoryliert MLC-4 und bewirkt deren Inaktivierung. MEL-11 wird durch LET-502 inhibiert.

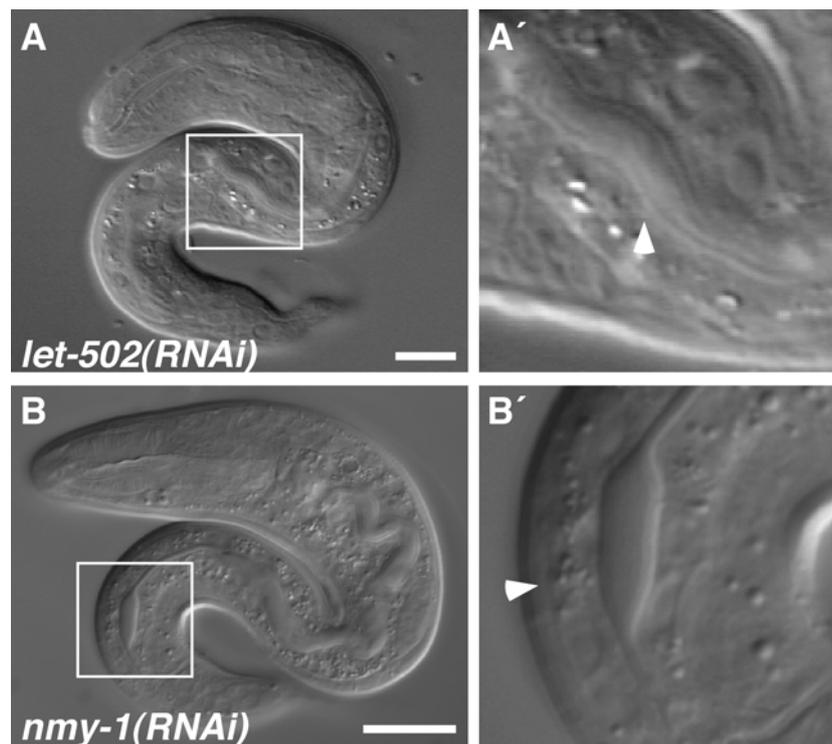


Abb. 17: DIK-Analyse der larvalen *let-502*- und *nmy-1(RNAi)*-Phänotypen.

Unter DIK-Optik zeigen *let-502(RNAi)*-Larven partielle Verdickungen des Darmlumens (A, A' Pfeilkopf, n=5), die ebenso bei *nmy-1(RNAi)*-Larven zu sehen sind (B, B', Pfeilkopf, n=4). (A', B') stellen entsprechende Herausvergrößerungen dar.

Die weißen Rahmen kennzeichnen die Herausvergrößerungen in (A', B'). Eichstrich 10µm.

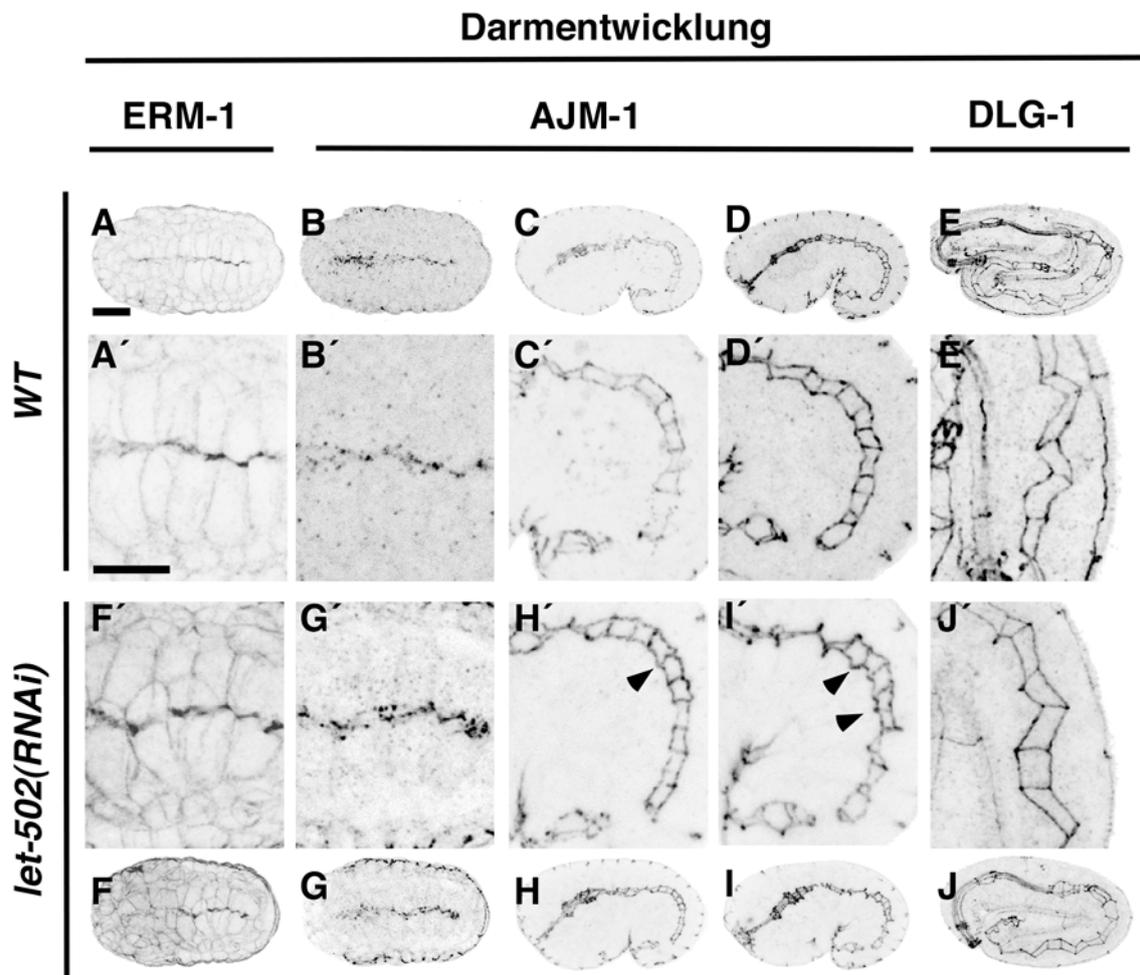


Abb. 18: Analyse des embryonalen *let-502(RNAi)*-Phänotyps I.

WT- (A-E) und *let-502(RNAi)*-Embryonen (F-J) in verschiedenen Morphogenesestadien gefärbt gegen ERM-1 als apikalen Darmmarker (A, F) und AJM-1 (B-D) bzw. DLG-1 (E-J) als AJ-Marker. (A'-J') stellen die entsprechenden Herausvergrößerungen dar. In der frühen Morphogenese (Bohnestadium) lokalisieren ERM-1 und AJM-1 sowohl in WT- (A, B, n>10) als auch in *let-502(RNAi)*-Embryonen (F, G, n=8) am zukünftigen apikalen Pol der Darmzellen. Während im WT die AJ weiterhin nach apikolateral gelangt (C-E, n>43), expandiert diese in *let-502(RNAi)*-Embryonen nach lateral (H-J, n>20, Pfeilkopf).

(G'-I') Pfeilköpfe zeigen laterale Ausdehnungen. Anterior ist links. Lateralansicht. Ventralansicht in (A, A', F, F'). Eichstrich 10µm.

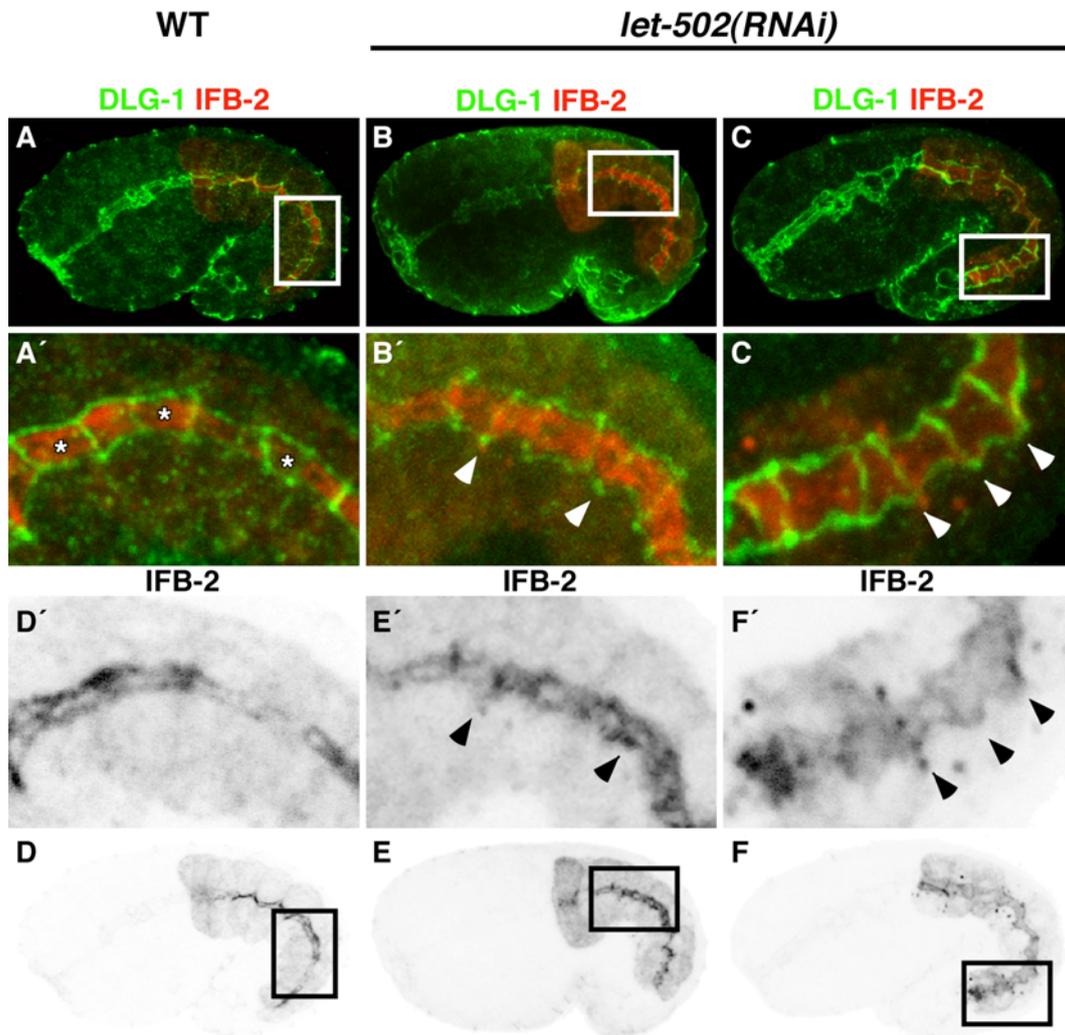


Abb. 19: Analyse des embryonalen *let-502(RNAi)*-Phänotyps II.

WT- (A, D) und *let-502(RNAi)*-Embryonen (B-F) im Komma- bzw. Kaulquappenstadium gefärbt gegen IFB-2 als Lumenmarker (A-F) und DLG-1 als AJ-Marker (A-C). (A'-F') stellen die entsprechenden Herausvergrößerungen dar. Im Gegensatz zum WT (A,D, n>15) zeigen *let-502(RNAi)*-Embryonen eine laterale Expansion der AJ (B, C), die mit einer lateralen Ausdehnung des Darmlumen einhergeht (B, C, E, F, n=17).

(B', C', E', F') Pfeilköpfe zeigen laterale Expansion. Die Umrandungen in (A-F) zeigen die entsprechenden Herausvergrößerungen in (A'-F'). Anterior ist links. Lateralansicht. Eichstrich 10µm.

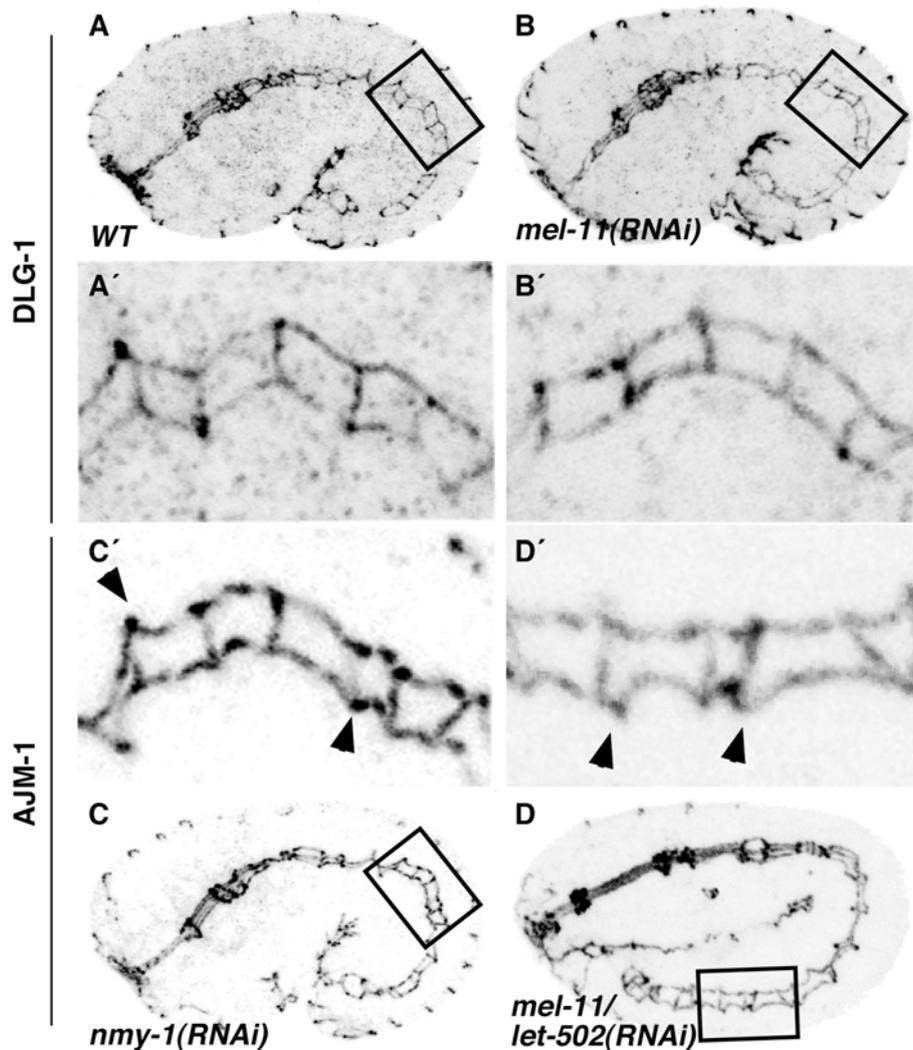


Abb. 20: Analyse von *mel-11(RNAi)*-, *nmy-1(RNAi)*- und *mel-11/let-502(RNAi)*- Embryonen. WT- (A), *mel-11(RNAi)*- (B), *nmy-1(RNAi)*- (C) und *mel-11/let-502(RNAi)*-Embryonen wurden gegen DLG-1 (A, B) bzw. AJM-1 (C, D) als Marker für die AJ gefärbt. (A'-D') stellen die entsprechenden Herausvergrößerungen dar. Während in *mel-11(RNAi)*-Embryonen die AJ wildtypisch ist (vgl. A, B, n=8), ist in *nmy-1*- (C, n>15) und in *mel-11/let-502(RNAi)*-Embryonen (D, n=5) eine laterale Expansion der AJ zu erkennen. (C', D') Pfeilköpfe zeigen laterale Ausdehnungen. Die schwarzen Umrandungen in (A-D) zeigen die entsprechenden Herausvergrößerungen in (A'-D'). Anterior ist links. Lateralansicht. Eichstrich 10µm.

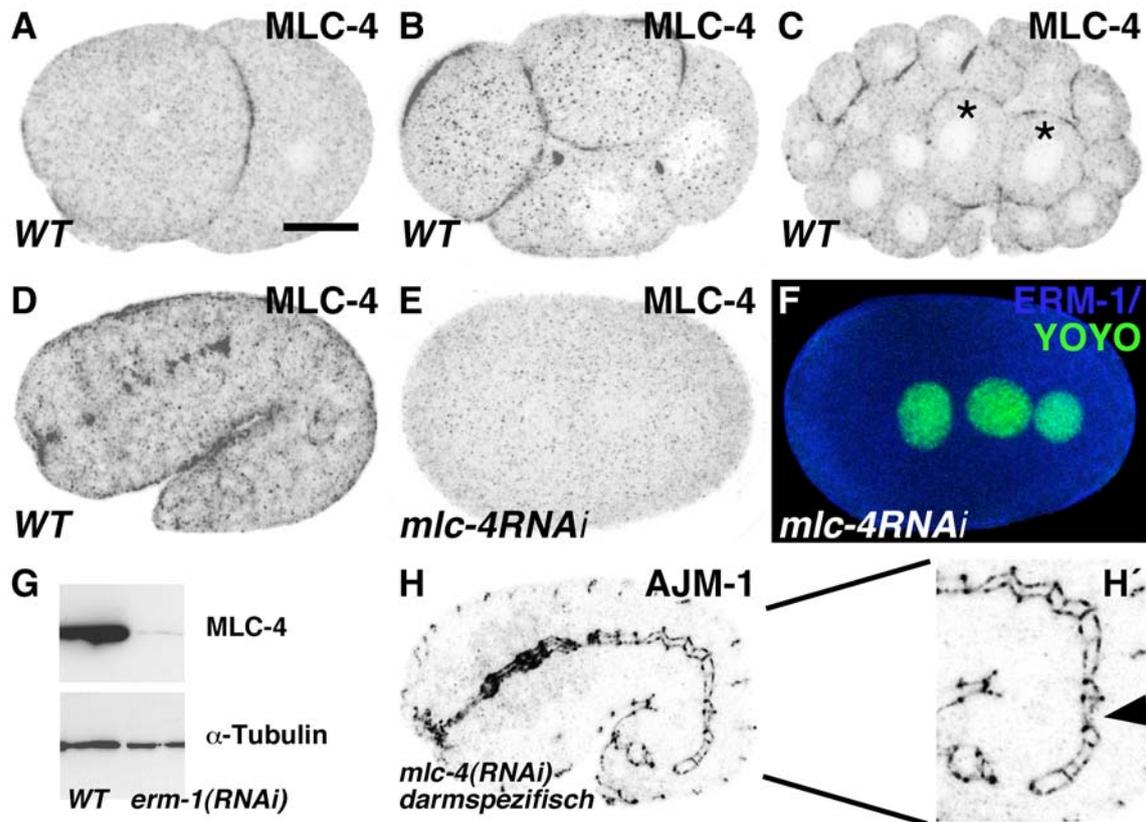


Abb. 21: Lokalisation von MLC-4 und Analyse des embryonalen *mlc-4(RNAi)*-Phänotyps.

(A-E) Färbungen von WT- (A-D) und *mlc-4(RNAi)*-Embryonen (E) in verschiedenen Stadien gegen MLC-4. *mlc-4(RNAi)*-Embryo gefärbt gegen ERM-1 und YOYO (F) und darmspezifische RNAi von *mlc-4(RNAi)*-Embryonen (G, G') gefärbt gegen AJM-1. Zunächst im Zweifachstadium an der Plasmamembran lokalisierend (A, n>10), zeigt MLC-4 eine präferentielle Lokalisation im Kortex der AB-Zell-Linie (B, n>10). In späteren Zytokinesestadien ist MLC-4 im Kortex der meisten Zellen zu finden, wobei auch eine schwache kortikale Färbung in den Darmzellen-Vorläufern zu finden ist (C, Sternchen, n=5). Während Morphogenesestadien zeigt sich eine schwache kortikale Färbung aller Zellen, in Pharynx und Hypodermis in eine apikale Akkumulation zu sehen (D, n=8). In *mlc-4(RNAi)*-Embryonen ist keine MLC-4 Lokalisation mehr nachweisbar (E), wobei Zytokinesedefekte zu sehen sind (F, n=9). (G) Ein Western Blot zeigt eine spezifische Bande bei 20 kDa, die in *mlc-4(RNAi)*-Embryonen nahezu nicht mehr zu detektieren ist, als Ladekontrolle dient α -Tubulin (Piperno und Fuller, 1985). (H, H') Darmspezifische RNAi von *mlc-4* führt zu leichteren Defekten im posterioren Bereich der Darm-AJ (Pfeilkopf, n=10/80).

(C) Die Sternchen zeigen die E-Zellen. (H') Pfeilkopf deutet auf Defekte in der AJ-Struktur. Anterior ist links. Eichstrich 10 μ m.

