

**Entwicklungsgenetische und zellbiologische Analyse der
Musterbildung im Darmepithel des Nematoden
*Caenorhabditis elegans***

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

Michael Hoffmann

aus Düsseldorf

September 2006

Aus dem Institut für Genetik
der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf

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

Referent: Prof. Dr. Elisabeth Knust
Koreferent: PD Dr. Olaf Bossinger
Tag der mündlichen Prüfung: 15.11.2006

Die hier vorgelegte Dissertation habe ich eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt. Die Dissertation wurde in der vorgelegten oder in ähnlicher Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Düsseldorf, den 04.09.2006

(Michael Hoffmann)

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	ENTWICKLUNG DES DARMEPITHEL BEI <i>C. ELEGANS</i>	1
1.2	DIE APIKO-BASALE POLARITÄT.....	5
1.3	DIE PLANARE ZELLPOLARITÄT.....	8
1.4	DER FIBROBLASTEN WACHSTUMSFAKTOR SIGNALWEG IN <i>C. ELEGANS</i>	12
1.5	RNA VERMITTELTE INTERFERENZ DER GENFUNKTION IN <i>C. ELEGANS</i>	14
2	AUFGABENSTELLUNG	17
3	ERGEBNISSE	18
3.1	VANG-1 IST EIN STRABISMUS/VAN GOGH HOMOLOG IN <i>C. ELEGANS</i>	18
3.2	LOKALISATIONSANALYSE VON VANG-1 IM WILDTYP EMBRYO	21
3.3	STRUKTUR-FUNKTIONSANALYSE VON VANG-1.....	25
3.4	DER FUNKTIONSVERLUST VON VANG-1 LÄBTT SICH DURCH RNA VERMITTELTE INTERFERENZ NICHT HERBEIFÜHREN	29
3.5	IN <i>vang-1</i> EMBRYONEN SIND MUSTERBILDUNGSDEFEKTE IM DARM ZU ERKENNEN	31
3.6	IN <i>vang-1</i> EMBRYONEN SIND ABWEICHUNGEN IM ABLAUF DER HYPODERMALEN ZELLINTERKALATION ZU BEOBACHTEN	37
3.7	EIN PUTATIVER PLANARER ZELLPOLARITÄTS-SIGNALWEG IST AN DER MUSTERBILDUNG IM DARM BETEILIGT	40
3.8	DER KANONISCHE WINGLESS-SIGNALWEG IST AN DER MUSTERBILDUNG IM DARM BETEILIGT.....	48
3.9	DER CADHERIN-CATENIN KOMPLEX IST AN DER MUSTERBILDUNG IM DARMEPITHEL BETEILIGT.....	53
3.10	DER FIBROBLASTEN WACHSTUMSFAKTOR-REZEPTOR STEUERT LIGANDENUNABHÄNGIG DIE MUSTERBILDUNG IM DARM	58
3.11	DIE HISTON-DEACETYLASE HDA-1 IST AN DER MUSTERBILDUNG IM DARM BETEILIGT.....	67
3.12	KOMPONENTEN DER EXTRAZELLULÄREN MATRIX SIND AN DER MUSTERBILDUNG DES DARMEPITHEL BETEILIGT	72
4	ZUSAMMENFASSUNG	82
5	DISKUSSION	83
5.1	DIE INTERKALATION DER DARMZELLEN WIRD DURCH VANG-1, DSH-2 UND LIN-17 ÜBER EINEN PLANAREN ZELLPOLARITÄTS-SIGNALWEG REGULIERT	83
5.2	VANG-1 WIRD AM LATERALEN KORTX DER DARMZELLEN BENÖTIGT, UM DIE INTERKALATION ZU GEWÄHRLEISTEN.....	89
5.3	DIE MUSTERBILDUNG IM DARM BENÖTIGT EINE KORREKTE ANORDNUNG DER ZELLEN WÄHREND DER ZYTOPLASMATISCHEN POLARISIERUNG, WELCHE UNABHÄNGIG VON VANG-1 VERMITTELT WIRD	90
5.4	<i>C. ELEGANS</i> ALS MÖGLICHES MODELLSYSTEM FÜR PLANARE ZELLPOLARITÄT	94
6	MATERIAL UND METHODEN.....	97
6.1	CHEMIKALIEN, MATERIALIEN UND GERÄTE	97
6.2	MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN	98
6.2.1	<i>Isolation genomischer DNA</i>	98
6.2.2	<i>Isolation von RNA über TRIzol®</i>	99
6.2.3	<i>in vitro</i> Transkription	99
6.2.4	<i>in vitro</i> Translation	99
6.2.5	Pulldown Assay	100
6.2.6	Hefe 2-Hybrid Interaktionstest	100
6.2.7	Hefestamm	101
6.2.8	Bakterienstämme	101
6.2.9	Vektoren.....	102
6.2.10	Konstrukte.....	102
6.2.10.1	RNAi:	102
6.2.10.2	Hefe Interaktionstests:	103

6.2.10.3	Proteinsynthese:	103
6.2.10.4	Antikörperproduktion:	103
6.2.10.5	Überexpressionen:.....	103
6.3	ZELLBIOLOGISCHE METHODEN	104
6.3.1	<i>Analyse von transgenen Stämmen</i>	<i>104</i>
6.3.2	<i>Auskreuzen der vang-1 Mutante</i>	<i>104</i>
6.3.3	<i>Die Technik der RNA vermittelten Interferenz.....</i>	<i>105</i>
6.3.3.1	Mikroinjektion	105
6.3.3.2	RNAi über Feeding	105
6.3.3.3	Auswertung der RNAi-Tiere	106
6.3.4	<i>Herstellung Polylysin-beschichteter Objektträger und Deckgläser.....</i>	<i>106</i>
6.3.5	<i>Herstellung Agarose-beschichteter Objektträger und Deckgläser</i>	<i>106</i>
6.3.5.1	Für <i>in vivo</i> -Beobachtung	106
6.3.5.2	Für Mikroinjektion.....	107
6.3.6	<i>Präparation von Embryonen</i>	<i>107</i>
6.3.7	<i>Antikörperfärbungen an Embryonen</i>	<i>107</i>
6.3.8	<i>Auswertung von Embryonen</i>	<i>108</i>
7	LITERATURVERZEICHNIS	110
8	ANHANG	122
8.1	SEQUENZIERUNG DER <i>vang-1</i> RTPCR AM WT UND DER <i>vang-1</i> MUTANTE	122
8.2	SEQUENZIERUNGEN DER ÜBEREXPRESSIONSKONSTRUKTE.....	123
8.3	ABKÜRZUNGEN.....	126

1 Einleitung

Ein Teilbereich der Entwicklungsgenetik beschäftigt sich mit der Epithelentwicklung, mit deren Erforschung das Verstehen um den Aufbau und die Aufrechterhaltung polarer Zellverbände möglich wird. Epithelien kleiden alle inneren und äußeren Körperoberflächen aus und werden daher auch Deckgewebe genannt. Durch ihren polaren Aufbau können sie wichtige Aufgaben, wie z.B. Schutzfunktion durch die Epidermis, Aufnahme von Nährstoffen durch das Darmepithel oder Sekretion von Stoffen durch Drüsenepithelien übernehmen. Obgleich sich diese Epithelien in ihrer Funktion unterscheiden, sind ihre einzelnen Komponenten, die Epithelzellen, prinzipiell identisch aufgebaut. Die Beschaffenheit der Epithelzellen ist dabei sowohl in Vertebraten als auch in Invertebraten konserviert. Begünstigt durch seinen einfachen Aufbau und der geringen Zellzahl bietet das Darmepithel von *C. elegans* eine Möglichkeit, die Vorgänge zu analysieren, die für den Aufbau und den Erhalt eines Epithels benötigt werden.

1.1 Entwicklung des Darmepithels bei *C. elegans*

Das Darmepithel entsteht aus einer einzigen Zelle, der E-Blastomere, welche aus einer asymmetrischen Teilung der mesendodermalen Vorläuferzelle EMS hervorgeht (Sulston et al., 1983). Maßgeblich für die frühe Entwicklung der E-Zell-Linie ist die Aktivität der zygotischen GATA-Transkriptionsfaktoren END-1 und END-3 (Zhu et al., 1997; Maduro et al., 2005). In Abwesenheit dieser Transkriptionsfaktoren kann kein Endoderm gebildet werden. Die Expression von END-1 und END-3 wird vermutlich direkt durch die zygotischen GATA-Transkriptionsfaktoren MED-1 und MED-2 induziert (Abb. 1). MED-1 und MED-2 selbst werden durch das maternale SKN-1, einen b-ZIP-ähnlichen Transkriptionsfaktor, aktiviert (Goszcynski und McGhee, 2005). END-1 und END-3 stehen vermutlich an der Spitze einer regulatorischen Kaskade, welche die weitere Differenzierung des Darmes festlegt. Ihre Expression ist temporär auf die frühe E-Zell-Linie limitiert (Zhu et al., 1997; Maduro et al., 2005). Die Aufrechterhaltung der Identität und die weitere Differenzierung der E-Zellen wird vermutlich durch Regulatoren gewährleistet, die

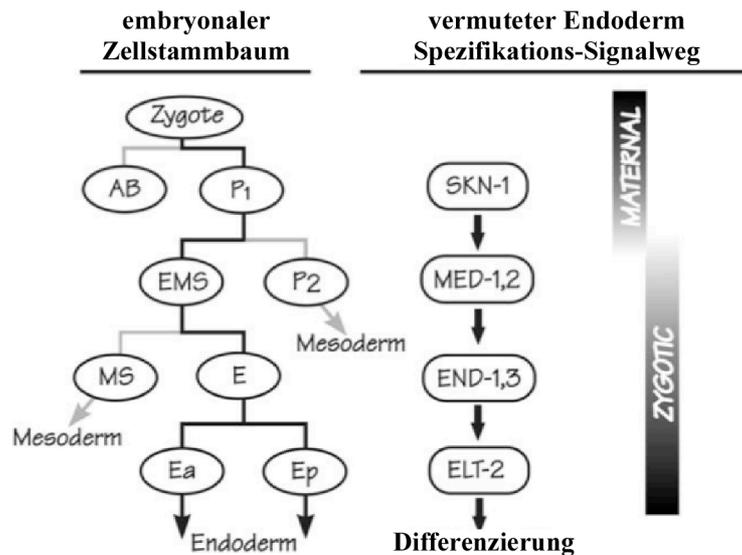


Abb. 1: Übersicht der endoderm spezifizierenden Transkriptionsfaktoren

Gezeigt ist der Zellstammbaum des frühen *C. elegans* Embryos (links) und die Kaskade der Transkriptionsfaktore, die zur Spezifizierung des Endoderms postuliert wird (rechts). Das maternale SKN-1 führt in der EMS-Zelle zur Aktivierung der zygotischen Transkriptionsfaktoren MED-1 und MED-2. MED-1 und MED-2 aktivieren dann in der E-Zelle die Expression von END-1 und END-3. Die Aktivierung von ELT-2 erfolgt im E2-Stadium (Verändert nach Goszcynski und McGhee, 2005).

durch END-1 und END-3 aktiviert werden. Zu diesen putativen Regulatoren wird das ELT-2 gezählt (Zhu et al., 1997; Hawkins und McGhee, 1995; Fukushige et al., 1998, 2005), dessen Funktionsverlust zu einer Mißbildung des Darmes führt. Die Expression von ELT-2, selbst auch ein GATA-Transkriptionsfaktor, beginnt in der frühen Embryogenese im E2 Stadium und bleibt bis zum Adulten bestehen. Noch in der Embryonalentwicklung werden durch ELT-2 weitere darmspezifische Gene, die z.B. für Proteasen oder Phosphatasen kodieren, angeschaltet, um einen funktionsfähigen Darm zu erzeugen (Fukushige et al., 1998).

Die einzelnen Stadien der Darmentwicklung werden mit der Anzahl der bestehenden E-Nachfahren bezeichnet, so wie E2, E4, E8, E16 und E20 (Abb. 2). Im E2-Stadium findet die Gastrulation statt, wodurch die beiden Darmvorläuferzellen nach innen wandern. Hier werden durch drei weitere Zellteilungsrunden sechzehn Zellen (E16) gebildet. In diesem Stadium beginnt die Morphogenese des Darmes mit der sogenannten zytoplasmatischen Polarisierung, welche den mesenchymal-epithelialen

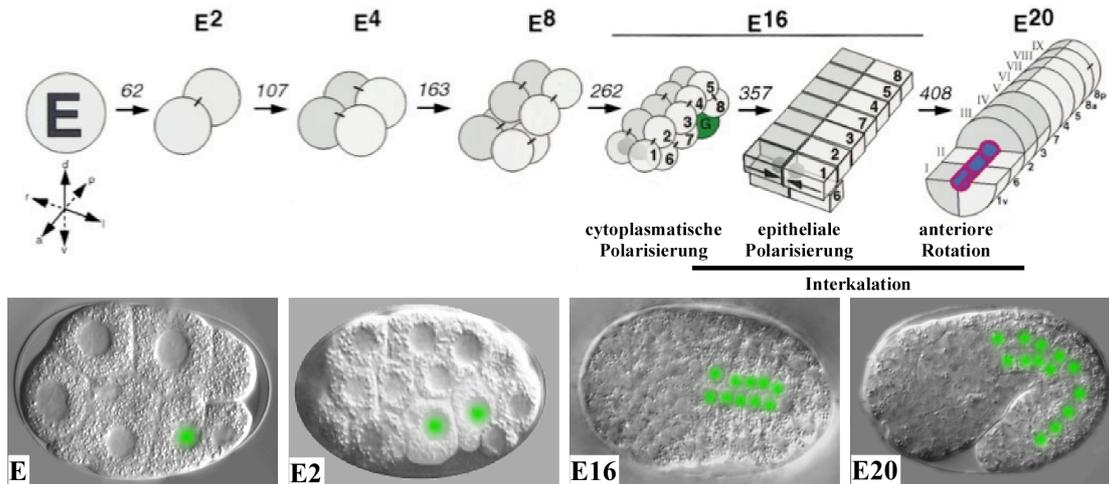


Abb. 2: Übersicht über die Darmentwicklung in *C. elegans*

Die E-Zelle (in der unteren Reihe grün markiert) entsteht durch eine asymmetrische Teilung der EMS-Zelle. Durch vier folgende Zellteilungsrunden entsteht ein zweischichtiges Darmprimordium aus sechzehn Zellen (E16). Ab diesem Stadium wandern die vier ventralen Zellen nacheinander in die dorsale Zellschicht ein, wodurch ein einschichtiges Epithel entsteht. Nach einer weiteren Teilungsrunde der jeweils terminal gelegenen Zellen besteht der Darm schließlich aus zwanzig Zellen (E20). Die Positionen der einzelnen Darmzellen während der Entwicklung sind im Schema gezeigt (obere Reihe; Verändert nach Leung et al., 1999). Das Bild des E2-Stadiums wurde modifiziert nach: www.wormatlas.org, Handbook of anatomy.

Übergang der Darmvorläuferzellen markiert. Hierbei werden die Komponenten der zukünftigen zellulären Kontaktstrukturen in den Zellen apikal angereichert, und die Kerne der jeweils links- und rechtsseitigen Zellen wandern dabei in Richtung einer virtuellen Mittellinie aufeinander zu (Leung et al., 1999). Dadurch nimmt das Darmprimordium in Bezug zur Mittellinie eine radiäre Symmetrie an, welche sowohl die dorsalen als auch die ventralen Zellen betrifft. Die bilaterale Symmetrie entsteht erst durch das Einwandern der ventral gelegenen Zellen in die dorsale Zellreihe im E16 – E20 Stadium. Diese auch Interkalation genannte Wanderung geschieht paarweise. Das posterior gelegene Zellpaar wandert an einer fest definierten Position zuerst ein, wonach das anteriore Zellpaar an einer weiteren festgelegten Position interkaliert (Abb. 2; Leung et al., 1999). Das im E16 Stadium zweischichtig vorliegende Primordium wird also durch zwei zeitlich aufeinander folgende Interkalationsereignisse verändert, sodaß das Darmepithel schließlich aus einer Zellschicht besteht. Durch Zellteilungen der jeweils terminalen Darmzellpaare entsteht ein Epithel aus exakt zwanzig Zellen. Die sich jeweils lateral bzw. dorso-ventral

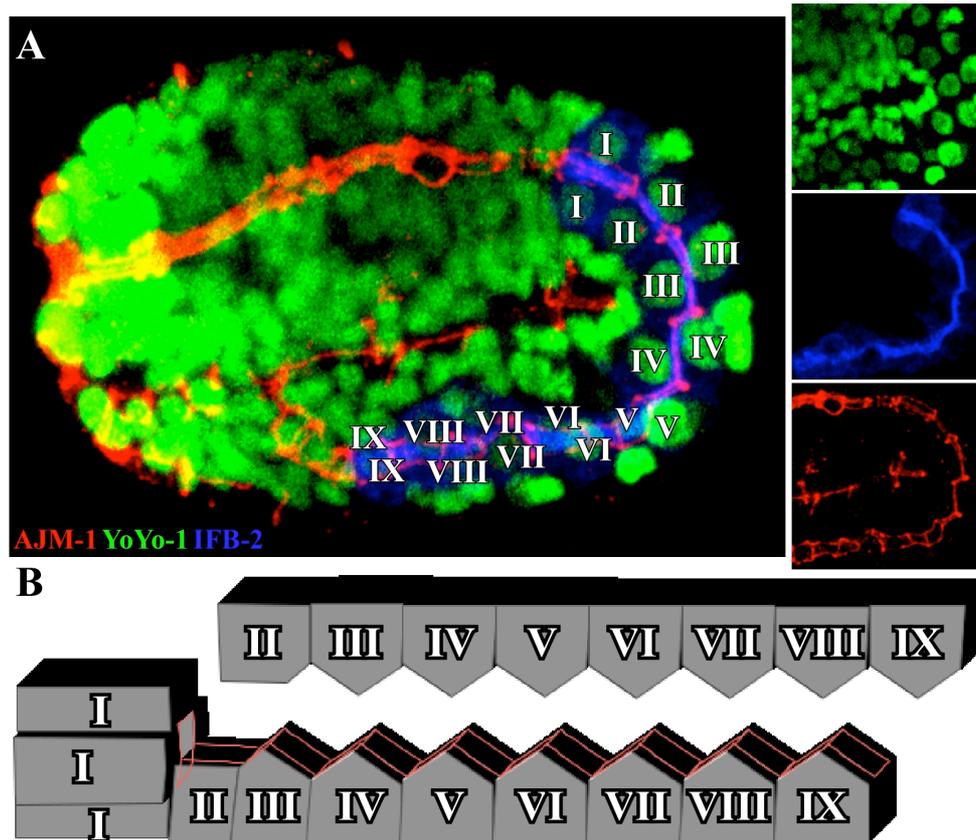


Abb. 3: Aufbau des *C. elegans* Darmepithels aus zwanzig Zellen

(A) Um die Architektur des Darmes zu zeigen, sind der apikalen Kontakt (CeAJ, “*C. elegans* apical junction”) in rot, das darmspezifische Intermediärfilament IFB-2 in blau und die Zellkerne in grün dargestellt. Die zwanzig Darmzellen sind zu neun Einheiten (ints, “intestinal units”), geordnet. Die anteriore Einheit, int I, besteht aus vier Zellen. In den folgenden Einheiten int II-IX liegen jeweils Zellpaare vor (Entnommen aus Leung et al., 1999). Die Zellen einer Einheit sind zueinander versetzt. (B) Schematische Darstellung der Darmzellenanordnung. Durch die jeweilige Versetzung der Darmzellen entsteht ein strickleiterförmiges CeAJ-Muster (in rot).

gegenüberliegenden Zellen werden dabei in neun Darmeinheiten (ints, “intestinal units”) unterteilt (Abb. 3; Leung et al., 1999). Die terminale anteriore Einheit (int I) des Darmes besteht aus vier Zellen, alle folgenden Einheiten (int II bis IX) werden aus jeweils zwei Zellen gebildet. Die Zellen eines ints sind zueinander versetzt, sodaß eine größtmögliche Kontaktfläche gewährleistet ist.

Der Zusammenschluß mesenchymaler Zellen zu einem geordneten Zellverband, dem Epithel, geht Hand in Hand mit dem hierfür notwendigen polaren Aufbau der Zellen. Die Zellen eines Epithels zeigen eine deutliche Polarität entlang der apiko-basalen Achse. Sie besitzen dabei eine apikale, eine laterale und eine basale

Membrandomäne, und auf molekularer Ebene ist ihre Oberseite (apikal) von ihrer Unterseite (basal) zu unterscheiden (Abb. 4; Übersichtsartikel Nelson, 2003).

1.2 Die apiko-basale Polarität

Die apikale Domäne von Epithelzellen stellt die Kontaktfläche zur Außenwelt oder zum Lumen dar. Die Differenzierung der apikalen Seite geht dabei mit ihrer Funktion einher. So kann beispielsweise in Epithelien, die eine Funktion in der Stoffaufnahme haben, die apikale Oberfläche der Zellen durch sogenannte Mikrovilli stark vergrößert sein. Die apikale Membrandomäne ist es auch, die den Zusammenhalt der Zellen untereinander durch starke Kontaktstrukturen gewährleistet, welche zudem eine Barriere für die selektive Aufnahme von Stoffen darstellt (Übersichtsartikel Knust und Bossinger, 2002).

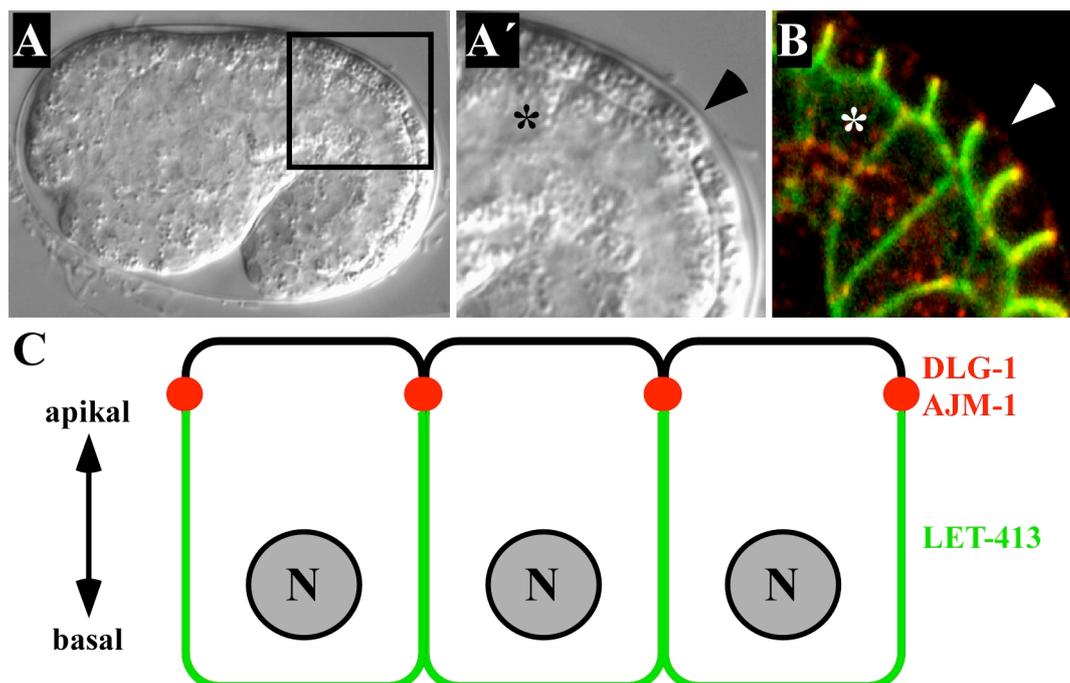


Abb. 4: Epithelzellen besitzen eine apiko-basale Polarität

(A) Im Embryo können drei Epithelien unterschieden werden: das Darmepithel (A', exemplarisches Sternchen), die Hypodermis (A', exemplarischer Pfeil) und der Pharynx (nicht gezeigt). (B) Die Polarisierung der Epithelzellen kann auf Immunfluoreszenzebene durch den basolateralen Marker LET-413 (in grün) und den CeAJ-Marker DLG-1 (in rot) dargestellt werden. (C) Schematischer Aufbau und Anordnung der Epithelzellen. Die apikale Membrandomäne (in schwarz) wird von der basolateralen Membrandomäne (in grün) durch die CeAJ getrennt (in rot).

Die Komposition der elektronendichten Kontaktstruktur in *C. elegans*, auch CeAJ (“*C. elegans* apical junction”; McMahon et al., 2001) genannt, ist in den letzten Jahren intensiv untersucht worden, dennoch ist der dynamische Aufbau dieser Struktur bisher nicht bis ins Detail geklärt. Auf Immunfluoreszenzebene kann die CeAJ molekular in drei Bereiche entlang der apiko-basalen Achse unterschieden werden (Segbert et al., 2004). Auf EM-Ebene wurde bisher AJM-1 (s.u.) als Bestandteil der elektronendichten Struktur nachgewiesen, wobei auch das Intermediärfilament IFB-2, welches als Darmlumenmarker eingesetzt wird, bis in die elektronendichte Struktur hineinreicht (Köppen et al., 2001; Bossinger et al., 2004). IFB-2 lokalisiert dabei innerhalb des sogenannten terminalen Netzes (“terminal web”), welches u.a. aus Spektrin, Aktin-Bindeproteinen und Intermediärfilamenten besteht, und direkt unterhalb der Mikrovilli der Darmzellen lokalisiert (Fath und Burgess, 1995; Ku et al., 1999; Mooskeker, 1985; Thomas, 2001).

Die CeAJ ist aufgeteilt in die sub-apikale Region (SAR, “sub-apical region”), dem Cadherin-Catenin-Komplex (CCC, “Cadherin-Catenin-Complex”) und dem DLG-1/AJM-1 Komplex (DAC, “DLG-1/AJM-1 Complex”; Segbert et al., 2004). In der SAR lokalisiert das Transmembranprotein CRB-1, welches epidermale Wachstumsfaktor Domänen (EGF, “epidermal growth factor”) besitzt (Abb. 5). In *Drosophila* ist das CRB-1 Homologe Crumbs für die Etablierung der apiko-basalen Polarität unabkömmlich (Tepass et al., 1990; Knust, 1994). Im Darmepithel von *C. elegans* besitzt CRB-1 eine redundante Funktion bei der Ausbildung und Positionierung der CeAJ, indem es möglicherweise zusammen mit dem CCC auf die Lokalisation von DLG-1 wirkt (Bossinger et al., 2001; Segbert et al., 2004). Hier konnte gezeigt werden, daß der Funktionsverlust des CCC in einem *let-413(RNAi)* (s.u.) Hintergrund zur Rettung des *let-413* Phänotypen beiträgt, welches jedoch durch einen zusätzlichen Funktionsverlust von CRB-1 wieder rückgängig gemacht wird.

In der apikalen Einheit der CeAJ, schließt sich der CCC, bestehend aus E-Cadherin, α - und β -Catenin (Costa et al. 1998). Dieser Komplex ist in anderen Organismen generell an der Zell-Zellerkennung, Zelladhäsion und der Aufrechterhaltung der apiko-basalen Polarität beteiligt (Übersichtsartikel Angst et al., 2001). Allerdings bewirkt ein alleiniger Funktionsverlust des CCC in *C. elegans* keine Beeinträchtigung

in der Zelladhäsion oder der Zellpolarität, sondern beeinflusst die Zellformveränderung und die Zellwanderung in der Hypodermis (Costa et al., 1998).

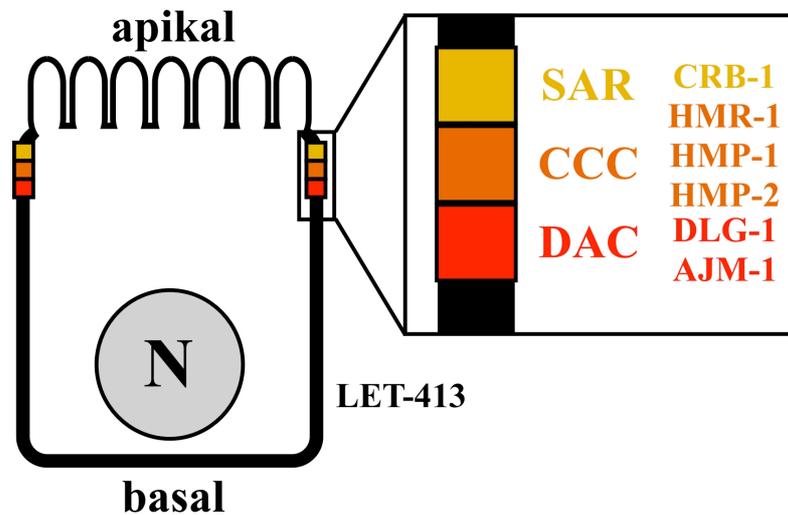


Abb. 5: Die apikale Kontaktstruktur in *C. elegans* kann in drei Regionen unterteilt werden

Schematischer Aufbau einer Epithelzelle. Die apikale Kontaktstruktur in *C. elegans* (CeAJ, “*C. elegans* apical junction”) wird in drei Regionen unterteilt, die jeweils von verschiedenen Proteinkomplexen gebildet werden: Die sub-apikale Region (SAR, “sub-apical region”), der Cadherin-Catenin Komplex (CCC, “Cadherin-Catenin Complex”) und der DLG-1/AJM-1 Komplex (DAC, DLG-1/AJM-1 Complex). In der SAR lokalisiert CRB-1 (in gelb). Der CCC wird aus dem E-Cadherin HMR-1, dem α -Catenin HMP-1 und dem β -Catenin HMP-2 gebildet (in orange). Die basale Einheit der CeAJ besteht aus DLG-1 und AJM-1 (in rot).

In der basalen Einheit der CeAJ lokalisiert der DAC (Bossinger et al., 2001; Firestein und Rongo, 2001; Köppen et al., 2001; Segbert et al., 2004). Die Architektur der CeAJ wird direkt durch den DAC beeinflusst. Bei einem Funktionsverlust von DLG-1 oder AJM-1 ist die Struktur der CeAJ auf Immunfluoreszenzebene an unregelmäßigen Stellen unterbrochen (Köppen et al., 2001; McMahon et al., 2001). Dies hat jedoch keinen Einfluss auf die Zelladhäsion oder die apiko-basale Polarität, obwohl in *dlg-1(RNAi)* Embryonen auf EM-Ebene ein Verlust der elektronendichten Struktur festzustellen ist (McMahon et al., 2001). Bis auf das Protein AJM-1, welches bisher einzig in *C. elegans* identifiziert wurde, existieren Homologe von den oben beschriebenen Proteinen in Vertebraten und in *Drosophila*. Die Domänenkomposition der Proteine, und im Prinzip auch die Verteilung entlang der apiko-basalen Achse ist dabei jeweils hochkonserviert (Knust und Bossinger, 2002).

Einen starken Einfluss auf die Aufrechterhaltung der CeAJ und die Polarität hat das in der Epithelzelle basolateral lokalisierende LET-413, das *C. elegans* Scribble/Erbin Homolog (Legouis et al., 2000). LET-413 stellt dabei keine Komponente der CeAJ dar, obgleich auf Immunfluoreszenzebene eine partielle Kolo-kalisation mit AJM-1, einem Bestandteil der CeAJ, bestehen kann (Legouis et al., 2000). Bei einem Funktionsverlust von LET-413 treten Polaritätsdefekte auf, und die epitheliale Integrität ist beeinträchtigt (Legouis et al., 2000; McMahon et al., 2001). Die basalen Komponenten der CeAJ, AJM-1 und DLG-1, gelangen dabei nur teilweise und mit Verzögerung an ihren Bestimmungsort (Legouis et al., 2000; Bossinger et al., 2001; Köppen et al., 2001). Der späte *let-413* Phänotyp ist dadurch gekennzeichnet, daß die Komponenten der CeAJ, wie AJM-1 oder DLG-1, nach basolateral gelangen.

Neben dem beschriebenen apiko-basalen Aufbau innerhalb der Zellen existiert in vielen Geweben eine Polarität innerhalb der Ebene des Epithels. Diese Form der Polarität wird planare Zellpolarität (PCP, "planar cell polarity") genannt. Sie beeinflusst die subzelluläre Architektur der einzelnen Zellen maßgeblich, und wird im folgenden Abschnitt beschrieben.

1.3 Die planare Zellpolarität

Sichtbar wird die PCP in Epithelien, deren Zellen leicht erkennbare und entlang der proximo-distalen Achse ausgerichtete Strukturen wie z.B. Härchen ausbilden, wie sie im Flügel von *Drosophila* auftreten (Abb. 6; McNeill, 2002; Axelrod und McNeill, 2002; Eaton, 2003). PCP läßt sich ebenfalls in Epithelien beobachten, die durch einen geordneten Aufbau hervorstechen, z.B. dem Auge von *Drosophila*. Hier schließen sich mehrere komplex aufgebaute Zellen, die Photorezeptoren, jeweils zu einer Einheit, dem Ommatidium, zusammen (Wolff und Ready, 1993). Die PCP kann ebenfalls für die Elongation eines Epithels benötigt werden, wie z.B. der konvergenten Extension (CE, "convergent extension") in *Xenopus* (Keller, 2002). Hierbei wandern gegenüberliegende Zellreihen geordnet ineinander (=Konvergenz) und führen dadurch zu einer Verlängerung des Epithels (=Extension).

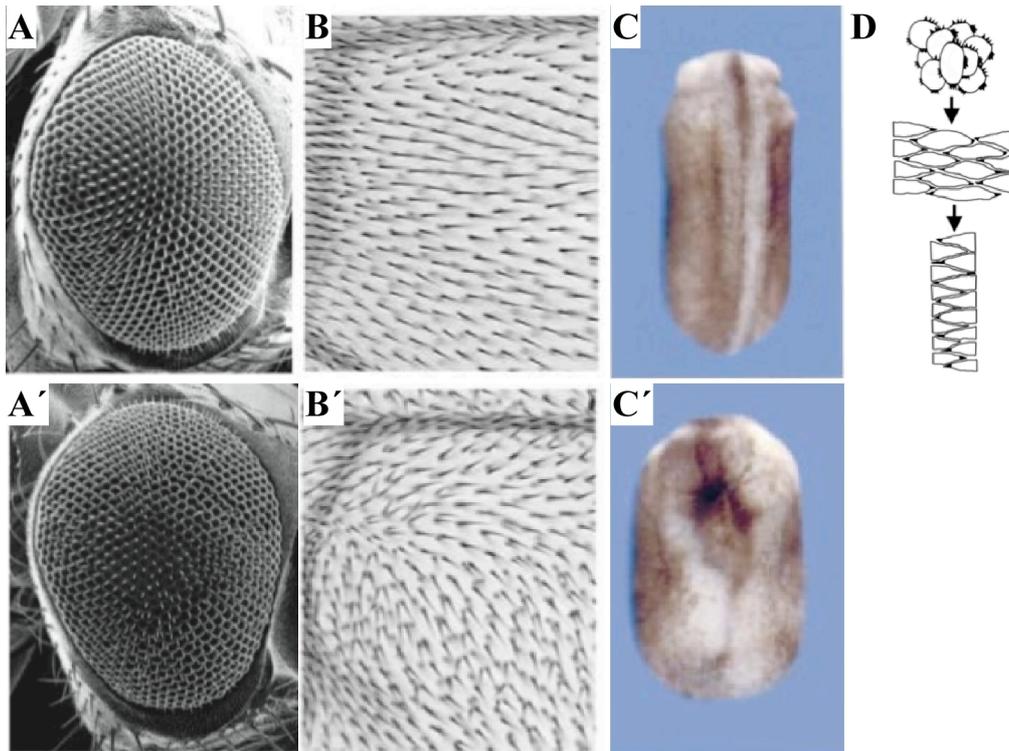


Abb. 6: Planare Zellpolarität in *Drosophila* und in Vertebraten

(A) Aufnahme eines Komplexauges von *Drosophila*. Die geordnete und regelmäßige Anordnung der Ommatidien wird durch den PCP-Signalweg gewährleistet (modifiziert nach Wolff und Rubin, 1998). (B) Mikroskopische Aufnahme eines Flügels von *Drosophila*. Die Ausrichtung der Härchen ist geordnet und zeigt eine deutliche planare Polarität (modifiziert nach Axelrod und McNeill, 2002). (C) Gerichtete Ausbildung von Zellfortsätzen und Zellwanderung, wie sie bei dem Schluß des Neuralrohrs benötigt wird, steht unter der Kontrolle des PCP-Signalweges (modifiziert nach Darken et al., 2002). (D) Der Vorgang aus (C) ist hier schematisch dargestellt (übernommen aus Glickman et al., 2003). (A', B', C') Wird der PCP-Signalweg unterbrochen, treten Musterdefekte auf, wobei sich die Zellen beziehungsweise ihre zellulären Strukturen ungerichtet orientieren.

Auch die Bildung des Neuralrohres ist ein Prozeß, bei dem der PCP-Signalweg über die Regulation der CE eine entscheidende Rolle spielt. Die im Menschen mit der Häufigkeit von 1:1000 Geburten auftretende und lethale Anenzephalie ist ein Defekt in der Schließung des Neuralrohres (NTD, "neural tube defects"). Als Modell zur Untersuchung von NTD hat sich eine *Strabismus/Van Gogh* (s.u.) mutante Maus etabliert (Greene et al., 1998; Doudney und Stanier, 2005).

Die PCP beeinflusst also nicht nur die Architektur in einer Zelle um z.B. im Flügel von *Drosophila* Härchen am jeweiligen distalen Zellkortex auszubilden, sondern auch die Anordnung der Zellen innerhalb eines Epithels, wie sie bei der CE in *Xenopus* beobachtet werden kann. Wie kommt es nun zur Ausprägung dieser präzisen

Ordnung? Die Antwort ist einfach, aber auch komplex zugleich: Die Zellen kommunizieren miteinander. Somit stellt die Zell-Zell-Kommunikation die Basis umfangreicher morphogenetischer Vorgänge dar, und es kann eine Ordnung initiiert und aufrechterhalten werden. Um nun eine planare Polarität zu etablieren, kommunizieren die Zellen dabei über den sogenannten PCP-Signalweg. Obgleich bereits zahlreiche Komponenten dieses Signalweges identifiziert worden sind, viele davon in *Drosophila*, ist die komplizierte zeitliche und auch räumliche Interaktion der Komponenten nicht vollständig verstanden. In einem einfachen Modell zur Etablierung der PCP wird ein Mechanismus postuliert, der in drei Etappen abläuft (Tree et al., 2002).

Im ersten Schritt benötigt ein Epithel ein globales Polaritätssignal, welches die planare Achse festlegt. Auf molekularer Ebene ist das globale Signal bisher unbekannt, jedoch scheinen die atypischen Cadherine Fat (Yang et al., 2002) und Dachous (Adler et al., 1998) sowie das Transmembranprotein Four-jointed (Zeidler et al., 1999) an der Erzeugung oder der Modifizierung dieses Signals beteiligt zu sein (Ma et al., 2003; Matakatsu und Blair, 2004). Das Polaritätssignal bewirkt, daß im zweiten Schritt auf zellulärer Ebene nahezu alle PCP-Kernkomponenten asymmetrisch verteilt werden, und sich dadurch Signalzentren ausbilden. Zu den PCP-Kernkomponenten werden die Transmembranproteine Frizzled (Vinson et al., 1989), Strabismus/Van Gogh (Taylor et al., 1998; Wolf und Rubin, 1998) und das atypische Cadherin Flamingo/Starry Night (Chae et al., 1999; Usui et al., 1999) gezählt. Als zytoplasmatische PCP-Kernkomponenten gelten Dishevelled (Klingensmith et al., 1994), das LIM (LIN-11, ISL-1, MEC-3)-Domänen Protein Prickle (Gubb et al., 1999) und das Ankyrin-Domänen Protein Diego (Feiguin et al., 2001). Flamingo und Diego sind von der asymmetrischen Verteilung ausgenommen. Im dritten Schritt sind diese Signalzentren dann in der Lage, die polare subzelluläre Architektur der Zelle zu kontrollieren.

Die asymmetrische Verteilung der PCP-Komponenten im zweiten Schritt der PCP-Ausbildung ist ein komplexer Vorgang, der sich aus einer unpolaren Verteilung der einzelnen Komponenten entwickelt. Dabei ist prinzipiell jede PCP-Kernkomponente in ihrer Lokalisation von jeder anderen abhängig (Übersichtsartikel Mihaly et al.,

2005). Möglicherweise beruht diese Abhängigkeit in einigen Fällen auf einer direkten physikalischen Wechselwirkung. So konnte bisher gezeigt werden, daß z.B. Dishevelled mit Frizzled (Wong et al., 2003) und mit Strabismus/Van Gogh (Bastock et al., 2003) interagiert. Weiterhin wurde eine Bindung von Strabismus/Van Gogh an Diego (Das et al., 2004) und an Prickle (Jenny et al., 2003) nachgewiesen. Diego und Prickle wiederum können kompetitiv an Dishevelled binden (Jenny et al., 2005). Tatsächlich können in verschiedenen PCP-Mutanten die jeweiligen Veränderungen in der Lokalisation der anderen Komponenten unterschiedlich ausfallen. In *flamingo* Mutanten z.B. ist die Verteilung von Strabismus/Van Gogh nicht beeinflusst, obwohl die planare Polarität beeinträchtigt ist (Rawls und Wolff, 2003). In *Strabismus/Van Gogh* Mutanten hingegen ist die asymmetrische Verteilung der PCP-Proteine, z.B. Dishevelled, Prickle (Bastock et al., 2003) oder Frizzled (Strutt, 2001) beeinträchtigt, was die Komplexität der Wechselwirkung unterstreicht.

Durch die kombinierte Auswertung der bisherigen genetischen Analysen wird eine hierarchische Ordnung postuliert, die in zwei Modellen dargestellt ist (Abb. 7; Bastock et al., 2003; Das et al., 2004; Übersichtsartikel Mihaly et al., 2005). Die beide Transmembranproteine Strabismus/Van Gogh und Frizzled nehmen in beiden Varianten des Modells eine zentrale Position ein. Basierend auf den Daten aus dem Flügel von *Drosophila* werden in Model A die beiden Proteine Strabismus/Van Gogh und Frizzled durch Flamingo rekrutiert. Im Anschluß können Strabismus/Van Gogh und Frizzled die zytoplasmatischen Komponenten Diego, Dishevelled und Prickle rekrutieren. Für das Auge von *Drosophila* wird das Model B angenommen. Hier stehen Strabismus/Van Gogh und Frizzled an der Spitze der Hierarchie und rekrutieren zunächst die zytoplasmatischen Komponenten Diego, Dishevelled und Prickle. Diese Proteine werden dann benötigt, um Flamingo zu lokalisieren, und Flamingo wiederum hält die Positionierung des gesamten Komplexes aufrecht. Die Initiierung der asymmetrischen Verteilung verbleibt allerdings unklar. In *C. elegans* ist ein System, welches planare Polarität vermitteln könnte, noch nicht beschrieben worden. Allerdings sind einzelne Komponenten des PCP-Signalweges, wie Frizzled oder Strabismus/Van Gogh, auch hier konserviert und im Rahmen dieser Arbeit in Bezug auf eine mögliche Funktion als PCP-Komponenten charakterisiert worden (s. Aufgabenstellung).

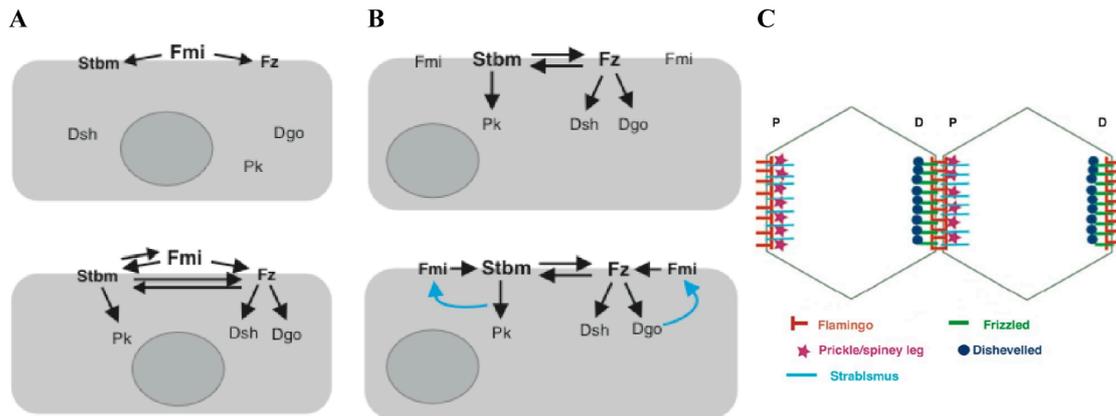


Abb. 7: Hierarchisches Modell für die Etablierung der planaren Zellpolarität

(A) Für den Flügel von *Drosophila* wird angenommen, daß Strabismus/Van Gogh und Frizzled durch Flamingo rekrutiert werden, und daraufhin gegenseitig ihre Lokalisation stabilisieren. Dadurch gelangen die weiteren Komponenten Prickle, Diego und Dishevelled an ihren Bestimmungsort. (B) Im Auge von *Drosophila* wird Flamingo vermutlich durch Strabismus/Van Gogh und Frizzled rekrutiert, und durch die Rekrutierung der weiteren Komponenten stabilisiert (Modifiziert nach Mihaly et al., 2005). (C) Durch weitere Wechselwirkungen werden einige der PCP-Komponenten entlang der proximo-distalen Achse asymmetrisch verteilt. Strabismus/Van Gogh und Prickle lokalisieren dabei am jeweiligen proximalen Zellkortex, wohingegen Frizzled und Dishevelled am distalen Zellkortex lokalisieren (Modifiziert nach Eaton, 2003). Abkürzungen: Strabismus/Van Gogh (Stbm), Frizzled (Fz), Flamingo (Fmi), Prickle (Pk), Diego (Dgo), Dishevelled (Dsh).

Die durch den PCP-Signalweg vermittelte Anordnung von Bestandteilen innerhalb einer Zelle, wie bei der Härchenbildung im Flügel von *Drosophila*, und von Zellen innerhalb eines Epithels, wie bei der Bildung des Neuralrohrs in *Xenopus*, wird zu einem bestimmten Zeitpunkt in der Entwicklung benötigt, um die Morphogenese des jeweiligen Epithels zu koordinieren. Allerdings sind insgesamt eine Vielzahl verschiedener Signalwege an dem korrekten Ablauf morphogenetischer Prozesse beteiligt. Im folgenden Abschnitt wird daher ein weiterer Signalweg dargestellt, der in *C. elegans* möglicherweise im Zusammenhang mit dem PCP-Signalweg stehen könnte.

1.4 Der Fibroblasten Wachstumsfaktor Signalweg in *C. elegans*

Fibroblasten Wachstumsfaktoren (FGFs, "fibroblast growth factors") vermitteln wichtige Funktionen in der Entwicklung, darunter Musterbildung, Zell-Zell Kommunikation und Zellmigration (Szebenyi und Fallon, 1999). Die Wachstumsfaktoren werden in das extrazelluläre Kompartiment sekretiert und ihr

Signal wird dann autokrin oder parakrin von speziellen Transmembranrezeptoren, den FGF-Rezeptortyrosinkinasen (FGFR), weitergeleitet. In Säugetieren konnte bisher eine große Anzahl von FGFs und FGFR identifiziert, und in Familien klassifiziert werden (Ornitz und Itoh, 2001). Eine genaue Bestimmung der Funktion einzelner FGFs wird dadurch erschwert, daß unterschiedliche FGFs an verschiedene FGFR binden können, und somit Bestandteile eines komplexen Netzwerk darstellen (Ornitz et al., 1996).

Für Studien prinzipieller Abläufe und Funktionsweisen der FGF-Signalwege zeigen sich Invertebraten vorteilhaft, da dort bisher eine geringe Anzahl an FGFR identifiziert worden sind. In *Drosophila* sind dies die zwei FGFR Breathless und Heartless (Glazer und Shilo, 1991; Beiman et al., 1996). Der einzige FGFR in *C. elegans* ist EGL-15, welcher u.a. die postembryonale Zellmigration der sogenannten Sexmyoblasten (SM, "sex myoblasts") reguliert. Im Hermaphroditen wandern die SM, welche EGL-15 exprimieren, im frühen Larvenstadium von ihrer ursprünglichen posterioren Position nach anterior, wo sie dann im Adulten zu Geschlechtsmuskeln der Vulva und der Gonade differenzieren (Sulston und Horvitz, 1977; De Vore et al., 1995; Popovici et al., 1999; Birnbaum et al., 2005). Das Gen *egl-15* kodiert für die beiden Isoformen EGL-15(A) und EGL-15(B), die durch alternatives Spleißen entstehen. Die Aktivität der FGF-Rezeptortyrosinkinasen kann durch seine Liganden, den FGF, gesteuert werden. In *C. elegans* sind zwei FGFs, EGL-17 und LET-756, identifiziert worden (Burdine et al., 1997; Roubin et al., 1999). Beide FGFs interagieren mit EGL-15 (De Vore et al. 1995). EGL-15(A) ist der putative Rezeptor für EGL-17 und EGL-15(B) ist der putative Rezeptor für LET-756 (Goodman et al., 2003). Für die Interaktion zwischen FGF und FGFR werden wahrscheinlich Glykosaminglycane benötigt (Plotnikov et al., 1999; Ornitz und Leder, 1992).

Die beiden FGF Liganden EGL-17 und LET-756 sind vermutlich an der Vermittlung verschiedener Prozesse beteiligt. EGL-17 zeigt bei einem Funktionsverlust einen ähnlichen Phänotyp, wie er auch in bestimmten *egl-15* Mutanten beobachtet werden kann (De Vore et al., 1995; Burdine et al., 1997; Borland et al., 2001). Dieser Phänotyp ist durch Defekte in der Migration der SM (s.o.) charakterisiert, welche zu einer Beeinträchtigung der Eiablage führen (*egl*, "egg-laying defective"). In der

Modelvorstellung wird der Ligand EGL-17 von der sich entwickelnden Vulva und Gonade exprimiert und dient somit als attraktives Signal für die korrekte Positionierung der SMs, welche selbst EGL-15(A) exprimieren (Burdine et al., 1998; Branda und Stern, 2000). Das LET-756 hingegen ist an der Regulation des Axonwachstums beteiligt (Bülow et al., 2004). Axone benötigen für ihr Wachstum ein Substrat, welches durch den FGF-Signalweg reguliert wird und möglicherweise aus Zelladhäsionsmolekülen (CAM, "cell adhesion molecule") besteht (Doherty und Walsh, 1996). In *C. elegans* wird das Substrat von den Hypodermis- und Muskelzellen bereitgestellt. Dabei wird der Ligand LET-756 von den angrenzenden Muskelzellen gebildet und sekretiert, und aktiviert EGL-15(B) in den Hypodermiszellen (Huang und Stern, 2004). Eine Besonderheit ist hierbei, daß zwei unterschiedliche Zelltypen über den FGF-Signalweg das Axonwachstum nicht-autonom und indirekt regulieren, wohingegen in Vertebraten der FGFR autonom in den Wachstumskegel der Axone selbst wirkt.

