

Drei neu identifizierte Gene in der Morphogenese von *Caenorhabditis elegans*: *pcp-2*, *pcp-3* und *gon-12* sind sowohl während dem dritten Larvalstadium, als auch im alternativen Dauerlarvenstadium aktiv und regulieren die Entwicklung reproduktiver Organe.

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fachbereiche
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von
Stephan Fröde
aus Neuburg

Göttingen 2002

D 7

Referent: Prof. Dr. U. Grossbach

Korreferent: Prof. Dr. W. Engel

Tag der mündlichen Prüfung: 29 . 01 . 2003

Danksagung:

Herrn Prof. Dr. Ulrich Grossbach danke ich für kritisches Lesen des Manuskripts, die Bereitstellung der gegebenen Arbeitsmöglichkeiten, insbesondere für die geeigneten Rahmenbedingungen, unter denen diese Arbeit entstand.

Dank gilt auch meinem Betreuer, Dr. Ekkehard Schulze, für die Bereitstellung dieses interessanten Themas, die Beobachtung der Entwicklung der Arbeit und der dabei gewährten Diskussionsbeiträge, welche die Fortentwicklung maßgeblich beeinflussten.

Dank gilt den folgenden Personen, die unserer Arbeitsgruppe spezifisches *Caenorhabditis elegans* Material überlassen haben, ohne das diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre:

Dr. Einhard Schierenberg für den Wildstamm N2, Theresa Stiernagl vom *Caenorhabditis Genetics Center* (CGC) für alle anderen *C.elegans* Stämme, Dr. Alan Coulson für Cosmidklone, Ralph Baumeister für das Plasmid pRF4 und Dr. Adam Antebi für den RNAi Fütterungsbasisklon L4440 und den zugehörigen *E.coli* Stamm HT115.

Besonderer Dank gilt den Technischen Assistentinnen Hella Timmermann und Hanna Widera für Ihr Interesse an dem Thema und Ihrer ständig großzügigen Unterstützung. Dabei danke ich auch meinem ehemaligen Kollegen und Freund Masoud Bahrami, der mir jederzeit mit Rat und Tat zur Hilfe stand und häufig motivierende Worte fand.

Dabei darf ich mich mit großer Freude auch bei allen Mitarbeitern des III. Zoologischen Instituts - Entwicklungsbiologie bedanken, es herrschte stets eine sehr angenehme Arbeitsatmosphäre und allseitige Hilfsbereitschaft.

Finanzielle Unterstützung erhielt ich von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) im Rahmen des Sonderforschungsbereichs SFB271 „Molekulare Genetik morphoregulatorischer Prozesse“ im Teilprojekt A14 „Molekulare Analyse der Morphogenese der Dauerlarve von *Caenorhabditis elegans*“.

Zuletzt danke ich meinen Eltern für die finanzielle Unterstützung während meines Studiums und der Zeit zur Promotion sowie zusammen mit meiner Schwester und meinen engsten Freunden für Kraft und Lebensfreude, die direkt oder indirekt zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	Seite	i
Generell verwendete Abkürzungen	Seite	i
Genetische Abkürzungen in <i>Caenorhabditis elegans</i>	Seite	iv
Abkürzungen von Proteinen und Proteindomänen	Seite	vi
1 EINLEITUNG	Seite	1
1.1 SIGNALKASKADEN IN DER DETERMINATION DES DAUERLARVENSCHICKSALS	Seite	3
1.1.1 Zwei von <i>daf-6</i> ausgehende Signalwege	Seite	5
1.1.2 Der Insulin-ähnliche Signalweg	Seite	7
1.2 HETEROCHRONE GENE IN DER DAUERLARVENBILDUNG	Seite	8
1.3 DIE ENTSTEHUNG DER VULVA	Seite	10
1.4 ZIELSETZUNG	Seite	11
2 MATERIAL UND METHODEN	Seite	12
2.1 MATERIAL	Seite	12
2.1.1 Genetische Symbole und Nomenklatur	Seite	12
2.1.2 <i>Caenorhabditis elegans</i> Stämme	Seite	13
2.1.3 Cosmidklone	Seite	16
2.1.4 Oligonukleotide	Seite	17
2.1.5 Enzyme für die Molekularbiologie	Seite	22
2.1.6 Plasmide und Bakterienstämme	Seite	22
2.1.7 Chemikalien, Lösungen, Nährmedien und diagnostische Kits	Seite	23
2.1.8 Mikroskopie	Seite	24
2.1.9 Computersoftware	Seite	25

2.2	METHODEN	Seite	26
2.2.1	Molekularbiologie	Seite	26
2.2.1.1	Isolation chromosomaler DNA aus <i>C. elegans</i> Populationen	Seite	26
2.2.1.2	Isolation von Cosmid DNA aus Bakterien	Seite	27
2.2.1.3	Klonierung von Bakterienstämmen für RNAi Experimente	Seite	28
2.2.1.3.1	RNAi gegen <i>pcp-3</i> : pSFsjjF23B2.11, pSFsjjF23B2.11_3UTR und p5'_11_CDS_fed Futterbakterien	Seite	28
2.2.1.3.2	RNAi gegen <i>pcp-2</i> : pSFsjjF23B2.12, pSFsjjF23B2.12_3UTR und p5'_12_CDSfed Futterbakterien	Seite	29
2.2.1.3.3	RNAi gegen <i>pcp-4</i> : pY116F11B.3fed Futterbakterien	Seite	30
2.2.1.3.4	RNAi gegen C46C2.4: pSFsjjC46C2.4fed Futterbakterien	Seite	31
2.2.1.3.5	RNAi gegen C53D6.4: pC53D6.4fed Futterbakterien	Seite	31
2.2.1.3.6	RNAi Futterbakterien für alle vorhergesagten Gene des Cosmids F23B2	Seite	31
2.2.1.4	dsRNA <i>in vitro</i> Produktion für RNAi gegen <i>pcp-2</i> und <i>pcp-3</i>	Seite	32
2.2.1.5	Erzeugung von GFP Reporterkonstrukten	Seite	33
2.2.1.5.1	pEXPR11PRO1GFP, das <i>pcp-3::gfp</i> Konstrukt	Seite	33
2.2.1.5.2	pEXPR12PRO1EGFP, das <i>pcp-2::gfp</i> Konstrukt	Seite	34
2.2.1.6	PCR-Produkte und Vektoren für Sequenzierreaktionen und 'Mutantenrescue'	Seite	35
2.2.1.6.1	PCR Reaktionen 11_P1, 11_P2 und 11_P3	Seite	36
2.2.1.6.2	Vektoren p12ex1, p12ex2/3, p12ex4, p12ex5, p12ex6 und psjj_12_lo	Seite	36
2.2.1.6.3	PCR Produkte sfg-F23B2.11 und 12_1/27	Seite	37
2.2.2	<i>Caenorhabditis elegans</i> Kulturbedingungen	Seite	38
2.2.3	DNA Mikroinjektion zur Erstellung transgener <i>C. elegans</i> Stämme	Seite	38
2.2.4	RNA vermittelte Geninaktivierung (RNAi)	Seite	42
2.2.4.1	RNAi durch Fütterungsexperimente	Seite	43
2.2.4.2	RNAi durch Mikroinjektion	Seite	44
2.2.4.3	RNAi durch 'Soaking'	Seite	45
2.2.5	Präparation von Embryonen und hochsynchronisiert wachsende <i>C. elegans</i> Population	Seite	45
2.2.5.1	Anreicherung von adulten Nematoden	Seite	46
2.2.5.2	Embronenpräparation aus adulten Nematoden	Seite	46
2.2.5.3	synchronisiert wachsende <i>C. elegans</i> Population	Seite	47
2.2.6	Nile Red <i>in vivo</i> Markierung von Fetttropfen in <i>C. elegans</i>	Seite	48

2.2.7	Erzeugung des mutanten Allels <i>ee1007</i>	Seite 48
2.2.7.1	Mutagenese mit DEB und TMP/UV	Seite 49
2.2.7.2	genetische Identifikation von Mutanten durch F1 Präkomplementation	Seite 50
2.2.8	Kreuzungen in <i>C. elegans</i>	Seite 51
2.2.9	Analyse temporärer Genfunktion von <i>gon-12(ee1007)</i> durch Temperaturverschiebung	Seite 53
2.2.10	Darstellung der Vulvavorläuferzellen am L3 Larvalstadium sowie dem alternativen Dauerstadium	Seite 54
3	ERGEBNISSE	Seite 55
3.1	ZWEI LYSOSOMALE CARBOXYPEPTIDASEN ERWEISEN SICH ALS ESSENTIELL FÜR MORPHOGENESE VON GONADE UND VULVA	Seite 55
3.1.1	Eine Suche nach dauerabhängig morphogenetischen Genen führt zu einer Prolylcarboxypeptidase, enkodiert durch <i>pcp-3</i>	Seite 56
3.1.2	Struktur und Verbreitung von Carboxypeptidasen im <i>C. elegans</i> Genom	Seite 59
3.1.3	Adulte RNAi Phänotypen von <i>pcp-2</i> , <i>pcp-3</i> und <i>pcp-4</i> : Das Auftreten von vulvalen Ausstülpungen und gonadale Migrationsfehler der DTC	Seite 62
3.1.4	Inaktivierung von von <i>pcp-2</i> und <i>pcp-3</i> durch RNAi hat zum Zeitpunkt des Dauerstadiums noch keinen erkennbaren Einfluß auf die Entwicklung von Vulva und Gonade	Seite 68
3.1.5	Analyse der Expression von <i>pcp-2</i> und <i>pcp-3</i> mit <i>gfp</i> -Konstrukten	Seite 69
3.1.6	Auslöschen der GFP-Fluoreszenz in den Reporterstämmen durch RNAi	Seite 72
3.1.7	Verminderung der Fettakkumulation in RNAi phänotypischen F23B2.11 Dauerlarven in einem <i>daf-2(m41)</i> genetischem Hintergrund	Seite 73
3.1.8	RNAi von C53D6.4, dem homologen Angiotensinrezeptor II von <i>C. elegans</i> , führt zu arretierten Embryonen und pseudovulvalen Ausstülpungen	Seite 74

3.1.9	Im genetischen <i>daf-9(e1406)</i> Hintergrund propagiert möglicherweise <i>pcp-3</i> Vulvabildung	Seite 76
3.1.10	<i>pcp-3</i> Modulation im <i>daf-15(m81)</i> Hintergrund betrifft reproduktive Organentwicklung	Seite 77
3.2	GON-12 REGULIERT FRÜH VULVABILDUNG UND SPÄT GONADENMORPHOLOGIE	Seite 79
3.2.1	Mutagenese mit DEB bzw. TMP und anschließender F1 Präkomplementation screen führte zu einer neuen Mutante, beteiligt an Morphologie von Vulva und Gonade	Seite 80
3.2.2	Der adulte Phänotyp des <i>gon-12(ee1007)</i> IV Allels zeigt gonadale Mißbildungen und entwicklungsabhängig Ppv	Seite 81
3.2.3	<i>gon-12(ee1007)</i> zeigt verfrühte larvale Teilungen der Vulvavorläuferzellen	Seite 82
3.2.4	Die Komplementation von <i>gon-12</i> mit <i>unc-129</i>	Seite 84
4	DISKUSSION	Seite 85
4.1	DIE UNGEWÖHNLICHEN LYSOSOMALEN CARBOXYPEPTIDASEN, PCP-2 UND PCP-3, REGULIEREN DIE MIGRATION DER DISTALEN TIP ZELLEN AN DER GONADE	Seite 87
4.2	<i>pcp-2</i> UND <i>pcp-3</i> INAKTIVIERUNG BEEINTRÄCHTIGT SEKUNDÄR DIE MORPHOLOGIE UND FUNKTION DER VULVA	Seite 92
4.3	DIE WIRKUNG VON TGF β SIGNALLEN IN DER ENTWICKLUNG VON REPRODUKTIVEN ORGANEN	Seite 96
4.4	<i>gon-12</i> IST FÜR DEN ZEITPUNKT DER TEILUNG DER VULVAVORLÄUFERZELLEN MITVERANTWORTLICH	Seite 101

5	ZUSAMMENFASSUNG	Seite 105
6	LITERATURVERZEICHNIS	Seite 107
7	ABBILDUNGEN	Seite 138
8	ANHANG	Seite 156
8.1	GENOMISCHE SEQUENZ VON <i>pcp-2</i> UND <i>pcp-3</i>	Seite 156
8.2	RESTRIKTIONSKARTE DES VEKTORS L4440	Seite 160
8.3	KARTIERUNG DES <i>DAF-15</i> LOKUS AUF CHROMOSOM IV	Seite 161
8.4	DIE α/β HYDROLASE PROTEINE IN <i>C. ELEGANS</i>	Seite 163
8.5	PROTEINE MIT DUF274 DOMÄNE IN <i>C. ELEGANS</i>	Seite 165
8.6	DARSTELLUNG DER CHARAKTERISTIKA VON PROLYLCARBOXYPEPTIDASEN	Seite 167
8.7	MIGRATION DER DISTALEN TIPZELLE (DTC)	Seite 172
8.8	EXPRESSIONSDATEN VON <i>pcp-2</i> UND <i>pcp-3</i> DURCH <i>IN SITU</i> HYBRIDISIERUNG	Seite 174

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Generell verwendete Abkürzungen

∅	Durchmesser
1°, 2°, 3°	unterschiedliche Gradierung im Entwicklungsschicksal der 6 VPCs
3'UTR	3'-OH gelegener nicht translaterter Bereich der mRNA
aa	„aminoacid“; Aminosäuren
AC	„anchor cell“; gonadale Ankerzelle, entwickelt sich bis zum Adulten zur Verbindung zwischen Vulva und Gonade
Abb	Abbildung
Acc.No.	Zugriffscod auf Sequenzen der Datenbank des National Institute of Health
bp	Basenpaar
bzgl.	bezüglich
bzw.	beziehungsweise
CDS	codierende Sequenz eines Gens
CGC	<i>Caenorhabditis</i> Genetics Center
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
cM	centi-Morgan
d	Tag
DE3	Plasmidinsertion in <i>Escherichia coli</i> , welches T7-RNA-Polymerase unter Kontrolle des lacZ Promotors exprimiert
DEB	Diepoxybutan, mutagenes Agenz
d.h.	das heißt
DNA	Desoxyribonukleinsäure, bei Verwendung der Bezeichnung ist von der doppelsträngigen Form die Rede
ds	„double strand“ doppelsträngige (DNA oder RNA)
DTC	„distal tip cell“, somatische Zelle am jeweiligen distalen Ende jeden Gonadenarms von <i>C. elegans</i>
F0	Elterntiere der F1, im Fall von <i>C. elegans</i> kann das auch nur ein Tier sein
F1 / F2 / F3	erste / zweite / dritte Filialgeneration bzw. Nachkommen der F0
gf	„gain of function“; Mutation, die zu Hyperaktivität des betroffenen Gens führt
ggf	gegebenenfalls
GMP	Guanosinmonophosphat
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde

hyp7	hypodermale Zelle, die den Großteil des <i>C. elegans</i> Körpers umspannt, syncytial und multinuklear
I _A , I _B , ...	serielle Auflistung nachfolgender Intronsequenzen eines Gens
IL1V	„inner labial 1 neurons, ventral“; Neuronbezeichnung
IP3	Inositol-1,4,5-triphosphat
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactosid, ein Substrat des Enzyms Beta-Galactosidase
kbp	kilo-Basenpaar (1000 bp)
L1, L2, L3, L4	Larvalstadien von <i>Caenorhabditis elegans</i>
L2d	spezifisches L2 Stadium mit Determination zur Dauerlarve
L2m	„L2 molt“; Häutung der L2 Larve zur L3 Larve oder der alternativen Dauerlarve
L3d	Dauerlarve
L5, L6	zusätzliche Larvalstadien einiger heterochroner Mutanten von <i>C. elegans</i>
lacUV5	starker Promotor in <i>Escherichia coli</i> Zellen
lf	„loss of function“; Mutation, die zu Funktionsverlust des betroffenen Gens führt
max.	maximal
min	Minute
mRNA	messenger RNA
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NIH	National Institute of Health
nt	Nukleotide
NTP	Nukleotidtriphosphat
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDA	Adultes Stadium nach Dauerentwicklung (postdauer Adulti)
PDL3, PDL4	L3 Stadium und L4 Stadium nach Dauerbildung an der L2m
PI3	Phosphatidylinositol-3-phosphat
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-biphosphat
PI(3,4,5)P3	Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat
Pos.	Position
Ppv	„pseudoprotruding vulva“; Phänotyp, bei dem sich bei der Vulva eine Ausstülpung bildet, wonach keine Eier mehr abgelegt werden. Die Ausstülpung kann schließlich aufreißen.
RISC	„RNA-induced silencing complex“; Multienzymkomplex zur komplementären Bindung von 21-23 nt RNA Fragmenten zu homologer mRNA, die von diesem Komplex schließlich auch degradiert wird
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	„RNA mediated gene inactivation“; Inaktivierung von Genaktivität durch RNA
rpm	„rounds per minute“; Umdrehungen pro Minute

s	Sekunde
S1-S4	reflektiert das im L1-L4 Stadium aktive genetische Programm
SA	reflektiert das im adulten Stadium aktive genetische Programm
S2d/S3d	reflektiert das im L2d/Dauer Stadium aktive genetische Programm
ss	„single strand“, einzelsträngig (DNA oder RNA)
TMP	Trimethylpsoralen, mutagenes Agenz
URL	Webadresse des Internet
UV	ultraviolettes Licht
V3.p – V8.p	Name von sechs Vulvavorläuferzellen in <i>C. elegans</i>
VPC	Vulvavorläuferzelle (hypodermaler Ursprung)
wt	Wildtyp
YAC	„Yeast artificial chromosome“; künstlich erstellte Hefechromosomen, um Genomdatenbanken unterschiedlicher Organismen zu bilden
Z1 / Z4	Ursprungszellen der somatischen Gonade von <i>C. elegans</i>
z.B.	zum Beispiel

Genetische Abkürzungen in *Caenorhabditis elegans*

Die hier ausgeführten Abkürzungen sind genetische Bezeichnungen aus *C. elegans*. Eine kurze generelle Darstellung der Wirkung jeder Gengruppe ist angegeben. Dies besteht oft in einer phänotypischen Beschreibung von Stämmen mit mutierten Allelen, die zu einem Gen der Gruppe gehören.

<i>age</i>	„ <i>ageing abnormal</i> “; mutante Allele verändern adulte Lebensspanne
<i>daf</i>	„ <i>dauer formation</i> “; regulative Gene der Dauerlarvenbildung
<i>daf-c</i>	„ <i>dauer formation constitutive</i> “, die Bildung der Dauerlarve erfolgt konstitutiv, bei vielen Mutanten aber temperaturabhängige Ausprägung
<i>daf-d</i>	„ <i>dauer formation defective</i> “, Bildung der Dauerlarve nicht möglich
<i>dpy</i>	„ <i>dumpy</i> “; Nematode besitzt deutlich größeren Durchmesser und gleichzeitig verkleinerte Gesamtlänge
<i>dig</i>	„ <i>displaced gonad</i> “; falsch ausgewachsene Gonade
<i>dyf</i>	„ <i>dye filling defective</i> “, Mutationen in diesen Genen bewirken einen Verlust der <i>in vivo</i> Färbbarkeit von sensorischen Neuronen mit z.B. Fluorescein
<i>eDf18</i>	chromosomale Deletion von Chromosom IV
<i>eDf19</i>	chromosomale Deletion von Chromosom IV
<i>elt</i>	„ <i>erythroid-like transcription factor</i> “; Familie von Transkriptionsfaktoren
<i>exc</i>	„ <i>excretory abnormal</i> “; fehlerhafte Morphologie des exkretorischen Kanals
<i>fem</i>	„ <i>feminization</i> “; Geschlechtsdetermination zu weiblichem Sexualtyp verändert
<i>gfp</i>	„ <i>green fluorescent Protein</i> “; kodierende Sequenz des Grün Fluoreszierenden Proteins der Qualle <i>Aequorea victoria</i>
<i>gon</i>	„ <i>gonad morphology abnormal</i> “; somatische Gonadenmorphologie abnormal
<i>gpa</i>	„ <i>G protein, Alpha subunit</i> “, Untereinheit von G-Proteinen
<i>him</i>	„ <i>high incidence of males</i> “; erhöhtes Auftreten einer fehlenden Verteilung der Gonosomen bei der Meiose, es treten verstärkt XO Männchen auf
<i>hmg</i>	„ <i>high mobility group</i> “; kodieren für 'High Mobility Group' Proteine
<i>itr</i>	„ <i>inositoltriphosphate receptor-like</i> “; Ähnlichkeit zum humanen Inositoltriphosphat Rezeptor
<i>let</i>	„ <i>lethal</i> “; Gene mit lethalen Phänotypen
<i>lin</i>	„ <i>lineage abnormal</i> “; verändertes Teilungsmuster von Zellen
<i>lon</i>	„ <i>long</i> “; Gesamtlänge des Nematoden ist erhöht
<i>mDf7</i>	chromosomale Deletion von Chromosom IV

<i>mDp4</i>	Duplikation eines Bereichs von Chromosom IV; Rearrangement
<i>mec</i>	„ <i>mechanosensory abnormal</i> “; keine Berührungsempfindlichkeit
<i>mig</i>	„ <i>cell migration abnormal</i> “, Gene, die Zellmigration, z.B. der DTC, steuern
<i>mum</i>	„ <i>maternal-effect uncoordinated and malformed</i> “; maternal affektierter Phänotyp in der F1: Bewegung und Körpermorphologie beeinträchtigt
<i>myo</i>	„ <i>myosin-like</i> “; Gene die für Muskelspezifisches Myosin kodieren
<i>nT1</i>	reziproke Translokation zwischen Chromosom IV und Chromosom V
<i>pal</i>	„ <i>posterior alae</i> “; Struktur der posterioren hypodermalen Alae verändert
<i>pcp</i>	„ <i>prolyl-carboxypeptidase-like</i> “, Gene mit Ähnlichkeit zu humanen Prolylcarboxypeptidasen (lysosomale Carboxypeptidase C)
<i>pdk-1</i>	Phosphoinositol-abhängige-Kinase 1 Gen
<i>rol</i>	„ <i>roller</i> “; drehende Bewegung entlang der Körperlängsachse
<i>sem</i>	„ <i>sex muscle abnormal</i> “, Muskulatur der Sexualorgane abnormal
<i>sma</i>	„ <i>small</i> “; geringere Gesamtnematodenlänge
<i>sos</i>	„ <i>son of sevenless</i> “; ähnliche Gene zu dem <i>Drosophila</i> Gen <i>sos</i>
<i>tax</i>	„ <i>chemotaxis abnormal</i> “, Gene die Chemotaxis betreffend
<i>tph</i>	Gen für Tryptophan Hydroxylase
<i>unc</i>	„ <i>uncoordinated</i> “; Beinrächtigung in der Bewegung bis zu totaler Paralyse

Abkürzungen von Proteinen und Proteindomänen

AKT/PKB	antiapoptotische Serin/Threonin Proteinkinase aktiviert durch Phosphoinositol-3'-Kinase, Proteinkinase B
CAPS	Ca ²⁺ abhängiges Aktivatorprotein der Sekretion
DCC	„deleted in colorectal cancer“; Deletion bei rektalem Darmkrebs (<i>H. sapiens</i>)
DUF	„domain of unknown function“; <i>C. elegans</i> spezifische Domänen mit unbekannter Funktion
EGF	„epidermal growth factor“, epidermaler Wachstumsfaktor
FKHR	„forkhead in human rhabdomyosarcoma“; Proteinbezeichnung
HNF-3	„hepatocyte nuclear factor 3“; Familie von Transkriptionsfaktoren mit verwandtem Strukturmotiv
HSP90	Hitzeschockprotein 90
IRS-1	Insulin - Rezeptor - Substrat - 1 Domäne des Insulinrezeptors DAF-2 von <i>C. elegans</i> ; in vielen Organismen ist IRS1 ein eigenständiges Protein
NHR	nuklearer Hormonrezeptor
p110	Untereinheit p110 einer Phosphatidylinositol-3-kinase
PRCP	Prolylcarboxypeptidase
PTEN	Tumorsuppressor Protein, eine Proteintyrosinphosphatase
RBCC	RING finger, B-Box und coiled-coil Domänen
RISC	Proteinkomplex aus einer Helicase, Exonuklease, RecA und Endonuklease, RNA Hybride aufzutrennen und in 21-22 nt Fragmente zu zerlegen
SH2 / SH3	„src-homology domain“, ein Proteindomänenbezeichnung
SMAD	<i>sma/Mad</i> Gene kodieren Proteine mit homologer Domänenstruktur und Anordnung; <i>sma</i> bezeichnet die Zwergengene („dwarfins“) <i>sma-2</i> , <i>sma-3</i> und <i>sma-4</i> von <i>C. elegans</i> ; <i>Mad</i> bezeichnet das homologe Gen <i>Mothers against decapentaplegic</i> in <i>Drosophila melanogaster</i>
SnoN	„ski-related novel gene non Alu-containing“; verwandt zu ski, enthält auf genomischer Ebene nicht die spezifisch humanen Alu Repetitionen
TGFβ	„transforming growth factor - beta“; ein Wachstumsfaktor
TM-GC	Transmembranguanylylcyclase
TSP	Thrombospondin bindende Domäne

1 EINLEITUNG

Caenorhabditis elegans kann als geeignetes Modell betrachtet werden, um Signalkaskaden zu identifizieren, welche Informationen der Umwelt zu einer Antwort im sich entwickelnden Organismus bezüglich Verhalten und Morphogenese umsetzen (Riddle und Albert, 1997). Die Ontogenese dieses Organismus besteht aus sechs unterscheidbaren Lebensstadien, dem Embryo, dem ersten (L1) bis vierten (L4) Larvalstadium, sowie zu letzt dem adulten hermaphroditischen Wurm, der zu sexueller Selbstreproduktion befähigt ist (Byerly *et al.*, 1976a; Brenner, 1974). Dabei bilden selbstbefruchtete Hermaphroditen mit dem Genotyp XX in den Gonosomen fast ausschließlich wieder Hermaphroditen mit Ausnahme seltener XO Männchen (max. 0,2%; Hodgkin *et al.*, 1979). Von der Zellteilung bis zur Morphogenese der unterschiedlichen Gewebe des Nematoden sind Abfolge und zeitlicher Rahmen der Entwicklungsereignisse annähernd invariant (Sulston und Horvitz, 1977; Sulston *et al.* 1980, 1983; Kimble und Hirsh, 1979; Hedgecock und White, 1985). Daraus ergab sich die Möglichkeit, den gesamten Entwicklungsstammbaum in Form eines Zelliniendiagramms festzuhalten (Schierenberg und Cassada, 1986). Mit diesen Basisgrundlagen der Wildtypentwicklung, welche gut kontrollierte Bedingungen eines integrativen Netzwerks zur Verfügung stellen, die von zellulärer zu organischer Ebene reichen, zusammen mit dem Vorteil, daß das relativ kleine Genom von *C. elegans* vollständig sequenziert vorliegt (The *C. elegans* Sequencing Consortium, 1998), ist es ermöglicht, Umwelteinflüsse und unterschiedliche Genotypen auf Entwicklungsschicksale des Nematoden zu untersuchen.