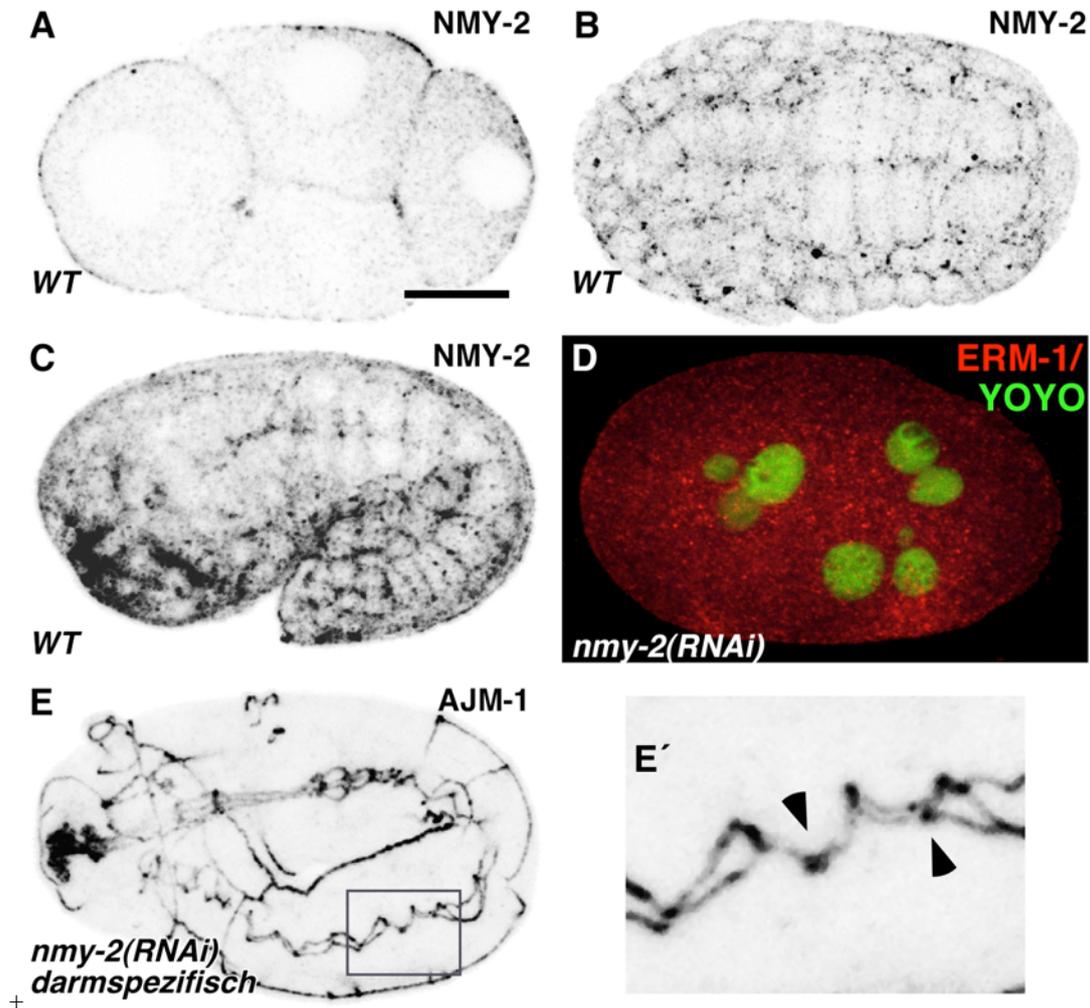


Abb. 22: Lokalisation von NMY-2 im Embryo und Analyse des embryonalen *nmy-2(RNAi)*-Phänotypen.

(A-C) Färbungen gegen NMY-2 in verschiedenen WT-Stadien. ERM-1 und YOYO-Färbungen in *nmy-2(RNAi)*-Embryonen (D) und AJM-1 Färbungen bei darmspezifischer RNAi von *nmy-2* (E, E'). NMY-2 ist in frühen Zytokinesestadien im Zellkortex aller Zellen exprimiert (A, n=7). Diese Lokalisation bleibt auch während der Morphogenese (Bohnestadium, B und Pflaumestadium, C, n>15) bestehen, wobei eine schwache apikale Akkumulation in Pharynx- und Darmzellen zu erkennen ist. (D) RNAi von *nmy-2* führt zu einem frühen embryonalen Arrest mit Zytokinesedefekten (n=5). (E, E') Darmspezifische RNAi von *nmy-2* verursacht geringe Störungen in der AJ-Struktur des Darmes (n=14/120).

(E) Rahmen stellt die entsprechende Herausvergrößerung in (E') dar. (E') Pfeilkopf zeigt auf Defekte im AJ-Muster. Anterior ist links. Eichstrich 10 μ m.

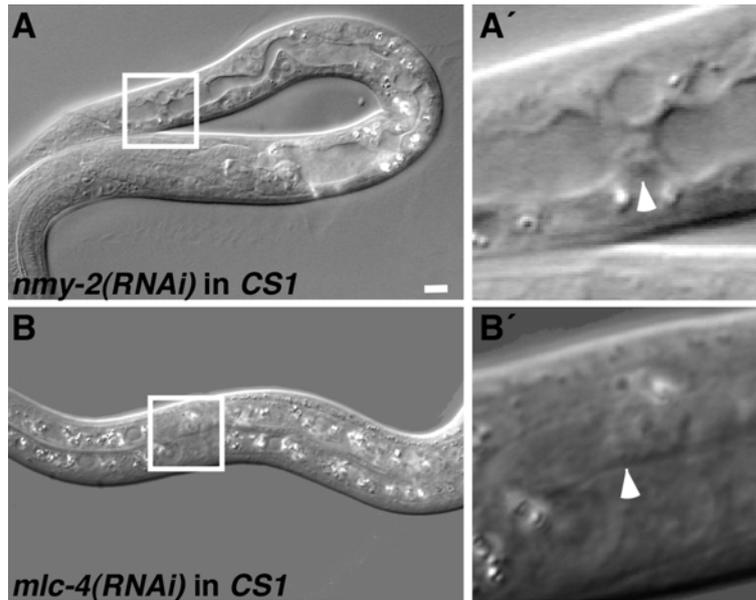


Abb. 23: Darmspezifische RNAi von *nmy-2* und *mlc-4* führt zu larvalem Arrest.

(**A und B**) DGI-Aufnahmen von *nmy-2(RNAi)*- (**A**) und *mlc-4(RNAi)*-Embryonen (**B**). (**A'**, **B'**) stellen die entsprechenden Herausvergrößerungen dar. Während darmspezifische RNAi von *nmy-2* zu larvalem Arrest mit Lumenweiterungen und mutmaßlichen Verschlüssen führt (**A**, **A'**, Pfeilkopf, n=5/130), resultiert diese bei *mlc-4* in larvalem Arrest mit "Verdickungen" des Darmlumens (**B**, **B'**, Pfeilkopf, n=5/120).

(**A'**, **B'**) Pfeilköpfe zeigen auf Darmdefekte. Die weißen Umrandungen in (**A**, **B**) zeigen die entsprechenden Herausvergrößerungen in (**A'**, **B'**). Eichstrich 10µm.

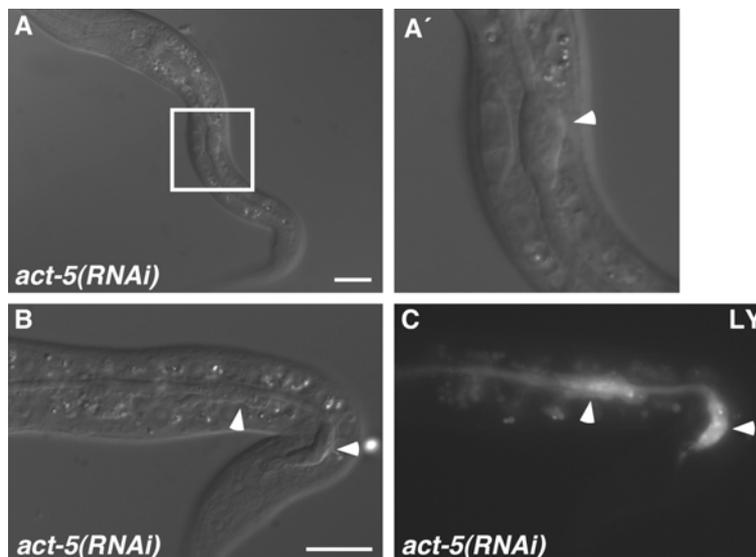


Abb. 24: Analyse des larvalen *act-5(RNAi)*-Phänotypen

DGI- (**A**, **A'**, **B**) und Fluoreszenzaufnahmen nach Fütterung mit Lucifer Yellow (LY, **C**) von *act-5(RNAi)*-Larven. *act-5(RNAi)*-Larven zeigen partielle "Verdickungen" des Darmlumens (**A**, **A'**, Pfeilkopf), die für LY keine Barriere darstellen (vgl. **B**, **C**, n=12, Pfeilköpfe).

(**A'**-**C**) Pfeilköpfe zeigen auf "Verdickungen". Der weiße Rahmen in (**A**) zeigt die Herausvergrößerung in (**A'**). Anterior ist links. Eichstrich 10 µm.

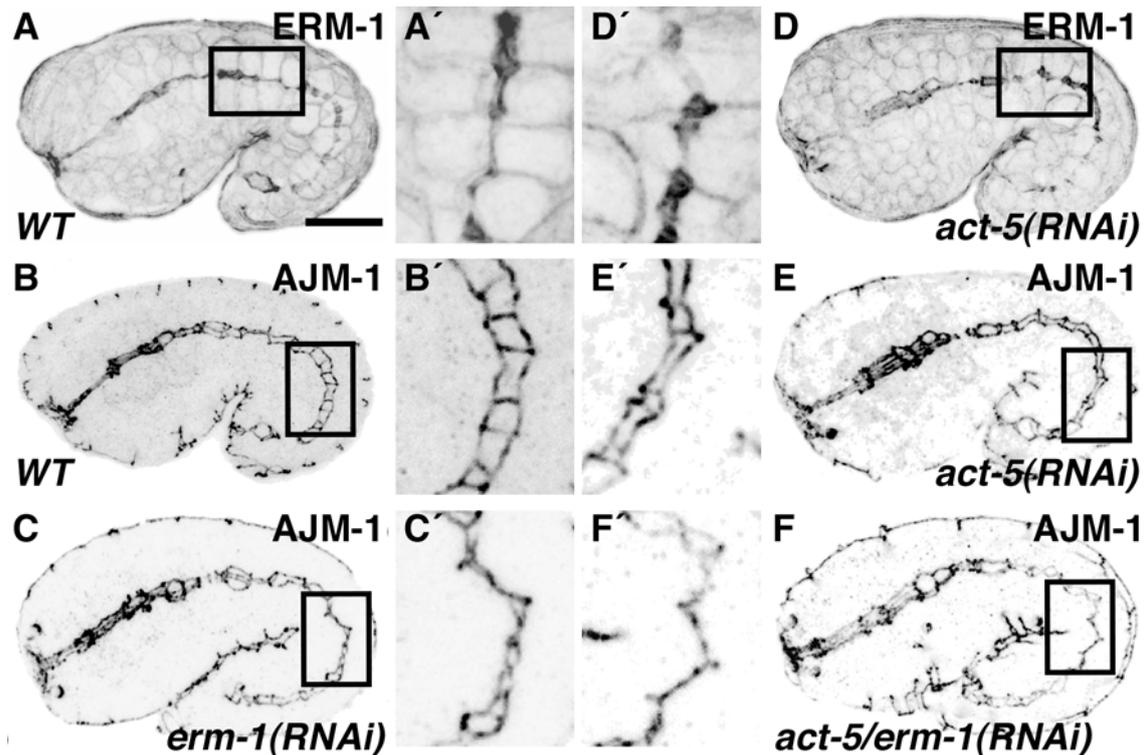


Abb. 25: Die Analyse des embryonalen *act-5(RNAi)*-Phänotyps.

WT- (**A**, **B**), *erm-1(RNAi)* (**C**), *act-5(RNAi)* (**D**, **E**) und *act-5/erm-1(RNAi)*-Embryonen gefärbt gegen ERM-1 als apikalen (**A**, **D**) und AJM-1 als AJ-Marker (**B**, **C**, **E**, **F**). (**A'**-**F'**) stellen die entsprechenden Herausvergrößerungen dar. ERM-1 ist sowohl in WT- und als auch in *act-5(RNAi)*-Embryonen apikal in den Darmzellen angereichert (**A**, $n > 50$ und **D**, $n > 20$). Allerdings zeigen *act-5(RNAi)*-Embryonen "Verengungen" der AJ-Struktur (**B** und **E**). Ein Doppelknockout von *act-5* und *erm-1* resultiert in einen *erm-1(RNAi)*-Phänotypen (vgl. **C**, $n > 25$, **F**, $n = 10$).

Die schwarzen Umrandungen in (**A**-**F**) kennzeichnen die entsprechenden Herausvergrößerungen in (**A'**-**F'**). Anterior ist links. Eichstrich 10 μ m.

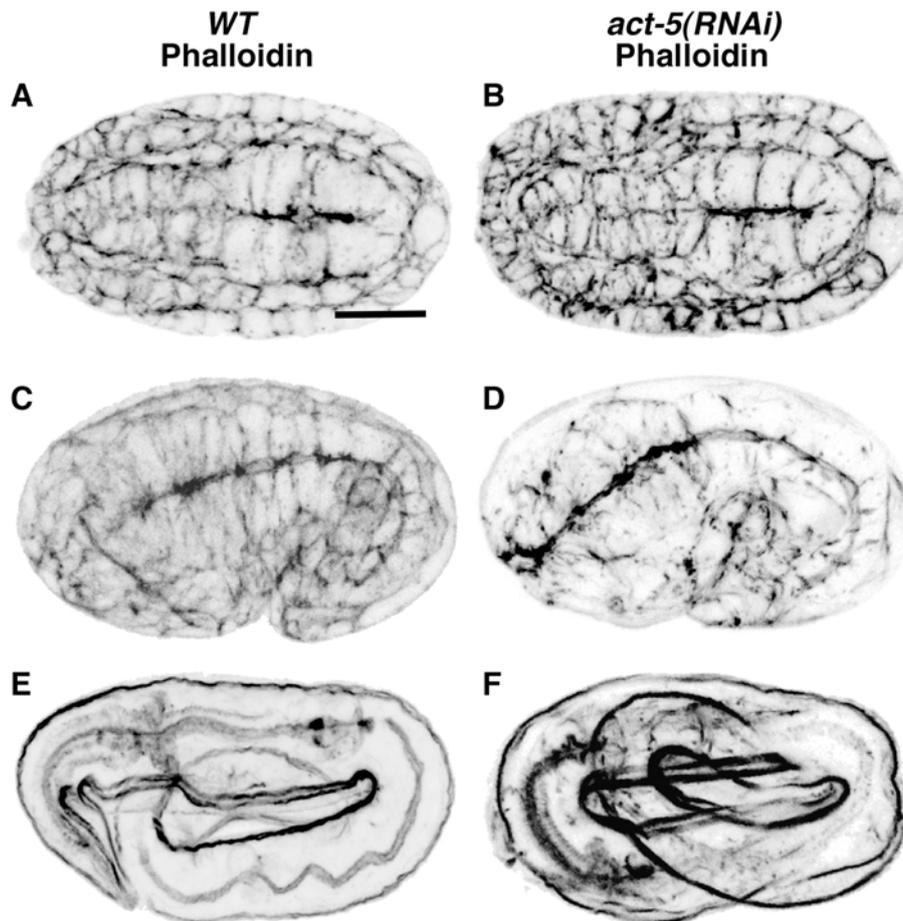


Abb. 26: Die F-Aktin Verteilung in WT- und *act-5(RNAi)*-Embryonen.

WT- (A, C, E) und *act-5(RNAi)*-Embryonen (B, D, F) in verschiedenen Morphogenesestadien wurden mit fluoreszierendem Phalloidin gefärbt, um Aktin-Filamente sichtbar zu machen. In der frühen Morphogenese (Bohnestadium) ist sowohl im WT (A, n=25), als auch in *act-5(RNAi)*-Embryonen (B, n=5) eine apikale Aktinakkumulation in den Darmzellen zu erkennen. In *act-5(RNAi)*-Embryonen (D, n=5) ist die Lokalisation von F-Aktin auch im Verlauf der weiteren Morphogenese (Pflaumestadium) nicht vom WT (C, n>15) zu unterscheiden. Erst zum Ende der Embryonalentwicklung (Bretzelstadium) ist in *act-5(RNAi)*-Embryonen F-Aktin im apikalen Kortex der Darmzellen vermindert (vgl. E, F, n=5).

Anterior ist links. Eichstrich 10 μ m.

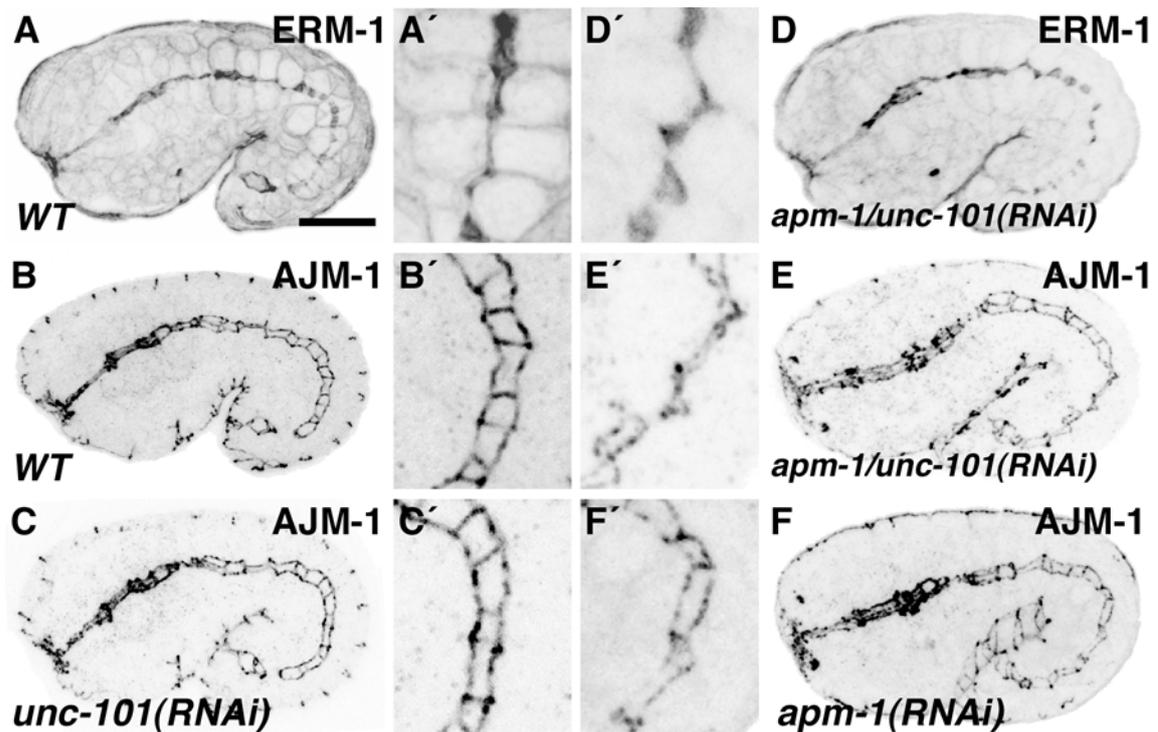


Abb. 27. Vergleich der AJ-Struktur von WT und in Endozytose involvierte Proteine

WT (A, D), *apm-1/unc-101(RNAi)* (D, E), *unc-101(RNAi)* (C) und *apm-1(RNAi)*-Embryonen (F) gefärbt mit ERM-1 (A, D) und AJM-1 als AJ-Marker (B, C, E, F). (A'-F') stellen die korrelierenden Herausvergrößerungen dar. Während die ERM-Lokalisation in *apm-1/unc-101(RNAi)*-Embryonen (D) der nahezu WT-Situation (B) entspricht, zeigt die AJ-Struktur zumindestens im posterioren Bereich eine Ähnlichkeit zu einem *erm-1(RNAi)*-Phänotypen (E). Dagegen erscheint die AJ-Struktur in den Einzelknockouts eher wildtypisch (C und F). Anterior ist links. Eichstrich 10µm.

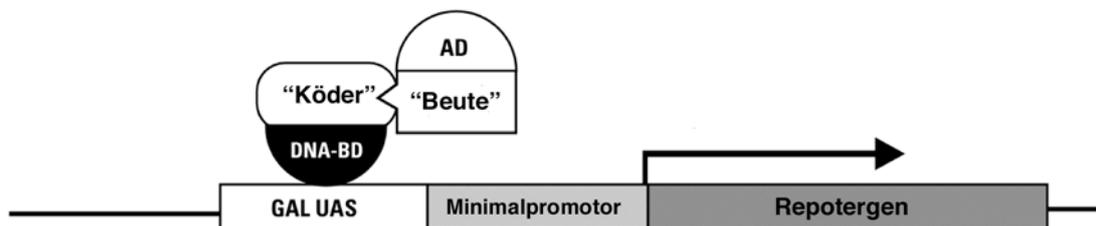


Abb. 28: Prinzip des Hefe-2-Hybrid (H2H) Interaktionstests.

Der Transkriptionsfaktor GAL4 besteht aus 2 Untereinheiten: einer DNA-Bindedomäne (GAL4-BD) und einer Aktivierungsdomäne (GAL4-AD). Die DNA-BD bindet an den GAL UAS-Promotor und lokalisiert weitere Transkriptionsfaktoren. Die GAL4-AD sorgt dafür, daß dann die Transkription initiiert wird. Diese Untereinheiten sind im Rahmen eines H2H-Tests mit den "Köder"- bzw. "Beute"-Proteinen fusioniert. Beide Fusionsproteine bewirken alleine keine Transkription des Reportergene. Erst wenn "Köder"- und "Beute"-Protein miteinander interagieren, kann eine Transkription der Reportergene stattfinden.