Die Analyse des FGF-Signalweges in *C. elegans* ist unter Anwendung von genetischen Screens gut untersucht worden (Borland et al., 2001). Diese klassischen genetischen Screens basieren auf der Analyse von Mutanten, die durch den Einsatz verschiedener Mutagene hergestellt werden können. Die Auswertung dieser Screens ist durch die Komplexität der auf der Anatomie basierenden Analyse der Phänotypen, oder der noch folgenden Identifizierung des Gens, limitiert. Die Anwendung der reversen Genetik und der Technik der RNA vermittelten Interferenz (RNAi, "RNA mediated interference") erlaubt es, systematisch und spezifisch die Genfunktion zu vermindern.

1.5 RNA vermittelte Interferenz der Genfunktion in *C. elegans*

In der Entwicklungsbiologie ist neben der Fragestellung wo ein Protein lokalisiert, von Interesse zu sehen, was die Aufgabe eines Proteins beziehungsweise eines Gens ist. Die Funktion eines Proteins kann über die Analyse des jeweiligen Funktionsverlustphänotyp offenbart werden. Neben der klassischen Erzeugung und Analyse von Mutanten stellt hierbei die RNAi eine geeignete Methode dar, um Funktionsverlustphänotypen darzustellen. In Mutanten ist die genomische DNA

Sequenz eines Gens verändert, sodaß letztendlich ein trunkiertes, inaktives oder kein Protein gebildet werden kann. Im letzten Fall spricht man von einer Nullmutante. Der Einsatz der RNAi jedoch verändert die genomische DNA-Sequenz nicht. Über RNAi werden *in vivo* gezielt mRNAs abgebaut, was zu einer Phänokopie einer Nullmutante führen kann (Fire et al., 1998; Montgomery et al., 1998; Timmons und Fire, 1998).

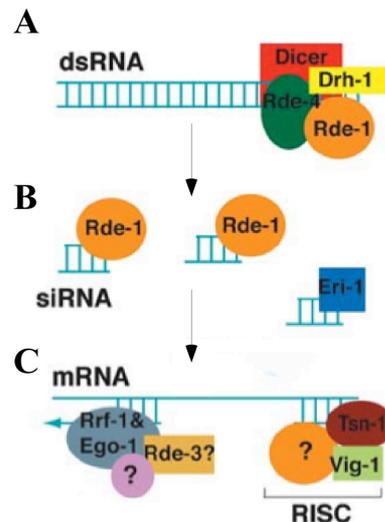


Abb. 8: Schematische Übersicht des molekularen Mechanismus der RNA vermittelten Interferenz in *C. elegans*

(A) Doppelsträngige RNA (dsRNA, “double stranded RNA”) wird im Organismus durch den Dicer Komplex gebunden und (B) in siRNAs (“small interfering RNAs”) prozessiert. Die siRNAs verbleiben gebunden an RDE-1 und werden in den nächsten Schritt eingebracht (C), wo sie zusammen mit der Nuklease TSN-1 und dem RNA-Bindeprotein VIG-1 den RISC (“RNA induced silencing complex”) ausbilden. Dieser Komplex ist in der Lage, die zur dsRNA korrespondierenden mRNA zu erkennen, zu binden, und schließlich zu degradieren. Möglicherweise zeitgleich bindet ein anderer Komplex, bestehend aus RRF-1, EGO-1 und RDE-3, an die mRNA, um weitere dsRNA zu bilden, welche erneut im ersten Schritt prozessiert werden kann und den Ablauf des RNAi-Mechanismus aufrechterhält (modifiziert nach Grishok, 2005).

Als Agenz wird eine doppelsträngige RNA (dsRNA, “double stranded RNA”) über die Injektion oder das Füttern spezieller Bakterien in den Organismus gebracht, wie sie zu kleineren, etwa 21 Nukleotide langen reaktiven RNA Fragmenten verarbeitet wird, den sogenannten siRNAs (“short interfering RNAs”; Abb. 8). Diese Fragmentierung geschieht durch das Zusammenwirken der Proteine des Dicer-Komplexes. Der Dicer-Komplex besteht aus dem dsRNA Bindeprotein RDE-4, dem PAZ-PIWI Protein RDE-1 und der Helikase DCR-1 (Grishok 2005). Durch die Assoziation der durch den DICER-Komplex gebildeten siRNAs mit weiteren

Proteinen wird der RISC (“RNA induced silencing complex”) gebildet. Der RISC wird aus der Nuklease TSN-1 und dem RNA-Bindeprotein VIG-1 gebildet. Es wird vermutet, daß noch weitere Komponenten für die Funktion des RISC notwendig sind (Grishok, 2005). Der RISC ist nun in der Lage, die endogene mRNA zu erkennen, und abzubauen, was letztendlich zu einem Funktionsverlustphänotyp führt. Ein weiterer Komplex bestehend aus den RNA Polymerasen RRF-1 und EGO-1 erkennt zusammen mit den durch den Dicer-Komplex gebildeten siRNAs ebenfalls die Ziel-mRNA, um weitere dsRNA bilden zu können und den RNAi-Mechanismus aufrechtzuerhalten.

2 Aufgabenstellung

Die planare Zellpolarität (PCP, “planar cell polarity”) steuert Musterbildungsprozesse in vielen Organismen, von *Drosophila* über *Xenopus* bis hin zum Menschen. Sie beeinflusst die Ausprägung von Strukturen in bereits etablierten Epithelien, und trägt zudem selbst auch zur Epithelbildung bei. Strabismus/Van Gogh nimmt bei der Vermittlung der PCP in den genannten Organismen eine zentrale Position ein. Mit der Identifizierung des Strabismus/Van Gogh Homologen VANG-1 liegt nun eine Kernkomponente des PCP-Signalweges vor, die auf das Vorhandensein der planaren Polarität auch in *C. elegans* hinweist.

Das Darmepithel in *C. elegans* benötigt für die korrekte Anordnung der Darmzellen die Interkalation von vier ventral gelegenen Zellen in die dorsale Zellreihe. Die Regulation dieses Musterbildungsprozesses ist bisher unerforscht. Interessanterweise wird in *Xenopus* die Interkalation bestimmter Zellen durch den PCP-Signalweg vermittelt. Die Beteiligung des Interkalationsprozesses an der Musterbildung im Darmepithel in *C. elegans* läßt daher vermuten, daß VANG-1 und ein putativer PCP-Signalweg an der Regulation dieses Prozesses beteiligt sein könnte.

Im Kontext dieser Arbeit sollte geprüft werden, ob die planare Polarität über VANG-1 in *C. elegans* existiert und vermittelt wird, sowie einen Einfluss auf die korrekte Anordnung der Zellen während der Morphogenese des Darmes zeigt. Weiterhin sollte analysiert werden, welche Gene und Signalwege zusätzlich, und in welchem Ausmaße, für die korrekte Musterbildung des Darmepithels verantwortlich sind.

3 Ergebnisse

3.1 VANG-1 ist ein Strabismus/Van Gogh Homolog in *C. elegans*

Das *C. elegans* Strabismus/Van Gogh Homolog VANG-1 wurde ursprünglich in einem Hefe 2-Hybrid Screen als Interaktionspartner von DLG-1 isoliert (C. Segbert/O. Bossinger, Düsseldorf; pers. Mitteilung). Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Lokalisation von VANG-1 während der Embryonalentwicklung und die mögliche Funktion innerhalb eines putativen planaren Zellpolaritäts (PCP, “planar cell polarity”) -Signalweges erstmals charakterisiert, wobei in *C. elegans* das System der PCP bisher noch nicht bekannt oder untersucht worden ist.

Strabismus/Van Gogh ist ein Transmembranprotein, welches ursprünglich in *Drosophila* identifiziert worden ist (Wolff und Rubin, 1998; Taylor et al., 1998). Der Name dieses Proteins beschreibt den Funktionsverlustphänotypen im Auge (Strabismus) und im Flügel (Van Gogh) von *Drosophila*, welcher als Ursache den Verlust der planaren Polarität hat. Die planare Polarität kann in Epithelien beobachtet werden, die eine geordnete Ausrichtung der einzelnen Zellen des Epithels entlang einer Achse verlangen, die senkrecht zur apiko-basalen Achse der Zellen verläuft. Ein Verlust der planaren Polarität sorgt generell für eine Beeinträchtigung in der Funktion des Epithels. Dabei nimmt Strabismus/Van Gogh bei der Ausbildung der planaren Polarität durch den sogenannten PCP-Signalweg eine Schlüsselposition ein.

Mit Hilfe des BLAST-(Basic Local Alignment Search Tool) Server können generell homologe Proteine aus verschiedenen Organismen identifiziert werden (Altschul et al., 1990; Madden et al., 1996). Über eine BLAST-Suche mit der *Drosophila* Strabismus/Van Gogh Sequenz (DStbm) wurde eine Auswahl der hierbei identifizierten und bereits charakterisierten Strabismus/Van Gogh Homologen Proteine aus Maus (Ltap; Kibar et al., 2001) und *Xenopus* (XStbm; Darken et al., 2002; Goto und Keller, 2002) über das Programm MegAlign mit VANG-1 verglichen (Abb. 9D). Über diesen Vergleich können konservierte Bereiche in den Proteinsequenzen der Homologen untereinander erkennbar gemacht werden.

Hierbei liegt die Gesamtsequenzidentität von VANG-1 zu den homologen Proteinen im Mittel bei 29%. Hochkonserviert sind die Positionen der vier Transmembrandomänen sowie das PDZ- (PSD-95, Discs large, ZO-1) Bindemotiv am C-Terminus (Abb.9D, schwarze Boxen). Die BLAST Analyse ergab zudem, daß in *C. elegans* kein weiteres Protein existiert, welches sowohl eine ähnlich hohe Sequenzidentität zu den genannten Homologen aufweist, als auch eine vergleichbare Domänenkomposition besitzt. Aufgrund dieser Daten kann angenommen werden, daß VANG-1 das einzige Strabismus/Van Gogh Homologe in *C. elegans* ist.

Das für *vang-1* vorhergesagte offene Leseraster (pORF, “predicted open reading frame”) B0410.2 konnte über die Sequenzierung der *vang-1* RT-PCR bestätigt werden (s. M&M; Sequenzdaten s. Anhang). Die hierbei erhaltene Sequenz ist mit der vom Genefinder vorhergesagten gespleißten Sequenz identisch (Favello et al., 1995). Zudem wird der *vang-1* pORF durch teilweise sequenzierte cDNA´s aus dem Kohara Labor (Mishima, Japan) ebenfalls bestätigt (WormBase web site, <http://www.wormbase.org>, release WS152, 2006). Die Translation der über die RT-PCR gewonnenen *vang-1* cDNA liefert ein 533 Aminosäuren großes Protein (Abb. 9B). Charakteristisch für VANG-1 sind die vier Transmembrandomänen im N-terminalen Bereich und die vier C-terminalen Aminosäuren –ESAV. Diese Aminosäuren stellen ein PDZ (PSD-95, Discs Large, ZO-1) Bindemotiv dar, welches eine physikalische Interaktion mit Proteinen ermöglicht, die eine korrespondierende PDZ Domäne besitzen (Doyle et al., 1996; Kang et al., 2003).

Bei der im Rahmen dieser Arbeit für die Funktionsanalyse verwendeten *vang-1* Mutante *tm1422* handelt es sich um eine “in-frame” Deletion von 565 Basenpaaren, die Exon IV und das darauffolgende Intron betrifft (Abb. 9A, grauer Balken). Die Mutante wurde im Rahmen des National Bioresource Project (NBP, Japan) isoliert und zur Verfügung gestellt (Gengyo-Ando und Mitani, 2000). Die Nukleotidsequenz der verkürzten Form wurde über die Sequenzierung der RT-PCR bestätigt (s. M&M; Sequenzdaten s. Anhang). Die Translatierte cDNA des Allels *vang-1* (*tm1422*) liefert eine im N-terminus verkürzte Form von VANG-1, in der die ersten drei Transmembrandomänen fehlen, wobei der C-terminus des Proteins allerdings nicht verändert ist (Abb. 9C).

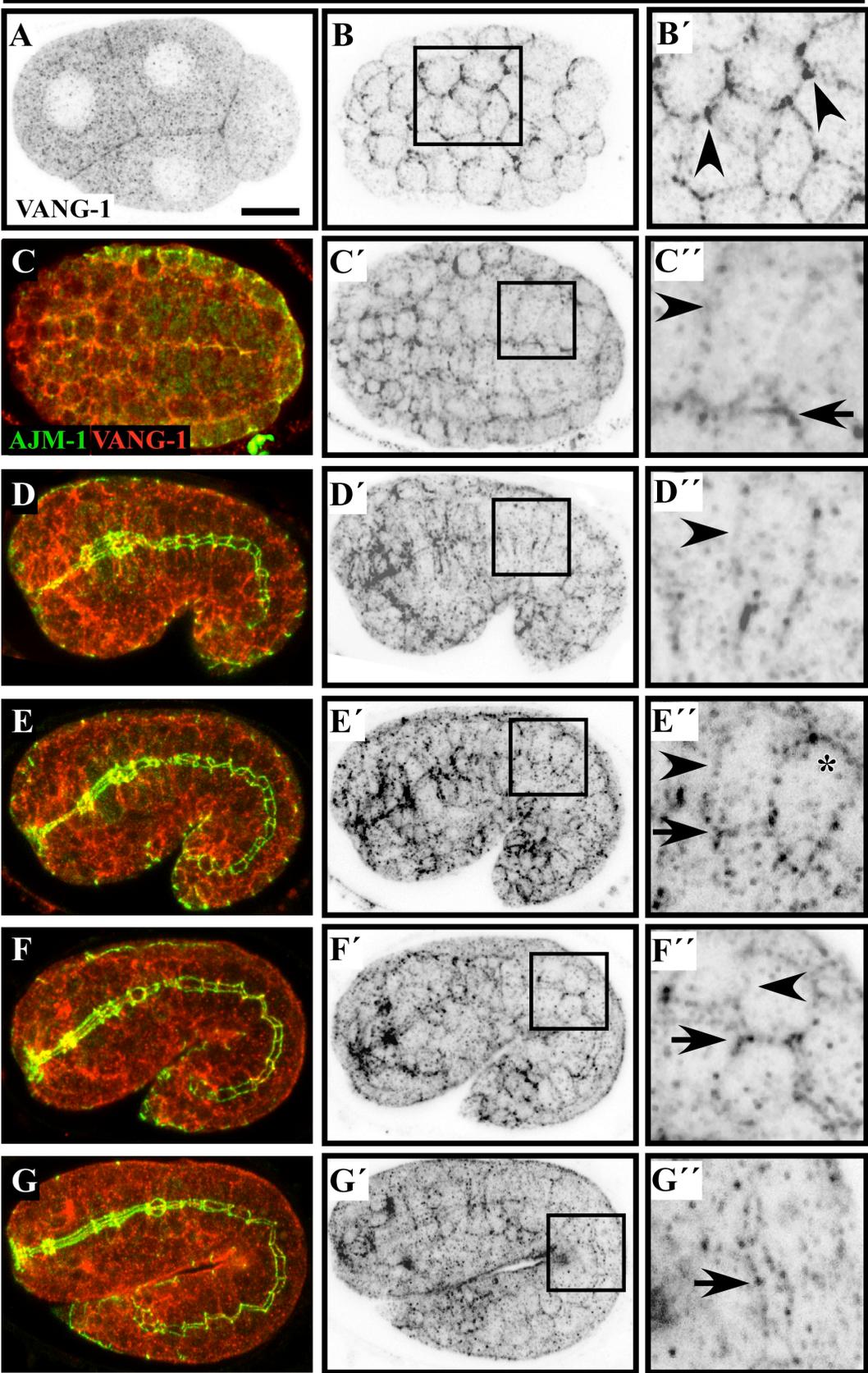
Über die Überprüfung der Lokalisation eines Proteins können erste Hinweise auf eine mögliche Funktion geliefert werden. Hierbei wird analysiert, zu welchem Zeitpunkt in der Entwicklung das Protein nachgewiesen werden kann. Zudem besteht die Möglichkeit, durch geeignete Doppelfärbungen eine Klassifizierung der subzellulären Verteilung zu gewährleisten. Im folgenden Abschnitt wird die Lokalisationsanalyse über Antikörperfärbungen gegen VANG-1 während der Embryonalentwicklung auf Immunfluoreszenzebene durchgeführt.

3.2 Lokalisationsanalyse von VANG-1 im Wildtyp Embryo

Für die Lokalisationsanalyse von VANG-1 wurde ein gegen den intrazellulären C-Terminus gerichteter polyklonaler Antikörper verwendet (s. M&M). VANG-1 lokalisiert in der frühen Embryonalentwicklung im Kortex benachbarter Zellen (Abb. 10A,B). Die kortikale Lokalisation bleibt in der weiteren Entwicklungsphase (Proliferationsphase) bestehen, jedoch ist VANG-1 hier nicht ubiquitär verteilt. Es sind kortikale Bereiche zu erkennen, in denen VANG-1 verstärkt akkumuliert (Abb. 10B', Pfeilkopf). VANG-1 wird in der Morphogenese im Pharynx, der Hypodermis und im Darm exprimiert (Abb. 10D-G).

Die Funktion von VANG-1 im Darm von *C. elegans* wurde in dieser Arbeit untersucht, daher wird für dieses Gewebe die Lokalisation genauer beschrieben. Für VANG-1 konnte während der Morphogenese im Darm eine dynamische Lokalisation festgestellt werden. Zu Beginn der Morphogenese zeigt VANG-1 eine laterale Verteilung (Abb. 10C'', Pfeilkopf) und eine Lokalisation im apikalen Bereich, wo VANG-1 mit dem CeAJ-Marker AJM-1 kolokalisiert (Abb. 10C'', Pfeil). Mit dem Fortschreiten der Embryonalentwicklung (Kommastadium) lokalisiert VANG-1 dann zunächst wieder lateral (Abb. 10D'', Pfeilkopf), woraufhin im weiteren Verlauf der Entwicklung (Kaulquappenstadium) VANG-1 neben der lateralen Verteilung (Abb. 10E'', Pfeilkopf) zusätzlich auch wieder apikal in der CeAJ lokalisiert (Abb. 10E'', Pfeil). Hier ist zudem eine basale Verteilung von VANG-1 zu erkennen (Abb. 10E'', Sternchen). Dieses Muster bleibt zunächst bestehen (Abb. 10F''), bis schließlich in der späteren Morphogenese (Pflaumenstadium) VANG-1 fast vollständig in der CeAJ

WT



(Legende Abb. 10 auf der nächsten Seite)

Abb. 10: VANG-1 zeigt eine dynamische Lokalisation in den Darmzellen

(A,B) Antikörperfärbung gegen VANG-1 (s. M&M), (C-G) Antikörperfärbungen gegen den CeAJ-Marker AJM-1 (in grün) und VANG-1 (in rot) am Wildtyp. (C-G) (Pfeil) verweist jeweils auf eine Lokalisation von VANG-1 in der CeAJ, (Pfeilkopf) verweist jeweils auf eine Lokalisation von VANG-1 am lateralen Zellkortex. (A) VANG-1 lokalisiert im Kortex benachbarter Zellen. (B) In Proliferationsstadien zeigt VANG-1 eine kortikale Lokalisation mit einer Akkumulation dort, wo mehrere Zellen aneinander grenzen (Pfeilköpfe). (C) Während der zytoplasmatischen Polarisierung kolokalisiert VANG-1 mit dem CeAJ-Marker AJM-1 und lokalisiert zusätzlich im lateralen Kortex. (D) Im Kommastadium lokalisiert VANG-1 hauptsächlich lateral. (E) Im Kaulquappstadium ist erneut eine laterale und eine Lokalisation in der CeAJ zu erkennen. (F) Die basolaterale Verteilung ist im Pflaumestadium schwächer, die Lokalisation in der CeAJ ist vorhanden. (G) Im späten Pflaumestadium lokalisiert VANG-1 hauptsächlich in der CeAJ. Für jedes Stadium ist n=20. Anterior ist links, dorsal ist oben. Eichstrich in (A) ist 10 μ m.

lokalisiert (Abb. 10G'', Pfeil). Das in der CeAJ verteilte VANG-1 kolokalisiert dabei mit dem DLG-1/AJM-1 Komplex (DLG-1/AJM-1 Complex, DAC) in der CeAJ ("C. elegans apical junction", CeAJ; Bossinger et al., 2001; Köppen et al., 2001; McMahon et al., 2001). Zum Zeitpunkt der lateralen Lokalisation von VANG-1 im Kommastadium (s. Abb. 10D'') finden Interkalationsereignisse statt. Die Interkalation im Darm wird benötigt, um zwei ventral gelegene Zellpaare in die dorsale Zellreihe zu integrieren (s. Einleitung; Leung et al., 1999). Mit der zeitlichen Komplettierung der Interkalation lokalisiert VANG-1 lateral und auch apikal. Diese Beobachtung wird als Hinweis auf die mögliche Funktion von VANG-1 in lateraler Position gesehen (s. Diskussion).

In *Drosophila* ist die asymmetrische Verteilung von Strabismus/Van Gogh innerhalb einer Zelle essentiell, um die planare Polarität zu vermitteln (Bastock et al., 2003). Daher ist es von Interesse zu testen, ob VANG-1 in *C. elegans* ebenfalls asymmetrisch lokalisiert. Deshalb wurde die VANG-1 Verteilung in einem transgenen Stamm untersucht, der LET-413-CFP unter der Kontrolle des *let-413* Promotors exprimiert (freundlicherweise von J. Pilipiuk/O. Bossinger, Düsseldorf, zur Verfügung gestellt). Das Expressionsmuster von LET-413-CFP in diesem Stamm entspricht dabei dem des endogenen LET-413, und dieser Stamm zeigt zudem keine erkennbaren Abweichungen von der wildtypischen Entwicklung (J. Pilipiuk/O. Bossinger, Düsseldorf; pers. Mitteilung). LET-413 ist das *C. elegans* Scribble Homolog und lokalisiert in der Morphogenese im basolateralen Kortex

epithelialer Zellen (Legouis et al., 2000). LET-413 ist dabei selbst nicht asymmetrisch verteilt und stellt somit einen idealen Marker für diese Analyse dar (Abb. 11).

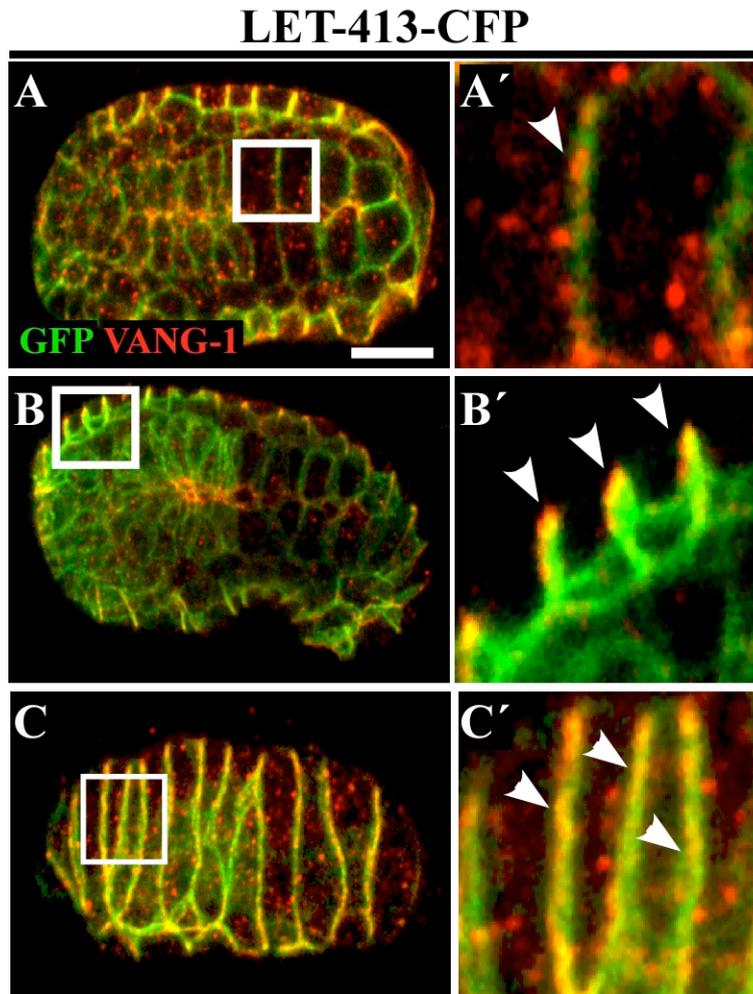


Abb. 11: VANG-1 lokalisiert asymmetrisch in Darm- und Hypodermiszellen
 (A, B, C) Doppelfärbung mit einem anti-GFP-Antikörper gegen LET-413-CFP (in grün) als Kortexmarker und VANG-1 (in rot) am transgenen Stamm LET-413-CFP. (A) In den Darmzellen ist eine Verteilung am posterioren Zellkortex zu erkennen (A', Pfeilkopf). (B) In anterioren Hypodermiszellen des Kommastadiums ist eine starke Akkumulation von VANG-1 im jeweils posterioren Kortex der Zellen zu erkennen (B', Pfeilköpfe). (C) Dorsalansicht eines Embryos im Kommastadium. VANG-1 lokalisiert am posterioren Kortex der anterioren Hypodermiszellen (C', Pfeilköpfe). Die Asymmetrie kann nicht in allen Zellen des Darmes und der Hypodermis klar dargestellt werden. Anterior ist links, dorsal ist oben. Eichstrich in (A) ist 10 μ m.

In der frühen Morphogenese (Bohnestadium) lokalisiert VANG-1 und LET-413 in den Darmzellen kortikal. Durch die geringe Überlagerung dieser beiden Proteine in dem ausgewählten Bereich wird deutlich, daß VANG-1 asymmetrisch am posterioren Kortex verteilt ist (Abb. 11A', Pfeilkopf). Im Kommastadium lokalisiert VANG-1 in der Hypodermis apikolateral, während LET-413 basolateral verteilt ist (Abb. 11B). Im

anterioren Bereich des Embryos ist eine asymmetrische Lokalisation von VANG-1 in den Hypodermiszellen zu erkennen, wobei VANG-1 am jeweils posterioren Kortex der Zellen akkumuliert (Abb. 11B', C', Pfeilköpfe). In diesen Stadien der Embryonalentwicklung finden Interkalationsereignisse statt, die möglicherweise unter der Kontrolle von VANG-1 stehen können, und neben der lateralen Lokalisation (s. Abb. 10) auch die hier beschriebene asymmetrische Verteilung von VANG-1 benötigen. Die asymmetrische Verteilung von VANG-1 ist dabei nicht in allen Zellen der Hypodermis und des Darms eindeutig zu erkennen. Möglicherweise ist VANG-1 dort nicht asymmetrisch lokalisiert, oder aber die Asymmetrie kann dort nicht eindeutig dargestellt werden. Insgesamt jedoch kann die beobachtete asymmetrische Verteilung von VANG-1 innerhalb bestimmter Zellen als Hinweis auf die Präsenz planarer Polarität in *C. elegans* gesehen werden (s. Diskussion).

Neben der Lokalisation des endogenen Proteins kann die Überexpression eines Proteins Hinweise auf die Funktion selbst liefern. Werden jeweils nur Teilbereiche eines Proteins überexprimiert, so kann dies einen Rückschluß auf die Funktion der fehlenden oder noch vorhanden Bereiche des Proteins zulassen. Im folgenden Abschnitt 3.3 wird die Überexpression von vier verschiedenen VANG-1 Konstrukten gezeigt und analysiert.

3.3 Struktur-Funktionsanalyse von VANG-1

Die grundlegende Idee einer Überexpressionen ist zum einen, das endogene Protein durch das überexprimierte und möglicherweise veränderte Protein zu verdrängen. Dadurch können zum einen dominant-negative Effekte erzeugt werden. Zum anderen besteht die Möglichkeit, durch eine starke Überexpression eine Fehllokalisierung des überexprimierten Proteins zu erreichen, da putative Regulatoren mit der exzessiven Proteinmenge nun nicht mehr hinreichend interagieren können. Auch hierbei können Defekte auftreten, die einen Hinweis auf die Funktion des Proteins liefern. Eine Kombination aus diesen Alternativen ist ebenso möglich. Die hier untersuchten VANG-1 Überexpressionskonstrukte stehen jeweils unter der Kontrolle des darmspezifischen *elt-2* Promotors (Zhu et al., 1997; freundlicherweise von J. McGee, Calgary, zur Verfügung gestellt). Für diesen Promotor konnte bereits eine starke

Expression der dahintergeschalteten Sequenz gezeigt werden (C. Segbert/O. Bossinger, Düsseldorf; pers. Mitteilung). Wird die wildtypische Form (FL, “full length”) des Proteins überexprimiert, so läßt sich diese mit dem VANG-1 Antikörper im Zellkortex sowohl basal als auch lateral nachweisen (Abb. 12A).

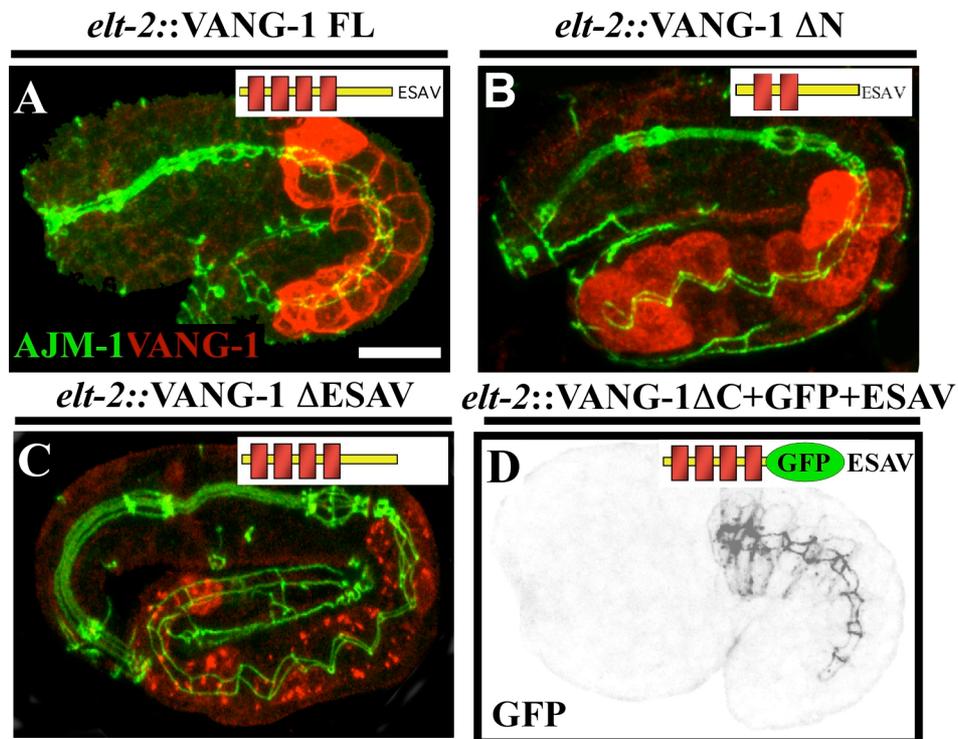


Abb. 12: Lokalisationsanalyse der darmspezifischen Überexpression verschiedener VANG-1 Proteinformen

(A,B,C) Antikörperfärbung gegen den CeAJ-Marker AJM-1 (in grün) und VANG-1 (in rot). (D) Färbung gegen GFP. Alle Überexpressionskonstrukte stehen unter der Kontrolle des darmspezifischen *elt-2* Promotors. Die Proteinformen sind jeweils als Model in der korrespondierenden Abbildung dargestellt. (A) Die wildtypische Proteinform von VANG-1 zeigt eine Lokalisation im Zellkortex. (B) Wird der N-Terminus deletiert, kann diese Proteinform im Cytoplasma nachgewiesen werden. (C) Bei Entfernung des PDZ-Bindemotivs tritt eine vesikuläre Lokalisation auf. (D) Wenn der intrazelluläre Teil mit Ausnahme des PDZ-Bindemotivs durch GFP ersetzt wird, zeigt sich eine verfrühte Anreicherung in der CeAJ (vgl. Abb. 23). In (A) treten Defekte auf, die mit den Defekten in der Mutante identisch sind. In (B-D) sind keine Defekte nachweisbar. Anterior ist links, dorsal ist oben. Eichstrich in (A) ist 10 μ m.

Während endogenes VANG-1, wie beschrieben, ein dynamisches Expressionsmuster mit einem Wechsel der Lokalisation von apikal nach lateral zeigt (vgl. Abb. 10), ist die Lokalisation der VANG-1 FL Überexpression stationär im basolateralen Kortex gehalten. Eine Lokalisation von VANG-1 FL Überexpression in der CeAJ, wie sie im Wildtyp des gleichen Stadiums nachweisbar ist, konnte nicht beobachtet werden. Eine

nähere Analyse zeigt, daß diese Überexpression Defekte in der Anordnung der Darmzellen erzeugt. Diese Anordnungsdefekte sind mit denen der *vang-1* Mutante identisch, daher wird dieser Phänotyp in Abschnitt 3.5 eingehend analysiert.

Transmembranproteine besitzen häufig für ihre Eingliederung in das Membransystem einer Zelle ein sogenanntes Signalpeptid. Dieses Signal ist eine in der Länge und Komposition variable N-terminale Sequenz aus zumeist hydrophoben Aminosäuren (Übersichtsartikel Rothman, 1989). Um zu testen, ob im N-terminus von VANG-1 ein solches Signalpeptid vorhanden sein könnte, wurde der N-terminale Bereich bis zur zweiten Transmembrandomäne entfernt. Die Überexpression dieses Konstruktes zeigt eine diffuse zytoplasmatische Lokalisation ohne erkennbare Akkumulation im Kortex oder der CeAJ (Abb. 12B). Die computergestützte Analyse der VANG-1 Proteinsequenz über den SignalP-3.0 Server sagt kein Signalpeptid voraus (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>; Bendtsen et al., 2004). Es befindet sich im N-terminus womöglich eine Sequenz, die für eine korrekte Eingliederung in das Membransystem benötigt wird, jedoch vermutlich kein Signalpeptid darstellt.

Proteine mit PDZ-Domänen können als molekulare Gerüste die intrazelluläre Verteilung von bestimmten Proteinen steuern (Roh und Margolis 2003). Hierbei interagieren diese Proteine mit ihrer PDZ-Domäne physikalisch mit den vier, bzw. drei C-terminalen Aminosäuren ihres Zielproteins (Harris et al., 2003; Harris und Lim, 2001). Um zu prüfen, ob das C-terminale PDZ-Bindemotiv –ESAV von VANG-1 einen Einfluss auf die Lokalisation hat, wurden diese Aminosäuren deletiert. Die Überexpression dieses Konstruktes resultiert in einer vesikulären Lokalisation (Abb. 12C). In diesem Konstrukt ist die oben erwähnte N-terminale Sequenz vorhanden, sodaß eine Eingliederung in das vesikuläre Membransystem gewährleistet ist. Da hier jedoch das PDZ-Bindemotiv fehlt, verbleibt diese VANG-1 Proteinform in Vesikel.

Möglicherweise ist daher ein PDZ-Domänenprotein für die kortikale Rekrutierung und der Überführung von VANG-1 aus Vesikeln an die Plasmamembran verantwortlich. Von allen im *C. elegans* Proteom vorhergesagten und vorkommenden PDZ-Domänenproteinen stellt hierbei das *C. elegans* GOPC-Homolog (pORF ZK849.2) einen vielversprechenden Kandidaten dar. GOPC besitzt eine PDZ-

Domäne, und für das Homolog aus der Maus konnte eine Assoziation mit dem Golgi nachgewiesen werden. In Zellkultur zeigt es sich für die Rekrutierung von Frizzled an den Kortex verantwortlich, wobei hier die PDZ Domäne von GOPC an das PDZ-Bindemotiv von Frizzled bindet (Yao et al., 2001). Frizzled und VANG-1 besitzen beide ein ähnliches PDZ-Bindemotiv vom Typ I, welches durch die Sequenz -S/T-X-V klassifiziert wird (Songyang et al., 1997). Zudem zeigt die PDZ-Domäne von GOPC eine hohe Sequenzidentität zur PDZ Domäne 2 von DLG-1, welche in einer Hefe-2 Hybrid Analyse für die Interaktion mit VANG-1 benötigt wird (C. Segbert/O. Bossinger, Düsseldorf; pers. Mitteilung). Um zu prüfen, ob GOPC einen Einfluss auf die Rekrutierung von VANG-1 ausübt, wurden der Funktionsverlust von GOPC über RNAi analysiert, und die VANG-1 Lokalisation überprüft. Dabei zeigt *gopc(RNAi)* keinen erkennbaren embryonalen Phänotyp (Daten nicht gezeigt), und VANG-1 lokalisiert wildtypisch am Kortex der Darm- und Hypodermiszellen (Abb. 13, Pfeilköpfe). GOPC zeigt also keinen Einfluss auf die Rekrutierung von VANG-1. Jedoch besteht hier, wie im nächsten Abschnitt für *vang-1(RNAi)* gezeigt wird, die Möglichkeit, daß die GOPC-Expression über RNAi nicht beeinflusst werden kann.

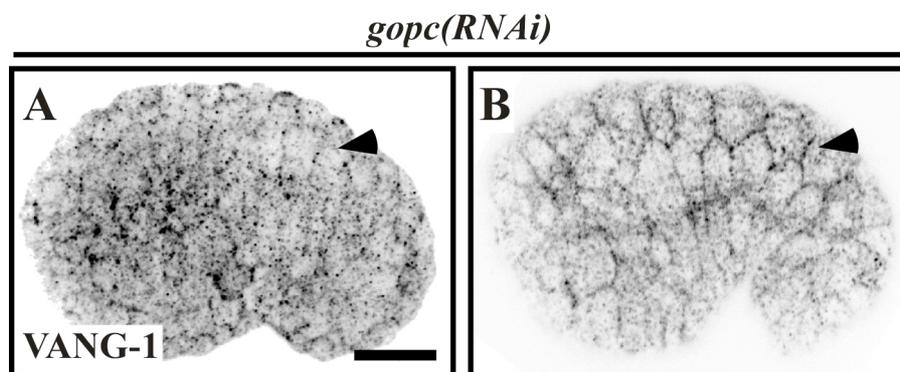


Abb. 13: Der Funktionsverlust von GOPC über RNAi zeigt keinen Einfluss auf die kortikale Rekrutierung von VANG-1

(A,B) Antikörperfärbungen gegen VANG-1 an *gopc(RNAi)*-Embryonen. (A) VANG-1 ist im Kommastadium in den Darmzellen wie im Wildtyp (vgl. Abb. 10) am lateralen Kortex nachweisbar (Pfeilkopf). (B) In der Hypodermis lokalisiert VANG-1 ebenfalls am Kortex der Zellen (Pfeilkopf). Anterior ist links, dorsal ist oben. Eichstrich in (A) ist 10µm.

Um zu prüfen, ob der intrazelluläre C-terminale Bereich von VANG-1 weitere regulierende Sequenzen enthält, wurde dieser deletiert und durch GFP ersetzt. Da das PDZ-Bindemotiv -ESAV, wie gezeigt, vermutlich für die kortikale Rekrutierung notwendig ist, wurde dieses Motiv C-terminal an das GFP angehängt. Das so

hergestellte Konstrukt zeigt hauptsächlich eine Lokalisation in der CeAJ (Abb. 12D), wohingegen wildtypisches VANG-1 in diesem Stadium der Entwicklung (Kommastadium) noch lateral lokalisiert, und erst später in der CeAJ verteilt ist (vgl. Abb. 10D, E). Der intrazelluläre Bereich von VANG-1 enthält also offensichtlich Sequenzen oder Elemente, die für die zeitliche Kontrolle der subzellulären Lokalisation erforderlich sind. Im Zusammenhang mit einer möglichen Phosphorylierung wird dieser Aspekt in Abschnitt 3.9 wieder aufgegriffen.

Neben der Fragestellung wie sich ein Protein verhält, ist von Interesse zu sehen, was die Aufgabe eines Proteins beziehungsweise eines Gens ist. Die Funktion eines Proteins kann über den jeweiligen Funktionsverlustphänotypen offenbart werden. Neben der klassischen Analyse von Mutanten stellt hierbei die RNA vermittelte Interferenz (RNAi) eine geeignete Methode dar. In Mutanten ist die genomische DNA Sequenz eines Gens verändert, sodaß letztendlich ein inaktives oder kein Protein gebildet werden kann. In diesem Fall spricht man von einer Nullmutante. Der Einsatz von RNAi jedoch verändert die genomische DNA-Sequenz nicht. Über RNAi werden *in vivo* gezielt mRNA's abgebaut, was zu einer Phänokopie einer Nullmutante führen kann (Fire et al., 1998; Montgomery et al., 1998; Timmons und Fire, 1998). Um den Funktionsverlustphänotypen von VANG-1 zu überprüfen, wurde versucht, *vang-1(RNAi)* durchzuführen.

3.4 Der Funktionsverlust von VANG-1 läßt sich durch RNA vermittelte Interferenz nicht herbeiführen

Das zunächst für *vang-1(RNAi)* eingesetzte Fragment (Abb. 14E) ist offensichtlich nicht in der Lage, das Genprodukt in ausreichender Weise zu vermindern, denn hier detektiert der VANG-1 Antikörper in *vang-1(RNAi)* Embryonen das wildtypische Muster (Abb. 14G), und es treten keine Defekte auf (Daten nicht gezeigt). Es ist allerdings bekannt, daß der Einsatz von unterschiedlichen Zielsequenzen für die RNAi unter Umständen das Genprodukt entfernen kann (J. Pettit, Dundee; pers. Mitteilung). Bei der Durchführung von genomweiten RNAi Analysen wurden bereits verschiedene Sequenzen für *vang-1(RNAi)* eingesetzt (Abb. 14A-D), jedoch wird der jeweilige *vang-1(RNAi)* Phänotyp als Wildtyp beschrieben (Kamath et al., 2003; Rual

et al., 2004; Sönnichsen et al., 2005). Als Kontrolle wurde *vang-1(RNAi)* mit einem Fragment aus Sönnichsen et al., 2005 durchgeführt (Abb. 14B), jedoch auch hier läßt sich der Proteinlevel von VANG-1 nicht reduzieren (Daten nicht gezeigt).

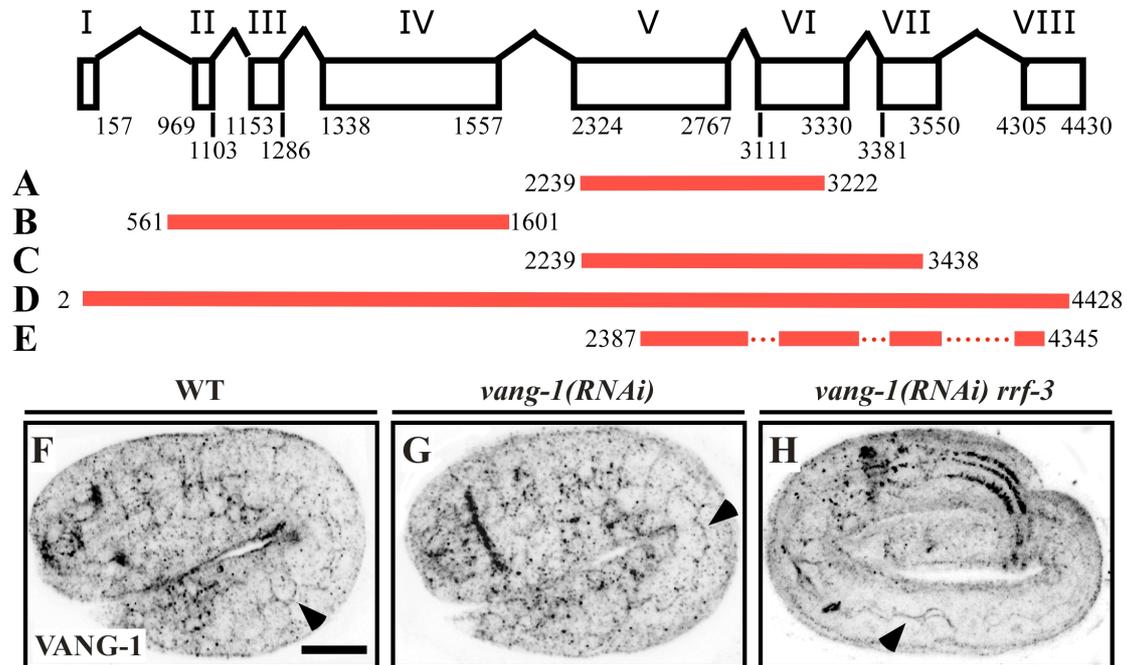


Abb. 14: Ein Funktionsverlust von VANG-1 ist über RNAi nicht herbeizuführen
Gezeigt ist die vorhergesagte genomische Organisation des *vang-1* Locus (oben; die Zahlen markieren Anfangs- bzw. Endposition der Exons) und (A-E) die Bereiche von *vang-1*, die als Zielsequenz für die Durchführung der RNAi ausgewählt worden sind. Die Konstrukte stammen aus (A,B) Sönnichsen et al., 2005, (C) Kamath et al., 2003, (D) Rual et al., 2004 und (E) eigenes Konstrukt (s. M&M). Für (A-D) wurde genomische DNA eingesetzt, während das Fragment in (E) über RTPCR gewonnen wurde (s. M&M). (F-H) Antikörperfärbungen gegen VANG-1 am WT (F), an *vang-1(RNAi)* (G) und an *vang-1(RNAi)* am Stamm *rrf-3*, der eine erhöhte Sensitivität gegen RNAi besitzt (H). (G) RNAi unter Einsatz des Fragmentes aus (E) ist nicht in der Lage, den VANG-1 Proteinlevel zu reduzieren (Pfeilkopf, vgl. F). Das Fragment aus (B) ist ebenfalls nicht in der Lage, den Proteinlevel von VANG-1 zu reduzieren (Daten nicht gezeigt). Da der Phänotyp unter Einsatz der Fragmente aus (A, C, D) in der jeweiligen Literatur als WT deklariert worden ist, wurden keine weiteren Kontrollen mit diesen Fragmenten durchgeführt. (H) Im RNAi-sensitiven Stamm *rrf-3* zeigt *vang-1(RNAi)* mit dem Fragment aus (E) ebenfalls keine nachweisbare Verminderung in der Expression von VANG-1 (Pfeilkopf). Anterior ist links, dorsal ist oben. Eichstrich in (F) ist 10µm.

Eine weitere Möglichkeit, ein Genprodukt über RNAi zu entfernen, liegt in der Anwendung einer Mutante, die eine erhöhte Sensitivität gegen RNAi zeigt (Sijen et al., 2001; Simmer et al., 2002). Das in diesem Stamm mutierte Gen ist das *rrf-3*, welches für eine putative RNA-Polymerase kodiert. Selbst unter Einsatz dieser

Mutante gelingt es nicht, die VANG-1 Expression über RNAi zu vermindern (Abb. 14H, Pfeilkopf).

Da die Analyse des Funktionsverlustphänotypen von VANG-1 über RNAi nicht möglich ist, wurde das National Bioresource Project (NBP, Japan) mit einem Screen nach einer *vang-1* Mutante beauftragt (Gengyo-Ando und Mitani, 2000). Das hieraus isolierte Allel *tml422* wurde im Rahmen dieser Arbeit zwei mal ausgekreuzt (s.M&M). Im Folgenden wird dieses homozygot vorliegende Allel *tml422* als *vang-1* Mutante bezeichnet, und mit Hilfe von Differential-Interferenz-Kontrast (DIK)-Optik und Immunfluoreszenz analysiert.

3.5 In *vang-1* Embryonen sind Musterbildungsdefekte im Darm zu erkennen

Wie bereits beschrieben ist in der *vang-1* Mutante der Bereich deletiert, der für die ersten drei Transmembrandomänen kodiert (s. Abb. 9B). Die Mutante ist mit eingeschränkter Fertilität lebensfähig und weist in der frühen Embryonalentwicklung keine erkennbaren Defekte auf. Ebenfalls wildtypisch verläuft die sogenannte zytoplasmatische Polarisierung. Die zytoplasmatische Polarisierung ist ein Prozeß, bei dem sich die noch mesenchymalen Darmzellen entlang einer imaginären Mittellinie anordnen (Abb. 15A, Sternchen; Leung et al., 1999). Dieser Prozeß zeigt in *vang-1* Embryonen keine Abweichungen zum Wildtyp (Abb. 15B, Sternchen).

Als wichtiges Ereignis der Darmmorphogenese folgt die Interkalation von jeweils zwei ventral gelegenen Darmzellpaaren, die dadurch in die dorsale Zellschicht einwandern (s. Abb. 1; Leung et al., 1999). Dieser Prozeß läßt sich aufgrund seiner räumlichen und zeitlichen Dynamik nur sehr schwer darstellen und wurde bisher noch nicht vollständig dokumentiert (Leung et al., 1999). Es konnten dennoch Hinweise gefunden werden, daß die Interkalation in *vang-1* Mutanten beeinträchtigt sein könnte. In *vang-1* Embryonen ist zu erkennen, daß eine einzelne ventrale Zelle des posterioren Zellpaares ihre Position nicht verändert (Abb. 16B', Pfeilkopf), wohingegen im Wildtyp zu diesem Zeitpunkt dieses Zellpaar schon vollständig in die dorsale Zellreihe eingewandert ist (Abb. 16A, A'). Diese Beobachtung wird als erster Hinweis gesehen, daß VANG-1 die Interkalation der Darmzellen regulieren könnte.