Dabei können bei vorgegebenen physiologischen Gegebenheiten Umweltfaktoren wie die Verfügbarkeit von Nahrung, Populationsdichte oder Temperatur zu postembryonalen Entwicklungsunterbrechungen an einigen unterschiedlichen Lebensstadien von *C. elegans* führen (Golden und Riddle, 1984a; Johnson *et al.*, 1984; Arasu *et al.*, 1991). Dies betrifft insbesondere die Entscheidung, ob eine Entwicklung zum reproduktiven Adultus oder alternativ unter ungünstigen Umweltbedingungen ein Dauerarrest durch Bildung einer sogenannten Dauerlarve als Ersatz des L3 Larvalstadiums eintreten soll. Dieses besondere Entwicklungsstadium der Dauerlarve arretiert seine Entwicklung (Cassada und Russell, 1975). Es ernährt sich nicht, da die Öffnung der Mundhöhle zugewachsen ist und pharyngeales Pumpverhalten eingestellt wird (Albert und Riddle, 1983). Dabei ist die Dauerlarve verstärkt resistent gegenüber Umwelteinflüssen (Cassada und Russell, 1975). Hierbei erhöht sich zudem die Gesamtlebenszeit des Nematoden um das vier bis achtfache gegenüber der dreiwöchigen Lebensdauer reproduktiv wachsender Wildtypwürmer (Klass und Hirsh, 1976). Bei Verbesserung der Umweltbedingungen nehmen die Dauerlarven

innerhalb der folgenden vier Stunden wieder Nahrung auf, beenden den Entwicklungsarrest und häuten sich zu einer physiologisch nicht unterscheidbaren L4 Larve gegenüber L4 Larven ohne Dauerarrest während der Entwicklung, wobei ebenfalls die dreiwöchige adulte Lebensdauer nach dem Dauerzustand nicht beeinträchtigt ist (Cassada und Russell, 1975; Klass und Hirsh, 1976). In Folge radialer Schrumpfung ist die Gesamterscheinung der Dauerlarve im Vergleich zu den L2 und L3 Larven sehr dünn und lang. Dieser Vorgang wirkt sich auch auf das Darmlumen aus, das nun einen sehr geringen Durchmesser besitzt (Popham und Webster, 1979).

Die Vulvaentwicklung nimmt einen besonderen Stellenwert ein, da deren Entwicklungsbeginn und damit dessen Signalisierung mit der Entscheidung Dauerlarve oder reproduktive Entwicklung korreliert ist. Somit bedarf es auch einer differenzierten heterochronen Synchronisierung. Bereits während der L1 werden sechs längs angeordnete Vulvavorläuferzellen (VPC) hypodermalen Ursprungs geboren, V3.p – V8.p. Sie sind ventral im Einklang zur Lage des fertigen Organs positioniert. Erst 20 Stunden später im L3 Stadium beginnen diese Zellen sich zu teilen (Sternberg und Horvitz, 1986). Die Dauerlarve erhält heterochron betrachtet ihren Entwicklungsarrest an der Häutung zur L3 Larve (L2m). Damit sind die sechs VPCs auch noch ungeteilt. Mit dem Austritt aus dem Dauerlarvenstadium werden dann die Stadien PDL3 und PDL4 ausgeführt, welche die gleichen Entwicklungsereignisse ausführen, gemäß der reproduktiven L3 und L4 (Liu und Ambros, 1991).

Auch die Entwicklung der Gonade ist entscheidend von den Vorgängen während des L3 Stadiums betroffen. Während L2 wird die Bildung der somatischen Gründerzellen zur Gonadenbildung aus den Ursprungszellen Z1 und Z4 beendet (Hirsh *et al.*, 1976). Insbesondere durch die Wirkung der zwei distalen Tipzellen (DTCs) elongiert die Gonade im Hermaphroditen anterior und posterior während L3, wodurch zwei gleichwertige funktionale Gonadenarme ausgebildet werden. Zudem beginnt die Proliferation der Keimbahnzellen. In der frühen L4 Larve vollzieht jeder Gonadenarm eine 180° Wendung in der Wachstumsrichtung, zudem beginnt die Spermatogenese. Insbesondere die Migration der DTCs ist ein entscheidender Vorgang während der Gonadogenese im dritten Larvalstadium (Kimble und Hirsh, 1979, Kimble und White, 1981).

Bis heute ist fast nichts bekannt über Gene und Signalwege, welche direkt aktiv sind während der morphogenetischen Phase der Dauerlarvenbildung. Man kennt nun ziemlich gut eine Reihe von Signalkaskaden, die Entscheidung zur und Zeitpunkt der Dauerlarvenentwicklung regeln und auf die beiden Gene *daf-16* und *daf-12* konvergieren.

Dabei ist *daf-16* möglicherweise das entscheidende Gen für die Expression der Gene, welche die Formgebung der Dauer maßgeblich beeinflusst, weil das Gen in denjenigen Geweben exprimiert vorliegt, welche von morphogenetischen Veränderungen affektiert sind (Lin *et al.*, 1997; Ogg *et al.*, 1997). Dahingegen entscheidet *daf-12* vielmehr, nachdem die Entscheidung getroffen wurde, Dauerlarve zu bilden, über den tatsächlichen Zeitpunkt, zu dem diese spezielle Entwicklung eingeleitet werden soll (Antebi *et al.*, 1998). Zielgene von *daf-12* und *daf-16* sind bis heute weitgehend unbekannt. Gezieltes Suchen führt meist zu bereits bekannten Genen etablierter Signalketten zurück. Die benötigte Zeit für Dauermorphogenese beträgt bei 25°C etwa elf bis zwölf Stunden (Golden und Riddle, 1984a), stellt aber bis heute eine „black box“ für die Wissenschaft dar.

1.1 SIGNALKASKADEN IN DER DETERMINATION DES DAUERLARVENSCHICKSALS

Caenorhabditis elegans trifft bereits während der frühen Entwicklungsstadien die Entscheidung, vorwiegend im L1 Stadium, wenn der Wurm nach der Embryogenese empfänglich ist für Umwelteinflüsse, ob im weiteren Entwicklungsprogramm Dauerarrest eintreten wird. Dadurch entsteht eine spezielle L2 Larve, genannt L2d, welche determiniert zum Dauerzustand ist, aber auch noch volles Entwicklungspotential bei Verbesserung der Umweltbedingungen zur L3 Larve besitzt (Golden und Riddle, 1984a). Die wesentlichen Signale im Entscheidungsprozess sind ein von allen Nematoden der Population sekretiertes Pheromon (Golden und Riddle, 1984c), sowie der Vorrat an Nahrung und die Temperatur. Dabei reflektiert die Konzentration des Pheromons die Populationsdichte. Ein hohes Verhältnis von Pheromon zum Futtersignal begünstigt Dauerlarvenbildung und sorgt für deren Aufrechterhaltung (Golden und Riddle, 1984b). Der Einfluß der Temperatur wirkt modulierend auf genanntes Verhältnis ein, wobei bei höherer Temperatur Dauerbildung generell unterstützt wird. Ändern sich die Bedingungen zu hohem Futtersignal gegenüber Pheromon, kommt es zur Wiederaufnahme reproduktiven Wachstums mit der Häutung zur L4 Larve (Golden und Riddle, 1982).

Die Eigenschaft von *C. elegans*, unterschiedliche Entwicklungswege einschlagen zu können, die sich morphologisch und physiologisch stark unterscheiden, hat den Organismus zu einem Modell gemacht, Signaltransduktionskaskaden festzusetzen, die aus der Umwelt stammende Signale zur Entscheidung Dauerlarve gegenüber reproduktiver Entwicklung umsetzen. Außerdem ist es in keinem anderen heute benutzten Modellsystem so einfach, Mutanten zu erzeugen und zu charakterisieren (Brenner, 1974; Byerly *et al.*, 1976b). Die für die Entscheidung zur Dauerlarvenentwicklung maßgeblichen Gene konnten in zwei Gruppen

eingeteilt werden, dauer-konstitutiv (*daf-c*) und dauer-defekt (*daf-d*), d.h. es handelt sich um Gene, die auf der einen Seite, falls mutiert, stets zum Dauerzustand führen, die Dauerlarve auch vollständig morphologisch ausbilden, schließlich in diesem Zustand verharren (*daf-c*), sowie im Gegensatz dazu um Gene, die zu einer Unfähigkeit zur Ausbildung der Dauerlarve führen; (*daf-d*; Riddle *et al.*, 1981). Epistasiusuntersuchungen und die Verfügbarkeit temperatur-sensitiver *daf-c* Mutationen begünstigten die Ermittlung einer zunächst zweiteiligen Signaltransduktionskaskade über die Entscheidung zwischen Dauerlarvenarrest oder Reproduktion (Riddle *et al.*, 1981; Swanson und Riddle, 1981).

Das erste bekannte Gen, welches in den Signalwegen zur Dauerlarvenbildung wirkt, ist *daf-22*. Es ist in die Produktion eines dauer-spezifischen Pheromons involviert und gehört zur Kategorie *daf-d*. Es ist das einzig bekannte *daf-d* Gen, dessen Ausfall allein durch Zugabe von Pheromon aufgehoben werden kann (Golden und Riddle, 1985). Auch eines der früh wirkenden *daf-d* Gene ist *daf-6*. Bei Mutation dieses Gens kann *C. elegans* nicht auf unterschiedliche Konzentrationen des Pheromons reagieren, da die amphidialen Poren blockiert sind (Vowels und Thomas, 1992). Damit nimmt sensorische Kontrolle, insbesondere chemosensorische, eine Schlüsselfunktion in der Dauerlarvenbildung ein. Mit ihr sind strukturell die Amphidien mit den Dendriten der zugehörigen Neuronen sowie die äußeren labialen Sensillen verbunden (Albert *et al.*, 1981).

Der Antagonist zum Pheromon in der Entscheidung Reproduktion gegenüber Dauerlarve ist die Verfügbarkeit von Nahrung. Serotonin wäre ein denkbare Molekül, welches den Nahrungsstimulus in die Signalwege einfließen läßt. Ein Gen, *tph-1*, ist involviert in die Biosynthese von Serotonin ausgehend von Tryptophan. Dabei speichert eine *tph-1* Mutante erhöhte Mengen an Fett ein. Dies hat Effekte auf eine neuroendokrine TGF β Signalkaskade. Zudem ist das Fettspeicherverhalten mit der Abnahme von Insulin-ähnlichen neuroendokrinen Signalen gekoppelt (Sze *et al.*, 2000). Dabei erweist sich das Wirken des serotonergischen Systems in *C. elegans* metabolischer Kontrolle ähnlich dem serotonergischer Signale im Menschen bzgl. Metabolismus und Fettleibigkeit (Leibowitz und Alexander, 1998).

1.1.1 Zwei von *daf-6* ausgehende Signalwege

Verfolgt man nun ausgehend von *daf-6* den Signaltransduktionsweg weiter, teilt sich die Signalkaskade in zwei relativ unterschiedliche neuronale Signalketten (Thomas *et al.*, 1993; Schackwitz *et al.*, 1996).

In der chemosensorischen Genkaskade befindet sich als *daf-c* Gen *daf-11*, welches eine Transmembranguanylylcyclase (TM-GC) enkodiert. Zudem enkodiert das *daf-c* Gen *daf-21* ein Hitzeschockprotein (HSP90), das in Dauerlarven in erhöhter Menge vorliegt und welches als Chaperon der Streßbekämpfung dient (Dalley und Golomb, 1992), indem es native Proteinstrukturen aufrecht erhält, in streßfreien Bedingungen aber auch an bestimmte Zielproteine bindet und deren Faltungsstruktur stabilisiert. Das Zielprotein ist typischerweise inaktiv und erfährt seine aktive Form ungebunden von HSP90 (Review in Scheibel und Buchner, 1998; Buchner, 1999, Caplan, 1999; Mayer und Bukau, 1999). Das System der beiden DAF-C Proteine DAF-11 und DAF-21 könnte derart wirken (Birnbay *et al.*, 2000). Sogenannte *dyf* Gene unterdrücken den *daf-c* Effekt von *daf-11* und *daf-21*, deren Wirkung benötigt demzufolge funktionale chemosensorische Ciliastrukturen (Vowels und Thomas, 1992, Thomas *et al.*, 1993). Eine TM-GC kann aus GTP cGMP bilden. Das cGMP agiert direkt auf durch zyklisches Nukleotid erregbare Kationentransporter, um Hyperpolarisation an neuronalen Membranen zu ermöglichen (Fesenko *et al.*, 1985). Die Gene *tax-4* und *tax-2* kodieren für α und β Untereinheiten von zyklischen Nukleotid vermittelten Ionentransportern (Coburn und Bargmann, 1996; Komatsu *et al.*, 1996, Coburn *et al.*, 1998). Mittels Aktivierung durch ein heterotrimeres G-Protein hydrolysiert eine Phosphodiesterase cGMP zu GMP, wodurch die Potentialänderung an der neuronalen Membran gestoppt wird, damit der Ruhezustand zurückgeführt werden kann. Von zwei α -Untereinheiten von G-Proteinen, GPA-2 und GPA-3, gibt es *daf-d* Mutationen durch Funktionsverlust (lf), und *daf-c* Wirkung mit Funktionsgewinn (gf) durch Transgene (Zwaal *et al.*, 1997).

Ausgehend von *daf-6* existiert aber noch die zweite neuronale Signalkaskade, die mit der Dauerentwicklung verbunden ist, TGF β ähnliche Signaltransduktion. Die *daf-c* Gene dieser Kaskade sind nicht durch die *dyf*-Gene des cGMP Signalwegs reprimierbar. Die beiden Gengruppen besitzen teilweise redundante Fähigkeiten und dies drückt sich in ihrer parallelen Aktivität in unterschiedlichen sensorischen Neuronen aus (Thomas *et al.*, 1993; Schackwitz *et al.*, 1996). *daf-7* kodiert für ein Mitglied der „transforming growth factor β “ (TGF β) Großfamilie. Die Transkription dieses Gens ist direkt von der Temperatur und dem Pheromonlevel abhängig. TGF β Expression bedeutet, daß nachfolgende Entwicklung über das reguläre L3 Stadium erfolgt. Signalisierung durch dieses endokrine Signal ist auf das amphidiale ASI Neuronenpaar in der L1 Larve beschränkt (Ren *et al.*, 1996). Das TGF β System ist Mammaliensystemen homolog. Typ II und Typ I Aktivin Rezeptor Kinasen, das

sind Serin/Threonin Rezeptor Protein Kinasen, reagieren auf das neuroendokrine Signal und leiten es über Phosphorylierung diverser SMAD Proteine in den Nukleus weiter (Review in Christian und Nakayama, 1999). In *C. elegans* ist DAF-4 der Typ II Rezeptor (Estevez *et al.*, 1993), nach TGF β Ligandenbindung dimerisiert dieser mit dem Typ I Rezeptor DAF-1 (Georgi *et al.*, 1990). DAF-1 ist spezifisch vorhanden für die Entscheidung zwischen Dauerlarvenentwicklung und Reproduktion. Positive Signalisierung bedeutet direkte Entwicklung bis zum adulten Wurm. Demzufolge ist das Gen unter anderem in der DTC, aber auch in Amphidien, Kopfganglien und einigen anderen Zellen exprimiert (Gunther *et al.*, 2000). Phosphorylierung von DAF-1 aktiviert die SMAD Proteine DAF-8 und DAF-14 durch Dimerisierung (Inoue und Thomas, 2000). Ein aktivierter SMAD Komplex kontrolliert ein großes Spektrum an Zielgenen (Heldin *et al.*, 1997). Antagonistisch zu diesem SMAD Komplex agiert DAF-3, Mutationen in diesem Gen sind deshalb *daf-d*. DAF-3 konkurriert um Dimerisierung zur Bildung eines SMAD Komplexes mit DAF-8 oder DAF-14. Bei dessen Bindung ist Eintritt des Komplexes in den Nukleus und Transkription von Zielgenen nicht möglich (Patterson *et al.*, 1997). Mutationen in *daf-5* sind ebenfalls *daf-d* und wirken entgegen der TGF β Signalkette (Riddle *et al.*, 1981, Thomas *et al.*, 1993). Neuerdings konnte *daf-5* als ein Sno Onkogen Homolog identifiziert werden, welches möglicherweise mit dem DAF-3 Transkriptionsfaktor interagieren kann (L.S. da Graca und G.I. Patterson, persönliche Kommunikation). Im Vertebraten kann SnoN mit SMAD3 und SMAD4 interagieren und dabei als Korepressor wirken (Sun *et al.*, 1999a). Die Interaktion wird nach TGF β Stimulation beendet und SnoN wird mittels Proteasomen degradiert (Stroschein *et al.*, 1999; Sun *et al.*, 1999b).

Die Gene *daf-3* und *daf-5* könnten bereits die letzten Proteine des TGF β Signalwegs zur Determination der Dauerlarve sein und die von ihnen kontrollierten, aber bislang unbekanntes Zielgene bereits die notwendigen morphogenetischen Gene der Dauerbildung beinhalten.

1.1.2 Der Insulin-ähnliche Signalweg

In der *C. elegans* Dauerentscheidung konnte eine von der chemosensorischen Kontrolle und dem TGF β Signalweg unabhängige Signalkaskade identifiziert werden, welche ebenso vom Pheromon, aber auch vom Nahrungsangebot beeinflusst wird (Gottlieb und Ruvkun, 1994; Larsen *et al.*, 1995). Eines der Schlüsselgene dieser Kette ist *daf-2*, welches für einen Insulinrezeptor mit Homologie zum menschlichen Rezeptor kodiert (Kimura *et al.*, 1997). Dafür stehen im Genom von *C. elegans* 37 Insulingene als potentielle Liganden zur Verfügung (Pierce *et al.*, 2001). Allerdings ist in *C. elegans* nur ein homologes Insulinrezeptorgen, *daf-2*, bekannt (Kimura *et al.*, 1997, Ruvkun und Hobert, 1998). Der Insulinrezeptor ist weitestgehend in allen Zelllinien des Nematoden vorhanden, jedoch genügt neuronales Insulin-ähnliches Signalisieren der Regulation larvaler Entwicklung, der Lebensspanne und der Lipidakkumulation in Darmzellen (Wolkow *et al.*, 2000), was auch bislang an bekannten Funktionen des Insulinsignalwegs in *C. elegans* bekannt ist (Riddle *et al.*, 1981, Kenyon *et al.*, 1993, Malone und Thomas, 1994, Kimura *et al.*, 1997, Tissenbaum und Ruvkun, 1998).

Intrazellulär autophosphoryliert DAF-2 möglicherweise, gemäß dem *Drosophila* Model, zunächst nach Ligandenbindung durch seine Kinasedomäne seine eigene C-terminale IRS-1 Domäne an Tyrosinresten (Ruan *et al.*, 1995). Dies genügt der Bindung einer Phosphatidylinositol-3 (PI3) – Kinase, deren p110 Untereinheit von *age-1* enkodiert wird (Morris *et al.*, 1996). Starke Mutationen in *age-1* zeigen sehr ähnliche Phänotypen und Interaktionen mit anderen *daf*-Genen wie *daf-2* (Gottlieb und Ruvkun, 1994, Dorman *et al.*, 1995; Malone *et al.*, 1996). Antagonistisch zu den *daf-c* Genen *daf-2* und *age-1* wirkt das PTEN Tumorsuppressorhomolog *daf-18*, Mutationen darin sind somit *daf-d* (Ogg und Ruvkun, 1998, Rouault *et al.*, 1999). Eine PI3-Kinase kann die Phosphatgruppe der IRS-1 Domäne an Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) übertragen, und es entsteht membrangebundenes Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat (PI(3,4,5)P₃) (Review in Kapeller und Cantley, 1994, Hunter, 1995). PTEN führt die Umkehrreaktion durch (Maehama und Dixon, 1998).

Die Konzentration des sekundären Signalüberträgers PI(3,4,5)P₃ steigt drastisch an im Zuge der Antwort auf Insulin-ähnliche Signalwirkung (Toker und Cantley, 1997). In Konkurrenz zur Reaktion von DAF-18 stehen die Kinasen AKT1- und AKT-2, homolog zum menschlichen AKT/PKB (Paradis und Ruvkun, 1998). Nach Aktivierung dieser Kinasen durch Bindung von PI(1,4,5)P₃ an deren Pleckstrin Domäne, können diese nachfolgend direkt DAF-16 phosphorylieren (Franke *et al.*, 1997, Frech *et al.*, 1997, Klippel *et al.*, 1997, Paradis und Ruvkun, 1998). Zur Aktivierung der AKT Kinasen wird zudem 3-Phosphoinositol-abhängige Kinase 1 (PDK1) benötigt, welche PI(1,4,5)P₃ an AKT überträgt (Alessi *et al.*, 1996; Alessi *et*

al., 1997a, b). Dieses *C. elegans pdk-1* Gen hat *daf-c* Mutationen, die unabhängig von *age-1* Signalen sind (Paradis und Ruvkun, 1999).

DAF-16 steht am Ende der bekannten Insulin-ähnlichen Signaltransduktion, es gehört zur HNF-3/forkhead Familie mit einer einzigen forkhead DNA-bindenden Domäne (Lin *et al.*, 1997, Ogg *et al.*, 1997). Durch Phosphorylierung von DAF-16 durch AKT/PKB wird nukleare Lokalisation inhibiert und damit Transkriptionsaktivität unterbunden (Brunet *et al.*, 1999). Exprimiert wird *daf-16* in den meisten Geweben des Nematoden, die bei der Dauerlarvenmorphogenese metabolische oder morphologische Veränderungen erfahren, wie Ektoderm, Muskeln, Darm und Neuronen. Der nötige Zeitrahmen dazu umfaßt späte Embryogenese, frühe Larvalstadien und die Dauerlarve (Ogg *et al.*, 1997, Furuyama *et al.*, 2000). Daher kann spekuliert werden, daß die Zielgene des Transkriptionsfaktors DAF-16 für die Expression von Genen zuständig sein könnten, welche die Dauermorphogenese einleiten.

Es konnte gezeigt werden, daß die Zellen des Wurms im Insulin-ähnlichen Signalweg nicht zellautonom agieren, sondern eine positiv signalisierende Zellgruppe kann dem gesamten Nematoden das Signal zu reproduktivem Wachstum bzw. zur Dauerlarvenbildung vermitteln (Apfeld und Kenyon, 1998). Der beschriebene Signalweg verläuft aber zellintern, es wäre demnach zu erwarten, daß Zielgene von DAF-16 an der Produktion eines sekundären endokrinen Signals beteiligt sind.

1.2 HETEROCHRONE GENE IN DER DAUERLARVENBILDUNG

Neben den bereits erwähnten drei Signalwegen, welche die Entscheidung larvaler Arrest gegenüber reproduktivem Wachstum festlegen, konnte außerdem das Gen *daf-12* identifiziert werden, welches ebenfalls den Dauerzustand reguliert, auf Grund genetischer Epistasisuntersuchungen aber am Ende des regulatorischen Signalwegs steht (Riddle *et al.*, 1981). *Daf-d* Mutationen in *daf-12* reprimieren *daf-c* Mutationen sowohl im chemosensorischen, als auch im TGF β -ähnlichen Signalweg (Riddle *et al.*, 1981; Vowels und Thomas, 1992; Thomas *et al.*, 1993).

Insgesamt hat sich gezeigt, daß *daf-12* sowohl Dauerlarven- als auch reproduktive Entwicklung in Einklang mit dem geeigneten Entwicklungszeitpunkt reguliert (Antebi *et al.*, 1998). *daf-12* kodiert für einen nuklearen Hormonrezeptor (NHR) (Yeh, 1991). Das finale Gen *daf-12* zeigt insbesondere auch die Bedeutung der Heterochronie, das bedeutet in diesem Fall, daß der genaue Entwicklungszeitrahmen eingehalten werden soll, zu welchem die Dauerlarve gebildet wird (Antebi *et al.*, 1998, 2000). Unter Heterochronie versteht man die Störung des Zusammenhanges zwischen morphologischen Phänotypen und dem

relativen Zeitablauf im Entwicklungsprogramm eines Organismus. Mutationen in heterochronen Genen bewirken, daß Entwicklungsereignisse relativ zur Wildtypentwicklung früher oder später eintreten (Ambros und Horvitz, 1984). In diesem Zusammenhang erwies es sich als nützlich, die zu den postembryonalen Stadien gehörenden genetisch aktiven Programme mit S1 bis S4, SA, S2d und S3d zu benennen gemäß der Wildtypentwicklung von L1 bis L4, Adult, L2d und Dauerlarve (gemäß Ambros und Horvitz, 1984).