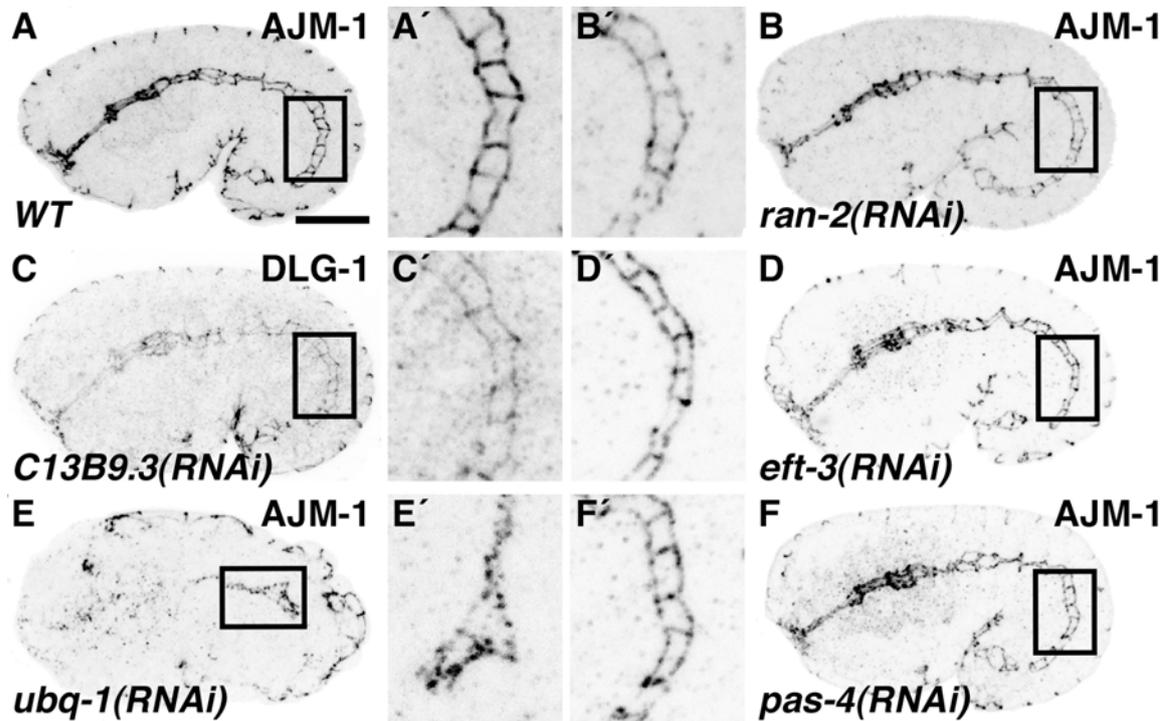


Abb. 29: Analyse des AJ-Musters der Hefe-Zwei Hybrid Interaktionspartner von ERM-1.
 Färbungen von WT (A) und Interaktionspartnern von ERM-1 (B-F) in verschiedenen Morphogenesephasen gegen AJM-1 als AJ-Marker. (A-F) stellen die entsprechenden Herausvergrößerungen dar. Wie auch der WT (A) zeigen auch die Knockouts verschiedener Interaktionspartner von ERM-1 das typische strickleiterähnliche AJ-Muster (B, C, F). Gezeigt sind *ran-2*, codiert für ein Rho-GAP (B, n>20), C13B9.3, welches Homologien zu einem Clathrin-Adapter-Molekül aufweist (C, n>20), *eft-3*, codiert für einen Elongationsfaktor und *pas-4*, welches für eine Proteasomenuntereinheit codiert (F, n>20). Nur *ubq-1*, welches für ein Ubiquitin codiert, zeigt ein irreguläres AJ-Muster (E, n=11).
 Anterior ist links. Dorsal ist oben. Lateralansicht. Eichstrich 10 μ m.

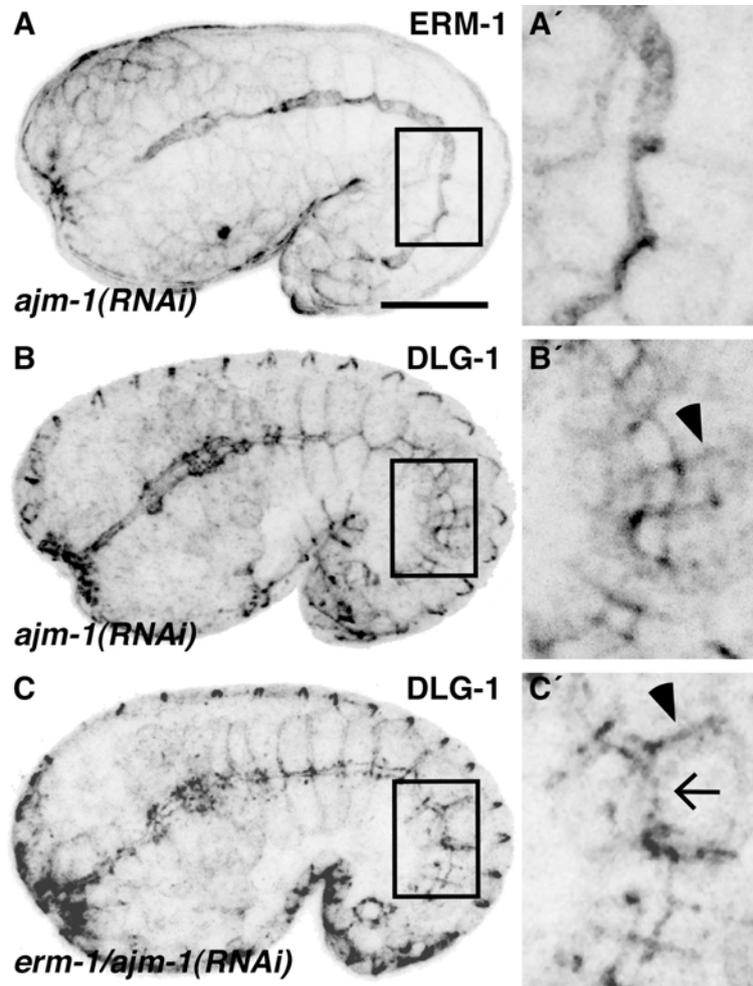


Abb. 30: Analyse von ERM-1 in Abhängigkeit von AJM-1

Färbungen von *ajm-1(RNAi)*- (A, B) und *erm-1/ajm-1(RNAi)*-Embryonen (C) gegen ERM-1 als apikalen (A) und DLG-1 als AJ-Marker (B, C). (A'-C') stellen die dementsprechenden Herausvergrößerungen dar. Während in *ajm-1(RNAi)*-Embryonen eine normale Verteilung von ERM-1 (A, A, n=15) zu beobachten ist, tritt hier deutlich die für den Phänotyp typische, laterale Expansion von DLG-1 hervor (B, Pfeilkopf, Segbert et al., 04). In einem Doppelknockout von *erm-1* und *ajm-1* zeigt sich die Summierung beider Einzelphänotypen, d.h. der laterale Schift der DLG-1-Expression und die "verengte" AJ (C, Pfeilkopf, Pfeil, n=11).

(B', C') Pfeilköpfe zeigen auf die laterale Expansion von DLG-1, Pfeil zeigt auf "verengte" AJ. (A-C) Die schwarzen Rahmen kennzeichnen die entsprechenden Herausvergrößerungen in (A'-C'). Anterior ist links. Dorsal ist oben. Lateralansicht. Eichstrich 10µm.

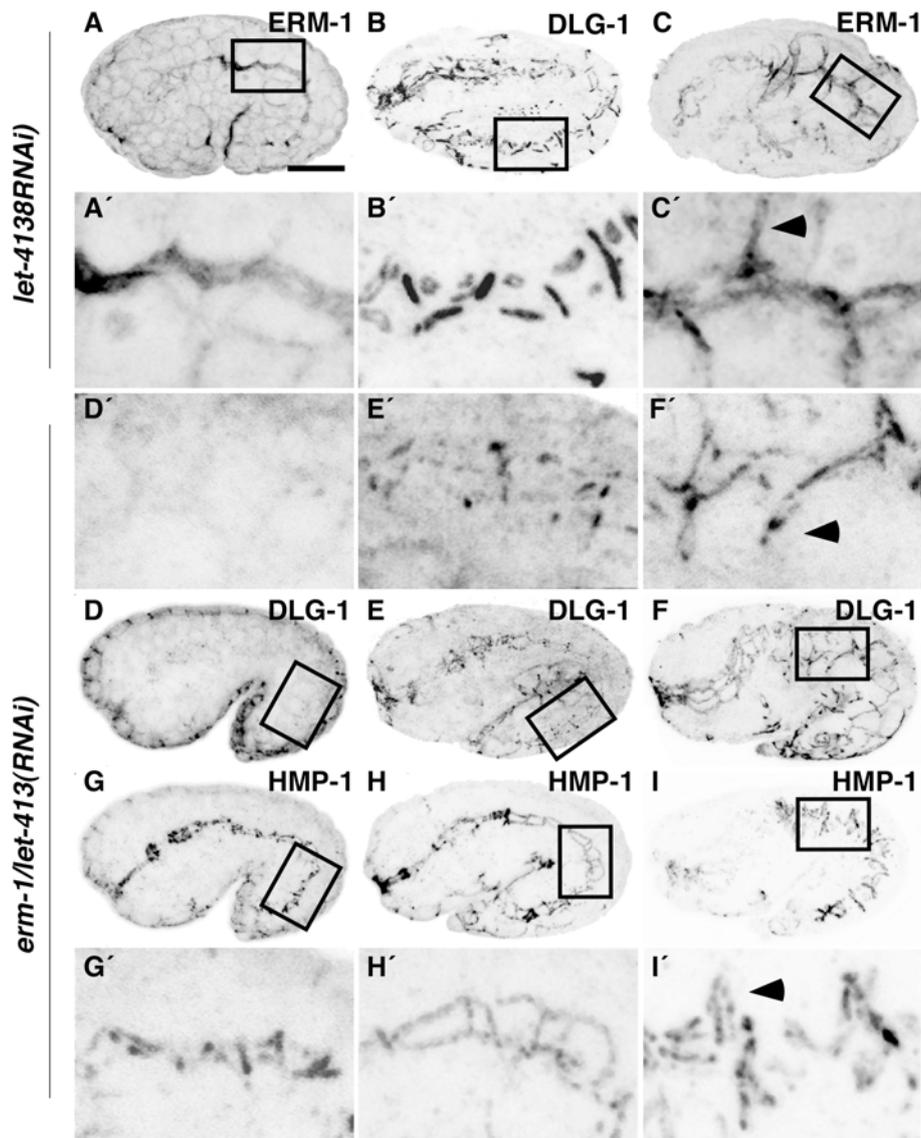


Abb. 31: Analyse von ERM-1 in Abhängigkeit von LET-413

Färbungen von *let-413(RNAi)* (A-C) und *erm-1/let-413(RNAi)*-Embryonen (D-I) gegen ERM-1 als apikalen Marker (A, C), DLG-1 (B, D-F) und HMP-1 als AJ-Marker. (A'-I') stellen die entsprechenden Herausvergrößerungen dar. Während in der frühen Morphogenese (Kaulquappstadium) von *let-413(RNAi)*-Embryonen die ERM-1-Lokalisation der WT-Situation entspricht (A, A', n=3), zeigt sich im weiteren Verlauf eine Ausdehnung nach basolateral (C, n=6), hiervon sind sämtliche apikale und apiko-laterale Proteine betroffen (Daten nicht gezeigt). (D) In *erm-1/let-413(RNAi)*-Embryonen (n=13) ist in Kaulquappstadium keine DLG-1-Lokalisation sichtbar, welches dem *let-413(RNAi)*-Phänotyp entspricht. Später gelangt DLG-1 in die AJ (Pflaumestadium, E, n=14) und zeigt ein gespottetes Muster, allerdings nicht den erwarteten *erm-1(RNAi)*-Phänotypen. Schließlich fällt die AJ, wie in *let-413(RNAi)* auf die basolaterale Membrandomäne (F, n=8). Im Vergleich dazu verbleibt in *erm-1/let-413(RNAi)*-Embryonen die HMP-1-Lokalisation, entsprechend *erm-1(RNAi)*-Embryonen; zunächst am apikalen Kortex der Darmzellen (G, n=11), wobei sich dieses Akkumulation im Verlauf der Morphogenese auflöst (H, Pflaumestadium, n=9) und die AJ schließlich nach basolateral fällt (I, n=5).

(C', F', I') Pfeilköpfe zeigen auf laterale Ausdehnungen der AJ. (A-I) Die schwarzen Rahmen kennzeichnen die entsprechenden Herausvergrößerungen in (A'-I'). Anterior ist links. Dorsal ist oben. Lateralansicht. Eichstrich 10µm.

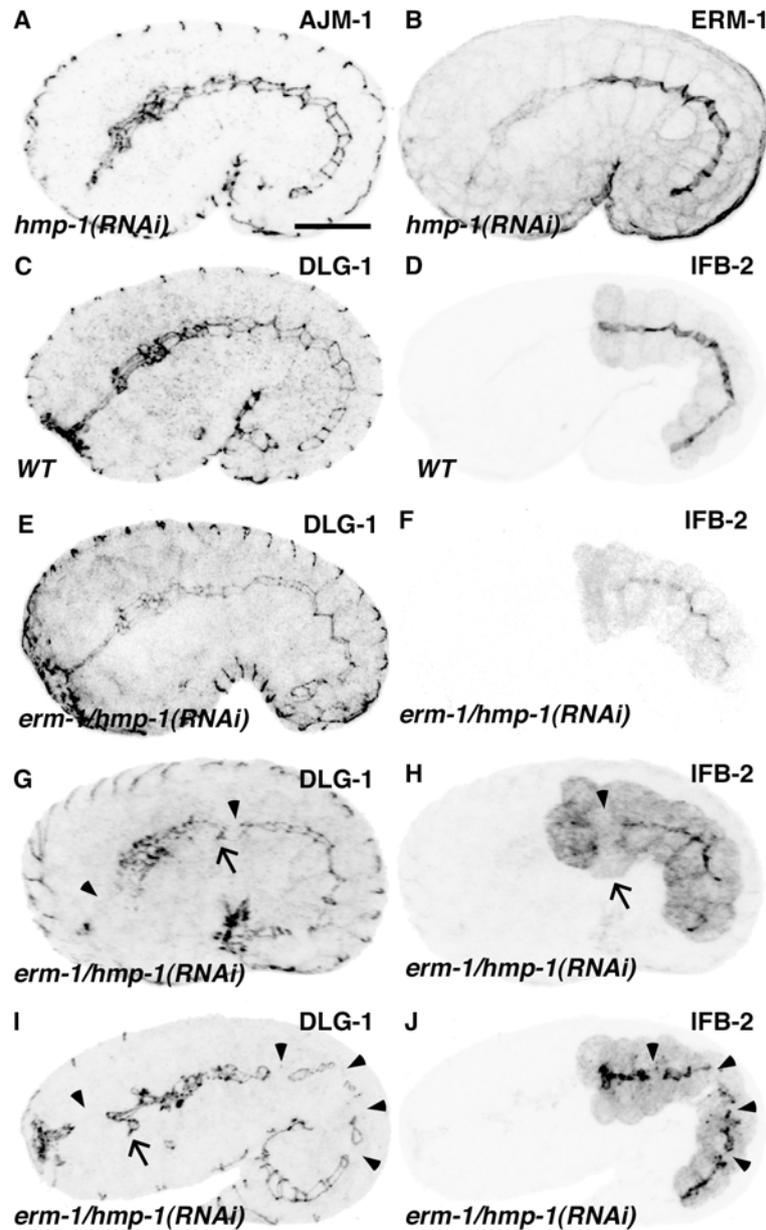


Abb. 32: Analyse von ERM-1 in Abhängigkeit von HMP-1

Färbungen von *hmp-1(RNAi)*- (A, B), WT- (C, D) und *erm-1/hmp-1(RNAi)*- Embryonen (E-J) in verschiedenen Morphogenestadien gegen AJM-1 (A) und DLG-1 (C, E, G, I) als AJ-Marker, IFB-2 (D, F, H, J) und ERM-1 als apikale Marker (B). Die AJ-Struktur und die ERM-1 Lokalisation in *hmp-1(RNAi)*-Embryonen entsprechen der WT-Situation (A, B, n=5). Während in WT-Embryonen das Muster von AJ und Lumen kontinuierlich ist (C, D, n>15), erscheint es in *erm-1/hmp-1(RNAi)*-Embryonen fragmentiert, d.h. die Zell-Zelladhäsion ist defekt. (G-J). Die Integrität der AJ ist in der frühen Morphogenese (Bohnestadium) zunächst normal (E, F, n=7), die Defekte treten erst mit fortschreitender Elongation des Embryos auf (G, H, Pfeilköpfe, n=10) und verstärken sich (I, J, Pfeilköpfe, n=11). (G, I) Auch im Pharynx sind Adhäsionsdefekte zu sehen (Pfeile). (G-J) Pfeilköpfe zeigen auf fehlende AJ- bzw. apikale Marker. (G) Pfeil zeigt auf "herausgerissene" AJ. (F) Pfeil zeigt auf eine aus dem Verband getretene Zelle. (G, I) Pfeil zeigt auf fehlende bzw. "abgerissene" Pharynx-AJ. Anterior ist links. Dorsal ist oben. Lateralansicht. Eichstrich 10µm.

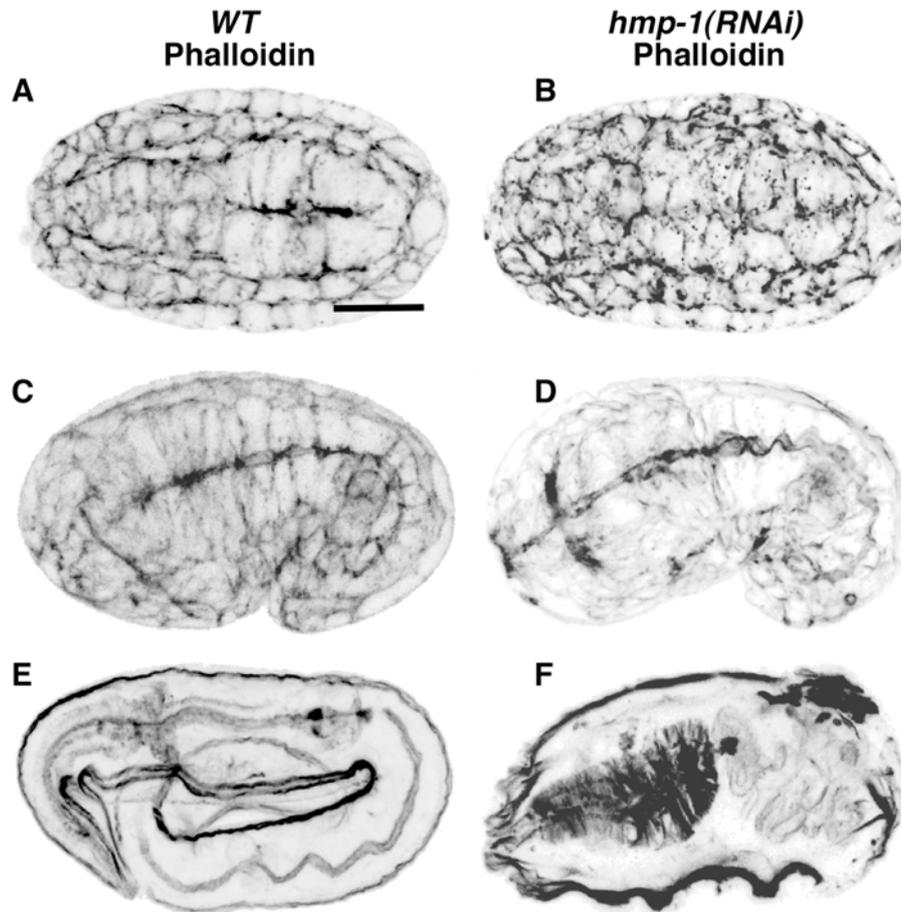


Abb. 33: Analyse des Aktinzytoskeletts im Darmepithel von *hmp-1(RNAi)*-Embryonen

Färbungen mit fluoreszierendem Phalloidin an WT- (A, C, E) und *hmp-1(RNAi)*-Embryonen (B, D, F) in verschiedenen Morphogenesestadien. In WT-Embryonen ist ab Beginn der Morphogenese eine apikale Akkumulation von Aktin in den Darmzellen zu beobachten (A, C, E, n=25). In *hmp-1(RNAi)*-Embryonen unterbleibt in der anfänglichen Morphogenese (B, Bohnestadium, n=7) die Aktinanreicherung im apikalen Kortex des Darmepithel, dies ist auch noch in späteren Stadien (D, n=12, F, n=4, Kaulquappe und arretiertes Stadium) sichtbar.

Anterior ist links. Dorsal ist oben. Lateralansicht. Eichstrich 10µm.