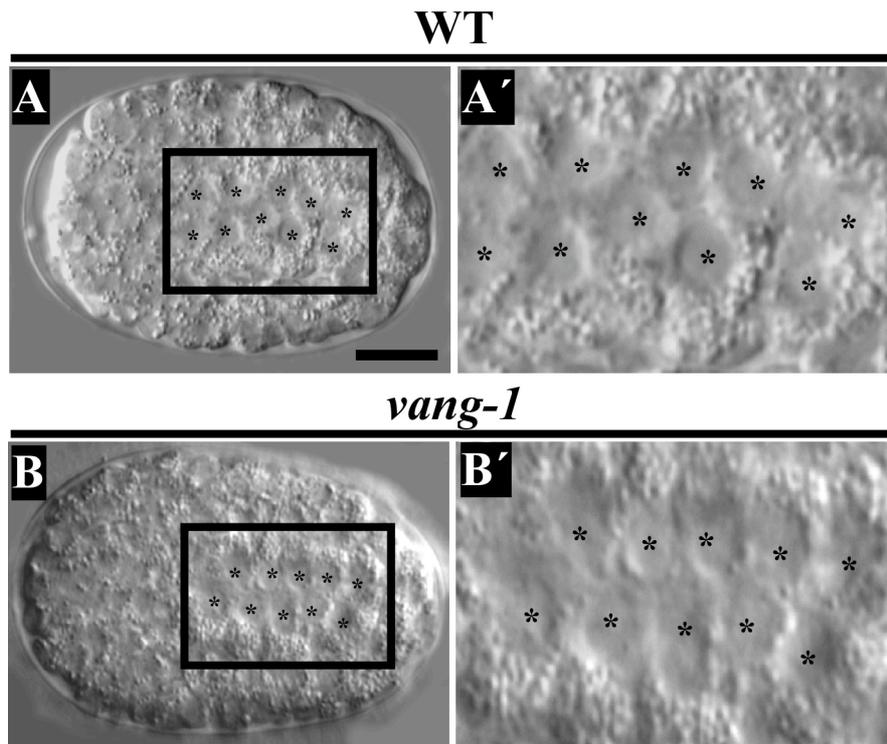


Abb. 15: Die Anordnung der Darmzellen zum Zeitpunkt der zytoplasmatischen Polarisierung ist in *vang-1* Mutanten nicht beeinträchtigt

(A, B) DIK-Aufnahmen von Embryonen zum Zeitpunkt der zytoplasmatischen Polarisierung. (A) Im Wildtyp sind die zehn dorsalen Darmzellen paarig entlang einer virtuellen Mittellinie angeordnet (A', Sternchen; n=20). (B) In *vang-1* Embryonen ist diese Anordnung ebenfalls zu erkennen (B', Sternchen; n=20). Anterior ist links, dorsal ist oben. Eichstrich in (A) ist 10 μ m.

Um zu überprüfen, ob diese putative unvollständige Interkalation einen Einfluss auf die weitere Darmentwicklung zeigt, wurden Morphogenesestadien der *vang-1* Mutante unter DIK-Optik analysiert, und mit dem Wildtyp verglichen (Abb. 17). Im Wildtyp werden die anterioren Darmzellen im Kommastadium entlang der dorso-ventral-Achse ausgerichtet (Abb. 17A, weisse Sternchen), und die folgenden Zellen orientieren sich entlang der links-rechts Achse, wodurch aufgrund der Seitenansicht somit nur eine Zelle zu erkennen ist (Abb. 17A, schwarze Sternchen). In *vang-1* Embryonen des gleichen Stadiums ist dieses Muster nicht vorhanden. Die Anordnung der Zellen ist unregelmäßig, wobei die dorso-ventrale Ausrichtung der Darmzellen nicht stattfindet (Abb. 17B, schwarze Sternchen).

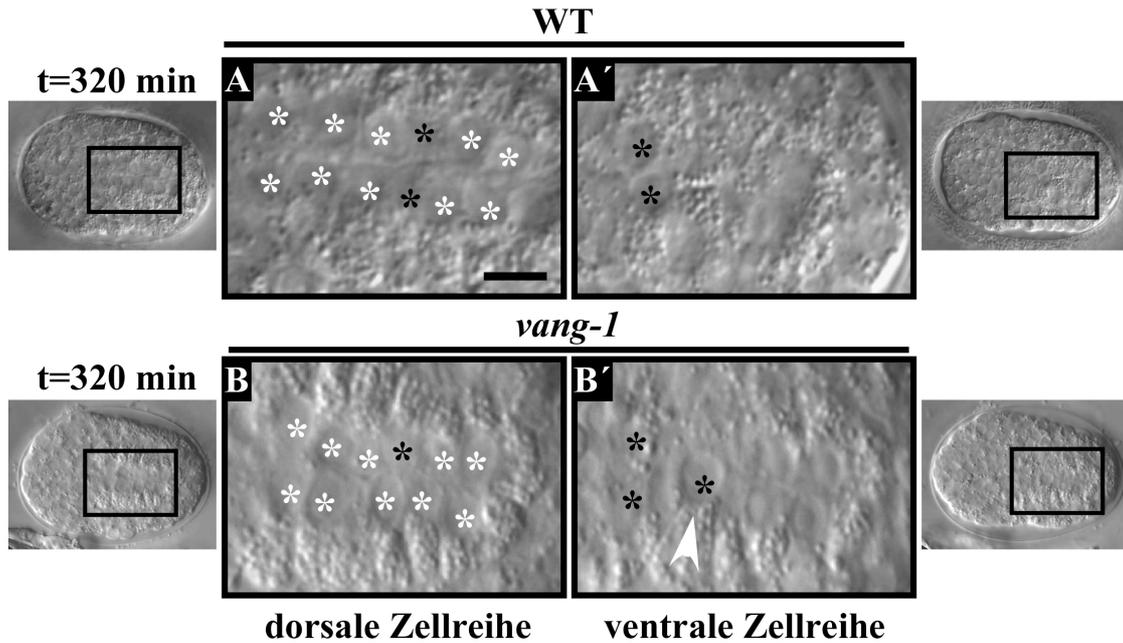


Abb. 16: In *vang-1* Embryonen ist möglicherweise die Interkalation beeinträchtigt

(A,B) DIK-Aufnahmen von Embryonen zum Zeitpunkt der Interkalation. Dorsale Zellen sind durch weiße Sternchen markiert, ventrale Zellen durch schwarze Sternchen. (A) Im Wildtyp besteht zum Zeitpunkt $t=320$ min die dorsale Zellreihe aus sechs Zellpaaren, wobei ein Zellpaar (schwarze Sternchen) durch die Interkalation aus seiner ursprünglich ventralen Position eingewandert ist ($n=4$). (A') In der ventralen Position befindet sich noch ein Zellpaar (schwarze Sternchen). (B) In *vang-1* Embryonen hat nur eine Zelle des ventralen Zellpaares die Interkalation abgeschlossen (schwarzes Sternchen), wohingegen die andere Zelle dieses Zellpaares in ihrer ventralen position verbleibt (B', Pfeilkopf; $n=1$). Anterior ist links, dorsal ist oben. Eichstrich in (A) ist $3\mu\text{m}$.

Um die defekte Anordnung der Darmzellen genauer zu überprüfen, wurde auf Immunfluoreszenzebene mit dem CeAJ Marker AJM-1 (Köppen et al., 2001) und dem Kernmarker YoYo-1 (Marie et al., 1996) gefärbt, um die exakte Position der Zellen darzustellen. Im Wildtyp wird die gleichförmige und paarweise Anordnung der Darmzellen durch ein entsprechendes Muster der CeAJ beschrieben (Abb. 18A; vgl. Abb. 3). Exemplarisch ist hier ein Zellpaar im anterioren Bereich gezeigt, welches sich in einer dorso-ventraler Achse gegenüberliegt (Abb. 18A', weiße Sternchen). Dieses Zellpaar bildet zwei CeAJ miteinander aus, die eine Eingrenzung des Lumens darstellen (Abb. 18A'', schwarze Pfeilköpfe; vgl. auch Schemazeichnung in D).

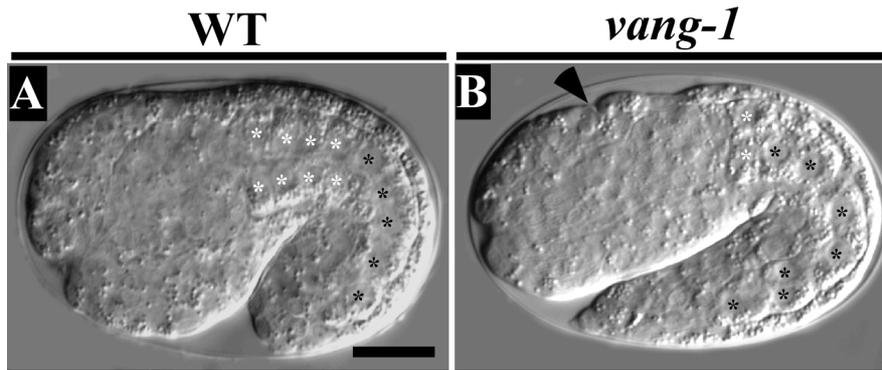


Abb. 17: In *vang-1* Embryonen sind Musterdefekte des Darmepithels zu erkennen

(A, B) DIK-Aufnahmen von Embryonen zum Zeitpunkt der Morphogenese am Wildtyp (A) und an *vang-1* Embryonen (B). (A) Im Wildtyp sind die jeweiligen Zellen der ersten vier Darmeinheiten (int, "intestinal unit") entlang der dorso-ventralen Achse ausgerichtet (weisse Sternchen; s. Einleitung; n=50). Die Zellen der folgenden ints V bis IX sind entlang der lateralen Achse angeordnet, sodaß nur jeweils ein Zellkern sichtbar ist (schwarze Sternchen). (B) In *vang-1* Embryonen sind die ints willkürlich entlang einer Achse angeordnet, wobei durch die laterale Fokusebene nicht alle Zellkerne erfasst worden sind (n=30). Zusätzlich zu den Defekten im Darm zeigt die Hypodermis eine vom Wildtyp abweichende Morphologie, die durch Einstülpungen gekennzeichnet ist (Pfeilkopf; vgl. Abb. 11; n=10). Anterior ist links, dorsal ist oben. Eichstrich in (A) ist 10µm.

In *vang-1* Embryonen wird deutlich, daß die sonst gleichförmige Ausrichtung der Darmzellen zu Einheiten aus jeweils zwei Zellen beeinträchtigt ist. Hier kann eine Anordnung von drei Zellen und die daraus resultierende Ausbildung von drei CeAJ beobachtet werden (Abb. 18B' Sternchen, B'', Pfeilköpfe; vgl. auch Schemazeichnung in E). Die Gesamtanzahl der Darmzellen ist hierbei nicht verändert, sie beträgt wie im Wildtyp konstant zwanzig. Die Anordnungsdefekte der Darmzellen in *vang-1* Embryonen sind variabel, wobei insgesamt nur die Region, in der Zellinterkalationen stattfinden können, betroffen ist (Abb. 9F). So ist weder der terminale anteriore Bereich (int I) noch der posteriore Bereich (int VI-IX) des Darmes in *vang-1* Mutanten von den Defekten betroffen. Dieser Bereich der Einheiten int II bis int V wird nachstehend als Interkalationsbereich bezeichnet. Als direkte Konsequenz der Anlagerung einer weiteren Zelle zu einer Einheit kann die Verkürzung des Darmes in *vang-1* Mutanten gesehen werden (Abb. 19). Der wildtypische Darm zeigt ein bestimmtes CeAJ-Muster, welches seinen Aufbau aus neun Darmeinheiten reflektiert (Abb. 19A; vgl. Abb.3), wohingegen in *vang-1* Mutanten die klare Differenzierung der einzelnen Darmeinheiten nunmehr verhindert

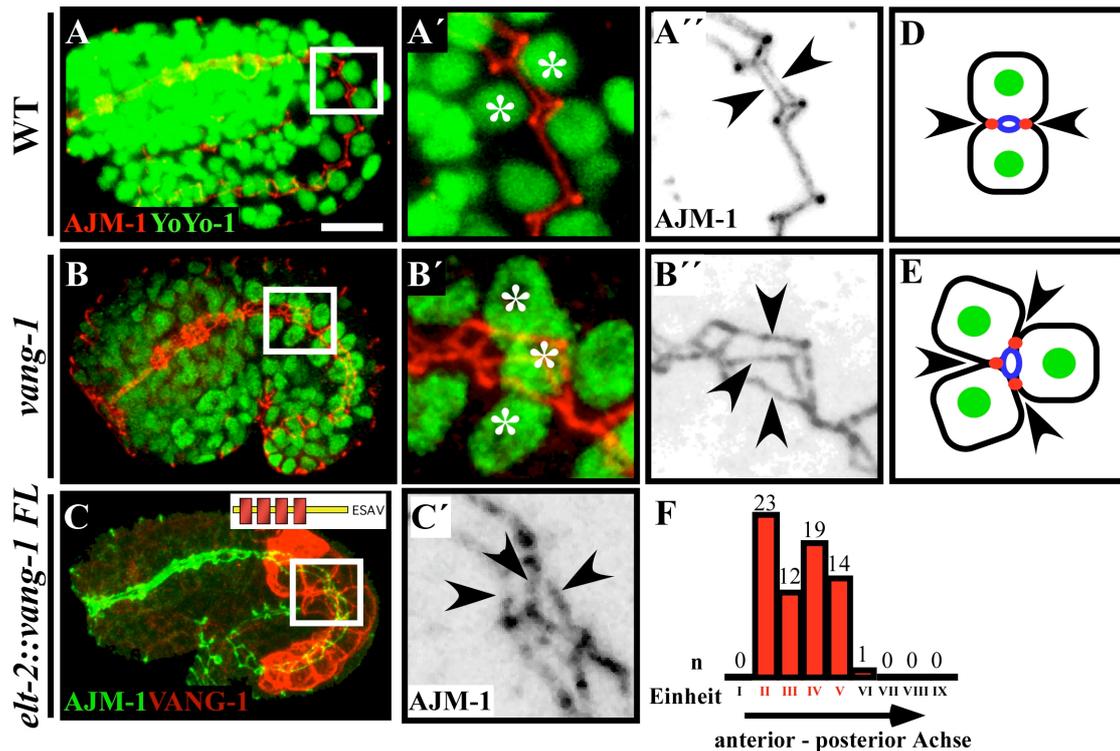


Abb. 18: In *vang-1* Embryonen werden Darmeinheiten aus drei anstatt aus zwei Zellen gebildet

(A,B) Antikörperfärbungen gegen den CeAJ-Marker AJM-1 (in rot) und den Zellkernmarker YoYo-1 (in grün). (C) Antikörperfärbung gegen den CeAJ-Marker AJM-1 (in grün) und VANG-1 (in rot). (D,E) Schematische Darstellung der Anordnung zu Ints aus zwei Zellen (D) und aus drei Zellen (E). Zellkerne sind hier in grün, die CeAJ in rot und das Lumen in blau dargestellt (vg. Abb.3). (A) Im Wildtyp sind die Darmzellen der ints II bis IX jeweils gegenüberliegend angeordnet (A', Sternchen zeigen exemplarisch ein Int; s. Einleitung). Dabei bilden die zwei Zellen eines Ints auch zwei CeAJ-Gürtel aus (A'', Pfeilköpfe; vgl. D). Dieses Muster der CeAJ im Wildtyp ist invariabel (n=150). (B) Die Darmzellen in *vang-1* Embryonen können sich zu ints aus drei Zellen anlagern (B', Sternchen), wobei drei CeAJ ausgebildet werden (B'', Pfeilköpfe; vgl. E). Die Veränderung im Muster kann durch die CeAJ-Färbung klar dargestellt werden. (C) In der darmspezifischen Überexpression von VANG-1 können Defekte beobachtet werden, die zu den Defekten in *vang-1* Embryonen identisch sind (C', Pfeilköpfe; n=10). (F) Die Anordnung von mehr als zwei Zellen zu einem int kann in *vang-1* Mutanten im anterioren Interkalationsbereich der ints II bis V beobachtet werden (n=69). Anterior ist links, dorsal ist oben. Eichstrich in (A) ist 10µm.

ist (Abb. 19B). Wie bereits gezeigt, ordnen sich in *vang-1* Mutanten drei Darmzellen zu einem int an (s. Abb. 18), wobei mehrere ints betroffen sein können (Abb. 19B, Pfeile). Die Länge des Darmes kann dabei lediglich 77% der Wildtyplänge erreichen. Die Musterbildungsdefekte werden im Verlauf der Morphogenese nicht korrigiert und sind noch im Larvenstadium zu erkennen (Abb. 19C, Pfeilköpfe).

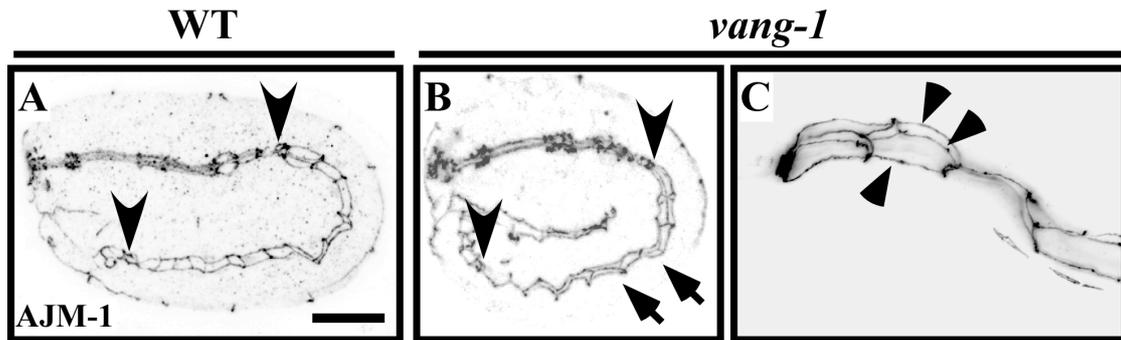


Abb. 19: Der Darm ist in *vang-1* Embryonen verkürzt

(A-C) Antikörperfärbungen gegen den CeAJ-Marker AJM-1. Der Darm ist durch schwarze Pfeilköpfe flankiert. Die Darmlänge in diesem Stadium beträgt im Mittel $44,9\mu\text{m}$ ($n=10$; Gemessen wurde der Abstand zwischen den flankierenden Pfeilköpfen mit Hilfe von geeichten Linien im Programm Photoshop CS, Adobe). (A) Der Wildtyp reflektiert durch das Muster der CeAJ die invariante Anordnung der Darmzellen zu neun ints (vgl. Abb.3). (B) In *vang-1* Embryonen ist aufgrund der Interkalationsdefekte (Pfeile; vgl. Abb. 16) die eindeutige Differenzierung in neun Darmeinheiten nicht möglich. Die Länge des Darmes ist je nach Schweregrad der Defekte variabel und beträgt hier im Mittel $34,9\mu\text{m}$ ($n=5$). Anterior ist links, dorsal ist oben. (C) In Larvenstadien sind die Musterdefekte persistent ($n=10$). Gezeigt ist hier der anteriore Darmbereich eines L3-Stadiums, und int II besteht aus drei Zellen (Pfeilköpfe). Anterior ist links, dorsal ist oben. Eichstrich in (A) ist $10\mu\text{m}$.

Möglichlicherweise werden die in der *vang-1* Mutante fehlenden ersten drei Transmembrandomänen von VANG-1 für die korrekte Funktion des Proteins, z.B. bei der Erkennung eines planaren Signals oder bei der Signalweiterleitung, benötigt. Durch diese Beeinträchtigung der Funktion könnten die beobachteten Musterdefekte im Darm entstehen (s. Diskussion).

Auch durch die darmspezifische Überexpression von VANG-1 werden Musterbildungsdefekte induziert, die den Defekten in der Mutante entsprechen (Abb. 18C, C'). Das in der Mutante gebildete VANG-1 ist eine trunkeerte Proteinform, die scheinbar in ihrer Funktion beeinträchtigt ist, wohingegen in der Überexpression exzessives und stationäres VANG-1 in basolateraler Position vorhanden ist (Abb. 18C'). Der Phänotyp der Mutante entspricht also dem der Überexpression. Dieses wird als ein weiterer Hinweis auf die Existenz der planaren Polarität in *C. elegans* gewertet, da in anderen Systemen durch eine Überexpression oder einem Funktionsverlust von PCP-Komponenten ebenfalls ein identischer PCP-Phänotyp hervorgerufen werden kann (Krasnow und Adler, 1994; Darken et al., 2002; Goto und Keller, 2002; s. Diskussion).

Die Defekte in der *vang-1* Mutante betreffen die Region des Darmes, die durch die Interkalation gestaltet wird (s. Abb. 18F). VANG-1 könnte also, wie es in *Xenopus* auch der Fall ist, die Interkalation regulieren. Um einen weiteren Hinweis für diese Hypothese und der Existenz der planaren Polarität in *C. elegans* zu erhalten, wurde ein weiteres Interkalationsereignis in der Embryonalentwicklung untersucht.

3.6 In *vang-1* Embryonen sind Abweichungen im Ablauf der hypodermalen Zellinterkalation zu beobachten

Zellinterkalationen treten sowohl im Darmepithel als auch in der embryonalen Hypodermis auf. Die dorsalen Hypodermiszellen wandern geordnet ineinander und bauen nach dem Reißverschlußprinzip eine Zellreihe auf (Williams-Masson et al., 1998). Die Interkalation der Hypodermiszellen scheint im wesentlichen dem Ablauf der konvergenten Extension in anderen Systemen zu entsprechen, wie sie z.B. in *Xenopus* beobachtet werden kann (Keller et al., 1985). Hier führt ein Funktionsverlust von Strabismus/Van Gogh zu einer Beeinträchtigung in der Interkalation der Zellen (Darken et al., 2002). Die Kontrolle dieses morphogenetischen Prozesses unterliegt dabei dem PCP-Signalweg, was im folgenden Abschnitt 3.7 näher erläutert wird. Um zu testen, ob VANG-1 einen ähnlichen Einfluss auf die hypodermale Entwicklung besitzt, wurden *vang-1* Embryonen zum Zeitpunkt der hypodermalen Zellinterkalation analysiert.

Im Wildtyp wird die dorsale Hypodermis aus Zellen gebildet, die sich ursprünglich lateral gegenüberliegen. Diese Zellen wandern dann alternierend ineinander, ähnlich einem Reißverschluß (Abb. 20A, Pfeilköpfe; Simske und Hardin, 2001). In *vang-1* Embryonen gelingt es den hypodermalen Zellen prinzipiell ineinanderzuwandern (Abb. 20D, Pfeilköpfe), jedoch ist das sonst so geordnete Muster nach dem Reißverschlußprinzip nicht penetrant.

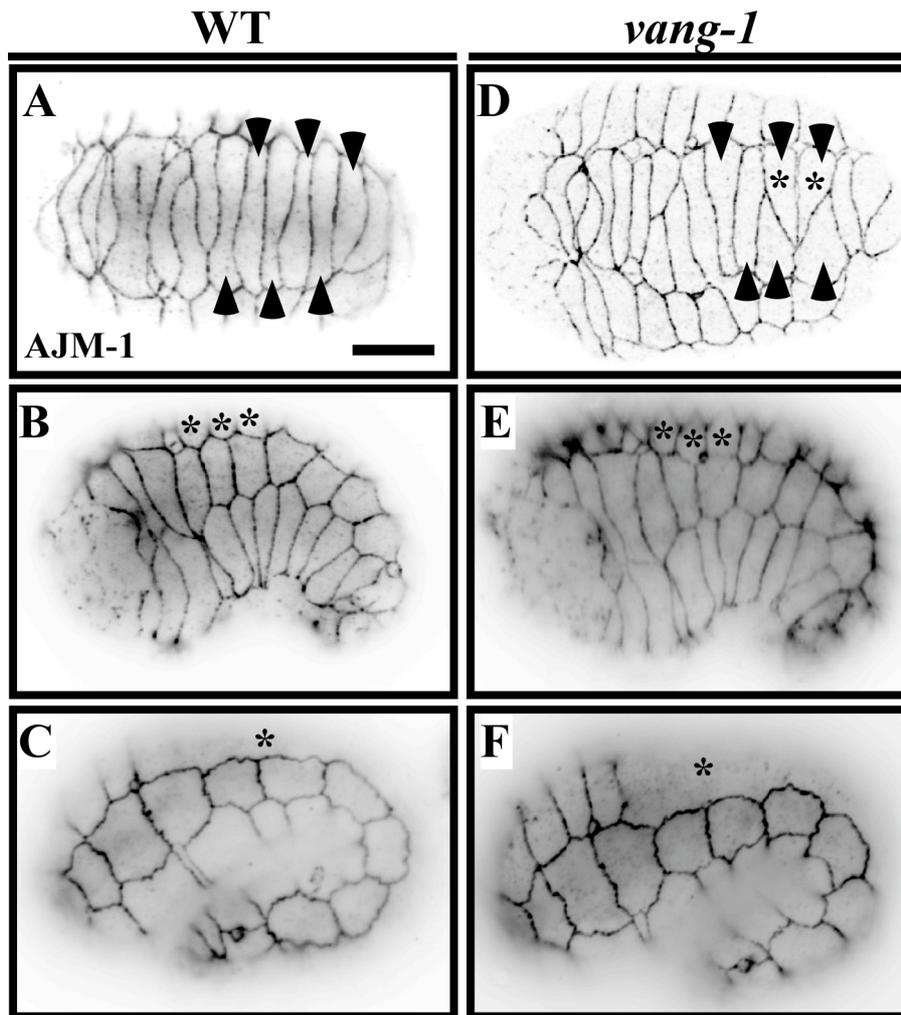


Abb. 20: In *vang-1* Embryonen treten Interkalationsdefekte in der Hypodermis auf

(A-F) Antikörperfärbungen gegen den CeAJ-Marker AJM-1 am WT (A-C) und an *vang-1* Mutanten (D-F). (A,D) Die Wanderungsrichtung der Zellen ist jeweils mit Pfeilköpfen angegeben (A) Im Wildtyp wandern die Hypodermiszellen alternierend ineinander (n=10). (B) In *vang-1* Embryonen wandern die Zellen nicht exakt alternierend, sondern teilweise paarig, ineinander (Sternchen; n=2). (B) Exemplarisch sind drei hypodermale Zellen des Kommastadiums mit Sternchen markiert. (C) Diese Zellen sind im Pflaumestadium zusammen mit weiteren Zellen der Hypodermis zu einer Zelle fusioniert (Sternchen). (E) In *vang-1* Embryonen sind ebenfalls exemplarisch drei Zellen markiert (Sternchen). (F) Im Pflaumestadium sind diese Zellen fusioniert und bilden wie im WT eine Zelle (Sternchen). Anterior ist links, dorsal ist oben. (A, D) ist eine Dorsalansicht. Eichstrich in (A) ist 10 μ m.

Einige Zellen zeigen hier eine paarweise Wanderung in Richtung der gegenüberliegenden Seite, was im Wildtyp nicht beobachtet werden kann (Abb. 20D, Sternchen). Kurze Zeit nachdem die Hypodermiszellen die Interkalation vollendet haben, beginnen diese zu fusionieren und bilden so im weiteren Verlauf der Embryogenese ein Synzytium (Abb. 20B, C, Sternchen; Hedgecock und White, 1985;

Podbilewicz und White, 1994; Shemer und Podbilewicz, 2003). Die hypodermalen Interkalationsdefekte in *vang-1* Mutanten haben keinen Einfluss auf die Zellfusionen, sodaß auch hier ein hypodermales Synzytium gemäß dem wildtypischen Vorbild entsteht (Abb. 20E, F, Sternchen). Somit kann die weiter hypodermale Entwicklung ohne Beeinträchtigung vollzogen werden, obgleich morphologische Abweichungen zum Wildtyp vorhanden sind (vgl. Abb. 17D).

Der in *vang-1* Embryonen beobachtete Phänotyp im Darm wird als Interkalationsphänotyp interpretiert, und könnte im direkten Zusammenhang mit einem putativen PCP-Signalweg stehen. Die Zellen eines Epithels können neben einer apiko-basalen Polarität auch eine planare Polarität besitzen, d.h. die Zellen sind entlang der Achse einer Ebene polarisiert, ähnlich einer Eisennadel in einem Magnetfeld. Diese Polarisierung wird durch einen nicht-kanonischen Wingless Signalweg, dem PCP-Signalweg, gesteuert (Übersichtsartikel Eaton, 1997). Dieser Signalweg beeinflusst u.a. die planare Zellpolarität im Auge in *Drosophila* oder die konvergente Ausdehnung des Neuralrohres in *Xenopus* (Übersichtsartikel Fanto und McNeill, 2004). Bisher konnten in diesen Systemen zahlreiche Proteine identifiziert werden, die an dem Aufbau der planaren Polarität beteiligt sind, und Strabismus/Van Gogh nimmt in diesem Signalweg neben Frizzled und Dishevelled eine zentrale Position ein (Bastock et al., 2003; s. Einleitung). Diese Schlüsselposition von Strabismus/Van Gogh wird deutlich, sobald es zu einem Funktionsverlust dieses Proteins kommt. Die Zellen eines Epithels sind dann nicht mehr in der Lage, eine geordnete planare Polarität aufzubauen, und richten sich zufällig entlang der Achse einer Ebene aus.

Um zu testen, ob die homologen Komponenten dieses Signalweges in *C. elegans* einen ähnlichen Phänotypen wie *vang-1* hervorrufen, was einen Hinweis auf eine Präsenz im gleichen Signalweg liefert, wurde der Funktionsverlust von Frizzled und Dishevelled auf Defekte in der Musterbildung im Darmepithel untersucht.

3.7 Ein putativer planarer Zellpolaritäts-Signalweg ist an der Musterbildung im Darm beteiligt

In *C. elegans* sind bereits unterschiedliche Wingless-Signalwege identifiziert worden, die an diversen Entwicklungsprozessen beteiligt sind. Prozesse wie die Wanderung bestimmter Neuroblasten, die Spezifizierung des Endoderms oder die asymmetrische Teilung einiger Zellen basieren auf der Funktion des Wingless-Signalweges, der sich jeweils unterschiedlicher Paraloge der Komponenten bedient (Übersichtsartikel Korswagen, 2002). Dabei wird das Frizzled MOM-5 im Embryo für die Induktion des Endoderms benötigt (Thorpe et al., 1997). Das Frizzled LIN-17 hingegen ist an der Festlegung der Identität bestimmter Zellen während der Vulvaentwicklung beteiligt (Deshpande et al., 2005).

Um zu prüfen, welche Gene an der Regulation der Interkalation in *C. elegans* beteiligt sind, wurden ausgewählte Komponenten der bekannten Wingless-Signalwege auf diesen Aspekt hin analysiert. In *C. elegans* existieren die drei Dishevelled Homologe DSH-1, DSH-2 und MIG-5 (Korswagen, 2002). Der Funktionsverlust über RNAi zeigt bei DSH-1 und MIG-5 jeweils keinen erkennbaren Darm-Phänotypen (Daten nicht gezeigt). Der Funktionsverlust des DSH-2 führt zu Musterbildungsdefekten im Darm, was auf Immunfluoreszenzebene sichtbar gemacht werden kann (Abb. 21C). Diese Musterdefekte stellen eine Phänokopie von *vang-1* dar (Abb. 21B). Interessanterweise kann eine Phänokopie des *vang-1* Phänotyps auch durch den Funktionsverlust des Frizzled LIN-17 erzielt werden (Abb. 21D). Die Defekte betreffen in *dsh-2(RNAi)* und *lin-17* Mutanten jeweils nur die Region des Darmes, in der Zellinterkalationen stattfinden. Die terminale anteriore Region und die posteriore Darmregion sind nicht betroffen. Die bereits für *vang-1* gezeigte Formation einer Darmeinheit aus drei Zellen ist in *dsh-2(RNAi)* Embryonen (Abb. 21C) und in *lin-17* Mutanten (Abb. 21D) ebenfalls zu beobachten. Dabei reflektiert die Ausprägung von drei apikalen Kontakten (Abb. 21C'', D'', Pfeilköpfe) die Anlagerung von drei Zellen (Abb. 21C', D', Sternchen) zu einer Einheit. Der Funktionsverlust von LIN-17 und DSH-2 führt also, wie VANG-1, zu einer identischen Ausprägung von Musterbildungsdefekten im Darm, was auf eine genetische Interaktion und einer Präsenz im gleichen Signalweg hindeuten könnte.

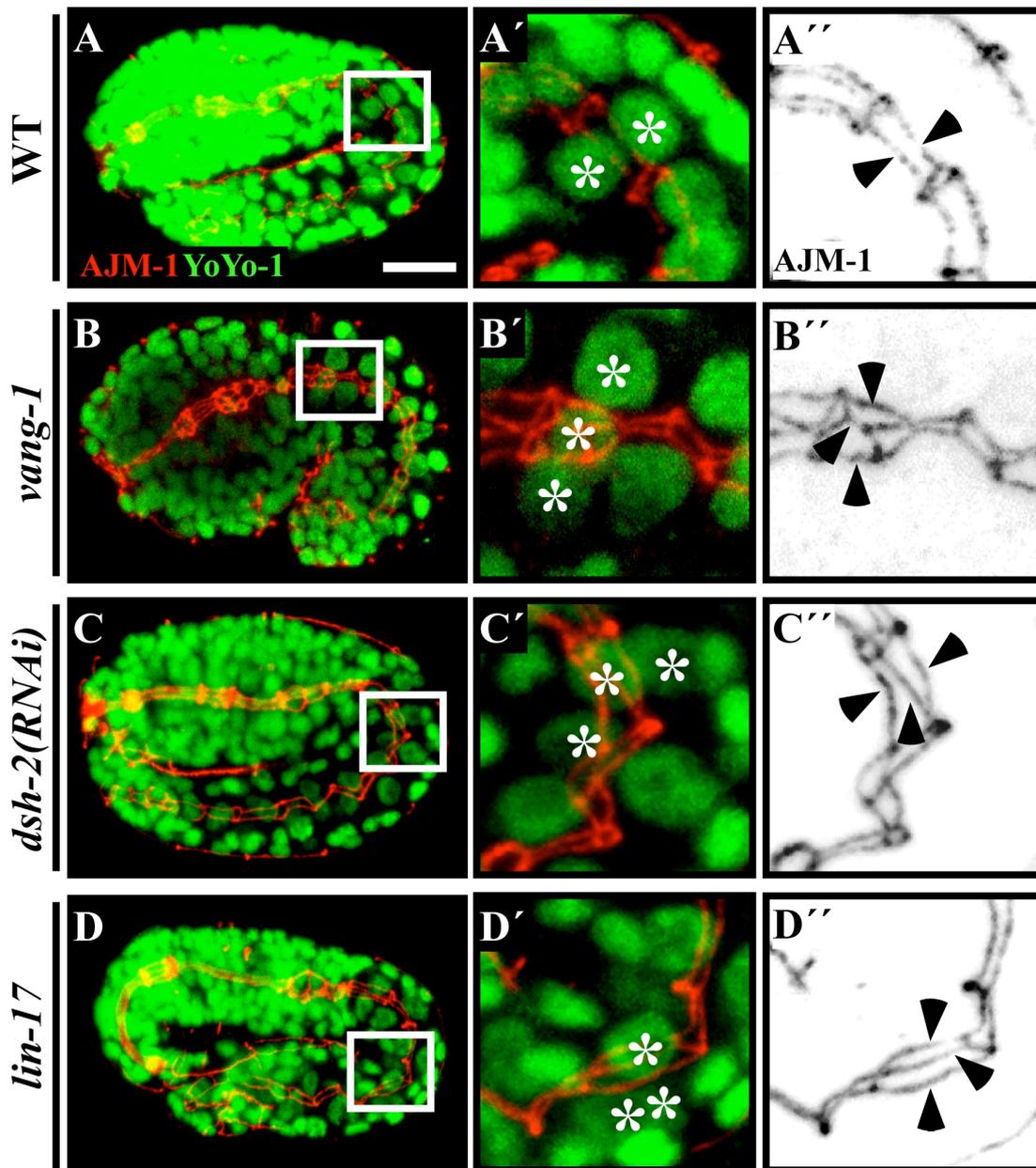


Abb. 21: Der Funktionsverlust von DSH-2 und LIN-17 reproduziert jeweils den *vang-1* Phänotyp

(A-D) Antikörperfärbungen gegen den CeAJ-Marker AJM-1 (in rot) und Kernfärbung mit YoYo-1 (in grün). (A) Die wildtypischen ints II bis IX werden jeweils von zwei Zellen gebildet (A', Sternchen) und bilden dabei zwei CeAJ aus (A'', Pfeilköpfe). (B) In *vang-1* Embryonen werden Einheiten aus drei Zellen angelegt (B', Sternchen), die entsprechend drei CeAJ ausbilden (B'', Pfeilköpfe). (C, D) In *dsh-2(RNAi)* werden, ebenso wie in *lin-17* Embryonen, Einheiten im anterioren Interkalationsbereich aus drei Zellen erstellt (C', D', Sternchen). Die betroffene Darmeinheit zeigt die Ausbildung von drei CeAJ (C'', D'', Pfeilköpfe). Anterior ist links, dorsal ist oben. Eichstrich in (A) ist 10 μ m.

Um nachzuweisen, ob VANG-1 und DSH-2 eine direkte Interaktion zeigen, wurde zunächst ein Hefe-Interaktionstest durchgeführt (s. M&M). Dabei zeigt DSH-2 eine physikalische Interaktion über seine PDZ-Domäne mit dem C-terminalen PDZ-Bindemotiv -ESAV von VANG-1. Wird das PDZ-Bindemotiv von VANG-1 entfernt, läßt sich keine Interaktion im Hefe 2-Hybrid nachweisen (Daten nicht gezeigt). Es besteht also prinzipiell die Möglichkeit, daß beide Proteine auch *in vivo* in direkter Wechselwirkung stehen können. Um diese Annahme zu unterstützen, wurden Antikörperfärbungen gegen VANG-1 und DSH-2 am Wildtyp durchgeführt und auf Kolokalisation beider Proteine hin untersucht (der DSH-2 Antikörper wurde freundlicherweise von N. Hawkins zur Verfügung gestellt; Hawkins et al., 2005). Im Wildtyp zeigt DSH-2 eine Expression im Darm (Abb. 22A, B) und in der Hypodermis (Abb. 22C). Dabei ist DSH-2 im Darm des Bohnestadiums sowohl lateral (Abb. 22A', Pfeilkopf) als auch apikal verteilt (Abb. 22A'', Pfeil), und zeigt jeweils eine deutliche Kolokalisation mit VANG-1. Auch die für VANG-1 bereits beschriebene Dynamik in der subzellulären Verteilung kann für die Lokalisation von DSH-2 beobachtet werden. Im Kommastadium sind sowohl DSH-2 (Abb. 22B', Pfeilkopf) als auch VANG-1 (Abb. 22B'', Pfeilkopf) vornehmlich lateral lokalisiert. In der späteren Morphogenese zeigt DSH-2 wieder neben der lateralen Verteilung (Abb. 22C', Pfeilkopf) eine Lokalisation in der CeAJ, wo es mit VANG-1 und AJM-1 kolokalisiert (Abb. 22C). Die deutliche Darstellung der Kolokalisation von VANG-1 und DSH-2 unterstützt, zusammen mit den Daten aus dem Hefe-Interaktionstest, die Annahme einer direkten Interaktion der beiden Proteine VANG-1 und DSH-2 *in vivo*.

In *Drosophila* beeinflussen sich die Kernkomponenten des PCP-Signalweges wechselseitig in ihrer Lokalisation (s. Einleitung). Um zu analysieren, ob die Verteilung von VANG-1 durch DSH-2 reguliert wird, wurde die Lokalisation von VANG-1 in *dsh-2(RNAi)* Embryonen untersucht (Abb. 23). Um dabei eine mögliche Veränderung in der asymmetrischen Lokalisation von VANG-1 sichtbar zu machen, wurde dieses Experiment am Stamm LET-413-CFP durchgeführt (s.o.).

WT

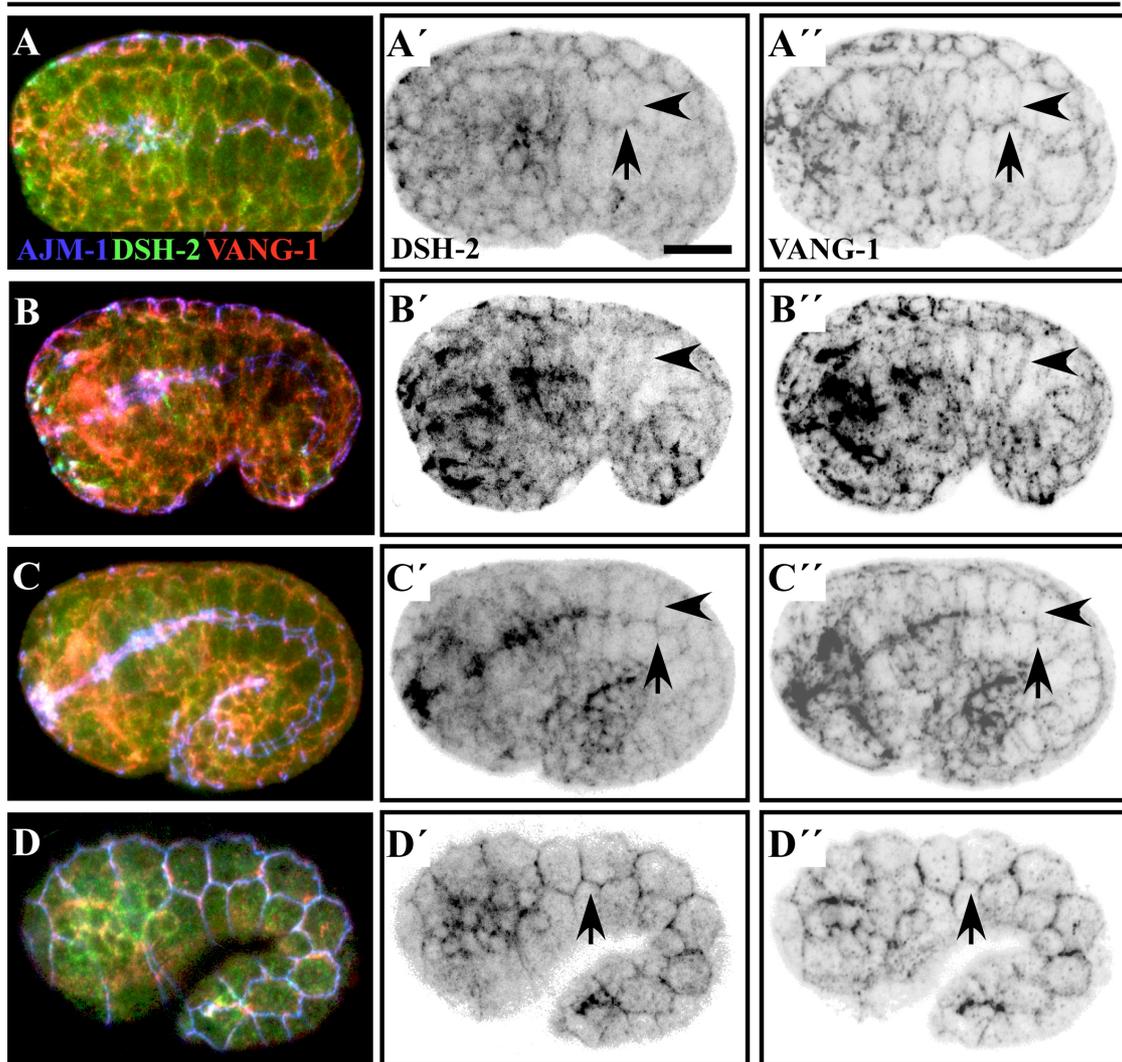


Abb. 22: VANG-1 und DSH-2 kolokalisieren im Darm und der Hypodermis

(A-D) Antikörperfärbungen am WT-Embryo gegen den CeAJ-Marker AJM-1 (in blau), DSH-2 (in grün) und VANG-1 (in rot). (A) In der frühen Morphogenese kolokalisieren DSH-2 und VANG-1 in der CeAJ (A', A'' Pfeil) und lateral (A', A'', Pfeilkopf). (B) Im Kommastadium kolokalisieren DSH-2 und VANG-1 lateral (B', B'', Pfeilkopf). (C) Im Kaulquappestadium kolokalisieren beide Proteine wieder in der CeAJ (C', C'', Pfeil) und lateral (B', B'', Pfeilkopf). (D) In der Hypodermis kolokalisieren DSH-2 und VANG-1 in der CeAJ mit AJM-1 (D', D'', Pfeil). DSH-2 zeigt somit eine dynamische Lokalisation in den Darmzellen, die zu der VANG-1 Lokalisation identisch ist. Anterior ist links, dorsal ist oben. Eichstrich in (A') ist 10 μ m.

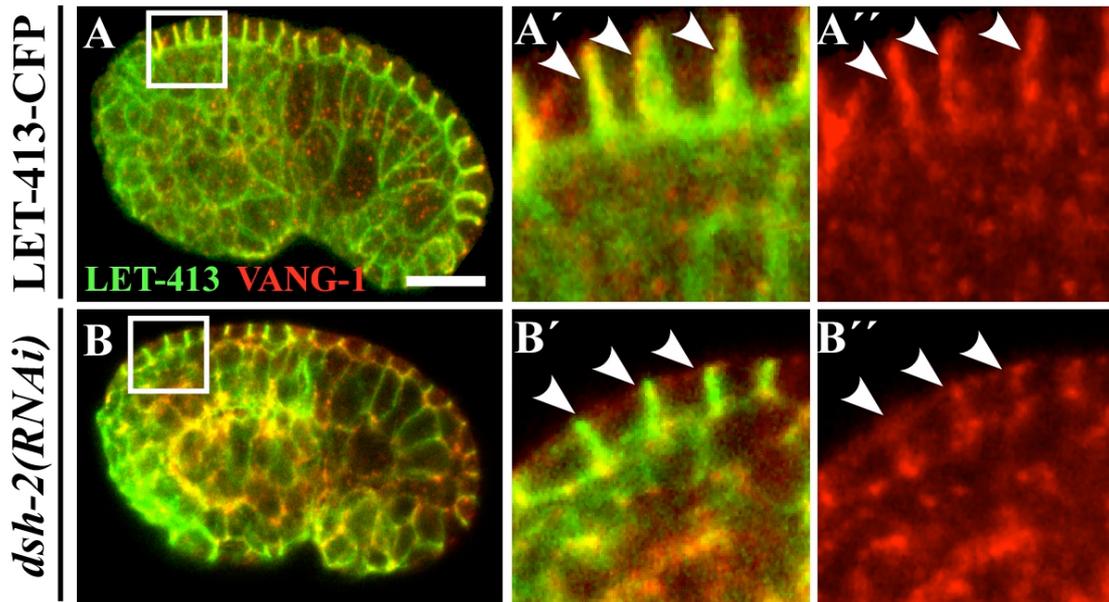


Abb. 23: Die asymmetrische Verteilung von VANG-1 wird durch DSH-2 reguliert

(A,B) Antikörperfärbungen gegen GFP (in grün) und VANG-1 (in rot) am Stamm LET-413-CFP. (A) Wie beschrieben (s. Abb. 11) lokalisiert VANG-1 in anterioren Hypodermiszellen am jeweils posterioren Zellkortex (A', A'', Pfeilköpfe). (B) In *dsh-2(RNAi)* ist in den anterioren Hypodermiszellen eine schwache ubiquitäre Verteilung von VANG-1 im Zellkortex erkennbar (B', B'', Pfeilköpfe; n=20). Anterior ist links, dorsal ist oben. Eichstrich in (A) ist 10 μ m.

In anterioren Hypodermiszellen zeigt VANG-1 eine asymmetrische Verteilung, wobei VANG-1 hier wie bereits gezeigt am jeweiligen posterioren Kortex der Hypodermiszellen stark akkumuliert (Abb. 23A', Pfeilköpfe). In *dsh-2(RNAi)* Embryonen ist in den anterioren Hypodermiszellen weder eine vergleichbare Akkumulation von VANG-1, noch eine asymmetrische Verteilung zu erkennen (Abb. 23B', Pfeilköpfe). Die Färbung erscheint hier möglicherweise schwächer, da VANG-1 in *dsh-2(RNAi)* Embryonen nicht mehr konzentriert am posterioren Zellkortex lokalisiert, sondern im gesamten Kortex verteilt ist. Die subzelluläre Lokalisation von VANG-1 wird also durch DSH-2 reguliert. Die Lokalisationskontrolle basiert aufgrund der Interaktionsdaten aus der Hefe und der gezeigten Kolo-kalisation *in vivo* möglicherweise auf einer direkten Regulation von VANG-1 durch DSH-2 (s. Diskussion).

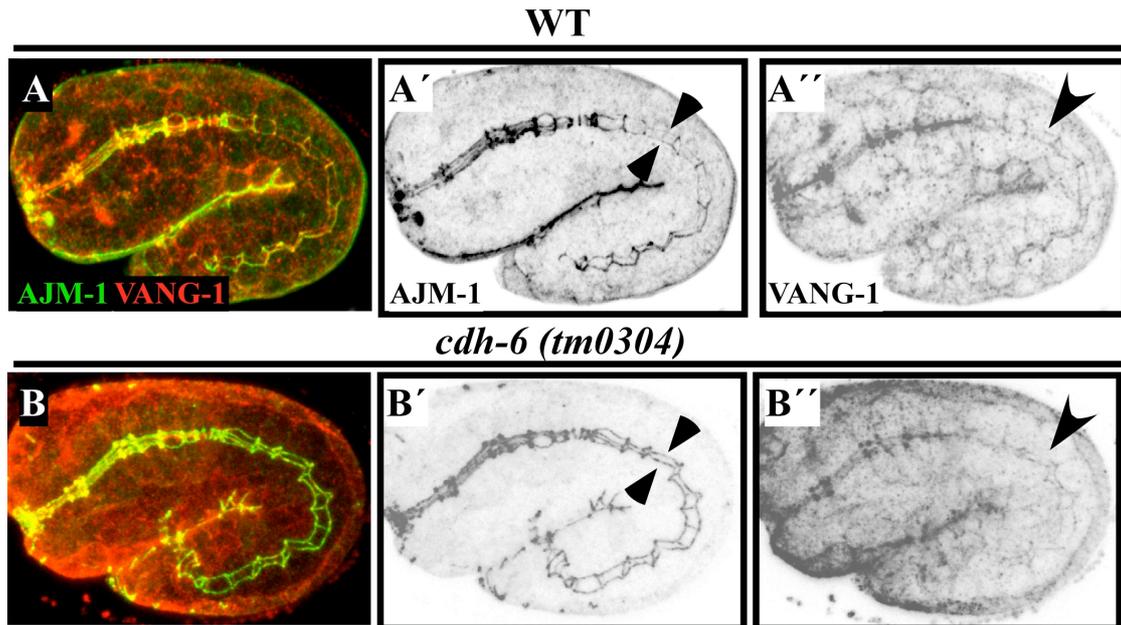


Abb. 24: In *cdh-6* Mutanten sind keine Musterdefekte nachweisbar und die VANG-1 Lokalisation ist nicht beeinträchtigt

(A,B) Antikörperfärbungen gegen den CeAJ-Marker AJM-1 (in grün) und VANG-1 (in rot) am Wildtyp (A) und an *cdh-6* Mutanten (B). (B') Das CeAJ-Muster in *cdh-6* Mutanten entspricht dem Muster im Wildtyp (vgl. A'; n=30). Die ints II bis IX werden jeweils aus zwei Zellen gebildet (Pfeilköpfe). (B'') Die VANG-1 Lokalisation ist ebenfalls wildtypisch (vgl. A''). Anterior ist links, dorsal ist oben. Eichstrich in (A) ist 10 μ m.