Auf Grunde der heute bekannten heterochron wirkenden Gene läßt sich das Geschehen in frühe und späte Zeitgeber einteilen, gemäß L1 bis L3 Stadium und L3 bis zum Adulten (Ambros, 2000). LIN-14 akkumuliert am stärksten im L1 Stadium, sinkt im L2 Stadium ab und muß in L3 abwesend sein, damit S3 Programm stattfinden kann. Das Gen konnte kloniert werden (Ruvkun *et al.*, 1989) und stellt ein neuartiges regulatorisches Kernprotein dar, wobei keine Homologie zu bereits bekannten Proteinen dieser Art vorhanden ist (Wightman *et al.*, 1991; Hong *et al.*, 2000). *lin-14* Aktivität wird durch *lin-4* Aktivität negativ reguliert (Ambros, 1989). *lin-4* kodiert kein Protein, sondern zwei untranslatierte RNAs, *lin-4L* (61 nt) und *lin-4S* (22 nt) (Lee *et al.*, 1993). Im späten L1 Stadium wird *lin-4S* exprimiert (Feinbaum und Ambros, 1999) und kann an fünf Bindestellen an die 3'UTR des *lin-14* Transkriptes binden, wodurch das Transkript nicht weiter translatiert wird und die Proteinmenge stetig abnimmt (Lee *et al.*, 1993, Wightman *et al.*, 1993). *lin-28* zeigt ähnliche Phänotypen, wie *lin-14* Mutationen, denen S2 Programm fehlt (Ambros und Horvitz, 1984, 1987). Das LIN-28 Protein besitzt eine „cold-shock“ Domäne mit RNA bindenden Motiven und Cys-Cys-His-Cys Zinkfinger für weitere RNA Bindung, wodurch LIN-28 möglicherweise an *lin-14* Transkript bindet und dieses während L1 stabilisiert (Moss *et al.*, 1997). *lin-4S* besitzt eine einzige Bindestelle an der *lin-28* mRNA und kann somit zeitverzögert *lin-28* Translation verhindern, wodurch am Ende der L2 weder LIN-14 noch LIN-28 vorhanden ist und S3 ermöglicht wird (Moss *et al.*, 1997).

Die ausgeführten regulatorischen dauerspezifischen Signalkaskaden stellen die Weiche zwischen S3 und S3d ein. *daf-12* ist schließlich für den Übergang von S2 nach S3/S3d verantwortlich. LIN-14 reprimiert während S1 noch *daf-12* Aktivität. *daf-12* wird in *C. elegans* in drei Isoformen A1, A2 und B exprimiert, wobei sich A1 und A2 nur gering unterscheiden. Die Isoformen werden als *daf-12a* und *daf-12b* bezeichnet (Snow und Larsen, 2000; Antebi *et al.*, 2000). *daf-12a* Expression während des mittleren L2 Stadiums verhindert Wiederholung von S2 im L3 Stadium und senkt dazu den LIN-28 Proteinanteil ab. Dies funktioniert auch ohne *lin-4S*. Insulin und TGF β signalisieren zugunsten *daf-12a*. Hingegen wirkt *daf-12b* als Voreinstellung, wenn keine Signalisierung erfolgt, und S3d wird ausgeführt (Antebi *et al.*, 1998).

Da *daf-12* sowohl S3 als auch S3d regelt, zudem ein Transkriptionsfaktor ist, besteht die Möglichkeit, daß *daf-12* für den Übergang von den frühen zu den späten heterochronen Genen mitverantwortlich ist (Antebi *et al.*, 2000).

Die späte heterochrone Festsetzung ist ortholog zur frühen Stadienbestimmung. Hier agiert eine 21 nt RNA von *let-7*, die auf mRNA Ebene eine Translation von *lin-29* und *lin-41* inhibiert (Reinhart *et al.*, 2000, Slack *et al.*, 2000).

1.3 DIE ENTSTEHUNG DER VULVA

Bei der L2m liegen sechs Vulvavorläuferzellen (VPCs) in einer Reihe ventral im Nematoden vor. Eine der inneren Zellen, V6.p, und die beiden Zellen links und rechts daneben, V5.p und V7.p, durchlaufen ein spezifisches Teilungsmuster, genannt 1° und 2° Schicksal. Sie teilen sich bis zu dreimal und differenzieren terminal zu Vulvazellen. Die drei anderen außen liegenden VPCs teilen sich einmal und fusionieren mit der multinuklearen syncytialen Hypodermiszelle *hyp7* (Sternberg und Horvitz, 1986; Greenwald *et al.*, 1983; Ferguson *et al.*, 1987). Die VPCs sind nach der Signalisierung irreversibel determiniert. Sie führen ein vorgegebenes Teilungsprogramm durch, migrieren in ihre Ausgangsposition und differenzieren sich dort, wodurch sie den muskulösen Eiablageapparat des Nematoden bilden (Sternberg und Horvitz, 1986; Horvitz und Sternberg, 1991; Herman und Hedgecock, 1990; Hill und Sternberg, 1992; Greenwald *et al.*, 1983).

Das Schicksal jeder VPC hängt von interzellulär agierenden Signalen ab: einer induzierenden gonadalen Zelle, der Vulva-Anker-Zelle (AC) (Sulston und White, 1980; Kimble, 1981), der inhibitorisch wirkenden Hypodermis (Herman und Hedgecock, 1990) und den benachbarten VPCs (Sternberg, 1988; Sternberg und Horvitz, 1989). AC signalisiert über einen EGF ähnlichen Wachstumsfaktor. LIN-3 ist das membranständige EGF-Vorläuferprotein, von dem EGF proteolytisch abgespalten wird. EGF ist im Bereich V6.p am höchsten, da diese Zelle direkt unterhalb von AC liegt, und ist geringer vertreten im Bereich um V5.p und V7.p (Hill und Sternberg, 1992; Katz *et al.*, 1995). Der Rezeptor für EGF ist LET-23, eine Rezeptortyrosinkinase (Aroian *et al.*, 1990). Durch positive Signalisierung wird 1° in P6.p induziert (Ferguson und Horvitz, 1985, Koga und Oshima, 1995; Simske und Kim, 1995). Eine auf 1° Schicksal festgelegte Zelle induziert 2° Schicksal in den benachbarten Zellen V5.p und V7.p (Sternberg, 1988, Levitan und Greenwald, 1998). Die hypodermale *hyp7* Zelle inhibiert 1° und 2° Schicksal. Da die Zellen V3.p, V4.p und V8.p weder durch AC für 1°, noch durch V6.p zu 2° stimuliert werden, induziert *hyp7* 3° Schicksal in diesen drei letzten Zellen (Ferguson und Horvitz, 1989, Herman und Hedgecock, 1990).

1.4 ZIELSETZUNG

Seit 13 Jahren kennt man lediglich zwei Gene mit dauermorphogenetischen Mutationen, *daf-9* und *daf-15*. In der initiellen Beschreibung von *daf-9* und *daf-15* zeigen Mutanten unvollständige Dauermorphogenese, dies führt zu einem Entwicklungsabbruch. Alle an Dauerbildung beteiligten Organe zeigen mehr oder weniger stark ausgeprägte L3 oder L3d Eigenschaften. *daf-9* führt im Arrestzustand noch gonadale Keimzellproliferation durch. Sexuelle Reife wird aber nicht erreicht (Albert und Riddle, 1988). Insbesondere von *daf-9* konnten andere mutierte Allele isoliert werden, in denen gonadale DTC Migration affiziert ist. Neuerdings konnte *daf-9* als Cytochrom P450 identifiziert werden. Es stellt eine Verbindung zwischen Reproduktion, Dauerentwicklung und Heterochronie dar (Gerisch *et al.*, 2001, Jia *et al.*, 2002). *daf-9* ist mutmaßlich vor *daf-12* in einem endokrinen hormonellen Signaltransduktionsweg aktiv. Es wird spekuliert, daß darin ein Ligand für den nuklearen Hormonrezeptor *daf-12* gebildet wird (Gerisch *et al.*, 2001).

daf-9 ist das erste klonierte Gen, welches an Dauermorphogenese beteiligt ist, aber auch an der Regulation reproduktiv benötigter Gene. Das System um *daf-12* und *daf-9* reguliert zeitliche Rahmenbedingungen an einem Scheidepunkt von zwei differenzierten Entwicklungswegen.

Wenn man somit das Thema etwas weitläufiger sieht, beinhaltet die Morphogenese der Dauer auch morphologische Effekte, die erst später in der Entwicklung auftreten können, z.B. reproduktive Entscheidungen. Wenn Signale bei der L2 Häutung zum Arrestzustand fehlerhaft an Vulvavorläuferzellen oder die Keimbahn weitergegeben werden, wird der Phänotyp erst im Adulten deutlich, obwohl die kausale Begründung deutlich früher zu suchen ist, eventuell in einem fehlerhaften Teilungsschema der Vulvavorläuferzellen.

C. elegans korrespondiert in vielfältiger Weise mit seiner Umwelt. Dadurch konnten viele Signalkaskaden bestimmt werden, die das Signal zu einer Entwicklungsantwort modellieren. Die Dauerlarvenbildung ist ein zentrales Ereignis, um das sich die meisten heute in *C. elegans* bekannten endokrinen Signalwege arrangieren.

Diese Arbeit beschreibt die Suche nach Genen, die in diesem Spektrum wirksam sind und an morphogenetischen Ereignissen teilnehmen. Es handelt sich um Gene, die teilhaben am Entscheidungsprozeß zwischen Dauerlarvenbildung oder reproduktiver Entwicklung, in letzterem Fall reproduktive Organentwicklung propagieren. Es konnten in *C. elegans* dupliziert vorliegende Gene für lysosomale Carboxypeptidase identifiziert werden, welche die Entwicklung von Vulva und Gonade beeinflussen. Außerdem wurde ein Gen identifiziert, dessen Wirkung einen Beitrag zum Verständnis von Migration bzgl. Gonadenentwicklung und Vulvaentwicklung leisten kann.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 MATERIAL

2.1.1 Genetische Symbole und Nomenklatur

Diese Arbeit beschäftigt sich mit den lysosomalen Carboxypeptidasen, die systematisch mit F23B2.11 und F23B2.12, sowie ZK112.1 und Y116F11B.3 bezeichnet wurden (The *C. elegans* Sequencing Consortium, 1998).

Zudem entstanden in dieser Arbeit mutante Allele *ee1007* und *ee1008*.

Die im folgenden aufgelisteten Gensymbole wurden durch das *Caenorhabditis* Genetics Center (CGC), dem Leiter für genetische Kartierung und Nomenklatur, Dr. J. Hodgkin, akzeptiert und in die entsprechenden *C. elegans* Datenbanken aufgenommen:

pcp-1 für das Gen mit der systematischen Bezeichnung ZK112.1

pcp-2 für das Gen mit der systematischen Bezeichnung F23B2.12

pcp-3 für das Gen mit der systematischen Bezeichnung F23B2.11

pcp-4 für das Gen mit der systematischen Bezeichnung Y116F11B.3

gon-12 symbolisiert provisorisch das zu Allel *ee1007* zugehörige Gen

Dabei steht *pcp* für „*prolyl-carboxypeptidase-like*“, Gene mit Ähnlichkeit zu lysosomaler Carboxypeptidase C bzw. Prolylcarboxypeptidase. *gon* steht gemäß früherer Vereinbarung für „*gonad development abnormal*“, es handelt sich um Gene, dessen Gonadenmorphologie in mutierten Allelen verändert oder degradiert ist.

Durch genetische Komplementation konnte das Allel *ee1008* dem schon bekannten und klonierten Gen *unc-24* zugeordnet werden (Barnes *et al.*, 1996).

2.1.2 *Caenorhabditis elegans* Stämme

Die in dieser Arbeit entstandenen Stämme wurden gemäß der für *C. elegans* geltenden genetischen Nomenklatur bezeichnet (Horvitz *et al.*, 1979, Hodgkin, 1995). Es wurden die unserer Arbeitsgruppe durch Dr. J. Hodgkin zugewiesenen Laborcodes verwendet, `EC` für die Bezeichnung von Stämmen und `ee` für die Bezeichnung von Allelen.

Es sei angefügt, daß EC1053 direkt aus einem Mutageneseexperiment mit Diepoxybutan (DEB) stammt. Daher können weitere unbestimmte Mutationen im Genom dieses Stammes präsent sein. Es war somit erforderlich, den Stamm gegen DR466 und N2 auszukreuzen, es resultieren die Stämme EC1069, EC1070, EC1071, EC1072 und EC1073.

Extrachromosomale Arrays besitzen die Nomenklatur eeEx#, in eckigen Klammern folgt die Beschreibung des Array, darunter sind Markerplasmide, wie pRF4 (*rol-6(su1006)*) oder pHMG1βPromotorEGFP (*hmg1β::gfp*), Wildtypgenbezeichnungen, sowie Cosmid und YAC Bezeichnungen.

Nachfolgende Stämme wurden für diese Arbeit entwickelt:

EC612: *daf-2(m41)* III ; *him-8(e1489)* IV

EC613: *daf-2(m41)* III; *eDf18 / unc-24(e138) dpy-20(e1282)* IV

EC1001: *daf-15(m81) unc-22(s7) / nT1* IV ; + / *nT1* V ;

eeEx1001 [H22D14, F14A5, F49C12, T20D3, C10C5, F56D5, F59B8 , hmg1β::gfp]

EC1002: *daf-15(m81) unc-22(s7) / nT1* IV ; + / *nT1* V ;

eeEx1002 [H22D14, F14A5, F49C12, T20D3, C10C5, F56D5, F59B8 , hmg1β::gfp]

EC1003: *daf-15(m81) unc-22(s7) / nT1* IV ; + / *nT1* V ;

eeEx1003 [H22D14, F14A5, F49C12, T20D3, C10C5, F56D5, F59B8 , hmg1β::gfp]

EC1004: *daf-15(m81) unc-22(s7) / nT1* IV ; + / *nT1* V ;

eeEx1004 [H22D14, F14A5, F49C12, T20D3, C10C5, F56D5, F59B8 , hmg1β::gfp]

EC1005: *daf-15(m81) unc-22(s7) / nT1* IV ; + / *nT1* V ;

eeEx1005 [ZC410, C01F6, F23B2, H05E11, H28B06, hmg1β::gfp]

EC1006: *daf-15(m81) unc-22(s7) / nT1* IV ; + / *nT1* V ;

eeEx1006 [ZC410, C01F6, F23B2, H05E11, H28B06, hmg1β::gfp]

EC1007: *daf-15(m81) unc-22(s7) / nT1* IV ; + / *nT1* V ;

eeEx1007 [ZC410, C01F6, F23B2, H05E11, H28B06, hmg1β::gfp]

EC1008: *daf-15(m81) unc-22(s7) / nT1* IV ; + / *nT1* V ;

eeEx1008 [ZC410, C01F6, F23B2, H05E11, H28B06, hmg1β::gfp]

- EC1009: *daf-15(m81) unc-22(s7) / nT1 IV ; + / nT1 V ;*
eeEx1009 [ZC410, C01F6, F23B2, H05E11, H28B06, hmg1β::gfp]
- EC1010: *daf-15(m81) unc-22(s7) / nT1 IV ; + / nT1 V ;*
eeEx1010 [ZC410, C01F6, F23B2, H05E11, H28B06, hmg1β::gfp]
- EC1011: *daf-15(m81) unc-22(s7) / nT1 IV ; + / nT1 V ;*
eeEx1011 [ZC410, C01F6, F23B2, H05E11, H28B06, hmg1β::gfp]
- EC1012: *daf-15(m81) unc-22(s7) / nT1 IV ; + / nT1 V ;*
eeEx1012 [ZC410, C01F6, F23B2, H05E11, H28B06, hmg1β::gfp]
- EC1013: *daf-15(m81) unc-22(s7) / nT1 IV ; + / nT1 V ;*
eeEx1013 [ZC410, C01F6, F23B2, H05E11, H28B06, hmg1β::gfp]
- EC1014: *daf-15(m81) unc-22(s7) / nT1 IV ; + / nT1 V ;*
eeEx1014 [ZC410, C01F6, F23B2, H05E11, H28B06, hmg1β::gfp]
- EC1015: *daf-15(m81) unc-22(s7) / nT1 IV ; + / nT1 V ;*
eeEx1015 [C46C2, H05E11, H28B06, hmg1β::gfp]
- EC1016: *daf-15(m81) unc-22(s7) / nT1 IV ; + / nT1 V ;*
eeEx1016 [C46C2, H05E11, H28B06, hmg1β::gfp]
- EC1017: *daf-15(m81) unc-22(s7) / nT1 IV ; + / nT1 V ;*
eeEx1017 [C46C2, H05E11, H28B06, hmg1β::gfp]
- EC1018: *daf-15(m81) unc-22(s7) / nT1 IV ; + / nT1 V ;*
eeEx1018 [C46C2, H05E11, H28B06, hmg1β::gfp]
- EC1019: *daf-15(m81) unc-22(s7) / nT1 IV ; + / nT1 V ;*
eeEx1019 [C46C2, H05E11, H28B06, hmg1β::gfp]
- EC1022: *daf-15(m81) unc-22(s7) / nT1 IV ; + / nT1 V ;*
eeEx1022 [F59B8, F38E11, C33A12, F56H11, T05A1, F27C8, W09C2, hmg1β::gfp]
- EC1023: *daf-15(m81) unc-22(s7) / nT1 IV ; + / nT1 V ;*
eeEx1023 [F59B8, F38E11, C33A12, F56H11, T05A1, F27C8, W09C2, hmg1β::gfp]
- EC1026: *daf-15(m81) unc-22(s7) / nT1 IV ; + / nT1 V ; eeEx1026 [C01F6 ; hmg1β::gfp]*
- EC1033: *eeEx33 [F23B2 ; hmg1β::gfp]*
- EC1034: *daf-15(m81) unc-22(s7) / nT1 IV ; + / nT1 V ; eeEx1034 [Y11D7A ; hmg1β::gfp]*
- EC1035: *daf-15(m81) unc-22(s7) / nT1 IV ; + / nT1 V ; eeEx1035 [Y11D7A ; hmg1β::gfp]*
- EC1038: *daf-15(m81) unc-22(s7) / nT1 IV ; + / nT1 V ; eeEx38 [F23B2 ; hmg1β::gfp]*
- EC1039: *daf-15(m81) unc-22(s7) / nT1 IV ; + / nT1 V ; eeEx39 [F23B2 ; hmg1β::gfp]*
- EC1040: *daf-15(m81) unc-22(s7) / nT1 IV ; + / nT1 V ; eeEx33 [F23B2 ; hmg1β::gfp]*
- EC1049: *daf-15(m81) unc-22(s7) / nT1 IV ; + / nT1 V ; eeEx49 [pcp-3⁺ ; hmg1β::gfp]*
- EC1050: *daf-15(m81) unc-22(s7) / nT1 IV ; + / nT1 V ; eeEx50 [pcp-3⁺ ; hmg1β::gfp]*
- EC1052: *eeEx52 [rol-6(su1006) ; pcp-3::gfp]*
- EC1053: *daf-2(m41) III ; gon-12(ee1007) unc-24(ee1008) IV*
- EC1057: *daf-2(m41) III ; gon-12(ee1007) unc-24(ee1008) IV eeEx57 [C50D10 ; K09F8 ; hmg1β::gfp]*

EC1058: *daf-2(m41)* III ; *gon-12(ee1007) unc-24(ee1008)* IV eeEx58 [C50D10 ; K09F8 ; *hmgIβ::gfp*]
 EC1059: *daf-2(m41)* III ; *gon-12(ee1007) unc-24(ee1008)* IV eeEx59 [C50D10 ; K09F8 ; *hmgIβ::gfp*]
 EC1060: *daf-2(m41)* III ; *gon-12(ee1007) unc-24(ee1008)* IV eeEx60 [C50D10 ; K09F8 ; *hmgIβ::gfp*]
 EC1061: *daf-2(m41)* III ; *gon-12(ee1007) unc-24(ee1008)* IV eeEx61 [C50D10 ; K09F8 ; *hmgIβ::gfp*]
 EC1062: *daf-2(m41)* III ; *gon-12(ee1007) unc-24(ee1008)* IV eeEx62 [*pcp-2⁺* ; *hmgIβ::gfp*]
 EC1063: *daf-2(m41)* III ; *gon-12(ee1007) unc-24(ee1008)* IV eeEx63 [*pcp-2⁺* ; *hmgIβ::gfp*]
 EC1064: *daf-2(m41)* III ; *gon-12(ee1007) unc-24(ee1008)* IV eeEx64 [*pcp-2⁺* ; *hmgIβ::gfp*]
 EC1065: *daf-2(m41)* III ; *gon-12(ee1007) unc-24(ee1008)* IV eeEx65 [*pcp-2⁺* ; *hmgIβ::gfp*]
 EC1066: *daf-2(m41)* III ; *gon-12(ee1007) unc-24(ee1008)* IV eeEx66 [*pcp-2⁺* ; *hmgIβ::gfp*]
 EC1067: *daf-2(m41)* III ; eeEx67 [*rol-6(su1006)* ; *pcp-2::gfp*]
 EC1068: *daf-2(m41)* III ; eeEx68 [*rol-6(su1006)* ; *pcp-2::gfp*]
 EC1069: *gon-12(ee1007) unc-24(ee1008)* IV
 EC1070: *gon-12(ee1007) unc-24(ee1008)* IV ; *him-5(e1490)* V
 EC1071: *daf-2(m41)* III ; *gon-12(ee1007) unc-24(ee1008)* IV ; *him-5(e1490)* V
 EC1072: *daf-2(m41)* III ; *gon-12(ee1007) unc-24(ee1008)* IV
 EC1073: *unc-24(ee1008)* IV

Festlegung genetischer Unterschiede erfordert ein Basissystem, welches als Wildtyp (wt) bezeichnet wird. Dieser *Caenorhabditis elegans* Stamm, der nahe Bristol isoliert werden konnte, heißt N2 (Brenner, 1974). Die hier verwendete fortlaufende N2 Kultur entstammt dem Labor von Dr. E. Schierenberg in Köln.

Ferner wurden folgende *C. elegans* Stämme eingesetzt. Diese wurden, falls nicht besonders erwähnt, vom CGC erhalten.

CB1489: *him-8(e1489)* IV
 CB3823: *eDf18 / unc-24(e138) dpy-20(e1282)* IV
 DR40: *daf-1(m40)* IV
 DR412: *daf-15(m81) / unc-24(e138)* IV
 DR466: *him-5(e1490)* V
 DR732: *daf-15(m81) unc-22(s7) / nT1* IV ; + / *nT1* V
 DR733: *daf-9(e1406) lon-2(e678) / unc-78(e1217)* X
 DR1564: *daf-2(m41)* III
 EC315: *daf-2(m41)* III ; eeIs306 [*myo-2::d1egfp*]
 (K. Reisner, S. Fröde und E. Schulze, unveröffentlicht)
 JT6130: *daf-21(p673)* V
 NW987: *unc-129(ev554)* IV

Alle verwendeten Stämme wurden kryokonserviert gemäß Sulston und Brenner (1974). Dies ermöglicht Langzeitspeicherung von *C. elegans* Stämmen, sowie Rückhalt von Vergleichsstämmen, die bei Bedarf wieder aufgetaut werden können, oder wenn im Verlauf von Langzeitkultivierung genomische Schäden auftreten.

2.1.3 Cosmidklone

Die Klone entstammen der Cosmidbibliothek von Alan Coulson. Sie entspricht beinahe dem kompletten *Caenorhabditis elegans* Genom (Coulson *et al.*, 1986, 1988, 1991). In Tabelle 1 sind die in dieser Arbeit verwendeten Cosmidklone aufgelistet, sowie deren Antibiotikaresistenz in den verwendeten *E.coli* Hostzellen. Handhabung erfolgte gemäß Empfehlung des Herstellers. Präparation der Cosmide erfolgte durch DNA MIDI Präparation über Ionentauscher des DNA MIDI Prep Kits von Macherey Nagel gemäß dessen Anweisung. Außerdem ist der Zugriffscode (Acc.No.) angegeben, unter dem die Sequenz der sequenzierten Cosmide bei der Datenbank vom NCBI des National Institute of Health (NIH) abgerufen werden kann. Die aktuelle Internetadresse (URL) des NCBI ist unter <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> aufzurufen.

Tabelle 1: alle in dieser Arbeit verwendeten Cosmidklone und YACs

Die YACs sind gesondert markiert (*), Selektion der YAC enthaltenden Hefezellen erfolgt auf Minimalagarplatten ohne Uracil (ura⁻). Cosmide ohne Acc.No. sind nicht sequenziert worden. Cosmide, die nicht präpariert wurden, sind gesondert markiert (+).

Name des Cosmids	Antibiotikaresistent	ggf. Acc.No.
C01F6	Ampicillin	Z68213
C07C7	Ampicillin	Z68295
C10C5	Ampicillin	Z68214
C33A12	Ampicillin	Z68493
C46C2	Ampicillin	Z68296
C50D10	Ampicillin	---
C53D6(+)	---	Z70270
F14A5	Kanamycin	Z75951
F23B2	Kanamycin	Z82266
F27C8	Kanamycin	Z68216
F38E11	Kanamycin	Z68342
F49C12	Kanamycin	Z68227

Name des Cosmids	Antibiotikaresistent	ggf. Acc.No.
F56D5	Kanamycin	Z69662
F56H11	Kanamycin	Z68749
F59B8	Kanamycin	Z68343
H05E11	Chloramphenicol	---
H22D14	Chloramphenicol	AL022273
H28B06	Chloramphenicol	---
K09F8	Kanamycin	---
T05A1	Kanamycin	Z68219
T20D3	Kanamycin	Z68220
VF38E11R(+)	---	AL033537 und Z99267
W09C2	Kanamycin	Z68221
Y11D7A(*)	(-ura)	AL032632
Y116F11B(**)	---	AL132943
ZC410	Kanamycin	Z68270
ZK112(+)	---	L14324

2.1.4 Oligonukleotide

Im folgenden sind die verwendeten Oligonukleotide bzw. Primer aufgelistet. Zusätzliche Information bzgl. 5' Bindeposition an dem entsprechenden sequenzierten Cosmid ist gegeben (The *C. elegans* Sequencing Consortium, 1998). Dieses Cosmid ist aber nicht notwendig auch immer das bei PCR verwendete template. Zudem ist unterstrichen dargestellt die nicht zur Cosmidsequenz komplementäre Sequenz von Consensus Sequenzen diverser Restriktionsendonukleasen, die dem Design der Primer angefügt wurden zum Zweck der Klonierung. Im Anhang sind die Sequenzen von F23B2.12 und F23B2.11 in Kapitel 8.1 dargestellt, die Positionen der Primer sind unterstrichen markiert.