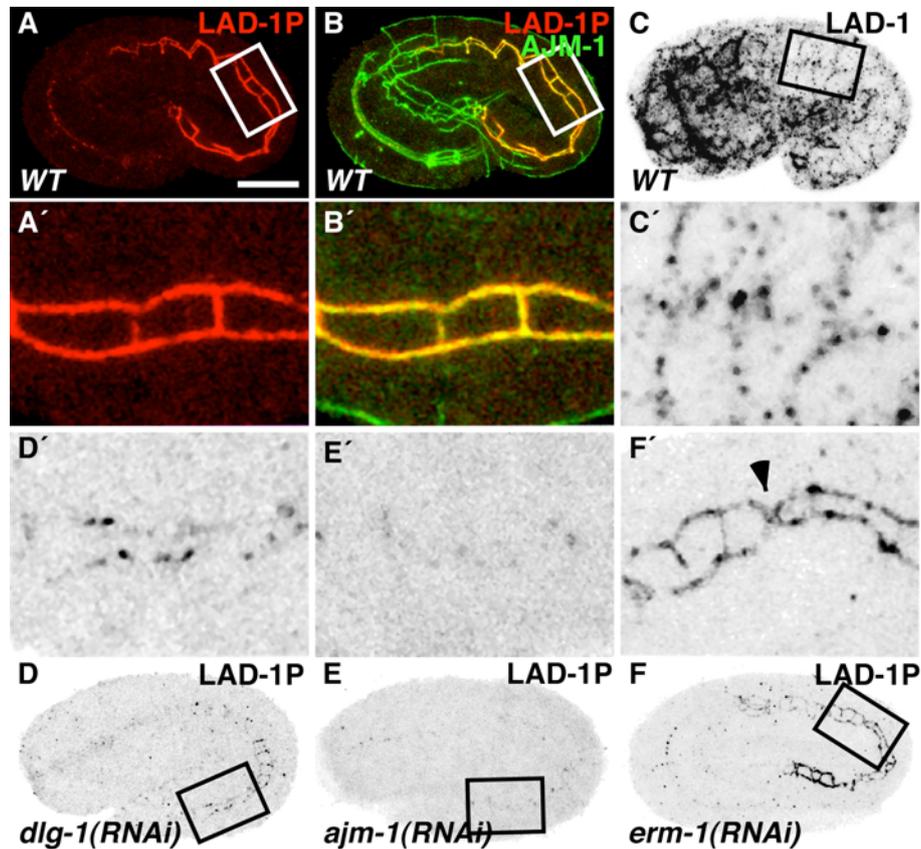
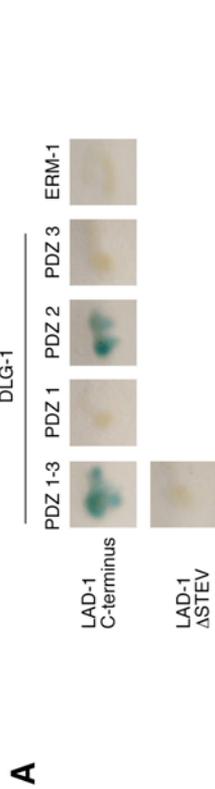
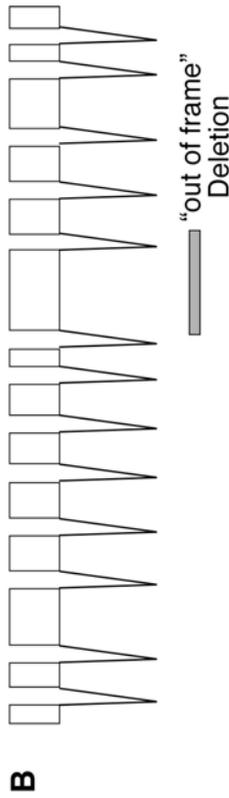


Abb. 34: Die Lokalisation von LAD-1 in WT und *dlg-1*- bzw. *erm-1*(RNAi)-Embryonen

(A, B, D, F) Färbungen gegen phosphoryliertes LAD-1 (LAD-1P, rot) in WT- (A, B), *dlg-1*(RNAi)- (D) und *erm-1*(RNAi)-Embryonen (F), unphosphoryliertes LAD-1 in WT-Embryonen (C) und AJM-1 als AJ-Marker in WT- (B, grün) und *dlg-1*(RNAi)-Embryonen (E). (A'-F') stellen die entsprechenden Herausvergrößerungen dar. LAD-1P lokalisiert spezifisch in der basalen Einheit der AJ des Darmepithels (A, n=20), wo es mit AJM-1 kolokalisiert (B, gelber Bereich, n=15). Nichtphosphoryliertes LAD-1 dagegen zeigt eine basolaterale Expression (C, n=7). In *dlg-1*(RNAi)-Embryonen zeigt LAD-1P ein gespottetes AJ-Muster (D, n=8), das auch in *ajm-1*(RNAi)-Embryonen zu sehen ist (E, n=21). In *erm-1*(RNAi)-Embryonen ist die typische apikal akkumulierte AJ zu beobachten (F, Pfeilkopf, n=5).

(F) Pfeilkopf zeigt auf apikal akkumulierte AJ. (A-F) Die schwarzen Rahmen kennzeichnen die entsprechenden Herausvergrößerungen in (A'-F'). Anterior ist links. Lateralansicht. Eichstrich 10μm.



F

MGLRETMRGGPPNNTTTFILLGCLLFLVSDRYYTCTAENIELKDYKFGN
 QFSLQITNNKRRSLQOMPTEQYVNOSSPIA EQNQHKLHLCFFSGYPAPK
PRWFHNGREJSESDAAGFRFE SYGKTLVFNVTQDKAGKYDCRFATQQBI
 DRTFNVVVEAAPYWP L GPPNNTNTSEGEKVI FDCITTYGKPTPKVTFYKNG
VEIESQKDRYLIEGRLJIFDVKKGTGKGMNAVYQCKSEKHHGWLWTN
FYLNLLAFKPQLLIDPGKEEVAAGKKVTLCKFFASPNAAVKWEAPML
SGSKGNQIPADAYGVGKLVFSEVTAEEGEYECIGTNYQATGLITLKV
RKPTIVQPFPRVEEVRMAGEEMRLACDATADNQLVVKYEWLVGKSLPED
RISSGHYKIDDDHSLVISNPTQDDTAKYKCVVSTKLDQVEKEIKIQFKDV
PVAVHSAWVQTCDKNSL TAFIKFEHYESIHTIAPIKFEFWVQYQIDSETEG
SQWRTHPVP-SAAHPNDKIDNNLRHTTGDATVSLQPFQFKFPHQFDPFAHLIQ

E

MGLRETMRGGPPNNTTTFILLGCLLFLVSDRYYTCTAENIELKDYKFGN
 QFSLQITNNKRRSLQOMPTEQYVNOSSPIA EQNQHKLHLCFFSGYPAPK
PRWFHNGREJSESDAAGFRFE SYGKTLVFNVTQDKAGKYDCRFATQQBI
 DRTFNVVVEAAPYWP L GPPNNTNTSEGEKVI FDCITTYGKPTPKVTFYKNG
VEIESQKDRYLIEGRLJIFDVKKGTGKGMNAVYQCKSEKHHGWLWTN
FYLNLLAFKPQLLIDPGKEEVAAGKKVTLCKFFASPNAAVKWEAPML
SGSKGNQIPADAYGVGKLVFSEVTAEEGEYECIGTNYQATGLITLKV
RKPTIVQPFPRVEEVRMAGEEMRLACDATADNQLVVKYEWLVGKSLPED
RISSGHYKIDDDHSLVISNPTQDDTAKYKCVVSTKLDQVEKEIKIQFKDV
PVAVHSAWVQTCDKNSL TAFIKFEHYESIHTIAPIKFEFWVQYQIDSETEG
SQWRTHPVP-SAAHPNDKIDNNLRHTTGDATVSLQPFQKYVFRVIARNSVG
DSAARLAKDQCETPAKQPKNDPDEVAAKGTSPEIIVQWKPMSREEWNGA
DFHYVVKYRPKDEDQRVGDWKEVAVEDPFADRVTVNL DDEKDVKPFQPYE
VQVQAVNSEGR TNVWPE TVEGRTGEGVPSSTPSGLRVL EKSGLT VTLAWN
GVDPQTANGNFTGYKITVWVDEADQSDSDSSEDEDEKRRKFRWKR SIRV
KRQSGIRKTVVF-GP-SATQGLTDLKPATLNHAYI QVTNGAHE GSA SDTID
FQITDEGVP-SPVRS L RAYPMNSKV GGEKGVVVL VWKKPRQTNGKLAR YEVE
YCKTQNGKLVKSCPRKQIDADSKEIRITGLENETPYRFTL RAHTSAGEG
DPNSSDATTLPETTAAAGVDPVPSLVENAI GDKYFNVSFRPAKYDDESRA
PVGNTYEVQYKPDADWETVKPADDGLTVHVDGLSPGTYKDYDRVAALQV
DPEGGETTKLISGTSKTTTTGTSRRERNVLLIIIIIIIIIIIIICCC
VVCRQRGQNYPVSQREREQGREPILGKPDYKIDDDDEKRLIGSKASESID
SMAQYGD TDPGVFTEDGSGFJGQVVPQKSLMPAERPEKGSTSTFV

Beschreibung der Abb. 35 s. S. 128

Abb. 35: LAD-1, ein L1-CAM (“cell adhesion molecule”) Homolog in *C. elegans* (Abb. s. S. 131).

(A) In einem direkten Hefe-Interaktionstest kann eine Wechselwirkung des zytosolischen Bereiches von LAD-1 mit der 2 PDZ-Domäne von DLG-1 nachgewiesen werden. Eine Interaktion von LAD-1 mit ERM-1 bzw. LAD-1 ohne PDZ-Bindemotiv als Negativkontrolle (Δ STEV) mit DLG-1 unterbleibt.

(B) Schematische Darstellung des *lad-1* Transkripts. *lad-1* ist 3435 bp groß und besitzt 14 Exons. In *lad-1(ok1244)* ist das 9. Exon deletiert, wodurch es zu einem “frameshift” kommt, der zu einem vorzeitigem Stoppkodon führt.

(C) *lad-1* kodiert für ein 1144 As großes Protein, dessen extrazellulärer Bereich aus 4 Imunglobulindomänen (IG, blau) und 5 Fibronectin-Domänen (FN, gelb) besteht. Es besitzt eine Transmembrandomäne (TM, rot) und einen 92 As großen zytosolischen Bereich.

(D) Im Vergleich dazu kommt es in *lad-1(ok1244)* nur zur Translation eines verkürzten Proteins von 550 As, dem sowohl die FN-Domänen, die TM, als auch der komplette zytosolische Bereich fehlen.

(E) Sequenz des LAD-1 Proteins mit farbig gekennzeichneten Aminosäuren der entsprechenden Domänen. Kursiv dargestellt ist die konservierte FERM-Bindesequenz (RSLT), die Phosphorylierungssequenz (EDGSFIGQY) und das PDZ-Bindemotiv (STEV).

(F) Sequenz des mutanten Proteins. Ab As 539 kommt es zur fehlerhaften Translation, die ein vorzeitiges Stoppkodon bewirkt, so daß nur ein trunkiertes Protein entsteht.

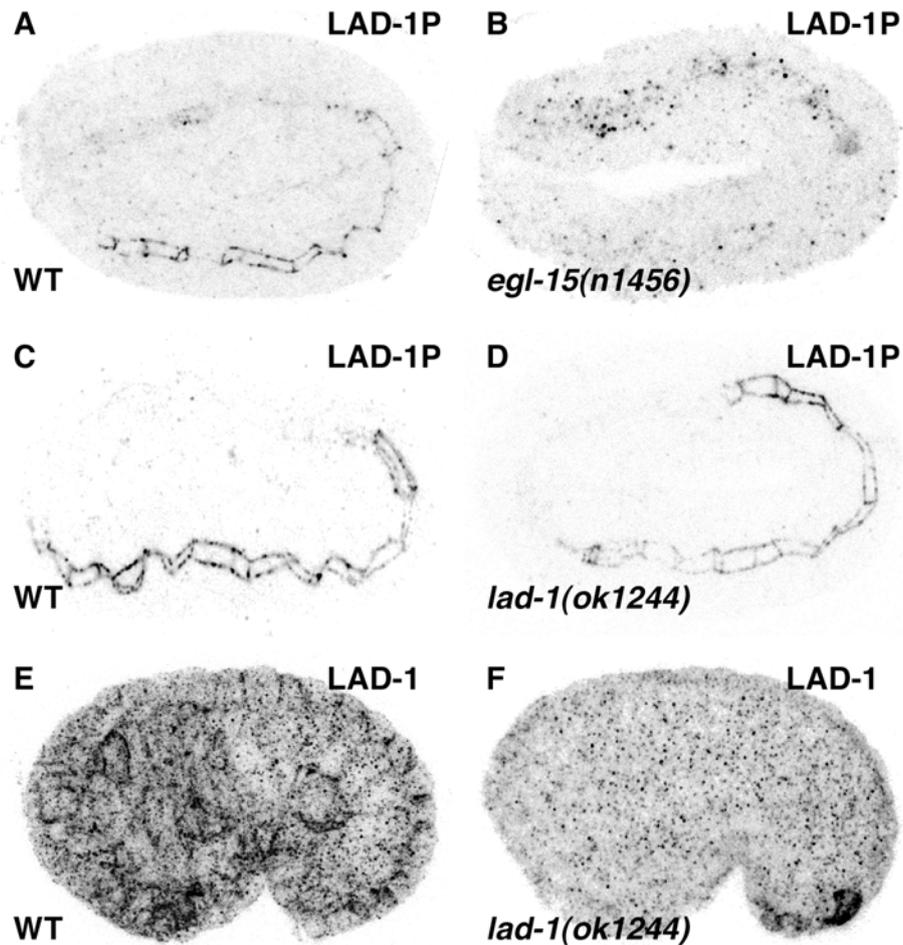


Abb. 36: Analyse der LAD-1 Expression in *lad-1(RB1199)* und *egl-15(n1456)*.
 WT- (A, C, E), *egl-15(n1456)*- (B) und *lad-1(ok1244)*-Embryonen (D, F) gefärbt gegen phosphoryliertes LAD-1P (1163) und nichtphosphoryliertes LAD-1NP (6993). Während in *egl-15(n1456)* die Expression von LAD-1P drastisch reduziert ist (B, n=6), entspricht sie in *lad-1(ok1244)* (D, n=7) einer wildtypischen Expression (C, n>15). Dagegen ist die Lokalisation des kortikalen LAD-1 in *lad-1(ok1244)*-Embryonen im Vergleich zum WT (C, n=6) vermindert (E, n=8). Anterior ist links. Dorsal ist oben. Lateralansicht. Eichstrich 10µm.

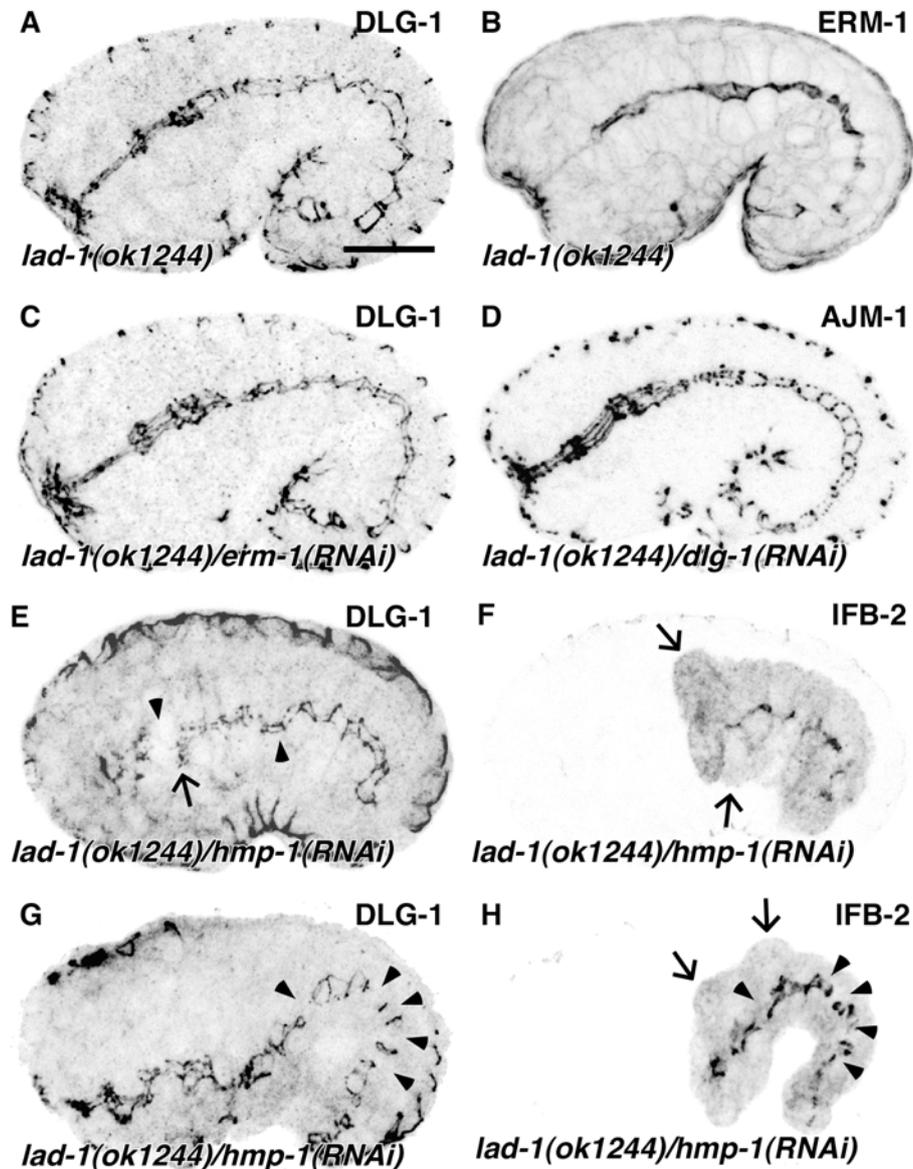


Abb. 37: Analyse von *lad-1(ok1244)* in verschiedenen genetischen Hintergründen

Färbungen von *lad-1(ok1244)* (A, B), *lad-1(ok1244)* im *erm-1(RNAi)*- (C), *dlg-1(RNAi)*- (D) und *hmp-1(RNAi)*-Hintergrund (E-H) in verschiedenen Morphogenesestadien gegen DLG (A, C, E, G), AJM-1 (D) als AJ-Marker, IFB-2 (F, H) und ERM-1 als apikalen Marker (B). In *lad-1(ok1244)* ist die Lokalisation von DLG-1 und ERM-1 nicht gestört (A, n=8, B, n=7), in Doppelknockouts mit *dlg-1* und *erm-1* zeigt sich eine Ausprägung der entsprechenden Einzelknockout-Phänotypen (C, n=9, D, n=8). Im Gegensatz dazu kommt es in *lad-1(ok1244)/hmp-1(RNAi)*-Embryonen zu einem kontinuierlichen Verlust von AJ- und apikalen Markern im Darmepithel, also von Zell-Zelladhäsion (E-H, n=45; Pfeilköpfe). (E) Entsprechende Defekte sind auch im Pharynx zu erkennen.

(E-H) Pfeilköpfe zeigen auf fehlende AJ- bzw. apikale Marker. (E) Pfeil zeigt auf Adhäsionsdefekt im Pharynx. (F und H) Pfeile zeigen auf aus dem Verband getretene Zellen. Anterior ist links. Dorsal ist oben. Lateralansicht. Eichstrich 10µm.

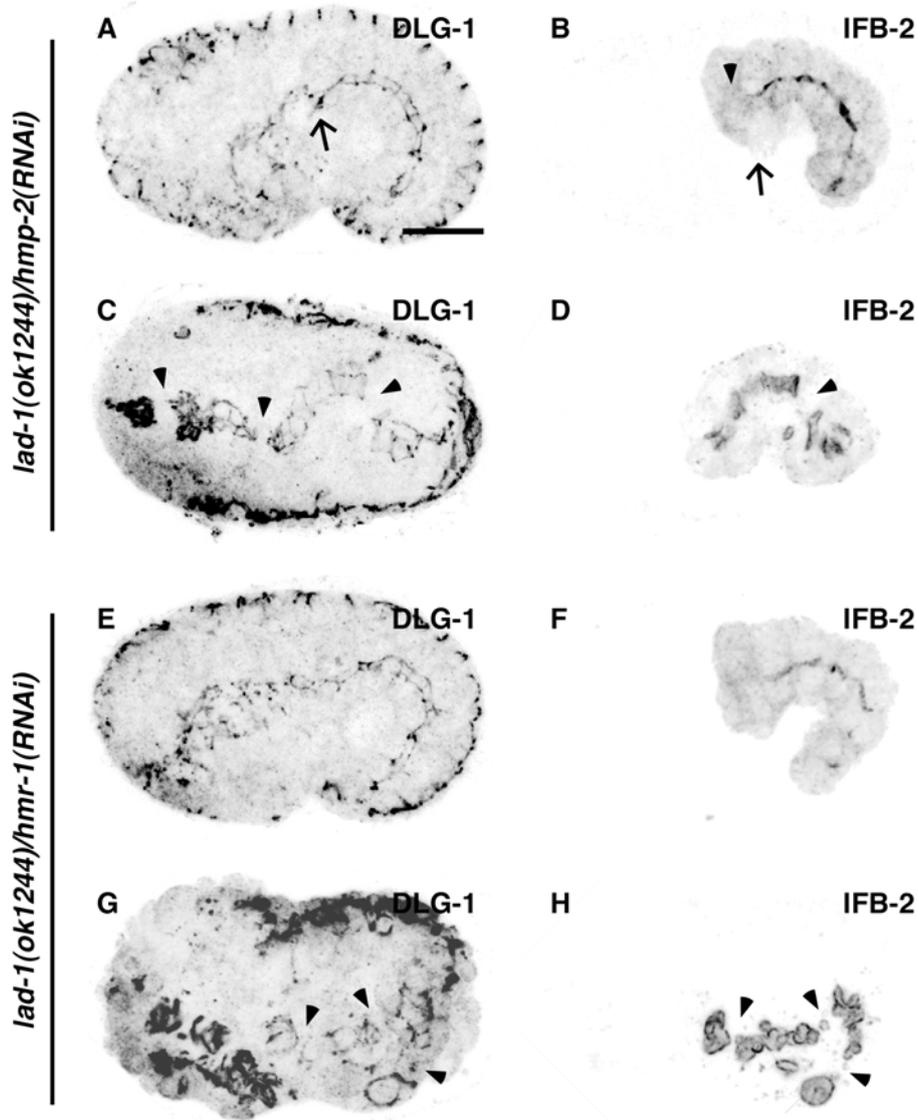


Abb. 38: Analyse von *lad-1(ok1244)* in einem *hmr-1(RNAi)*- bzw. *hmp-2(RNAi)*-Hintergrund
 Färbungen von *lad-1(ok1244)/hmp2(RNAi)* (A-D) und *lad-1(ok1244)/hmr-1(RNAi)*-Embryonen (G-H) in verschiedenen Morphogenesestadien gegen DLG-1 (A, C, E, G) als AJ-Marker und IFB-2 (B, D, F, H) als apikalen Marker. Sowohl in *lad-1(ok1244)/hmp2(RNAi)* (A-D) als auch *lad-1(ok1244)/hmr-1(RNAi)*-Embryonen (G-H) ist ein kontinuierlicher Verlust von Zell-Zelladhäsion im Darmepithel und im Pharynx zu beobachten, sowohl die AJ als auch IFB-2 sind fragmentiert (Pfeilköpfe). (B-D, G, H) Pfeilköpfe zeigen auf fehlende AJ- bzw. IFB-2-Lokalisation. (A) Pfeil zeigt auf "herausgerissene" AJ. (B) Pfeil zeigt aus dem Verband getretene Zelle. Anterior ist links. Dorsal ist oben. Lateralansicht. Eichstrich 10 μ m.