Weitere Komponenten des PCP-Signalweges in *Drosophila* sind neben Strabismus/Van Gogh die Proteine Flamingo, Diego und Prickle (Chae et al., 1999; Gubb et al., 1999; Feiguin et al., 2001; s. Einleitung). Flamingo gehört zur Familie der atypischen Cadherine und wird für die Verteilung von PCP Komponenten, wie z.B. Diego und Prickle, benötigt (Usui et al., 1999; Das et al., 2002). Das zyttoplasmatische Protein Diego dirigiert vermutlich über seine Ankyrin-Domänen selbst weitere PCP-Proteine (Feiguin et al., 2001). In *C. elegans* konnten über eine BLAST-Analyse keine offensichtlichen Homologen von Diego und Prickle identifiziert werden, wohingegen CDH-6 als das putative *C. elegans* Flamingo Homolog vermutet wird. Die Komposition der extrazellulären Cadherin Domänen von CDH-6 entspricht der des Flamingo, allerdings ist der intrazelluläre C-terminus nur sehr gering konserviert. Die Gesamtsequenzähnlichkeit von CDH-6 zu Flamingo liegt bei 81,2% (WormBase web site, <http://www.wormbase.org>, release WS152, 2006). In *cdh-6* Mutanten treten Fertilitätsdefekte auf, was darauf schließen läßt, daß das CDH-6 prinzipiell in seiner Funktion beeinträchtigt ist. Es sind jedoch keine

Musterbildungsdefekte im Darm nachweisbar (Abb. 24B'), und auch die Lokalisation von VANG-1 verhält sich in diesem Hintergrund wildtypisch (Abb. 24B'', Pfeilkopf). Im Gegensatz zu der Funktion von Flamingo in anderen Systemen scheint das CDH-6 in *C. elegans* keine Funktion in Bezug auf VANG-1 zu besitzen. Es besteht jedoch die Möglichkeit, daß diese *cdh-6* Mutante keine Null-Mutante darstellt, sondern lediglich ein trunkiertes Protein hervorbringt, was für die putative Wechselwirkung mit VANG-1 ausreicht.

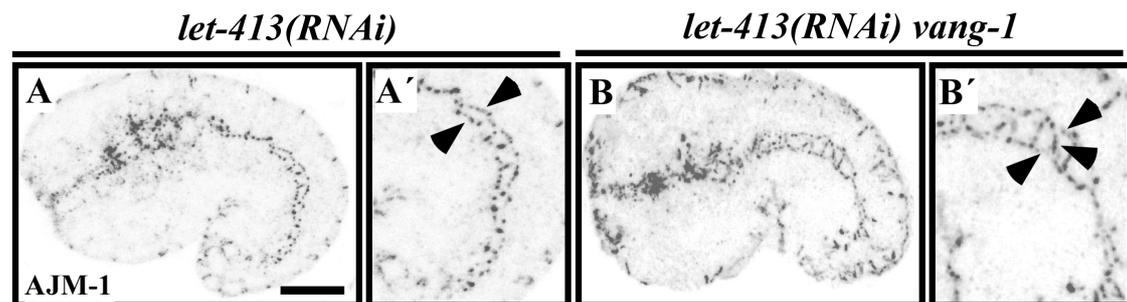


Abb. 25: LET-413 zeigt keinen Einfluss auf die Musterbildung des Darmepithels (A,B) Antikörperfärbungen gegen den CeAJ-Marker AJM-1 an *let-413(RNAi)* Embryonen (A) und an *let-413(RNAi)* an der *vang-1* Mutante (B). (A) Der *let-413(RNAi)* Phänotyp zeigt, wie bereits beschrieben, eine punktierte Verteilung von AJM-1 in der CeAJ (Legouis et al., 2000). (A') Es werden Darmeinheiten aus zwei Zellen gebildet (Pfeilköpfe; n=25). (B) Der Funktionsverlust von LET-413 in *vang-1* Mutanten führt zur kombinierten Ausprägung beider Phänotypen. (B') Die Ausprägung von Einheiten bestehend aus drei Zellen ist erkennbar (Pfeilköpfe; n=20). Anterior ist links, dorsal ist oben. Eichstrich in (A) ist 10µm.

Ein weiteres Gen, welches an der Ausprägung planarer Polarität in *Drosophila* und *Xenopus* beteiligt ist, ist das jeweilige Scribble Homolog (Montcouquiol et al., 2003, Wada et al., 2005). Für das *C. elegans* Scribble Homolog LET-413 ist bisher eine Funktion an der Etablierung und Aufrechterhaltung der apiko-basalen Polarität gezeigt worden (Legouis 2000; s. Einleitung). Um eine mögliche Beteiligung von LET-413 an der Musterbildung nachzuweisen, wurden *let-413(RNAi)* Embryonen gegen den CeAJ-Marker AJM-1 und VANG-1 gefärbt. Der Funktionsverlust von LET-413 führt wie bereits beschrieben in der mittleren Morphogenese zu einer punktuellen Verteilung von AJM-1 entlang des apikalen Kontaktes (Abb. 25A; Legouis et al., 2000). Musterdefekte treten in *let-413(RNAi)* Embryonen allerdings nicht auf, da hier, wie im Wildtyp, die Ausprägung von zwei apikalen Kontakten innerhalb einer Darmeinheit beobachtet werden kann, welches die korrekte Anordnung der Darmzellen reflektiert (Abb. 25A', pfeilköpfe).

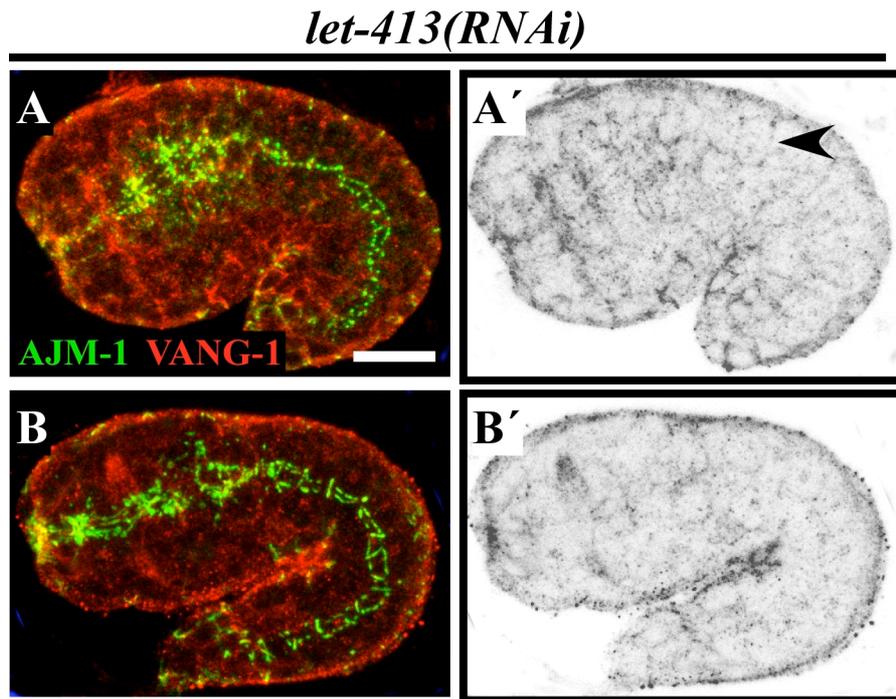


Abb. 26: LET-413 beeinflusst die späte Lokalisation von VANG-1 in der CeAJ
 (A, B) Antikörperfärbungen gegen den CeAJ-Marker AJM-1 (in grün) und VANG-1 (in rot) an *let-413(RNAi)* Embryonen. (A) Im Kommastadium in *let-413(RNAi)* kann VANG-1, wie im WT, lateral detektiert werden (A', Pfeilkopf; n=10). (B) Im Kaulquappestadium in *let-413(RNAi)* ist VANG-1 nahezu nicht mehr nachweisbar (B'; n=20). Anterior ist links, dorsal ist oben. Eichstrich in (A) ist 10 μ m.

Der Funktionsverlust von LET-413 in *vang-1* Mutanten führt zur kombinierten Ausprägung beider Phänotypen, also einer punktierten Verteilung von AJM-1 entlang der CeAJ und Musterdefekten im Darm (Abb. 25B', Pfeilköpfe). LET-413 und VANG-1 sind also offensichtlich an jeweils voneinander unabhängigen Prozessen beteiligt. Die Funktion von LET-413 in Bezug auf die Aufrechterhaltung der apiko-basale Polarität beeinflusst jedoch auch die späte Lokalisation von VANG-1. Im Vergleich zum Wildtyp ist in *let-413(RNAi)* Embryonen VANG-1 in der CeAJ nicht mehr nachweisbar (Abb. 26B', vgl. Abb. 10G). Allerdings ist dies vermutlich auf die generelle Funktion von LET-413 zurückzuführen, da neben AJM-1 z.B. auch DLG-1 in einem *let-413(RNAi)* Hintergrund in seiner Lokalisation betroffen ist (Köppen et al., 2001; Bossinger et al., 2001). Die frühe laterale Verteilung von VANG-1 hingegen ist in *let-413(RNAi)* Embryonen nicht verändert (Abb. 26A', Pfeilkopf). In anderen Systemen stehen die Proteine Strabismus/Van Gogh, Dishevelled und Frizzled im PCP-Signalweg in einer zentralen Position. In *C. elegans* reproduziert der jeweilige Funktionsverlust von Dishevelled (DSH-2) und Frizzled (LIN-17) den *vang-*

1 Interkalations-Phänotyp, was auf eine Funktion im gleichen Signalweg hindeutet. Für weitere Regulatoren der PCP, wie Flamingo (CDH-6) oder Scribble (LET-413), konnte in *C. elegans* keine Beteiligung an der Interkalation nachgewiesen werden.

Dishevelled ist ein zytoplasmatisches Protein, welches nicht exklusiv im PCP-Signalweg steht. Vielmehr ist Dishevelled an der Signalweiterleitung verschiedener sogenannter Wiggless-Signalwege, u.a. dem kanonischen Wiggless-Signalweg, beteiligt (s.u.; Wallingford und Habas, 2005). Um zu prüfen, ob auch der kanonische Wiggless-Signalweg an der Regulation der Musterbildung beteiligt ist, wurden der Funktionsverlust ausgewählter Komponenten dieses Signalweges analysiert.

3.8 Der kanonische Wiggless-Signalweg ist an der Musterbildung im Darm beteiligt

Der PCP-Signalweg ist ein sogenannter nicht-kanonischer Wiggless-Signalweg, d.h. die Vermittlung seiner Funktion geschieht über Frizzled, Dishevelled und gewebespezifisch z.B. über die Regulation der c-Jun N-terminal Kinase (JNK) und über GTPasen der Rho Familie (Strutt et al., 1997; Boutros et al., 1998). Demgegenüber steht als notwendiger intrazellulärer Übermittler des Wiggless-Signals das β -Catenin, neben Dishevelled, im kanonischen Wiggless-Signalweg in einer zentralen Position (Übersichtsartikel Miller et al., 1999; Übersichtsartikel Huelsken und Behrens, 2002). β -Catenin wirkt hierbei als Transkriptionsfaktor und wird in Abwesenheit eines Wiggless-Signals permanent im N-Terminus phosphoryliert. Dadurch ist es für eine Degradation durch das Proteasom markiert (Aberle et al., 1997; Übersichtsartikel Bienz und Clevers, 2000; s. Einleitung).

Der sogenannte “destruction complex” steuert hierbei direkt die Phosphorylierung von β -Catenin (Übersichtsartikel Luo und Lin 2004). Dieser Komplex besteht im wesentlichen aus dem Tumorsuppressor APC-1, der Serin/Threonin Kinase GSK-3 und dem Axin-ähnlichen Protein PRY-1, welches vermutlich die Funktion eines Gerüsts für die Komponenten dieses Komplexes ausübt (Rocheleau et al., 1998; Schlesinger et al., 1999; Korswagen et al., 2002). Bei der Anwesenheit eines Wiggless-Signals wird die Funktionalität des Komplex inhibiert, und die

Phosphorylierung von β -Catenin bleibt aus (Mao et al., 2001). Dadurch kann unphosphoryliertes β -Catenin akkumulieren und schließlich über die Bindung an Transkriptionsfaktoren der TCF/LEF (T-cell factor/lymphoid enhancing factor) - Familie die Transkription von Zielgenen des Wingless-Signalweges einleiten (Behrens et al., 1996; Huber et al., 1996; Molenaar et al., 1996). Dieses ist vereinfacht dargestellt der Vorgang, durch den der kanonische Wingless-Signalweg in der Lage ist, morphogenetische Prozesse zu steuern.

Um zu prüfen, ob neben dem PCP Signalweg auch der kanonische Wingless-Signalweg über die Regulation von β -Catenin an der Musterbildung im Darm beteiligt sein könnte, wurde zunächst der Funktionsverlust zweier Komponenten des "destruction complex", APR-1 und GSK-3, analysiert. Das Ausschalten der beiden Komponenten GSK-3 und APR-1 über RNAi führt jeweils zu pleiotropen Defekten. Für APR-1 konnte dabei bereits gezeigt werden, daß ein Funktionsverlust den ventralen Schluß der Hypodermiszellen beeinflusst (Hoier et al., 2000), oder die Darmzellzahl erhöht sein kann (R. Schneider/O. Bossinger, Düsseldorf; pers. Mitteilung). In *apr-1(RNAi)* und *gsk-3(RNAi)* können jeweils auch Musterbildungsdefekte unterschiedlicher Stärke beobachtet werden (Abb. 27). Der Phänotyp in *gsk-3(RNAi)* erscheint hierbei stärker als der durch *vang-1* oder *apr-1(RNAi)* verursachte Phänotyp, da die lateralen Hypodermiszellen in *gsk-3(RNAi)* nicht in der Lage sind, die für den ventralen Schluß erforderliche Zellmigration durchzuführen. Im Wildtyp wird diese Zellwanderung nach ventral benötigt, um den Embryo zu schliessen. Durch die hypodermalen Migrationsdefekte in *gsk-3(RNAi)* gelangt der Darm an die "Außenseite" des Embryos und bildet den sogenannten gex-Phänotypen ("gut-on-exterior"; Soto et al., 2002).

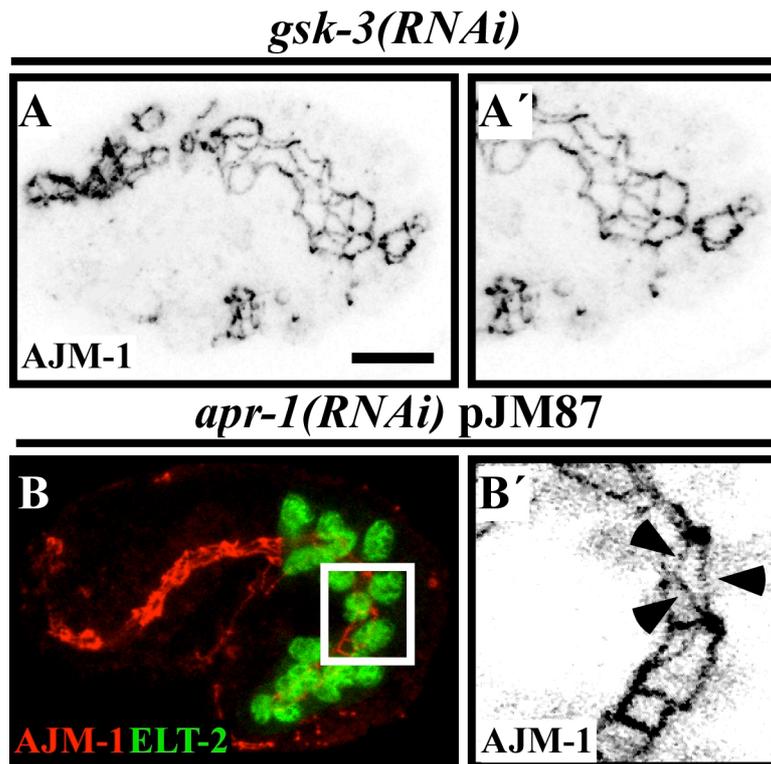


Abb. 27: Der Funktionsverlust von APR-1 und GSK-3 führt jeweils zu Musterdefekten des Darmepithels

(A,B) Antikörperfärbungen gegen den CeAJ-Marker AJM-1 an *gsk-3(RNAi)* Embryonen (A) und an *apr-1(RNAi)* Embryonen am Stamm pJM87, der ein ELT-2-GFP Fusionsprotein exprimiert und die Darmzellkerne markiert (B). (A) Der Funktionsverlust von GSK-3 führt zu einer Zystenbildung der Darmzellen (n=12). (B) In *apr-1(RNAi)* kann die Bildung von Darmeinheiten aus drei Zellen auch im posterioren Bereich des Darmes beobachtet werden (B, Auswahl; B', Pfeilköpfe; n=8). Anterior ist links, dorsal ist oben. Eichstrich in (A) ist 10 μ m.

Zudem sind in *gsk-3(RNAi)* Embryonen die Darmzellen zu einer Art Zyste angeordnet, wodurch der Darm stark verkürzt ist (Abb. 27A). Diese zystenartige Anlagerung der Darmzellen liegt schon zum Zeitpunkt der zytoplasmatischen Polarisierung vor, und wird im Verlauf der Morphogenese nicht korrigiert. Vermutlich ist auch hier, ähnlich wie in der Hypodermis, die Migration der Zellen beeinträchtigt. Musterdefekte im Darm können daher auch zu einem früheren Zeitpunkt als den der Interkalation entstehen (vgl. Abschnitt 1.10 ; s. Diskussion).

Über *apr-1(RNAi)* kann der *vang-1* Phänotyp augenscheinlich reproduziert werden (Abb. 27B). Allerdings betreffen die Musterdefekte nicht nur den für *vang-1* bestimmten Bereich der zellulären Interkalation. Einzelne Einheiten werden zwar aus drei Darmzellen geformt, was durch die Ausbildung von drei apikalen Kontakten

reflektiert wird (Abb. 27B', Pfeilköpfe). Jedoch ist in *apr-1(RNAi)* mehrheitlich auch der posteriore Bereich des Darmes betroffen (Abb. 27B, markierter Bereich). In diesem Bereich treten keine Zellinterkalationen auf (Leung et al., 1999), somit ist hier eine beeinträchtigte Interkalation alleine nicht die Erklärung für diesen Phänotypen. Die Zellzahl ist hierbei nicht verändert (s.o.). Die Interferenz mit der Funktion des β -Catenin regulierenden "destruction complex" führt also zu neuartigen Musterdefekten, die allerdings keine Phänokopie von *vang-1* oder *dsh-2(RNAi)* darstellen. Insbesondere *apr-1(RNAi)* zeigt, daß Musterdefekte mit der Bildung von Einheiten aus drei Zellen auch im posterioren Bereich des Darmes auftreten können (s. Diskussion).

Das β -Catenin steht, wie oben beschrieben, im kanonischen Wingless Signalweg als essentieller Faktor für die Weiterleitung des Signals, und die beiden Regulatoren von β -Catenin, das APR-1 und das GSK-3, zeigen eine Beteiligung an der Musterbildung (s. Abb. 27). Um zu testen, ob und in welchem Ausmaße das β -Catenin selbst für die Musterbildung benötigt wird, wurde der Funktionsverlustphänotyp der drei in *C. elegans* bekannten β -Catenine BAR-1, HMP-2 und WRM-1 analysiert (Eisenmann et al., 1998; Costa et al., 1998; Rocheleau et al., 1997). Für BAR-1 und WRM-1 konnte bereits eine Beteiligung im Wingless Signalweg nachgewiesen werden, wobei WRM-1 an asymmetrischen Zellteilungen im Embryo beteiligt ist (Rocheleau et al., 1999; Takeshita und Sawa, 2005), und wie das APR-1 bei einem Funktionsverlust zu einer erhöhten Anzahl der Darmzellen führen kann (R. Schneider/O. Bossinger, Düsseldorf; pers. Mitteilung). Das BAR-1 reguliert die postembryonale Wanderung der Q-Neuroblasten, welche ein komplexes Wanderungsmuster zeigen, und während ihrer Wanderung Tochterzellen hervorbringen (Korswagen, 2002). Der jeweilige Funktionsverlust von WRM-1 und von HMP-2 zeigen Musterbildungsdefekte, die mit den in *vang-1* Mutanten beobachteten Defekten augenscheinlich identisch sind (Abb. 28B, C). In *hmp-2(RNAi)* und in *wrm-1* Mutanten werden entsprechend Einheiten aus drei Zellen gebildet (Pfeilköpfe in Abb. 28B', C'). Der Funktionsverlust von HMP-2 zeigt jedoch auch im posterioren Bereich eine Abweichung vom wildtypischen Muster (Abb. 28C, markierter Bereich), wie es auch in *apr-1(RNAi)* beobachtet werden kann (s. Abb. 28B).

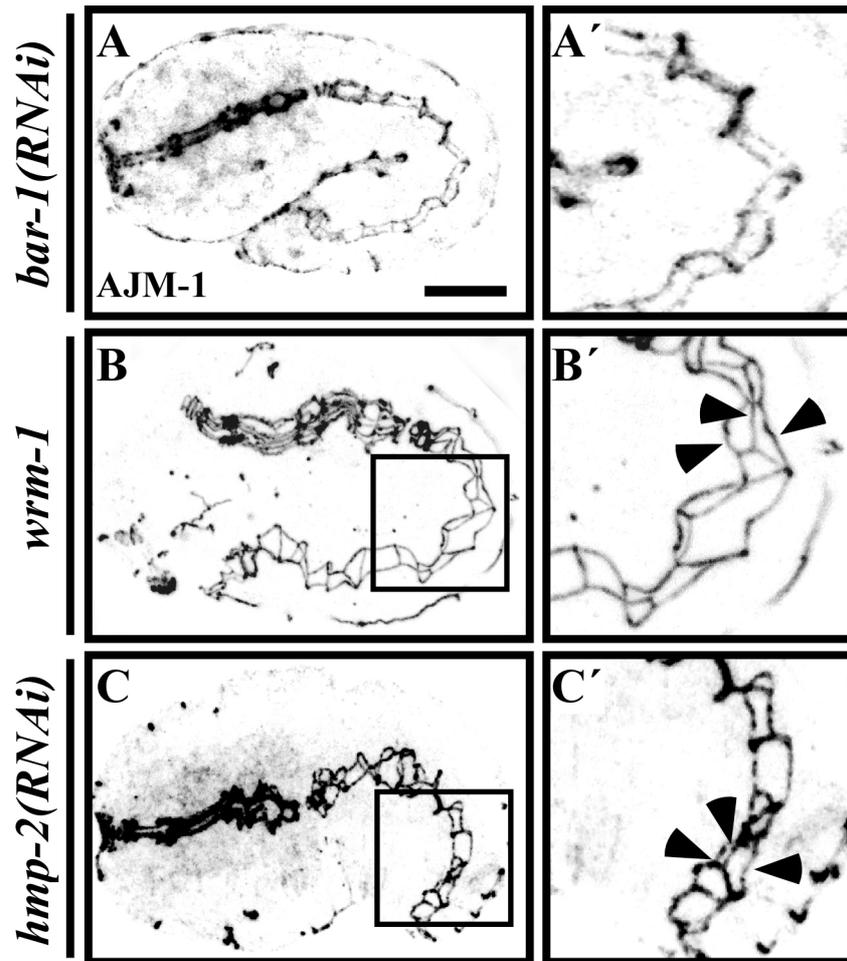


Abb. 28: Die β -Catenine HMP-2 und WRM-1 sind an der Musterbildung im Darmepithel beteiligt

(A-C) Antikörperfärbungen gegen den CeAJ-Marker AJM-1 an *bar-1(RNAi)* (A), *wrm-1* Mutanten (B) und an *hmp-2(RNAi)* (C). (A) Der Funktionsverlust von BAR-1 läßt keine Musterdefekte erkennen (n=30). (B) In *wrm-1* Mutanten treten Musterdefekte auf, die hauptsächlich den anterioren Bereich des Darmes betreffen (B, Auswahl; n=12). Hier werden Einheiten aus drei Zellen gebildet (B', Pfeilköpfe). (C) In *hmp-2(RNAi)* können Musterdefekte festgestellt werden, die auch den posterioren Bereich des Darmes betreffen (C, Auswahl). Auch hier tritt eine Formation einer Einheiten aus drei Zellen auf (C', Pfeilköpfe; n=40). Anterior ist links, dorsal ist oben. Eichstrich in (A) ist 10 μ m.

Mehrheitlich ist in *hmp-2(RNAi)*, anders als in *apr-1(RNAi)*, allerdings der Bereich der Interkalation betroffen. Das heißt dennoch, daß der Prozeß der Interkalation alleine nicht für den *hmp-2(RNAi)* Phänotyp verantwortlich zu sein scheint. In *wrm-1* Embryonen treten die Musterdefekte ebenso wie in *hmp-2(RNAi)* gehäuft in der Region auf, die charakteristisch für *vang-1* und den somit definierten Bereich der Zellinterkalation sind. Der Funktionsverlust des β -Catenin BAR-1 zeigt keinen Einfluss auf die Musterbildung (Abb. 28A).

Im Allgemeinen kann die identische Ausprägung des Verlustphänotypen als Hinweis auf eine Beteiligung im gleichen Signalweg oder Prozeß gesehen werden. Der Funktionsverlust der Proteine des PCP-Signalweges VANG-1, LIN-17 und DSH-2 (s. Abb. 21) führen zu identischen Musterdefekten, die womöglich Aufgrund einer beeinträchtigten Interkalation entstehen. Der Regulator von β -Catenin, das APR-1 (s. Abb. 27B), zeigt einen ähnlichen Phänotypen, allerdings sind hier mehrheitlich auch Bereiche betroffen, die nicht direkt im Zusammenhang mit der Interkalation stehen. Die β -Catenine HMP-2 und WRM-1 liefern vornehmlich einen Interkalationsphänotypen, zeigen aber in geringem Umfang auch Musterdefekte im posterioren Bereich des Darmes (s. Abb. 28B, C; s. Diskussion). Somit wird die unterschiedliche Ausprägung des Phänotyps bei einem Funktionsverlust der Komponenten des kanonischen Wingless-Signalweges (s. Abb. 27, 28) im Vergleich zu *dsh-2(RNAi)* (s. Abb. 21) als Hinweis bewertet, daß DSH-2 nicht im kanonischen Wingless-Signalweg, sondern zusammen mit VANG-1 und LIN-17 im PCP-Signalweg stehen könnte (s. Diskussion).

In *Drosophila* besitzt β -Catenin sowohl eine Funktion im Wingless-Signalweg, stellt aber auch eine Komponente des Cadherin-Catenin-Komplexes ("Cadherin-Catenin Complex", CCC) dar. In *C. elegans* konnten die beiden β -Catenine BAR-1 und WRM-1 dem Wingless-Signalweg zugeordnet werden (Korswagen, 2002). Das β -Catenin HMP-2 ist für die korrekte Funktion des Cadherin-Catenin-Komplexes essentiell (Costa et al., 1998). Der CCC besteht aus E-Cadherin (HMR-1), α -Catenin (HMP-1) und dem β -Catenin (HMP-2). Die Funktionalität dieses Komplexes ist beeinträchtigt, sobald eine Komponente in ihrer Funktion betroffen ist. Ob nun die durch *hmp-2* verursachten Defekte auf einen generellen Funktionsverlust des CCC zurückzuführen sind, wurden die weiteren Komponenten HMR-1 und HMP-1 jeweils auf Musterbildungsdefekte überprüft.

3.9 Der Cadherin-Catenin Komplex ist an der Musterbildung im Darmepithel beteiligt

Für den CCC konnte bisher in anderen Organismen eine Beteiligung an vielen Prozeßen der Morphogenese wie Zelladhäsion, Zellerkennung und Zellmigration,

oder der Organisation des Zytoskelets nachgewiesen werden (Übersichtsartikel Tepass et al., 2000; Goodwin und Yap, 2004). In *C. elegans* ist der CCC an dem Schluß der ventralen Hypodermis beteiligt, was im Prinzip das vollendende Ereignis einer morphogenetischen Zellmigration darstellt (Costa et al., 1998). Die Interkalation der Darmzellen stellt ein weiteres Migrationsereignis dar, an dem der CCC beteiligt sein könnte.

Wie bereits gezeigt, führt der Funktionsverlust des β -Catenins HMP-2 zu Musterbildungsdefekten (s. Abb. 28C). Da für HMP-2 bereits eine Funktion im CCC gezeigt wurde (Costa et al., 1998), soll überprüft werden, ob auch der Funktionsverlust der anderen Komponenten des CCC, HMR-1 und HMP-1, einen ähnlichen Phänotypen hervorrufen.

Die Komponenten HMR-1 und HMP-1 wurden über RNAi ausgeschaltet, und der Funktionsverlust führt tatsächlich jeweils zu Musterbildungsdefekten (Abb. 29). Die Musterdefekte betreffen vornehmlich die anteriore Region der Einheiten II bis V des Darmepithels, wie sie auch in *vang-1* Mutanten beobachtet werden. Zudem werden in *hmr-1(RNAi)* (Abb. 29A', Pfeilköpfe) und in *hmp-1(RNAi)* (Abb. 29B', Pfeilköpfe) Einheiten aus drei Zellen gebildet, sodaß die Beeinträchtigung der Interkalation auch hier als Ursache dieser Defekte vermutet werden kann. Allerdings können zudem auch Musterdefekte im posterioren Bereich des Darmes auftreten (Abb. 29B, Pfeilkopf; A''-C''), was nach dem bisherigen Erkenntnisstand nicht mit einer fehlgeleiteten Interkalation zu erklären ist, da die Interkalationsdefekte klar auf den anterioren Bereich begrenzt sind (s. Abschnitt 1.5). Möglicherweise spielen hier auch andere Aspekte z.B. der Zellanordnung bei der zytoplasmatischen Polarisierung eine Rolle. Eine weitere Möglichkeit ist, daß bei einem Funktionsverlust des CCC die Zelladhäsion soweit beeinträchtigt ist, daß einzelne Zellen zu einem bestimmten Zeitpunkt verschoben werden können. Zusammenfassend kann dennoch gesagt werden, daß das Darmepithel den CCC für die korrekte Musterbildung benötigt. Ein Funktionsverlust von jeweils nur einer Komponente des CCC führt zu Musterbildungsdefekten. Diese Defekte betreffen mehrheitlich den Bereich der Interkalation, es sind jedoch auch Bereiche im posterioren Bereich betroffen.

Zum anderen aber auch der CCC, welcher die Musterbildung noch zusätzlich im posterioren Bereich des Darmes beeinflusst (s.o.).

Um zu prüfen, ob VANG-1 einen Einfluss auf die Expression des CCC ausübt, und daher die Defekte im anterioren Darmbereich verursacht, wurden Antikörperfärbungen gegen die CCC-Komponente HMP-1 an *vang-1* Embryonen zum Zeitpunkt der Interkalation durchgeführt, und mit dem wildtypischen HMP-1 Muster verglichen (Abb. 30). Wildtypembryonen zeigen, wie bereits beschrieben, zu Beginn der Interkalation ein charakteristisches Muster, welches durch zwei sogenannte "gaps" gekennzeichnet ist (Abb. 30A, Pfeilköpfe; Leung et al., 1999). Diese "gaps" der HMP-1 Expression werden im Verlauf der Morphogenese geschlossen. Dabei interkaliert zunächst das posteriore Zellpaar (Abb. 30B, Pfeilköpfe), bis schließlich nach der Interkalation des anterioren Zellpaares ein über die Länge des Darmes ununterbrochenes Muster von HMP-1 zu erkennen ist (Abb. 30C).

Diese dynamische Expression von HMP-1 ist auch in *vang-1* Mutanten zu beobachten, und zeigt dabei keine Veränderung zum Wildtyp (Abb. 30D-F). Die "gaps" in der Expression von HMP-1 deuten auch in *vang-1* Mutanten auf den Bereich, in den die Zellen interkalieren werden (Abb. 30D, Pfeilköpfe). Nach t=360 Minuten sind die beiden "gaps", wie im Wildtyp, auch hier geschlossen (Abb. 30F).

Die Expression des CCC, sichtbar gemacht durch eine Färbung gegen das α -Catenin HMP-1, steht daher offensichtlich nicht unter der Kontrolle von VANG-1. Die in *vang-1* Mutanten auftretenden Musterdefekte im anterioren Bereich des Darmes sind somit nicht auf eine Fehlfunktion des CCC zurückzuführen. Es kann hierbei allerdings nicht ausgeschlossen werden, daß das HMP-1 Expressionsmuster von dem des HMR-1 oder HMP-2 abweichen könnte. Dazu haben neuere Studien gezeigt, daß α -Catenin auch unabhängig von den beiden anderen Komponenten des CCC, β -Catenin und E-Cadherin, wirken könnte (Drees et al., 2005; Yamada et al., 2005).

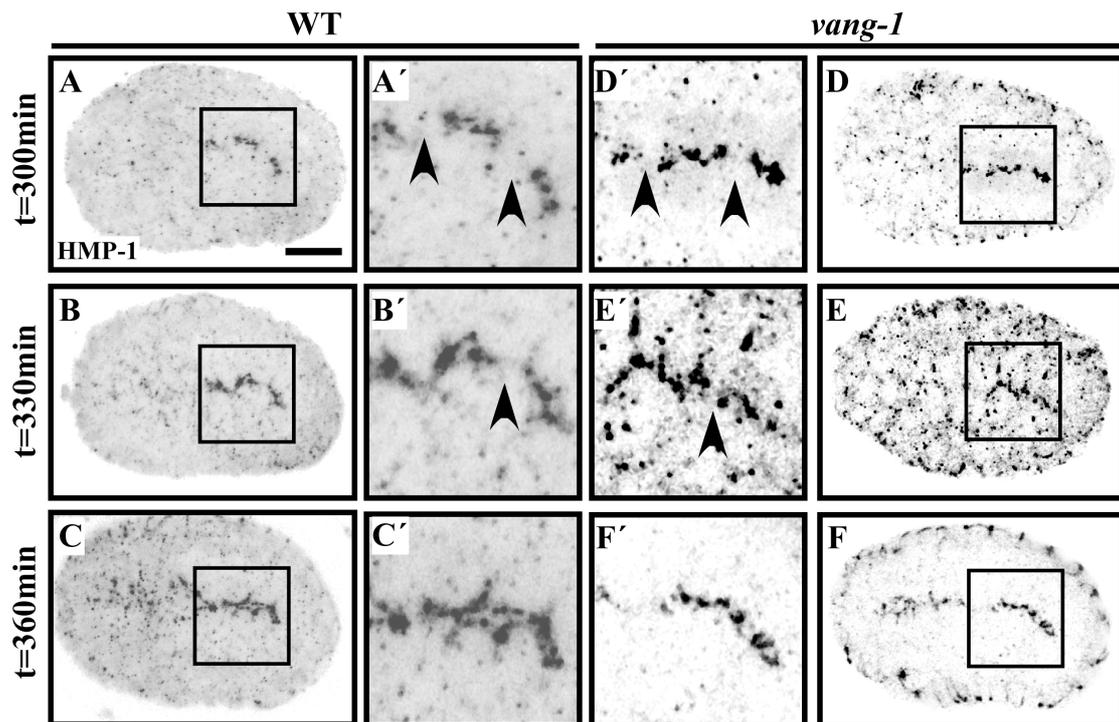


Abb. 30: Das Expressionsmuster von HMP-1 im Darmepithel während der Interkalation ist in *vang-1* Embryonen nicht beeinträchtigt

(A-F) Antikörperfärbungen gegen das α -Catenin HMP-1 am Wildtyp (A-C) und an *vang-1* Embryonen (D-F). (A, D) Zum Zeitpunkt $t=300\text{min}$ zeigt das Expressionsmuster von HMP-1 zwei "gaps" (A', Pfeilköpfe; D', Pfeilköpfe). (B, E) Zum Zeitpunkt $t=330\text{min}$ kann nur eine "gap" in der HMP-1 Expression beobachtet werden (B', Pfeilkopf; E', Pfeilkopf). (C, F) Nach vollendeter Interkalation zum Zeitpunkt $t=360\text{min}$ sind keine "gaps" in der HMP-1 Expression nachweisbar (C'; F'). Anterior ist links, dorsal ist oben. Eichstrich in (A) ist $10\mu\text{m}$.

Beide Systeme, auf der einen Seite der PCP-Signalweg über VANG-1, auf der anderen Seite der CCC, regulieren offensichtlich unabhängig voneinander die Interkalation der Darmzellen, wobei der CCC auch die posteriore Musterbildung des Darmepithels beeinflusst. Hierbei scheint der Wirkungsort dieser beiden Systeme unterschiedlich zu sein: Der CCC wird in den Darmzellen in der CeAJ benötigt, wohingegen wie im nächsten Abschnitt 3.10 gezeigt wird, der putative PCP-Signalweg über VANG-1 an dem lateralen Kortex der Zelle wirken könnte.

Der allgemeine Vorgang der Morphogenese ist in vielerlei Hinsicht komplex und unterliegt offensichtlich der Kontrolle durch verschiedenen Signalwege. Der Wingless-Signalweg ist in vielen Systemen an morphogenetischen Prozessen involviert, z.B. die Migration der Neuralleistenzellen in *Xenopus* (De Calisto et al., 2005), oder die Induktion der Gliedmaßen in *Gallus* (Kawakami et al., 2000).

Interessanterweise scheint es einen direkten Bezug von Wingless zu einem weiteren morphogenetischen Signalweg, dem Fibroblasten Wachstumsfaktor (“fibroblast growth factor”, FGF)-Signalweg, zu geben. So konnte unter anderem gezeigt werden, daß durch ein Zusammenspiel von Wingless- und FGF-Signalweg in Säugetieren die Region positioniert wird, in der einige Sinneszellen, wie z.B. Riechzellen, entstehen (Litsiou et al., 2005). Der FGF-Signalweg kann zudem direkt durch den Wingless-Signalweg induziert werden (Kawakami et al., 2001). Um nun eine mögliche Beteiligung des FGF-Signalweges an der Musterbildung von *C. elegans* nachzuweisen, sind im folgenden Abschnitt ausgewählte Komponenten dieses Signalweges untersucht worden.

3.10 Der Fibroblasten Wachstumsfaktor-Rezeptor steuert ligandenunabhängig die Musterbildung im Darm

Der FGF-Signalweg vermittelt seine Funktion über den FGF-Rezeptor (FGFR) und seine Liganden, den FGFs (s. Einleitung). In *C. elegans* existiert ein FGFR, EGL-15, und zwei Liganden, EGL-17 und LET-756 (Birnbaum et al., 2005). Um zunächst zu prüfen, ob der FGFR EGL-15 einen Einfluss auf die Musterbildung im Darm und die VANG-1 Lokalisation in den Darmzellen besitzt, wurden *egl-15* Embryonen auf Immunfluoreszenzebene analysiert.

In *egl-15* Embryonen sind Musterdefekte zu beobachten, und die Darmzellen bilden im anterioren Bereich Einheiten, die aus drei Zellen bestehen (Abb. 31C', Sternchen). Hierbei tritt die für *vang-1* bereits charakterisierte Variabilität in der Position dieser Musterdefekte auf, und beschränkt sich dabei hauptsächlich auf die Region der Einheiten int II bis int V, wobei in geringem Umfang auch int VI betroffen ist (Abb. 31C''). Insgesamt bilden *egl-15* Embryonen dennoch eine Phänokopie der schon in *vang-1* beobachteten Defekte. Eine Ausprägung des gleichen Phänotyps kann als Hinweis auf eine direkte genetische Interaktion interpretiert werden. Ob nun ein direkter Einfluss zwischen EGL-15 und VANG-1 bestehen könnte, wurde die Lokalisation von VANG-1 in *egl-15* Embryonen untersucht.

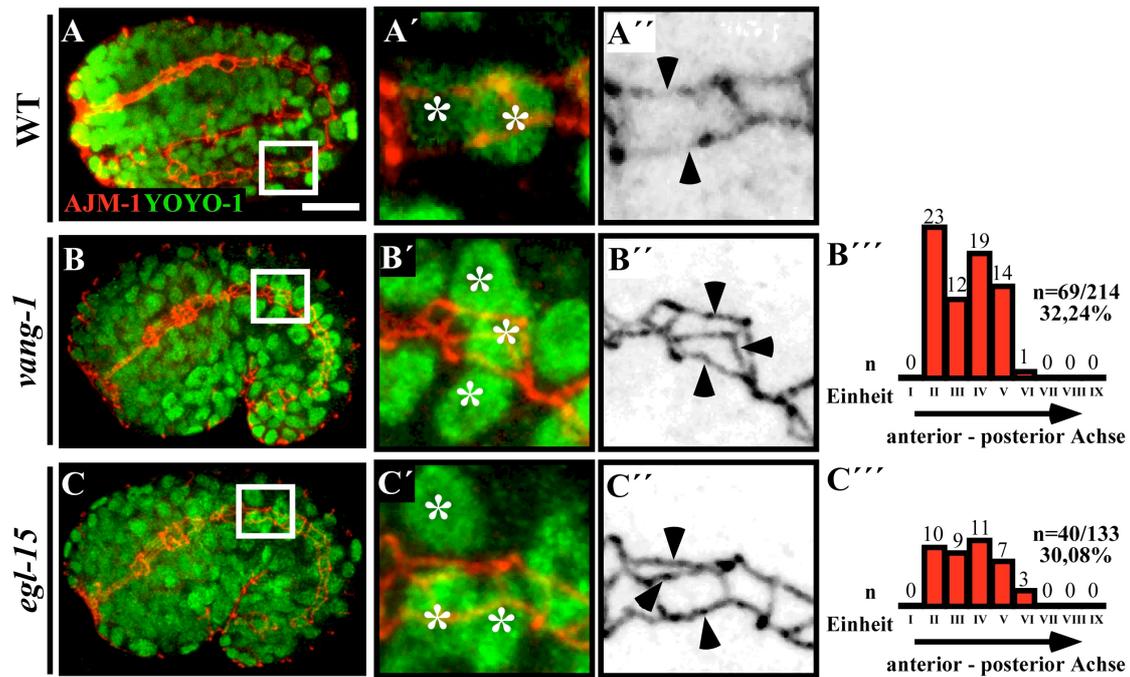


Abb. 31: Der Funktionsverlust des Fibroblasten Wachstumsfaktor Rezeptors EGL-15 reproduziert den *vang-1* Phänotyp

(A-C) Antikörperfärbungen gegen den CeAJ-Marker AJM-1 (in rot) und den Kernmarker YoYo-1 (in grün) am Wildtyp (A), an *vang-1* (B) und an *egl-15* Embryonen (C). (A) Der Wildtyp bildet die Darmscheinheiten II bis IX aus jeweils zwei Zellen (A', Sternchen), die zusammen zwei CeAJ ausbilden (A'', Pfeilköpfe). (B) In *vang-1* Embryonen ist die Ausbildung von Einheiten bestehend aus drei Zellen (B', Sternchen) mit dem Aufbau von drei CeAJ zu erkennen (B'', Pfeilköpfe). Betroffen hiervon ist der Interkalationsbereich mit den Einheiten II bis V (B'''). (C) In *egl-15* Mutanten werden Einheiten aus drei Zellen gebildet (C', Sternchen), welches durch den Aufbau von drei CeAJ reflektiert wird (C'', Pfeilköpfe). Von diesen Musterdefekten ist mit 92,5% nahezu vollständig der Interkalationsbereich (Einheit II bis V) betroffen (C'''). Anterior ist links, dorsal ist oben. Eichstrich in (A) ist 10µm.

Zunächst zeigt sich in frühen Morphogenesestadien (Bohnestadium) von *egl-15* Mutanten keine Veränderung in der Lokalisation von VANG-1 im Vergleich zum Wildtyp (Daten nicht gezeigt). Im Kommastadium ist die subzelluläre Lokalisation von VANG-1 in *egl-15* Mutanten hingegen verändert (Abb. 32B). Während im Wildtyp Embryo VANG-1 vornehmlich lateral lokalisiert (Abb. 32A', Pfeilkopf), verteilt sich VANG-1 in *egl-15* Embryonen des Kommastadiums auch entlang der CeAJ (Abb. 32B', Pfeil). Im Wildtyp gelangt VANG-1 erst später in die CeAJ (Abb. 32B). In *egl-15* Embryonen gelangt VANG-1 also zu einem vorgezogenem Zeitpunkt in die CeAJ. EGL-15 scheint also die subzelluläre Lokalisation von VANG-1 zu regulieren, indem es dafür sorgt, daß VANG-1 in der frühen Morphogenese vornehmlich lateral lokalisiert.

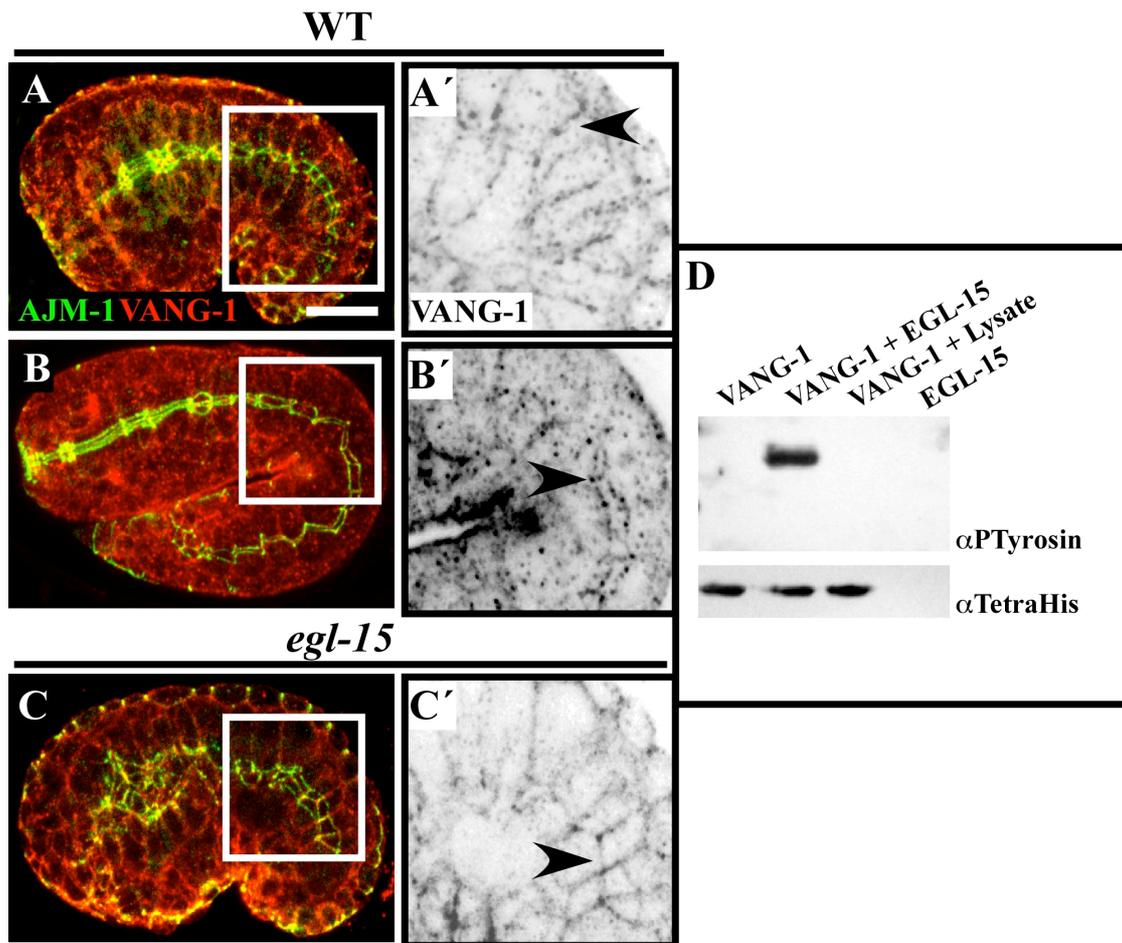


Abb. 32: EGL-15 beeinflusst die Lokalisation von VANG-1 und phosphoryliert VANG-1 *in vitro*

(A-C) Antikörperfärbungen gegen den CeAJ-Marker AJM-1 (in grün) und VANG-1 (in rot). (D) Immunoblot gegen Phospho-Tyrosin sowie Tetra-His als Inputkontrolle. (A) Im Wildtyp lokalisiert VANG-1 im Kommastadium lateral (A', Pfeilkopf). (B) Erst im Kaulquappstadium ist VANG-1 in der CeAJ detektierbar (B', Pfeilkopf). (C) In *egl-15* Embryonen ist VANG-1 bereits im Kommastadium in der CeAJ nachweisbar (B', Pfeil). (D) Die Kinasedomäne von EGL-15 phosphoryliert den C-terminus von VANG-1 in einem *in vitro* Kinase Assay (s. M&M). Anterior ist links, dorsal ist oben. Eichstrich in (A) ist 10 μ m.

Wie bereits in Abschnitt 3.3 gezeigt, wird die subzelluläre Lokalisation von VANG-1 durch seinen intrazellulären C-terminus reguliert. Das C-terminale PDZ-Bindemotiv spielt hierbei eine Rolle bei der Rekrutierung an den Kortex (Abb. 12C), und der verbleibende intrazelluläre Teil von VANG-1 ist an der zeitlichen Kontrolle der subzellulären Lokalisation beteiligt (Abb. 12D). Diese Beobachtung läßt sich mit dem oben beschriebenen Verhalten von VANG-1 in *egl-15* Mutanten reproduzieren. Somit besteht die Möglichkeit, daß EGL-15 die subzelluläre Lokalisation von VANG-1 direkt beeinflusst. Dieses geschieht Möglicherweise über Sequenzen im C-terminus

von VANG-1, die von EGL-15 für die korrekte zeitliche und räumliche Kontrolle der Lokalisation benötigt werden.