12ex1-f CCCAAGCTTAAAGCTAACAGTCGTGGAGC
*Hind*III; an Pos. 244 des sequenzierten C07C7 Cosmids
 Pos. 1834-1857 der Sequenz im Anhang

12ex1-b CCGCTCGAGTTAATAGAAAGTATGTATCGCCCC
*Xho*I; an Pos. 38393 des sequenzierten F23B2 Cosmids
 Pos. 2517-2494 der Sequenz im Anhang

12ex2/3-f	<u>CCCAAGCTTCGAAAGTTCTTATACAAAATTGTGAGG</u> <i>HindIII</i> ; an Pos. 38441 des sequenzierten F23B2 Cosmids Pos. 2469-2495 der Sequenz im Anhang
12ex2/3-b	<u>CCGCTCGAGATGCACACTTTGTAAGCCCC</u> <i>XhoI</i> ; an Pos. 37495 des sequenzierten F23B2 Cosmids Pos. 3396-3415 der Sequenz im Anhang
12ex4-f	<u>CCCAAGCTTCAGGATGGAGTATGTTTACTAAACG</u> <i>HindIII</i> ; an Pos. 37563 des sequenzierten F23B2 Cosmids Pos. 3347-3371 der Sequenz im Anhang
12ex4-b	<u>CCGCTCGAGAAAGGAAAGTTGTGGGCAGGG</u> <i>XhoI</i> ; an Pos. 36258 des sequenzierten F23B2 Cosmids Pos. 4632-4693 der Sequenz im Anhang
12ex5-f	<u>AACTGCAGTTGTCTGTGACGCTACTGCC</u> <i>PstI</i> ; an Pos. 36391 des sequenzierten F23B2 Cosmids Pos. 4500-4519 der Sequenz im Anhang
12ex5-b	<u>CCGCTCGAGGGTAGTAATTGTTGAAAACATCCATGC</u> <i>XhoI</i> ; an Pos. 35195 des sequenzierten F23B2 Cosmids Pos. 5715-5689 der Sequenz im Anhang
12ex6-f	<u>CCCAAGCTTCATTATAAATGTTAAGTTGTAATTCGGG</u> <i>HindIII</i> ; an Pos. 35273 des sequenzierten F23B2 Cosmids Pos. 5636-5664 der Sequenz im Anhang
12ex6-b	<u>CCGCTCGAGTTTTTTAATGAACACCTAATTTTCAAGG</u> <i>XhoI</i> ; an Pos. 34668 des sequenzierten F23B2 Cosmids Pos. 6243-6215 der Sequenz im Anhang
SF_F23B2.11_P1_b	<u>TGCTCTAGACGATTTAAGCAACCAGATCCCAGGC</u> <i>XbaI</i> ; an Pos. 33360 des sequenzierten F23B2 Cosmids Pos. 7050-7074 der Sequenz im Anhang
SF_F23B2.11_P1_f	<u>CCCAAGCTTTATATCTGATCATAGTCTGCTGCCG</u> <i>HindIII</i> ; an Pos. 31830 des sequenzierten F23B2 Cosmids Pos. 9080-9056 der Sequenz im Anhang
SF_F23B2.11_P2_b	<u>TGCTCTAGATAAATTACCAGAGGATGTAATATCC</u> <i>XbaI</i> ; an Pos. 31766 des sequenzierten F23B2 Cosmids Pos. 9144-9167 der Sequenz im Anhang
SF_F23B2.11_P2_f	<u>CCCAAGCTTTCAGTAAAACGTTAGTGTCTTACCC</u> <i>HindIII</i> ; an Pos. 30463 des sequenzierten F23B2 Cosmids Pos. 10447-10423 der Sequenz im Anhang

SF_F23B2.11expr_f	<u>CGCGGATCCAAACTTTGAAGCATATACCC</u> <i>Bam</i> HI; an Pos. 32703 des sequenzierten F23B2 Cosmids Pos. 8202-8183 der Sequenz im Anhang
SF_F23B2.11expr3_f	<u>CTAGTGGGGCCCGTCAATTGTTGTGCACATGTCCG</u> <i>Bsp</i> 120I; an Pos. 31637 des sequenzierten F23B2 Cosmids Pos. 9273-9251 der Sequenz im Anhang
SF_F23B2.11g_b	<u>CTTTGCCCTAAACGTAGAAATGCC</u> an Pos. 34567 des sequenzierten F23B2 Cosmids Pos. 6343-6367 der Sequenz im Anhang
SF_F23B2.11g(2)_b	<u>CCCAAGCTTCTTTGCCCTAAACGTAGAAATGCC</u> <i>Hind</i> III; an Pos. 34567 des sequenzierten F23B2 Cosmids Pos. 6343-6367 der Sequenz im Anhang
SF_F23B2.11g_f	<u>TTTCCTTTCAAGTAACGAATGACCGC</u> an Pos. 28967 des sequenzierten F23B2 Cosmids Pos. 11943-111918 der Sequenz im Anhang
SF_F23B2.12expr1_b	<u>CTGGGGCCCCATTGAACTCAACGATTTCTTGAATGG</u> <i>Bsp</i> 120I; an Pos. 37798 des sequenzierten F23B2 Cosmids Pos. 3111-3085 der Sequenz im Anhang
SF_F23B2.12expr1/2_f	<u>CCGCTCGAGGTCCCGAAAATAGTCTACGCTTCTGG</u> <i>Xho</i> I; an Pos. 1960 des sequenzierten C07C7 Cosmids Pos. 143-168 der Sequenz im Anhang
SF_sjj_C01F6.6_b	<u>CCGCTCGAGGGTAACATAAGGGATTTTAGGCG</u> <i>Xho</i> I; an Pos. 25211 des sequenzierten C01F6 Cosmids
SF_sjj_C01F6.6_f	<u>CCCAAGCTTATTTTTGGAATGTTCCCATTCT</u> <i>Hind</i> III; an Pos. 24084 des sequenzierten C01F6 Cosmids
SF_sjj_C01F6.7_b	<u>CCGCTCGAGCACCCGACTCCTAGATTCCA</u> <i>Xho</i> I; an Pos. 27289 des sequenzierten C01F6 Cosmids
SF_sjj_C01F6.7_f	<u>CCCAAGCTTAAAAAGACGGGGCAAAGAAT</u> <i>Hind</i> III; an Pos. 26281 des sequenzierten C01F6 Cosmids
SF_sjj_C46C2.4_f	<u>CCCAAGCTTCGAAGTTGTTCCCGTCGTAT</u> <i>Hind</i> III; an Pos. 3340 des sequenzierten C46C2 Cosmids
SF_sjj_C46C2.4_b	<u>CCGCTCGAGTGACGACAACGTGTTAGGGA</u> <i>Xho</i> I; an Pos. 4523 des sequenzierten C46C2 Cosmids
SF_sjj_F23B2.1_b	<u>CCCAAGCTTAACTGGGTTCATGTTTCGAAGTT</u> <i>Hind</i> III; an Pos. 3907 des sequenzierten F23B2 Cosmids
SF_sjj_F23B2.1_f	<u>CGCGGATCCTCCAAACCACAAATTGCTTACTT</u> <i>Bam</i> HI; an Pos. 2280 des sequenzierten F23B2 Cosmids

SF_sjj_F23B2.2_b	<u>CCGCTCGAGGAAATTTACGTTCTTCGTTAC</u> <i>Xho</i> I; an Pos. 1781 des sequenzierten F23B2 Cosmids
SF_sjj_F23B2.2_f	<u>CGCGGATCCTGTTTCGTCTTTTGGTTTGAGTT</u> <i>Bam</i> HI; an Pos. 589 des sequenzierten F23B2 Cosmids
SF_sjj_F23B2.12_b	<u>CCGCTCGAGGGGGCTTACAAAGTGTGCAT</u> <i>Xho</i> I; an Pos. 37514 des sequenzierten F23B2 Cosmids Pos. 3396-3415 der Sequenz im Anhang
SF_sjj_F23B2.12_f	<u>CCCAAGCTTTACCCACACGACTTTCTCC</u> <i>Hind</i> III; an Pos. 36463 des sequenzierten F23B2 Cosmids Pos. 4447- 4428 der Sequenz im Anhang
SFF23B2.3rna-b	<u>CCGCTCGAGGGACGCCAGTTTTGATTGTT</u> <i>Xho</i> I; an Pos. 8090 des sequenzierten F23B2 Cosmids
SFF23B2.3rna-f	<u>CCCAAGCTTATCCTCCCAAGAACATTCCC</u> <i>Hind</i> III; an Pos. 6952 des sequenzierten F23B2 Cosmids
SFF23B2.4rna-b	<u>CCCAAGCTTCATGGGATGTGTTGATGGAA</u> <i>Hind</i> III; an Pos. 16527 des sequenzierten F23B2 Cosmids
SFF23B2.4rna-f	<u>CGCGGATCCAGCTATTCGGAGGGCTTCTC</u> <i>Bam</i> HI; an Pos. 14872 des sequenzierten F23B2 Cosmids
SFF23B2.5rna-b	<u>CCGCTCGAGGAATTAGCTGCTGTGTGAGTGTG</u> <i>Xho</i> I; an Pos. 19883 des sequenzierten F23B2 Cosmids
SFF23B2.5rna-f	<u>CGCGGATCCATCTTCCTGAAATCCAATCCAT</u> <i>Bam</i> HI; an Pos. 18302 des sequenzierten F23B2 Cosmids
SFF23B2.6rna-b	<u>CCCAAGCTTATTTGAAGAATGGCAATGAGAAA</u> <i>Hind</i> III; an Pos. 22379 des sequenzierten F23B2 Cosmids
SFF23B2.6rna-f	<u>CGCGGATCCAAAGTCGTCAAGAAACCAATCAA</u> <i>Bam</i> HI; an Pos. 21389 des sequenzierten F23B2 Cosmids
SFF23B2.7rna-b	<u>CCCAAGCTTCGACGGCAGCTCTCTAGTCT</u> <i>Hind</i> III; an Pos. 25834 des sequenzierten F23B2 Cosmids
SFF23B2.7rna-f	<u>CCGGAATTCGAAATCGCAACGTTCTGTGA</u> <i>Eco</i> RI; an Pos. 24377 des sequenzierten F23B2 Cosmids
SFF23B2.8rna-b	<u>CCGCTCGAGTTCCTTTGCATTTACGAAGTTA</u> <i>Xho</i> I; an Pos. 26573 des sequenzierten F23B2 Cosmids
SFF23B2.8rna-f	<u>CCCAAGCTTGAGGATCTCGCGTAATAAATGTG</u> <i>Hind</i> III; an Pos. 25936 des sequenzierten F23B2 Cosmids
SFF23B2.9rna-b	<u>CCGCTCGAGCGGGAAATTTCTTACGTTAGCTT</u> <i>Xho</i> I; an Pos. 23430 des sequenzierten F23B2 Cosmids

SFF23B2.9nai-f	<u>CCCAAGCTTAATAAAAAGGTTCCAACACCGACT</u> <i>HindIII</i> ; an Pos. 22576 des sequenzierten F23B2 Cosmids
SFF23B2.10nai-b	<u>CCGCTCGAGAGAATTTGCCGTTTGTGCGAG</u> <i>XhoI</i> ; an Pos. 27751 des sequenzierten F23B2 Cosmids
SFF23B2.10nai-f	<u>CCCAAGCTTCAGTGCTTGCTCTTCATCCA</u> <i>HindIII</i> ; an Pos. 26688 des sequenzierten F23B2 Cosmids
SFF23B2.11nai-b	<u>CCGCTCGAGATCCACCAGGTTTCGAACAG</u> <i>XhoI</i> ; an Pos. 30750 des sequenzierten F23B2 Cosmids Pos. 10160-10179 der Sequenz im Anhang
SFF23B2.11nai-f	<u>CGCGGATCCAGACGTCCATGCACATTTGA</u> <i>BamHI</i> ; an Pos. 29575 des sequenzierten F23B2 Cosmids Pos. 11335-11316 der Sequenz im Anhang
SFsjj_C53D6.4_b	<u>CGCGGATCCCTTGCGAGAAGCGAAGAATC</u> <i>BamHI</i> ; an Pos. 25369 des sequenzierten C53D6 Cosmids
SFsjj_C53D6.4_f	<u>CCGCTCGAGTCGACCCGTTTGGTTGAAAGAA</u> <i>XhoI</i> ; an Pos. 23689 des sequenzierten C53D6 Cosmids
SF_Y116F11B.3_b	<u>CCGCTCGAGTTCGGCTTAGGCTTAGGCTTAGGC</u> <i>XhoI</i> ; an Pos. 29198 des sequenzierten Y116F11B YACs
SF_Y116F11B.3_f	<u>CCGGAATTCAACTCACCCACAAGACTATCCCC</u> <i>EcoRI</i> ; an Pos. 28261 des sequenzierten Y116F11B YACs
sjj_F23B2_11_3UTR_b	<u>CCGCTCGAGACAACCAAAGTTCAGCAATCTTCC</u> <i>XhoI</i> ; an Pos. 28391 des sequenzierten F23B2 Cosmids Pos. 12519-11495 der Sequenz im Anhang
sjj_F23B2_11_3UTR_f	<u>CCCAAGCTTCTTGTCATTCATTGCCATTTTCGC</u> <i>HindIII</i> ; an Pos. 29150 des sequenzierten F23B2 Cosmids Pos. 11760-11783 der Sequenz im Anhang
sjj_F23B2_12_3UTR_b	<u>CCGCTCGAGGTGCAAAAGCCTCTTAGTATTGACCG</u> <i>XhoI</i> ; an Pos. 33845 des sequenzierten F23B2 Cosmids Pos. 7065-7039 der Sequenz im Anhang
sjj_F23B2_12_3UTR_f	<u>CCCAAGCTTGTTTAACGCCCTTCATTGCCATGC</u> <i>HindIII</i> ; an Pos. 34787 des sequenzierten F23B2 Cosmids Pos. 6123- 6147 der Sequenz im Anhang

2.1.5 Enzyme für die Molekularbiologie

Alle hier aufgelisteten Enzyme entstammen der Firma MBI Fermentas (St. Leon-Rot), deren Angaben zur Verwendung wurden eingehalten. Sie wurden ausnahmslos zu Klonierzwecken benutzt.

Restriktionsendonukleasen:

*Bam*HI, *Bcu*I, *Bsp*120I, *Eco*RI, *Hind*III, *Pst*I, *Xho*I

weitere Enzyme:

Taq-DNA-Polymerase, T4-DNA-Ligase, β -Agarase

2.1.6 Plasmide und Bakterienstämme

Molekularbiologische Klonierverfahren, sowie nachfolgende Arbeiten in *C. elegans* erforderten folgende synthetisch erstellten Plasmide und geeignete *Escherichia coli* Stämme.

Plasmide:

L4440	Timmons and Fire, 1998
pBluescript SK (+)	Short <i>et al.</i> , 1988
pEGFP-N1	Vektordesign von Clontech (Palo Alto, CA, USA); Chalfie <i>et al.</i> , 1994

Bakterienstämme:

DH5 α	Woodcock <i>et al.</i> , 1989
HT115	Timmons <i>et al.</i> , 2001
XL1 blue	Bullock <i>et al.</i> , 1987

2.1.7 Chemikalien, Lösungen, Nährmedien und diagnostische Kits

DNA Midiprep Kit Macherey Nagel, Düren

Expand High Fidelity PCR System Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

MEGAScript™ T7 *in vitro* Transcription Kit for large scale synthesis of RNA
(AMBION, Woodward Austin, TX, USA)

1 M Kaliumphosphatpuffer pH, 6,0: 136g KH₂PO₄ werden in 900 ml Wasser gelöst,
der pH von 6,0 wird mit KOH Plätzchen eingestellt, dann auf 1000 ml aufgefüllt

LB (Laura-Bertani) Lösung und Agarplatten: Wang und Koch, 1978

10g Trypton (DIFCO, Detroit, USA), 5g NaCl, 5g Hefeextrakt (Roth, Karlsruhe
oder DIFCO), evtl. 15 g Bactoagar (DIFCO) auf 1000 ml Wasser

Antibiotika können nach dem Autoklavieren bei weniger als 65°C zugefügt werden

M9: Brenner, 1974

6g Na₂HPO₄, 3g KH₂PO₄, 5g NaCl, 0,25g MgSO₄*7H₂O in 1000 ml Wasser

5x M9 (ohne Mg²⁺ Ionen):

3,4g Na₂HPO₄, 1,5g KH₂PO₄, 0,25g NaCl, 0,5g NH₄Cl in 100 ml Wasser

NGM / OP50 Agarplatten: Brenner, 1974

3g NaCl, 2,5g Pepton (Roth, Karlsruhe), 17g Agar (Bacteriology Grade, Applichem,
Darmstadt) in 975 ml Wasser, autoklaviert, dann auf 55°C abgekühlt

unter Rühren werden unter Einhaltung der Reihenfolge folgende einzeln autoklavierte
Lösungen zupipettiert, um Salzpräzipitate zu vermeiden, 1 ml 5mg/ml Cholesterol

(ethanolische Lösung, nicht autoklaviert), 1 ml 1M CaCl₂, 1 ml 1M MgSO₄ und 25 ml

1 M Kaliumphosphatpuffer pH, 6,0; es werden Agarplatten in 6 cm Ø Petrischalen

gegossen; 30 µl einer frisch angezogenen OP50 Kultur in LB ohne Antibiotika werden

1:3 verdünnt auf diesen Platten ausgestrichen und 16h bei 20°C vorinkubiert, bevor

C. elegans auf diesen Platten kultiviert wird

10x PBS (phosphate buffered saline):

1,4 M NaCl, 27 mM KCl, 80 mM Na₂HPO₄, 15 mM KH₂PO₄

RNGM / OP50: wie NGM / OP50, allerdings mit dreifacher Peptonmenge

TE: Tris / HCl pH 8,0 ; 1 mM EDTA (Etylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure; als
Dinatriumsalz eingesetzt)

2.1.8 Mikroskopie

Standardvisualisierung bei Nematodenkultivierung erfolgt mit Durchlicht an einem Stereomikroskop mit 50 bis 500-facher Gesamtvergrößerung, stufenweise einstellbar unter Einbeziehung des Objektivrevolvers (Wild-Heerbrugg, Schweiz).

Zur Selektion fluoreszierender Nematoden stand ein Dissektionsstereomikroskop SZX-RFL2 (Olympus, Tokyo Japan) mit Durchlicht und koaxialer Fluoreszenzoptik zur Verfügung. Durchlicht wird ermöglicht über den optionalen Boden SZX-ILLB200 des SZX12 Binokulars und optimiert mit der Kaltlichtquelle Highlight 3100. GFP Fluoreszenz wird visualisiert durch Anregung mit Licht einer Quecksilberdampflampe (HBO USH-102D, Ushio Japan), welches über einen Bandpass von 460 bis 490 nm gefiltert wird. Ein 510 nm Emissionsfilter visualisiert die in den grün sichtbaren Spektralbereich verschobene Fluoreszenz. Die Filtereinheit SZX-MGFP (Olympus) ermöglicht spezifische Absorption und Emission.

Mikroinjektion in *C. elegans* erfolgte an einem reversen Zeiss Axiovert 35 Mikroskop ausgestattet mit Nomarski Differentieller Interferenz Kontrast, Epifluoreszenzoptik und diversen Mikromanipulationseinrichtungen. Zur Injektion wird neben dem 10x Okular im Objektivrevolver ein 10x und ein 40x Objektiv (Neofluar; 0,75) benötigt. Das Axiovert 35 ist weiterhin ausgestattet mit einer motorbetriebenen Mikromanipulationseinrichtung, einem Piezo Translator PMZ 20 und einer herkömmlichen Druckluftpistole.

Lichtmikroskopische Aufnahmen wurden an einem Zeiss Axioplan 2 Mikroskop ausgeführt, ausgestattet mit LSM510 (konfokales Laserscanning Modul, ZEISS) und einer SPOT RT CCD Kamera (Diagnostic Instruments, Sterling Heights, MI, USA), Nomarski Differentieller Interferenz Kontrast und Epifluoreszenzoptik. Grün fluoreszierende Bilder wurden erstellt bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm und einem Emissionsbandpassfilter mit einem Wellenlängenspektrum zwischen 505 und 550 nm. Rote Fluoreszenz des Nile Red wird über einen Bandpassfilter 546 ± 12 nm angeregt, Emission wird über den einen Langpassfilter gemessen, welches Licht von mehr als 590 nm Wellenlänge durchläßt. Zur Betrachtung der Autofluoreszenz des Darmes von *C. elegans* wurde ein Filter gewählt, der 364 nm Anregungswellenlänge passieren läßt.

Nematoden wurden auf 4% Agarosepads in M9 Lösung der Schichtdicke von etwa 3 Tesafilmstreifen in einem 5µl Tropfen M9 mit 2% Natriumazid zur mikroskopischen Untersuchung auf einem Objektträger eingebettet. Das Natriumazid paralyisiert die Nematoden, das Agarosepad fixiert die Nematoden in einer Ebene nach Deckglasauflage. Nematoden sind extrem austrocknungsempfindlich, deshalb wird das Präparat mit Nagellack versiegelt, um einen ausreichenden Beobachtungszeitrahmen zu gewährleisten.

2.1.9 Computersoftware

Im Rahmen der Nukleotidsequenzanalyse und Proteinanalyse verwendeter DNA-Sequenzen und Proteinsequenzen wurde „PC Gene : the nucleic acid and protein sequence analysis software system; © A. Bairoch, Universität von Genf, Schweiz™, Version 6.70 (Oct. 1992)“ eingesetzt (Moore *et al.*, 1988). Die benötigten Daten wurden der Datenbank des National Institute of Health, USA, aus dem Internet entnommen (URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Urheber dieser Daten ist „The *C. elegans* Sequencing Consortium“ (1998), dessen Daten auch den Datenbanken ACeDB (Eeckman und Durbin, 1995) und Wormbase (Stein *et al.*, 2001) zu entnehmen sind, unter anderem auch, um physikalische Kartierungsdaten von Cosmiden und YACs zu erhalten (Coulson *et al.*, 1988; Sulston *et al.*, 1988).

Vergleichende Protein und Nukleinsäurestrukturanalysen wurden mit dem „profile hidden Markov Model Software HMMER 2.2 (Eddy, 1998) der Datenbank PFAM Version 7.2 (Bateman *et al.*, 2002) durchgeführt. Weiterführende Analyse erfolgte mit SMART Version 3.4 (Schultz *et al.*, 1998; Letunic *et al.*, 2002) und Blast 2.0 (Altschul *et al.*, 1997) der Datenbank Genbank (NCBI). CLUSTALX Version 1.64b (Thompson *et al.*, 1994) wurde zur Erstellung von multiplen Sequenzvergleichen benutzt und MEGA2 (Kumar *et al.*, 2001), um UPGMA Vergleichsstammbäume zu erstellen.

Abschließende Photobearbeitung erfolgte mit SPOT Kamera Software 3.1, sowie der ZEISS-Konfokal-Mikroskop Software Version 2.50 für LSM510 und Adobe Photoshop 5.5.

2.2 METHODEN

2.2.1 Molekularbiologie

Zur Untersuchung der lysosomalen Carboxypeptidasen mit den systematischen Bezeichnungen F23B2.11 (*pcp-3*) und F23B2.12 (*pcp-2*) von *Caenorhabditis elegans* wird die Herstellung von unterschiedlichen Bakterienstämmen beschrieben, die *in vivo* dsRNA ausbilden. Parallel dazu wird entsprechende dsRNA auch in einer *in vitro* RNA Reaktion synthetisiert. Beide Sorten dsRNA sollen im Anschluß dazu eingesetzt werden, um durch Fütterungsexperimente der Bakterien oder durch Mikroinjektion der *in vitro* synthetisierten dsRNA in den *C. elegans* Körper genspezifische Phänotypen auf Basis komplementärer Bindung an endogene mRNA in den affektierten Nematoden zu verursachen. Diese Technik wird als RNA vermittelte Geninaktivierung (RNAi) bezeichnet (Fire *et al.*, 1998).

Zur weiteren Untersuchung werden zusätzliche RNAi Fütterungskclone zu anderen Genen erstellt, die möglicherweise in einem Zusammenhang mit *pcp-2* und *pcp-3* stehen könnten. Außerdem werden zwei Reporter erstellt, die nach Mikroinjektion in *C. elegans* GFP exprimieren (Prasher *et al.*, 1992) unter Kontrolle der wurmeigenen Promotoren von *pcp-2* und *pcp-3*. Dies soll räumliche und zeitliche Aktivität dieser Promotoren darstellen, um Rückschlüsse auf die gewebe- und stadienspezifische Bedeutung der durch diese Promotoren endogen kontrollierten Carboxypeptidasen ziehen zu können (Chalfie *et al.*, 1994).

Einige PCR-Produkte und Plasmide wurden zudem erstellt, um die *C. elegans* Gene *pcp-2* und *pcp-3* zu sequenzieren, um eventuelle Zugehörigkeit von mutierten Allelen, wie *m81* des *daf-15* Locus oder dem in dieser Arbeit vorgestellten *ee1007*, zu diesen lysosomalen Carboxypeptidasen zu ermitteln.

2.2.1.1 Isolation chromosomaler DNA aus *C. elegans* Populationen

Bei der Erstellung einiger Plasmidklone war es notwendig, bei der PCR Reaktion direkt chromosomale DNA von *Caenorhabditis elegans* als Matritze zu benutzen. Verwendet wurde DNA des Wildtyps N2, von DR732 und von EC1053, der im Rahmen dieser Arbeit erstellt wurde (Kapitel 2.2.8).

Isolierung chromosomaler DNA erfolgte gemäß Korswagen *et al.* (1996), die Basispräparationsgrundlage stellt Wood *et al.* (1988). Nematoden von 3-4 dicht

bewachsenen, aber nicht zu alten, NGM / OP50 Kulturplatten wurden mit ausreichend 4°C M9 Lösung abgespült, bei 1500 rpm pelletiert. Es erfolgten sechs Waschschriffe mit etwa 10 ml 4°C M9, dabei wurden die Nematoden nachfolgend 2x bei 1200 rpm, 2x bei 1000 rpm und 2x bei 800 rpm pelletiert, um *E.coli* OP50 weitgehend von den Würmern zu entfernen. Gereinigte Nematoden wurden in 400 µl 0,2 M NaCl, 0,1 M Tris/HCl pH 8,5, 0,05M EDTA, 0,5% SDS aufgenommen. Die Würmer wurden nach Zugabe von 10 µl 10 mg/ml Proteinase K 30 min bei 65°C lysiert. Die RNA wurde durch Zugabe von 5 µl 10 mg/ml Ribonuklease A bei 37°C während 30 min Reaktionszeit entfernt. Die chromosomale DNA wurde schließlich durch vier Extraktionsschritte je 30 min aus der Lösung mit zunächst Phenol, dann zweimal mit Phenol / Chloroform / Isoamylalkohol und am Schluß mit Chloroform von Proteinen und Membranfragmenten abgetrennt. Die DNA wurde aus der wäßrigen Lösung des Überstands mit Ethanol gefällt, und in 100 µl Wasser aufgenommen.