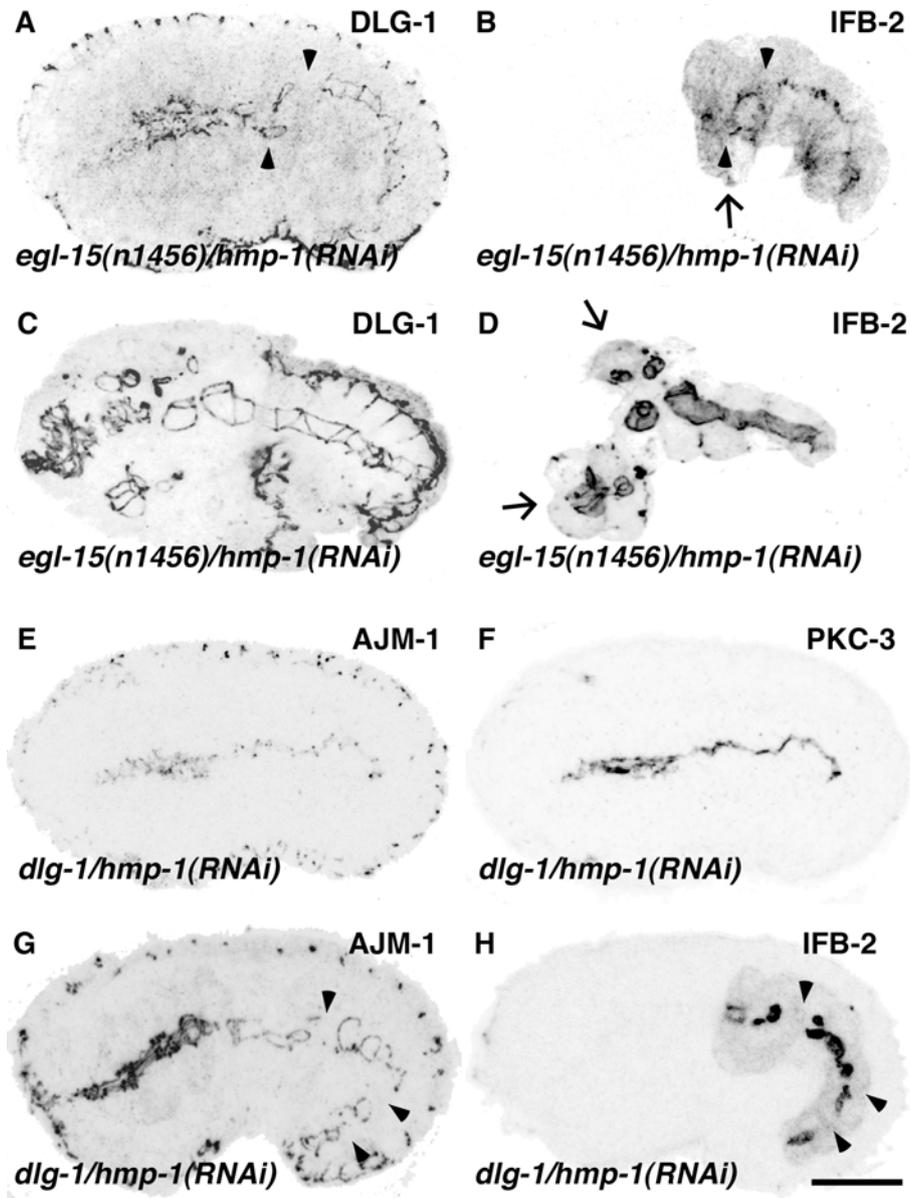


Abb. 39: Analyse von *egl-15(n1456)/hmp-1(RNAi)*- und *dlg-1/hmp-1(RNAi)*-Embryonen
 Färbungen an *egl-15(n1456)/hmp-1(RNAi)*- (A-D) und *dlg-1/hmp-1(RNAi)*-Embryonen (E-H) in verschiedenen Morphogenesestadien gegen DLG-1 (A, C) und AJM-1 (E, G) als AJ-Marker, IFB-2 (B, D, H) und PKC-3 (F) als apikale Marker. Sowohl in *egl-15(n1456)/hmp-1(RNAi)*- (A-D, n=10) als auch in *dlg-1/hmp-1(RNAi)*-Embryonen (E-H, n=18) ist ein fortschreitender Verlust der Zell-Zelladhäsion im Darmepithels zu beobachten. (C) Auch im Pharynx sind Adhäsionsdefekte zu sehen. (A, B, G, H) Pfeilköpfe zeigen auf fehlende AJ- bzw. apikale Marker. (B, D) Pfeile zeigen auf aus dem Verband getretene Zellen. Anterior ist links. Dorsal ist oben. Lateralansicht. Eichstrich 10µm.

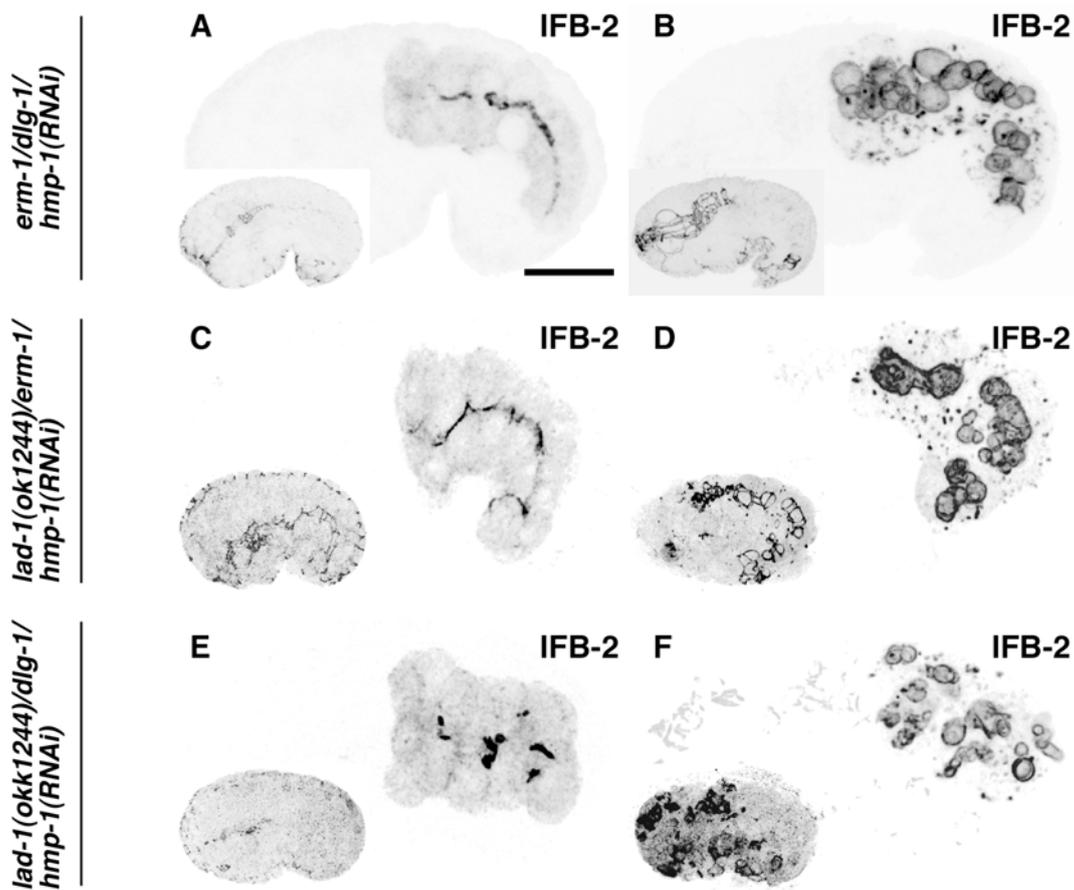


Abb. 40: Analyse von Dreifachknockouts verschiedener Kombination von *lad-1(ok1244)*, *erm-1*, *dlg-1* und *hmp-1(RNAi)*

Färbungen gegen IFB-2 als apikalen Marker (A-F) und DLG-1 als AJ-Marker (A-F, Verkleinerungen) von *erm-1/dlg-1/hmp-1(RNAi)* (A, B), *lad-1(ok1244)/erm-1/hmp-1(RNAi)* (C, D) und *lad-1(ok1244)/dlg-1/hmp-1(RNAi)* (E, F) in verschiedenen Morphogenesestadien. Ein Dreifachknockout von *erm-1*, *dlg-1* und *hmp-1* zeigt in früher Morphogenese (Kaulquappenstadium) eine normale Integrität des Darmepithels (A, n=8), erst im Verlauf der Morphogenese (Pflaumestadium) wird eine sehr starke Defragmentierung sichtbar (B, n=7). In *lad-1(ok1244)/erm-1/hmp-1(RNAi)* ist ein gradueller Verlust von AJ- und apikalen Komponenten zu beobachten, der an den "normalen" Zell-Zelladhäsionsverlust-Phänotyp der Zweifachknockouts erinnert (vgl. Abb. 23, 27, 29, C, D, s. auch DLG-Färbung in Verkleinerungen, n=8). Im Gegensatz dazu zeigt sich in *lad-1(ok1244)/dlg-1/hmp-1(RNAi)* bereits in Kommastadien eine sehr stark fragmentierte IFB-2-Lokalisation (E, n=8), die im Verlauf der Morphogenese erhalten bleibt (F, n=8).

Anterior ist links. Dorsal ist oben. Lateralansicht. Eichstrich 10µm.

9 Literaturverzeichnis

- Adams, C. L., Chen, Y. T., Smith, S. J. und Nelson, W. J. (1998). Mechanisms of epithelial cell-cell adhesion and cell compaction revealed by high-resolution tracking of E-cadherin-green fluorescent protein. *J Cell Biol* **142**, 1105-19.
- Affolter, M., Bellusci, S., Itoh, N., Shilo, B., Thiery, J. P. und Werb, Z. (2003). Tube or not tube: remodeling epithelial tissues by branching morphogenesis. *Dev Cell* **4**, 11-8.
- Amieva, M. R., Wilgenbus, K. K. und Furthmayr, H. (1994). Radixin is a component of hepatocyte microvilli in situ. *Experimental Cell Research* **210**, 140-4.
- Anderson, J. M. (2001). Molecular structure of tight junctions and their role in epithelial transport. *News Physiol Sci* **16**, 126-30.
- 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.
- Bachmann, A., Schneider, M., Theilenberg, E., Grawe, F. und Knust, E. (2001). *Drosophila* Stardust is a partner of Crumbs in the control of epithelial cell polarity. *Nature* **414**, 638-643.
- Beitel, G. J. und Krasnow, M. A. (2000). Genetic control of epithelial tube size in the *Drosophila* tracheal system. *Development* **127**, 3271-82.
- Bennett, V. und Chen, L. (2001). Ankyrins and cellular targeting of diverse membrane proteins to physiological sites. *Curr Opin Cell Biol* **13**, 61-7.
- Berryman, M., Franck, Z. und Bretscher, A. (1993). Ezrin is concentrated in the apical microvilli of a wide variety of epithelial cells whereas moesin is found primarily in endothelial cells. *J Cell Sci* **105** (Pt 4), 1025-43.
- Bertet, C., Sulak, L. und Lecuit, T. (2004). Myosin-dependent junction remodelling controls planar cell intercalation and axis elongation. *Nature* **429**, 667-71.
- Bilder, D., Li, M. und Perrimon, N. (2000). Cooperative Regulation of Cell Polarity and Growth by *Drosophila* Tumor Suppressors. *Science* **289**, 113-116.
- Bilder, D. und Perrimon, N. (2000). Localization of apical epithelial determinants by the basolateral PDZ protein Scribble. *Nature* **403**, 676-80.
- Birnbaum, D., Popovici, C. und Roubin, R. (2005). A pair as a minimum: the two fibroblast growth factors of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Dev Dyn* **232**, 247-55.
- Bonilha, V. L., Finnemann, S. C. und Rodriguez-Boulan, E. (1999). Ezrin promotes morphogenesis of apical microvilli and basal infoldings in retinal pigment epithelium. *J Cell Biol* **147**, 1533-48.
- 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.
- 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. und Schierenberg, E. (1992). Cell-cell communication in the embryo of *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol* **151**, 401-9.
- Bossinger, O., Wiegner, O. und Schierenberg, E. (1996). Embryonic gut differentiation in nematodes: Endocytosis of macromolecules and its experimental inhibition. *Roux's Archives of Dev Biol* **205**, 494-497.
- Brenner, S. (1974). The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* **77**, 71-94.

- Bretscher, A., Edwards, K. und Fehon, R. G. (2002). ERM proteins and merlin: integrators at the cell cortex. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**, 586-99.
- Buechner, M. (2002). Tubes and the single *C. elegans* excretory cell. *Trends Cell Biol* **12**, 479-84.
- Burdine, R. D., Branda, C. S. und Stern, M. J. (1998). EGL-17(FGF) expression coordinates the attraction of the migrating sex myoblasts with vulval induction in *C. elegans*. *Development* **125**, 1083-93.
- Burdine, R. D., Chen, E. B., Kwok, S. F. und Stern, M. J. (1997). egl-17 encodes an invertebrate fibroblast growth factor family member required specifically for sex myoblast migration in *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 2433-7.
- Byerly, L., Cassada, R. C. und Russell, R. L. (1976). The life cycle of the nematode *Caenorhabditis elegans*. I. Wild-type growth and reproduction. *Dev Biol* **51**, 23-33.
- Chen, L., Ong, B. und 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.
- Cheng, L., Itoh, K. und Lemmon, V. (2005). L1-mediated branching is regulated by two ezrin-radixin-moesin (ERM)-binding sites, the RSLE region and a novel juxtamembrane ERM-binding region. *J Neurosci* **25**, 395-403.
- Cohen, N. R., Taylor, J. S., Scott, L. B., Guillery, R. W., Soriano, P. und Furley, A. J. (1998). Errors in corticospinal axon guidance in mice lacking the neural cell adhesion molecule L1. *Curr Biol* **8**, 26-33.
- Colas, J. F. und Schoenwolf, G. C. (2001). Towards a cellular and molecular understanding of neurulation. *Dev Dyn* **221**, 117-45.
- Consortium, T. C. e. S. (1998). Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology. *Science* **282**, 2012-8.
- Costa, M., Raich, W., Agbunag, C., Leung, B., Hardin, J. und Priess, J. R. (1998). A putative catenin-cadherin system mediates morphogenesis of the *Caenorhabditis elegans* embryo. *J Cell Biol* **141**, 297-308.
- Cox, E. A. und Hardin, J. (2004). Sticky worms: adhesion complexes in *C. elegans*. *J Cell Sci* **117**, 1885-97.
- 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.
- Dahme, M., Bartsch, U., Martini, R., Anliker, B., Schachner, M. und Mantei, N. (1997). Disruption of the mouse L1 gene leads to malformations of the nervous system. *Nat Genet* **17**, 346-9.
- Dickson, T. C., Mintz, C. D., Benson, D. L. und Salton, S. R. (2002). Functional binding interaction identified between the axonal CAM L1 and members of the ERM family. *J Cell Biol*.
- Dimitratos, S. D., Woods, D. F., Stathakis, D. G. und Bryant, P. J. (1999). Signaling pathways are focused at specialized regions of the plasma membrane by scaffolding proteins of the MAGUK family. *Bioessays* **21**, 912-921.
- Doi, Y., Itoh, M., Yonemura, S., Ishihara, S., Takano, H., Noda, T. und Tsukita, S. (1999). Normal development of mice and unimpaired cell adhesion/cell motility/actin-based cytoskeleton without compensatory up-regulation of ezrin or radixin in moesin gene knockout. *Journal Of Biological Chemistry* **274**, 2315-21.

- Drubin, D. G. und Nelson, W. J. (1996). Origins of cell polarity. *Cell* **84**, 335-44.
- Durfee, T., Becherer, K., Chen, P. L., Yeh, S. H., Yang, Y., Kilburn, A. E., Lee, W. H. und Elledge, S. J. (1993). The retinoblastoma protein associates with the protein phosphatase type 1 catalytic subunit. *Genes Dev* **7**, 555-69.
- Eaton, S. und Simons, K. (1995). Apical, basal, and lateral cues for epithelial polarization. *Cell* **82**, 5-8.
- Engqvist-Goldstein, A. E. und Drubin, D. G. (2003). Actin assembly and endocytosis: from yeast to mammals. *Annu Rev Cell Dev Biol* **19**, 287-332.
- Faivre-Sarrailh, C., Banerjee, S., Li, J., Hortsch, M., Laval, M. und Bhat, M. A. (2004). Drosophila contactin, a homolog of vertebrate contactin, is required for septate junction organization and paracellular barrier function. *Development* **131**, 4931-42.
- Favello, A., Hillier, L. und Wilson, R. K. (1995). Genomic DNA sequencing methods. *Methods In Cell Biology* **48**, 551-69.
- Fields, S. und Song, O. (1989). A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* **340**, 245-6.
- 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**, 3465-75.
- Forni, J. J., Romani, S., Doherty, P. und Tear, G. (2004). Neuroglian and FasciclinII can promote neurite outgrowth via the FGF receptor Heartless. *Mol Cell Neurosci* **26**, 282-91.
- Francis, G. R. und Waterston, R. H. (1985). Muscle organization in *Caenorhabditis elegans*: localization of proteins implicated in thin filament attachment and I-band organization. *J Cell Biol* **101**, 1532-49.
- Fransen, E., Van Camp, G., D'Hooge, R., Vits, L. und Willems, P. J. (1998). Genotype-phenotype correlation in L1 associated diseases. *J Med Genet* **35**, 399-404.
- Fraser, A. G., Kamath, R. S., 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**, 325-30.
- Gautreau, A., Louvard, D. und Arpin, M. (2000). Morphogenic effects of ezrin require a phosphorylation-induced transition from oligomers to monomers at the plasma membrane. *J Cell Biol* **150**, 193-203.
- Genova, J. L. und Fehon, R. G. (2003). Neuroglian, Gliotactin, and the Na⁺/K⁺ ATPase are essential for septate junction function in *Drosophila*. *J Cell Biol* **161**, 979-89.
- 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**, 865-73.
- 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**, 331-6.
- Granes, F., Urena, J. M., Rocamora, N. und Vilaro, S. (2000). Ezrin links syndecan-2 to the cytoskeleton. *J Cell Sci* **113**, 1267-76.

- Grishok, A. (2005). RNAi mechanisms in *Caenorhabditis elegans*. *FEBS Lett.*
- Gruenberg, J. und Maxfield, F. R. (1995). Membrane transport in the endocytic pathway. *Curr Opin Cell Biol* **7**, 552-63.
- Gundelfinger, E. D., Kessels, M. M. und Qualmann, B. (2003). Temporal and spatial coordination of exocytosis and endocytosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**, 127-39.
- Guo, S. und Kemphues, K. J. (1995). par-1, a gene required for establishing polarity in *C. elegans* embryos, encodes a putative Ser/Thr kinase that is asymmetrically distributed. *Cell* **81**, 611-20.
- Guo, S. und Kemphues, K. J. (1996). A non-muscle myosin required for embryonic polarity in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **382**, 455-8.
- Hall, S. G. und Bieber, A. J. (1997). Mutations in the *Drosophila* neuroglian cell adhesion molecule affect motor neuron pathfinding and peripheral nervous system patterning. *J Neurobiol* **32**, 325-40.
- Hanzel, D., Nabi, I. R., Zurzolo, C., Powell, S. K. und Rodriguez-Boulan, E. (1991). New techniques lead to advances in epithelial cell polarity. *Seminars In Cell Biology* **2**, 341-53.
- Hardin, J. und Lockwood, C. (2004). Skin tight: cell adhesion in the epidermis of *Caenorhabditis elegans*. *Curr Opin Cell Biol* **16**, 486-92.
- Hawkins, M. G. und McGhee, J. D. (1995). elt-2, a second GATA factor from the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Journal Of Biological Chemistry* **270**, 14666-71.
- Heiska, L., Alftan, K., Grönholm, M., Vilja, P., Vaheri, A. und Carpén, O. (1998). Association of ezrin with intercellular adhesion molecule-1 and -2 (ICAM-1 and ICAM-2). Regulation by phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate. *Journal Of Biological Chemistry* **273**, 21893-900.
- Helander, T. S., Carpén, O., Turunen, O., Kovanen, P. E., Vaheri, A. und Timonen, T. (1996). ICAM-2 redistributed by ezrin as a target for killer cells. *Nature* **382**, 265-8.
- Hodgkin, J. A. und Brenner, S. (1977). Mutations causing transformation of sexual phenotype in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* **86**, 275-87.
- Hoover, K. B. und Bryant, P. J. (2000). The genetics of the protein 4.1 family: organizers of the membrane and cytoskeleton. *Curr Opin Cell Biol* **12**, 229-34.
- Huang, P. und Stern, M. J. (2005). FGF signaling in flies and worms: more and more relevant to vertebrate biology. *Cytokine Growth Factor Rev* **16**, 151-8.
- Hutter, H., Vogel, B. E., Plenefisch, J. D., Norris, C. R., Proenca, R. B., Spieth, J., Guo, C., Mastwal, S., Zhu, X., Scheel, J. und Hedgecock, E. M. (2000). Conservation and novelty in the evolution of cell adhesion and extracellular matrix genes. *Science* **287**, 989-94.
- Islam, R., Kristiansen, L. V., Romani, S., Garcia-Alonso, L. und Hortsch, M. (2004). Activation of EGF receptor kinase by L1-mediated homophilic cell interactions. *Mol Biol Cell* **15**, 2003-12.
- Ivanov, A. I., McCall, I. C., Parkos, C. A. und Nusrat, A. (2004). Role for actin filament turnover and a myosin II motor in cytoskeleton-driven disassembly of the epithelial apical junctional complex. *Mol Biol Cell* **15**, 2639-51.
- Ivanov, A. I., Nusrat, A. und Parkos, C. A. (2005). Endocytosis of the apical junctional complex: mechanisms and possible roles in regulation of epithelial barriers. *Bioessays* **27**, 356-65.
- Ivetic, A. und Ridley, A. J. (2004). Ezrin/radixin/moesin proteins and Rho GTPase signalling in leucocytes. *Immunology* **112**, 165-76.