Für EGL-15 konnte dabei bereits dargestellt werden, daß es über eine Phosphorylierung an der Kontrolle der subzellulären Lokalisation des LCAM Homologen LAD-1 im Darm von *C. elegans* beteiligt ist. LAD-1 kann als unphosphorylierte und phosphorylierte Form vorliegen, und in *egl-15* Embryonen ist phosphoryliertes LAD-1 nicht mehr nachweisbar (Chen et al., 2001). Eine computergestützte Analyse der Proteinsequenz von VANG-1 zeigt, daß der intrazelluläre Bereich von VANG-1 das Motiv –RIGGY- enthält, welches eine Aminosäurekomposition ähnlich dem putativen Phosphorylierungsmotiv –FIGQY- in LAD-1 aufweist. Um zu prüfen, ob VANG-1 durch EGL-15 phosphoryliert wird, wurde ein *in vitro* Kinase Assay durchgeführt (s. M&M). Dabei kann eine Phosphorylierung des VANG-1 C-Terminus durch die Tyrosinkinase-Domäne von EGL-15 nachgewiesen werden (Abb. 32C). Hierbei könnte die räumliche Nähe beider Proteine ausreichen, um eine Phosphorylierung zu erreichen, da der C-Terminus von VANG-1 und die Tyrosinkinase-Domäne von EGL-15 in einer Hefe 2-Hybrid Analyse physikalisch nicht interagieren (Daten nicht gezeigt). Wenn sich diese *in vitro* Daten auf *C. elegans* selbst übertragen lassen, kann eine Regulation der subzellulären Lokalisation von VANG-1 durch EGL-15 angenommen werden, die auf direkter Phosphorylierung beruht. EGL-15 läßt sich mit Antikörperfärbungen embryonal nicht nachweisen (Szewczyk et al., 2003), und postembryonal kann keine eindeutige subzelluläre Lokalisation bestimmt werden (Huang et al., 2004), sodaß über die Lokalisation von EGL-15 keine weiteren Hinweise auf eine mögliche direkte Regulation von VANG-1 durch EGL-15 ermittelt werden können.

Um zu testen, ob die Liganden von EGL-15 die Lokalisation von VANG-1 beeinflussen, wurden Mutanten von *egl-17* und *let-756* in Bezug auf VANG-1 untersucht. In *egl-17* Mutanten werden die ints II bis IX, wie im Wildtyp, jeweils zwei Zellen gebildet (Abb. 33A', Pfeilköpfe). Die subzelluläre VANG-1 Lokalisation ist in frühen Morphogenesestadien nicht beeinträchtigt. Im Komma-/Kaulquappstadium lokalisiert VANG-1 am lateralen Kortex der Darmzellen (Abb. 24A'', Pfeilkopf). In der späten Morphogenese lokalisiert VANG-1 am lateralen Kortex

(Abb. 24B'', Pfeilkopf) und in der CeAJ (Abb. 24B'', Pfeil), wobei die Verteilung von VANG-1 in der CeAJ im Vergleich zum Wildtyp (vgl. Abb. 10F) stärker punktiert erscheint. EGL-17 beeinflusst also die Musterbildung im Darmepithel und die frühe laterale Verteilung von VANG-1 nicht.

In *let-756* Embryonen treten ebenso keine Musterdefekte auf (Abb. 33C', Pfeilköpfe), und die VANG-1 Lokalisation verhält sich wildtypisch (Abb. 24C, D). In der frühen Morphogenese ist VANG-1 in *let-756* Embryonen am lateralen Kortex verteilt (Abb. 33C'', Pfeilkopf), und in der späteren Morphogenese lokalisiert VANG-1 in der CeAJ (Abb. 33D'', Pfeil). Diese Ergebnisse lassen den Schluß zu, daß der FGFR EGL-15 die Musterbildung im Darmepithel unabhängig von den FGF-Liganden EGL-17 und LET-756 beeinflusst. Die frühe Lokalisation von VANG-1 wird ebenfalls ligandenunabhängig durch EGL-15 kontrolliert. Der FGF EGL-17 scheint einen leichten Einfluss auf die Verteilung von VANG-1 in der CeAJ in der späteren Morphogenese zu besitzen.

Aufgrund der Auswertung von genetischen Screens ist der EGL-15 Signalweg relativ gut untersucht worden (Übersichtsartikel Borland et al., 2001). Aus diesen Screens konnten mehrere Proteine identifiziert werden, die EGL-15 regulieren können. Ein negativer Regulator von EGL-15 ist die Phosphatase CLR-1 (Kokel et al., 1998). Der Funktionsverlust von *clr-1* führt zu einer gesteigerten Aktivität von EGL-15 (Huang und Stern, 2004). Eine Analyse von *clr-1* erschien somit im Zusammenhang auf die VANG-1 Lokalisation und die Musterbildung im Darmepithel sinnvoll. Unter der Annahme, daß EGL-15 über die Phosphorylierung für die laterale Lokalisation von VANG-1 verantwortlich ist, könnte in *clr-1* Mutanten aufgrund des nun hyperaktivierten EGL-15 vermehrt phosphoryliertes VANG-1 in lateraler Position vorliegen. In *clr-1* Mutanten treten jedoch keine Musterbildungsdefekte des Darmepithels auf (n=100). Die frühe laterale Lokalisation von VANG-1 ist nicht beeinflusst (Abb. 34A', Pfeilkopf; vgl. Abb.2C'), und auch die späte Lokalisation von VANG-1 in der CeAJ weist in *clr-1* Embryonen keine Abweichungen zum Wildtyp auf (Abb. 34B', Pfeilkopf). CLR-1 zeigt somit keine Beteiligung an der Musterbildung im Darmepithel. Die Lokalisation von VANG-1 wird in den Darmzellen nicht durch CLR-1 reguliert.

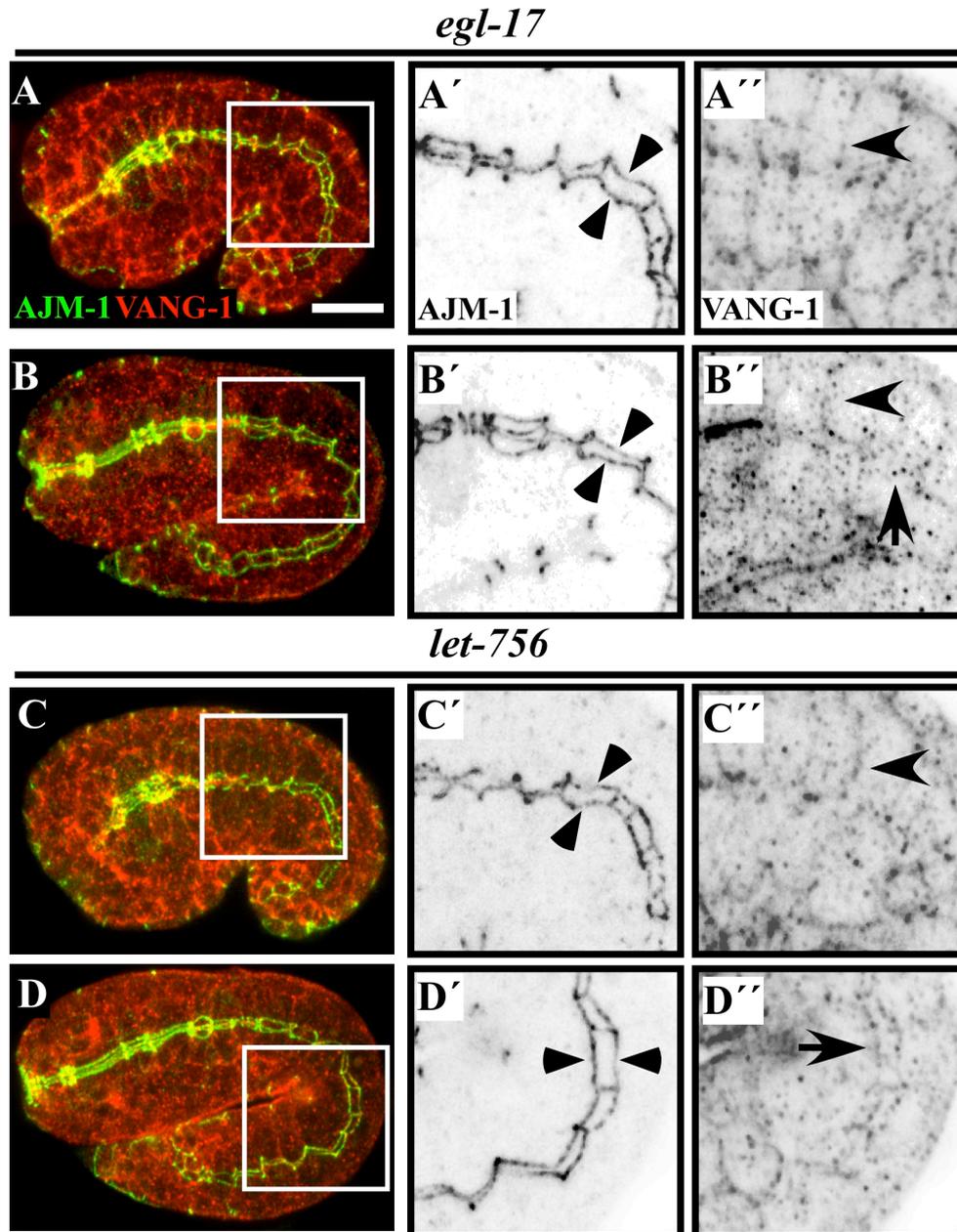


Abb. 33: EGL-17 und LET-756 zeigen keine Beteiligung an der Musterbildung des Darmepithels

(A-D) Antikörperfärbungen gegen den CeAJ-Marker AJM-1 (in grün) und VANG-1 (in rot). (A) Im Kommastadium von *egl-17* Embryonen sind keine Musterdefekte zu erkennen (A', Pfeilköpfe; n=50) und VANG-1 ist, wie im Wildtyp, am lateralen Kortex der Darmzellen nachweisbar (A'', Pfeilkopf). (B) Im Kaulquappestadium von *egl-17* Embryonen lokalisiert VANG-1, wie im Wildtyp, am lateralen Kortex (B'', Pfeilkopf) und auch in der CeAJ (B'', Pfeil). Allerdings erscheint die Lokalisation von VANG-1 in der CeAJ stärker punktiert als im Wildtyp. (C) In *let-756* Embryonen sind keine Musterdefekte nachweisbar (C', Pfeilköpfe; n=50), und VANG-1 lokalisiert, wie im Wildtyp, in diesem Stadium am lateralen Kortex (C'', Pfeilkopf). Im Pflaumestadium lokalisiert VANG-1 in *let-756* Embryonen in der CeAJ (D'', Pfeil). Anterior ist links, dorsal ist oben. Eichstrich in (A) ist 10 μ m.

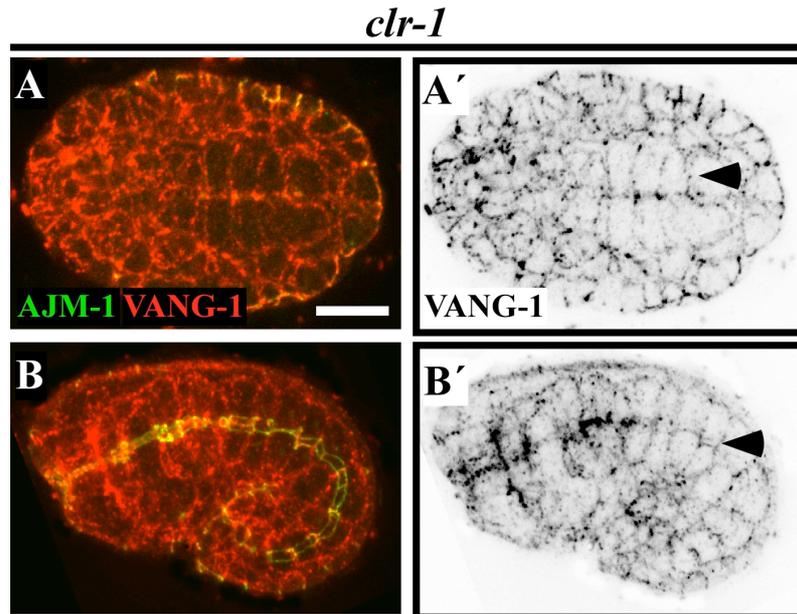


Abb. 34: In *clr-1* Embryonen ist die VANG-1 Lokalisation nicht beeinflusst
 (A,B) Antikörperfärbungen gegen den CeAJ-Marker AJM-1 (in grün) und VANG-1 (in rot). (A) Im Bohnestadium lokalisiert VANG-1 wildtypisch am lateralen Kortex der Darmzellen (A', Pfeilkopf). (B) In der späteren Morphogenese (Kaulquappstadium) ist VANG-1, wie im Wildtyp, auch entlang der CeAJ verteilt (B', Pfeilkopf). Anterior ist links, dorsal ist oben. Eichstrich in (A) ist 10 μ m.

Eine weitere regulatorische Komponente des FGF-Signalweges in *C. elegans* stellt die Phosphatase PTP-3 dar. PTP-3 ist ein Interaktionspartner von CLR-1 (Harrington et al., 2002), und ein Vertebraten PTP-3 Homolog aktiviert über Dephosphorylierung die Kinase Src (Übersichtsartikel Roskoski 2005). Src selbst ist in zahlreichen Signalwegen involviert, die u.a. Zellmigrationen steuern (Li et al., 2006). Um eine Beteiligung von PTP-3 an der Musterbildung nachzuweisen, wurde das Darmepithel von *ptp-3* Embryonen auf Immunfluoreszenzebene analysiert.

Tatsächlich zeigen sich in *ptp-3* Embryonen Musterbildungsdefekte, die in Position und Variabilität mit denen von *vang-1* identisch sind (Abb. 35). Auch hier werden Darmeinheiten aus drei Zellen gebildet, was durch die Ausprägung von drei apikalen Kontakten sichtbar wird (Abb. 35B', Pfeilköpfe). Die Defekte betreffen nur den anterioren Darmbereich, der durch die Interkalation gestaltet wird (Abb. 35C, vgl. Abb. 18F). Die Lokalisation von VANG-1 ist früh lateral zu erkennen, erscheint insgesamt jedoch schwächer als im Wildtyp (Abb. 35A'', Pfeilkopf; vgl. Abb. 10D). In späten Morphogenesestadien ist VANG-1 nur ansatzweise und stark punktiert in der CeAJ nachzuweisen (Abb. 35B'', Pfeilkopf). Der Funktionsverlust von PTP-3

führt also zu Musterdefekten im Darmepithel, die als Interkalationsdefekte interpretiert werden und eine Phänokopie von *vang-1* darstellen. Wie bereits vermutet, könnte VANG-1 im Kommastadium am lateralen Kortex benötigt werden, um die Interkalation zu regulieren. Eine Ursache der Interkalationsdefekte in *ptp-3* Embryonen könnte also in der schwächeren lateralen VANG-1 Lokalisation im Kommastadium liegen (s. Diskussion).

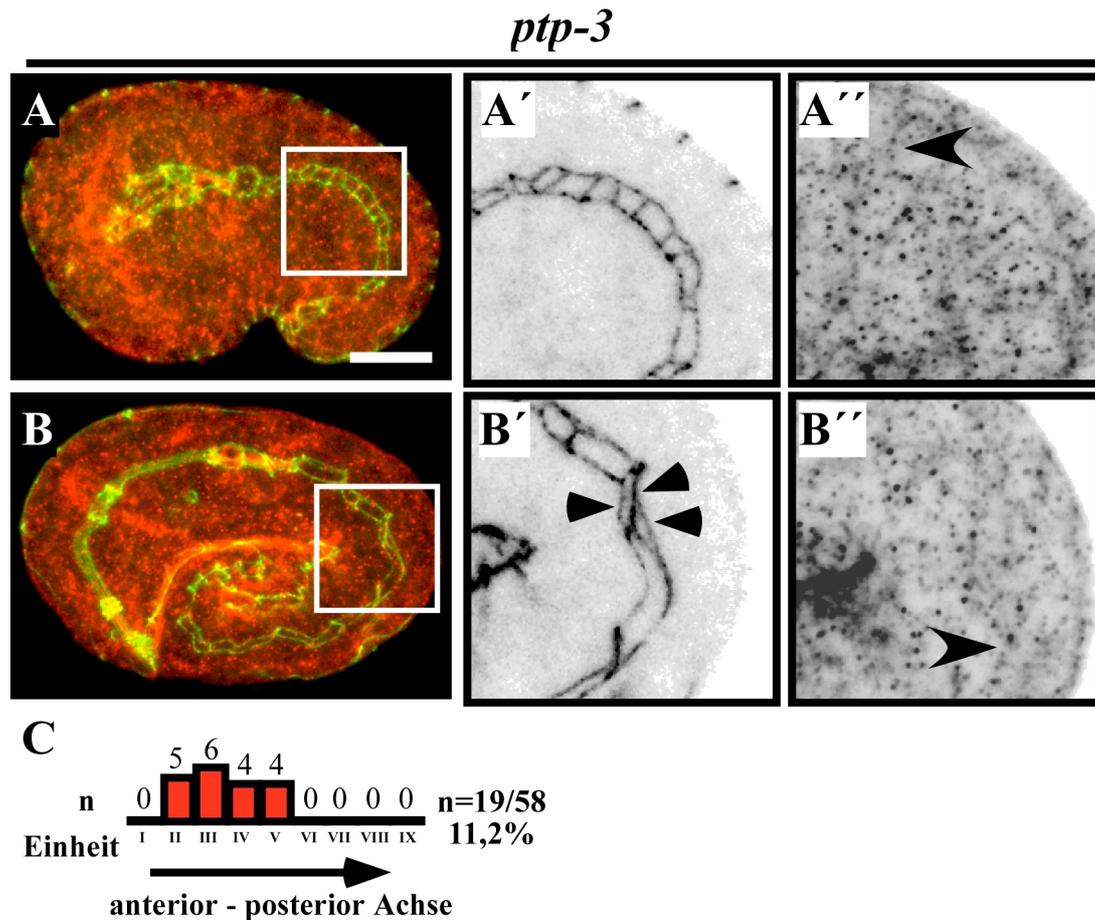


Abb. 35: In *ptp-3* Embryonen treten Musterbildungsdefekte im Darmepithel auf (A,B) Antikörperfärbungen gegen den CeAJ-Marker AJM-1 (in grün) und VANG-1 (in rot) an *ptp-3* Embryonen. (A) Im Kommastadium lokalisiert VANG-1 schwach lateral (A'', Pfeilkopf). (B) Es werden ints bestehend aus drei Zellen gebildet (B', Pfeilköpfe). Die späte Lokalisation von VANG-1 in der CeAJ ist nur schwach und stark punktiert ausgeprägt (B'', Pfeilkopf). (C) Die Musterdefekte betreffen den Interkalationsbereich, wobei dieser Phänotyp nur zu 11,2% auftritt (C). Anterior ist links, dorsal ist oben. Eichstrich in (A) ist 10 μ m.

Um den Einfluss des FGF-Signalweges darzustellen, wurden weitere Signalwege gesucht, die direkt von dem FGF-Signalweg reguliert werden können, oder ebenfalls an der Regulierung morphogenetischer Prozesse beteiligt sind. In diesem Kontext

wurde der Blick auf den Notch/Delta System gerichtet. Dieses System kann von dem FGF-Signalweg positiv reguliert werden (Akai et al., 2005). Der Notch/Delta Signalweg ist an der Musterbildung und Zellschicksalsentscheidung in vielen Systemen beteiligt (Übersichtsartikel Lai, 2004). Die Festlegung der Identität der Vulvavorläuferzellen in *C. elegans* z.B. benötigt die Funktion von Notch/Delta, welches auf dem Prinzip der Lateralinhibition beruht (Sternberg, 1988). Notch/Delta wird zudem benötigt, um eine links-rechts Asymmetrie im Darm von *C. elegans* zu erzeugen (Hermann et al., 2000).

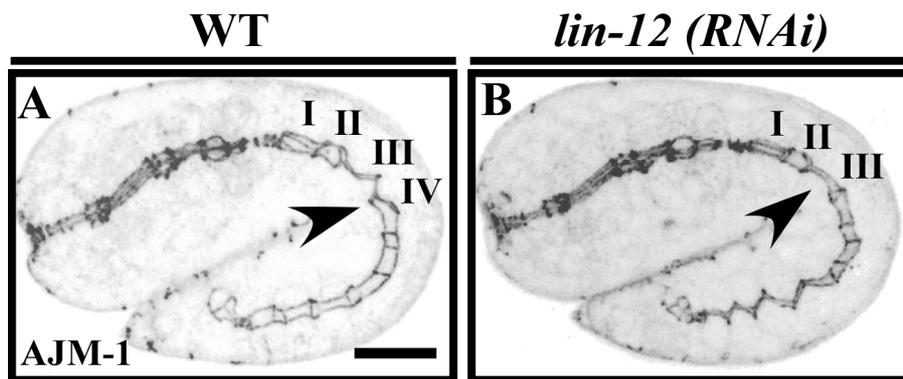


Abb. 36: LIN-12 ist nicht an der Musterbildung durch Interkalation im Darmepithel beteiligt

(A,B) Antikörperfärbungen gegen den CeAJ-Marker AJM-1 am Wildtyp (A) und an *lin-12(RNAi)* Embryonen (B). (A) Die Rotation der Darmzellen ist im Wildtyp ab dem vierten Int zu erkennen (A, Pfeilkopf). (B) In *lin-12(RNAi)* Embryonen kann die Rotation schon im dritten Int beobachtet werden (Pfeilkopf; n=25). Es treten hierbei keine *vang-1* ähnlichen Musterdefekte im Darm auf (n=50). Anterior ist links, dorsal ist oben. Eichstrich in (A) ist 10µm.

Um zu prüfen, ob die Interkalationsdefekte im Darmepithel auf eine Fehlregulation des Notch/Delta Systems zurückzuführen sind, wurde der Funktionsverlust von Notch (LIN-12) analysiert (Abb. 26). In *lin-12(RNAi)* Embryonen zeigen sich keine Defekte in Bezug auf die Interkalation. Die Anordnung der Darmzellen zu Ints bestehend aus jeweils zwei Zellen ist in *lin-12(RNAi)* deutlich erkennbar (Abb. 36B). Die in der Literatur bereits beschriebene Veränderung in der Rotation der Darmzellen ist allerdings zu erkennen (Abb. 36B, Pfeilkopf; Hermann et al., 2000). Die Rotation der Darmzellen setzt zeitlich nach dem Interkalationsprozeß an und wird vermutlich postembryonal benötigt, um das Gonadenwachstum zu unterstützen. Im Wildtyp ist die Rotation der Darmzellen ab dem Int IV nachweisbar, wohingegen in *lin-12(RNAi)* die Rotation zufällig einsetzt, wie hier gezeigt schon ab Int III (Abb. 36B, Pfeilkopf).

Das Notch/Delta System über LIN-12 ist also nicht an der Interkalation und der hieraus resultierenden Musterbildung beteiligt, sondern zeigt offenbar nur eine spätere Funktion bei der Rotation der Darmzellen.

Eine Eigenschaft von FGF und FGFR ist die Affinität zu Heparansulfat Proteoglykanen (HSPGs) und das Glykosaminoglycan Heparin, welche Bestandteile der extrazellulären Matrix (ECM, "extracellular matrix") darstellen (Jeanny et al., 1987; Übersichtsartikel Burgess und Maciag, 1989). In *Drosophila* konnte gezeigt werden, daß eine unterbrochene Biosynthese von bestimmten ECM Komponenten zu einem ähnlichen Phänotyp führt wie der, der durch den jeweiligen Funktionsverlust der beiden FGFR *Heartless* und *Breathless* verursacht wird (Lin et al., 1999).

Somit könnte auch in *C. elegans* ein möglicher Zusammenhang zwischen dem FGFR EGL-15 und der ECM bestehen. Im folgenden Abschnitt werden daher ausgewählte Bestandteile und Regulatoren der ECM auf Musterbildungsdefekte im Darmepithel überprüft.

3.11 Die Histon-Deacetylase HDA-1 ist an der Musterbildung im Darm beteiligt

Neben der oben beschriebenen Korrelation von FGF und ECM wird zudem während der Gastrulation bei *Xenopus* die ECM von planaren Zellpolaritätsgenen reguliert (Goto et al., 2005). Hierbei treten Wechselwirkungen auf, die über die ECM-Komponente Fibronectin ablaufen und letztendlich die Interkalation regulieren. Dieses System weist morphologische Ähnlichkeiten zum *C. elegans* Darm auf, z.B. werden die interkalierenden Zellen in beiden Systemen von anderen Epithelschichten umgeben. In *C. elegans* sind hierbei die Darmzellen zum Zeitpunkt der Interkalation von Muskelvorläuferzellen flankiert (Hall und Hedgecock, 1991). Ob nun die ECM einen Einfluss auf die Musterbildung des Darmepithels hat, soll im Folgenden analysiert werden.

Das Gen *hda-1* ist maßgeblich an der Regulation der ECM in *C. elegans* beteiligt (Whetstone et al., 2005). HDA-1 reprimiert die Transkription über die Deacetylierung von Histonen. Die Expression der Collagene vom Typ IV, die als Liganden für

Integrine benötigt werden, kann direkt durch HDA-1 reguliert werden (Whetstone et al., 2005; Hall et al., 1990). HDA-1 stellt aufgrund seiner fast schon universellen Rolle in der Regulation der ECM-Komposition einen guten Kandidaten dar, um eine Analyse durchzuführen. Zudem ist HDA-1, so wie VANG-1 und EGL-15, ein Interaktionspartner von DLG-1 im Hefe 2-Hybrid (C. Segbert/O. Bossinger, Düsseldorf; pers. Mitteilung).

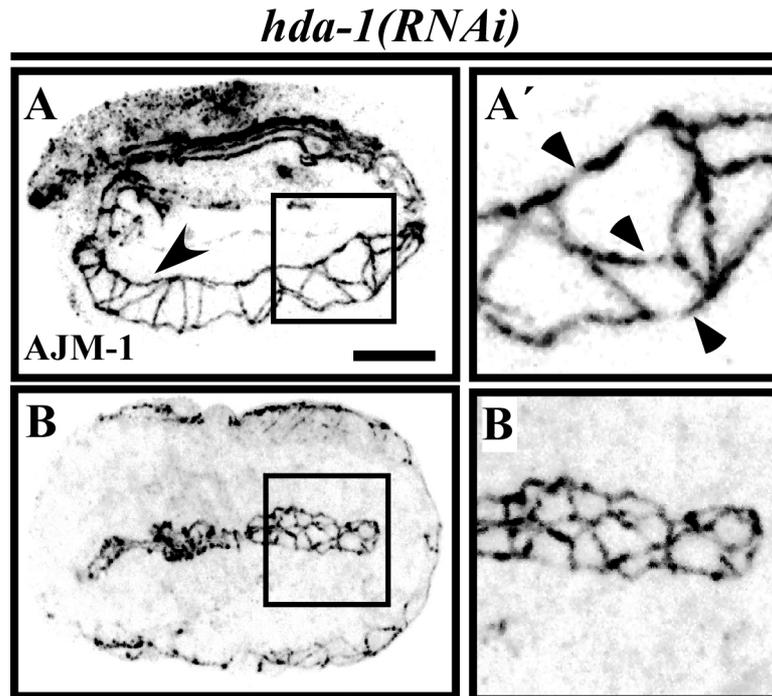


Abb. 37: Der Funktionsverlust von HDA-1 führt zu Musterdefekte im Darmepithel

(A,B) Antikörperfärbungen gegen den CeAJ-Marker AJM-1 an *hda-1(RNAi)* Embryonen. (A) Im anterioren Bereich sind Musterdefekte zu erkennen. Es werden Einheiten aus drei Zellen gebildet (A', Pfeilköpfe). Musterdefekte betreffen auch den posterioren Darmbereich (A, Pfeilkopf). Dieser *hda-1* Phänotyp tritt zu 7,8% auf (n=13/166). (B) Zu 81,9% führt *hda-1(RNAi)* zur Ausprägung einer zystenartigen Anlagerung der Darmzellen (n=136/166). Anterior ist links, dorsal ist oben. Eichstrich in (A) ist 10 μ m.

Der Funktionsverlust von HDA-1 führt hauptsächlich zu einem embryonalen Arrest im Bohnestadium (starker Phänotyp). Der starke Phänotyp zeigt Ähnlichkeiten zum *gsk-3(RNAi)* Phänotyp (Abb. 37B; vgl. Abb. 27). Die Zellen sind auch hier zu einer Art Zyste angelagert, wodurch der Darm stark verkürzt ist. Einigen *hda-1(RNAi)* Embryonen gelingt es, weiter in die Morphogenese zu gelangen (schwacher Phänotyp). Der schwache Phänotyp ähnelt zunächst dem Phänotyp von *vang-1* (Abb. 37A). Es sind Musterbildungsdefekte zu erkennen, und es werden Einheiten aus drei

Zellen gebildet (A', Pfeilköpfe). Allerdings treten auch im posterioren Bereich des Darmes Defekte auf (Abb. 37A, Pfeilkopf), also auch außerhalb der Region, in der Interkalation stattfindet. Somit wird der *vang-1* Phänotyp durch den Funktionsverlust von HDA-1 nur teilweise reproduziert.

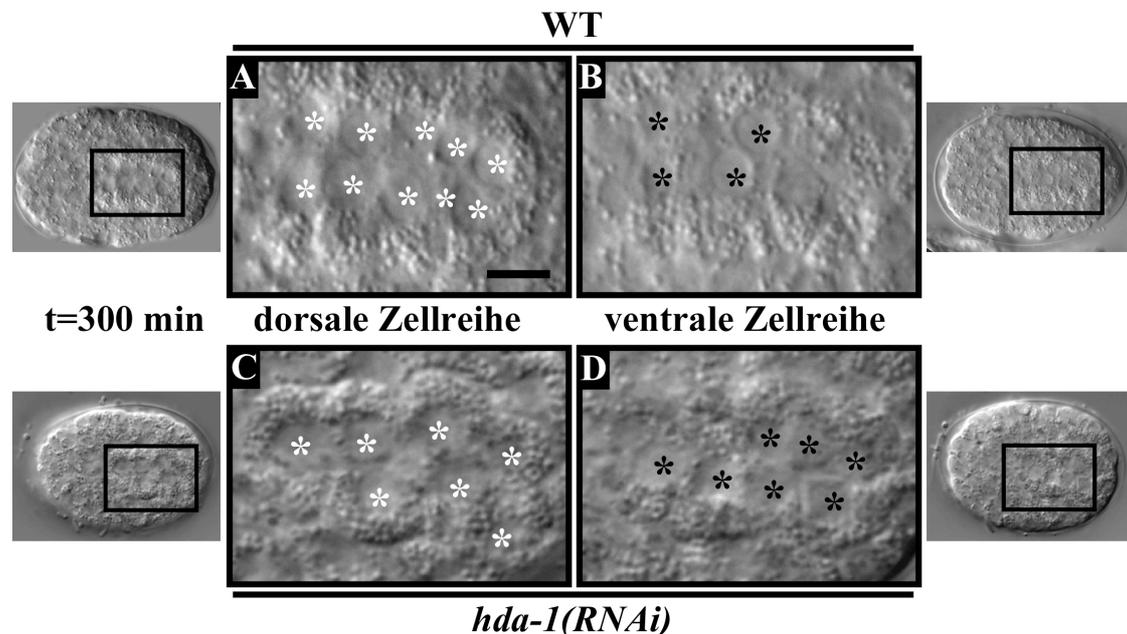


Abb. 38: Die Anordnung der Darmzellen zum Zeitpunkt der zytoplasmatische Polarisierung ist in *hda-1(RNAi)* Embryonen beeinträchtigt

(A-D) DIK-Aufnahmen zum Zeitpunkt der zytoplasmatischen Polarisierung am Wildtyp (A,B) und an *hda-1(RNAi)* Embryonen (C,D). (A) In der dorsalen Ebene sind zehn Zellen jeweils paarig angeordnet (Sternchen). (B) Vier Zellen befinden sich in der ventralen Ebene (Sternchen). (C,D) In *hda-1(RNAi)* Embryonen ist eine klare Differenzierung in dorsale und ventrale Ebene nicht möglich, da die Zellen eine ungeordnete Zyste bilden (vgl. Abb.27B). Anterior ist links, dorsal ist oben. Eichstrich in (A) ist 10µm.

Um die Entstehung des starken HDA-1 Phänotyps zu untersuchen, wurden DIK-Aufnahmen von *hda-1(RNAi)* Embryonen zum Beginn der Morphogenese ausgewertet. Hierbei zeigt sich, daß die Anordnung der Zellen schon vor dem Zeitpunkt der Interkalation beeinträchtigt ist (Abb. 38C, D). Im Wildtyp sind die Darmzellen dorsal zu einer Zellreihe bestehend aus zehn Zellen angeordnet (Abb. 38A). Unter dieser Zellreihe befinden sich in ventraler Position die vier Zellen, die später interkalieren werden (Abb. 38B). In *hda-1(RNAi)* Embryonen ist die Zellzahl wildtypisch, jedoch ist die Separation in eine dorsale und eine ventrale Zellreihe nicht eindeutig. HDA-1 besitzt also eine frühe Funktion, die für die Anordnung der Darmzellen bei der zytoplasmatischen Polarisierung benötigt wird (s. Diskussion).

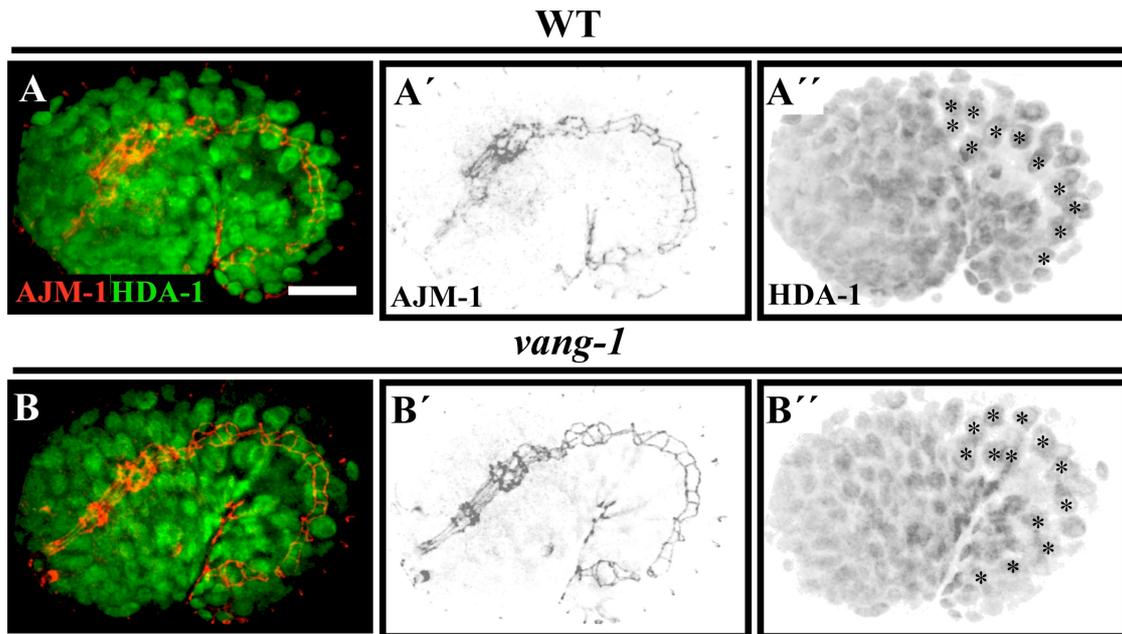


Abb. 39: Die Lokalisation von HDA-1 ist in *vang-1* Embryonen nicht beeinträchtigt

(A,B) Antikörperfärbungen gegen den CeAJ-Marker AJM-1 (in rot) und HDA-1 (in grün) am Wildtyp (A) und an *vang-1* Embryonen (B). (A) HDA-1 lokalisiert im Wildtyp in allen Darmzellkernen, wobei durch die Lateralansicht nicht alle Zellkerne sichtbar sind (A'', Sternchen). (B) In *vang-1* Embryonen lokalisiert HDA-1 in allen Darmzellkernen. Auch hier sind durch die Lateralansicht nicht alle Darmzellkerne zu erkennen (B'', Sternchen). Anterior ist links, dorsal ist oben. Eichstrich in (A) ist 10 μm .

Der schwächere *hda-1(RNAi)* Phänotyp zeigt, wie oben beschrieben, eine Anordnung der Darmzellen zu Einheiten aus drei Zellen (s. Abb. 37A'). Neben seiner Funktion zum Zeitpunkt der zytoplasmatischen Polarisierung könnte HDA-1 somit auch eine spätere Funktion in der Regulation der Interkalation ausüben. Da für VANG-1 eine Beteiligung an der Interkalation der Darmzellen nachgewiesen werden konnte (s. Abschnitt 1.5), besteht also die Möglichkeit, daß HDA-1 durch VANG-1 zum Zeitpunkt der Interkalation reguliert werden könnte. Um zu überprüfen, ob nun VANG-1 einen Einfluss auf die Lokalisation von HDA-1 hat, was einen Hinweis auf eine Funktion von HDA-1 zum Zeitpunkt der Interkalation liefern würde, wurden Antikörperfärbungen gegen HDA-1 ausgewertet (Abb. 39). Im Wildtyp lokalisiert HDA-1 in allen Darmzellkernen (Abb. 39A''). Dieses Lokalisationsmuster von HDA-1 wird auch in *vang-1* Embryonen reproduziert (Abb. 39B''), sodaß die HDA-1 Expression offensichtlich nicht unter der Kontrolle von VANG-1 steht. Die Lokalisation eines Proteins gibt dennoch keine Auskunft über den

Aktivierungszustand. So verbleibt die Möglichkeit, daß HDA-1 in *vang-1* Embryonen zwar korrekt lokalisiert, jedoch unter Umständen nicht aktiv sein könnte.

Zusammenfassend kann allerdings angenommen werden, daß die Musterbildung im Darm auf mindestens zwei verschiedene Prozesse zurückzuführen ist, wie es bereits schon im Abschnitt 3.9 angedeutet wurde. Zum einen wird eine korrekte Anordnung der Darmzellen zum Zeitpunkt der zytoplasmatische Polarisierung benötigt. Dieser Vorgang wird u.a. durch HDA-1 reguliert. Zum anderen wird eine geregelte Interkalation im anterioren Darmbereich verlangt. Dieser Prozeß wird durch VANG-1, DSH-2 und LIN-17 gesteuert. Die Komponenten des FGF-Signalweges EGL-15 und PTP-3 zeigen ebenfalls eine Beteiligung in der Regulation der Interkalation. Der Funktionsverlust des CCC zeigt, daß zudem die korrekte Anordnung der Darmzellen womöglich auch über eine generelle Regulation der Adhäsion entschieden wird (s. Diskussion).

Neben der Regulation von ECM-Genen reprimiert HDA-1 die Expression des Hoxgens *lin-39* (*Zerknüllt* in *Drosophila*), welches postembryonal anterior-posteriore Musterbildung steuert (Chen and Han, 2001). LIN-39 aktiviert den FGFR-Liganden EGL-17 und wird selbst zudem vom Wingless Signalweg reguliert (Cui und Han, 2003; Maloof et al., 1999; Hoier et al., 2000). Auch der Darm von *C. elegans* besitzt vermutlich eine anterior-posteriore Polarität, da bestimmte Marker jeweils nur eine Expression im anterioren oder im posterioren Bereich des Darms zeigen (Egan et al., 1995; Fukushige et al., 2005). Um nun einen Einfluss von LIN-39 auf die Musterbildung im Darm zu zeigen, wurde der Funktionsverlust über RNAi überprüft. Die Anordnung der Darmzellen in *lin-39(RNAi)* Embryonen entspricht dabei dem wildtypischen Muster, und die ints II bis IX werden jeweils aus zwei Zellen gebildet (Abb.40B, Pfeilköpfe). LIN-39 zeigt daher keinen offensichtlichen Einfluss auf die Musterbildung im Darm.

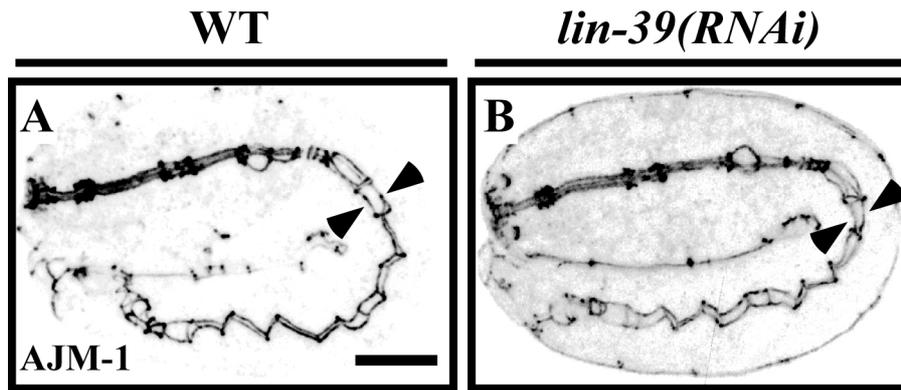


Abb. 40: LIN-39 zeigt keine Beteiligung an der Musterbildung im Darmepithel
 (A,B) Antikörperfärbungen gegen den CeAJ-Marker AJM-1 am Wildtyp (A) und an *lin-39(RNAi)* Embryonen (B). (B) In *lin-39(RNAi)* Embryonen sind keine Musterdefekte im Darmepithel zu erkennen, und die ints II bis IX bestehen, wie im Wildtyp (A, Pfeilköpfe), aus jeweils zwei Zellen (Pfeilköpfe; n=80). Anterior ist links, dorsal ist oben. Eichstrich in (A) ist 10 μ m.

Bestandteile der ECM sind auch die Integrine (Tamkun et al., 1986). Integrine sind generell an der polaren Reorganisation zellulärer Bestandteile beteiligt, die z.B. für die Zellmigration notwendig ist (Buck und Horwitz 1987). Zudem kann die Zell-Zell Adhäsion durch Integrine reguliert werden (Übersichtsartikel Zamir und Geiger, 2001), und auch die Zusammensetzung der ECM selbst kann durch Integrine gesteuert werden (Übersichtsartikel Bökel und Brown, 2002). Für die durch Integrine vermittelte Zellmigration sind Interaktionen mit Collagenen vom Typ IV erforderlich (Turner et al., 1989; Tawil et al., 1990). Da HDA-1 u.a. die Expression von Typ IV Collagenen steuert, soll eine Analyse der Integrine in *C. elegans* Aufschluss über eine mögliche Beteiligung an der Musterbildung bringen.

3.12 Komponenten der extrazellulären Matrix sind an der Musterbildung des Darmepithels beteiligt

In *C. elegans* sind bisher zwei α -Integrine (INA-1, PAT-2) und ein β -Integrin (PAT-3) charakterisiert worden (Gettner et al., 1995; Übersichtsartikel Hutter et al., 2000). Mit Hilfe der Wormbase BLAST Analyse unter Verwendung der Sequenzen von PAT-3 und INA-1 konnte jeweils ein weiteres putatives α - und β -Integrin identifiziert werden (WormBase web site, <http://www.wormbase.org>, release WS152, 2006).

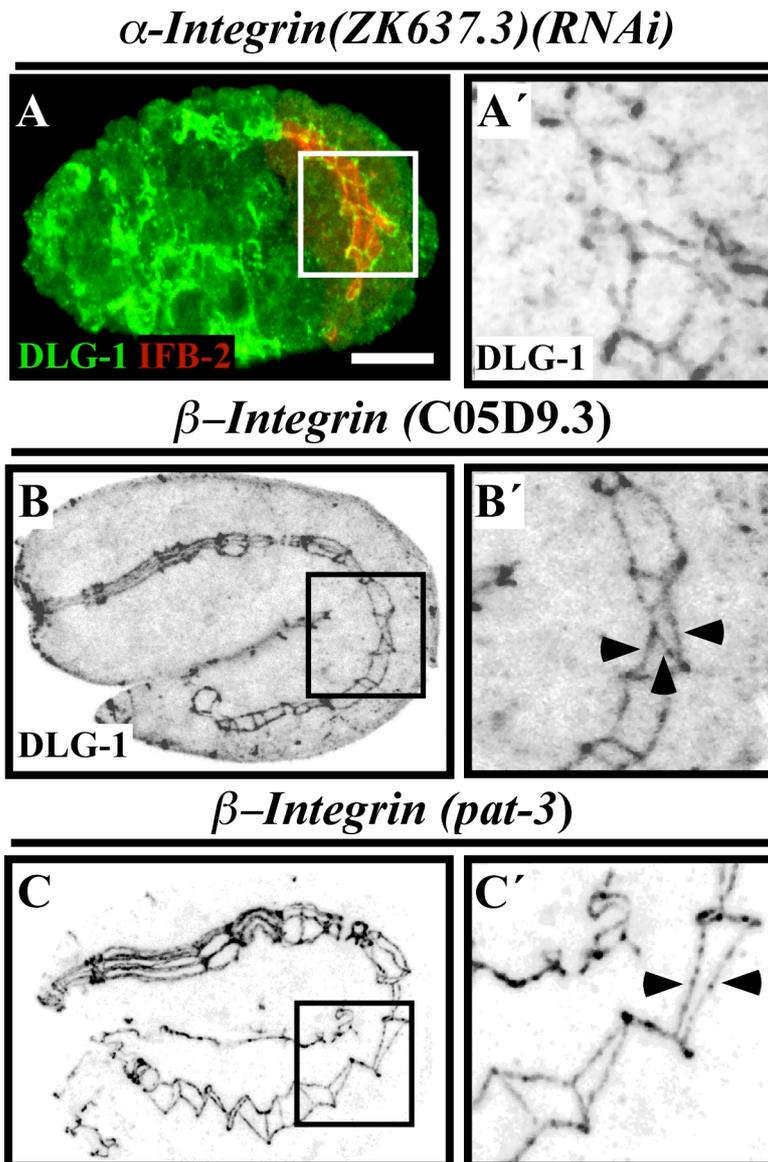


Abb. 41: Integrine können an der Musterbildung im Darm beteiligt sein

(A,B,C) Antikörperfärbungen gegen den CeAJ-Marker DLG-1 (A in grün), (A) und gegen den Darmlumenmarker IFB-2 (in rot) an *ZK637.3(RNAi)* (A), *C05D9.3* Embryonen (B) und *pat-3* Embryonen (C). (A) *ZK637.3(RNAi)* führt zur Zystenbildung der Darmzellen, wie sie schon für *gsk-3(RNAi)* und *hda-1(RNAi)* beobachtet worden ist (vgl. Abb. 27A und Abb. 37B; n=30). (B) Das β -Integrin *C05D9.3* zeigt Musterdefekte im Interkalationsbereich mit der Ausprägung von einer Einheit aus drei Zellen (B', Pfeilköpfe). Von 65 untersuchten Embryonen zeigten mit 4,6% nur drei Embryonen diesen Phänotyp. (C) Die *pat-3* Mutante zeigt keinen Einfluss auf die Musterbildung im Darm (n=80). Es werden wildtypische ints bestehend aus jeweils zwei Zellen gebildet (C', Pfeilköpfe). Anterior ist links, dorsal ist oben. Eichstrich in (A) ist 10 μ m.

Zunächst zeigt die Analyse der bisher nicht charakterisierten Integrine, daß Musterbildungsdefekte im Darmepithel auftreten können (Abb. 41A, B). Der Funktionsverlust des α -Integrins *ZK637.3* zeigt einen Phänotyp, der dem von *gsk-*

3(RNAi) oder *hda-1(RNAi)* verursachten Phänotyp ähnelt (vgl. Abb. 27A, 37B). Hier ist eine Anlagerung der Darmzellen zu einer Art Zyste zu erkennen, wodurch der Darm stark verkürzt ist (Abb. 41A´). Eine Mutante des β -Integrins C05D9.3 zeigt demgegenüber eine Phänokopie des *vang-1* Phänotyps (Abb. 41B). Es werden Einheiten aus drei Zellen gebildet (Abb. 31B´, Pfeilköpfe). Ein Musterbildungsdefekt tritt hier jedoch nur selten auf. Betroffen ist allerdings der Bereich, in dem Interkalationen stattfindet. Mit Hilfe von SAGE Analysen konnte gezeigt werden, daß das α -Integrin ZK637.3 und das β -Integrin C05D9.3 in Darm- und Muskelzellen exprimiert werden (McKay et al., 2003), was auf eine tatsächliche Beteiligung der Integrine an der Musterbildung hindeuten könnte (s. Diskussion).

Das bereits charakterisierte β -Integrin ist das PAT-3. Es spielt für die Entwicklung der Muskelzellen, welche im Embryo die Darmzellen flankieren, eine entscheidende Rolle und lokalisiert in der ECM dieser Muskelzellen (Gettner et al., 1995; Hall und Hedgecock, 1991). Da Integrine für die Ausübung ihrer Funktion $\alpha\beta$ -Heterodimere bilden müssen (Hynes et al., 1989), wurde die weitere Analyse der Integrine auf den Funktionsverlust des β -Integrin PAT-3 beschränkt. In *pat-3* Mutanten können keine Musterbildungsdefekte identifiziert werden. Die Anordnung der Darmzellen verhält sich hierbei wildtypisch, und die ints II bis IX werden jeweils aus zwei Zellen gebildet (Abb. 41C´, Pfeilköpfe). Das β -Integrin PAT-3 zeigt also keine Beteiligung an der Musterbildung im Darmepithel. Zusammenfassend kann gesagt werden, daß Integrine als Komponenten der ECM eine mögliche Beteiligung an der Regulation der Musterbildung im Darm zeigen. Dabei können sowohl die Anordnung der Darmzellen zum Zeitpunkt der zytoplasmatischen Polarisierung (s. Abb. 41A), als auch die Interkalation betroffen sein (s. Abb. 41B). Das β -Integrin PAT-3 allerdings weist bei der Musterbildung des Darmepithels keine erkennbare Funktion auf (s. Abb. 41C).

Integrine benötigen das Spektrin-Zytoskelett, um beispielsweise das Einwandern von Zellen zu vermitteln (Bialkowska et al., 2005). Das auf Spektrin basierende Membranzytoskelett wurde in Erythrozyten entdeckt und sorgt dort für die Stabilität der Zellform (Lux und Palek, 1995). Interessanterweise lokalisiert in *C. elegans* das Spektrin Homolog SPC-1 im Kortex und der sub-apikalen Membrandomäne der

Darmzellen. Der Funktionsverlust von SPC-1 führt zu Elongationsdefekten des Embryos (Norman and Moerman, 2002).