2.2.1.2 Isolation von Cosmid DNA aus Bakterien und YAC Klone aus Hefe

Aufreinigung von Cosmiden aus Bakterien erfolgte gemäß Empfehlung von Dr. A. Coulson, der uns auch Cosmide seiner genomischen Genbibliothek zur Verfügung stellte. Bakterien vom oberen Rand der zugesandten Stichkultur wurden in 100 µl LB aufgenommen mit 10-50% Glycerin versetzt und als Rückhalt bei -80°C eingefroren. Gleichzeitig wurden auch Bakterien gemäß der 3-Strich Methode auf Antibiotika haltige LB Platten ausgestrichen. Die Wahl des Antibiotikums war abhängig von dem Vektor in dem die Cosmide kloniert vorliegen (Kapitel 2.1.3). Nach 14-16 h Brutdauer bei 37°C wurde eine kleine isolierte Kolonien in 50 ml LB unter Selektionsdruck durch Antibiotikum 14 h bei 37°C angezogen und DNA durch MIDI Präparation (Macherey-Nagel, Nucleobond AX Kit) isoliert. Es wurde ein Testverdau mit *EcoRI* durchgeführt. Nach analytischer Gelelektrophorese unter Verwendung eines geeigneten Größenstandards wurden die Bandengrößen einer Cosmidanalyse zusammenaddiert. Die Summe wird zwischen 35 und 40 kbp erwartet, falls keine Deletionen im Cosmidklon vorlagen. Zudem wurde unverdaute Cosmid DNA auf demgleichen analytischen Gel mit unverdauter λ-Phagen DNA von 48502 bp verglichen, die Banden befinden sich hier auf etwa gleicher Höhe. Beide Analysen beweisen die Integrität einer guten Cosmidpräparation. In einigen Fällen mußten mehrere Klone untersucht werden, um geeignete Präparationen zu besitzen. Von den Bakterien, die nicht deletierte Cosmide enthalten, wurde ein Aliquot, mit 10-50% Glycerin versetzt, zurückgefroren. Sollte bei Versuch einer wiederholten Präparation von direkter Anzucht aus diesem Stock deletiertes Cosmid erhalten werden, empfiehlt sich erneuter Ausstrich auf LB Agarplatten, auch aus dem direkten Zellstock der Stichkultur.

Aufreinigung der YACs erfolgt gemäß Coulson *et al.* (1988). Die exakte Darstellung der Aufreinigung ist der Methode Yeast/YAC Miniprep gemäß Coulson *et al.* (1995) zu entnehmen.

2.2.1.3 Klonierung von Bakterienstämmen für RNAi Experimente

Nachfolgend wird die Klonierung der Vektoren beschrieben, die für die RNAi Fütterungsexperimente eingesetzt werden. Eingesetzt zur Klonierung wird dafür stets das Plasmid L4440. Der L4440 besitzt zwei T7 Promotorstellen derart angeordnet, daß sie beidseitig die multiple Klonierstelle einschließen und im Falle von Transkription über diesen Promotor in Richtung Klonierstelle ablesen. Dadurch erhält man zwei RNA Stränge, die zueinander komplementär sind und dem inklonierten DNA Fragment entsprechen. Final werden alle diese Vektoren in den *Escherichia coli* Stamm HT115 transformiert. Im Wesentlichen besitzt dieser Stamm in das ringförmige Bakterienchromosom integriert das DE3 Plasmid, welches unter dem *E.coli* lacUV5 Promotor das T7 RNA Polymerase Gen (λ DE3 lysogen) kontrolliert. Aktivität des Promotors ist durch IPTG induzierbar. T7-RNA Polymerase kann, ebenso IPTG induzierbar, RNA über die T7 Promotoren des L4440 transkribieren (Timmons and Fire, 1998; Timmons *et al.*, 2001).

2.2.1.3.1 RNAi gegen *pcp-3*: pSFsjjF23B2.11, pSFsjjF23B2.11_3UTR und p5'_11_CDS_fed Futterbakterien

Für die Fütterung von F23B2.11(*pcp-3*) dsRNA synthetisierenden HT115 Zellen, wurden drei unterschiedliche Systeme entwickelt. pSFsjjF23B2.11 bildet dsRNA korrespondierend zu Exon 6 und einem Teil von Exon 5 und 7 inklusive der verbindenden Introns zur vorhergesagten genomischen *pcp-3* Sequenz. pSFsjjF23B2.11_3UTR entspricht, abgesehen von 40 bp, der 3'UTR von F23B2.11. p5'_11_CDSfed ist Exon 2 und 3, sowie dem Anfang von Exon 4 inklusive der verbindenden Introns von F23B2.11 zugehörig (Abb. 1A). Die Sequenz mit Primerbindestellen ist im Anhang 8.1 wiedergegeben.

Bei allen drei Plasmiden wird das Insert durch PCR aus dem Cosmid Klon F23B2 amplifiziert (Saiki *et al.*, 1985, Lawyer *et al.*, 1989), in pBluescript SK(+) zwischenkloniert und dann in L4440 umkloniert (Anhang 8.2). Dabei wird für die Klonierschritte der *Escherichia coli* Stamm DH5 α verwendet (Woodcock *et al.*, 1989).

Für das PCR Produkt für Klon pSFsjjF23B2.11 wurden das Primerpaar SFF23B2.11nai-f / SFF23B2.11nai-b verwendet. Das 1176 bp Produkt, generiert mit *Taq*-DNA-Polymerase, wird an den endständigen Consensus Sequenzen, vom Design der Oligonukleotide abstammend, mit *Bam*HI und *Xho*I enzymatisch verdaut. Dieses vorbereitete Insert wird in pBluescript SK(+), gleichermaßen vorbehandelt, mit T4-DNA-Ligase ligiert, dann in DH5 α transformiert (Hanahan, 1991). Die Selektion erfolgt auf LB-Agarplatten mit 100 μ g/ml Ampicillin, entsprechende Resistenz wird vom pBluescript SK(+) den DH5 α verliehen. DNA Miniprep (Birnboim und Doly, 1979) mehrerer Klone und nachfolgende Restriktionsanalysen mit geeigneten Enzymen ermitteln die Authentizität positiver Klone. Das Insert wird mittels der gleichen Enzyme *Bam*HI und *Xho*I in gleichermaßen vorbereiteten L4440 umligiert, wieder in DH5 α transformiert, auch L4440 verleiht Ampicillin Resistenz zum Selektionsdruck. Ein positiv ermittelter Klon wird in kompetente HT115 Zellen transformiert.

Die verwendeten Restriktionsendonukleasen generieren „sticky ends“, d.h. es entstehen durch enzymatischen Verdau ssDNA Enden, die nur zu gleichermaßen entstandenen DNA Enden ligationskompatibel sind. Dies gilt auch für die Klonierstrategie aller anderen Plasmide, die in dieser Arbeit entstanden sind.

Das Klonierschema der anderen beiden Klone entspricht exakt dem von pSFsjjF23B2.11. Für SFsjjF23B2.11_3UTR wird das Oligonukleotidpaar sjj_F23B2_11_3UTR_f / sjj_F23B2_11_3UTR_b zur PCR verwendet, das Produkt ist 759 bp groß. Kloniert wird über die endständigen Consensus Sequenzen des PCR-Produkts *Hind*III und *Xho*I.

p5'_11_CDS_fed PCR Produkt entsteht mit Hilfe der Primer SF_F23B2.11expr3_f / SF_F23B2.11g(2)_b. Das 2930 bp PCR Produkt wird über *Eco*RI und *Bsp*120I kloniert. Die *Eco*RI Erkennungsstelle befindet sich nicht endständig am PCR Produkt. Das Enzym spaltet das Produkt eher in der Mitte. Das klonierte Fragment ist 1243 bp groß.

2.2.1.3.2 RNAi gegen *pcp-2*: pSFsjjF23B2.12, pSFsjjF23B2.12_3UTR und p5'_12_CDSfed Futterbakterien

Auch für *pcp-2* wurden drei RNAi Bakterienstämme entwickelt, die ein ähnliches Muster aufweisen, zu dessen chromosomaler DNA sie komplementär sind, wie es bei den RNAi Futterbakterien gegen *pcp-3* der Fall ist. pSFsjjF23B2.12 entspricht Exon 4 der genomischen F23B2.12 Sequenz, pSFsjjF23B2.12_3UTR enthält ein Insert, welches der 3'UTR von F23B2.12 entspricht inklusive den letzten 45 bp der kodierenden Sequenz. p5'_12_CDSfed entspricht Exon 1 und 2 inklusive Intron und etwas 5'UTR von F3B2.12 (Abb. 1A, Anhang 8.1 und 8.2).

Die Klonierung wurde bei pSFsjjF23B2.12 und pSFsjjF23B2.12_3UTR entsprechend dem Schema der Futterbakterien gegen *pcp-3* (Kapitel 2.2.1.3.1) durchgeführt. Basis für die PCR Reaktion ist das Cosmid F23B2, welches das *pcp-2* Gen enthält, jedoch ohne zugehörigen Promotor und 56 bp CDS ab dem Startcodon. Für die Erstellung der Fütterungskлоне ist dies jedoch ohne Belang. Für pSFsjjF23B2.12 wurde zur PCR das Oligonukleotidpaar SF_sjj_F23B2.12_f / SF_sjj_F23B2.12_b verwendet, welches ein 1051 bp Produkt liefert. Dieses wurde über *HindIII* und *XhoI* letztlich in L4440 kloniert und schließlich in HT115 transformiert. Für den Klon pSFsjjF23B2.12_3UTR wurde PCR mit dem Primerpaar sjj_F23B2_12_3UTR_f / sjj_F23B2_12_3UTR_b durchgeführt. Dies ergab ein 942 bp Produkt, welches auch über *HindIII* und *XhoI* kloniert wurde. Der Klon p5'_12_CDSfed hingegen wurde aus dem bereits bestehenden Klon pEXPR12PRO1EGFP (Kapitel 2.2.1.5.2) angefertigt. pEXPR12PRO1EGFP enthält ein 2971 bp Insert, welches über *XhoI* und *Bsp120I* in den *gfp* enthaltenden Expressionsvektor pEGFP-N1 (Clontech) einkloniert wurde. Das Insert enthält eine interne *BcuI* Schnittstelle. Dadurch konnte aus pEXPR12PRO1EGFP ein 1252 bp *BcuI* und *Bsp120I* Fragment in L4440 umkloniert werden.

2.2.1.3.3 RNAi gegen *pcp-4*: pY116F11B.3fed Futterbakterien

Das Insert im L4440 beim Fütterungsklon pY116F11B.3fed entspricht Exon 4 der vorhergesagten genomischen Sequenz von Y116F11B.3, welches gemäß Annotation für eine Peptidase kodiert. Die PCR wurde hier direkt an chromosomaler Wildtyp DNA von *Caenorhabditis elegans* N2 durchgeführt mit den Oligonukleotiden SF_Y116F11B.3_f / SF_Y116F11B.3_b, wodurch ein 938 bp Produkt entsteht. Dieses wurde über *XhoI* und *EcoRI*, deren Consensus beim Primerdesign angefügt wurden, final in L4440 kloniert und in HT115 transformiert, ähnlich gemäß obiger Beschreibung (Kapitel 2.2.1.3.1). Abbildung 1 stellt den Bezug des Klons zum Gesamtgen dar, der Anhang (8.2) zeigt die Restriktionskarte des L4440.

2.2.1.3.4 RNAi gegen C46C2.4: pSFsjjC46C2.4fed Futterbakterien

Der Fütterungsklon pSFsjjC46C2.4fed gegen C46C2.4 dient als Kontrolle möglicher Kreuzreaktivität zu den Klonen gegen F23B2.11, F23B2.12 oder Y116F11B.3. Dieser Klon enthält von den insgesamt 9 Exons die Exon/Intron Struktur ab etwa dem letzten Drittel von Exon 6 (146 bp von gesamt 493 bp) bis 204 bp in die 3'UTR hinein. Kloniert wurde das 1201 bp PCR Produkt, hergestellt mit den Oligonukleotiden SF_sjj_C46C2.4_f und SF_sjj_C46C2.4_b an dem *C. elegans* Cosmidklon C46C2, final über die den Primern angefügten Consensussequenzen für *HindIII* und *XhoI* in L4440. Das fertige Plasmid wurde in HT115 Zellen transformiert. Die Durchführung erfolgte gemäß des dargestellten Klonierschemas in Kapitel 2.2.1.3.1, der Anhang (8.2) zeigt die Restriktionskarte des L4440.

2.2.1.3.5 RNAi gegen C53D6.4: pC53D6.4fed Futterbakterien

Der Fütterungsklon pC53D6.4fed gegen das systematisch bezeichnete C53D6.4 Gen wurde erstellt, um einen eventuellen funktionalen Zusammenhang zu *pcp-2* und *pcp-3* zu ermitteln. Das Gen besteht aus 12 Exons, für pC53D6.4fed wurde der Bereich ab etwa der Mitte des sechsten Exons bis 82 bp in der 3'UTR verwendet. Das über die artifiziellen Schnittstellen, aus dem Primerdesign stammend, *BamHI* und *XhoI* klonierte PCR Produkt hat eine Größe von 1679 bp. PCR wurde durchgeführt an chromosomaler N2 DNA mit den Oligonukleotiden SFsjj_C53D6.4_f und SFsjj_C53D6.4_b. Die Klonierung erfolgte analog der Darstellung in Kapitel 2.2.1.3.1, der Anhang zeigt die Restriktionskarte des L4440.

2.2.1.3.6 RNAi Futterbakterien für alle vorhergesagten Gene des Cosmids F23B2

Es wurden auch RNAi Klone gegen alle vorhergesagten Gene des Cosmids F23B2 hergestellt. Es handelt sich dabei um die folgenden systematisch bezeichneten Gene, in Klammer sind bekannte Charakteristika der kodierten Proteine angegeben (The *C. elegans* Sequencing Consortium, 1998): C01F6.6 (Protein enthält PDZ Domäne), F23B2.3 (Amilorid sensitiver Na⁺-Kanal), F23B2.4 (*daf-10*; mit WD Domäne und G β Wiederholung), F23B2.5 (*flp-1*; FMFR-Amid ähnlicher Neuropeptidvorläufer), F23B2.6 (Vimentin), F23B2.7 (hypothetisches Protein), F23B2.8 (hypothetisches Protein), F23B2.9 (Protein enthält PDZ Domäne), F23B2.10 (hypothetisches Protein), F23B2.11 (*pcp-3*) und F23B2.12 (*pcp-2*). Die Beschreibung der RNAi-Klone gegen *pcp-2* und *pcp-3* sind bereits oben dargestellt. In der

nachfolgenden Liste zur Herstellung der RNAi-Klone sind Bezeichnung des Gens, Name des Fütterungsklons, verwendete Oligonukleotide für PCR, Größe des PCR Produkts, welches stets innerhalb der CDS zum betreffenden Gen homolog ist, und Restriktionsenzyme für Klonierung in L4440 und spätere Transformation in *E.coli* Stamm HT115 aufgeführt. Die Klonierung verlief analog zu der Darstellung von oben (Kapitel 2.2.1.3.1). Außerdem enthält F23B2 das Gen F23B2.13, welches für ein gemeinsames Peptid von RNA Polymerase I, II und III kodiert, von diesem Gen wurde kein Fütterungsklon erstellt. Für C01F6.6 wurden vier unterschiedliche Klone entwickelt, da in der alten Version WS33 der Datenbank ACeDB noch vier Gene für diesen Locus beschrieben wurden. Die PCR für die beiden ersten in der Liste stehenden Klone wurden am Cosmid C01F6 durchgeführt, alle folgenden Klone dann an F23B2.

C01F6.6:	sjj_C01F6.6	SF_sjj_C01F6.6-f / SF_sjj_C01F6.6-b	1146 bp	<i>HindIII, XhoI</i>
C01F6.6:	sjj_C01F6.7	SF_sjj_C01F6.7-f / SF_sjj_C01F6.7-b	1027 bp	<i>BamHI, HindIII</i>
C01F6.6:	sjj_F23B2.1	SF_sjj_F23B2.1-f / SF_sjj_F23B2.1-b	1646 bp	<i>BamHI, HindIII</i>
C01F6.6:	sjj_F23B2.2	SF_sjj_F23B2.2-f / SF_sjj_F23B2.2-b	1211 bp	<i>BamHI, XhoI</i>
F23B2.3:	sjj_F23B2.3	SFF23B2.3rna-i-f / SFF23B2.3rna-i-b	1179 bp	<i>HindIII, XhoI</i>
F23B2.4:	sjj_F23B2.4	SFF23B2.4rna-i-f / SFF23B2.4rna-i-b	1656 bp	<i>BamHI, HindIII</i>
F23B2.5:	sjj_F23B2.5	SFF23B2.5rna-i-f / SFF23B2.5rna-i-b	1582 bp	<i>BamHI, XhoI</i>
F23B2.6:	sjj_F23B2.6	SFF23B2.6rna-i-f / SFF23B2.6rna-i-b	991 bp	<i>BamHI, HindIII</i>
F23B2.7:	sjj_F23B2.7	SFF23B2.7rna-i-f / SFF23B2.7rna-i-b	1458 bp	<i>EcoRI, HindIII</i>
F23B2.8:	sjj_F23B2.8	SFF23B2.8rna-i-f / SFF23B2.8rna-i-b	638 bp	<i>HindIII, XhoI</i>
F23B2.9:	sjj_F23B2.9	SFF23B2.9rna-i-f / SFF23B2.9rna-i-b	855 bp	<i>HindIII, XhoI</i>
F23B2.10:	sjj_F23B2.10	SFF23B2.10rna-i-f / SFF23B2.10rna-i-b	1064 bp	<i>HindIII, XhoI</i>

2.2.1.4 dsRNA *in vitro* Produktion für RNAi gegen *pcp-2* und *pcp-3*

Für RNAi gegen *pcp-2* (F23B2.12) und *pcp-3* (F23B2.11) wurde dsRNA auch *in vitro* hergestellt. Basis für die *in vitro* Produktion war Plasmid DNA von pSFsjjF23B2.11 und pSFsjjF23B2.12 (Kapitel 2.2.1.3.1 und 2.2.1.3.2). Da das Insert im L4440 kloniert vorliegt, dadurch beidseits von einem T7 Promotor flankiert wird, kann PCR mit nur einem Oligonukleotid durchgeführt werden, das ist kommerziell verfügbarer T7 Primer (Stratagene). Die im PCR Produkt dadurch auch endständig vorliegenden T7 Promotoren können nun auch in einer Transkriptionsreaktion direkt eingesetzt werden, um in einer Einzelreaktion zwei zueinander komplementäre RNA Stränge als dsRNA zu erzeugen.

Das PCR Produkt, hergestellt mit *Taq*-DNA-Polymerase, besitzt bei beiden Klonen als template und der Verwendung von T7 Primer eine Größe von etwa 1,3 kbp. Das PCR Produkt wird mit Phenol/Chloroform extrahiert und mit Ethanol präzipitiert, schließlich in nukleasefreiem Wasser aufgenommen. 1 µg je PCR Produkt bilden das template für die *in vitro* RNA Produktion. Diese wurde durchgeführt mit dem 'MEGAScript™ T7 *in vitro* Transcription Kit for large scale synthesis of RNA' (AMBION). Dieser stellt NTPs und einen T7-RNA-Polymerase enthaltenden Enzymmix bereit. Durchführung geschah nach Herstellerangaben, die Reaktion konnte bis auf 16h ausgeweitet werden, dadurch erhöhte sich die Ausbeute drastisch. RNA wird weiter aufgereinigt durch Hydrolyse des DNA template mit DNaseI. Danach wird die RNA einmal mit Phenol/Chloroform und einmal mit nur Chloroform extrahiert. RNA wird mit Isopropanol präzipitiert, schließlich in Wasser aufgenommen. Die Konzentration wird bei 260 nm in einem Spektralphotometer (Uvikon) bestimmt.

2.2.1.5 Erzeugung von GFP Reporterkonstrukten

Es wurden zwei GFP Reporterstämme für *C. elegans* entwickelt, die unter Kontrolle endogener Promotoren *gfp* exprimieren. Dabei werden Konstrukte erstellt, welche die CDS von *pcp-2* bzw. *pcp-3*, dem derzeitigen Kenntnisstand entsprechend, innerhalb des zweiten Exons im Leserahmen zur vollständigen CDS von *gfp* fusionieren. Dabei ist das erste Intron I_A mit in das Konstrukt gemäß genomischer Vorlage integriert. Die Fusion wird mit *pcp-2::gfp* und *pcp-3::gfp* bezeichnet.

2.2.1.5.1 pEXPR11PRO1GFP, das *pcp-3::gfp* Konstrukt

Das Plasmid pEXPR11PRO1GFP enthält die Fusion *pcp-3::gfp*. Dieses DNA Konstrukt besteht aus 1248 bp Promotorsequenz von *pcp-3*, vollständigem Exon 1 (119 bp) und Intron I_A (339 bp), sowie 159 bp von Exon 2, bevor Fusion im richtigen Leserahmen zu *gfp* im Vektor pEGFP-N1 (Clontech) realisiert ist. Damit besteht das enkodierte Protein aus 92 von insgesamt 1121 Aminosäuren (aa) von PCP-3 in Fusion mit GFP. Abbildung 1A zeigt eine schematische Darstellung, der Anhang zeigt die verwendete Nukleotidsequenz.

Das 1,9 kbp Insert wurde mit den Primern SFF23B2.11g_b und SF_F23B2.11expr_f aus dem Cosmidklon F23B2 amplifiziert mit 'Expand High Fidelity PCR System' (Roche Diagnostics GmbH), einem Enzymmix, der *Taq*-DNA Polymerase und *Tgo*-DNA-Polymerase enthält. Letztere besitzt proofreading Aktivität, d.h. 3'-5'-Exonukleaseaktivität, wodurch das

PCR Produkt eine deutlich geringere Fehlerquote verglichen zur Sequenz des template aufweist. Roche verspricht eine Amplifikationsfehlerrate im Einbau falscher Nukleotide bei der PCR von $4,8 \times 10^{-6}$, verglichen zu $1,6 \times 10^{-5}$ beim Einsatz purer *Taq*-DNA-Polymerase. Den Oligonukleotiden wurden Consensussequenzen für Restriktionsenzyme angefügt aus Kloniergründen. Dabei wurde an der 3'-OH Seite *Bam*HI so eingebaut, daß nach Klonierung in pEGFP-N1 der richtige Leserahmen der CDS von *gfp* verwendet wird bei späterer Expression des Konstrukts in *C. elegans* durch den *pcp-3* Promotor. Gesamt wurde das Konstrukt über *Hind*III und *Bam*HI zunächst in pBluescript SK(+) zwischenkloniert, bevor das Insert in pEGFP-N1 umkloniert wurde, wobei dieser Vektor zur Selektion Kanamycinresistenz den verwendeten XL1 blue Zellen verleiht. Von einem positiven Klon wurde eine DNA MIDI Präparation (Macherey-Nagel) angefertigt.

2.2.1.5.2 pEXPR12PRO1EGFP, das *pcp-2::gfp* Konstrukt

Das Plasmid pEXPR12PRO1EGFP enthält die Fusion *pcp-2::gfp*. Hier wurde ein 1798 bp langer *pcp-2* Promotor verwendet, Exon 1 und I_A sind vollständig vertreten, die Fusion mit *gfp* in pEGFP-N1 erfolgt nach 475 bp von Exon 2. Die Schnittstelle für *Bsp*120I am 3'-OH Ende des PCR Produkts wurde wieder gemäß Einhaltung des richtigen Leserahmens dem Oligonukleotid SF_F23B2.12expr1_b beim Design angefügt. Der andere Primer für das 2971 bp Produkt ist SF_F23B2.12expr1/2_f, mit zusätzlichem Consensus für *Xho*I. PCR wurde unter Anwesenheit einer proofreading Polymerase durchgeführt (Expand High Fidelity PCR System, Roche Diagnostics GmbH). Als template der PCR diente hier das Cosmid K09F8. Der Cosmidklon F23B2 wurde vollständig sequenziert, dabei überlappen die letzten 104 bp mit dem Cosmid C07C7. Der Cosmidklon C07C7 enthält den Promotorbereich von *pcp-2*, sowie 160 bp codierende F23B2.12 Sequenz (The *C. elegans* Sequencing Consortium, 1998). Weil nun diese beiden sequenzierten Cosmidklone nicht den Gesamtbereich für das obige PCR Produkt besitzen, wurde ein anderes Cosmid gesucht, welches diesen Bereich überlappt. Dafür kommen die physikalisch kartierten Cosmide C50D10 und K09F8 in Frage (Coulson *et al.*, 1988). Weiterführende PCR Analyse (Daten nicht gezeigt) ergaben, daß K09F8 nicht nur den fraglichen Bereich, sondern die gesamten Gene *pcp-2* und *pcp-3* inklusive der Promotoren, der vollständigen CDS und ausreichend 3'UTR einschließt.

Das PCR Produkt wurde in pBluescript SK(+) über *Xho*I, *Bam*HI zwischenkloniert, bevor es in pEGFP-N1 umkloniert wurde. Zur Klonierung wurde DH5 α verwendet. Es wurde eine DNA MIDI Präparation (Macherey-Nagel) angefertigt. Abbildung 1 setzt schematisch den genetischen Bereich von pEXPR12PRO1EGFP in Bezug zum Gesamtgen, der Anhang gibt genauere Auskunft über die Bindestellen der Oligonukleotide. Dieses Konstrukt ist auch Basis für den Fütterungsklon p5'_12_CDSfed (Kapitel 2.2.1.3.2).