- Izant, J. G. und Weintraub, H. (1985). Constitutive and conditional suppression of exogenous and endogenous genes by anti-sense RNA. *Science* **229**, 345-52.
- Jaffe, S. H., Friedlander, D. R., Matsuzaki, F., Crossin, K. L., Cunningham, B. A. und Edelman, G. M. (1990). Differential effects of the cytoplasmic domains of cell adhesion molecules on cell aggregation and sorting-out. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 3589-93.
- Jankovics, F., Sinka, R., Lukacsovich, T. und Erdelyi, M. (2002). MOESIN crosslinks actin and cell membrane in *Drosophila* oocytes and is required for OSKAR anchoring. *Curr Biol* **12**, 2060-5.
- Jazwinska, A., Ribeiro, C. und Affolter, M. (2003). Epithelial tube morphogenesis during *Drosophila* tracheal development requires Piopio, a luminal ZP protein. *Nat Cell Biol* **5**, 895-901.
- Kamath, R. S. und Ahringer, J. (2003). Genome-wide RNAi screening in *Caenorhabditis elegans*. *Methods* **30**, 313-21.
- 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.
- Kemler, R. (1993). From cadherins to catenins: cytoplasmic protein interactions and regulation of cell adhesion. *Trends Genet* **9**, 317-21.
- Kemphues, K. (2000). PARsing embryonic polarity. *Cell* **101**, 345-8.
- Kemphues, K. J., Kusch, M. und Wolf, N. (1988a). Maternal-effect lethal mutations on linkage group II of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* **120**, 977-86.
- Kemphues, K. J., Priess, J. R., Morton, D. G. und Cheng, N. S. (1988b). Identification of genes required for cytoplasmic localization in early *C. elegans* embryos. *Cell* **52**, 311-20.
- Ketting, R. F., Fischer, S. E., Bernstein, E., Sijen, T., Hannon, G. J. und Plasterk, R. H. (2001). Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in *C. elegans*. *Genes Dev* **15**, 2654-9.
- Kikuchi, S., Hata, M., Fukumoto, K., Yamane, Y., Matsui, T., Tamura, A., Yonemura, S., Yamagishi, H., Keppler, D. und Tsukita, S. (2002). Radixin deficiency causes conjugated hyperbilirubinemia with loss of Mrp2 from bile canalicular membranes. *Nat Genet* **31**, 320-5.
- Kim, J. K., Gabel, H. W., Kamath, R. S., Tewari, M., Pasquinelli, A., Rual, J. F., Kennedy, S., Dybbs, M., Bertin, N., Kaplan, J. M., Vidal, M. und Ruvkun, G. (2005). Functional genomic analysis of RNA interference in *C. elegans*. *Science* **308**, 1164-7.
- Kimble, J. und Hirsh, D. (1979). The postembryonic cell lineages of the hermaphrodite and male gonads in *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol* **70**, 396-417.
- Knudsen, K. A., Soler, A. P., Johnson, K. R. und Wheelock, M. J. (1995). Interaction of alpha-actinin with the cadherin/catenin cell-cell adhesion complex via alpha-catenin. *J Cell Biol* **130**, 67-77.
- 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. und Mango, S. (1999). Patterning the *C. elegans* embryo - Moving beyond the cell lineage. *Trends In Genetics* **15**, 307-313.

- Larue, L., Ohsugi, M., Hirchenhain, J. und Kemler, R. (1994). E-cadherin null mutant embryos fail to form a trophectoderm epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 8263-7.
- Le, T. L., Yap, A. S. und Stow, J. L. (1999). Recycling of E-cadherin: a potential mechanism for regulating cadherin dynamics. *J Cell Biol* **146**, 219-32.
- 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.
- Leung, B., Hermann, G. J. und Priess, J. R. (1999). Organogenesis of the *Caenorhabditis elegans* intestine. *Dev Biol* **216**, 114-34.
- Lu, R., Maduro, M., Li, F., Li, H. W., Broitman-Maduro, G., Li, W. X. und Ding, S. W. (2005). Animal virus replication and RNAi-mediated antiviral silencing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **436**, 1040-3.
- Lubarsky, B. und Krasnow, M. A. (2003). Tube morphogenesis: making and shaping biological tubes. *Cell* **112**, 19-28.
- MacQueen, A. J., Baggett, J. J., Perumov, N., Bauer, R. A., Januszewski, T., Schriefer, L. und Waddle, J. A. (2005). ACT-5 is an essential *Caenorhabditis elegans* actin required for intestinal microvilli formation. *Mol Biol Cell* **16**, 3247-59.
- Matsui, T., Yonemura, S. und Tsukita, S. (1999). Activation of ERM proteins in vivo by Rho involves phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase and not ROCK kinases. *Curr Biol* **9**, 1259-62.
- 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.
- Medina, E., Williams, J., Klipfell, E., Zarnescu, D., Thomas, G. und Le Bivic, A. (2002). Crumbs interacts with moesin and β -Heavy-spectrin in the apical membrane skeleton of *Drosophila*. *J Cell Biol* **158**, 941-951.
- Melnick, M. und Jaskoll, T. (2000). Mouse submandibular gland morphogenesis: a paradigm for embryonic signal processing. *Crit Rev Oral Biol Med* **11**, 199-215.
- Metzger, R. J. und Krasnow, M. A. (1999). Genetic control of branching morphogenesis. *Science* **284**, 1635-9.
- Michaux, G., Legouis, R. und Labouesse, M. (2001). Epithelial biology: lessons from *Caenorhabditis elegans*. *Gene* **277**, 83-100.
- Montgomery, M. K., Xu, S. und Fire, A. (1998). RNA as a target of double-stranded RNA-mediated genetic interference in *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 15502-7.
- Morales, F. C., Takahashi, Y., Kreimann, E. L. und Georgescu, M. M. (2004). Ezrin-radixin-moesin (ERM)-binding phosphoprotein 50 organizes ERM proteins at the apical membrane of polarized epithelia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 17705-10.
- Mostov, K., Su, T. und ter Beest, M. (2003). Polarized epithelial membrane traffic: conservation and plasticity. *Nat Cell Biol* **5**, 287-93.
- Müller, H. A. und Bossinger, O. (2003). Molecular networks controlling epithelial cell polarity in development. *Mech Dev* **120**, 1231-56.

- Munn, E. A. und Greenwood, C. A. (1983). Endotube-brush border complexes dissected from the intestines of *Haemonchus contortus* and *Ancylostoma caninum*. *Parasitology* **87** (Pt 1), 129-37.
- 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.
- Nix, S. L., Chishti, A. H., Anderson, J. M. und Walther, Z. (2000). hCASK and hDlg associate in epithelia, and their src homology 3 and guanylate kinase domains participate in both intramolecular and intermolecular interactions. *J Biol Chem* **275**, 41192-200.
- Parrish, S., Fleenor, J., Xu, S., Mello, C. und Fire, A. (2000). Functional anatomy of a dsRNA trigger. Differential requirement for the two trigger strands in RNA interference. *Mol Cell* **6**, 1077-87.
- Paul, S. M. und Beitel, G. J. (2005). Tubulogenesis: zipping up your fly. *Curr Biol* **15**, R70-2.
- Pellettieri, J. und Seydoux, G. (2002). Anterior-posterior polarity in *C. elegans* and *Drosophila*--PARallels and differences. *Science* **298**, 1946-50.
- Pestonjamas, K., Amieva, M. R., Strassel, C. P., Nauseef, W. M., Furthmayr, H. und Luna, E. J. (1995). Moesin, ezrin, and p205 are actin-binding proteins associated with neutrophil plasma membranes. *Molecular Biology Of The Cell* **6**, 247-59.
- Petronczki, M. und Knoblich, J. A. (2001). DmPAR-6 directs epithelial polarity and asymmetric cell division of neuroblasts in *Drosophila*. *Nat Cell Biol* **3**, 43-49.
- Piekny, A. J., Johnson, J. L., Cham, G. D. und Mains, P. E. (2003). The *Caenorhabditis elegans* nonmuscle myosin genes *nmy-1* and *nmy-2* function as redundant components of the *let-502*/Rho-binding kinase and *mel-11*/myosin phosphatase pathway during embryonic morphogenesis. *Development* **130**, 5695-704.
- Piekny, A. J. und Mains, P. E. (2003). Squeezing an egg into a worm: *C. elegans* embryonic morphogenesis. *ScientificWorldJournal* **3**, 1370-81.
- Piekny, A. J., Wissmann, A. und Mains, P. E. (2000). Embryonic morphogenesis in *Caenorhabditis elegans* integrates the activity of LET-502 Rho-binding kinase, MEL-11 myosin phosphatase, DAF-2 insulin receptor and FEM-2 PP2c phosphatase. *Genetics* **156**, 1671-89.
- Pilot, F. und Lecuit, T. (2005). Compartmentalized morphogenesis in epithelia: from cell to tissue shape. *Dev Dyn* **232**, 685-94.
- Piperno, G. und Fuller, M. T. (1985). Monoclonal antibodies specific for an acetylated form of alpha-tubulin recognize the antigen in cilia and flagella from a variety of organisms. *J Cell Biol* **101**, 2085-94.
- Plasterk, R. H. (1995). Reverse genetics: from gene sequence to mutant worm. *Methods In Cell Biology* **48**, 59-80.
- Polesello, C., Delon, I., Valenti, P., Ferrer, P. und Payre, F. (2002). Dmoesin controls actin-based cell shape and polarity during *Drosophila melanogaster* oogenesis. *Nat Cell Biol* **4**, 782-9.
- Pollack, A. L., Runyan, R. B. und Mostov, K. E. (1998). Morphogenetic mechanisms of epithelial tubulogenesis: MDCK cell polarity is transiently rearranged

- without loss of cell-cell contact during scatter factor/hepatocyte growth factor-induced tubulogenesis. *Dev Biol* **204**, 64-79.
- Popovici, C., Conchonaud, F., Birnbaum, D. und Roubin, R. (2004). Functional phylogeny relates LET-756 to fibroblast growth factor 9. *J Biol Chem* **279**, 40146-52.
- Pjuguet, P., Del Maestro, L., Gautreau, A., Louvard, D. und Arpin, M. (2003). Ezrin regulates E-cadherin-dependent adherens junction assembly through Rac1 activation. *Mol Biol Cell* **14**, 2181-91.
- 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**, 1139-1146.
- Reczek, D., Berryman, M. und Bretscher, A. (1997). Identification of EBP50: A PDZ-containing phosphoprotein that associates with members of the ezrin-radixin-moesin family. *J Cell Biol* **139**, 169-79.
- Rimm, D. L., Koslov, E. R., Kebriaei, P., Cianci, C. D. und Morrow, J. S. (1995). Alpha 1(E)-catenin is an actin-binding and -bundling protein mediating the attachment of F-actin to the membrane adhesion complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 8813-7.
- Roubin, R., Naert, K., Popovici, C., Vatcher, G., Coulier, F., Thierry-Mieg, J., Pontarotti, P., Birnbaum, D., Baillie, D. und Thierry-Mieg, D. (1999). let-756, A *C. elegans* FGF essential for worm development. *Oncogene* **18**, 6741-6747.
- Saotome, I., Curto, M. und McClatchey, A. I. (2004). Ezrin is essential for epithelial organization and villus morphogenesis in the developing intestine. *Dev Cell* **6**, 855-64.
- Sasakura, H., Inada, H., Kuhara, A., Fusaoka, E., Takemoto, D., Takeuchi, K. und Mori, I. (2005). Maintenance of neuronal positions in organized ganglia by SAX-7, a *Caenorhabditis elegans* homologue of L1. *Embo J* **24**, 1477-88.
- 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.
- Schneeberger, E. E. und Lynch, R. D. (2004). The tight junction: a multifunctional complex. *Am J Physiol Cell Physiol* **286**, C1213-28.
- Schriefer, L. A., Waddle, J. A. und Waterston, R. H. (1995). Gut wrenching observations on a novel *C. elegans* actin gene, act-5. *International C. elegans Meeting, 1995*.
- Segbert, C., Johnson, K., Theres, C., van Furden, 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.
- Serrador, J. M., Alonso-Lebrero, J. L., del Pozo, M. A., Furthmayr, H., Schwartz-Albiez, R., Calvo, J., Lozano, F. und Sanchez-Madrid, F. (1997). Moesin interacts with the cytoplasmic region of intercellular adhesion molecule-3 and is redistributed to the uropod of T lymphocytes during cell polarization. *J Cell Biol* **138**, 1409-23.
- Seydoux, G. und Schedl, T. (2001). The germline in *C. elegans*: origins, proliferation, and silencing. *Int Rev Cytol* **203**, 139-85.
- Shelton, C. A., Carter, J. C., Ellis, G. C. und Bowerman, B. (1999). The nonmuscle myosin regulatory light chain gene *mlc-4* is required for cytokinesis, anterior-posterior polarity, and body morphology during *Caenorhabditis elegans* embryogenesis. *J Cell Biol* **146**, 439-51.

- Shim, J. und Lee, J. (2000). Molecular genetic analysis of *apm-2* and *aps-2*, genes encoding the medium and small chains of the AP-2 clathrin-associated protein complex in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Mol Cells* **10**, 309-16.
- Shim, J. und Lee, J. (2005). The AP-3 clathrin-associated complex is essential for embryonic and larval development in *Caenorhabditis elegans*. *Mol Cells* **19**, 452-7.
- Shim, J., Sternberg, P. W. und Lee, J. (2000). Distinct and redundant functions of mu1 medium chains of the AP-1 clathrin-associated protein complex in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Mol Biol Cell* **11**, 2743-56.
- Simske, J. S. und Hardin, J. (2001). Getting into shape: epidermal morphogenesis in *Caenorhabditis elegans* embryos. *Bioessays* **23**, 12-23.
- Simske, J. S., Koppen, 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.
- Singson, A., Mercer, K. B. und L'Hernault, S. W. (1998). The *C. elegans* *spe-9* gene encodes a sperm transmembrane protein that contains EGF-like repeats and is required for fertilization. *Cell* **93**, 71-9.
- Sönnichsen, B., Koski, L. B., Walsh, A., Marschall, P., Neumann, B., Brehm, M., Alleaume, A. M., Artelt, J., Bettencourt, P., Cassin, E., Hewitson, M., Holz, C., Khan, M., Lazik, S., Martin, C., Nitzsche, B., Ruer, M., Stamford, J., Winzi, M., Heinkel, R., Roder, M., Finell, J., Hantsch, H., Jones, S. J., Jones, M., Piano, F., Gunsalus, K. C., Oegema, K., Gonczy, P., Coulson, A., Hyman, A. A. und Echeverri, C. J. (2005). Full-genome RNAi profiling of early embryogenesis in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **434**, 462-9.
- Speck, O., Hughes, S. C., Noren, N. K., Kulikauskas, R. M. und Fehon, R. G. (2003). Moesin functions antagonistically to the Rho pathway to maintain epithelial integrity. *Nature* **421**, 83-7.
- Stewart, W. W. (1981). Lucifer dyes--highly fluorescent dyes for biological tracing. *Nature* **292**, 17-21.
- Stringham, E. G., Jones, D. und Candido, E. P. (1992). Expression of the polyubiquitin-encoding gene (*ubq-1*) in transgenic *Caenorhabditis elegans*. *Gene* **113**, 165-73.
- 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, Y. und Sugano, S. (2003). Construction of a full-length enriched and a 5'-end enriched cDNA library using the oligo-capping method. *Methods Mol Biol* **221**, 73-91.
- Szewczyk, N. J. und Jacobson, L. A. (2003). Activated EGL-15 FGF receptor promotes protein degradation in muscles of *Caenorhabditis elegans*. *Embo J* **22**, 5058-67.
- 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.
- Tabara, H., Yigit, E., Siomi, H. und Mello, C. C. (2002). The dsRNA binding protein RDE-4 interacts with RDE-1, DCR-1, and a DEXH-box helicase to direct RNAi in *C. elegans*. *Cell* **109**, 861-71.
- Takeuchi, K., Sato, N., Kasahara, H., Funayama, N., Nagafuchi, A., Yonemura, S. und Tsukita, S. (1994). Perturbation of cell adhesion and microvilli formation by antisense oligonucleotides to ERM family members. *J Cell Biol* **125**, 1371-84.

- 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.
- Tepass, U., Gruszynski-DeFeo, E., Haag, T. A., Omatyar, L., Torok, T. und Hartenstein, V. (1996). shotgun encodes *Drosophila* E-cadherin and is preferentially required during cell rearrangement in the neurectoderm and other morphogenetically active epithelia. *Genes Dev* **10**, 672-85.
- Tepass, U., Theres, C. und Knust, E. (1990). crumbs encodes an EGF-like protein expressed on apical membranes of *Drosophila* epithelial cells and required for organization of epithelia. *Cell* **61**, 787-99.
- Timmons, L. und Fire, A. (1998). Specific interference by ingested dsRNA. *Nature* **395**, 854.
- Tran Quang, C., Gautreau, A., Arpin, M. und Treisman, R. (2000). Ezrin function is required for ROCK-mediated fibroblast transformation by the net and dbl oncogenes. *Embo J* **19**, 4565-76.
- Tsukita, S., Oishi, K., Sato, N., Sagara, J. und Kawai, A. (1994). ERM family members as molecular linkers between the cell surface glycoprotein CD44 and actin-based cytoskeletons. *J Cell Biol* **126**, 391-401.
- Turunen, O., Wahlström, T. und Vaheri, A. (1994). Ezrin has a COOH-terminal actin-binding site that is conserved in the ezrin protein family. *J Cell Biol* **126**, 1445-53.
- Uemura, T., Oda, H., Kraut, R., Hayashi, S., Kotaoka, Y. und Takeichi, M. (1996). Zygotic *Drosophila* E-cadherin expression is required for processes of dynamic epithelial cell rearrangement in the *Drosophila* embryo. *Genes And Development* **10**, 659-71.
- Utech, M., Ivanov, A. I., Samarin, S. N., Bruewer, M., Turner, J. R., Mrsny, R. J., Parkos, C. A. und Nusrat, A. (2005). Mechanism of IFN- γ -induced Endocytosis of Tight Junction Proteins: Myosin II-dependent Vacuolarization of the Apical Plasma Membrane. *Mol Biol Cell* **16**, 5040-52.
- van Fürden, D. (2001). Die Rolle der Ezrin-Radixin-Moesin Proteinfamilie während der Differenzierung des Darmepithels von *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**, 262-76.
- Vega-Salas, D. E., Salas, P. J. und Rodriguez-Boulan, E. (1988). Exocytosis of vacuolar apical compartment (VAC): a cell-cell contact controlled mechanism for the establishment of the apical plasma membrane domain in epithelial cells. *J Cell Biol* **107**, 1717-28.
- Vogel, C., Teichmann, S. A. und Chothia, C. (2003). The immunoglobulin superfamily in *Drosophila melanogaster* and *Caenorhabditis elegans* and the evolution of complexity. *Development* **130**, 6317-28.
- Wang, L. H., Rothberg, K. G. und Anderson, R. G. (1993). Mis-assembly of clathrin lattices on endosomes reveals a regulatory switch for coated pit formation. *J Cell Biol* **123**, 1107-17.
- Wang, X., Kweon, J., Larson, S. und Chen, L. (2005). A role for the *C. elegans* L1CAM homologue lad-1/sax-7 in maintaining tissue attachment. *Dev Biol* **284**, 273-91.
- Wei, J., Hortsch, M. und Goode, S. (2004). Neuroglial stabilizes epithelial structure during *Drosophila* oogenesis. *Dev Dyn* **230**, 800-8.

- Weller, S. und Gartner, J. (2001). Genetic and clinical aspects of X-linked hydrocephalus (L1 disease): Mutations in the L1CAM gene. *Hum Mutat* **18**, 1-12.
- Wilkins, C., Dishongh, R., Moore, S. C., Whitt, M. A., Chow, M. und Machaca, K. (2005). RNA interference is an antiviral defence mechanism in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **436**, 1044-7.
- Winter, C. G., Wang, B., Ballew, A., Royou, A., Karess, R., Axelrod, J. D. und Luo, L. (2001). *Drosophila* Rho-associated kinase (Drok) links Frizzled-mediated planar cell polarity signaling to the actin cytoskeleton. *Cell* **105**, 81-91.
- 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. (1988). "The Nematode *Caenorhabditis elegans*." *Cold Spring Harbor Laboratory Press.*, 1-667.
- Woods, D. F., Hough, C., Peel, D., Callaini, G. und Bryant, P. J. (1996). Dlg protein is required for junction structure, cell polarity, and proliferation control in *Drosophila* epithelia. *J Cell Biol* **134**, 1469-82.
- Yochem, J. und Herman, R. K. (2003). Investigating *C. elegans* development through mosaic analysis. *Development* **130**, 4761-8.
- Yonemura, S. und Tsukita, S. (1999). Direct involvement of ezrin/radixin/moesin (ERM)-binding membrane proteins in the organization of microvilli in collaboration with activated ERM proteins. *J Cell Biol* **145**, 1497-509.
- Zallen, J. A., Kirch, S. A. und Bargmann, C. I. (1999). Genes required for axon pathfinding and extension in the *C. elegans* nerve ring. *Development* **126**, 3679-92.
- Zallen, J. A. und Wieschaus, E. (2004). Patterned gene expression directs bipolar planar polarity in *Drosophila*. *Dev Cell* **6**, 343-55.