Um zu überprüfen, ob das Spektrin SPC-1 an der Musterbildung im Darmepithel beteiligt ist, wurde der Funktionsverlust von SPC-1 über RNAi analysiert. Dabei zeigt sich in *spc-1(RNAi)* Embryonen eine Anordnung von jeweils zwei Darmzellen zu einem int (Abb. 42B', Pfeilköpfe), was ein wildtypisches Muster widerspiegelt (vgl. Abb. 42A). Diese Beobachtung läßt zunächst den Schluß zu, daß das Spektrin-Zytoskelett nicht an der Musterbildung beteiligt ist. Spektrine werden prinzipiell über Ankyrine verankert (Übersichtsartikel Bennett and Chen, 2001). Das *C. elegans* Ankyrin UNC-44 lokalisiert basolateral u.a. in den Darmzellen und ist an der Regulation der subzellulären Lokalisation von LAD-1, einem LCAM Homolog, im Embryo beteiligt (Chen et al., 2001). Desweiteren reguliert UNC-44 postembryonale Zellmigration zusammen mit dem EGL-15/FGFR Signalweg (Branda and Stern, 2000), und stellt somit einen guten Kandidaten für eine Beteiligung an der Regulation der Musterbildung im Darmepithel dar. Allerdings treten in *unc-44(RNAi)* Embryonen keine Musterbildungsdefekte auf. Die Anordnung der Darmzellen ist hier wildtypisch (Abb. 42C), und die ints II bis IX werden jeweils aus zwei Zellen gebildet (Abb. 42C', Pfeilköpfe).

Das Spektrin/Ankyrin Zytoskelett über SPC-1 und UNC-44 ist offensichtlich nicht an der Regulation der Interkalation und der Musterbildung im Darmepithel von *C. elegans* beteiligt. Das oben erwähnte und in seiner Lokalisation von UNC-44 abhängige LCAM Homologe LAD-1 zeigt ebenso keine Beteiligung an der Musterbildung (D. van Fürden, Düsseldorf; pers. Mitteilung).

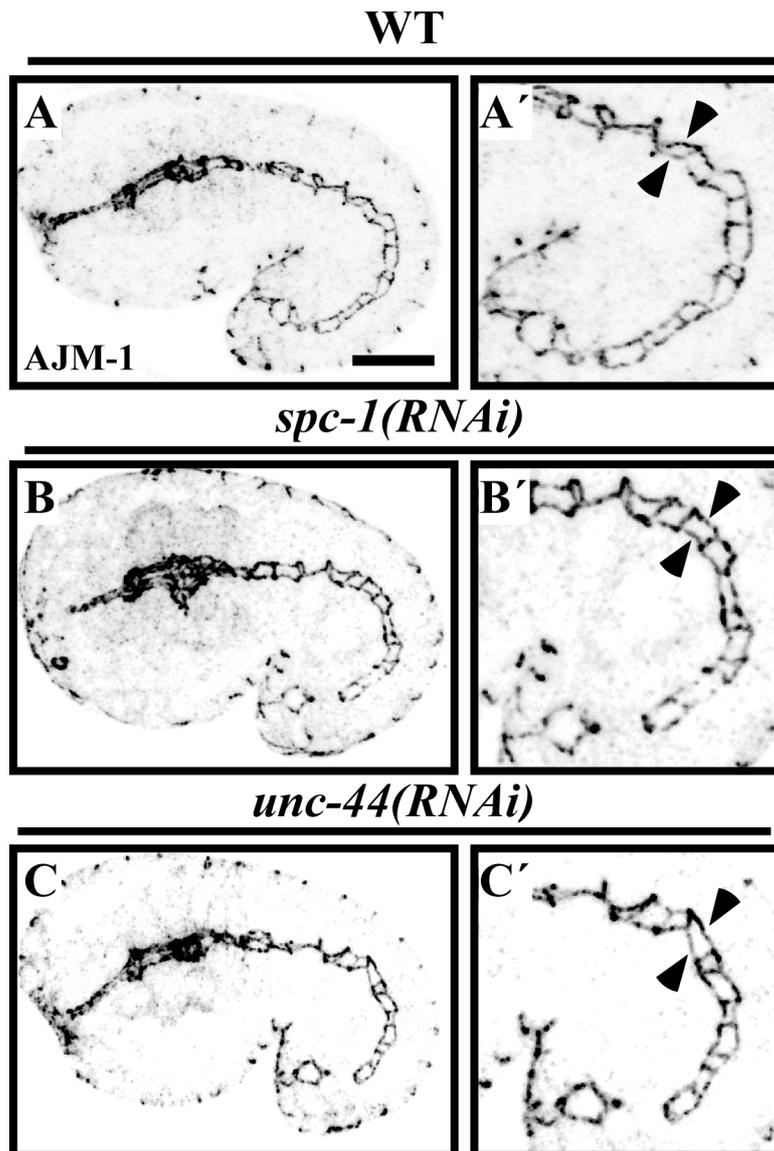


Abb. 42: Das Spektrin/Ankyrin System ist nicht an der Musterbildung des Darmepithels beteiligt

(A-C) Antikörperfärbungen gegen den CeAJ-Marker AJM-1 am Wildtyp (A), an *spc-1(RNAi)* Embryonen (B) und an *unc-44(RNAi)* Embryonen (C). (B,C) Sowohl in *spc-1(RNAi)* (B', n=50) als auch in *unc-44(RNAi)* (C, n=50) sind keine Musterdefekte im Darm nachzuweisen. In *spc-1(RNAi)* (B', Pfeilköpfe) und in *unc-44(RNAi)* (C', Pfeilköpfe) werden die ints II bis IX, wie im Wildtyp (A', Pfeilköpfe), jeweils aus zwei Zellpaaren gebildet. Anterior ist links, dorsal ist oben. Eichstrich in (A) ist 10 μ m.

Das Gen *src-1* soll aufgrund seines Phänotyps und der folgend aufgelisteten Aspekte in diesem Abschnitt behandelt werden, obgleich Src Homologe in anderen Organismen in vielen Signalwegen involviert sind. So ist von Src z.B. bekannt, daß es den CCC über die Phosphorylierung des β -Catenins beeinflusst (Lilien und Balsamo 2005). Allerdings spielt Src auch bei der Reorganisation des Zytoskeletts während der

Zellmigration eine große Rolle und wird hierbei durch Integrine aktiviert (Li et al., 2002). Um zu prüfen, ob SRC-1 in *C. elegans* an der Musterbildung im Darmepithel beteiligt ist, wurde der Funktionsverlust von SRC-1 über RNAi analysiert.

Der Funktionsverlust von SRC-1 führt zu den gleichen Musterbildungsdefekten mit unterschiedlicher Stärke, wie sie ähnlich bereits für *hda-1(RNAi)* beschrieben worden sind (Abb. 43A, B). Der schwächere Phänotyp ist augenscheinlich eine Phänokopie von *vang-1*. Die Musterdefekte betreffen hauptsächlich den Bereich, in dem Interkalation stattfindet, und es werden Einheiten aus drei Zellen gebildet (Abb. 43A', Pfeilköpfe). Allerdings können auch Bereiche im posterioren Darm betroffen sein, so wie es in *hda-1(RNAi)* auch beobachtet werden kann (Abb. 41E). Der stärkere Phänotyp zeigt eine zystenartige Anlagerung der Darmzellen, wie sie in *hda-1(RNAi)* auch vorkommt (Abb. 41B, vgl. Abb. 37B).

Aufgrund der Ausprägung des ähnlichen Phänotyps könnte eine Abhängigkeit zwischen SRC-1 und HDA-1 bestehen. Um zu prüfen, ob SRC-1 die Expression von HDA-1 reguliert, und dadurch ein identischer Phänotypen verursacht wird, wurden *src-1(RNAi)* Embryonen gegen HDA-1 gefärbt. Im Wildtyp lokalisiert HDA-1 in den Zellkernen aller Darmzellen (vgl. Abb. 39A), und auch in *src-1(RNAi)* kann die HDA-1 Expression in allen Darmzellkernen nachgewiesen werden (Abb. 43A'', B''). Dieses deutet darauf hin, daß HDA-1 möglicherweise unabhängig von SRC-1 wirkt. Da kein Antikörper gegen SRC-1 vorlag, konnte nicht geprüft werden, ob die Expression von SRC-1 durch HDA-1 reguliert wird.

Der Funktionsverlust von SRC-1 über RNAi führt, wie oben beschrieben, in seiner schwächeren Ausprägung zu einer Ausbildung von Ints bestehend aus drei Zellen (Abb. 43A', Pfeilköpfe). Da diese Defekte auch im Interkalationsbereich auftreten, könnte eine Ursache dieser Defekte in einer VANG-1 Fehlverteilung liegen. Daher wurde überprüft, ob die VANG-1 Lokalisation durch SRC-1 reguliert wird. In *src-1(RNAi)* Embryonen ist das frühe laterales VANG-1 nachweisbar (Abb. 43C', Pfeilkopf), und auch das späte apikale VANG-1 in der CeAJ ist detektierbar (Abb. 43D', Pfeilkopf).

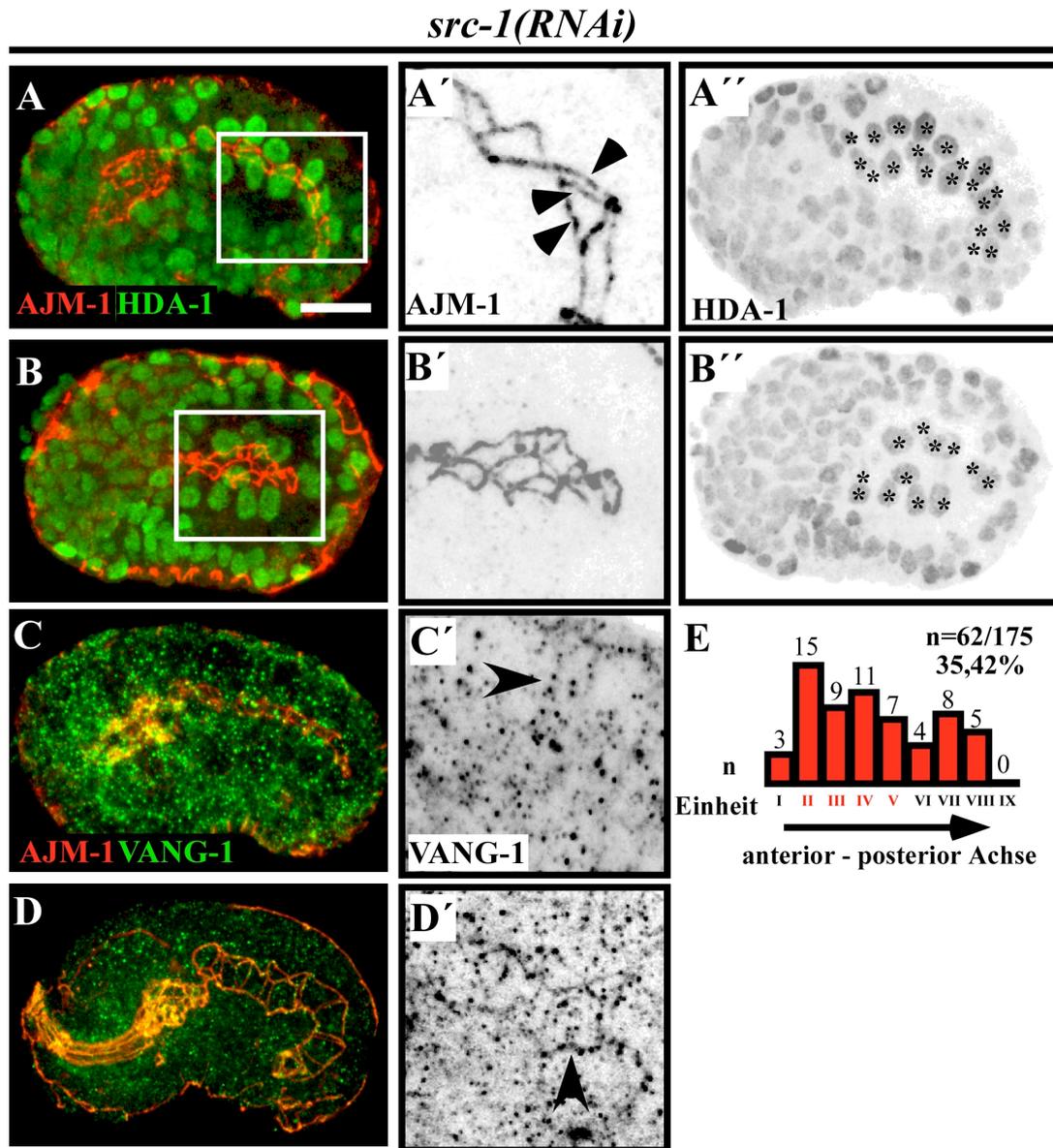


Abb. 43: Der Funktionsverlust von SRC-1 führt zu Musterdefekten im Darm
 (A-D) Antikörperfärbungen gegen den CeAJ-Marker AJM-1 (in rot), (A,B) HDA-1 (in grün), und (C,D) VANG-1 (in grün). (A) *Src-1(RNAi)* führt hauptsächlich zur Ausprägung zweier Phänotypen unterschiedlicher Stärke. Im „schwächeren“ Phänotyp sind Musterdefekte zu erkennen, und es werden Einheiten aus drei Zellen gebildet (A', Pfeilköpfe). Dieser Phänotyp tritt zu 35,42% auf (n=62/175). Die HDA-1 Expression ist hierbei in allen Darmzellkernen nachweisbar, wobei durch die Lateralansicht einige Kerne verdeckt sind (A'', Sternchen). (B) Der stärkere *src-1(RNAi)* Phänotyp tritt zu 54,86% auf (n=96/175), und zeigt eine zystenartige Anlagerung der Darmzellen, wie sie bereits für *hda-1(RNAi)* gezeigt worden ist (s. Abb. 37B). Auch hier ist HDA-1 in allen Zellkernen nachweisbar (B'', Sternchen). (C) Die laterale VANG-1 Expression ist in *src-1(RNAi)* Embryonen nur schwach und stark punktiert nachweisbar (C', Pfeilkopf). (D) In späten *src-1(RNAi)* Embryonen lokalisiert VANG-1 in der CeAJ (D', Pfeilkopf). (E) Die Musterdefekte betreffen zu 67,74% (n=42/62) den Interkalationsbereich (in rot dargestellt). Anterior ist links, dorsal ist oben. Eichstrich in (A) ist 10µm.

Allerdings erscheint insgesamt die VANG-1 Verteilung stärker punktiert als im Wildtyp (vgl. Abb. 10). Da vermutet wird, daß sowohl die Proteinmenge als auch die laterale Lokalisation von VANG-1 die Interkalation reguliert, könnte der Phänotyp in *scr-1(RNAi)* durch die schwächere VANG-1 Verteilung am lateralen Kortex der Darmzellen zumindest Teilweise erklärt werden. Die Defekte im posterioren Darmbereich der ints VI bis IX (Abb. 43E), wie sie prinzipiell z.B. auch bei einem Funktionsverlust des CCC auftreten (s. Abb. 29), können hiermit nicht erklärt werden. Möglicherweise besitzt SRC-1 in *C. elegans*, wie es für Src in anderen Organismen bereits gezeigt werden konnte (s.o.), auch einen Einfluss auf die Regulation der Zelladhäsion.

Ein Transmembranprotein, welches *upstream* von SRC-1 steht, ist MES-1 (Bei et al., 2002). MES-1 und SRC-1 werden parallel zum Wiggless Signalweg im frühen Embryo für die Spindelausrichtung benötigt. Bei der dabei ablaufenden Zellteilung entsteht u.a. die Darmvorläuferzelle E. Um zu untersuchen, ob MES-1 auch in der späteren Entwicklung *upstream* von SRC-1 stehen könnte, wurde der Funktionsverlust von *mes-1* über RNAi überprüft. In *mes-1(RNAi)* treten ebenso wie im schwächeren Phänotyp von *src-1(RNAi)* Musterbildungsdefekte auf (Abb. 44). Dabei werden Einheiten aus drei Zellen gebildet (Abb. 44A', Pfeilköpfe). Die Musterdefekte betreffen, so wie in *src-1(RNAi)*, auch den posterioren Darmbereich, in dem keine Zellinterkalation stattfinden (Abb.44A, Auswahl). Der Funktionsverlust von MES-1 reproduziert also den schwächeren *src-1* Phänotypen in Bezug auf die Musterbildung des Darmepithels. Eine zystenartige Anlagerung der Darmzellen, wie sie im stärkeren *src-1(RNAi)* Phänotyp auftritt, konnte in *mes-1(RNAi)* nicht beobachtet werden. Somit spielt MES-1 möglicherweise als Regulator von SRC-1 eine Rolle in der Musterbildung des Darmepithels. Da in *mes-1(RNAi)* keine Zystenbildung, welche ihren Ursprung noch vor der zytoplasmatischen Polarisierung hat, beobachtet werden konnte, reguliert MES-1 möglicherweise eine spätere Funktion von SRC-1.

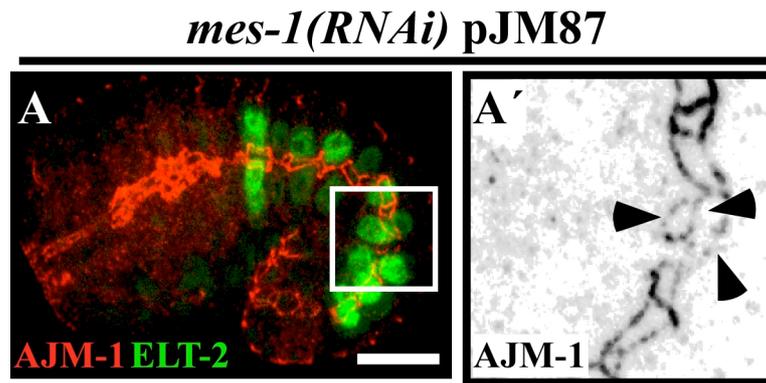


Abb. 44: Der Funktionsverlust von MES-1 führt zu Musterdefekten des Darmepithels

(A) Antikörperfärbungen gegen den CeAJ-Marker AJM-1 (in rot) am Stamm pJM87, der den darmspezifischen Zellkernmarker ELT-2-GFP exprimiert (in grün). In *mes-1(RNAi)* Embryonen sind Musterdefekte zu erkennen, wobei Einheiten aus drei Darmzellen gebildet werden (A', Pfeilköpfe). Dieser Phänotyp tritt zu 11,67% auf (n=7/60), wobei auch posteriore Bereiche des Darmes betroffen sind (A, Auswahl). Anterior ist links, dorsal ist oben. Eichstrich in (A) ist 10 μ m.

Die in diesem Abschnitt untersuchten Proteine HDA-1, SRC-1 und ZK637.2 sind mit der Zusammensetzung, der Funktionsvermittlung oder als Bausteine selbst mit der ECM assoziiert. Die identische Ausprägung des Verlustphänotyps dieser Proteine wird als Hinweis gewertet, daß die generelle Musterbildung des Darmepithels die ECM benötigt, welche durch die Muskelvorläuferzellen bereitgestellt wird. Dabei reguliert HDA-1 die Komposition der ECM direkt (Whetstone et al., 2005), und führt bei einem Funktionsverlust hauptsächlich zu einer zystenartigen Anlagerung der Darmzellen (s. Abb. 37). Das α -Integrin ZK637.2 als mögliche Komponente der ECM zeigt bei einem Funktionsverlust auch diesen Phänotyp (s. Abb. 41A), welcher ebenfalls durch den Funktionsverlust von SRC-1 reproduziert wird (s. Abb. 43).

<i>Gen</i>	Homolog	Analyse	n	WT	Muster	%	Anterior	Zyste	Andere
<i>vang-1</i>	Strabismus/Van Gogh	Mutante	214	145	69	32,24	69/69	0	0
<i>lin-17</i>	Frizzled	Mutante	20	15	5	25	5/5	0	0
<i>cfz-2</i>	Frizzled	RNAi	30	30	0	0	0	0	0
<i>mom-5</i>	Frizzled	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>dsh-1</i>	Dishevelled	RNAi	20	20	0	0	0	0	0
<i>dsh-2</i>	Dishevelled	RNAi	100	66	34	34	34/34	0	0
<i>mig-5</i>	Dishevelled	RNAi	20	20	0	0	0	0	0
<i>bar-1</i>	β -Catenin	RNAi	30	30	0	0	0	0	0
<i>hmp-2</i>	β -Catenin	RNAi	116	0	40	34,48	28/40	0	76
<i>wrm-1</i>	β -Catenin	Mutante	50	0	18	36	12/18	0	32
<i>hmp-1</i>	α -Catenin	RNAi	125	0	39	31,2	30/39	0	86
<i>hmr-1</i>	E-Cadherin	RNAi	139	0	32	23,02	24/32	0	107
<i>gsk-3</i>	Axin	RNAi	30	0	12	40	1/12	16	2
<i>apr-1</i>	APC	RNAi	50	0	15	30	8/15	28	7
<i>src-1</i>	Src Kinase	RNAi	175	6	62	35,42	42/62	96	11
<i>hda-1</i>	Histon Deacetylase	RNAi	166	0	13	7,8	0/13	136	17
ZK637.2	α -Integrin	RNAi	30	0	0	0	0	27	3
C05D9.3	β -Integrin	Mutante	65	62	3	4,61	3/3	0	0
<i>pat-3</i>	β -Integrin	Mutante	80	80	0	0	0	0	0
<i>egl-15</i>	FGF Rezeptor	Mutante	133	7	40	30,08	37/40	0	86
<i>clr-1</i>	Phosphatase	Mutante	100	94	0	0	0	0	6
<i>egl-17</i>	FGF	Mutante	50	50	0	0	0	0	0
<i>let-756</i>	FGF	Mutante	50	50	0	0	0	0	0
<i>ptp-3</i>	Phosphatase	Mutante	58	39	19	11,2	19/19	0	0
<i>unc-44</i>	Ankyrin	RNAi	50	0	0	0	0	0	0
<i>spc-1</i>	Spektrin	RNAi	50	45	0	0	0	0	5
<i>lin-39</i>	Zerknüllt	RNAi	80	80	0	0	0	0	0
<i>lin-12</i>	Notch	RNAi	50	25	0	0	0	0	25

Tab.1: Übersicht der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente in Bezug zur Musterbildung im Darmepithel

Gezeigt ist jeweils das untersuchte Gen und der dazugehörige geläufige Name des Homologs. Jedes Gen wurde entweder als Mutante untersucht, oder der Funktionsverlust über RNAi herbeigeführt. Die Anzahl der untersuchten Embryonen ist mit „n“ angegeben. Da pleiotrophe Defekte im Embryo auftreten, wurden jeweils zunächst drei Phänotypen unterschieden: Wildtyp („WT“), Musterdefekt („Muster“) und Zystenbildung („Zyste“). Eine wildtypische Musterbildung (vgl. Abb.3) wurde unter „WT“ eingeordnet. Musterdefekte (Angabe auch in %) wurden noch in Interkalationsdefekte („Anterior“), wie sie z.B. in *vang-1* auftreten, unterteilt. Eine Zystenbildung, wie sie z.B. in *hda-1(RNAi)* zu beobachten ist, wurde unter „Zyste“ angegeben. Unter „Andere“ sind die Phänotypen eingeordnet, die keine Musterdefekte oder Zystenbildung zeigen und auch nicht wildtypisch sind. Die beobachtete zystenartige Anlagerung der Darmzellen in *apr-1(RNAi)* tritt aufgrund einer erhöhten Zellzahl auf (R. Schneider/O. Bossinger, Düsseldorf, pers. Mitteilung). Gene, die wie *vang-1* hauptsächlich den Interkalationsbereich betreffen, sind in grau unterlegt.

4 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Funktion des planaren Zellpolaritäts- (PCP, “planar cell polarity“) Proteins VANG-1 auf die Musterbildung des Darmepithels von *C. elegans* untersucht. Es konnte gezeigt werden, daß VANG-1 über einen putativen PCP-Signalweg an der Regulation der Interkalation beteiligt ist, einem Prozeß, der den anterioren Bereich des Darmes gestaltet. Die Proteine DSH-2 und LIN-17, welche wie VANG-1 Homologe von PCP-Proteinen in anderen Organismen darstellen, spielen für die Interkalation ebenfalls eine entscheidende Rolle. Ein Funktionsverlust dieser Proteine führt jeweils zu Musterdefekten im anterioren Darmbereich, wo nun Darmeinheiten aus drei, anstatt aus zwei Zellen gebildet werden (s. Abb. 21). VANG-1 lokalisiert zum Zeitpunkt der Interkalation am lateralen Kortex (s. Abb. 10D) und wird offensichtlich auch da benötigt, da bei einer Beeinflussung der lateralen Lokalisation von VANG-1 ebenfalls Interkalationsdefekte auftreten können. Dieses kann bei einem Funktionsverlust des FGFR EGL-15 oder der Phosphatase PTP-3 beobachtet werden (s. Abb. 31, 35).

Es zeigte sich, daß die Musterbildung des Darmepithels selbst ein komplexer Vorgang ist, der durch die in dieser Arbeit weiterhin untersuchten Systeme offensichtlich zu unterschiedlichen Zeitpunkten reguliert wird. Zunächst ist die Koordination einer prinzipiellen Anordnung der Darmzellen zum Zeitpunkt der zytoplasmatische Polarisierung essentiell, um letztendlich einen elongierten Darm zu gewährleisten. Dieser Vorgang wird durch einen Funktionsverlust der Proteine GSK-3, HDA-1 und SRC-1 beeinträchtigt (s. Abb. 27, 37 und 43), was Hinweise auf eine mögliche Wechselwirkung der Darmzellen mit der ECM liefert.

Ein weiterer Phänotyp, der auch im posterioren Bereich des Darmes Abweichungen in der Anordnung der Zellen erkennen läßt, kann durch den Funktionsverlust der Komponenten des Cadherin-Catenin Komplex (CCC, “cadherin-catenin complex“) herbeigeführt werden, was auf eine mögliche Beteiligung der Zelladhäsionsregulation bei der Musterbildung im Darmepithel hinweist (s. Abb. 29).

5 Diskussion

Strabismus/Van Gogh reguliert in Invertebraten und Vertebraten, z.B. in *Drosophila* und *Xenopus*, die korrekte Musterbildung in Epithelien, die eine geordnete Ausrichtung oder Gestaltung ihrer Zellen verlangen (Fanto und McNeill, 2004; Wallingford et al., 2002). In *Drosophila* ist die Funktion von Strabismus/Van Gogh für die Anordnung der Ommatidien im Auge oder die Ausrichtung der Härchen im Flügel notwendig. In *Xenopus* wird der Prozeß der zellulären Interkalation, welcher für die Bildung des Neuralrohres notwendig ist, durch Strabismus/Van Gogh gesteuert. Der Signalweg, über den Strabismus/Van Gogh in *Drosophila* und *Xenopus* verknüpft ist, wird planarer Zell-Polaritäts-Signalweg (PCP, "planar cell polarity") genannt. In *C. elegans* ist der PCP-Signalweg bisher nicht bekannt oder charakterisiert worden, jedoch sind für die Morphogenese des Darms Interkalationsprozeße beschrieben, wie sie vergleichbar auch in *Xenopus* vorkommen (Leung et al., 1999; Keller et al., 1985). Daher wurde im Rahmen dieser Doktorarbeit der Einfluss des Strabismus/Van Gogh Homolog VANG-1 auf die Musterbildung des Darmepithels von *C. elegans* untersucht. Auf die nun folgenden Punkte wurde im Ergebnisteil verwiesen, und sollen in diesem Abschnitt wie angegeben diskutiert werden:

- (1) Die Interkalation der Darmzellen wird durch VANG-1, DSH-2 und LIN-17 über einen planaren Zellpolaritäts-Signalweg reguliert
- (2) VANG-1 wird am lateralen Kortex der Darmzellen benötigt, um die Interkalation zu gewährleisten
- (3) Die Musterbildung im Darm benötigt eine korrekte Anordnung der Zellen während der zytoplasmatischen Polarisierung, welche unabhängig von VANG-1 vermittelt wird
- (4) *C. elegans* als mögliches Modellsystem für planare Zellpolarität

5.1 Die Interkalation der Darmzellen wird durch VANG-1, DSH-2 und LIN-17 über einen planaren Zellpolaritäts-Signalweg reguliert

In *vang-1* Mutanten ist die Musterbildung im anterioren Bereich (int II-V) des Darmepithels beeinträchtigt (s. Abb. 18B, F). Dabei lagern sich drei Darmzellen zu

einer Einheit zusammen, wohingegen im Wildtyp Einheiten aus zwei Zellen gebildet werden. Es wird vermutet, daß in *vang-1* Mutanten die Interkalation der Darmzellen betroffen ist. Diese Hypothese wird durch die folgenden Beobachtungen in *C. elegans* und über Hinweise aus anderen Systemen gefördert: Das wildtypische Darmepithel wird im anterioren Bereich aus vier Zellpaaren aufgebaut (int II-V), wobei zwei dieser Zellpaare durch den Prozeß der Interkalation aus ihrer ursprünglichen ventralen Position in die dorsale Epithelschicht gelangen, und dort int II und int V ausbilden (s. Abb. 2; Leung et al., 1999). Der Prozeß der Interkalation selbst ist sehr filigran und vollzieht sich über mehrere zeitliche und räumliche Ebenen, sodaß dieser Prozeß bisher im Detail noch nicht beschrieben werden konnte (Leung et al., 1999). Daher war eine lückenlose und direkte Dokumentation des Interkalationsprozesses in *vang-1* Embryonen nicht möglich. Allerdings ist in *vang-1* Embryonen genau der Darmbereich betroffen, der durch die Interkalation gestaltet wird. Durch die räumliche Korrelation des Interkalationsprozesses mit den Defekten in der *vang-1* Mutante wird die oben genannte Hypothese unterstützt, daß VANG-1 die Interkalation der Darmzellen reguliert.

In *Drosophila* und *Xenopus* sind Dishevelled und Frizzled neben Strabismus/Van Gogh bereits charakterisierte Komponenten des PCP-Signalweges (Fanto und McNeill, 2004; Wallingford und Harland, 2002). In diesen beiden Systemen führt der jeweilige Funktionsverlust von Strabismus/Van Gogh, Dishevelled und Frizzled zu einer Aufhebung der planaren Polarität mit einer Ausprägung eines identischem Phänotyps. Dabei wird in *Drosophila* der Verlust der planaren Polarität z.B. sichtbar durch eine zufällige Anordnung der Härchen im Flügel (s. Abb. 6; Taylor et al., 1998). Hier ist das Epithel als solches bereits etabliert und die PCP wird benötigt, um zusätzliche Strukturen, die Härchen, auszubilden. In *Xenopus* hingegen wird der PCP-Signalweg über den Prozeß der konvergenten Extension benötigt, um aus einem "kugelförmigen" Embryo eine elongierte Körperachse zu bilden (Wallingford, 2004). Dabei wird die konvergente Extension selbst durch die Interkalation der Neuralleistenzellen "angetrieben". Ein Funktionsverlust von Strabismus/Van Gogh, Frizzled oder Dishevelled bewirkt hier, daß der Embryo nicht mehr elongieren kann (Darken et al., 2002; Goto und Keller, 2002). In *C. elegans* kann der *vang-1* Phänotyp ebenfalls durch den jeweiligen Funktionsverlust von Dishevelled (*dsh-2*) und Frizzled

(*lin-17*) reproduziert werden (s. Abb. 21), so wie es in *Drosophila* und *Xenopus* der Fall ist. Die Musterdefekte in *vang-1*, *lin-17* und *dsh-2(RNAi)* Embryonen betreffen nur den anterioren Darmbereich der Region int II bis int V, der durch den Interkalationsprozeß gestaltet wird. Die posteriore Darmregion, int VI bis Int VIII, in der keine Interkalation stattfindet, zeigt in *vang-1* und *lin-17* Mutanten, sowie in *dsh-2(RNAi)* eine wildtypische Musterbildung (s. Abb. 18F). Die Morphogenese des Darms von *C. elegans* läßt sich dabei mit der Morphogenese der Neuralleiste von *Xenopus* gut vergleichen: In beiden Systemen wird die Funktion von Strabismus/Van Gogh, Frizzled und Dishevelled, welche PCP-Komponenten darstellen, für die Elongation des jeweiligen Epithels benötigt (s. Abb. 19). Zudem wird in beiden Systemen die Interkalation selbst durch die PCP-Komponenten reguliert. Diese Beobachtungen werden als Hinweise bewertet, daß in *C. elegans* ein Signalweg existieren könnte, der diese drei Proteine beinhaltet. Naheliegend ist hier der PCP-Signalweg, der in *Xenopus* oder *Drosophila* genau diese Proteine benötigt, um eine Musterbildung herbeizuführen.

Die Interferenz mit der planaren Polarität in *Xenopus* kann über zwei verschiedene Ansätze erfolgen, die letztendlich jedoch den gleichen zentralen Aspekt der PCP, die asymmetrische Signalgebung, beeinflussen. Zum einen wird durch den Funktionsverlust von Strabismus/Van Gogh ein PCP-Phänotyp erzeugt, der die Elongation des Embryos verhindert. Zum anderen kann aber auch die Überexpression von Strabismus/Van Gogh einen zum Funktionsverlust identischen Phänotyp verursachen (Darken et al., 2002; Wallingford und Harland, 2002). Angenommen wird, daß in beiden Fällen die asymmetrische Signalgebung durch den PCP-Signalweg nicht mehr möglich ist. Im ersten Fall dadurch, daß die Funktion von Strabismus/Van Gogh fehlt, wobei Strabismus/Van Gogh benötigt wird, um die asymmetrische Verteilung anderer Komponenten zu gewährleisten (s. Einleitung). Im zweiten Fall ist Strabismus/Van Gogh selbst nicht mehr asymmetrisch verteilt, sondern lokalisiert ubiquitär im Kortex der Zellen. Da sich die PCP-Komponenten untereinander in ihrer Lokalisation beeinflussen, wird somit ebenfalls die asymmetrische Signalgebung aufgehoben. In *C. elegans* führt nun die darmspezifische Überexpression von VANG-1 zu einem der *vang-1* Mutante entsprechenden Phänotyp (s. Abb. 12 ,18). Auch hier kann womöglich über die

Interferenz der asymmetrischen Signalgebung ein identischer Phänotyp erzeugt werden. Dies geschieht zum einen in der Mutante durch die Beeinträchtigung in der Signalvermittlung selbst. Zum anderen in der Überexpression durch die angenommene Aufhebung der asymmetrischen Verteilung von VANG-1 (s.u.), was letztendlich eine polare Signalvermittlung unausführbar macht. Die Ausprägung des identischen Phänotyps bei einem Funktionsverlust von VANG-1, DSH-2, LIN-17 und der darmspezifischen Überexpression von VANG-1 geben einen weiteren Hinweis auf die Existenz eines durch den PCP-Signalweg vermittelten planaren Aufbau der Zellen des Darmepithels entlang der antero-posterioren Achse, und somit der Existenz der PCP in *C. elegans*.

Einen weiteren Anhaltspunkt für die Existenz der PCP in *C. elegans* liefert die Beobachtung, daß VANG-1 eine asymmetrische Verteilung in Darm- und Hypodermiszellen entlang der anterior-posterioren Achse zeigt, und dabei am jeweiligen posterioren Zellkortex akkumuliert (s. Abb. 11). Im Flügel von *Drosophila* zeigt Strabismus/Van Gogh ebenfalls eine Verteilung am posterioren Kortex (Bastock et al., 2003). Allerdings konnte die asymmetrische Verteilung von VANG-1 nicht in allen an der Interkalation beteiligten Zellen nachgewiesen werden, und wurde z.B. in der Hypodermis nur in den anterioren Zellen beobachtet (s. Abb. 11B). Bisher ist nicht beschrieben worden, daß sich diese Zellen außer in ihrer anterioren Position von den weiteren hypodermalen Zellen unterscheiden (Heid et al., 2001; Shemer und Podbilewicz, 2003). Im Darmepithel ist die asymmetrische Verteilung insgesamt rudimentär darstellbar (s. Abb. 11A). Die beobachtete asymmetrische Verteilung tritt dennoch in einem Stadium auf, in dem die Zellinterkalationen der Darm- und Hypodermiszellen stattfinden (Leung et al., 1999; Williams-Masson et al., 1998). Daher könnte die subzelluläre Verteilung von VANG-1 in direktem Zusammenhang zu dem hier stattfindenden Prozeß stehen. Angenommen wird, daß die asymmetrische Verteilung innerhalb aller Darm- und Hypodermiszellen dennoch vorhanden sein könnte. Möglicherweise ist diese Asymmetrie auf Immunfluoreszenzebene dadurch nicht auflösbar, weil der Interkalationsprozeß selbst eine starke zeitliche und räumliche Dynamik verschiedener zellulärer Komponenten benötigt und verursacht (Williams-Masson et al., 1998; Simske und Hardin, 2001), und VANG-1 dabei selbst dieser Dynamik unterliegen könnte (vgl. Abb. 10). Es besteht hierbei jedoch auch die

Möglichkeit, daß VANG-1 nicht in allen Darm- und Hypodermiszellen asymmetrisch verteilt ist. Eine Nachweismöglichkeit wäre die zeitliche mikroskopische Aufzeichnung der Embryonalentwicklung in einem transgenen Stamm, der zwei verschiedene Marker exprimiert, um die Asymmetrie sichtbar machen zu können. Anbieten würde sich dabei das LET-413-CFP (“cyan fluorescent protein”) Fusionsprotein als kortikaler Marker, da dieser Stamm bereits etabliert ist (s. Abb. 11). In diesem Stamm könnte ein zusätzlich integriertes VANG-1-RFP (“red fluorescent protein”, Gross et al., 2000; freundlicherweise von R. Tsien, San Diego, zur Verfügung gestellt) Aufschluß über die mögliche asymmetrische Verteilung von VANG-1 in allen Zellen und zu jedem Zeitpunkt in der Embryonalentwicklung geben. Das RFP müsste hierbei an den N-terminus von VANG-1 fusioniert werden, da das PDZ-Bindemotiv von VANG-1 für die kortikale Lokalisation an terminaler Position benötigt wird (s. Abb. 12C).

Die Ergebnisse von VANG-1 in Bezug zu DSH-2 unterstützen weiterhin die Hypothese, daß die PCP in *C. elegans* existieren könnte, und stellen sich wie folgt dar: VANG-1 und DSH-2 kolokalisieren im Darm und in der Hypodermis (s. Abb. 22A, D). Die für VANG-1 dokumentierte Dynamik in der subzellulären Lokalisation (s. Abb. 10) wird dabei von DSH-2 reproduziert (s. Abb. 22 A-C). Bei einem Funktionsverlust von DSH-2 über RNAi ist die asymmetrische Verteilung von VANG-1 in den anterioren Hypodermiszellen nicht mehr nachweisbar (s. Abb. 23). In diesem Bereich wird somit die subzelluläre asymmetrische Verteilung von VANG-1 durch DSH-2 reguliert. In *Drosophila* kolokalisieren Strabismus/Van Gogh und Dishevelled ebenfalls, und vermitteln dabei die PCP (Bastock et al., 2003). Zudem ist hier die asymmetrische Verteilung von Strabismus/Van Gogh in *dishevelled* mutanten Klonen aufgehoben.

Da durch *dsh-2(RNAi)* der *vang-1* Phänotyp reproduziert wird, könnte die Fehlverteilung von VANG-1 in diesem Hintergrund für die Ausprägung des Phänotyps verantwortlich sein. VANG-1 könnte folglich für seine Funktion in der Regulation der Interkalation die ersten drei Transmembrandomänen benötigen, welche in der *vang-1* Mutante deletiert sind, und zusätzlich eine asymmetrische Verteilung, welche durch DSH-2 kontrolliert wird.

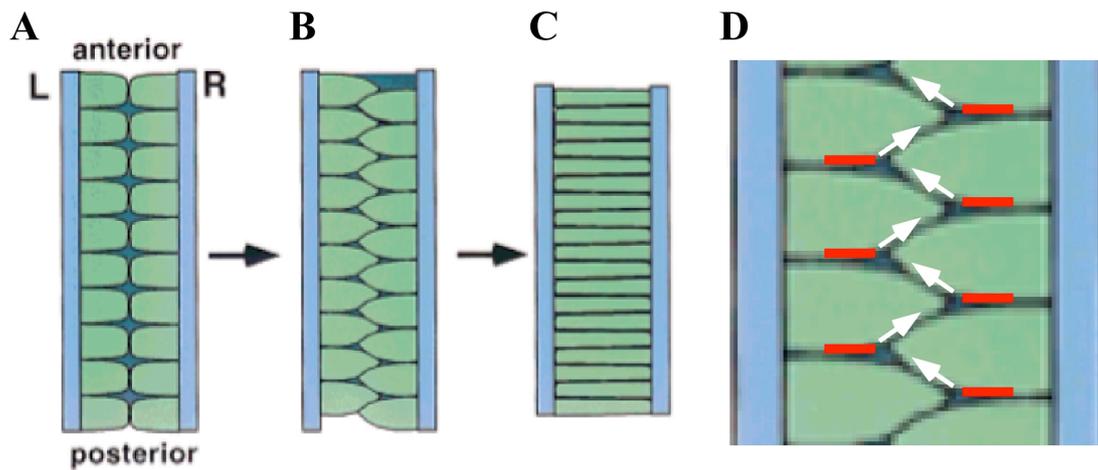


Abb. 45: Postulierte Funktion von VANG-1 am posterioren Zellkortex

(A-C) Schematische Übersicht der dorsalen Interkalation (modifiziert nach Simske und Hardin, 2001). (A) Die dorsalen Hypodermiszellen (in grün) werden auf ihrer jeweiligen basalen Seite von einer Reihe sogenannter "seam cells" (in blau) flankiert. (B) Die Zellen verändern ihre Form und werden dadurch zueinander versetzt. Es folgt die Interkalation, wobei die Zellen alternierend ineinanderwandern. (C) Die Interkalation ist abgeschlossen, sobald eine Zellreihe etabliert ist. (D) Für VANG-1 wird eine Funktion am posterioren Kortex (in rot dargestellt) für die Bildung der Zellfortsätze postuliert (Pfeile), um die geordnete und alternierende Interkalation der Zellen zu garantieren. Modifiziert nach Simske und Hardin, 2001.

Für die Interkalation in der Hypodermis werden von jeder Zelle Vortsätze in Richtung der Mittellinie gebildet, die letztendlich die Wanderungsrichtung definieren (Simske und Hardin, 2001). Das geordnete und alternierende Ineinanderwandern der Zellen könnte dabei durch die Ausbildung der Zellfortsätze am jeweiligen posterioren Kortex gewährleistet, und durch VANG-1 vermittelt werden. In der Modellvorstellung definiert VANG-1 hierbei den posterioren Kortex, und erlaubt dort die Ausbildung von Zellfortsätzen, die für die Interkalation benötigt werden (Abb. 45). Diese Fortsätze benötigen für ihre Migration ein Substrat für die Richtungsgebung, welches von den Zellen jeweils am anterioren Kortex bereitgestellt wird. Grundlegend in dieser Modellvorstellung ist, daß sich die Zellen leicht versetzt gegenüberliegen, was in der Hypodermis von *C. elegans* tatsächlich der Fall ist (Simske und Hardin, 2001). Für den Darm konnte zum Zeitpunkt der Interkalation ebenfalls eine jeweilige Versetzung der Zellen festgestellt werden (Leung et al., 1999; vgl. Abb. 2B).

5.2 VANG-1 wird am lateralen Kortex der Darmzellen benötigt, um die Interkalation zu gewährleisten

Zum Zeitpunkt der zytoplasmatischen Polarisierung lokalisiert VANG-1 in den Darmzellen sowohl am lateralen Kortex, als auch in der CeAJ (s. Abb. 10C). Zum Zeitpunkt der Interkalation kann VANG-1 hauptsächlich in lateraler Position am Kortex nachgewiesen werden (s. Abb. 10D). Dieses deutet in Bezug auf die Interkalation auf eine Funktion von VANG-1 zu diesem Zeitpunkt in genau dieser Position hin. Hierfür spricht auch, daß in bestimmten mutanten Hintergründen, welche die laterale Lokalisation von VANG-1 beeinflussen, Interkalationsdefekte zu erkennen sind. Dazu zählen *egl-15* und *ptp-3*. In *egl-15* Mutanten ist womöglich die Proteinmenge von VANG-1 in lateraler Position zu gering, da ein gewisser Anteil zum Zeitpunkt der Interkalation schon in der CeAJ lokalisiert (s. Abb. 32). In *ptp-3* Mutanten erscheint insgesamt weniger VANG-1 vorhanden zu sein (s. Abb. 35). Die subzelluläre Verteilung von VANG-1 wird also durch DSH-2 (s.o.), EGL-15 und PTP-3 reguliert. EGL-15 beeinflusst dabei womöglich durch direkte Phosphorylierung die Lokalisation von VANG-1 (s. Abb. 32D). Beobachtungen aus anderen Systemen liegen hierzu nicht vor, da eine Regulation der PCP durch den FGF-Signalweg bisher nicht gezeigt worden ist. Für die subzelluläre Lokalisation von Strabismus/Van Gogh in *Drosophila* oder der Maus ist bisher keine vergleichbare Dynamik mit einem Wechsel von lateral nach apikal beschrieben worden (Bastock et al., 2003; Montcouquiol et al., 2006).

Bei einem Funktionsverlust bestimmter Proteine, die zwar die späte Lokalisation von VANG-1 in der CeAJ beeinträchtigen, aber keinen Einfluss auf die frühe laterale Verteilung von VANG-1 zeigen, können keine Interkalationsdefekte beobachtet werden. Hierzu zählen LET-413 und DLG-1. LET-413 lokalisiert während der Morphogenese am basolateralen Zellkortex (Legouis et al., 2000), wobei LET-413 am lateralen Kortex mit VANG-1 kolokalisiert (s. Abb. 11). Bei einem Funktionsverlust zeigt LET-413 einen starken Einfluss auf Proteine, die in der CeAJ lokalisieren (Legouis et al., 2000; Bossinger et al., 2001; Köppen et al., 2001; McMahon et al., 2001). In *let-413(RNAi)* ist die Lokalisation von VANG-1 in der CeAJ nicht mehr nachweisbar, die frühe laterale Verteilung von VANG-1 ist allerdings nicht

beeinflusst (s. Abb. 26A), und es können keine Interkalationsdefekte beobachtet werden (s. Abb. 26B). Die Beeinflussung der späten Lokalisation von VANG-1 in *let-413(RNAi)* hat also keinen Einfluss auf die Musterbildung des Darmepithels. DLG-1 kolokalisiert mit VANG-1 in der CeAJ und beide Proteine zeigen eine physikalische Interaktion im Hefe-2 Hybrid (C. Segbert/O. Bossinger, Düsseldorf, pers. Mitteilung). Ein Funktionsverlust von DLG-1 führt zu einer unvollständigen Verteilung von CeAJ-Komponenten, wie z.B. AJM-1 (Bossinger et al., 2001; Köppen et al., 2001; McMahon et al., 2001) oder auch VANG-1 (C. Segbert/O. Bossinger, Düsseldorf, pers. Mitteilung). In *dlg-1(RNAi)* ist die frühe laterale Verteilung von VANG-1 nicht beeinflusst, und es können keine Musterdefekte beobachtet werden (C. Segbert/O. Bossinger, Düsseldorf, pers. Mitteilung). Diese Beobachtungen unterstützen die Hypothese, daß VANG-1 am lateralen Kortex für seine Funktion in der Regulation der Interkalation benötigt wird.

5.3 Die Musterbildung im Darm benötigt eine korrekte Anordnung der Zellen während der zytoplasmatischen Polarisierung, welche unabhängig von VANG-1 vermittelt wird

Die Morphogenese des Darms von *C. elegans* ist ein Prozeß, der durch den mesenchymal-epithelialen Übergang der Darmvorläuferzellen eingeleitet wird. Charakteristisch hierbei ist die Polarisierung der Zellen im E16-Stadium entlang einer virtuellen Mittellinie, was unter DIK-Optik beobachtet werden kann. Auf Immunfluoreszenzebene ist zu diesem Zeitpunkt eine Anreicherung der CeAJ-Komponenten sichtbar, d.h. es wird auch die apiko-basale Polarität initiiert. Dieser Vorgang wird als zytoplasmatische Polarisierung zusammengefasst (Leung et al., 1999). Die Anordnung der Darmzellen während der zytoplasmatischen Polarisierung ist bereits dokumentiert worden, und beinhaltet die Ausrichtung von sechs Zellpaaren zu einer dorsalen Reihe, und von zwei Zellpaaren zu einer ventraler Reihe (Leung et al., 1999; s. Abb. 2). Diese Anordnung der sechzehn Darmzellen scheint für die wildtypische Musterbildung und der Elongation des Darmes notwendig zu sein. In *hda-1(RNAi)* Embryonen ist die Anordnung der Darmzellen zum Zeitpunkt der zytoplasmatischen Polarisierung beeinträchtigt (s. Abb. 38C, D), was eine erhebliche Abweichung von der wildtypischen Musterbildung des Darms verursacht (s. Abb.

37B, vgl. Abb. 3). Eine klare Differenzierung der Darmzellen in dorsaler und ventraler Zellreihe ist in *hda-1(RNAi)* Embryonen nicht möglich. Die Darmzellen sind vielmehr zu einer Art Zyste zusammengelagert (s. Abb. 38C, D). In *vang-1* Embryonen hingegen können keine Abweichungen in der Anordnung der Zellen während der zytoplasmatischen Polarisierung beobachtet werden (s. Abb. 15), was darauf hinweist, daß dieser Prozeß unabhängig von der PCP reguliert werden könnte.

Der *hda-1(RNAi)* Phänotyp kann durch den Funktionsverlust von GSK-3 (s. Abb. 27A) und SRC-1 (s. Abb. 43B) reproduziert werden. In *gsk-3(RNAi)* und in *src-1(RNAi)* ist die Musterbildung jeweils erheblich beeinträchtigt, sodaß kein elongierter Darm entstehen kann. Die Darmzellen sind in *gsk-3(RNAi)* und *src-1(RNAi)*, wie in *hda-1(RNAi)*, ebenfalls zu einer Art Zyste angelagert. Ein direkter Zusammenhang zwischen den Homologen der Proteinen HDA-1, GSK-3 und SRC-1 (s.u.) in Vertebraten stellt sich wie folgt dar. Das HDA-1 Säuger-Homologe HDAC reprimiert in Zellkultur die Expression von E-Cadherin und benötigt dabei den Transkriptionsfaktor Snail (Peinado et al., 2004). Snail selbst wird über Phosphorylierung durch GSK-3 inhibiert (Schlessinger und Hall, 2004; Bachelder et al., 2005). Diese Regulation der Zelladhäsion über die E-Cadherin Expression durch HDAC und GSK-3 hat einen großen Einfluss auf den epithelial-mesenchymalen Übergang (EMT, "epithelial mesenchymal transition") der Zellen. Dabei kann die EMT dadurch verhindert werden, daß die Expression von E-Cadherin bei einem Funktionsverlust von HDAC oder Snail erhalten bleibt (Peinado et al., 2004). Demgegenüber kann die EMT unterstützt werden, wenn GSK-3 inhibiert wird und folgend die E-Cadherin Expression durch Snail ungehindert reprimiert werden kann (Bachelder et al., 2005).