2.2.1.6 PCR-Produkte und Vektoren für Sequenzierreaktionen und 'Mutantenrescue'

Die unten aufgeführten PCR-Produkte und Klone wurden erstellt, um bei nicht klonierten Mutanten durch Sequenzierreaktionen oder durch Größenunterschiede des Produkts zu wt (Kapitel 2.2.7.2) testen zu können, ob die Mutanten allelisch zu *pcp-2* oder *pcp-3* sind. Dazu wird PCR direkt an chromosomaler DNA von Stämmen durchgeführt, die das mutante Allel enthalten. Getestet wurde das in dieser Arbeit erstellte mutante Allel *ee1007*, das zugehörige Gen besitzt die Bezeichnung *gon-12*, präsent im *C. elegans* Stamm EC1053. Außerdem wurde die früher charakterisierte Mutation *daf-15(m81)* getestet, ob sie allelisch zu *pcp-3* ist. Hierzu wurde DNA des Stammes DR732 eingesetzt (Albert und Riddle, 1988). Die Sequenzierreaktionen wurden bei SeqLab (Sequence Laboratories Göttingen GmbH) und AGOWA GmbH (Berlin) durchgeführt. Dazu wurde *pcp-3* in drei Einzelfragmente 11_P1, 11_P2 und 11_P3 geteilt, welches die gesamte CDS repräsentiert. Diese wurden direkt als PCR Produkte zum Sequenzieren geschickt. Auch *pcp-2* wurde in mehrere Einzelteile gespaltet. Hier wurden die PCR Produkte 12ex1, 12ex2/3, 12ex4, 12ex5 und 12ex6 erstellt. Diese wurden allerdings in pBluescript SK(+) in DH5 α Zellen kloniert, welches den Vorteil besitzt, daß das DNA template bei der Sequenzierung nicht limitierend wirkt, falls der Sequenziervorgang wiederholt werden muß. Durch die Klonierung jedoch treten eher PCR Fehler in den Klonen auf, wodurch wiederholte Sequenzierungen nötig sind, um zu klären, ob an einem Locus tatsächlich eine Mutation vorliegt. Dies ist auch der Grund, weshalb ein verkürzter Klon von p12ex4 erstellt wurde, der mit *psjj_12_lo* bezeichnet wird. Im Anhang sind die verwendeten Primer in der Sequenz von *pcp-2* und *pcp-3* dargestellt.

2.2.1.6.1 PCR Reaktionen 11_P1, 11_P2 und 11_P3

Die hier beschriebenen PCR Produkte entstanden an chromosomaler DNA von EC1053 und DR732. Es wurde zur Verringerung der Fehlerquote das Expand High Fidelity PCR System (Roche Diagnostics GmbH) benutzt.

11_P1 wurde mit den Primern SF_F23B2.11_P1_f und SF_F23B2.11_P1_b erstellt. Das Produkt ist 1530 bp groß. Es repräsentiert den genomischen Bereich von Exon 1 bis Exon 3, beginnt demzufolge kurz vor dem Startcodon ATG und endet im Intron I_C.

11_P2 wurde mit den Primern SF_F23B2.11_P2_f und SF_F23B2.11_P2_b erstellt. Das Produkt ist 1303 bp groß. Es repräsentiert den genomischen Bereich von Exon 4 bis Exon 5, besitzt Teile der umgebenden Introns I_C und I_E.

11_P3 wurde mit den Primern SF_F23B2.11g_f und SFF23B2.11mai-b erstellt. Das Produkt ist 1783 bp groß. Es repräsentiert den genomischen Bereich vom Rest der CDS von *pcp-3*, beginnt innerhalb Exon 5 und endet in der 3'UTR.

2.2.1.6.2 Vektoren p12ex1, p12ex2/3, p12ex4, p12ex5, p12ex6 und psjj_12_lo

Die hier beschriebenen Klone repräsentieren Einzelfragmente des *pcp-2* Gens von EC1053 DNA. F23B2.12 wurde in fünf Fragmente unterteilt, welche die komplette CDS inklusive der Intronsequenzen teilweise überlappend repräsentieren. Beim Design der Primer für das Erstellen der Klone sind Restriktionsstellen angefügt worden. Dies sind *HindIII* und *XhoI*, lediglich bei p12ex5 wurde statt *HindIII* *PstI* verwendet, da eine endogene *HindIII* Stelle in Position 4683 (gemäß Sequenz im Anhang 8.1) vorliegt. Über erwähnte Schnittstellen erfolgte Klonierung in pBluescript SK(+).

p12ex1 wurde mit dem Oligonukleotidpaar 12ex1-f / 12ex1-b erstellt. Das PCR Produkt ist 701 bp groß, es repräsentiert Exon 1.

p12ex2/3 wurde mit dem Oligonukleotidpaar 12ex2/3-f / 12ex2/3-b erstellt. Das PCR Produkt ist 964 bp groß, es repräsentiert Exon 2 und 3. An einer zweiten EC1053 DNA Präparation wurde PCR und Klonierung dieses Klons wiederholt, er erhält den Beinamen VarN2 (p12ex2/3 VarN2).

p12ex4 wurde mit dem Oligonukleotidpaar 12ex4-f / 12ex4-b erstellt. Das PCR Produkt ist 1324 bp groß, es repräsentiert Exon 4. Dieser Klon wurde verändert als psjj_12_lo gebaut mit den bereits aus Kapitel 2.2.1.3.2 bekannten Oligonukleotiden SF_sjj_F23B2.12_b und SF_sjj_F23B2.12_b. PCR wurde hierfür auch an der zweiten EC1053 DNA Präparation durchgeführt. Das etwas kürzere PCR Produkt ist 1051 bp groß, schließt aber auch das gesamte Exon 4 mit ein. Kloniert ist es über *HindIII* und *XhoI*.

p12ex5 wurde mit dem Oligonukleotidpaar 12ex5-f / 12ex5-b erstellt. Das PCR Produkt ist 1232 bp groß, es repräsentiert Exon 5. Der unter Verwendung der zweiten EC1053 Präparation wiederholt hergestellte Klon erhält den Beinamen VarN2.

p12ex6 wurde mit dem Oligonukleotidpaar 12ex6-f / 12ex6-b erstellt. Das PCR Produkt ist 623 bp groß, es repräsentiert Exon 6. Dieser Klon wurde auch zweimal auf Grundlage jeder EC1053 Präparation erstellt. Zur Unterscheidung tragen sie die Beinamen VarO1 und VarN2.

2.2.1.6.3 PCR Produkte sfg-F23B2.11 und 12_1/27

Diese beiden PCR Produkte dienen später der Injektion in *Caenorhabditis elegans*. Der Authentizität des Produktes wegen, wurde das Expand High Fidelity PCR System (Roche Diagnostics GmbH) eingesetzt. PCR Grundlage ist für sfg-F23B2.11 das Cosmid F23B2 und für 12_1/27 das Cosmid K09F8. sfg-F23B2.11 ist 5601 bp groß und entstand mit den Oligonukleotiden SFF23B2.11g_f und SFF23B2.11g_b. Es besteht aus 1248 bp *pcp-3* Promotor, dessen gesamter CDS und 144 bp 3'UTR. Das PCR Produkt 12_1/27 entstand mit den Primern SF_F23B2.12expr1/2_f und sjj_F23B2_12_3UTR_b, es besteht aus 6928 bp. Dies sind 1798 bp Promotorsequenz, die CDS von *pcp-2* und 913 bp 3'UTR. Die Primerbindestellen sind dem Anhang (8.1) zu entnehmen.

Da diese PCR Produkte injiziert werden sollten, wurden diese durch präparative Gelelektrophorese von unspezifischen Produkten und verbliebenen Oligonukleotiden abgetrennt. Mit β -Agarase (MBI Fermentas) wurde die Gelmatrix hydrolysiert. Enzymatische Reaktion und weiterführende Präzipitation der DNA entspricht der Empfehlung des Herstellers. Die DNA Konzentration wurde spektralphotometrisch bestimmt.

2.2.2 *Caenorhabditis elegans* Kulturbedingungen

Routinierte Handhabung von *Caenorhabditis elegans* Stämmen erfolgte gemäß Brenner (1974) auf NGM Platten, die mit *Escherichia coli* Stamm OP50 beschichtet wurden.

Einzelne Stämme, die extrachromosomale Arrays beinhalten, mußten stets auf Präsenz des Transgens kontrolliert werden. Dies ist visuell möglich, da ausnahmslos dominantes *rol-6(su1006)* Markerplasmid pRF4 (Kramer *et al.*, 1990) oder das pHMGI β PromotorEGFP Fluoreszenzmarker Plasmid (Kurz, T. und Schulze, E., unveröffentlicht) zum Einsatz kam.

Alle verwendeten Stämme wurden kryokonserviert gemäß Sulston und Brenner (1974). Dies ermöglicht Langzeitspeicherung von *C. elegans* Stämmen, sowie Rückhalt von Vergleichsstämmen, die bei Bedarf wieder aufgetaut werden können, oder wenn im Verlauf von Langzeitkultivierung genomische Schäden auftreten.

2.2.3 DNA Mikroinjektion zur Erstellung transgener *C. elegans* Stämme

Es wurden zwei verschiedene Arten von transgenen Stämmen erstellt. Zum einen wurde DNA mikroinjiziert, die im Nematoden *gfp* exprimiert unter den *C. elegans* eigenen Promotoren *pcp-2* und *pcp-3*. Die Beschreibung der verwendeten Plasmide ist in Kapitel 2.2.1.5 dargestellt. Als Coninjektionsmarker wurde stets das dominante *rol-6(su1006)* Allel im Plasmid pRF4 (Kramer *et al.*, 1990) eingesetzt. Es resultieren die Stämme EC1052, EC1067 und EC1068. Nachfolgend sind die DNA-haltigen Lösungen aufgelistet, die zur Entstehung dieser Stämme beitrugen. Jede Injektionslösung ist grundsätzlich in TE Lösung gepuffert.

EC1052: [*pcp-3::gfp* ; *rol-6(su1006)*]

100 ng/ μ l pEXPR11PRO1GFP, 100 ng/ μ l pRF4, 100 ng/ μ l pBluescript SK(+)

Injiziert wurde diese Lösung in *C. elegans* Wildtyp N2.

EC1067 und EC1068: *daf-2(m41)* III ; [*pcp-2::gfp* ; *rol-6(su1006)*]

50 ng/ μ l pEXPR12PRO1EGFP, 100 ng/ μ l pRF4 und pBluescript SK(+)

Injiziert wurde diese Lösung in *C. elegans* Stamm DR1564.

Zum anderen, um Mutantenrescue durchzuführen wurden Cosmidmischungen oder PCR Produkte in *C. elegans* injiziert. Hier wurde stets der Fluoreszenzmarker pHMGI β PromotorEGFP (*hmgI β ::gfp*) coninjiziert, welches *gfp* unter dem ubiquitär exprimierten *hmgI β* Promotor exprimiert (Kurz, T. und Schulze, E., unveröffentlicht).

Es entstanden nachfolgende Stämme, die Auflistung enthält nachfolgend je Stammbezeichnung, genetische Darstellung des Stammes, Komponenten der injizierten TE gepufferten Lösung sowie der verwendete Stamm zur Mikroinjektion:

EC1001, EC1002, EC1003 und EC1004:

daf-15(m81) unc-22(s7) / nT1 IV ; + / nT1 V ;
[H22D14, F14A5, F49C12, T20D3, C10C5, F56D5, F59B8 ; hmgIβ::gfp]
20 ng/μl je Komponente:
Cosmide: H22D14, F14A5, F49C12, T20D3, C10C5, F56D5, F59B8 ;
pHMGIβPromotorEGFP, injiziert in DR732

EC1005, EC1006, ... , EC1014:

daf-15(m81) unc-22(s7) / nT1 IV ; + / nT1 V ;
[ZC410, C01F6, F23B2, H05E11, H28B06; hmgIβ::gfp]
20 ng/μl je Komponente:
Cosmide: ZC410, C01F6, F23B2, H05E11, H28B06 ;
pHMGIβPromotorEGFP, injiziert in DR732

EC1015, EC1016, EC1017, EC1018 und EC1019:

daf-15(m81) unc-22(s7) / nT1 IV ; + / nT1 V ;
[C46C2, H05E11, H28B06; hmgIβ::gfp]
20 ng/μl je Komponente:
Cosmide: C46C2, H05E11, H28B06 ;
pHMGIβPromotorEGFP, injiziert in DR732

EC1022 und EC1023:

daf-15(m81) unc-22(s7) / nT1 IV ; + / nT1 V ;
[F59B8, F38E11, C33A12, F56H11, T05A1, F27C8, W09C2; hmgIβ::gfp]
20 ng/μl je Komponente:
Cosmide: F59B8, F38E11, C33A12, F56H11, T05A1, F27C8, W09C2 ;
pHMGIβPromotorEGFP, injiziert in DR732

EC1026: *daf-15(m81) unc-22(s7) / nT1 IV ; + / nT1 V ; [C01F6 ; hmgIβ::gfp]*

20 ng/μl C01F6, 20 ng/μl pHMGIβPromotorEGFP, injiziert in DR732.

EC1033: *[F23B2 ; hmgIβ::gfp]*

20 ng/μl F23B2, 20 ng/μl pHMGIβPromotorEGFP, 100 ng/μl λ-Phagen DNA;
Injiziert wurde in N2.

EC1034 und EC1035:

daf-15(m81) unc-22(s7) / nT1 IV ; + / nT1 V ; [Y11D7A; hmgIβ::gfp]
YAC: 100 ng/μl Y11D7A ; 20 ng/μl pHMGIβPromotorEGFP; injiziert in DR732

EC1038 und EC1039: *daf-15(m81) unc-22(s7) / nT1 IV ; + / nT1 V ; [F23B2 ; hmgIβ::gfp]*

20 ng/μl F23B2, 20 ng/μl pHMGIβPromotorEGFP, injiziert in DR732.

EC1049 und EC1050: *daf-15(m81) unc-22(s7) / nT1 IV ; + / nT1 V ; [pcp-3⁺ ; hmgIβ::gfp]*

2 ng/μl PCR Produkt sfg-F23B2.11, 20 ng/μl pHMGIβPromotorEGFP
und 80 ng/μl pBluescript SK(+); Injiziert wurde in DR732.

EC1057, EC1058, EC1059, EC1060 und EC1061:

daf-2(m41) III ; gon-12(ee1007) unc-24(ee1008) IV ; [K09F8 ; C50D10 ; hmgIβ::gfp]

50 ng/μl je cosmid K09F8 und C50D10,

20 ng/μl pHMGIβPromotorEGFP und 100 ng/μl pBluescript SK(+),
injiziert in EC1053.

EC1062, EC1063, EC1064, EC1065 und EC1066:

daf-2(m41) III ; gon-12(ee1007) unc-24(ee1008) IV ; [pcp-2⁺ ; hmgIβ::gfp]

50 ng/μl 12_1/27, 50 ng/μl SFsjjF23B2.12, 20 ng/μl pHMGIβPromotorEGFP
und 100 ng/μl pBluescript SK(+), injiziert wurde in EC1053.

Die oben angegebenen Lösungen wurden in das Cytoplasma eines distal gelegenen Gonadenarms junger adulter Hermaphroditen injiziert (Mello *et al.*, 1991). In diesem gonadalen Syncytium kann die DNA bei der Bildung der Oozyte mitaufgenommen werden. Bei der Weiterentwicklung stehen für das Schicksal dieser DNA mehrere Möglichkeiten zur Verfügung. Zufällige Verteilung der DNA auf Tochterzellen führt zu mosaikartiger Verteilung im Wurm. Die angebotene DNA kann transient nur in der F1 Generation exprimiert werden, Weitervererbung auf spätere Generationen ist ausgeschlossen (Fire und Waterston, 1989). In sehr seltenen Fällen kommt es zu Integration der angebotenen DNA in das Genom von *C. elegans* (Fire, 1986) dann meist an einem zufälligen Integrationslokus, aber Integration durch homologe Rekombination ist ebenfalls möglich (Brovermann *et al.*, 1993). Deutlich häufiger tendiert *C. elegans* zur Bildung von extrachromosomalen Arrays (Stinchcomb *et al.*, 1985). Diese bilden sich durch Ligation, Rekombination und Reparatur der DNA Enden bis zu einer Größe von meist mehr als 700 kbp, wodurch dann auch mehrere hundert Kopien der angebotenen DNA im Array vorherrschen können (Stinchcomb *et al.*, 1985, Mello *et al.*, 1991, Hope, 1991). Ein gebildetes Array ist physikalisch stabil, repliziert jedoch unabhängig dem Turnus im Zellzyklus, wodurch es zu mosaikartiger Verteilung des Array im Wurmkörper kommt. Ein sich extrachromosomal replizierendes Array kann durch die Keimbahn auf nachfolgende Generationen weitervererbt werden, die Zahl der F1 mit Array zur Gesamtzahl der Nachkommen eines Elterntieres ergibt die Transmissionsrate, die für jedes extrachromosomale Array spezifisch ist (Stinchcomb *et al.*, 1985).

Auf Basis dieser Grundlage wurden F1 Nematoden injizierter F0 vereinzelt, wenn sie das Markerplasmid tragen, erkennbar an Fluoreszenz oder dem sich gemäß der Längsachse

rollend abnormalen Fortbewegungsmusters. F2 Nachkommen mit Markerplasmidexpression tragen ein extrachromosomales Array, zusammengesetzt aus allen angebotenen DNA Komponenten. Entstehen mehrere F1 mit Array aus einer Injektion, so ist dennoch jedes Array physikalisch verschieden, unabhängig, ob sie demselben F0 Elterntier zugehörig sind. Daher wird darauf geachtet, daß F1 frühzeitig selektiert werden, um unabhängig gebildete Arrays unterscheiden zu können. Jedes Array trägt damit auch gemäß einheitlicher Nomenklatur von *C. elegans* einen anderen Namen (Hodgkin, 1995). Diese sind der Auflistung in Kapitel 2.1.2 zu entnehmen für jeden transgenen Stamm.

Zur Mikroinjektion wurden Lösungen mit affinitätschromatographisch gereinigter Plasmid DNA verwendet (Macherey-Nagel). Zusätzlich wurden obige Gesamtlösungen 30 min bei 14000 rpm in einer Eppendorf Zentrifuge von Partikeln, welche den Durchfluß in der Injektionsnadel behindern könnte, befreit. Die Injektionsnadeln wurden aus Glaskapillaren für die Mikroinjektion (Borosilikatglas, 1,0 mm gesamt und 0,75 mm Innendurchmesser, inklusive Mikrofilament; Fa. Hilgenberg) am P-87 Flamig / Brown Micropipette Puller (Sutter Instrument Co., USA) gezogen. Folgendes zweistufige Basisprogramm wurde verwendet, es sei aber erwähnt, daß sich mit zunehmender Arbeitsdauer das Gerät um die Heizspindel erwärmt, wodurch einzelne Parameter abgewandelt werden müssen, wenn unterschiedliche Nadelformen auftreten.

01 Heat 930 Pull 90 Vel 50 Time 245

02 Heat 785 Pull 80 Vel 60 Time 133

Unter Verwendung von 'Microloadern' (Eppendorf) konnte etwa 1-2 µl Injektionslösung in die Nadel pipettiert werden. Junge adulte Nematoden wurden in Mineralöl auf Agarosepads gehaftet. Dies sind 24x40 mm Deckgläser, auf denen 0,15 % wäßrige Agaroselösung (NEEO Ultraqualität, Roth) vollständig eingetrocknet ist. Durch diese Art Fixierung kann die Lage des Nematoden ausgerichtet und am Mikroinjektionsmikroskop die syncytiale Gonade fokussiert werden. Dies sind notwendige Bedingungen, um mit der Mikromanipulation die Nadel auf den Wurm auszurichten. Mit dem Piezo Translator kann der Wurm penetriert werden. Der PMZ20 wird im Modus 2 betrieben, d.h., man kann durch wiederholten Knopfdruck die Nadel in eine Vorwärtsposition (dies wird als Ausgangsbasis verwendet) und eine Rückwärtsposition bringen. Dabei ist die Vorwärtsbewegung auf eine Geschwindigkeit von 100 mm/s, die Rückwärtsbewegung auf 5 mm/s und die Distanz zwischen beiden Positionen auf 14 µm wahlweise justiert worden. Der Wurm wird bis zur Injektionsposition eingedrückt mit der Mikromanipulationseinrichtung, dann wird mit dem PMZ20 die rückwärtige Position angewählt, die Nadel wird wieder bis zur Ausgangsposition nach vorne bewegt. Erneuter Knopfdruck am PMZ20 führt die Nadel schnell nach vorne, wobei der Wurm penetriert wird. Die Gonadenposition wird überprüft, rückwärtige Nachjustierung ist meist erforderlich. Mit

etwa 1 bar Überdruck wird die DNA Lösung im Nanomaßstab in die Gonade gepresst. Die Gonade dehnt sich hierbei leicht aus, daran ist Flüssigkeitseintritt zu erkennen, die Nadel wird aus dem Wurm zurückgezogen. Sollte keine Flüssigkeit aus der Nadel strömen, ist die Nadelspitze verstopft, sie kann dann vorsichtig am Rand eines Deckglases gebrochen werden, oder die Lösung ist zu viskos oder partikelhaltig. Im Idealfall einer DNA Injektion wird die Nadel vor dem ersten Wurm leicht aufgebrochen. Eine abzentrifugierte Injektionslösung ist partikelfrei, wodurch die Nadel für deutlich mehr als 30 Würmer zur Injektion geeignet ist. 30 bis 60 Würmer werden in der Regel zur Erstellung transgener Linien einer Sorte injiziert. Injizierte Würmer werden mit einem Tropfen M9 vom Pad befreit und mit weiteren 2 Würmern auf einer NGM/OP50 Platte bei 20°C bebrütet. Ab dem zweiten Postinjektionstag werden transgene F1 gesucht und vereinzelt. Falls diese F1 transgene F2 produzieren, handelt es sich um eine Nematodenpopulation mit einem physikalisch festgelegten Array, dem nun eine einheitliche Bezeichnung zugeordnet wird, der Stamm erhält einen Stammnamen (siehe oben und Kapitel 2.1.2).

2.2.4 RNA vermittelte Geninaktivierung (RNAi) Technik

Das Standardexperiment, um zügig Aufschluß über Genfunktion zu erhalten, ist Geninaktivierung auf Basis komplementärer Hybridisierung von dsRNA an ein in *C. elegans* vorliegendes mRNA template (Fire *et al.*, 1998). Dabei wird die dsRNA Vorlage in 21 bis 23 nt Fragmente zerlegt, die über Komplexbildung mit diversen Enzymen, der RISC Formation, spezifisch mit mRNA komplementär hybridisieren. Der RISC Komplex besitzt Nukleaseaktivität, wodurch affektierte mRNA degradiert wird (Zamore *et al.*, 2000; Parrish *et al.*, 2000; Hammond *et al.*, 2000; Bernstein, 2000). Drei Möglichkeiten stehen in *C. elegans* zur Verfügung: Verfütterung von Bakterien, die induzierbar genspezifische dsRNA bilden (Timmons und Fire, 1998), Injektion von *in vitro* synthetisierter dsRNA (Fire *et al.*, 1998), sowie Einlegen der Würmer in konzentrierter dsRNA Lösung für einen gewissen Zeitraum (Soaking; Tabara *et al.*, 1998). *C. elegans* nimmt die angebotene RNA auf. Das System schließt die Verbreitung über den Körper ein, damit RNAi auch im Zielgewebe wirksam ist.

2.2.4.1 RNAi durch Fütterungsexperimente

Die unterschiedlichen RNAi bildenden Bakterienstämme wurden bereits erläutert (Kapitel 2.2.1.3). Das Vorgehen ist angelehnt an Fraser *et al.* (2000). Zur Vorbereitung des Experiments wird ein klonaler Ausstrich der Bakterien auf LB Agarplatten, mit 100 µg/ml Ampicillin versetzt, benötigt. Eine einzelne Kolonie wird in 5 ml Ampicillin-haltigem LB Medium inokuliert und 14h bei 37°C bebrütet. Davon werden 5 µl auf eine NGM Platte ausgestrichen, die zusätzlich mit 25 µg/ml Carbenicillin und 1 mM IPTG supplementiert ist. Carbenicillin entspricht der Ampicillinwirkung, weist aber höhere Stabilität über längere Zeit erhöhter Temperatur auf. Die RNAi Futterbakterien werden dadurch länger bei noch stattfindenden Teilungsprozessen auf Präsenz des Plasmids selektiert. Allerdings besteht auch hier kein ausreichender Schutz vor Kontamination mit anderen Bakterien oder Pilzen, welche die RNAi Effizienz beträchtlich reduzieren können. IPTG induziert Expression der T7-RNA-Polymerase im DE3 Integrat des *E.coli* Stammes HT115, welche dsRNA über die beiden gegenläufigen T7 Promotoren im L4440 Plasmid bildet. Damit wechselt HT115 von der Trophophase in die Idiophase, in der nun erhöhte Mengen dsRNA gebildet wird, die in den Körper der Nematoden, die auf diese Platten gesetzt werden, durch den normalen Nahrungsaufnahmeprozess gelangt.

Die Durchführung variierte. Das Standardexperiment jedoch sieht vor, daß drei L4 Larven, meist von DR1564, auf die 'feeding Platte' gesetzt werden. Diese werden 24 h bei 25°C inkubiert. Danach haben diese bereits mit Eiablage begonnen, die Adulti werden entfernt, die Platte weiter bei 25°C inkubiert, bis sich Dauers entwickelt haben infolge des *daf-2(m41)* Allels von DR1564. Bei 15.5°C wird schließlich Weiterentwicklung zum reproduktiven Lebensalter fortgesetzt, dann und in den Folgetagen erfolgt Auswertung. Grundsätzlich erfordert das Experiment, daß die F0 gut in M9 gewaschen werden, bevor diese auf die feeding Platte gesetzt werden, da Kontaminationen den Erfolg beeinträchtigen. Wenn L1 Larven verwendet werden sollen, wurden zunächst etwa 20 Adulte Würmer auf eine LB Platte mit Kanamycin plaziert und nach 24 h konnten 20-30 entwicklungsarretierte L1 Larven direkt auf die feeding Platte gesetzt werden. Hungernde L3 Larven wurden hergestellt, indem späte L2 Larven in M9 gewaschen und auf LB Kanamycinplatten 24h plaziert wurden.

Auswahl des *C. elegans* Stammes, Temperaturprofil, stadienspezifische Auswahl bzw. Auswertungszeitpunkt waren abhängig vom Experiment und den erzielten Phänotypen.