10 Anhang-Abkürzungen

α -...	Alpha-...
Abb.	Abbildung
Abs.	Abschnitt
As	Aminosäure
Bp	Basenpaare
ca.	circa
d.h.	das heißt
EtBr	Ethidiumbromid
h	Stunde
J	Joule
M	Molarität
min	Minute
ml	Milliliter
OD	optische Dichte
o.g.	oben genanntes/r
PCR	“polymerase chain reaction”, Polymerasekettenreaktion
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
s.	siehe
s. o.	siehe oben
ü. N.	über Nacht
V	Volt
vgl.	vergleiche
WT	Wildtyp
(w/v)	Weight per volume
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

11 Anhang-Sequenzen

11.1 Verifizierte *erm-1*-Sequenz

Anmerkung: Anhand von cDNA's verifizierter ORF ("open reading frame") von *erm-1*. Start- und Stoppkodon sind jeweils kursiv dargestellt (s. dazu Abschnitt 3.1.1).

ATGTCGAAAAAGCGATCAATGTGCGTGTACCTCGATGGACTCGGAGCTCGAGTTC
 GCTATTCAGTCGAGCACCACAGGAAAGCAACTTTTTGATCAGGTTGTCAAACCATT
 GGTCTCCGCGAGATCTGGTATTTTGGACTTCAGTACACTGACAACAAGGGATTCCCA
 ACATGGCTGAAATTGAACAAGAAAGTCTTGTCTCAGGACGTTAAGAAGGACCCGACT
 CTTGTTTTCAAATTCGCGCCAAATTCATCCGGAAGATGTGGCCGAGGAGATTATC
 CAGGATGTCACTATGCGTTTGTCTATCTCCAAGTGAAAGATGGAATTCTGTCAGAT
 GAGATTTATTGTCCACCGGAAACCTCTGTTCTTCTTGCCCTTTACGCGATGCAAGCT
 AAATATGGAGACTATGTTCCAGAGACACATGTCGCCGGATGTCTTACTGCTGATCGT
 CTGCTTCCTCAACGCGTTCTCGGACAATTCAAATTGAACAGTGAGGAATGGGAACGC
 CGTATTATGACATGGTGGGCAGATCATCGTGCAACTACACGTGAACAAGCTATGCTT
 GAATATTTGAAAATTGCACAAGATCTCGAGATGTATGGAGTCAATTACTTTGAAATC
 CGCAACAAAAGGGAAGTCTCTATCTTGGTGTGCGATGCTCTTGGATTGAATATT
 TACGATAAAGCTGATCGTCTTTCGCCGAAAGTCGGATTCCCATGGTCCGAGATTCGT
 AATATATCATTCAACGACAAGAAATTTGTCATCAAACCAATTGATAAGAAGGCTCAT
 GACTTTGTCTTCTACGCTCCACGACTCCGTATCAACAAACGTATTCTTGCTTTGTGT
 ATGGGAAATCACGAGCTTTACATGCGTAGAAGAAAGCCAGATACCATTGAAGTTCAA
 CAAATGAAGCAACAAGCCAGAGAGGATCGTGCTCTTAAGATTGCCGAGCAGGAGAAG
 CTCACCAGAGAGATGTCTGCTCGCGAAGAAGCCGAACAGCGTCAACGTGACGCCGAA
 AAGCGTATGGCTCAAATGCAGGAAGATATGGAGAGAGCTCGTCTTGTCTTTGAAGCA
 CACAATACAATTCACTCATTGGAGGCTCAACTCAAGCAATTGCAATTGGCTAAACAA
 GCATTGGAACAGAAGGAATACGAACTTCGTGAGCTCACTGCTCAACTTCAATCCGAA
 AAAGCAATGAGTGATGGTGAGAGACGTCATTTGAGAGACCAAGTTGATGCTCGTGAA
 CGTGAAGTTTTTTTCGATGAGAGAAGAAGTCGAGAGACAGACTACTGTTACAAGACAA
 CTTTCAGACACAGATTCACTCGCAACAACACACTCAACTACTCAAACAGTCATCAC
 GTTTCCAATGGACACGCTCACGATGAGACTGCCACTGATGATGAAGATAATGGAGCA
 ACTGAACTCACAAATGACGCTGATCAGAATGTGCCACAACACGAGTTGGAGCGTGTC
 ACAGCAGCCGAGAAGAACATTCAGATCAAGAATAAGCTGGATATGTTGACTCGCGAG
 CTTGACAGTGTTAAAGATCAGAACGCTGTCACTGACTACGACGTTCTGCATATGGAG
 AACAAAAGGCCGGACGCGACAAGTACAAGACTCTCCGTCAAATCCGTGGAGGAAAC
 ACAAACGAAGAATCGATCAATACGAAAATATG TAA

11.2 Sequenzen der "in frame" Hefe-Zwei-Hybrid Screen Kandidaten

Anmerkung: Ergebnisse der Sequenzierung der im Hefe-Zwei-Hybrid Screen identifizierten Interaktionspartner von *erm-1*. Die gefundenen Gene befinden sich in dem Vektor pACTII. In rot ist die EcoRI Schnittstelle dargestellt, da die Gene mit EcoRI in den Vektor kloniert wurden. Die unterstrichenen Basen kennzeichnen das Leseraster (s. dazu Abschnitt 3.4).

11.2.1 Sequenzen der mit dem N-terminalen *erm-1*-Köderkonstrukt identifizierten Gene

F56D12.5A (*vig-1*):

GATGATGAAGATACCCACCAAACCCAAAAAAGAGATCTCTATGGCTTACCCATAC
 GATGTTCCAGATTACGCTAGCTTGGGTGGTCATATGGCCATGGAGGCCCCGGGGATC
CGAATTCGGCACGAGCCAAGACGTCGTGGAGGATTCACCCCTTGGAGGTGGACCATCT
 GGCGGACGTGGAGGAGGCCGTGGTGGACGTGGGCGTCAATTTCGATCGTCAATCCGGA
 TCCGACCGTACCGGAGTTCGCTCATTTCGACAAGAAGGACGGACACGGAAAGGGCAAC
 TGGGGAGACCAGAAGGACGAGTTGGCTGGAGAAACCGAGAACATTGCTCCAGAGGGC
 GCTGAGAGCACCGAGCCAGAGGTTCCACGTGAGAAGACCGCTGAGGAGCTCGCTTAC
 GAGGCTGAGTTGGCTGTTCTTGCCAAGCAAAAGACTCTTAAGGAGTTCAAGGCTGCG
 GCTAAGCTGACGCTCCAAAGTT

Y55F3AM.13

CGATGATGAAGATACCCACCAAACCCAAAAAAGAGATCTCTATGGCTTACCCATA
 CGATGTTCCAGATTACGCTAGCTTGGGTGGTCATATGGCCATGGAGGCCCCGGGGAT
CCGAATTCGGCACGAGGATCCGCGCAAGGCTTTGGAGCACAAACAGCTCTCACTGAT
 CGAGCAGCTCAAAGCACAGACCGAAGAGCTCAAGAAGTTGCTGGTAAGCCTTGGAGA
 GGCTGGAAAAGCAGAGAGATCTGCTCAAAAACCTGCGGAAAAGCGCCAAAAGAGCC
 TGAGAAATCCGCTGGAGCAGCCTCTCAGCTCCCGGAGTCCCGGAGCCCCGCAAA
 ACTAGACAAGGACGCCAAGAAGGAGGCTCGCAAGGCTGCCAAGGCAGAAGCCGTAAA
 GAAATTGGCTTCCGGAGAGGCTCCACCACAGAAATCCGCGAAAAGACCGTAAATTC
 GACTCCATGGACCGTCCAGGACGACCGAAAGACGTGGGAGACCAATCTGACTCTCAC
 CGTGAATCTCCAACCTTCTTGTGGCCTACGAGCCGCAGGAGCAGCTGAAAAACGC
 CACGCTGACAGTGCGGGACGTGGATTTGCCGTGGGCTCGGGCTCTCGAAAGGTCGG
 CGCAAGCCGTGGAGTCTCGTTTGAGGGAGAAGTCAAAAATCAGACGAAAGAGAAGAA
 ATCCAGTCTGAAAGTTGTGAAAGGCCCTGCTCCTCCCTGCTATTGAAAAACTACCG
 TCAAATCCCTTCAACTATCTGGAAGCTGTTGGGCTCTT

C36B1.4 (pas-4)

AAAAAGAGATCTCTATGGCTTACCCATACGATGTTCCAGATTACGCTAGCTTGGGTG
 GTCATATGGCCATGGAGGCCCCGGGGATCCGAATTCGGCACGAGAGATATATTGCAA
 ACACGAAGCAGCGCTTACACAATCTCCAGGACGTGCCCCATTTCGGAATTTCAATGC
 TCATTGGAGGATTCGATCATGACGGAACCTCCACGTCTTTTCAAACCGAGCCATCTG
 GAGCTTACTACGAGTACGTTGCCAACGCGACTGGAAGAGGAGAGAAACCAGTGCGTG
 AATACCTTGAGGAGCAATACAGCGAGGAAAATACTGTGACGAAGCTACCACTCTTA
 AATTGGTTGTAAAGTCGCTGGCTCAGGTCGTACCACCAGGATCACAAAATATCGAGA
 TTGCAGTCATGAAAAAAGTTAATGATGAGCTGCAGCAACGTGTATTGTCAACTGAAG
 AAATCGAGGCTCTCCTGAAGGTTGTTGAGACAGAACGTGTGGCTGCTGAGGCTGAAG
 AGGCTGCATCCAAGAAGAAGTAGATTGCAACTTTTGTCTTCTGTCCATTATCCGTGT
 GTATTGATTTCCAGTTATCTGCTCCCCTTTTCAAACCTAATTTATTTTATTCATC
 TTTATTGACGGGAATGAAAAAGTTTTCCCTAAAAAATAAAAAAAAAAAAAAAAAAACTC
 GAGAGATCTATGAATCGTAGATACTGAAAAACCCGCAAGTTCACTTCAACTGTGCA
 TCGTGCACCATCTCAATTTCTTTCATTTATACATCGTTTTGCCCCTCTTTATG

C06E7.2:

AAAAAGAGATCTCTATGGCTTACCCATACGATGTTCCAGATTACGCTAGCTTGGGTG
 GTCATATGGCCATGGAGGCCCCGGGGATCCGAATTCGGCACGAGAGATATATTGCAA
 ACACGAAGCAGCGCTTACACAATCTCCAGGACGTGCCCCATTTCGGAATTTCAATGC
 TCATTGGAGGATTCGATCATGACGGAACCTCCACGTCTTTTCAAACCGAGCCATCTG
 GAGCTTACTACGAGTACGTTGCCAACGCGACTGGAAGAGGAGAGAAACCAGTGCGTG
 AATACCTTGAGGAGCAATACAGCGAGGAAAATACTGTGACGAAGCTACCACTCTTA
 AATTGGTTGTAAAGTCGCTGGCTCAGGTCGTACCACCAGGATCACAAAATATCGAGA
 TTGCAGTCATGAAAAAAGTTAATGATGAGCTGCAGCAACGTGTATTGTCAACTGAAG
 AAATCGAGGCTCTCCTGAAGGTTGTTGAGACAGAACGTGTGGCTGCTGAGGCTGAAG
 AGGCTGCATCCAAGAAGAAGTAGATTGCAACTTTTGTCTTCTGTCCATTATCCGTGT
 GTATTGATTTCCAGTTATCTGCTCCCCTTTTCAAACCTAATTTATTTTATTCATC
 TTTATTGACGGGAATGAAAAAGTTTTCCCTAAAAAATAAAAAAAAAAAAAAAAAAACTC

GAGAGATCTATGAATCGTAGATACTGAAAAACCCGCAAGTTCACCTTCAACTGTGCA
TCGTGCACCATCTCAATTTCTTTTCATTTATACATCGTTTTGCCCCTTTTATG

W09H1.6 (*lec-1*):

AAAAAAGAGATCTCTATGGCTTACCCCTACGATGTTCCAGATTACGCTAGCTTGGGT
GGTCATATGGCCATGGAGGCCCGGGGATCC**GAATTC**GGCACGAGGAAGAGCGCAAG
TCGAACCAATCAAGAAGGGAGACTCGTTCGACATTCGCATCCGTGCTCACGACGAT
CGTTCCAGATCATCGTCGACCACAAGGAGTTC AAGGACTACGAGCACCGTCTGCCA
CTCTCCTCAATCTCTCACCTCTCGATTGACGGAGATCTCTACTTGAACCACGTTTAC
TGGGGAGGAAAGTACTACCCAGTACCATAACGAGAGCGGACTCGCCAACGGACTTCCA
GTCGAAAGAGCCTCCTCGTCTTTGGAACCGTTGAGAAGAAGGCCAAGCGTTCCAC
GTCAACCTTCTCCGCAAGAATGGAGACATCTCGTTCACCTTCAACCCACGTTTCGAT
GAGAAGCACGTCATCCGCAACTCTCTTGCCGCCAACGAATGGGGAAATGAGGAGCGC
GAGGGAAAGAACCATTTCGAGAAGGGAGTCGGCTTCGACTTGGTCATCCAA

Y37E11AL.7 (*map-1*)

AAAAAAGAGATCTCTATGGCTTACCCATACGATGTTCCAGATTACGCTAGCTTGGGT
GGTCATATGGCCATGGAGGCCCGGGGATCC**GAATTC**GGCACGAGCAAGCCCGAAAA
ATGGACGATTTGGAAGGCAAAAAGTGCATTGGATGCCAGAAACCGGCAAAACTACGA
TGCCCGACATGCATTTAAATGTCACTGCCCGACGCGTATTTCTGTGATCAGTCTGCT
TTCAAAGCATTCTGGCCGATTCACAAATTCTCGCACTCGGACGTCAACGGGCCGTAC
AATCCGTGGCCGTGCTACTCGTTCACAGGCTCGCTTCGCCAGGCCGAGTCACCGAT
CGTCGCCCGGTTCCCGATCACATCCCCCGCCGGATTACGCCCTTACCCGCAAGGC
GTCTCTCTGGAGGAACGTCAATCGAAAAGTGAACGTGTGATTAAAGTATTGACCGAC
GAGGAGAAGGAGGGCCTGAAAGTGGCCTGTAAACTAGGCCGTGAATGCCTGAATGAG
GCCGCCAAGGCCTGCGGGCCTGGAGTTACTACTGAGGAAATCGATCGAGTTGTGCAT
GAGGCGCAATTGAACGAGATTGTTATCCGAGCCCGTTGGGATATTATAAGTTCCCG
AAGAGTTGTTGTACTTCTGTTAATGAGGTCATTTGTTCATGGAATTCGGGATATGAGA
AAGTTGGAGAATGGAGATCTTTGCAATGTCGACGTCACCGTCTATCACCGCGGTTTC
CATGGAGATCTCAACGAAACCT

F47G4.2

AAAAAAGAGATCTCTATGGCTTACCCATACGATGTTCCAGATTACGCTAGCTTGGGT
GGTCATATGGCCATGGAGGCCCGGGGATCC**GAATTC**GGCACGAGCAAGCCCGAAAA
ATGGACGATTTGGAAGGCAAAAAGTGCATTGGATGCCAGAAACCGGCAAAACTACGA
TGCCCGACATGCATTTAAATGTCACTGCCCGACGCGTATTTCTGTGACAGTCTGCT
TCAAAGCATTCTGGCCGATTCACAAATTCTCGCACTCGGACGTCAACGGGCCGTACA
ATCCGTGGCCGTGCTACTCGTTCACAGGCTCGCTTCGCCAGGCCGAGTCACCGATC
GTCGCCCGGTTCCCGATCACATCCCCCGCCGGATTACGCCCTTACCCGCAAGGCG
TCTCTCTGGAGGAACGTCAATCGAAAAGTGAACGTGTGATTAAAGTATTGACCGACG
AGGAGAAGGAGGGCCTGAAAGTGGCCTGTAAACTAGGCCGTGAATGCCTGAATGAGG
CCGCCAAGGCCTGCGGGCCTGGAGTTACTACTGAGGAAATCGATCGAGTTGTGCATG
AGGCGGCAATTGAACGAGATTGTTATCCGAGCCCGTTGGGATATTATAAGTTCCCGA
AGAGTTGTTGTACTTCTGTTAATGAGGTCATTTGTTCATGGAATTCGGGATATGAGAA
AGTTGGAGAATGGAGATCTTTGCAATGTCGACGTCACCGTCTATCACCGCGGTTTC
ATGGAGATCTCAACGAAACCT

F31E3.5 (*eft-3*)

GATGATGAAGATACCCACCAAACCCAAAAAAGAGATCTCTATGGCTTACCCATAC
GATGTTCCAGATTACGCTAGCTTGGGTGGTCATATGGCCATGGAGGCCCGGGGATC
GAATTCGGCACGAGGACCACCCTCCGTCTCCACTCCAGGATGTGTACAAGATC
GGAGGAATCGGAATGTTCCAGTCGGACGTGTTGAGACCGGAATCATCAAGCCAGGA
ATGGTCGTTACCTTCGCTCCACAAAACGTCACCCTGAAGTCAAGTCCGTTGAGATG
CATCACGAATCTTCCAGAGGCCGTCCAGGAGACAACGTTGGATTCAACGTCAAG
AACGTCTCCGTCAAGGATATTGCTCGTGGATCCGTCTGCTCCGACTCCAAGCAAGAC
CCAGCCAAGGAGGCTCGCACCTTCCACGCCAGGTCATCATCATGAACCATCCAGGA

CAGATCTCCAACGGATACACTCCAGTTCTCGATTGCCACACCGCTCACATCGCCTGC
 AAGTTCAACGAGCTTAAGGAGAAGGTTGACCGTCTGACCGGTAAGAAGGTTGAGGAC
 TTCCCAAAGTTCCTCAAGTCTGGAGATGCTGGAATCGTCGAGCTCATCCCAACCAAG
 CCACTTTGTGTTGAATCCTTCACCGACTACGCTCCACTCGGACGTTTCGCCGTTTCGT
 GACATGAGACAAACCGTCGCTGTCGGAGTTATCAAGTCCGTTGAGAAGTCTGATGGA
 TCCTCTGGAAAGGTCACCAAGTCCGCCAAAAGGCTGCACCAAAGAAGAAGTAATCT
 TCATTGTTGAGTTATCTTGTGATTTTGATAATTATCAACTCTTACTTTTAATGGGTT
 ATGAATAATAACA

K10C2.4

GATGATGAAGATACCCACCAAACCCAAAAAAGAGATCTCTATGGCTTACCCATAC
 GATGTTCCAGATTACGCTAGCTTGGGTGGTCATATGGCCATGGAGGCCCCGGGGATC
CGAATTCGGCAGGAGGTTCCAATCGAGAAGGCTGAGGATCGTATCTTTGGAGTTGTG
 CTCATGAACGACTGGAGTGCTCGCGATATCCAAGCTTGGGAATACGTTCCACTCGGC
 CCATTCCTTGCTAAATCCTTTGCCACAACCTGTTTCTCCATGGGTCGTCTCAATTGAA
 GCTCTTCGTCCATACTTTGTTGAGAATCCAGTACAAGATCCAGTTCACCAGCATAT
 CTCATCACGATGACCCATTTACCCTTGACATCAATTTGGCCGTCAGTATCCGTCCA
 GAAGGAGATGCTGTGGACCATATTGTCTGTAAAACCTAATTTCAAGCATTTGTATTGG
 ACTCTAAAACAACAACCTTGCTCACCACACCGTCAATGGATGCAACCTCCGCGCTGGA
 GATCTTTTGGGATCAGGAACCTGTATCTGGACCAGAAGAAGGTGCATATGGATCCATG
 CTCGAGCTTTCGTGGCGGGAGCCAAAGAAGTTCCAGTTGGCTCAGAAATCCGAAAG
 TTCTTAAAGGACGGAGATGAGGTCAACCTTTCTGGAGTTTGTGAAAAGAATGGAGTC
 AGAATTGGTTTCGGAGAGTGCCGCGGAAAAGTCTGCCAGCCGATATCTAAAATCAT
 CGTAATTAATCGTTTTGCTTTTTGTTTTCATTTCTCTCGTTTGTTAGTAGTATCTCGT
 CGAATAAGTTCTGAAGCCACGA

F57B9.9 (pqn-46)