In *C. elegans* weist die Ausprägung des identischen Phänotyps in *hda-1(RNAi)* und *gsk-3(RNAi)* auf eine putative Verbindung von HDA-1 zu GSK-3 hin, möglicherweise in der Regulation des gleichen Prozeßes. Zum Zeitpunkt der zytoplasmatischen Polarisierung wird der zur EMT entgegengesetzte Prozeß, ein mesenchymal-epithelialer Übergang (MET, "mesenchymal epithelial transition"), ausgeprägt, welcher in Vertebraten durch den Funktionsverlust von GSK-3 induziert werden kann (Bachelder et al., 2005). Es ist vorstellbar, daß in *C. elegans* die Interferenz mit

Signalwegen, die diesen Übergang regulieren, zu der oben beschriebenen Zystenbildung führen könnte. Die in Vertebraten “gegenläufige” Funktion von HDAC und GSK-3 in der Regulation von EMT und MET liefert allerdings keine direkte Erklärung, warum der Phänotyp in *hda-1(RNAi)* und *gsk-3(RNAi)* identisch ist. Die Regulation der Zelladhäsion könnte dennoch einen zentralen Aspekt darstellen. In Vertebraten geschieht diese Regulation hauptsächlich über die Expressionskontrolle von E-Cadherin, welches in *C. elegans* wie bereits vermutet eine redundante Funktion in der Vermittlung der Zelladhäsion übernehmen könnte (Costa et al., 1998; Segbert et al., 2004). Der Funktionsverlust der einzelnen Komponenten des CCC (HMP-1, HMP-2 und HMR-1) über RNAi führt dabei jeweils zu keiner Zystenbildung (s. Abb. 29). Der CCC alleine ist also nicht für die durch *hda-1(RNAi)* und *gsk-3(RNAi)* verursachte Zystenbildung verantwortlich, und würde hier eine redundante Funktion in der Vermittlung der Zelladhäsion übernehmen. Um ein zum CCC redundantes System in der Regulation der EMT, und somit der Zelladhäsion, zu identifizieren, könnten in einer *hmp-1* (α -Catenin) Mutante (Stamm JJ862; Costa et al., 1998) über RNAi gezielt vorhergesagte oder bereits charakterisierte Adhäsionsmoleküle ausgeschaltet werden. Kandidaten für eine zum CCC redundante Funktion in der Regulation der EMT und der Zelladhäsion würden hierbei unter DIK-Optik über die Anlagerung der Darmzellen zu einer Zyste isoliert werden können. Der Vergleich zum RNAi-Phänotyp im Wildtyp ist allerdings notwendig, da der putative Kandidat schon alleine eine Zystenbildung verursachen könnte.

Interessanterweise kann eine zystenartige Anlagerung der Darmzellen, wie sie bei einem Funktionsverlust von HDA-1, GSK-3 oder SRC-1 beobachtet werden kann, auch herbeigeführt werden, wenn die E Blastomere physikalisch isoliert und im Nährmedium für die weitere Entwicklung kultiviert wird (s. Abb. 46; Leung et al., 1999). Eine Zystenbildung der E-Zellen tritt auch auf, wenn alle anderen Blastomeren durch Laser ablatiert werden (Leung et al., 1999).

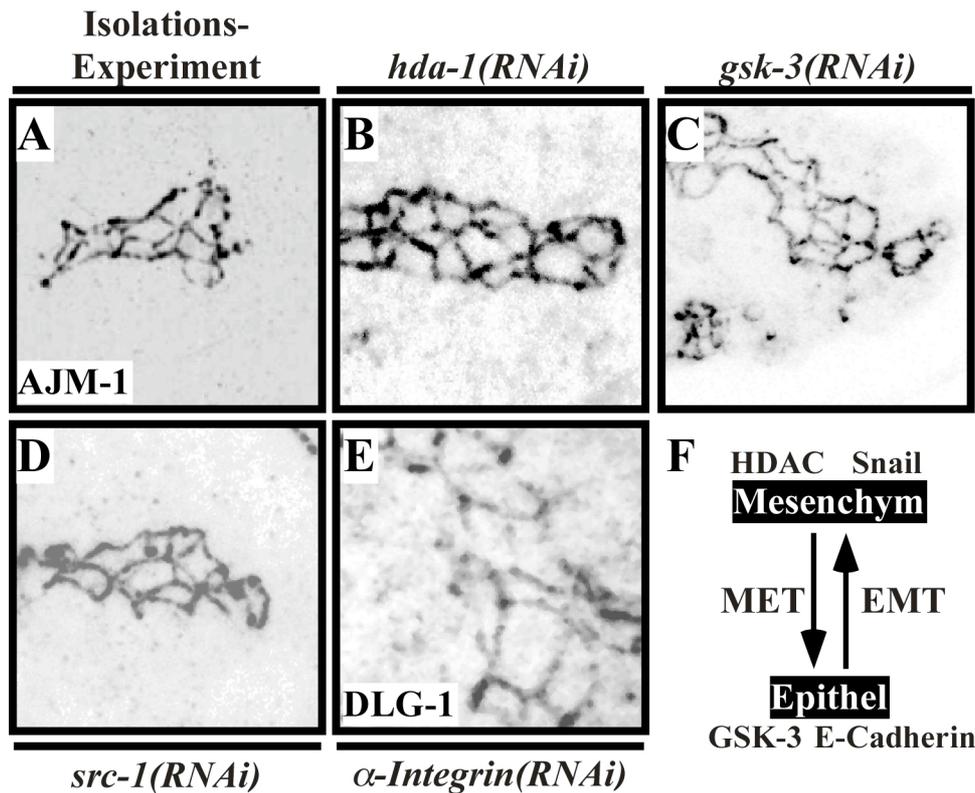


Abb. 46: Übersicht der Experimente, die zu einer zystenartigen Anlagerung der Darmzellen führen

Gezeigt sind die jeweiligen Herausvergrößerungen des Darmepithels. (A-E) Antikörperfärbungen gegen den CeAJ Marker AJM-1 (A-D) und DLG-1 (E) in verschiedenen RNAi Hintergründen (B-E) und an isolierten E-Blastomeren (A; modifiziert nach Leung et al. 1999). Die Musterbildung ist in allen Ansätzen erheblich betroffen, was zu einer Beeinträchtigung in der Elongation des Darmes führt. (F) In Vertebraten wird der epithelial-mesenchymale Übergang (EMT, "epithelial mesenchymal transition") und der mesenchymal-epitheliale Übergang (MET, "mesenchymal epithelial transition") durch HDAC, Snail und GSK-3 reguliert. Snail und HDAC reprimieren die Expression von E-Cadherin. Dadurch wird die EMT begünstigt. GSK-3 reprimiert Snail. Dadurch ist die E-Cadherin Expression nicht vermindert, und die MET kann ausgebildet werden (Zusammengefasst aus Bachelder et al., 2005; Peinado et al., 2004).

Diese Beobachtungen liefern einen Hinweis, daß die Darmzellen die Kommunikation mit anderen Geweben benötigen, um eine korrekte Anordnung zu gewährleisten. Diese Kommunikation könnte über Komponenten der ECM ablaufen, da der Funktionsverlust von HDA-1, einem Regulator der ECM-Komposition (Whetstine et al., 2005), eine zystenartige Anlagerung der Darmzellen zeigt (s. Abb. 38C, D). Möglicherweise geschieht die Kommunikation dabei über eine ECM-Integrin Interaktion. Integrine sind z.B. an der Regulation der Zelladhäsion beteiligt, um Prozesse wie die CE in *Xenopus* oder die EMT während der Nephrogenese in der

Maus zu vermitteln (Marsden und DeSimone, 2003; Kanwar et al., 2004). Das HDA-1 steuert auch die Expression von Typ IV-Kollagenen, die als Substrat für Integrine dienen können (Hall et al., 1990; Whetstin et al., 2005). Die Basalmembran der Darmzellen in *C. elegans* beinhaltet Typ IV-Kollagene, welche von den Muskelzellen bereitgestellt werden (Graham et al., 1994). Der Funktionsverlust des putativen α -Integrins zeigt wie der Funktionsverlust des HDA-1 eine zystenartige Anlagerung der Darmzellen (s. Abb. 41), was die hier genannte Hypothese, daß die ECM für die Regulation der Zellanordnung während der zytoplasmatischen Polarisierung benötigt wird, ebenfalls unterstützt.

Als weiterer Hinweis für die Regulation der Musterbildung im Darm durch Integrine wird gewertet, daß der Funktionsverlust der Tyrosinkinase SRC-1 zu einer zystenartigen Anlagerung der Darmzellen führt (s. Abb. 43B). SRC-1 Homologe in Vertebraten spielen im Integrin-Signalweg bei der ECM-Integrin-Interaktion und die durch Integrine vermittelte Zelladhäsion eine große Rolle (Li et al., 2002; Arias-Salgado et al., 2003). In *C. elegans* ist SRC-1 an der Regulation der Wanderungsrichtung der distalen Endzellen (DTC, "distal tip cell") beteiligt (Itoh et al., 2005). Die DTCs werden für die Gonadenentwicklung benötigt, und determinieren über ihre Wanderungsrichtung die Form der Gonade (Kimble und Hirsh, 1979; Hedgecock et al., 1987). Für die Wanderungsrichtung benötigen die DTCs verschiedene extrazelluläre Signale, wobei SRC-1 womöglich die Funktion als Signalvermittler übernimmt (Itoh et al., 2005). Ein direkter Bezug von SRC-1 zu Integrinen, wie er in Vertebraten besteht, ist in *C. elegans* jedoch noch nicht gezeigt worden.

5.4 *C. elegans* als mögliches Modellsystem für planare Zellpolarität

Um planare Zellpolarität studieren zu können, wird ein System benötigt, in dem Defekte und Abweichungen in der Ausprägung der durch diese Polarität vermittelten Strukturen leicht erkennbar sind. Die etablierten Systeme wie das Auge oder der Flügel von *Drosophila*, oder die Neuralleiste von *Xenopus* bieten die Möglichkeit, Abweichungen in der durch die PCP vermittelten Morphologie eines Organs leicht zu

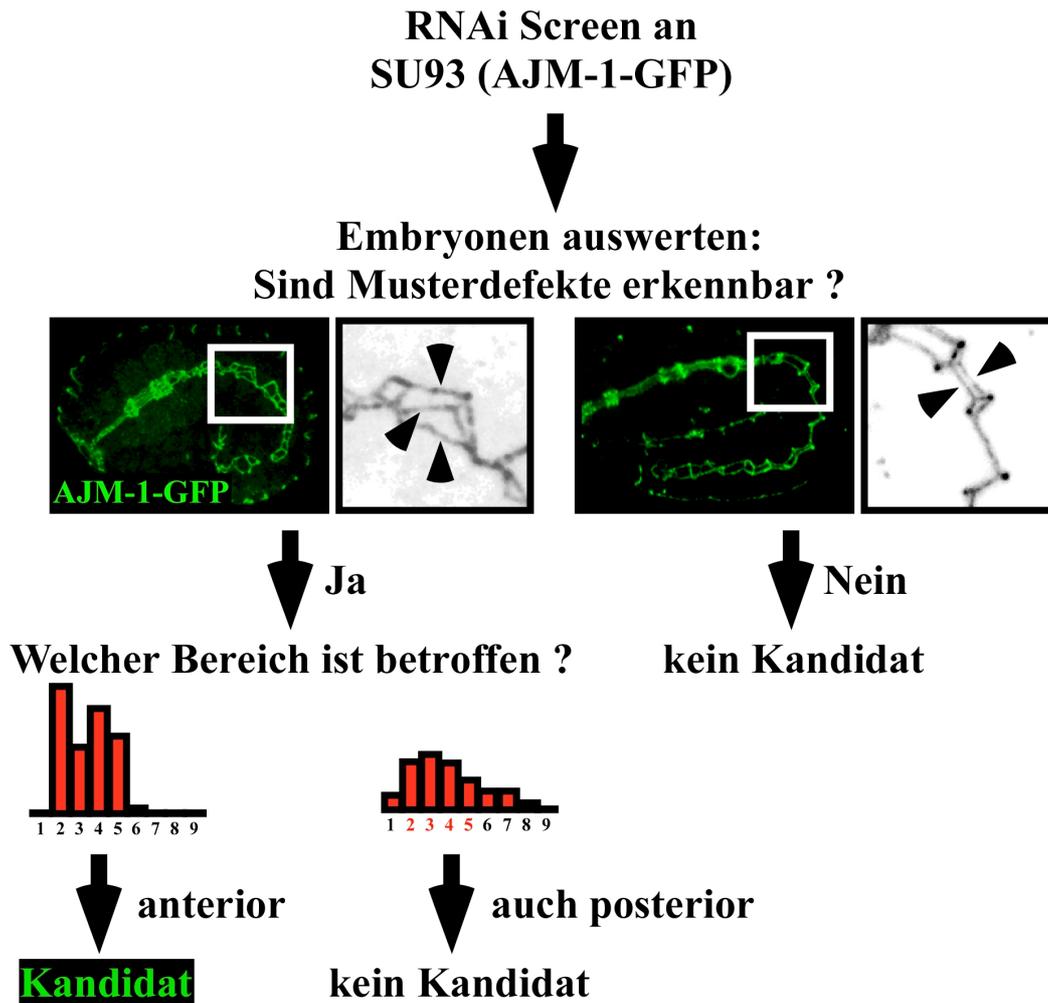


Abb. 47: Fließdiagramm zur Durchführung eines RNAi-Screens zur Identifizierung von Regulatoren der Interkalation im Darmepithel

Der RNAi Screen wird an dem Stamm SU93 durchgeführt, der einen CeAJ-Marker als GFP-Fusionsprotein exprimiert, um eine schnelle Darstellung des Ce-AJ Musters der Darmzellen zu gewährleisten. Die für diesen Screen notwendige RNAi-Bibliothek ist kommerziell erhältlich und beinhaltet 87% der Vorhergesagten Gene in *C. elegans* (Geneservice, England; Homepage der Firma www.geneservice.co.uk). In der Auswertung wird darauf geachtet, daß nur der anteriore Darmbereich von den Musterdefekten betroffen ist. Die heraus isolierten Kandidaten können im Folgenden einer genaueren Analyse, z.B. einer Charakterisierung der VANG-1 Lokalisation, unterzogen werden.

erkennen. Der Darm von *C. elegans* besitzt Aufgrund seiner einfachen Organisation aus exakt zwanzig Zellen und der invarianten Entwicklung ebenfalls das Potenzial, Abweichungen im Ablauf der Morphogenese leicht erkennen zu können. Dieses System wäre unter der Voraussetzung einzusetzen, daß die PCP in *C. elegans* tatsächlich existiert und zudem die Interkalation reguliert. Allerdings wird diese Annahme durch die oben diskutierten Hinweise (Asymmetrie, Phänotyp, Reproduzierbarkeit) unterstützt. Um neue Komponenten der PCP in *C. elegans* zu

identifizieren, würde es genügen, das CeAJ-Muster des Darmes oder der Hypodermis in verschiedenen genetischen Hintergründen zu analysieren, und mit dem *vang-1* Phänotyp zu vergleichen (Abb. 47). Der Darm von *C. elegans* besitzt dabei möglicherweise eine anterior-posteriore Polarität, die eine festgelegte Anordnung der Darmzellen gewährleistet und dadurch ein konstantes Muster der CeAJ garantiert. Jedenfalls liefert diese Invariabilität des wildtypischen CeAJ Musters die Grundlage, um Gene zu identifizieren, die an der Interkalation beteiligt sind. Um eine große Anzahl möglicher Kandidaten zu isolieren, käme hier die Technik der RNAi zum Einsatz, die es erlaubt, systematische oder sogar genomweite Analysen durchzuführen (Lee et al., 2003; Sönnichsen et al., 2005; s. Einleitung). In diesem "RNAi Screen" könnte ein bereits etablierter Stamm verwendet werden, der einen CeAJ Marker, das AJM-1-GFP, exprimiert, um eine schnelle Auswertung zu gewährleisten (Köppen et al., 2001). Ein Nachteil des *C. elegans* PCP Systems wäre, daß der eigentliche Prozeß der Interkalation der Darmzellen bisher im Detail noch nicht dargestellt werden konnte (Leung et al., 1999). Der Vorteil allerdings ist, daß der PCP-Phänotyp bereits nach etwa 400 Minuten noch in der Embryonalentwicklung beobachtet werden kann (Leung et al., 1999), was so in keinem anderen System möglich ist.

6 Material und Methoden

6.1 Chemikalien, Materialien und Geräte

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 und autoklaviert.

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

Allgemeine Geräte:

Elektrotransformationen:	Gene Pulser II und Puls Controller Plus (BioRad, München)
UV-Spektrometer:	Gene Quant II (Pharmarcia Biotech, Cambridge, England)
	und UV-160 (Shizmadzu Deutschland GmbH, Duisburg)
Zentrifugen:	Biofuge pico (Heraeus instruments, Düsseldorf) J21-C (Beckman instruments, Palo Alto, USA)
Mikropipettenpuller:	Sutter P-97 (Science products, Hofheim)
Ultraschallgerät:	Labsonic U (Braun Biotech, Melsungen)
SDS-PAGE & Western-Blotting:	Mini Protean II (BioRad, München)
PCR-Geräte:	PTC-200 (MJ Research, Watertown, USA) Primus 25 advanced (PEQLAB, Erlangen)

Mikroskope:

- Zeiss Axiophot 2 (Zeiss, Oberkochen), gekoppelt mit einer Sony 3 CCD Color Videokamera
- konfokales Lasermikroskop Leica TCS NT (Leica, Heidelberg)
- inverses Mikroskop Leica DM IRB, gekoppelt mit einem Mikromanipulator Piezo Manipulator PM10, Science products, Hofheim

Injektionen von dsRNA oder Überexpressionskonstrukten 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

Kitsysteme:

- MAXIscript T7, *Ambion*, Austin, USA: Synthese von dsRNA
- Nucleobond AX, *Machery-Nagel*, Düren: Aufreinigung von Plasmid DNA
- NucleoSpin Extract, *Machery-Nagel*, Düren: Aufreinigung von DNA
- OneStep RT-PCR Kit, *Qiagen*, Hilden: cDNA Synthese

Sequenzanalysen:

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

Bildbearbeitung:

Bilder als Rohdaten wurden auf einem eMac (Apple, Ismaning) mit den Bildverarbeitungsprogrammen Adobe Photoshop CS (Adobe Systems, San Jose; USA) und CanvasTM X (Deneba Systems, Miami, USA) bearbeitet.

6.2 Molekularbiologische Methoden

Die folgenden molekularen Standardmethoden und Medien wurden im wesentlichen wie beschrieben durchgeführt und angesetzt (Sambrock, Fritsch, Maniatis 2nd Edition 1989, Molecular Cloning): **Klonierung von DNA** (Kap.1.53), **Restriktionsanalyse von Plasmid DNA** (Kap.1.85), **Transformation kompetenter Zellen mit DNA** (Kap.1.74), **DNA Gelelektrophorese** (Kap.4.39), **Polymerase Kettenreaktion (PCR)** (Kap.14.18), **reverse Transkriptase PCR (RTPCR)** (Kap.14.20), **Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen** (Kap.9.32), **SDS PAGE** (Kap.18.47), **Immuno-Blotting (Western Blotting)** (Kap.18.60).

6.2.1 Isolation genomischer DNA

(modifiziert nach Williams, 95).

Würmer werden in einem Reaktionsgefäß gesammelt. Es folgen drei Waschschrte, indem die Würmer jeweils für 1 min bei 5000 rpm zentrifugiert werden. Der Überstand wird jeweils abgenommen, danach folgt eine Zugabe von 750µl dH₂O. Nach dem letzten Waschschrte wird der Überstand soweit wie möglich entfernt und die Würmer werden für 10 min in flüssigen Stickstoff gegeben. Eine Haltung bei -70°C ist ab hier möglich. Der Ansatz wird aufgetaut, dann erfolgt eine Zugabe von 1 Vol. 2x Lysis Puffer und eine Inkubation für 1 h bei 60°C. Anschließend folgt eine Inkubation für 15 min bei 95°C. Der Ansatz wird auf Eis auf 4°C abgekühlt. Abschließend eine Phenol/Chloroform Extraktion mit Resuspension in 30µl dH₂O.

2x Lysis Puffer (frisch ansetzen):

2x PCR Puffer (Mg²⁺ frei)

5 mM MgCl₂

0,9% Nonidet P-40

0,9% Tween-20

0,02% Gelatin

0,12 µg/µl Proteinase K

6.2.2 Isolation von RNA über TRIzol®

(Modifiziert nach Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Würmer werden in einem Reaktionsgefäß gesammelt und anschließend für 1 min bei 5000 rpm zentrifugiert. Für eine RTPCR sind wenige Würmer (20) ausreichend. Der Überstand wird verworfen. 1 ml TRIzol® wird zu dem Wurmpellet gegeben, kurz gevortexed und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgt eine Zentrifugation für 10 min bei 13000 rpm und 4°C. Der Überstand wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 200µl Chloroform versetzt, 15 sek leicht geschüttelt und für 3 min bei Raumtemperatur inkubiert. Hiernach wird der Ansatz 15 min bei 13000 rpm und 4°C zentrifugiert. Die Obere Phase wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit 500µl Isopropanol versetzt, invertiert und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgt eine Zentrifugation für 10 min bei 13000 rpm und 4°C, der Überstand wird danach verworfen. Der Ansatz wird mit 100µl 75% DEPC-Ethanol versetzt und für 5 min bei 8000 rpm und 4°C gewaschen. Dann folgt eine Trocknung für 10 min unter einer heißen Lampe, der getrocknete Ansatz wird in 25µl DEPC-H₂O für 10 min bei 60°C resuspendiert.

6.2.3 *in vitro* Transkription

Doppelsträngige RNA für RNAi-Experimente wird ausgehend von dem jeweiligen pPD129.36 Konstrukt (s. 6.2.10.1), welches zwei flankierende T7-Promotoren besitzt, in einer Reaktion durch *in vitro* Transkription hergestellt. Das Template für die Transkriptionsreaktion wird mittels einer Standard-PCR-Reaktion mit spezifischen Primern hergestellt. Es werden für die Reaktion 2µl der unaufgereinigten PCR eingesetzt. 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 wird 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 und wird in 15µl DEPC-Wasser resuspendiert. Die RNA wird schließlich in Aliquots von 2µl bei -70°C aufbewahrt.

6.2.4 *in vitro* Translation

Die für *in vitro* Interaktionstests wie den Pulldown (s. 6.2.5) benötigten Peptide können über eine *in vitro* Transkription/Translation synthetisiert werden. Der Vektor mit dem zu translatierenden Fremdanteil benötigt bei diesem Ansatz einen T7-Promotor (z.B. im pGBKT7).

Ansatz:

- 25µl Retikulozyten Lysat (= 1 Aliquot)
- 2µl TNT-Puffer
- Xµl Vektor (1µg)

- 1 μ l Aminosäuren-Mix
- 1 μ l transcend tRNA (baut markiertes K ein)
- 1 μ l RNase Inhibitor
- 1 μ l T7-Polymerase

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

Lösung:

Ammoniumacetat-Stopplösung: 5M Ammoniumacetat, 100mM EDTA

6.2.5 Pulldown Assay

Ein *in vitro* Nachweis für eine Protein-Protein Interaktion 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. 6.2.4) 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. Es wurde eine mögliche Interaktion von DLG-1 und VANG-1 über einen Pulldown verifiziert.

Ein Pulldown-Ansatz sieht wie folgt aus:

5 μ g His-Tag Protein mit 20 μ l Ni-NTA Matrix , 0.25 μ l Proteaseinhibitoren und 80 μ l Puffer mischen

2h bei RT auf dem Schüttler inkubieren

4x mit je 500 μ l Puffer waschen (d.h. gut schütteln und bei 1000 rpm ca. 1 min zentrifugieren)

Zugabe von 20 μ l *in vitro* translatiertes Protein, 0.25 μ l Proteaseinhibitoren und 1mg/ml BSA, auffüllen auf 100 μ l 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

6.2.6 Hefe 2-Hybrid Interaktionstest

Eine über Nacht-Kultur (in YPDA) des Y190 Hefestammes wird auf OD₆₀₀ 0.2 verdünnt und dann bis zur exponentiellen Phase bei 30°C schüttelnd inkubiert (OD₆₀₀ zwischen 0.6-0.8). Der weitere Ablauf geschieht wie folgt:

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 300 μ l resuspendieren.

15min bei 30°C inkubieren.

In der Zwischenzeit DNA vorbereiten: 2 μ l Heringssperm DNA, 1 μ g zu transformierende Plasmid DNA (pGBKT7 und pACT Konstrukte) und 300 μ l 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.

Es folgt der X-Gal Interaktionstest, bei dem die in der Hefe gebildeten und interagierenden Fusionsproteine über die Aktivierung der β-Galaktosidase einen blauen Niederschlag bilden. 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:

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 nitrogen base without amino acids" in 850ml dH₂O auflösen, autoklavieren, 100ml 10x Dropout Lösung und 50ml 40% Glukose hinzufügen.

SD-Agar: 15g Agar pro Liter SD

10x Dropout Lösung: 300mg/l L-Isoleuzin, 1500mg/l L-Valin, 300mg/l L-Adenin 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

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

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

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

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

6.2.7 Hefestamm

Der Stamm Y190 (Clontech, Palo Alto, USA) wurde für den Hefe 2-Hybrid Test verwendet.

6.2.8 Bakterienstämme

Es wurden folgende Bakterienstämme der Spezies *Escherichia coli* verwendet: XL1blue (Stratagene, Heidelberg), M15[pREP4] (Qiagen, Hilden), HT₁₁₅(D_E) (CGC, Minnesota).

Medien:

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

6.2.9 Vektoren

pBluescript II KS +/- (Stratagene, Heidelberg), pQE30 (Qiagen, Hilden), pPD129.36 (L440 "feeding vektor"; Timmons, 1998), pGBKT7 (Clontech, Heidelberg), pACT2 (Clontech, Heidelberg), pEGFP-N1 (Clontech, Heidelberg).

6.2.10 Konstrukte

6.2.10.1 RNAi:

Um RNAi über Feeding/Injektion durchführen zu können, muss die Zielsequenz im Vektor pPD129.36 vorliegen. Folgende Sequenzen wurden durch kommerziell erhältliche pPD129.36-Konstrukte des Geneservice Ltd, Cambridge ausgeschaltet: *dsh-2*, ZK637.3, *ces-1*, *lin-39*, *unc-44*, *cfz-2*, *gsk-3*, *lin-12*, *shn-1*.

Die folgenden Konstrukte wurden freundlicherweise von D. van Fürden (Düsseldorf) zur Verfügung gestellt: *let-21*, *let-805*, *hmp-1*, *hmp-2*, *hmr-1*.

Folgende RNAi-Konstrukte wurden über eine Umklonierung aus der jeweiligen cDNA (freundlicherweise von J. Kohara, Japan) hergestellt: *spc-1*, yk19h9, XhoI und NcoI 1232bp. *src-1*, yk117f2, HindII 874bp. *mes-1*, yk1157h05, BglII 1834bp.

Folgende RNAi-Konstrukte wurden von C. Segbert/O. Bossinger (Düsseldorf) zur Verfügung gestellt: *apr-1*, *bar-1*, *hda-1*.

Folgende Konstrukte wurden über RTPCR mit den angegebenen Primern und entsprechender Klonierung in den pPD129.36 hergestellt. Die Konstrukte wurden jeweils über eine Sequenzierung (Agowa, Berlin) und Restriktionsverdau verifiziert: pPD129.36 Sequenzier Primer:

for GATAACCGTATTACCGCCTTTG

vang-1, for 5'-GTGCCGGGGTACCTCGTATCAAG-3'

rev 5'-CCCACGGTACCAACTGCCGACTC-3' über KpnI, 1599bp

jnk-1, for CCTGTGGGTACCGAGGAACGATTATC

rev AAAACGGTACCTCAGGAATAAATGTC über KpnI, 1389bp

dsh-1, for ATGATGAATTCGGCTCTACAACAAC

rev TTGGGGATCCTCTCATTGCATTTCG

dsh-2, for CTTCAGAATTCTTTCAAGCATCAC

rev CATTGGATCCATAGCATTCGTGGC

mig-5, for GAAAGGGATCCTCAGAAGACCGTATG

rev ACAGCCTGCAGTACCCAAACTCCAAC

Für die Injektion von dsRNA, die korrespondierend zur genomischen DNA-Sequenz ist, wurden die Primer mit T7-Bindetsellen (unterschieden) versehen, und das PCR Produkt direkt für eine *in vitro* Transkription (s. 6.2.3) eingesetzt.

vang-1 genomisch, for

TAATACGACTCACTATAGGCGAAAATTCAGAAGCGGGTA

rev TAATACGACTCACTATAGAGCGGTCAGTGAGTCCATCT

6.2.10.2 Hefe Interaktionstests:

pACT2-VANGCT, for TGTCAGGGGATCCTTGAAAGATACG
 rev CAAACCTCGAGCTAATTGCTAATTTT, BamHI, XhoI
 pACT2-VANGCTdESAV, for TGTCAGGGGATCCTTGAAAGATACG
 rev CAAACCTCGAGCTAATTGCTAATTTT, BamHI, XhoI
 pGBKT7-EGL15, for GTCCATGGTGTGCAAACAAACTACTAC
 rev CTAACTGCAGTCAAAATTTCGGGT, NcoI, PstI

Die folgenden Hefe Interaktions-Konstrukte wurden von C. Segbert/O. Bossinger (Düsseldorf) zur Verfügung gestellt: pGBKT7-DSH-2 PDZ, pGBKT7-MIG-5 PDZ, PGBKT7-DSH-1 PDZ.

6.2.10.3 Proteinsynthese:

pQE30-VANG-1CT (s. Antikörperproduktion)

6.2.10.4 Antikörperproduktion:

Der VANG-1 Antikörper wurde von Eurogentec, Belgien über die Immunisierung von zwei Kaninchen hergestellt. Das Antigen wurde von C. Segbert (Düsseldorf) unter Verwendung des folgenden Konstruktes synthetisiert, und nach Standard-Protokoll über Centricons® (Millipore, Homepage der Firma: www.millipore.com) aufgereinigt.

pQE30-VANG-1CT, vorwärts 5'-TGTCAGGGGATCCTTTGAAAGATAC-3',
 rückwärts 5'-CTAGCCGGTACCTCAAACTGCCGAC-3' (BamHI und KpnI; 987bp
 Fragment; 329aa -FERY...-ESAV)

6.2.10.5 Überexpressionen:

Der Überexpressionsvektor wurde wie folgt hergestellt: Ursprungsvektor pPD49.78 (Bestandteil des "Fire-Vektor-Kit"; A.Fire, Stanford), Ausschneiden der *hsp16-2* Promotorsequenz mit NsiI und KpnI, ersetzen durch die *elt-2* Promotorsequenz (freundlicherweise von J. McGhee zur Verfügung gestellt). Die Konstrukte wurden über die jeweilige Sequenzierung (Agowa, Berlin) verifiziert. Als Template der *vang-1* Sequenz für diese Konstrukte diente das pPD129.36-*vang-1* Konstrukt (s.o.), und wurde über PCR mit den folgenden Primern amplifiziert und kloniert. Alle Konstrukte wurden über KpnI (untersuchen) hergestellt. Die Konstrukte pOECS-*vang-1* FL, pOECS-*vang-1* dN und pOECS-*vang-1* dESAV wurden von C. Segbert/O. Bossinger, Düsseldorf hergestellt.

pOECS-*vang-1* FL, for 5'-GTGCCGGGGTACCTCGTATCAAG-3'
 rev 5'-CCCACGGTACCAACTGCCGACTC-3'.
 pOECS-*vang-1* dN, for 5'-TGTCAGGGGGTACCTTTGAAAGATAC-3'
 rev 5'-CCCACGGTACCAACTGCCGACTC-3'.
 pOECS-*vang-1* dESAV, for 5'-GTGCCGGGGTACCTCGTATCAAG-3'
 rev 5'-CAAACGGTACCCTAATTGCTAATTTT-3'

Das Überexpressionskonstrukt pOECS-*vang-1* dC+GFP+ESAV wurde wie folgt hergestellt:

Als Template der GFP Sequenz diente der Vektor pEGFP-N1 (s.o.). Zunächst wurde die GFP-Sequenz in den pBluescript II KS (s.o.) über eine PCR mit den folgenden Primern kloniert:

for 5'-TCGAATTCATGGTGAGCAAG-3' (EcoRI)

rev 5'-GCGGATCCTTACTTGTACAGCTC-3' (BamHI)

In dieses Konstrukt wurde der Bereich kloniert, der für die N-terminale Region von VANG-1 kodiert. Als Template diente hier das pPD129.36-*vang-1* Konstrukt (s.o.). Benutzt wurden die folgenden Primer:

for 5'-GTGCCGGGGTACCTCGTATCAAG-3' (KpnI)

rev 5'-CAGCGAATTCACGAAGCTCGAG-3' (EcoRI)

Dieses Konstrukt diente als Template für die abschließende PCR mit den folgenden Primern, welche in den pOECS kloniert worden ist (über KpnI):

for 5'-TGGGTACCTCGTATCAAGATAACAG-3'

rev 5'-CAGGTACCTCAAACCTGCCGACTCCTTGTACAGCTCGTCCAT-3'

Kinase Assay:

pQE30-VANG-1CT (s. Antikörperproduktion)

pGBKT7-EGL-15, for GTCCATGGTGTGCAAACAAACTAC

rev CTAAGTGCAGTCAAATTCGGGT (über NcoI und PstI). Dieses Konstrukt exprimiert die C-terminalen 494 AS (inklusive der Kinase-Domäne) von EGL-15 (-VCKQ...KPEF) in einer *in vitro* transkription/translation (s. 4.2.3/4.2.4).

6.3 Zellbiologische Methoden

6.3.1 Analyse von transgenen Stämmen

C. elegans wird im wesentlichen gehalten wie beschrieben (Brenner, 1974). Die folgenden Stämme wurden vom Caenorhabditis Genetics Center (CGC), Minnesota erhalten:

N2 (Varietät Bristol, Wildtyp); *egl-15*(NH2963); *egl-17*(MT3188); *clr-1*(MT4035); *ptp-3* (CZ540); *lin-17*(MT3807); *wrm-1*(VC519); pJM87, J. McGhee; *jnk-1*(VC8); *unc-44*(CB1260). Die folgenden Stämme wurden im Rahmen des National

Bioresource Project (NBP, Japan) isoliert und erhalten: *vang-1*(tm1422), wurde im Rahmen dieser Arbeit 2 mal ausgekreuzt (s.u.); C05D9.3(tm0353); *cdh-6*(tm0304).

Die Spezifität des VANG-1 Antikörpers (s. 6.2.10.4) wurde positiv an der Defizienz TY2071 getestet, in der u.a. der *vang-1* Locus deletiert ist.

Die folgenden Konstrukte wurden für Überexpressionsstudien jeweils zusammen mit dem Markerplasmid RRF4 (*rol-6*, dominanter Marker) in die Gonade eines Adulten Wurmes injiziert (s. 6.3.3.1), um einen transgenen Stamm zu erzeugen: pOECS-*vang-1* FL, pOECS-*vang-1* dN, pOECS-*vang-1* dESAV, pOECS-*vang-1* dC+GFP+ESAV. Die Nachkommen jeder Generation wurden über den Marker selektiert und gehalten.

6.3.2 Auskreuzen der *vang-1* Mutante

In drei Ansätzen wurde ein *tm1422* Hermaphrodit im L4 Stadium mit jeweils fünf WT Männchen auf einer kleinen Agarplatte gehalten. Aus der F1 Generation wurden drei Larven vereinzelt und auf kleinen Agarplatten gehalten. Jeweils fünf Larven aus jeder

F2 Generation wurden erneut vereinzelt und die Nachkommen auf die für *vang-1* typischen Defekte in der Musterbildung (s. Ergebnisse *vang-1* Mutante) hin untersucht. Desweiteren wurde die Zahl der Nachkommen kontrolliert, da die *vang-1* Mutante eine reduzierte Nachkommenzahl zeigt. Von den so behandelten Linien konnte eine Linie isoliert werden. Die Prozedur wurde mit dieser Linie wiederholt, sodaß letztlich das Allel tm1422 zwei mal ausgekreuzt vorlag. Zur Kontrolle wurde eine RTPCR an dieser Linie durchgeführt (Sequenz s. Anhang).

6.3.3 Die Technik der RNA vermittelten Interferenz

6.3.3.1 Mikroinjektion

Um in *C.elegans* mit Hilfe der RNAi-Technik die Funktion eines bestimmten Genes auszuschalten, wird in die Gonade dsRNA injiziert (s. Einleitung). 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 *A.dest.* 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.

6.3.3.2 RNAi über Feeding

RNAi kann über das Füttern spezieller RNase III-defizienter Bakterien (HT115, s. 6.2.8) erfolgen. Diese Bakterien müssen die Zielsequenz der RNAi in einem bestimmten Vektor (pPD129.36, s. 6.2.10.1) über Transformation (s. 6.2) 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.

6.3.3.3 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. 6.3.8) und Antikörperfärbungen (s. 6.3.7) verwendet.

6.3.4 Herstellung Polylysin-beschichteter Objektträger und Deckgläser

Für Antikörperfärbungen an Embryonen (s. 6.3.7) werden diese auf Polylysin-beschichtete Objektträger transferiert. 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

8 µl der gebrauchsfertigen Lösung werden auf einem sauberen Objektträger gleichmäßig ausgestrichen und luftgetrocknet.

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 (DIK)-Mikroskopie werden die Embryonen und Larven beobachtet (s. 6.3.8).

6.3.5 Herstellung Agarose-beschichteter Objektträger und Deckgläser

6.3.5.1 Für *in vivo*-Beobachtung

Um Embryonen *in vivo* beobachten zu können (siehe Abschnitt 6.3.8) werden sie auf Agarose-beschichtete Objektträger transferiert. Hierfür wird eine 2-3% Agaroselösung in dH₂O in der Mikrowelle aufgeköcht und ein Tropfen dieser Lösung auf einen Objektträger gegeben. Durch Auflegen eines zweiten Objektträgers wird die Agarose gespreizt. Nach dem Erhärten der Agarose wird der zweite Objektträger durch vorsichtiges Hin- und Herschieben entfernt.

6.3.5.2 Für Mikroinjektion

Für die Mikroinjektion (s. 6.3.3.1) werden Agarose-beschichtete Deckgläser benötigt. Hierfür wird ebenfalls eine 2-3% Agaroselösung in dH₂O aufgeköcht. Diese wird auf einem Deckglas gespreizt und 2-3 Stunden bei 70°C bis zur Austrocknung der Agarose inkubiert.

6.3.6 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. Die so freigesetzten Embryonen werden mit einer fein ausgezogenen Pasteurpipette aufgesaugt und für die folgenden Untersuchungen auf einen Agarose- bzw. Polylysinbeschichteten Objektträger überführt.

6.3.7 Antikörperfärbungen 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 (s. 6.3.8)

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.

Alternativ ist eine PFA-(Paraformaldehyd) Fixierung der Embryonen möglich. Hierfür werden die Präparate wie oben beschrieben angefertigt. Die Fixierung erfolgt bei -20°C in einer 4%igen PFA-Lösung in TBST für 30min. Hierfür wird $100\mu\text{l}$ der Fixierungslösung auf das Präparate gegeben, mit einem Deckglas versehen und in eine feuchte Kammer gelegt. Es folgen drei Waschrunde mit TBST (s.o.) für jeweils 5min. Die Inkubation mit primären und sekundären Antikörper ist wie oben beschrieben.

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

Bezeichnung	Ursprung	Antigen	Einzusetzen	Referenz
anti-HMP-1	Maus	α -Catenin	1:2	Costa et al., 1998
MH27	Maus	AJM-1	1:10	Francis und Waterston, 1985
anti-DLG-1	Rabbit	DLG-1	1:200	Segbert et al., 2004
anti-VANG-1	Rabbit	VANG-1	1:50	diese Arbeit
Anti-GFP	Maus	GFP	1:100	Invitrogen
Anti-HDA-1	Rabbit	HDA-1	1:300	Dufourq et al., 2002

6.3.8 Auswertung von Embryonen

Für *in vivo* Beobachtungen mit DIK-Mikroskopie wurde ein Zeiss Axioptot 2 (Zeiss, Oberkochen), gekoppelt mit einer Sony 3 CCD Colour Video-Kamera benutzt. Die aufgenommenen Bilder wurden über auf einen angeschlossenen Macintosh PowerPC gespeichert, und gegebenenfalls in das Bildverarbeitungsprogramm Photoshop (s.o.) importiert. Die Auswertung der Antikörperfärbungen erfolgte am konfokalen Lasermikroskop Leica TCS NT (Leica, Heidelberg). Von den Embryonen wurden in der Regel Schnittprojektionen aufgenommen und ausgewertet, wobei die Abstände der einzelnen Schnitte zwischen $0,5$ und $1\mu\text{m}$ groß waren.

Um die asymmetrische Lokalisation von VANG-1 darzustellen, wurden nur die einzelnen Schnittebenen ausgewertet und dargestellt. Im Zusammenhang mit den Musterdefekten im Darm von *C. elegans* wurden jeweils Statistiken erstellt. Dabei

wurden Antikörperfärbungen gegen den CeAJ-Marker AJM-1 (s. 6.3.7) am Zeiss Axiophot 2 betrachtet. Die Embryonen wurden über die Position der Defekte in der Musterbildung gezählt. Exemplarisch sind jeweils Schnittprojektionen aufgenommen worden.

7 Literaturverzeichnis

- Aberle, H., Bauer, A., Stappert, J., Kispert, A. und Kemler, R. (1997). beta-catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway. *Embo J* **16**, 3797-804.
- Adler, P. N., Charlton, J. und Liu, J. (1998). Mutations in the cadherin superfamily member gene *dachsous* cause a tissue polarity phenotype by altering frizzled signaling. *Development* **125**, 959-68.
- Akai, J., Halley, P. A. und Storey, K. G. (2005). FGF-dependent Notch signaling maintains the spinal cord stem zone. *Genes Dev* **19**, 2877-87.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. und Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* **215**, 403-10.
- Angst, B. D., Marcozzi, C. und Magee, A. I. (2001). The cadherin superfamily. *J Cell Sci* **114**, 625-6.
- Arias-Salgado, E. G., Lizano, S., Sarkar, S., Brugge, J. S., Ginsberg, M. H. und Shattil, S. J. (2003). Src kinase activation by direct interaction with the integrin beta cytoplasmic domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 13298-302.
- Axelrod, J. D. und McNeill, H. (2002). Coupling planar cell polarity signaling to morphogenesis. *ScientificWorldJournal* **2**, 434-54.
- Bachelder, R. E., Yoon, S. O., Franci, C., de Herreros, A. G. und Mercurio, A. M. (2005). Glycogen synthase kinase-3 is an endogenous inhibitor of Snail transcription: implications for the epithelial-mesenchymal transition. *J Cell Biol* **168**, 29-33.
- Bastock, R., Strutt, H. und Strutt, D. (2003). Strabismus is asymmetrically localised and binds to Prickle and Dishevelled during Drosophila planar polarity patterning. *Development* **130**, 3007-14.
- Behrens, J., von Kries, J. P., Kuhl, M., Bruhn, L., Wedlich, D., Grosschedl, R. und Birchmeier, W. (1996). Functional interaction of beta-catenin with the transcription factor LEF-1. *Nature* **382**, 638-42.
- Bei, Y., Hogan, J., Berkowitz, L. A., Soto, M., Rocheleau, C. E., Pang, K. M., Collins, J. und Mello, C. C. (2002). SRC-1 and Wnt signaling act together to specify endoderm and to control cleavage orientation in early C. elegans embryos. *Dev Cell* **3**, 113-25.
- Beiman, M., Shilo, B. Z. und Volk, T. (1996). Heartless, a Drosophila FGF receptor homolog, is essential for cell migration and establishment of several mesodermal lineages. *Genes Dev* **10**, 2993-3002.
- Bendtsen, J. D., Nielsen, H., von Heijne, G. und Brunak, S. (2004). Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *J Mol Biol* **340**, 783-95.
- Bennett, V. und Chen, L. (2001). Ankyrins and cellular targeting of diverse membrane proteins to physiological sites. *Curr Opin Cell Biol* **13**, 61-7.
- Bialkowska, K., Saido, T. C. und Fox, J. E. (2005). SH3 domain of spectrin participates in the activation of Rac in specialized calpain-induced integrin signaling complexes. *J Cell Sci* **118**, 381-95.
- Bienz, M. und Clevers, H. (2000). Linking colorectal cancer to Wnt signaling. *Cell* **103**, 311-20.
- 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.
- Bokel, C. und Brown, N. H. (2002). Integrins in development: moving on, responding to, and sticking to the extracellular matrix. *Dev Cell* **3**, 311-21.

- Borland, C. Z., Schutzman, J. L. und Stern, M. J. (2001). Fibroblast growth factor signaling in *Caenorhabditis elegans*. *Bioessays* **23**, 1120-30.
- 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.
- Boutros, M., Paricio, N., Strutt, D. I. und Mlodzik, M. (1998). Dishevelled activates JNK and discriminates between JNK pathways in planar polarity and wingless signaling. *Cell* **94**, 109-18.
- Branda, C. S. und Stern, M. J. (2000). Mechanisms controlling sex myoblast migration in *Caenorhabditis elegans* hermaphrodites. *Dev Biol* **226**, 137-51.
- Buck, C. A. und Horwitz, A. F. (1987). Integrin, a transmembrane glycoprotein complex mediating cell-substratum adhesion. *J Cell Sci Suppl* **8**, 231-50.
- Bulow, H. E., Boulin, T. und Hobert, O. (2004). Differential functions of the *C. elegans* FGF receptor in axon outgrowth and maintenance of axon position. *Neuron* **42**, 367-74.
- 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.
- Burgess, W. H. und Maciag, T. (1989). The heparin-binding (fibroblast) growth factor family of proteins. *Annu Rev Biochem* **58**, 575-606.
- Chae, J., Kim, M. J., Goo, J. H., Collier, S., Gubb, D., Charlton, J., Adler, P. N. und Park, W. J. (1999). The *Drosophila* tissue polarity gene starry night encodes a member of the protocadherin family. *Development* **126**, 5421-9.
- 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.
- Chen, Z. und Han, M. (2001). *C. elegans* Rb, NuRD, and Ras regulate *lin-39*-mediated cell fusion during vulval fate specification. *Curr Biol* **11**, 1874-9.
- 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.
- Cui, M. und Han, M. (2003). Cis regulatory requirements for vulval cell-specific expression of the *Caenorhabditis elegans* fibroblast growth factor gene *egl-17*. *Dev Biol* **257**, 104-16.
- Darken, R. S., Scola, A. M., Rakeman, A. S., Das, G., Mlodzik, M. und Wilson, P. A. (2002). The planar polarity gene *strabismus* regulates convergent extension movements in *Xenopus*. *Embo J* **21**, 976-85.
- Das, G., Jenny, A., Klein, T. J., Eaton, S. und Mlodzik, M. (2004). Diego interacts with Prickle and *Strabismus/Van Gogh* to localize planar cell polarity complexes. *Development* **131**, 4467-76.

- Das, G., Reynolds-Kenneally, J. und Mlodzik, M. (2002). The atypical cadherin Flamingo links Frizzled and Notch signaling in planar polarity establishment in the *Drosophila* eye. *Dev Cell* **2**, 655-66.
- De Calisto, J., Araya, C., Marchant, L., Riaz, C. F. und Mayor, R. (2005). Essential role of non-canonical Wnt signalling in neural crest migration. *Development* **132**, 2587-97.
- Deshpande, R., Inoue, T., Priess, J. R. und Hill, R. J. (2005). lin-17/Frizzled and lin-18 regulate POP-1/TCF-1 localization and cell type specification during *C. elegans* vulval development. *Dev Biol* **278**, 118-29.
- DeVore, D. L., Horvitz, H. R. und Stern, M. J. (1995). An FGF receptor signaling pathway is required for the normal cell migrations of the sex myoblasts in *C. elegans* hermaphrodites. *Cell* **83**, 611-20.
- Doherty, P. und Walsh, F. S. (1996). CAM-FGF Receptor Interactions: A Model for Axonal Growth. *Mol Cell Neurosci* **8**, 99-111.
- Doudney, K. und Stanier, P. (2005). Epithelial cell polarity genes are required for neural tube closure. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* **135**, 42-7.
- Doyle, D. A., Lee, A., Lewis, J., Kim, E., Sheng, M. und MacKinnon, R. (1996). Crystal structures of a complexed and peptide-free membrane protein-binding domain: molecular basis of peptide recognition by PDZ. *Cell* **85**, 1067-76.
- Drees, F., Pokutta, S., Yamada, S., Nelson, W. J. und Weis, W. I. (2005). Alpha-catenin is a molecular switch that binds E-cadherin-beta-catenin and regulates actin-filament assembly. *Cell* **123**, 903-15.
- Eaton, S. (1997). Planar polarization of *Drosophila* and vertebrate epithelia. *Curr Opin Cell Biol* **9**, 860-6.
- Eaton, S. (2003). Cell biology of planar polarity transmission in the *Drosophila* wing. *Mech Dev* **120**, 1257-64.
- Egan, C. R., Chung, M. A., Allen, F. L., Heschl, M. F., Van Buskirk, C. L. und McGhee, J. D. (1995). A gut-to-pharynx/tail switch in embryonic expression of the *Caenorhabditis elegans* ges-1 gene centers on two GATA sequences. *Dev Biol* **170**, 397-419.
- Eisenmann, D. M., Maloof, J. N., Simske, J. S., Kenyon, C. und Kim, S. K. (1998). The beta-catenin homolog BAR-1 and LET-60 Ras coordinately regulate the Hox gene lin-39 during *Caenorhabditis elegans* vulval development. *Development* **125**, 3667-80.
- Fanto, M. und McNeill, H. (2004). Planar polarity from flies to vertebrates. *J Cell Sci* **117**, 527-33.
- Fath, K. R. und Burgess, D. R. (1995). Microvillus assembly. Not actin alone. *Curr Biol* **5**, 591-3.
- Favello, A., Hillier, L. und Wilson, R. K. (1995). Genomic DNA sequencing methods. *Methods Cell Biol* **48**, 551-69.
- Feiguin, F., Hannus, M., Mlodzik, M. und Eaton, S. (2001). The ankyrin repeat protein Diego mediates Frizzled-dependent planar polarization. *Dev Cell* **1**, 93-101.
- 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.
- Fukushige, T., Goszczynski, B., Yan, J. und McGhee, J. D. (2005). Transcriptional control and patterning of the *pho-1* gene, an essential acid phosphatase expressed in the *C. elegans* intestine. *Dev Biol* **279**, 446-61.