2.2.4.2 RNAi durch Mikroinjektion

RNAi gegen *pcp-2* und *pcp-3* (Kapitel 2.2.1.4) wurde in die Gonade von *C. elegans* Hermaphroditen injiziert. Die Technik der Injektion ist in Kapitel 2.2.3 erläutert. RNA Präparationen aus *in vitro* Transkription sind hochmolekular (teilweise um 6 µg/µl). Sie werden in dieser Konzentration direkt ohne Einsatz von Markergenen injiziert (Fire *et al.*, 1998). Da diese Lösung hoch viskos ist, ist der Durchfluß durch die Mikroinjektionsnadel stark vermindert, im Extremfall war Verdünnung der RNAi auf 1 µg/µl in TE nötig. Da *C. elegans* dsRNA auf seinen Gesamtkörper unabhängig des Gewebes verteilt, welches dsRNA empfängt, sind auch Injektionen erfolgreich, bei denen die dsRNA in den Darm gelangt. Es sei aber darauf hingewiesen, daß Darmpartikel wirkungsvoll die Nadel verstopfen. Injiziert wurden je dsRNA 15 junge Adulte Hermaphroditen von DR1564, die auf insgesamt fünf normale NGM/OP50 Platten verteilt bei 20°C inkubiert wurden. Nach 12 h wurden die Adulten auf fünf frische NGM/OP50 Platten umgesetzt, dann aber bei 25°C weiter bebrütet. Das Gelege direkt nach der Injektion wird marginal betrachtet, da diese Embryonen zum Zeitpunkt der Injektion im Leib der Mutter bereits durch ihre Eischale vor Aufnahme von dsRNA geschützt waren und deshalb keinen auswertbaren RNAi Effekt aufweisen. Außerdem ist der genetische *daf-2* mutierte Hintergrund nicht zu einhundert Prozent erreichbar. Nach weiteren 12 h werden die injizierten Adulti wieder umgesetzt und weiter bei 25°C inkubiert. Es herrschen nun 2 Plattenchargen vor, einmal das Gelege 12h-24h post Injektion und mehr als 24 h post Injektion. Die erste Charge zeigt in der Regel die deutlichsten RNAi Phänotypen. Weitere 2d später haben sich aus den Embryonen durch das *daf-2(m41)* Allel Dauerlarven entwickelt. Von der zweiten Plattencharge werden noch die Adulti entfernt und verworfen. Zu diesem Zeitpunkt sind vergleichsweise wenig F1 Tiere noch nicht Dauerlarven, da die F0 Eiablage in der Zwischenzeit eingestellt hat oder Exitus eintrat. Die Platten werden nun nach 15,5°C transferiert, um den Austritt aus dem Dauerzustand zu ermöglichen. Nach weiteren 2 d sind die F1 adult, sie werden nun und in den folgenden Tagen final bewertet.

2.2.4.3 RNAi durch 'Soaking'

Für RNAi Wirkung durch Soaking wurde die *in vitro* synthetisierte RNA aus Kapitel 2.2.1.4 gegen *pcp-2* und *pcp-3* verwendet. Durchführung geschah in Anlehnung an Maeda *et al.* (2001). dsRNA wurde in Soaking Puffer (0,25x M9 Lösung (Mg²⁺-Ionen frei), 3 mM Spermidin (SIGMA S2626); 0,05% Gelatine (autoklaviert und filtriert)) auf eine Endkonzentration von etwa 1 µg/µl verdünnt. Frisch geschlüpfte L1 Larven vom *C. elegans* Stamm DR1564 wurden gründlich in M9 Lösung gewaschen, bevor 20 L1 in 4 µl obiger RNA Lösung eingelegt wurden. Darin verbrachten diese 24h bei 25°C. Danach wurden sie auf eine Standard NGM/OP50 Platte transferiert und bei 25°C weiter bebrütet. Nach Dauerlarvenbildung, infolge des *daf-2(m41)* Allels in DR1564, wurde Beendigung des Dauerzustands durch Transfer der Würmer nach 15,5°C eingeleitet. Adulte Phänotypen wurden anschließend ausgewertet.

2.2.5 Präparation von Embryonen und hochsynchronisiert wachsende *C. elegans* Population

Embryonenpräparationen in großem Maßstab stellen ausreichend Material zur Verfügung, wenn relative Häufigkeiten eines Ereignisses reduziert sind, z.B. *gfp* Fluoreszenz des erstellten *eeEx52* extrachromosomalen Array in EC1052 Embryonen (Kapitel 2.2.3). Zudem ist dies eine alternative Methode, um Embryonen zu präparieren, verglichen zum Aufschneiden einzelner Nematoden. Bei der Präparation wird alkalische Hypochloritlösung (Bleichlauge; NaOCl und KOH) verwendet. Diese zerstört auch GFP, wenn bei der Präparation die Eischale beschädigt wird. Somit bedeutet gemessene Fluoreszenz, daß vitale Embryonen vorlagen, wodurch Gewebespezifität des verwendeten *gfp*-Reporters unangetastet ist. Ein weiterer Vorteil besteht darin, daß hiermit Nematodenpopulationen synchronisiert werden können, da der Zellstammbaum und damit Entwicklungsparameter in *C. elegans* nahezu invariant sind (Sulston und Horvitz, 1977). Unter Einbezug des L1 Arrest kann die bestmögliche Synchronisierung einer Population erreicht werden. Ist der Arrest unerwünscht, besteht aber auch die Möglichkeit, aus diesen Tieren im Adulten Stadium erneut Embryonen zu präparieren und das am frühest möglichen Zeitpunkt bei z.B. 48-49 Stunden nach Schlupf bei 25°C bei N2. Diese Embryonen sind dann größtenteils im 1-30 Zellstadium und entwickeln sich mit einer Synchronitätsvarianz von etwa 1h weiter (Schauer und Wood, 1990).

2.2.5.1 Anreicherung von adulten Nematoden

Ausgangsbasis für eine gute Embryonenpräparation ist mindestens eine ausgehungerte Standard NGM/OP50 Platte des zu verwendenden *C. elegans* Stammes, z.B. EC1052. Diese besteht zum Größtenteil aus Nematoden im L1 Arrest, aber auch L2 Arrest liegt vor. Die Würmer dieser Platte werden durch Abspülen mit M9 oder auch Agarblocktransfer auf 10-20 10 cm Ø NGM/OP50 Platten verteilt und bei 20°C inkubiert. Nach Erreichen des adulten Stadiums können die Embryonen präpariert werden. Liegt das Ziel in der Erstellung einer in den Dauerzustand synchron verlaufenden Population von z.B. Stamm DR1564, empfiehlt sich vor der Präparation eine 12h 25°C Präinkubationsphase, dadurch wird 100% Dauerentwicklung in der Folgegeneration möglich.

2.2.5.2 Embryonenpräparation aus adulten Nematoden

Das Protokoll entwickelte sich auf Basis der alkalischen Hypochloritlyisierung adulter Nematoden (Emmons *et al.*, 1979). Vorbereitend wird die Bleichlauge hergestellt. Dies sind 10 ml NaOCl Lösung (12% Cl₂ aktiv, Firma Roth), 2,5 ml 5 M KOH und 37,5 ml Wasser. Diese Lösung muß in einem Exsikkator entgast werden, um gelöstes Chlorgas zu entfernen, welches die Embryonen irreversibel und nachhaltig schädigt, wodurch keine synchron wachsende Population entstehen kann. Die adulten Nematoden aus Kapitel 2.2.5.1 werden während des Entgasens der Bleichlauge mit eiskaltem M9 von den Platten ab gespült und in ein 15 ml Polypropylenzentrifugenröhrchen (Sarstedt) überführt. Nematoden bei 4°C sind immotil, sie können auch nicht schwimmen. Daher können sie durch 1 min Zentrifugation bei 1500 rpm in einer Hettich Zentrifuge pelletiert werden. Die Adulten werden einmal mit 10 ml M9 gewaschen und erneut pelletiert. Dadurch kann ein Großteil von OP50 entfernt werden, die durch das Bleichen auch lysiert werden, und damit Reaktivität der Bleichlauge gegenüber den adulten Nematoden reduzieren. Es wird nun zu den pelletierten adulten Nematoden 10 ml Bleichlösung bei Raumtemperatur gegeben, dann wird die Suspension 1 min geschüttelt, dann 1 min bei 1500 rpm abzentrifugiert. Die nun toten Adulten werden einmal mit 10 ml M9 bei Raumtemperatur gewaschen und dabei geschüttelt und wieder pelletiert. Zu diesem Pellet wird noch einmal 10 ml Bleichlauge hinzugefügt, 1 min geschüttelt, die Embryonen werden 1 min bei 1500 rpm pelletiert, schließlich sechs mal mit eiskaltem M9 gewaschen. Der typische Geruch des NaOCl sollte verschwinden. Man kann einen Tropfen konzentrierter Embryonensuspension direkt auf einem Agarosepad zu mikroskopischer Untersuchung aufbringen, Verwendung von NaN₃ ist hier unnötig (Kapitel 2.1.8).

Das Einhalten der hier erwähnten Zeiten ist kritisch, es sollte deshalb zügig hantiert werden, während die Nematoden mit Bleichlaugung affiziert sind. Außerdem muß M9 und Bleichlaugung an den genannten Schritten Raumtemperatur besitzen, da kalte Bleichlösung nur geringe Aktivität aufweist. Zudem sind auch Nematodenstamm und Zentrifuge zu beachtende Parameter, die dargestellten Zeiten gelten für DR1564, DR40, EC612 und EC1052. Z.B. sind bei N2 die Zeiten auf 40 s und 20 s, in denen NaOCl nachfolgend wirksam sein soll, verkürzt. Die Wahl der Zentrifuge erfolgt nach günstigem zeitlichen Ablauf in Anfahren und Abbremsen des Zentrifugenrotor. Mir stand eine Rotixa/RP Zentrifuge (Hettich AG, Bäch, Schweiz) mit einem 6-fach ladbarem Ausschwingrotor (Radius 198 mm) zur Verfügung. Die Maximalgeschwindigkeit beläuft bei diesem System auf 5000 rpm, die Anlaufzeit mißt 30 s, die Auslaufzeit beträgt minimal 34s. Innerhalb dieser Zeiten ist NaOCl auch aktiv, bei Verwendung anderer Zentrifugen sind diese Zeiten kalkulatativ miteinzubeziehen. Die Rotorgeschwindigkeit ist von marginaler Bedeutung, jedoch sollte 2000xg nicht überschritten werden, um die Embryonen nicht nachhaltig zu schädigen.

2.2.5.3 synchronisiert wachsende *C. elegans* Population

Um synchrone Weiterentwicklung zu ermöglichen, werden die präparierten Embryonen in 10 ml S-Basal Medium überführt. Sollen *daf-2(m41)* Dauerlarven entstehen, ist das Medium auf 25°C vorgewärmt. Die Embryonen werden genau 24h bei 175 rpm auf einem Certomat® R Schüttler mit Heizhaube Certomat® H (B. Braun Biotech international GmbH, Melsungen) bei 175 rpm geschüttelt. Dies erfolgte je nach genetischem Hintergrund bei 20°C oder 25°C. Die S-Basal Kultur wird nun in Eiswasser zügig abgekühlt. Durch 1 min Zentrifugation bei 1500 rpm bei 4°C wird die Kultur auf 1 ml Gesamtvolumen konzentriert. Danach werden die jetzt arretierten L1 Larven auf 20°C bzw. 25°C über Nacht vorgewärmte NGM/OP50 Platten ausgebreitet. Die Zahl der Platten muß der Menge an L1 Larven entsprechen. Dies bedeutet meist die doppelte Anzahl an Kulturplatten zu denen, welche für die Anzucht der adulten Nematoden zur Embryonenpräparation verwendet wurden. Ungleichmäßige Nahrungsbedingungen, ausgelöst durch Ausbreiten der Nematoden in der Form, daß sie sich in Haufen zusammen befinden oder durch insgesamt zu geringes Nahrungsangebot, sowie ungleichmäßige Temperierung der Kulturplatten sind hinreichende Bedingung, um Synchronität zu unterbinden. Gemäß Zielsetzung werden die L1 Larven entsprechend temperiert in Brutschränken weiter kultiviert. Das L1 Larvenstadium wird nun hochsynchronisiert verlassen, dies betrifft auch die weitere Entwicklung zur Dauerlarve oder zum Adulten. Dauerlarven können sich auch synchron fortentwickeln, wenn die Platten nach 15,5°C transferiert werden. Der Stapel an Kulturplatten muß dann aber zumindest für einige

Stunden vereinzelt bei 15,5°C ausgebreitet werden, damit insgesamt zügig eine Gesamttemperaturänderung stattfinden kann, um Synchronitätsvoraussetzungen nicht zu verletzen.

2.2.6 Nile Red *in vivo* Markierung von Fetttropfen in *C. elegans*

Fetttropfen können *in vivo* durch das fluoreszierende Lysochrom Nile Red dargestellt werden (Kirschner und Hara, 1980). *C. elegans* kann zusammen mit der gewöhnlichen Nahrungsaufnahme auch Nile Red aufnehmen, das Lysochrom verbreitet sich dann über den Körper. Es handelt sich um ein sehr intensives Fluorochrom, deshalb wird Nile Red sehr stark verdünnt eingesetzt. Es wurde eine 50 mg/ml Stock Lösung in Aceton erstellt, diese wurde zweimal je 1:10 in Aceton verdünnt, der Verdünnungsfaktor ist 10^{-2} . Weitere Verdünnungsstufen in 1xPBS folgten bis zur Verdünnung 10^{-5} . 250 µl dieser Lösung wurden auf eine Standard NGM/OP50 Platte im Kontrollexperiment und auf eine SFsjjF23B2.11 RNAi Futterplatte (Kapitel 2.2.4.1) pipettiert. Dies entspricht einer weiteren Verdünnung von 1:20 durch den Agar, wodurch eine Endkonzentration von 25 ng/ml Nile Red vorliegt. Je drei L4 Hermaphroditen von DR1564 wurden auf diese Platten gesetzt und bei 25°C inkubiert, bis Dauerlarven in den Nachkommen entstanden sind.

2.2.7 Erzeugung des mutanten Allels *ee1007*

Es bestand das Ziel, eine Mutante zu erzeugen mit vergleichbarem Phänotyp zu RNAi Phänotypen in *pcp-2* oder *pcp-3*. Dies geschieht durch Deletionsmutation mit Diepoxybutan oder mit Trimethylpsoralen unter UV Irritation. Derart mutagenisierte Männchen werden gegen die Deletion *eDf18* gekreuzt. Phänotypische Nachkommen sind innerhalb dieses genomischen Bereichs mutiert. Eine derart erzeugte Mutante könnte im *pcp-2* oder *pcp-3* Locus kartieren.

2.2.7.1 Mutagenese mit DEB und TMP/UV

Mutagenese wurde durchgeführt, sowohl mit Trimethylpsoralen (TMP) und nachfolgender Ultraviolettirritation (UV), als auch mit Diepoxybutan (DEB). Beide mutagenen Agenzien sind in der Lage, chromosomale Deletionen zu erzeugen (Cochrane und Skopek, 1994a, 1994b; Sladek *et al.*, 1989). Deren Toxizität und Mutationsfrequenz bezüglich PCR detektierbarer Deletionen gegenüber Transitionen oder Deletionen einzelner Basen wurde in *Caenorhabditis elegans* gemessen und bestätigt und erweist sich dahingehend als geeigneteres Agenz gegenüber Ethylmethansulphat, welches überwiegend G/C nach A/T Transitionen setzt (Barstead und Waterston, 1989, 1991).

Mutagenisiert wurden junge adulte Würmer des Stammes EC612 (*daf-2(m41)* III ; *him-8(e1489)* IV). Um dies stadienspezifisch zu gewährleisten und eine ausreichende Menge dieser Nematoden zu erzielen, wurde eine Präparation von Embryonen von zehn 10 cm Ø RNGM/OP50 Platten mit reichlich adulten Nematoden angefertigt. Nach weitergehender Entwicklung unter Einbeziehung des L1 Arrest entstanden synchronisiert junge adulte Nematoden, erkennbar daran, daß sehr wenige Embryonen im Körper der Hermaphroditen vorliegen, welche gerade im 1-30 Zellstadium vorliegen (Kapitel 2.2.5). Diese Nematoden wurden von ihren Kulturplatten mit eiskaltem M9 ab gespült, pelletiert bei 1200 rpm 1 min in einer Rotixa/RP Zentrifuge (Hettich), dann sechsmal gewaschen mit M9 wobei die Geschwindigkeit der Zentrifuge schrittweise auf 800 rpm reduziert wurde. Während dieses Vorgangs werden *E.coli* OP50 Zellen weitgehend entfernt, da diese bei den geringen Rotorgeschwindigkeiten nicht pelletieren. Alle Würmer werden in 16 ml M9 resuspendiert. In zwei 50 ml Polypropylenreaktionsgefäße werden je 8 ml Nematodensuspension überführt, eine zur TMP/UV, die andere zur DEB Mutagenese. Jene mit DEB erfolgte gemäß Trent *et al.* (1991). Zu 8 ml Wurmsuspension werden 8 ml 0,2 mM DEB in M9 Lösung pipettiert. Mutagenese erfolgt über 3h unter sanftem Schütteln bei 65 rpm auf einem Certomat® R Schüttler (B. Braun Biotech international GmbH). Um DEB zu entfernen wurde sechsmal wie oben gewaschen mit eiskaltem M9, dann wurden die Nematoden auf 20 10 cm Ø RNGM/OP50 Platten verteilt und ihnen zunächst 1h bei 20°C Erholung gewährt.

Mutagenese mit TMP erfolgte gemäß Yandell *et al.* (1994). Die Arbeit erfolgt in dunkel gehaltener Umgebung. 20 µl eines 3 mg/ml TMP Stocks in Dimethylsulfoxid werden in 8 ml M9 gelöst. Diese wird zur 8 ml Nematodensuspension hinzugefügt. Unter 15 min sanftem Schütteln nehmen die Nematoden das TMP in ihren Körper auf. Die komplette Suspension wird in einer dünnen Flüssigkeitsschicht in einer großen Schale ausgebreitet, so daß die Nematoden weitgehend einschichtig verteilt vorliegen. Jetzt erfolgt UV Irritation bei einer

Wellenlänge von 360 nm aus fünf TLD 15W/05 Neonröhren (Philips). Die affektierte Dosis ist 340 μJ in einem Stratalinker 2400 UV Crosslinker[®] (Stratagene La Jolla, CA, USA). Die Nematoden ruhen sich nun, auf zwanzig 10 cm \varnothing RNGM/OP50 Platten verteilt, 24h in Dunkelheit bei 20°C aus. Während dieser Zeit verliert das TMP seine Wirkung, dann können die Nematoden wieder Lichteinstrahlung ausgesetzt werden.

2.2.7.2 genetische Identifikation von Mutanten durch F1 Präkomplementation

Um spezifisch Mutationen eines Gens zu erhalten, wenn man bereits den Phänotyp abschätzen kann, ist F1 Präkomplementation. Dazu benötigt man mutagenisierte männliche *C. elegans* und einen Stamm, der eine chromosomale Deletion beherbergt in dem genomischen Bereich, in dem die erwünschte Mutation vorliegen soll. Da eine dauerabhängige Mutation erwartet wird, wurde der Stamm EC612 entwickelt, der doppelt mutiert in *daf-2(m41)* und *him-8(e1489)* ist. Durch das *him-8* Allel konnten Männchen erzeugt werden, die durch DEB und TMP/UV mutagenisiert wurden. Eine Kreuzungsplatte enthielt sechs mutagenisierte Männchen und vier Hermaphroditen des Stammes EC613. Insgesamt wurden 260 Kreuzungsplatten angesetzt bei dem Mutageneseexperiment mit DEB und 80 Kreuzungsplatten bei TMP/UV. Eine Kreuzungsplatte besteht aus RNGM Agar auf einer 6 cm \varnothing Petrischale, zentral wird ein 5 μl *E.coli* OP50 Tropfen plaziert. Dies hält die Nematoden nahe beieinander und erhöht die Kreuzungseffizienz. Der Stamm EC613 enthält ebenfalls die *daf-2(m41)* Mutation für temperaturabhängige Dauerlarvenbildung, außerdem beinhaltet er heterozygot die Deletion *eDf18*, welche ebenfalls die Gene *pcp-2* und *pcp-3* deletiert. Den Nematoden wurden 24h bei 20°C zur Kreuzung gewährt, dann wurden die Kreuzungsplatten nach 25°C transferiert. Nach vier Tagen entstand eine große Fraktion an Dauerlarven. Die Kreuzungsplatten wurden nach 15,5°C transferiert, damit sich die Dauerlarven fortentwickeln. Im Bereich von 4-6 Tagen nach Dauerlarvenbeendigung wurden die nun adulten Nematoden auf Vulvaphänotypen und soweit unter dem Stereomikroskop erkennbar auf Gonadenmalformationen untersucht. Jedoch kamen nur Platten zur Auswertung, auf denen in der F1 Männchen auftraten, diese entstehen gemäß Mendelscher Genetik und bestätigen Kreuzungsvorgänge in der F0. Insofern phänotypische F1 auf klonalen Platten bei 20°C Nachkommen (F2) erzeugten, wurde darauf geachtet, daß diese nicht Dpy und Unc Phänotypen gleichzeitig aufweisen, denn dies deutet auf Nachkommen in der F1 aus ungekreuzten EC613 hin, die neben *eDf18* auf dem Schwesterchromosom IV *unc-24(e138)* und *dpy-20(e1282)* heterozygot sind. Damit handelt es sich hier nicht um einen Phänotyp, der durch Mutagenese erzeugt wurde und somit aus ungeklärter Ursache stammt. Endgültige Bestätigung durch Wiederholung des Phänotyps konnte ausgehend von der

erhaltenen F2 Population an Einzeltieren stattfinden. Bei erfolgreicher Bestätigung des Phänotyps stand nun die Isolierung des Chromosoms mit dem mutierten Allel von der Deletion an. Das *him-8* Allel befindet sich, wie die Deletion auf Chromosom IV. Die erzeugte Mutation ist genetisch an *him-8* gekoppelt. Ungekreuzte Hermaphroditen auf klonalen Platten, die in ihren Nachkommen Männchen bilden, außerdem keine toten Embryonen erzeugen infolge Homozygotie in *eDf18*, sind reinerbige Mutanten ohne deletiertes Chromosom. Es entstand der Stamm EC1053, der das mutierte Allel *ee1007* enthält. Das durch *ee1007* affektierte Gen wurde mit *gon-12* bezeichnet. Obwohl *ee1007* genetisch von der Deletion abgesondert werden konnte, bildet EC1053 dennoch keine Männchen aus. Zudem trat sekundär ein deutlicher Unc Phänotyp auf.

Da durch die gewählten mutagenen Agenzien vorwiegend PCR-detektierbare Deletionen entstehen, wurden, sofern möglich, von F2 Nachkommen PCR durchgeführt, um zu testen, ob die Gene F23B2.11 oder F23B2.12 affektiert sind. Dazu wurden etwa 10 Nematoden in 10 µl Lysispuffer (30 mM Tris/HCl pH 8,0, 8 mM EDTA, 100 mM NaCl, 0,7% NP40, 0,7% Tween20) gemäß Barstead und Waterston (1991) aufgenommen. Nach Zugabe von 1 µl 1 mg/ml Proteinase K wurden die Würmer 60 min bei 65°C lysiert. Proteinase K wurde 15 min bei 96°C inaktiviert. Etwa 1 µl dieser Lösung wird pro PCR Reaktion eingesetzt. Sollte kein Erfolg möglich sein, wurde DNA gemäß Kapitel 2.2.1.1 präpariert und daran die PCR durchgeführt. Zum Test wurden die gleichen PCR Reaktionen, wie in Kapitel 2.2.1.6 beschrieben, ausgeführt.

2.2.8 Kreuzungen in *C. elegans*

Aus unterschiedlichen Gründen war es erforderlich, in *C. elegans* Kreuzungen durchzuführen. Die Mehrheit davon resultierte im Zusammenhang mit der Generierung und Analyse der Mutante in EC1053. Diese entstand durch Mutagenisierung von Männchen, die dann gegen einen Deletionsstamm gekreuzt wurden (Kapitel 2.2.7). Basis dazu waren die Stämme EC612 und EC613. EC612 entstand durch Kreuzung von DR1564 (*daf-2(m41)* III) Hermaphroditen mit CB1489 (*him-8(e1489)* IV) Männchen. Es hat sich generell gezeigt, daß die beste Kreuzungseffizienz bei 20°C erzielt wird unter Verwendung von Standard NGM/OP50 Platten, wobei OP50 lediglich als kleiner zentraler Fleck vorliegt, da Nematoden präferentiell in der Nähe des Futters verweilen und somit die Kreuzungspartner dicht umeinander kriechen. Zur Kreuzung wurden 3-5 Hermaphroditen und 8-10 Männchen verwendet. Nach einem Tag bei 20°C wurden die DR1564 Hermaphroditen vereinzelt. Es wurde mit den Nachkommen eines Hermaphroditen weitergearbeitet, welcher männliche Nachkommen produzierte. Von der F1 konnten 5 Hermaphroditen auf eine Standard

NGM/OP50 Platte plaziert werden. Inkubation erfolgte bei 25°C transferiert. Nach 3-4 Tagen wurden 50 Dauerlarven der F2, diese sind für *daf-2(m41)* homozygot, auf Klonplatten überführt, bei 15,5°C kam es zum Daueraustritt. Es wurde eine Platte ausgewählt, auf der in der F3 Männchen entstanden sind, diese sind dann auch *him-8(e1489)* homozygot.

Ähnlich verlief die Kreuzung zum Stamm EC613 (*daf-2(m41)* III ; *eDf18 / unc-24(e138) dpy-20(e1282)* IV). Männchen von EC612 (*daf-2(m41)* III ; *him-8(e1489)* IV) wurden mit Hermaphroditen des Stammes CB3823 (*eDf18 / unc-24(e138) dpy-20(e1282)* IV) gekreuzt. Da CB3823 jedoch die Allele heterozygot aufweist, können die F1 lediglich *eDf18* oder *unc-24* und *dpy-20* mutiert sein. Daher wurden F1 Männchen erneut mit Hermaphroditen von CB3823 gekreuzt. In der F2 treten nun tote Embryonen in Folge der homozygoten Deletion *eDf18* auf, oder Dpy Unc Tiere infolge der Homozygotie von *dpy-20* und *unc-24*. Die Nematoden mit Wildphänotyp könnten nun wieder Chromosom IV entsprechend CB3823 enthalten. Es wurden 40 Platten mit je einem adulten Nematoden der F2 kloniert bei 25°C. Es ist frühzeitig zu erkennen, ob *eDf18* anwesend ist infolge der toten Embryonen, der Dpy Unc Phänotyp ist auch frühzeitig bemerkbar. Alle Platten, die diese beiden Arten Phänotyp vorwiesen, wurden auf die Präsenz von Dauerlarven untersucht. Es wurden 10 Dauerlarven der F3 gepickt mit Wildtyperscheinung und Verhalten, diese sind dann auch wieder *dpy-20*, *unc-24* und *eDf18* heterozygot, außerdem sind diese *daf-2(m41)* homozygot. Es sei darauf hingewiesen, daß durch diese Art der Kreuzungsplanung definitiv kein *him-8* Allel in EC613 verbleibt. Das ist wichtig, denn beim F1 Präkomplementation screen nach Mutagenese wurde das stattgefundenere Kreuzungsereignis durch männliche Nachkommen bestimmt, diese dürfen nicht von der Mutation in *him-8(e1489)* abstammen.