GATGATGAAGATACCCACCAAACCCAAAAAAGAGATCTCTATGGCTTACCCATAC
 GATGTTCCAGATTACGCTAGCTTGGGTGGTCATATGGCCATGGAGGCCCCGGGGATC
CGAATTCGGCAGGAGCAGCAGTTCAACGGATACAACAACAATAACAATAACAAC
 AATCAGCAGCAACAGTTCTACAATAATAATAATAACTACAACAATAACAATTAC
 AATAATAATAACAATAACAATAACAATAACAATAACTACAACAATAACAATAACA
 GTCCAACAACAAGTTCAACAGCCTCAGCAACCTGTCCAGCAACCTCAACCAACTCCA
 ATTCGTCCACCACAGCCACAACGTTCCGGCCAACAGCCAGTGCAATCTTTCGAGTCA
 CATACCCAAATCGTGCAACCAGTGAGAGCTGTTCAAGCTAATGCTCAACTTGTTTCCAG
 CCAGTCATTCGGCCAGCTGCCAGCGCAGTTGCCACCGCCGTAGTTGATACCGATTCA
 TCTGCCAAGAAGGCCACAGAATTTAAACAAGCTAATGGAATTGAACAACCAAAGCCA
 GCTCATGCTGAAAAGGCTTCTCTTGATGCTGAGGTGGATGCCAATGTTGACCGTCAT
 TTGTGGTTCTCTGCGGATTATGATGTGAAGCAATGTCGCAAGGGACTCAACGGGAATC
 GGAGTTAGATTCCAAAAGAAGTTCCCATCATATCTACAAAAGGGAGGAAAGGATAGA
 GAACTCGCCGAGCTCGTCGAGCAGACTTTTGGAAATGTGAGAGAAATCATCGGCTTC
 TCACTGGGACAAGGTTGACACACTTTTGCAAAAAGATTAGTTTGACAACAGCGAAGAG
 GGAGAATGCCGTGCAGGACTATTCAGAGCGTATCTCATGTGTTAC

C46A5.9 (hcf-1)

GATGATGAAGATACCCACCAAACCCAAAAAAGAGATCTCTATGGCTTACCCATAC
 GATGTTCCAGATTACGCTAGCTTGGGTGGTCATATGGCCATGGAGGCCCCGGGGATC
CGAATTCGGCAGGAGGCGGATCCAAAACCAGCCACTGACGAAGGCGGATTGCCACAA
 GATTTATTTGAAGACACTGAAAAGAATGAGACTGCCCTCTCCAAAAGATCAAATGAT
 GCTCAGAGTGCAGACTCGAGTACGTGTGAGCAGAAAAAACTGATGAATCTGGATTG
 GAGGAAGACTCTGAAAAGATCAAAAACCTTCAGACGCTGGAGAAACAGATGAGATG
 AAAGAAGAGAATGGTGATGATGATTTGCCATGGTTTGTGTTGGAATCATAGATAAA
 GCAACAATCAACGTCACTCATTACTTCAATGATCGACAGCAATCCCTCGAAAAGCAA
 CTGAATGATTTGATTGATCATAATGCCTTTTAAATGTGTCAACGATTCTGTATTCACT
 ACTGAGGACAAAATTCCTGATCAATGGGCAATCTTACCGATTCCGTGTTTCAGCA

ATCAATGGCTTAGGAAAAGGAGCATGGAGTGAGACTGCATCGTGCAAGACATGCGTC
 CCGGGATATCCAAGTGCTCCATCATCGATTGCAATTACCAAGTCACACGAAGGCGCA
 CAACTCACCTGGGAGCCTCCATCAAACACGAATATTTCTGGAAAGATAATTGAGTAC
 AGCGTTTACTTGGCCGTTAAGAATCAATCTGCAAATTCGGCTGATAGTCAACTCGCT
 TTTATGAGAGTTTACTGTGGACCGCAGCTGACTGCCAGTTCTACATCAACCTGGAAC
 GGCTTTTGTGATCAGACCACAACC

11.2.2 Sequenzen der mit dem C-terminalen *erm-1*-Köderkonstrukt identifizierten Gene

F25B5.4a/c (*ubq-1*)

AAAAAGAGATCTCTATGGCTTACCCATACGATGTTCCAGATTACGCTAGCTTGGGTG
 GTCATATGGCCATGGAGGCCCGGGGATCCGAATTCGGCACGAGAGATATATTGCAA
 ACACGAAGCAGCGCTTCACACAATCTCCAGGACGTCGCCATTTCGGAATTTCAATGC
 TCATTGGAGGATTCGATCATGACGGAACCTCCACGTCTTTTCAAACCGAGCCATCTG
 GAGCTTACTACGAGTACGTTGCCAACGCGACTGGAAGAGGAGAGAAACCAGTGCGTG
 AATACCTTGAGGAGCAATACAGCGAGGAAAATACTGTGACGAAGCTACCACTCTTA
 AATTGGTTGTAAAGTCGCTGGCTCAGGTCGTACCACCAGGATCACAAAATATCGAGA
 TTGCAGTCATGAAAAAGTTAATGATGAGCTGCAGCAACGTGTATTGTCAACTGAAG
 AAATCGAGGCTCTCCTGAAGGTTGTTGAGACAGAACGTGTGGCTGCTGAGGCTGAAG
 AGGCTGCATCCAAGAAGAAGTAGATTGCAACTTTTGTCTTCTGTCCATTATCCGTGT
 GTATTGATTTCCAGTTATCTGCTCCCCTTTTCAAACCTAATTTATTTTATTCATC
 TTTATTGACGGGAATGAAAAAGTTTCCCTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAACTC
 GAGAGATCTATGAATCGTAGATACTGAAAAACCCCGCAAGTTCACTTCAACTGTGCA
 TCGTGCACCATCTCAATTTCTTTCATTTATACTCGTTTTTGCCTCTTTATG

Y39A3CL.5 (*clp-4*)

ATGATGAAGATACCCACCAAACCCAAAAAAGAGATCTCTATGGCTTACCCATACG
 ATGTTCCAGATTACGCTAGCTTGGGTGGTCATATGGCCATGGAGGCCCGGGGATCC
 GAATTCGGCACGAGCTGACTGCGGAGATTTTCGATGAAATCGCTGAAATGACTGGCG
 TCAACAGAGCAACTGAGACAGTCGAGGAGGAACATCAGTGGCATGAGATCATGGAGG
 ACGGGGAATGGAGTTCTAAAAAAGGCACAGCTGGAGGCTGCAACAACAACCCATCTA
 CCTACCCCAAGAACCCTCAATTCTCCACTTTCTTCACAGCACCACAATCCTCTATTG
 AAGCCGACGGGAATGTTACCGTAATCGTTGCAGTTCTACAAAAGTACAGAAGAGAGC
 TCCGTTCAAAGGGCAAAGATGTCCTGCCAATTGGTGTATCGATCTACTCACTTGGCG
 CCGAAGGCACCGCCCGGAGCCCTCTAACCGCCAGTTCTTCTCGCAAACCGCCCGA
 TCGCCCGAACTACAGTATTCTGTGAATACTAGAGAGGTTACTGTAAGATTCCGTGTAC
 CACCTGGGCAATATGTCATTGTCCCATGTACCTTTGATGCTTACGATGATGCCGAGT
 TTCTGCTCAGAGTCTATGCTAATGGAACCTTGAATCTAGCCTGCTGTAATCAATA
 ATGCCAGTTTTGCCGCGCAATGATGAGATTTTCGAATACTTTGCAATTTTATTTT
 TTCAAATATAAATTTCCGCCAAACTTTAATGCTTTGCTTCTTCAATAAATTTTAT
 CG

B0222.6 (*col-144*)

GATGATGAAGATACCCACCAAACCCAAAAAAGAGATCTCTATGGCTTACCCATAC
 GATGTTCCAGATTACGCTAGCTTGGGTGGTCATATGGCCATGGAGGCCCGGGGATC
 CGAATTCGGCACGAGGATGGAGTCTCTGTCTTCCGTGTTGAGACCGACTCTGCATGG
 ACCGAGATGATGGACATCCAGATCACCGTTACCCACCAAACCAAGCCACGTGTCAAC
 CCATTCAACTCTATCTTCCGTCAAAGCGTCAAACATTTCTCTGGACTCCAGCTTGG
 TGCCAATGCGAGCCAACTAAGCCAACCTGCCACCAGGACCACCAGGACCACCAGGA
 CAGCCAGGAGCCCGAGGAACCCAGGAGCCCGAGGACCAAAGGGAGACGACAACACC
 GCTACCTTCGCTCCACTCACCTGCGCCCGAGTCTCCCAAGACTGCGTCAAGTGCCCA
 GAAGGACCAGCTGGACCAGCCGACCAGAAGGACCAGCCGGACCAGCCGGACCAGAC
 GGACAACCAGGAGCACCAGGAAACGCTGGAAACCCAGGATCCGACGGACAACCAGGA
 GCCCCAGGAGACAACGGACAAGACGGAGCCCGAGGACAAGACGGACAACCAGGAGCC

CCAGGACAAGACGGACAACGTGGATCCGGAGCCCCAGGAGGACCAGGAGCCCCAGGA
 AACGCTGGACCAGCTGGACCAGCCGGACAAGACGGAGCCCCAGGACAAGACGGACAA
 CCAGGACCAGCCGGACCAGCTGGACAAGATGGAGCCAGGAAACGCTGGATCCGATG
 GACAACCAGGAGCCCCAGGAGGA

C13B9.3

CGATGATGAAGATACCCACCAAACCCAAAAAAGAGATCTCTATGGCTTACCCATA
 CGATGTTCCAGATTACGCTAGCTTGGGTGGTCATATGGCCATGGAGGCCCGGGGAT
 CC**GAATTC**GGCAGGAGGAATCATCTGATGGAGTCCAAGTCAATATTGAGTACACATT
 GCAAAGAGAGGACATCACTTTGAACAATGTTGCGCATATTGTGCCACTTCCAACCTGC
 GACAGCTCCATCCGTTGGTGTGATGGAGAATATGAGTACCACAAGACGAAGAA
 CGTGATTGTTTGGTCCCTTAGCTGTGATTGACAGCTCGAACTCTTCGGGAACCCCTTGA
 ATTCTCAGTTCCAAATGGCCATTGTGATCATTTCTTCCCTGTCTCCGTTGGATTAC
 TTCTGAAAACCTTGTGTGCGGATTACTGTACAAAAAGTTGTGAAAATGATGGATC
 GCCGGTAACTTATTCAGTGGAGACTACTTTCAACTCGGAAAATTTGAAATTGTGTA
 ATTTATTCCTATTCGAGAGATCTTCAAGATTGATATTTTTATTGCTTCCAATACCAC
 CACCAAGCCACTAATTTTTCTAGAGATTGATTCCTTTTTTGCAAATCATGTTAT
 CCCTTTGATTGCTGTGATGCATAAGCCACTCTCCTCCGACCCAATTCATACTGTATT
 TATTGAGAATATTTAATTTATGTATGCTCTTCTATTTATTTCCATTTCTTTTGGGT
 TTTACGGATACATTTTTTTTGTACGATAAAAAAAAAAAAAAAAAACTCGAGAGATCTAT
 GAATCGTAGATACTGAAAACCCGCAAGTCACTTCACTGTGCATCGTGCACCATCTC
 ATTTCTTCATTTATACATCGTTTGCCTCCTTTATGAACTATACTCCCTAAGTTCATC
 TGGCATGTACT

K05B2.3

AGATCTCTATGGCTTACCCATACGATGTTCCAGATTACGCTAGCTTGGGTGGTCATA
 TGGCCATGGAGGCCCGGGGATCC**GAATTC**GGCAGGAGGAACAATCACTGAACGATA
 AGGACACATCGATCAACAACTTCGTGACGAGAGCAAGATCCTGATGGTTGAGCTTC
 AAATGCTCATTGATACAAAACAGACTCTCGATGCTGAAATTGTGATCTACCGTAAGA
 TGCTTGATGGAAAAGAGAATCGCGCAGGTCTACGTCAGCTCGTGCAGCATGTTGTTA
 AGACAACATCTATTCATCAAACCAAGGAAATTGAGAGTCTTCGAGTTCTCAAAGGTG
 AAACGACTAGTC

C29E4.3a (ran-2)

GATGATGAAGATACCCACCATTTCCAAAAAAGAGATCTCTATGGCTTACCCATAC
 GATGTTCCAGATTACGCTAGCTTGGGTGGTCATATGGCCATGGAGGCCCGGGGATC
 C**GAATTC**GGCAGGAGGAATTGCGGCAGGAAATGTGATTGCAAAGCTTTAGAGAGT
 CATCCAGAGCTCGAGAGATGTCTTTGGAGTGATTTGTTCACTGGACGCCCTAAAAAC
 GAAATTCACCGATTCTAGAAGCTCTTGGAAAGGCTATGATGACTGCTGGATGTAAG
 ATCAAAGAGCTTGACTTGTCTGACAACGCCTTTGGACCAATTGGAGCTGATGCTCTC
 AAGGATCTTTTGAATCACCGTCATCATTCTCTTTGGAAGTCTTGAAGCTTAACAAC
 AATGGATTAGGAATAGGAGGAAAACAATCGCAAAATCATTGACTGAGTGTCTCAGA
 AAGTCAATTGCTGTGGGAGGCGAGAATCGATTGAGATTGAAAACATTTATTGCTGGA
 AGAAATCGTTTGGAAAATCCAGGAGCACATGCACTGGCGGCTACTTTTAAGGCTCTT
 GAAACGGTTGAATGGTTTGTGTTCTGTTCAAAATGGAATTCATGAAGAAGGAATTCGT
 GCTCTGGTGGCTGCATTGAAACACAACAAAATCTT

ZK1098.5

AGATCTCTATGGCTTACCCATACGATGTTCCAGATTACGCTAGCTTGGGTGGTCATA
 TGGCCATGGAGGCCCGGGGATCC**GAATTC**GGCAGGAGGTTCCACGATGCGTTGACA
 CTCGACAAATCGCTGATGTCCTGTGTGCAAAATGCGATTCCCTGTTATCTCGGAATTT
 CAGCCACAGCTTCATCGTGGACAAGTGGCGATCGTGAATTTACGATTACACTTGAAG
 CGAATCCACTTACGGAATTAGTTCAGGTACCCG

ZK1055.7

CGATGATGAAGATACCCACCAAACCCAAAAAAGAGATCTCTATGGCTTACCCATA
 CGATGTTCCAGATTACGCTAGCTTGGGTGGTCATATGGCCATGGAGGCCCGGGGAT

CCGAATTCGGCACGAGCCAAAACCTTGTTTCATGAATCCGTTCCAAGTAAGAATGCTGC
 AGCTTTTCTCACGGCTTCTGCTGTTAATACTTCTCAACTTGCACTCCTGGCTGGATT
 TTCATCTGTCTATCTGAATAATGCATTTGTCGCAACAAGTCACCTGAAAAACGTGTC
 ACCAGGTGAAAGACTCACTTGCTCTTTGGGAGTTGACACGGCAATTTCGTGTGGAGTA
 CAAGCCGGCAAAGAAGTACCATGAGGAAGGAGGTTACATCACCAAGCACTCTGCAA
 TGTCACGGAGCAAACAATCTCCATCAAAAATACGAGAAATGAGCAGCCGGTGCTCCT
 AACCGTGAAGCATGCGATTCCACGTAGCACTGACGAGAAGATCCGTGTGAAGCTAGT
 TTCACCAGCAGCTACGCCACATGATGCGGAGAAGGCTGGCACTGAAGCCGAGAATTC
 TGAGCCTGTGGAAGGGCAAAGTTCAATTCCAGCAATCACTTGGAGTGGACTATAAA
 GCTGGCTCCGAGCAGCTCAAAGGATCTGATCATCAAATATGTGGTGGAGCATCCAAA
 AGATGAAACTGTTCAATATCAAGAGAATTTCTAAAGTACATCCAACAGTGAATTGAT
 ACTTAAATGAAGTCGTCTATCTTTTACAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAACTCGAGAGA
 TCTATGAATCGTAGATACTGAAAACCCCGCAGTCACTTCACTGTGCATCGTGCACCA
 TCTCATTTCTTTCATTATACATCGTTTGCCTCTTTATGAACTAACTCTCTAGTTCAT
 C

11.3 Sequenzierung von *lad-1(ok1244)*

Anmerkung: gespleißte Sequenz von *lad-1(ok1244)* (s. auch Abschnitt 3.6.2.2). In rot sind die Basen gekennzeichnet, die den Beginn der Deletion markieren. Fettgedruckt sind die Basen, die die Sequenz nach der Deletion markieren. Hierdurch wird ein “frameshift” verursacht, der zu einem vorzeitigem Stoppkodon (blau kursiv) führt. Die unterstrichenen Basen kennzeichnen das Leseraster.

11.3.1 Vorwärtssequenz

GGAATCCAGCACCAAACCCCGCTTGGTTCCACAATGGTCGTGAGTATCAGTGAAGA
 TAGTGATGCTGCAGGTATTTTCGATTCGAATCATACGGTAAAACACTCGTCTTCAATG
 TAACACAAGACAAGGCTGGAAAGTATGATTGCCGATTTGCAACTCAACAGGATATTG
 ATCGAACATTCAATGTTGTAGTCGAGGCTGCTCCATACTGGCCACTTGGACCACCAC
 CAAATACAAATACAAGTGAAGGTGAAAAAGTAATATTCGACTGTACTACTTACGGAA
 AACCAACTCCGAAAGTGACATTTCTACAAGAATGGAGTCGAAATTGAATCACAAAAG
 ATGATAGATATCTAATTGAAGGAACAAGACTTACTATTTTTGATGTCAAGAAGGGAA
 CTTATGGTAAAGGAGATAATGCAATATATCAGTGTAATCTGAGAATAAGCATGGAT
 GGCTTTGGACCAATTTCTATCTGAATCTTCTTGCATTCAAACCACAACCTTCTCATCG
 ATCCAGGAAAGGAAGAAGTTGAAGCAGTTGCTGGAAAAAGGTTACACTTGAATGTA
 AATCTTTGCAAGTCCAAATGCAGCTGTAAAATGGGAAGCTCCAATGATTTCCGGAT
 CAGAAGGAAATCAGATTCAGCTGATGCTTATGGTGTGGAAAGCTCGTGTTCAGTG
 AAGTGACAGCTGCTGAAGAAGGAGAATATGAATGCATTGGAACCAATAAATATGGTC
 AAGCAACTGGTCTCATTACACTGAAAGTTAGAAAACCAACAATTGTTCAACCATTCC
 CCCGTGTTGAAGAAGTACGAATGGCTGGTGAAGAAATGAGATTAGCTTGTGATGCAA
 CAGCTGATAATCAATTAGAAGTAAAATATGAATGGCTTGTGATGGAAAGTCTCTAC
 CGGAGGATCGAATCAGTTCGGGACACTATAAAATCGATGATGATCATTCTTTAGTGA
 TTTCTAATCCAACCTCAAGATGATACTGCAAAGTATAAGTGTGTTGTGAGCACTAAAT
 TGATCAAGTTGAAAAGGAAATCAAATTTCAATTTAAGGATGTTCTGTGGCTGTTT
 ACTCTGCGTGGGTTCAAACCTTGTGACAAGAACTCACTCACTGCATTTATCAAATTCG
 AACACTATGAGTCGATTCACACAATTGCTCCAATAAAAGAATTCTGGGTTCAATATC
 AAATAGACTCAGAACTGAAGGATCACAATGGAGAACTCATCCAGTTCATCAGCTG
 CTCATCCAAATGATAAGATTGATAATAATCTTAGACATACAACCTGGTGATGCTACTG
 TTTCACTACAACCATTTGGA**AAATTC**CCCTCACCAGTTCGATCCCTTCGCGCATATCC
 AA**TGA**ACTCAAAGTCGGTGGTGAAGGGAGTCGTTGTTCTTGTATGGAAAAGCC
 ACGGCAGACTAACGGAAAGTTGGCACGATATGAGGTGGAGTACTGTAAAACCTCAAAA

CGGGAAACTCGTCGAAAAATCGTGTCTCGGAAACAAATCGATGCGGATTCAAAGA
GATT

Danksagung:

Diese Doktorarbeit ist am Institut für Genetik der Heinrich-Heine-Universität unter Anleitung von PD Dr. Olaf Bossinger angefertigt worden. Ihm möchte ich für die Überlassung des Themas, die vielfältigen Ratschläge, die immerwährende Diskussionsbereitschaft und kritischen Anmerkungen ganz besonders in Bezug auf diese Arbeit bedanken. Dank auch dafür, daß er es mir so oft ermöglicht hat, die großartigen *C. elegans* Meetings zu besuchen.

Herzlich bedanken möchte ich mich auch bei Frau Prof. Dr. E. Knust, da sie es mir ermöglicht hat, in ihrem Institut meine Arbeit anzufertigen.

Mein Dank gilt auch allen ehemaligen und derzeitigen Mitgliedern des Instituts für die angenehme Arbeitsatmosphäre, für steten Rat und Tat und vor allem die spaßigen Institutswanderungen.

Mein besonderer Dank gilt dem Wormlab. Speziell danke ich Carin und Gisela für ihre experimentelle Unterstützung.

Extra Dank nochmals an Ivonne und vor allem Mic für das Korrekturlesen.

Großer Dank gewährt Mic in allen Lebenslagen. Danke für die vielen Diskussionen, daß Du es immer geschafft hast, mich zum Nachdenken zu bewegen und immer einen Schritt tiefer zu gehen. Daß Du es geschafft hast, mich immer wieder aufzubauen und mir gezeigt hast, daß es noch mehr als Arbeit gibt (und dafür Ärger mit Olaf).

Danke für Dein Verständnis, Deine Geduld und Deine Liebe.

Bedanken möchte ich mich auch bei meinem Freundeskreis, für den Spaß, den wir stets haben.

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

Erklärung:

Ich versichere, daß ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unzulässige Hilfe angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und in 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 habe; daß die Dissertation noch keiner anderen Fakultät zur Prüfung vorgelegen hat; daß sie abgesehen von den unten angegebenen Teilpublikationen noch nicht veröffentlicht worden ist, sowie daß ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluß des Promotionsverfahrens auch nicht vornehmen werden. Die Bestimmungen der geltenden Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von PD Dr. Olaf Bossinger betreut worden.

Düsseldorf, den 25. Oktober 2005

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

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.

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**, 262-76.