- Fukushige, T., Hawkins, M. G. und McGhee, J. D. (1998). The GATA-factor *elt-2* is essential for formation of the *Caenorhabditis elegans* intestine. *Dev Biol* **198**, 286-302.
- Gengyo-Ando, K. und Mitani, S. (2000). Characterization of mutations induced by ethyl methanesulfonate, UV, and trimethylpsoralen in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Biochem Biophys Res Commun* **269**, 64-9.
- Gettner, S. N., Kenyon, C. und Reichardt, L. F. (1995). Characterization of beta pat-3 heterodimers, a family of essential integrin receptors in *C. elegans*. *J Cell Biol* **129**, 1127-41.
- Glazer, L. und Shilo, B. Z. (1991). The *Drosophila* FGF-R homolog is expressed in the embryonic tracheal system and appears to be required for directed tracheal cell extension. *Genes Dev* **5**, 697-705.
- Glickman, N. S., Kimmel, C. B., Jones, M. A. und Adams, R. J. (2003). Shaping the zebrafish notochord. *Development* **130**, 873-87.
- Goodman, S. J., Branda, C. S., Robinson, M. K., Burdine, R. D. und Stern, M. J. (2003). Alternative splicing affecting a novel domain in the *C. elegans* EGL-15 FGF receptor confers functional specificity. *Development* **130**, 3757-66.
- Goodwin, M. und Yap, A. S. (2004). Classical cadherin adhesion molecules: coordinating cell adhesion, signaling and the cytoskeleton. *J Mol Histol* **35**, 839-44.
- Goszczyński, B. und McGhee, J. D. (2005). Reevaluation of the role of the *med-1* and *med-2* genes in specifying the *Caenorhabditis elegans* endoderm. *Genetics* **171**, 545-55.
- Goto, T., Davidson, L., Asashima, M. und Keller, R. (2005). Planar cell polarity genes regulate polarized extracellular matrix deposition during frog gastrulation. *Curr Biol* **15**, 787-93.
- Goto, T. und Keller, R. (2002). The planar cell polarity gene *strabismus* regulates convergence and extension and neural fold closure in *Xenopus*. *Dev Biol* **247**, 165-81.
- Greene, N. D., Gerrelli, D., Van Straaten, H. W. und Copp, A. J. (1998). Abnormalities of floor plate, notochord and somite differentiation in the loop-tail (Lp) mouse: a model of severe neural tube defects. *Mech Dev* **73**, 59-72.
- Grishok, A. (2005). RNAi mechanisms in *Caenorhabditis elegans*. *FEBS Lett* **579**, 5932-9.
- Gross, L. A., Baird, G. S., Hoffman, R. C., Baldrige, K. K. und Tsien, R. Y. (2000). The structure of the chromophore within DsRed, a red fluorescent protein from coral. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 11990-5.
- Gubb, D., Green, C., Huen, D., Coulson, D., Johnson, G., Tree, D., Collier, S. und Roote, J. (1999). The balance between isoforms of the prickly LIM domain protein is critical for planar polarity in *Drosophila* imaginal discs. *Genes Dev* **13**, 2315-27.
- Hall, D. E., Reichardt, L. F., Crowley, E., Holley, B., Moezzi, H., Sonnenberg, A. und Damsky, C. H. (1990). The alpha 1/beta 1 and alpha 6/beta 1 integrin heterodimers mediate cell attachment to distinct sites on laminin. *J Cell Biol* **110**, 2175-84.
- Hall, D. H. und Hedgecock, E. M. (1991). Kinesin-related gene *unc-104* is required for axonal transport of synaptic vesicles in *C. elegans*. *Cell* **65**, 837-47.
- Harrington, R. J., Gutch, M. J., Hengartner, M. O., Tonks, N. K. und Chisholm, A. D. (2002). The *C. elegans* LAR-like receptor tyrosine phosphatase PTP-3 and the

- VAB-1 Eph receptor tyrosine kinase have partly redundant functions in morphogenesis. *Development* **129**, 2141-53.
- Harris, B. Z., Lau, F. W., Fujii, N., Guy, R. K. und Lim, W. A. (2003). Role of electrostatic interactions in PDZ domain ligand recognition. *Biochemistry* **42**, 2797-805.
- Harris, B. Z. und Lim, W. A. (2001). Mechanism and role of PDZ domains in signaling complex assembly. *J Cell Sci* **114**, 3219-31.
- Hawkins, M. G. und McGhee, J. D. (1995). elt-2, a second GATA factor from the nematode *Caenorhabditis elegans*. *J Biol Chem* **270**, 14666-71.
- Hawkins, N. C., Ellis, G. C., Bowerman, B. und Garriga, G. (2005). MOM-5 frizzled regulates the distribution of DSH-2 to control *C. elegans* asymmetric neuroblast divisions. *Dev Biol* **284**, 246-59.
- Hedgecock, E. M., Culotti, J. G., Hall, D. H. und Stern, B. D. (1987). Genetics of cell and axon migrations in *Caenorhabditis elegans*. *Development* **100**, 365-82.
- Hedgecock, E. M. und White, J. G. (1985). Polyploid tissues in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol* **107**, 128-33.
- Heid, P. J., Raich, W. B., Smith, R., Mohler, W. A., Simokat, K., Gendreau, S. B., Rothman, J. H. und Hardin, J. (2001). The zinc finger protein DIE-1 is required for late events during epithelial cell rearrangement in *C. elegans*. *Dev Biol* **236**, 165-80.
- Hermann, G. J., Leung, B. und Priess, J. R. (2000). Left-right asymmetry in *C. elegans* intestine organogenesis involves a LIN-12/Notch signaling pathway. *Development* **127**, 3429-40.
- Hoier, E. F., Mohler, W. A., Kim, S. K. und Hajnal, A. (2000). The *Caenorhabditis elegans* APC-related gene apr-1 is required for epithelial cell migration and Hox gene expression. *Genes Dev* **14**, 874-86.
- Huang, P. und Stern, M. J. (2004). FGF signaling functions in the hypodermis to regulate fluid balance in *C. elegans*. *Development* **131**, 2595-604.
- Huber, O., Bierkamp, C. und Kemler, R. (1996). Cadherins and catenins in development. *Curr Opin Cell Biol* **8**, 685-91.
- Huelsken, J. und Behrens, J. (2002). The Wnt signalling pathway. *J Cell Sci* **115**, 3977-8.
- 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.
- Hynes, R. O., Marcantonio, E. E., Stepp, M. A., Urry, L. A. und Yee, G. H. (1989). Integrin heterodimer and receptor complexity in avian and mammalian cells. *J Cell Biol* **109**, 409-20.
- Itoh, B., Hirose, T., Takata, N., Nishiwaki, K., Koga, M., Ohshima, Y. und Okada, M. (2005). SRC-1, a non-receptor type of protein tyrosine kinase, controls the direction of cell and growth cone migration in *C. elegans*. *Development* **132**, 5161-72.
- Jeanny, J. C., Fayein, N., Moenner, M., Chevallier, B., Barritault, D. und Courtois, Y. (1987). Specific fixation of bovine brain and retinal acidic and basic fibroblast growth factors to mouse embryonic eye basement membranes. *Exp Cell Res* **171**, 63-75.
- Jenny, A., Reynolds-Kenneally, J., Das, G., Burnett, M. und Mlodzik, M. (2005). Diego and Prickle regulate Frizzled planar cell polarity signalling by competing for Dishevelled binding. *Nat Cell Biol* **7**, 691-7.

- Kamath, R. S., Fraser, A. G., Dong, Y., Poulin, G., Durbin, R., Gotta, M., Kanapin, A., Le Bot, N., Moreno, S., Sohrmann, M., Welchman, D. P., Zipperlen, P. und Ahringer, J. (2003). Systematic functional analysis of the *Caenorhabditis elegans* genome using RNAi. *Nature* **421**, 231-7.
- Kang, B. S., Cooper, D. R., Jelen, F., Devedjiev, Y., Derewenda, U., Dauter, Z., Otlewski, J. und Derewenda, Z. S. (2003). PDZ tandem of human syntenin: crystal structure and functional properties. *Structure* **11**, 459-68.
- Kanwar, Y. S., Wada, J., Lin, S., Danesh, F. R., Chugh, S. S., Yang, Q., Banerjee, T. und Lomasney, J. W. (2004). Update of extracellular matrix, its receptors, and cell adhesion molecules in mammalian nephrogenesis. *Am J Physiol Renal Physiol* **286**, F202-15.
- Kawakami, Y., Capdevila, J., Buscher, D., Itoh, T., Rodriguez Esteban, C. und Izpisua Belmonte, J. C. (2001). WNT signals control FGF-dependent limb initiation and AER induction in the chick embryo. *Cell* **104**, 891-900.
- Kawakami, Y., Wada, N., Nishimatsu, S. und Nohno, T. (2000). Involvement of frizzled-10 in Wnt-7a signaling during chick limb development. *Dev Growth Differ* **42**, 561-9.
- Keller, R. (2002). Shaping the vertebrate body plan by polarized embryonic cell movements. *Science* **298**, 1950-4.
- Keller, R. E., Danilchik, M., Gimlich, R. und Shih, J. (1985). The function and mechanism of convergent extension during gastrulation of *Xenopus laevis*. *J Embryol Exp Morphol* **89 Suppl**, 185-209.
- Kibar, Z., Vogan, K. J., Groulx, N., Justice, M. J., Underhill, D. A. und Gros, P. (2001). Ltap, a mammalian homolog of *Drosophila* Strabismus/Van Gogh, is altered in the mouse neural tube mutant Loop-tail. *Nat Genet* **28**, 251-5.
- Kimble, J. und Hirsh, D. (1979). The postembryonic cell lineages of the hermaphrodite and male gonads in *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol* **70**, 396-417.
- Klingensmith, J., Nusse, R. und Perrimon, N. (1994). The *Drosophila* segment polarity gene *dishevelled* encodes a novel protein required for response to the wingless signal. *Genes Dev* **8**, 118-30.
- Knust, E. (1994). Control of epithelial cell polarity in *Drosophila*. *Trends Genet* **10**, 275-80.
- Knust, E. und Bossinger, O. (2002). Composition and formation of intercellular junctions in epithelial cells. *Science* **298**, 1955-9.
- Kokel, M., Borland, C. Z., DeLong, L., Horvitz, H. R. und Stern, M. J. (1998). *clr-1* encodes a receptor tyrosine phosphatase that negatively regulates an FGF receptor signaling pathway in *Caenorhabditis elegans*. *Genes Dev* **12**, 1425-37.
- Koppen, 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.
- Korswagen, H. C. (2002). Canonical and non-canonical Wnt signaling pathways in *Caenorhabditis elegans*: variations on a common signaling theme. *Bioessays* **24**, 801-10.
- Korswagen, H. C., Coudreuse, D. Y., Betist, M. C., van de Water, S., Zivkovic, D. und Clevers, H. C. (2002). The Axin-like protein PRY-1 is a negative regulator of a canonical Wnt pathway in *C. elegans*. *Genes Dev* **16**, 1291-302.

- Krasnow, R. E. und Adler, P. N. (1994). A single frizzled protein has a dual function in tissue polarity. *Development* **120**, 1883-93.
- Ku, N. O., Zhou, X., Toivola, D. M. und Omary, M. B. (1999). The cytoskeleton of digestive epithelia in health and disease. *Am J Physiol* **277**, G1108-37.
- Lai, E. C. (2004). Notch signaling: control of cell communication and cell fate. *Development* **131**, 965-73.
- Lee, S. S., Lee, R. Y., Fraser, A. G., Kamath, R. S., Ahringer, J. und Ruvkun, G. (2003). A systematic RNAi screen identifies a critical role for mitochondria in *C. elegans* longevity. *Nat Genet* **33**, 40-8.
- 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**, 415-22.
- Leung, B., Hermann, G. J. und Priess, J. R. (1999). Organogenesis of the *Caenorhabditis elegans* intestine. *Dev Biol* **216**, 114-34.
- Li, L., Okura, M. und Imamoto, A. (2002). Focal adhesions require catalytic activity of Src family kinases to mediate integrin-matrix adhesion. *Mol Cell Biol* **22**, 1203-17.
- Li, W., Aurandt, J., Jurgense, C., Rao, Y. und Guan, K. L. (2006). FAK and Src kinases are required for netrin-induced tyrosine phosphorylation of UNC5. *J Cell Sci* **119**, 47-55.
- Lilien, J. und Balsamo, J. (2005). The regulation of cadherin-mediated adhesion by tyrosine phosphorylation/dephosphorylation of beta-catenin. *Curr Opin Cell Biol* **17**, 459-65.
- Lin, X., Buff, E. M., Perrimon, N. und Michelson, A. M. (1999). Heparan sulfate proteoglycans are essential for FGF receptor signaling during *Drosophila* embryonic development. *Development* **126**, 3715-23.
- Litsiou, A., Hanson, S. und Streit, A. (2005). A balance of FGF, BMP and WNT signalling positions the future placode territory in the head. *Development* **132**, 4051-62.
- Luo, W. und Lin, S. C. (2004). Axin: a master scaffold for multiple signaling pathways. *Neurosignals* **13**, 99-113.
- Lux, S. E. und Palek, J. (1995). "Disorders of the red cell membrane. In: Blood: Principles and Practice of Hematology." J.B. Lippincott Co., Philadelphia.
- Ma, D., Yang, C. H., McNeill, H., Simon, M. A. und Axelrod, J. D. (2003). Fidelity in planar cell polarity signalling. *Nature* **421**, 543-7.
- Madden, T. L., Tatusov, R. L. und Zhang, J. (1996). Applications of network BLAST server. *Methods Enzymol* **266**, 131-41.
- Maduro, M. F., Hill, R. J., Heid, P. J., Newman-Smith, E. D., Zhu, J., Priess, J. R. und Rothman, J. H. (2005). Genetic redundancy in endoderm specification within the genus *Caenorhabditis*. *Dev Biol* **284**, 509-22.
- Maloof, J. N., Whangbo, J., Harris, J. M., Jongeward, G. D. und Kenyon, C. (1999). A Wnt signaling pathway controls hox gene expression and neuroblast migration in *C. elegans*. *Development* **126**, 37-49.
- Mao, T. L., Chu, J. S., Jeng, Y. M., Lai, P. L. und Hsu, H. C. (2001). Expression of mutant nuclear beta-catenin correlates with non-invasive hepatocellular carcinoma, absence of portal vein spread, and good prognosis. *J Pathol* **193**, 95-101.

- Marie, D., Vault, D. und Partensky, F. (1996). Application of the novel nucleic acid dyes YOYO-1, YO-PRO-1, and PicoGreen for flow cytometric analysis of marine prokaryotes. *Appl Environ Microbiol* **62**, 1649-55.
- Marsden, M. und DeSimone, D. W. (2003). Integrin-ECM interactions regulate cadherin-dependent cell adhesion and are required for convergent extension in *Xenopus*. *Curr Biol* **13**, 1182-91.
- Matakatsu, H. und Blair, S. S. (2004). Interactions between Fat and Dachshaus and the regulation of planar cell polarity in the *Drosophila* wing. *Development* **131**, 3785-94.
- McKay, S. J., Johnsen, R., Khattra, J., Asano, J., Baillie, D. L., Chan, S., Dube, N., Fang, L., Goszczynski, B., Ha, E., Halfnight, E., Hollebakk, R., Huang, P., Hung, K., Jensen, V., Jones, S. J., Kai, H., Li, D., Mah, A., Marra, M., McGhee, J., Newbury, R., Pouzyrev, A., Riddle, D. L., Sonnhammer, E., Tian, H., Tu, D., Tyson, J. R., Vatcher, G., Warner, A., Wong, K., Zhao, Z. und Moerman, D. G. (2003). Gene expression profiling of cells, tissues, and developmental stages of the nematode *C. elegans*. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **68**, 159-69.
- 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.
- McNeill, H. (2002). Planar polarity: location, location, location. *Curr Biol* **12**, R449-51.
- Mihaly, J., Matusek, T. und Pataki, C. (2005). Diego and friends play again. *Febs J* **272**, 3241-52.
- Miller, J. R., Hocking, A. M., Brown, J. D. und Moon, R. T. (1999). Mechanism and function of signal transduction by the Wnt/beta-catenin and Wnt/Ca²⁺ pathways. *Oncogene* **18**, 7860-72.
- Molenaar, M., van de Wetering, M., Oosterwegel, M., Peterson-Maduro, J., Godsave, S., Korinek, V., Roose, J., Destree, O. und Clevers, H. (1996). XTcf-3 transcription factor mediates beta-catenin-induced axis formation in *Xenopus* embryos. *Cell* **86**, 391-9.
- Montcouquiol, M., Rachel, R. A., Lanford, P. J., Copeland, N. G., Jenkins, N. A. und Kelley, M. W. (2003). Identification of Vangl2 and Scrb1 as planar polarity genes in mammals. *Nature* **423**, 173-7.
- Montcouquiol, M., Sans, N., Huss, D., Kach, J., Dickman, J. D., Forge, A., Rachel, R. A., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., Bogani, D., Murdoch, J., Warchol, M. E., Wenthold, R. J. und Kelley, M. W. (2006). Asymmetric localization of Vangl2 and Fz3 indicate novel mechanisms for planar cell polarity in mammals. *J Neurosci* **26**, 5265-75.
- 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.
- Mooseker, M. S. (1985). Organization, chemistry, and assembly of the cytoskeletal apparatus of the intestinal brush border. *Annu Rev Cell Biol* **1**, 209-41.
- Nelson, W. J. (2003). Adaptation of core mechanisms to generate cell polarity. *Nature* **422**, 766-74.
- Norman, K. R. und Moerman, D. G. (2002). Alpha spectrin is essential for morphogenesis and body wall muscle formation in *Caenorhabditis elegans*. *J Cell Biol* **157**, 665-77.

- Ornitz, D. M. und Itoh, N. (2001). Fibroblast growth factors. *Genome Biol* **2**, REVIEWS3005.
- Ornitz, D. M. und Leder, P. (1992). Ligand specificity and heparin dependence of fibroblast growth factor receptors 1 and 3. *J Biol Chem* **267**, 16305-11.
- Ornitz, D. M., Xu, J., Colvin, J. S., McEwen, D. G., MacArthur, C. A., Coulier, F., Gao, G. und Goldfarb, M. (1996). Receptor specificity of the fibroblast growth factor family. *J Biol Chem* **271**, 15292-7.
- Peinado, H., Ballestar, E., Esteller, M. und Cano, A. (2004). Snail mediates E-cadherin repression by the recruitment of the Sin3A/histone deacetylase 1 (HDAC1)/HDAC2 complex. *Mol Cell Biol* **24**, 306-19.
- Plotnikov, A. N., Schlessinger, J., Hubbard, S. R. und Mohammadi, M. (1999). Structural basis for FGF receptor dimerization and activation. *Cell* **98**, 641-50.
- Podbilewicz, B. und White, J. G. (1994). Cell fusions in the developing epithelial of *C. elegans*. *Dev Biol* **161**, 408-24.
- Popovici, C., Roubin, R., Coulier, F., Pontarotti, P. und Birnbaum, D. (1999). The family of *Caenorhabditis elegans* tyrosine kinase receptors: similarities and differences with mammalian receptors. *Genome Res* **9**, 1026-39.
- Rawls, A. S. und Wolff, T. (2003). Strabismus requires Flamingo and Prickle function to regulate tissue polarity in the *Drosophila* eye. *Development* **130**, 1877-87.
- Rocheleau, C. E., Downs, W. D., Lin, R., Wittmann, C., Bei, Y., Cha, Y. H., Ali, M., Priess, J. R. und Mello, C. C. (1997). Wnt signaling and an APC-related gene specify endoderm in early *C. elegans* embryos. *Cell* **90**, 707-16.
- Rocheleau, C. E., Yasuda, J., Shin, T. H., Lin, R., Sawa, H., Okano, H., Priess, J. R., Davis, R. J. und Mello, C. C. (1999). WRM-1 activates the LIT-1 protein kinase to transduce anterior/posterior polarity signals in *C. elegans*. *Cell* **97**, 717-26.
- Roh, M. H. und Margolis, B. (2003). Composition and function of PDZ protein complexes during cell polarization. *Am J Physiol Renal Physiol* **285**, F377-87.
- Roskoski, R., Jr. (2005). Src kinase regulation by phosphorylation and dephosphorylation. *Biochem Biophys Res Commun* **331**, 1-14.
- Rothman, J. E. (1989). Signal-peptide recognition. GTP and methionine bristles. *Nature* **340**, 433-4.
- 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**, 6741-7.
- Rual, J. F., Ceron, J., Koreth, J., Hao, T., Nicot, A. S., Hirozane-Kishikawa, T., Vandenhaute, J., Orkin, S. H., Hill, D. E., van den Heuvel, S. und Vidal, M. (2004). Toward improving *Caenorhabditis elegans* phenome mapping with an ORFeome-based RNAi library. *Genome Res* **14**, 2162-8.
- Schlesinger, A., Shelton, C. A., Maloof, J. N., Meneghini, M. und Bowerman, B. (1999). Wnt pathway components orient a mitotic spindle in the early *Caenorhabditis elegans* embryo without requiring gene transcription in the responding cell. *Genes Dev* **13**, 2028-38.
- Schlessinger, K. und Hall, A. (2004). GSK-3beta sets Snail's pace. *Nat Cell Biol* **6**, 913-5.
- 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.
- Shemer, G. und Podbilewicz, B. (2003). The story of cell fusion: big lessons from little worms. *Bioessays* **25**, 672-82.

- Sijen, T., Fleenor, J., Simmer, F., Thijssen, K. L., Parrish, S., Timmons, L., Plasterk, R. H. und Fire, A. (2001). On the role of RNA amplification in dsRNA-triggered gene silencing. *Cell* **107**, 465-76.
- Simmer, F., Tijsterman, M., Parrish, S., Koushika, S. P., Nonet, M. L., Fire, A., Ahringer, J. und Plasterk, R. H. (2002). Loss of the putative RNA-directed RNA polymerase RRF-3 makes *C. elegans* hypersensitive to RNAi. *Curr Biol* **12**, 1317-9.
- Simske, J. S. und Hardin, J. (2001). Getting into shape: epidermal morphogenesis in *Caenorhabditis elegans* embryos. *Bioessays* **23**, 12-23.
- Songyang, Z., Fanning, A. S., Fu, C., Xu, J., Marfatia, S. M., Chishti, A. H., Crompton, A., Chan, A. C., Anderson, J. M. und Cantley, L. C. (1997). Recognition of unique carboxyl-terminal motifs by distinct PDZ domains. *Science* **275**, 73-7.
- Sonnichsen, 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.
- Soto, M. C., Qadota, H., Kasuya, K., Inoue, M., Tsuboi, D., Mello, C. C. und Kaibuchi, K. (2002). The GEX-2 and GEX-3 proteins are required for tissue morphogenesis and cell migrations in *C. elegans*. *Genes Dev* **16**, 620-32.
- Sternberg, P. W. (1988). Lateral inhibition during vulval induction in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **335**, 551-4.
- Strutt, D. I. (2001). Asymmetric localization of frizzled and the establishment of cell polarity in the *Drosophila* wing. *Mol Cell* **7**, 367-75.
- Strutt, D. I., Weber, U. und Mlodzik, M. (1997). The role of RhoA in tissue polarity and Frizzled signalling. *Nature* **387**, 292-5.
- Sulston, J. E. und Horvitz, H. R. (1977). Post-embryonic cell lineages of the nematode, *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol* **56**, 110-56.
- 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.
- Szebenyi, G. und Fallon, J. F. (1999). Fibroblast growth factors as multifunctional signaling factors. *Int Rev Cytol* **185**, 45-106.
- 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.
- Takeshita, H. und Sawa, H. (2005). Asymmetric cortical and nuclear localizations of WRM-1/beta-catenin during asymmetric cell division in *C. elegans*. *Genes Dev* **19**, 1743-8.
- Tamkun, J. W., DeSimone, D. W., Fonda, D., Patel, R. S., Buck, C., Horwitz, A. F. und Hynes, R. O. (1986). Structure of integrin, a glycoprotein involved in the transmembrane linkage between fibronectin and actin. *Cell* **46**, 271-82.
- Tawil, N. J., Houde, M., Blacher, R., Esch, F., Reichardt, L. F., Turner, D. C. und Carbonetto, S. (1990). Alpha 1 beta 1 integrin heterodimer functions as a dual laminin/collagen receptor in neural cells. *Biochemistry* **29**, 6540-4.
- Taylor, J., Abramova, N., Charlton, J. und Adler, P. N. (1998). Van Gogh: a new *Drosophila* tissue polarity gene. *Genetics* **150**, 199-210.

- 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.
- Tepass, U., Truong, K., Godt, D., Ikura, M. und Peifer, M. (2000). Cadherins in embryonic and neural morphogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* **1**, 91-100.
- Thomas, G. H. (2001). Spectrin: the ghost in the machine. *Bioessays* **23**, 152-60.
- Thorpe, C. J., Schlesinger, A., Carter, J. C. und Bowerman, B. (1997). Wnt signaling polarizes an early C. elegans blastomere to distinguish endoderm from mesoderm. *Cell* **90**, 695-705.
- Timmons, L. und Fire, A. (1998). Specific interference by ingested dsRNA. *Nature* **395**, 854.
- Tree, D. R., Ma, D. und Axelrod, J. D. (2002). A three-tiered mechanism for regulation of planar cell polarity. *Semin Cell Dev Biol* **13**, 217-24.
- Turner, D. C., Flier, L. A. und Carbonetto, S. (1989). Identification of a cell-surface protein involved in PC12 cell-substratum adhesion and neurite outgrowth on laminin and collagen. *J Neurosci* **9**, 3287-96.
- Usui, T., Shima, Y., Shimada, Y., Hirano, S., Burgess, R. W., Schwarz, T. L., Takeichi, M. und Uemura, T. (1999). Flamingo, a seven-pass transmembrane cadherin, regulates planar cell polarity under the control of Frizzled. *Cell* **98**, 585-95.
- Vinson, C. R., Conover, S. und Adler, P. N. (1989). A Drosophila tissue polarity locus encodes a protein containing seven potential transmembrane domains. *Nature* **338**, 263-4.
- Wada, H., Iwasaki, M., Sato, T., Masai, I., Nishiwaki, Y., Tanaka, H., Sato, A., Nojima, Y. und Okamoto, H. (2005). Dual roles of zygotic and maternal Scribble1 in neural migration and convergent extension movements in zebrafish embryos. *Development* **132**, 2273-85.
- Wallingford, J. B. (2004). Closing in on vertebrate planar polarity. *Nat Cell Biol* **6**, 687-9.
- Wallingford, J. B. und Habas, R. (2005). The developmental biology of Dishevelled: an enigmatic protein governing cell fate and cell polarity. *Development* **132**, 4421-36.
- Wallingford, J. B. und Harland, R. M. (2002). Neural tube closure requires Dishevelled-dependent convergent extension of the midline. *Development* **129**, 5815-25.
- Whetstine, J. R., Ceron, J., Ladd, B., Dufourcq, P., Reinke, V. und Shi, Y. (2005). Regulation of tissue-specific and extracellular matrix-related genes by a class I histone deacetylase. *Mol Cell* **18**, 483-90.
- Williams-Masson, E. M., Heid, P. J., Lavin, C. A. und Hardin, J. (1998). The cellular mechanism of epithelial rearrangement during morphogenesis of the Caenorhabditis elegans dorsal hypodermis. *Dev Biol* **204**, 263-76.
- Wolff, T. und Rubin, G. M. (1998). Strabismus, a novel gene that regulates tissue polarity and cell fate decisions in Drosophila. *Development* **125**, 1149-59.
- Wolff, T. und Rubin, D.F. (1993). "Pattern formation in the Drosophila retina. In The Development of Drosophila melanogaster." Cold Spring Laboratory Press, NY.
- Wong, H. C., Bourdelas, A., Krauss, A., Lee, H. J., Shao, Y., Wu, D., Mlodzik, M., Shi, D. L. und Zheng, J. (2003). Direct binding of the PDZ domain of Dishevelled to a conserved internal sequence in the C-terminal region of Frizzled. *Mol Cell* **12**, 1251-60.

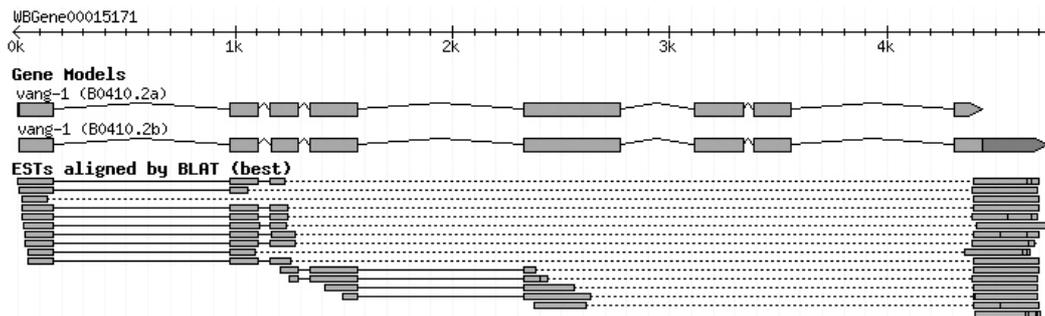
- Yamada, S., Pokutta, S., Drees, F., Weis, W. I. und Nelson, W. J. (2005). Deconstructing the cadherin-catenin-actin complex. *Cell* **123**, 889-901.
- Yang, C. H., Axelrod, J. D. und Simon, M. A. (2002). Regulation of Frizzled by fat-like cadherins during planar polarity signaling in the *Drosophila* compound eye. *Cell* **108**, 675-88.
- Yao, R., Maeda, T., Takada, S. und Noda, T. (2001). Identification of a PDZ domain containing Golgi protein, GOPC, as an interaction partner of frizzled. *Biochem Biophys Res Commun* **286**, 771-8.
- Zamir, E. und Geiger, B. (2001). Components of cell-matrix adhesions. *J Cell Sci* **114**, 3577-9.
- Zeidler, M. P., Perrimon, N. und Strutt, D. I. (1999). Polarity determination in the *Drosophila* eye: a novel role for unpaired and JAK/STAT signaling. *Genes Dev* **13**, 1342-53.
- Zhu, J., Hill, R. J., Heid, P. J., Fukuyama, M., Sugimoto, A., Priess, J. R. und Rothman, J. H. (1997). end-1 encodes an apparent GATA factor that specifies the endoderm precursor in *Caenorhabditis elegans* embryos. *Genes Dev* **11**, 2883-96.

8 Anhang

8.1 Sequenzierung der *vang-1* RTPCR am WT und der *vang-1* Mutante

Die für die Sequenzierung eingesetzten Primer sind:
 for 5'-ATGTCGTATCAAGATAACAGGAAAC-3'
 rev 5'-AAACTGCCGACTCATTGCTAAT-3'

Die Primer flankieren den gesamten pORF, welcher durch ansequenzierte cDNA's aus dem Kohara-Labor (National Inst. of Genetics, Shizuoka, Japan) verifiziert werden kann (s. folgende Abbildung; www.wormbase.org, Release WS157).



vang-1 WT:

```

ATGTCGTATCAAGATAACAGGAAACTTCCGAAAGACACGAGGAGTTGCGT
TGGAGGTTTTTCGGTATGAAGGACACAAGAAGCAACTACGACCAAGATATG
CACAATCTGAAATTGGCGAGCCATTTATACCGAGGTTTTCTGCAATTGCTA
GTGAGGGCCAGAAGATTGCACCACCTAACGAAGACTGGGCAGACAACAC
CACCGTGCTCACTGGAATGACGACGGATTCTTTCACAATGGAAGAAAAAG
TGATTTATACCCACCAATTGGACGTGTCATAGGAAGACGGTGCTCTAGG
TTTGTCTGGCTGTTGGCCTCGTCGTTACTTTGCATTATATCGGTGGTCAGTG
CGCCGATAATGTGTTTCATTGCCTATAATCGCACCACGTTTCGGCTTCAGCA
TGCCGGCAATTCAATGTGACGTCGATTGTGAAGGACTCCTGTTTTTAATGG
CAATCAAACAATCTTTTTGGTAATTGCAATTGGAGTTCCTTATTGGAGGA
AAGCCATGGCAGACATGCCAGGTTGTACTTTGTACGAGCTGCGCTTACA
TTTTAGTCATGTTTATCCTGTTTCGCGTTTTGGCTCTTTACATTGTCAGGA
TAATGTTTGAAGATACGACAACACTACAAGTACATCGTTTCCTATTCCACAT
CACTGCTCGACGCTCTTCTATGGACACATTATCTCTCTGTTGTGCTCCTCG
AGCTTCGTCGTCTACGTGCCCAATTCATTGTAACACTATTGTTTCGCGATCCAG
ACGGTGAAATGCATACATTGAACATTGGCGCTGGCTCAATTCAAGAAGCT
GCCACCGAGATTCTTCGTTTCTACACAACCTCGATTCTCCTCGTTCAACATT
CACCTTGACAACGCCAGACAGACGGCGGTTGCAAAGCAGTCTGGAATGCA
AGGAGGCACCGCAGGCTTCAAGATGTACAATATCGAGCAATTTGGAGGGC
AGGAAACTGTTAGTGAAGTCAACACGCGGGCTTTGATGGAAGCCGCGGCG
AGAAGAAGGATTGGTGGATATGCTGAAGTGATGCAGGAAGAAGACTTGATTT
TGAAAAACGGTTAAAGAAGAGAAAGTATCGCCTAATTGCCGCCGCCGAA
GACGCATTCTCCCATGTTTCAGAACACTGCCGAGTCGGGAACGAACCAAAA
GCCTGGAATTAACAACCAGATGGACTCACTGACCGCTGCTCAAACGTAT
TCACATGGATTGTCCGGCCGCTACCAAATATTTAAAAACTACTCGTCTTC
AGTCAAGACATCCTTCAGGAGAAGTTACGAGGCACATTGAAAGATGCCTA
AACTCAAGTTGTCTCATCGAACATTTCTCCAACGCTTCTTCAGTGACCGT
ATTCCCAACGGGAAATTGTCGGGGAATCGAAATGGTTCGGTAATTTGCGA
  
```

CGAGGCGGTGAGCTCTGGAGTTCAACACGGAACGTATCTAGTGCTCAAAT
 CGCACAACCCAGATATCGACTGCGGAGTTCAACTTGTGGTGCACCATCTCG
 AGTATTCGGTCTTCAATTTGACCGAGCAAGCCAAACCTGGAAATGAAAA
 GTT TTCCTTAAAA ATTAGCAATG AGTCGGCAGTTTGA

vang-1 tm1422:

ATGTCGTATCAAGATAACAGGAAACTTCCGAAAGACACGAGGAGTTGCGT
 TGGAGGTTTTCGGTATGAAGGACACAAGAAGCAACTACGACCAAGATATG
 CACAATCTGAAATTGGCGAGCCATTTATACCGAGGTTTTCTGCAATTGCTA
 GTGAGGTTTCCTATTCCACATCACTGCTCGACGCTCTTCTATGGACACATT
 ATCTCTCTGTTGTGCTCCTCGAGCTTCGTCGTCTACGTGCCCAATTCATTGT
 AACTATTGTTTCGCGATCCAGACGGTGAAATGCATACATTGAACATTGGCG
 CTGGCTCAATTCAAGAAGCTGCCACCGAGATTCTTCGTTTCTACACAACCTC
 GATTCTCCTCGTTCAACATTCACCTTGACAACGCCAGACAGACGGCGGTT
 GCAAAGCAGTCTGGAATGCAAGGAGGCACCGCAGGCTTCAAGATGTACA
 ATATCGAGCAATTTGGAGGGCAGGAAACTGTTAGTGAAGTCAACACGCGG
 GCTTTGATGGAAGCCGCGGCGAGAAGAAGGATTGGTGGATATGCTGAAGT
 GATGCAGGAAGAAGTTGATTTTGA AAAACGGTTAAAGAAGAGAAAGTAT
 CGCCTAATTGCCGCGCCGAAGACGCATTCTCCCATGTTTCAGAACACTGC
 CGAGTCCGGAACGAACCAAAAAGCCTGGAATTAACAACCAGATGGACTCA
 CTGACCGCTGCTCAAAAACGTATTCACATGGATTGTCCGGCCGCTCACCAA
 ATATTTAAAAACTACTCGTCTTCAGTCAAGACATCCTTCAGGAGAAGTTAC
 GAGGCACATTGAAAGATGCCTAACACTCAAGTTGTCTCATCGAACATTTTC
 TCCAACGCTTCTTCAGTGACCGTATTCCTCAACGGGAAATTGTCGGGGAA
 TCGAAATGGTTCGGTAATTTGCGACGAGGCGGTGAGCTCTGGAGTTCAACA
 CGGAACGTATCTAGTGCTCAAATCGCACAACCCAGATATCGACTGCGGAG
 TTCAACTTGTGGTGCACCATCTCGAGTATTCGGTCTTCAATTTGACCGAGC
 AAGCCAAACCTGGAAATGAAAAGTTTTCTTAAAAATTAGCAATGAGTCG
 GCAGTTTGA

8.2 Sequenzierungen der Überexpressionskonstrukte

pOECs-*vang-1* FL:

ATGTCGTATCAAGATAACAGGAAACTTCCGAAAGACACGAGGAGTTGCGT
 TGGAGGTTTTCGGTATGAAGGACACAAGAAGCAACTACGACCAAGATATG
 CACAATCTGAAATTGGCGAGCCATTTATACCGAGGTTTTCTGCAATTGCTA
 GTGAGGGCCAGAAGATTGCACCACCTAACGAAGACTGGGCAGACAACAC
 CACCGTGCTCACTGGAATGACGACGGATTCTTTCACAATGGAAGAAAAAG
 TGATTTATACCCACCAATTGGACGTGTCATAGGAAGACGGTGCTCTAGG
 TTTGTCTGGCTGTTGGCCTCGTCGTTACTTTGCATTATATCGGTGGTCAGTG
 CGCCGATAATGTGTTCAATTGCCTATAATCGCACCACGTTTCGGCTTCAGCA
 TGCCGGCAATTCAATGTGACGTGCGATTGTGAAGGACTCCTGTTTTTAATGG
 CAATCAAAAACAATCTTTTTGGTAATTGCAATTGGAGTTCTTTATTGGAGGA
 AAGCCATGGCAGACATGCCAGGTTGTACTTTGTACGAGCTGCGCTTACA
 TTTTATAGTCATGTTTATCCTGTTTCGCGTTTTGGCTCTTTTACATTGTCAGGA
 TAATGTTTGAAGATACGACAACACTACAAGTACATCGTTTCCTATTCCACAT
 CACTGCTCGACGCTCTTCTATGGACACATTATCTCTCTGTTGTGCTCCTCG
 AGCTTCGTCGTCTACGTGCCCAATTCATTGTAACCTATTGTTTCGCGATCCAG

ACGGTCAAATGCATACATTGAACATTGGCGCTGGCTCAATTCAAGAAGCT
 GCCACCGAGATTCTTCGTTTCTACACAACCTCGATTCTCCTCGTTCAACATT
 CACCTTGACAACGCCAGACAGACGGCGGTTGCAAAGCAGTCTGGAATGCA
 AGGAGGCACCGCAGGCTTCAAGATGTACAATATCGAGCAATTTGGAGGGC
 AGGAAACTGTTAGTGAAGTCAACACGCGGGCTTTGATGGAAGCCGCGGCG
 AGAAGAAGGATTGGTGGATATGCTGAAGTGTGCAGGAAGAAGTGGATTT
 TGAAAAACGGTTAAAGAAGAGAAAGTATCGCCTAATTGCCGCCGCCGAA
 GACGCATTCTCCCATGTTTCAGAACACTGCCGAGTCCGGAACGAACCAAAA
 GCCTGGAATTAACAACCAGATGGACTCACTGACCGCTGCTCAAACGTAT
 TCACATGGATTGTCCGGCCGCTCACCAAATATTTAAAACTACTCGTCTTC
 AGTCAAGACATCCTTCAGGAGAAGTTACGAGGCACATTGAAAGATGCCTA
 AACTCAAGTTGTCTCATCGAACATTTCTCCAACGCTTCTTCAGTGACCGT
 ATTCCCAACGGGAAATTGTCGGGGAATCGAAATGGTTCGGTAATTTGCGA
 CGAGGCGGTGAGCTCTGGAGTTCAACACGGAACGTATCTAGTGCTCAAAT
 CGCACAACCCAGATATCGACTGCGGAGTTCAACTTGTTTGCACCATCTCG
 AGTATTCCGTTCTTCAATTTGACCGAGCAAGCCAAACCTGGAAATGAAAA
 GTTTTCCTTAAAAATTAGCAATGAGTCGGCAGTTTGA

pOECS-*vang-1* dN:

ATGTTTGAAAGATACGACAACCTACAAGTACATCGTTTCCTATTCCACATCA
 CTGCTCGACGCTCTTCTATGGACACATTATCTCTCTGTTGTGCTCCTCGAG
 CTTCGTATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCCGGGGTGGTGCCCAT
 CCTGGTTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCG
 GCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATC
 TGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCCACCCTCGTGACCACCCT
 GACCTACGGCGTGCAGTGCTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGC
 ACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACC
 ATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTT
 CGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCA
 AGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACACTACAACAG
 CCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTG
 AACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGA
 CCACTACCAGCAGAACACCCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCCCG
 ACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAG
 AAGCGCGATCACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCCGGGATCAC
 TCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGATGGACGAGCTGTACAAGGAGTCGG
 CAGTTTGA

pOECS-*vang-1* dC+GFP+ESAV:

ATGTCGTATCAAGATAACAGGAACTTCCGAAAGACACGAGGAGTTGCGT
 TGGAGGTTTTCGGTATGAAGGACACAAGAAGCAACTACGACCAAGATATG
 CACAATCTGAAATTGGCGAGCCATTTATACCGAGGTTTTCTGCAATTGCTA
 GTGAGGGCCAGAAGATTGCACCACCTAACGAAGACTGGGCAGACAACAC
 CACCGTGCTCACTGGAATGACGACGGATTCTTTCACAATGGAAGAAAAAG
 TGATTTATACCCACCAATTGGACGTGTCATAGGAAGACGGTGTCTAGG
 TTTGTCTGGCTGTTGGCCTCGTCGTTACTTTGCATTATATCGGTGGTCAGTG
 CGCCGATAATGTGTTTCATTGCCTATAATCGCACCACGTTTCGGCTTCAGCA
 TGCCGGCAATTCAATGTGACGTCGATTGTGAAGGACTCCTGTTTTTAATGG
 CAATCAAAACAATCTTTTTGGTAATTGCAATTGGAGTTCTTTATTGGAGGA

AAGCCATGGCAGACATGCCAGGTTGTACTTTGTACGAGCTGCGCTTACA
TTTTAGTCATGTTTATCCTGTTTCGCGTTTTGGCTCTTTTACATTGTCAGGA
TAATGTTTGAAGATACGACAACACTACAAGTACATCGTTTCCTATTCCACAT
CACTGCTCGACGCTCTTCTATGGACACATTATCTCTCTGTTGTGCTCCTCG
AGCTTCGTATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCGGGGTGGTGCCC
ATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTG
CGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTC
ATCTGCACCACGGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCCACCCTCGTGACCAC
CCTGACCTACGGCGTGCAGTGCTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAAGC
AGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGC
ACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAA
GTTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACT
TCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACACTACAA
CAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAG
GTGAACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGC
CGACCACTACCAGCAGAACACCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGC
CCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAAC
GAGAAGCGCGATCACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCCGGGAT
CACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGATGGACGAGCTGTACAAGGAGT
CGGCAGTTTGA

pO ECS-*vang-1* dESAV:

ATGTCGTATCAAGATAACAGGAACTTCCGAAAGACACGAGGAGTTGCGT
TGGAGGTTTTTCGGTATGAAGGACACAAGAAGCAACTACGACCAAGATATG
CACAATCTGAAATTGGCGAGCCATTTATACCGAGGTTTTTCTGCAATTGCTA
GTGAGGGCCAGAAGATTGCACCACCTAACGAAGACTGGGCAGACAACAC
CACCGTGCTCACTGGAATGACGACGGATTCTTTCACAATGGAAGAAAAAG
TGATTTATACCCACCAATTGGACGTGTCATAGGAAGACGGTGCTCTAGG
TTTGTCTGGCTGTTGGCCTCGTCGTTACTTTGCATTATATCGGTGGTCAGTG
CGCCGATAATGTGTTTCATTGCCTATAATCGCACCCAGTTTTCGGCTTCAGCA
TGCCGGCAATTCAATGTGACGTCGATTGTGAAGGACTCCTGTTTTTAATGG
CAATCAAAACAATCTTTTTGGTAATTGCAATTGGAGTTCTTTATTGGAGGA
AAGCCATGGCAGACATGCCAGGTTGTACTTTGTACGAGCTGCGCTTACA
TTTTAGTCATGTTTATCCTGTTTCGCGTTTTGGCTCTTTTACATTGTCAGGA
TAATGTTTGAAGATACGACAACACTACAAGTACATCGTTTCCTATTCCACAT
CACTGCTCGACGCTCTTCTATGGACACATTATCTCTCTGTTGTGCTCCTCG
AGCTTCGTCTACGTGCCAATTCAATTGTAAGTATTGTTTCGCGATCCAG
ACGGTGAATGCATACATTGAACATTGGCGCTGGCTCAATTCAAGAAGCT
GCCACCGAGATTCTTCGTTTCTACACAACCTCGATTCTCCTCGTTCAACATT
CACCTTGACAACGCCAGACAGACGGCGGTTGCAAAGCAGTCTGGAATGCA
AGGAGGCACCGCAGGCTTCAAGATGTACAATATCGAGCAATTTGGAGGGC
AGGAAACTGTTAGTGAAGTCAACACGCGGGCTTTGATGGAAGCCGCGGCG
AGAAGAAGGATTGGTGGATATGCTGAAGTGATGCAGGAAGAAGTATTGATTT
TGAAAAACGGTTAAAGAAGAGAAAGTATCGCCTAATTGCCGCCGCGGAA
GACGCATTCTCCCATGTTTCAGAACACTGCCGAGTCCGGAACGAACCAAAA
GCCTGGAATTAACAACCAGATGGACTCACTGACCGCTGCTCAAAACGTAT
TCACATGGATTGTCCGGCCGCTCACCAATATTTAAAAACTACTCGTCTTC
AGTCAAGACATCCTTCAGGAGAAGTTACGAGGCACATTGAAAGATGCCTA
AACTCAAGTTGTCTCATCGAACATTTCTCCAACGCTTCTTCAGTGACCGT

ATTCCCAACGGGAAATTGTCGGGGAATCGAAATGGTCGGTAATTTGCGA
CGAGGCGGTGAGCTCTGGAGTTCAACACGGAACGTATCTAGTGCTCAAAT
CGCACAACCCAGATATCGACTGCGGAGTTCAACTTGTTTGCACCATCTCG
AGTATTCCGTTCTTCAATTTGACCGAGCAAGCCAAACCTGGAAATGAAAA
GTTTTCCTTAAAAATTAGCAATTAG

8.3 Abkürzungen

Abb.	Abbildung
Abs.	Abschnitt
As	Aminosäure
Bp	Basenpaare
ca.	circa
d.h.	das heißt
s.	siehe
s.o.	siehe oben
ü.N.	über Nacht
vgl.	vergleiche
WT	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

Danksagung:

Man stelle sich vor, daß jemand nach einem Jahrzehnt an der Universität diese nun verlassen muss. Wieviele Eindrücke wurden in einer so langen Zeit gesammelt? Wieviele Menschen durfte man kennenlernen, wieviele Geschichten erleben, wieviele gemeinsame Zeit verbringen? Mit dem Abschluß der Promotionsprüfung wird diese einmalige Zeit nun endgültig vorbei sein. Es bleiben die positiven Erinnerungen, welche hoffentlich noch lange verweilen, bis sie verblassen.

Für die große Möglichkeit, mit einem kleinen Wurm zu arbeiten, gilt mein Dank meinem Betreuer und Arbeitsgruppenleiter Olaf Bossinger. Das mit den 6 Litern war gelogen....

Mein besonderer Dank gilt Christoph Segbert. Für die Integration, die Ratschläge ("Da kannst Du Dir ein Ei drauf pellen!"), die Motivation (Freitag Abend, 19:00: "Du bleibst jetzt solange hier, bis der Blot fertig ist!" – Es wurde 0.15 Uhr). Für die Möglichkeit, auch nach 4 Bier und diesem schrecklichen Whisky aus dem Sozialraum noch Antikörperfärbungen auszuwerten. Wenn ich Dir etwas widmen könnte, dann diese Arbeit – aber sie wird nicht gut genug sein.

Das Wormlab. Ort endloser Minis und Midis. Danke Gisela, daß Du mir immer geholfen hast. Danke auch an die vielen "Kleinen" aus der Arbeitsgruppe: Eva, Daniela, Jenny, Robin und Tobias. Der Blot-Tag war ein Erlebnis besonderer Art.

Ich möchte Elisabeth Knust für die Möglichkeit, im Institut für Genetik zu arbeiten, und für die Diskussionen in Seminaren und Vorträgen danken.

Ein großes Danke geht an all diejenigen, die leider aus Platzmangel nur aufgelistet werden können, aber mit schönen Geschichten in Erinnerung verbleiben. Woody, Arno, Ferdi, Isa, Diane, Mirjana, Susann, Sandra, Özlem, Rammí, Walter, Thorsten, Soya, Wiebke, Sirin, Anna, Nadine, Carmen, Johannes, Sonja

Thomas, Du hättest eigentlich eine ganze Seite verdient. Nimm Dir S. 41, die ist besonders schön...

Ein großes Danke an Dani. Die gemeinsame Zeit mit Dir war und ist wunderbar.