Das mutante Allel *gon-12(ee1007)* in EC1053 wurde zum Absichern noch einmal gegen die Deletion gekreuzt. Dazu wurde zunächst EC1053 mit DR466 (*him-5(e1490)* V) gekreuzt, um Männchen zu erhalten, die dann gegen EC613 weiter gekreuzt wurden nach obigem Schema. Bei 25°C zeigte sich die gonadale Malformation, verursacht durch *gon-12(ee1007)* im Adulten deutlich, auch ohne Entwicklung über den Dauerzustand. Ferner wurden die F1 Männchen gegen N2 und gegen DR1564 weitergekreuzt. Es entstanden die Stämme EC1069, EC1070, EC1071 und EC1072. Durch das Auskreuzen werden sekundäre Mutationen auf anderen Chromosomen eliminiert, allerdings zeigte sich, daß die Mutation mit dem Unc Phänotyp mit *gon-12(ee1007)* gekoppelt ist. Durch Rekombination konnte beim Auskreuzen die sekundäre Mutation isoliert werden nach Klonierung von 120 Hermaphroditen der F1 aus der Kreuzung EC1053 mit DR466. Dieser Stamm wurde mit EC1073 bezeichnet. Durch Kreuzung ergab sich Komplementation mit *unc-24(e138)*, welches aus DR412 (*daf-15(m81) / unc-24(e138)* IV) homozygot isoliert wurde. Das Allel wird folgerichtig mit *unc-24(ee1008)* bezeichnet. EC1073 wurde mehrere Generationen bei 25°C kultiviert, es konnte nie der Phänotyp von *gon-12(ee1007)* beobachtet werden. EC1069

(*gon-12(ee1007) unc-24(ee1008)* IV) war Basis für weitere Komplementationskreuzungen. Primär wurde jedoch stets gegen DR466 gekreuzt, um Männchen zu erhalten. Diese wurden weiter gekreuzt gegen *unc-129(ev554)* IV, *unc-24(e138)* und CB3823. Die Männchen aus EC1070 (*gon-12(ee1007) unc-24(ee1008)* IV *him-5(e1490)* V) sind infolge des Unc Phänotyps zu unbeweglich für Kreuzungsereignisse.

Zur Rettung der Mutante *daf-15(m81)* wurde das extrachromosomale Array *eeEx33 [F23B2 ; hmg1β::gfp]* in EC1033 (Kapitel 2.2.3) mit DR732 gekreuzt, um zu testen, ob das Cosmid F23B2 dies bewirkt. Grün fluoreszierende Hermaphroditen wurden mit CB1489 (*him-8(e1489)* IV) gekreuzt. Männchen der F1 mit GFP Fluoreszenz wurden gegen DR732 gekreuzt. Die daraus resultierenden Männchen mit Fluoreszenz wurden auch noch einmal gegen DR732 gekreuzt, da *daf-15(m81)* in DR732 heterozygot vorliegt. Tiere mit wt Phänotyp, aber GFP Fluoreszenz wurden gesucht, deren Nachkommen ohne Fluoreszenz *daf-15* Dauerlarven bilden und außerdem viele tote Embryonen durch Aneuploidie des Balancer *nT1* bilden. Der Stamm wird EC1040 genannt. Bei grün fluoreszierenden *daf-15* homozygoten Nachkommen wird auf Mutantenrettung untersucht.

2.2.9 Analyse temporärer Genfunktion von *gon-12(ee1007)* durch Temperaturverschiebung

Da EC1053 temperaturabhängig Malformationen der Gonade aufweist, außerdem zu Ausstülpungen an der Vulva neigt, war es nötig, die Vorgänge der Genfunktion zeitlich einzugrenzen. Dies ist möglich, indem zu unterschiedlichen Entwicklungszeitpunkten von der permissiven niedrigen Temperatur 15,5°C auf die restriktive Temperatur 25°C gewechselt wird und umgekehrt. Zudem sei erwähnt, daß mit den ausgekreuzten Stämmen EC1069 und EC1072 differentiell der Phänotyp bezüglich Vulva und Gonade und der Zusammenhang mit Dauerentwicklung untersucht werden konnte. EC1070 und EC1071 ermöglichen durch das *him-5(e1490)* Allel weiterhin die Beobachtungen auf *gon-12(ee1007)* Männchen auszudehnen.

2.2.10 Darstellung der Vulvavorläuferzellen am L3 Larvalstadium sowie dem alternativen Dauerstadium

Da die beobachteten Vulvaphänotypen bei *pcp-2/pcp-3* und *gon-12* scheinbar mit Dauerentwicklung korrelieren, wurde die Situation zum Zeitpunkt, wenn S3/S3d Programm aktiv ist, untersucht. Bei der L2m in N2 sind 6 VPCs vorhanden mit determiniertem Entwicklungsschicksal, die während S3 beginnen, sich entsprechend durch Zellteilungen weiterzuentwickeln (Sulston und Horvitz, 1977). Diese Teilungen finden bei Entwicklung über den Dauerzustand erst nach der Diapause statt (Liu und Ambros, 1991). Der Zustand der VPCs soll untersucht werden von EC1069 und EC1072 bei der L2m, das gleiche gilt für DR1564 (*daf-2(m41)* III) auf RNAi Fütterungsplatten gegen *pcp-3* (SFsjjF23B2.11) und *pcp-2* (SFsjjF23B2.12; Kapitel 2.2.4.1). Als Kontrolle dient N2 und DR1564 auf NGM/OP50. Für die RNAi Experimente wurden 3 L4 Larven auf die Fütterungsplatte gesetzt und bei 25°C bis zum Dauerzustand inkubiert. Die VPCs wurden durch mikroskopische Laser Scanning Technologie des LSM510 Modul erfaßt. Bei EC1072 wurden 20 Adulte auf eine NGM/OP50 Platte gesetzt und bei 25°C, bis der Dauerzustand auftrat, bebrütet. Um das vergleichende L3 Stadium zu untersuchen, wurde der L1 Arrest ausgenutzt. 24h nach Wiederaufnahme der Entwicklung bei 20°C konnte bei N2, EC1069 und EC1072 der Zustand der VPCs erfaßt werden. Bei den RNAi Experimenten wurden hierzu arretierte L1 Larven von LB/Kanamycin Platten auf die Fütterungsplatten gesetzt. Die dargestellten Zeiten basieren gemäß Hirsh *et al.* (1976).

3 ERGEBNISSE

Dieser Abschnitt gliedert sich in zwei Abschnitte. Zunächst (3.1) werden molekulare Untersuchungen beschrieben, die belegen, daß bei Inaktivität zweier neu entdeckter Gene *pcp-1* und *pcp-2*, welche für lysosomale Carboxypeptidasen kodieren, die Entwicklung der typischen Gonadenstruktur durch fehlerhafte Migration der distalen Tipzellen (DTC) gestört ist. Im Adultstadium nach Durchlaufen eines Dauerlarvenstadiums (PDA) von *Caenorhabditis elegans* wird nach Ausbildung einer funktionalen Vulva diese nachträglich nach außen ausgestülpt, wodurch die Eiablage abrupt abbricht.

Im zweiten Teil (3.2) wird eine Mutante *gon-12* vorgestellt, die unabhängig von *pcp-2* und *pcp-3* wirkt. Diese temperatursensitive Mutante belegt für das *gon-12* Gen im Verlauf der postembryonalen Entwicklung zwei unterschiedliche, zeitlich abgrenzbare Aktivitäten. Zunächst wird der Zeitpunkt verändert, zu dem sich die Vulvavorläuferzellen (VPCs) teilen, jedoch ist das Teilungsschema nicht betroffen. Allerdings kann eine verfrühte Teilung der VPCs zu einer pseudovulvalen Ausstülpung in Adulten aus rein reproduktiver schneller Entwicklung führen. Ferner reguliert späte *gon-12* Aktivität die Entwicklung der Morphogenese zu einer funktionalen Gonade.

3.1 ZWEI LYSOSOMALE CARBOXYPEPTIDASEN ERWEISEN SICH ALS ESSENTIELL FÜR MORPHOGENESE VON GONADE UND VULVA

Zunächst wird beschrieben, wie das *pcp-3* Gen, welches eine lysosomale Carboxypeptidase kodiert, als morphogenetisches Gen bzgl. Vulvaentwicklung erkannt wurde. Nachfolgend werden Struktur und Verbreitung von Carboxypeptidasen auf Genom- und Proteinebene diskutiert. Im Genom sind *pcp-3* und *pcp-2* als Paar angeordnet und weisen sehr ähnliche Struktur auf. Auf mRNA Ebene durch RNAi durchgeführte Geninaktivierungsexperimente zeigen die Funktion von *pcp-2* und *pcp-3* distinktiert bzgl. Vulva und Gonadenentwicklung. Promotoranalysen durch GFP-Reporter zeigten übergeordnet das zeitliche und räumliche Expressionsmuster. Zudem wurde eine Korrelation zwischen geninaktivierender dsRNA und fehlender spezifischer Proteinakkumulation deutlich.

3.1.1 Eine Suche nach dauerabhängig morphogenetischen Genen führt zu einer Prolylcarboxypeptidase, enkodiert durch *pcp-3*

In *Caenorhabditis elegans* sind zwei dauermorphogenetische Gene beschrieben worden, *daf-9* und *daf-15* (Albert und Riddle, 1988). Neuerdings konnte die molekulare Struktur von *daf-9* als Cytochrom P450 aufgeklärt werden (Gerisch *et al.*, 2001; Jia *et al.*, 2002).

Von dem Gen *daf-15* gibt es bislang nur ein mutantes Allel, *m81*. Dieses bildet temperaturunabhängig konstitutiv ein morphologisch verändertes und unvollständiges Dauerstadium aus. Das Tier ist in diesem Stadium arretiert und erreicht die sexuelle Reife nie (Albert und Riddle, 1988). Es wurde versucht, dieses Gen im Genom zu identifizieren. Die Strategie zur Identifikation dieses Gens war Mutantenrettung durch Cosmide, die in die Gonade des *C. elegans* Stammes DR732 injiziert wurden. Dieser *C. elegans* Stamm enthält heterozygot die *daf-c* Mutation *daf-15* chromosomal gekoppelt mit *unc-22(s7)*. Generell bilden nach Injektion von Cosmiden in *C. elegans* Stämme diese unter anderem aus der DNA ein sogenanntes extrachromosomales Array durch Endorekombinationsereignisse. Ein derart entstandenes Array ist zwar in der ausgebildeten Struktur stabil, jedoch wird es unabhängig vom regulären Zellzyklus repliziert. Dadurch kommt es zu einer mosaikartigen Verteilung des Array in der Soma. Ebenfalls ist die Transmission des Array auf die Nachkommen ungleichmäßig (Stinchcomb *et al.*, 1985, Mello *et al.*, 1991, Hope, 1991). Erkannt wird ein Array durch Coinjektion eines visuell detektierbaren Markers. Hier ist stets das Plasmid pHMGI β EGFP verwendet worden, welches *gfp* exprimiert unter Regulation des *C. elegans* hmgI β Promotors (Kurz, T. und Schulze, E., unveröffentlicht). In den Nachfolgegenerationen nach Injektion war das Ziel die Suche nach phänotypischen Unc-22 Nematoden, welche die beteiligten Cosmide, erkennbar an GFP Expression des Markerplasmids, als extrachromosomales Array beinhalten, mit der Eigenschaft, daß diese Nachkommen injizierter Tiere nicht im konstitutiven dauerähnlichen Arrest bedingt durch *daf-15(m81)* enden, sondern das fertile adulte Stadium erreichen. Von einem Cosmid, welches diese Fähigkeit dem Stamm DR732 übergibt, erhofft man sich, daß es das Wildtypallel von *daf-15* enthält.

Das *daf-15* Gen kartiert auf Chromosom IV (Anhang 8.3). Es konnte ferner gezeigt werden, daß die chromosomale Deletion *eDf18*, z.B. im Stamm CB3823 vorhanden, unter anderem auch *daf-15* deletiert (Albert und Riddle, 1988). Die Größe dieser Deletion im Chromosom beträgt etwa 0,8 cM und endet nach bisherigen Erkenntnissen jeweils vor den klonierten Genen *unc-24* und *elt-1*. Ferner wird der Bereich für den Lokus von *daf-15* weiter eingegrenzt auf den Bereich zwischen *fem-3* und *elt-1* durch Multifaktorkartierungen (Hodgkin, 1986), entnommen der Datenbank ACeDB (Eeckman und Durbin, 1995). Siebzehn überlappend sequenzierte Cosmide, sowie ein YAC Klon decken diesen Bereich von etwa

0,38 cM ab. Für diesen Bereich sind insgesamt 121 Gene vorhergesagt worden (The *C. elegans* Sequencing Consortium, 1998).

Die Cosmide wurden zunächst gemischt in drei Ansätzen (L1, M1 und R1) in den *C. elegans* Stamm DR732 injiziert, wobei gemäß physikalischer Cosmidkartierung L1 fünf links gelegene Cosmide, M1 sieben zentral kartierte Cosmide und R1 sieben rechts gelegene Cosmide enthält. Mit diesen drei Ansätzen sind alle Cosmide, die den möglichen *daf-15* Lokus überspannen, vertreten (Anhang 8.3). Es entstanden 2 Stämme, EC1022 und EC1023, die R1, vier Stämme, EC1001, EC1002, EC1003 und EC1004, die M1 und zehn Stämme, EC1005 bis EC1014, die L1 enthalten. Das YAC Y11D7A, welches einen durch die Cosmide nicht abgedeckten chromosomalen Bereich ausfüllt, wurde extra injiziert in DR732 und führte zu den Stämmen EC1034 und EC1035. Einzig die Linien mit dem Cosmidmix L1 zeigten Unterschiede im Phänotyp zu dem injizierten Stamm DR732. Dagegen konnten bei den Linien mit M1, R1 und Y11D7A keine auffälligen Merkmale, verglichen zu DR732, festgestellt werden. Die Cosmide in den Linien mit L1 wurden deshalb vereinzelt in *C. elegans* DR732 injiziert. EC1026 enthält das Cosmid C01F6, das auch den *fem-3* Lokus beinhaltet. EC1015 bis EC1019 enthalten C46C2 und physikalisch überlappend dazu H05E11 und H28B06 (Kartierung der Cosmide gemäß Anhang 8.3). Alle diese Linien sind unauffällig, genau wie die Linien mit M1 und R1. In den drei unabhängig etablierten Linien EC1038, EC1039 und EC1040 mit dem verbliebenen Cosmid F23B2 aus L1 hingegen ergab sich die gleiche Besonderheit, wie in den Linien mit der Gesamtmischung L1. Bei Anwesenheit von Cosmid F23B2 wurden in DR732 adulte Hermaphroditen mit Unc-22 Phänotyp erhalten, wie es einer Rettung durch das Wildtypallel von *daf-15* entspricht. Jedoch bildeten sie teilweise keine weiteren Nachkommen, so daß eine tatsächliche Rettung nicht bestätigt werden konnte. Das Cosmid F23B2 enthält neun vorhergesagte Gene mit vermutlich ausreichenden Promotorsequenzen, vollständiger CDS und 3'UTR. Zwei weitere Gene sind nur partiell in diesem Cosmid vertreten. Die neun komplett in F23B2 vorhandenen Gene wurden systematisch mit F23B2.3, F23B2.4 (*daf-10*), F23B2.5 (*flp-1*), F23B2.6, F23B2.7, F23B2.8, F23B2.9, F23B2.10 und F23B2.11 bezeichnet, die beiden anderen heißen C01F6.6 und F23B2.12 (The *C. elegans* Sequencing Consortium, 1998). Mittels RNAi Technik, bei der spezifisch die Wirkung von Genen inaktiviert wird durch homologe mRNA Degradierung, wurde am *C. elegans* Wildtypstamm N2 versucht, das *daf-15* Gen bzgl. der neun vollständig vertretenen Gene in F23B2, sowie C01F6.6, zu identifizieren. Einzig RNAi von F23B2.11 zeigte einen schwachen Phänotyp, die Nachkommen von drei Hermaphroditen waren ungewöhnlich hell im lichtmikroskopischen Anblick. Konstitutiver Dauerlarvenarrest, wie es für *daf-15(m81)* typisch ist, konnte bei keinem RNAi Experiment von einem der Gene von F23B2 erhalten werden. Das Experiment wurde ausgedehnt auf RNAi von jedem dieser Gene am *C. elegans* Stamm EC315 (Reißner, Fröde und Schulze, unveröffentlicht), der

unter anderem das *daf-2(m41)* Allel enthält. Bei 25°C bildet dieser Stamm konstitutiv Dauerlarven aus. Sollte eines der Gene in F23B2 *daf-15* sein, so wird erwartet, daß selbst bei permissiver Temperatur der Dauerarrest nicht verlassen wird, wie es für *daf-2(m41)* Dauerlarven im Normalfall üblich ist. Diese Strategie zielt auf eine Phänokopie der abnormalen und unvollständigen Morphologie von *daf-15(m81)* Dauerlarven hin, wodurch der Austritt aus dem Dauerarrest unmöglich ist (Albert und Riddle, 1988). Einzig ungewöhnlich erwies sich auch hier die RNAi von F23B2.11, bei diesem Gen entstand im adulten Zustand eine pseudovulvale Ausstülpung (Ppv). Dieser Phänotyp erwies sich als abhängig vom Dauerlarvenarrest. Bei durchgängiger Entwicklung ohne Entwicklungsarrest wurde der Phänotyp nicht beobachtet. Sequenzierung des F23B2.11 Gens von DNA homozygoter *daf-15(m81)* Nematoden soll klären, ob diese beiden Gene zueinander allelisch sind.

Aus einigen homozygoten *daf-15* Dauerlarven aus DR732 wurde deshalb DNA für PCR präpariert. Es wurden drei PCR Reaktionen durchgeführt, die zusammen die CDS von F23B2.11 umfassen. Sequenzieranalyse dieser PCR-Produkte ergab keine Abweichungen zur sequenzierten Version des Wildtyps zu diesem Gen (The *C. elegans* Sequencing Consortium, 1998). Ein Versuch, die Mutante *daf-15(m81)* nur mit dem F23B2.11 Gen zu retten, war nicht erfolgreich bei zwei unabhängig etablierten Stämmen EC1049 und EC1050. F23B2.11 und *daf-15* sind somit zwei verschiedene Gene.

Bei dem Versuch, das zweite morphogenetische Gen *daf-15* zu identifizieren, wurde also ein neues Gen gefunden das anscheinend an Morphogenese reproductiv benötigter Organe beteiligt ist. Es hat die systematische Bezeichnung F23B2.11. Nach der Sequenz handelt es sich um eine lysosomale Carboxypeptidase (The *C. elegans* Sequencing Consortium, 1998). Ihr wurde hier wegen der Ähnlichkeit zu humaner Prolylcarboxypeptidase die Bezeichnung *pcp-3* (Prolylcarboxypeptidase ähnliches Gen) verliehen.

3.1.2 Struktur und Verbreitung von Carboxypeptidasen im *C. elegans* Genom

Bei Betrachtung der genomischen Sequenz von *pcp-3* (F23B2.11) fällt auf, daß das benachbarte Gen F23B2.12 sehr ähnlich ist. Dieses Gen wird in der Folge mit *pcp-2* bezeichnet. Beide Gene sind mit gleicher Orientierung nebeneinander auf Chromosom IV angeordnet, getrennt durch 1422 bp verbindender Sequenz, 3'UTR von *pcp-2* bzw. Promotorregion von *pcp-3* (Abb. 1A). Weiterhin sind die Exongrößen der kodierenden Sequenzen (CDS) beider Gene fast auf die Base genau gleich groß, abgesehen im Bereich Exon 0, Exon 1 von *pcp-3* und Exon 1 von *pcp-2* (The *C. elegans* Sequencing Consortium, 1998). Jedoch zeigt das Alignment der beiden Gene, daß es sich dabei um zwei Einschübe von je drei Basen direkt nebeneinander handelt passend zum Leserahmen, wodurch es zu einem Einschub einer Aminosäure im Expressionsprodukt kommt. Die Introngrößen hingegen variieren beträchtlich. Die Primärstruktur von PCP-2 weist 1080 aa auf, die von PCP-3 1121 aa. Ein Sequenzvergleich mit PALIGN des Software Pakets PcGene ergab 75% Übereinstimmung zwischen beiden Proteinsequenzen. Weiterführende Analyse dieser Gene mittels der Proteinstrukturdatenbank Pfam ermittelt je zwei α/β Hydrolase Faltungseinheiten im Protein (Abb. 1B) gemäß der *Mus musculus* Referenzfaltungseinheit (Acc.No. PF00561, Ollis *et al.*, 1992). Viele hydrolytische Enzyme besitzen diese Faltungseinheit, im Kern bestehend aus 8 β -Strängen welche über α -Helices verbunden sind und ein α/β Faltblattmotiv bilden. Zudem ist stets eine katalytische Einheit vorhanden, welche am stärksten evolutiv konserviert ist (Ollis *et al.*, 1992). Durch BLAST Suche unter Verwendung der gesamten PCP-2 bzw. PCP-3 Sequenz konnten etwa 100 α/β Hydrolase Proteine in *C. elegans* gefunden werden (Anhang 8.4). Dabei konnte Y116F11B.3 (PCP-4) ermittelt werden, welches die gleiche Anordnung der Faltungseinheiten aufweist. Weiterhin ist auch hier die Größe und Zahl der Exons beinahe exakt vergleichbar. Es fällt auf, daß lediglich im Bereich zwischen den beiden α/β Hydrolase Einheiten, kodierend durch Exon 4, 29 Aminosäuren weniger vorhanden sind. Alle anderen kleineren Unterschiede entsprechen auch hier wieder kompletten Aminosäuredefiziten, jeweils 3 nachfolgende Basen auf Genomebene, 1 aa in E1, 1 aa zusätzlich in E3, 3 aa in E5 und 6 aa in Exon 6. Trotz der Gesamtverkürzung um 38 aa ist PCP-4 zu 61,9% identisch zu PCP-2. Das Gen liegt peripher in Chromosom V. Außerdem liegt zwei Gene vor *pcp-2* das Gen C46C2.4, welches ein Protein kodiert, das zwar nur eine α/β Hydrolase Einheit besitzt, aber mit 46,1% Sequenzidentität sehr hohe Ähnlichkeit zu PCP-2 aufweist.

Bei vergleichender Sequenzanalyse an der PFAM Datenbank für Proteindomänen (Bateman *et al.*, 2002), ergab sich insbesondere bei PCP-4 und PCP-3 am C-Terminus eine mit DUF274 bezeichnete Domäne. DUF bezeichnet Domänen, die spezifisch für *C. elegans* sind, deren Struktur und Funktion jedoch unbekannt sind. Die Interpro Datenbank (Apweiler

et al., 2001) erwähnt 21 Proteine mit zueinander höchster Sequenzhomologie, welche diese Domäne besitzen. Bei genauer Betrachtung fällt auf, daß die meisten Einträge wie das Genpaar PCP-2 und PCP-3 benachbart zueinander im Genom mit gleicher Orientierung vorliegen. Von diesen 21 liegen bereits sieben direkt als Cluster beieinander, von sechs davon sind auch cDNA Klone nachgewiesen (Kohara, 1996). Zudem tendieren zueinander stärker ähnliche Proteine auch in ihrer kodierenden CDS gleich große Exons bei dennoch variablen Introns zu besitzen (siehe Anhang 8.5).

Ferner wurde eine BLAST Suche unter Verwendung der Datenbank des NCBI durchgeführt mit der PCP-2 Sequenz als Basis. Nachdem zwar zunächst Ähnlichkeit mit anderen *C. elegans* Proteinen bestätigt ist, zeigt sich auch die Ähnlichkeit zu Prolylcarboxypeptidasen und Serincarboxypeptidasen im Mammaliersystem wie *Rattus norvegicus* und *Homo sapiens* aber auch im Pflanzenreich wie bei *Arabidopsis thaliana*. Diese Proteine weisen allerdings nur eine α/β Hydrolase Einheit auf. Ferner ergab sich, daß ZK112.1 mit 41,1% stärkste Homologie zu dem menschlichen PRCP aufweist, weshalb wir dieses Protein mit PCP-1 bezeichnet haben. Bei vergleichenden Untersuchungen nur der α/β Hydrolase Einheiten ergab sich stärkste Homologie zwischen diesen Proteinen nur zur jeweils zweiten Faltungsstruktur von PCP-2, PCP-3 und PCP-4 (Tabelle 2). Zur weiteren Strukturaufklärung wurde ein Sequenzvergleich zwischen humaner und pflanzlicher PRCP, PCP-1, PCP-2 und C26B9.5 (Anhang 8.4, als Prolylcarboxypeptidase vorhergesagt) durchgeführt, um die reaktiven konservierten Bereiche der *C. elegans* Carboxypeptidasen ermitteln zu können. Ferner wurde auch ein Vergleich zwischen den vier ähnlichsten Proteinen von PCP-2 durchgeführt. Aus beiden Vergleichen zusammen konnten die Aminosäuren des aktiven Zentrums, Serin, Asparaginsäure und Histidin zugeordnet werden. Weiterhin wurden mögliche Glykosylierungsstellen ermittelt um die Proteine in die Lysosomen zu sekretieren. (Ferlinz *et al.*, 2001; Anhang 8.4, 8.6). Hauptkriterium war der Vergleich zur menschlichen PRCP (Tan *et al.*, 1993). Neben Glykosylierung funktioniert lysosomale Zuordnung über eine N-terminale Signalsequenz. Diese ist bei den vorhergesagten Sequenzen auch nach Maßgabe der Kriterien, positiver Start durch z.B. Arginin, ein hydrophober Kern durch eine Reihe von Leucin Resten und einigen polaren Aminosäuren am Ende, auch vorhanden (Nielsen *et al.*, 1997; Anhang 8.6). Bei *pcp-3* ist eine Exon/Intron Struktur vorausgesagt worden, die zu einem 41 aa längeren Protein führt als PCP-2. Jedoch, ließe man diese 41 aa weg, wäre die jetzt erste Aminosäure 42 ein Methionin, danach käme eine reguläre Signalsequenz. Aus diesem Grund wurde das für diese 41 aa codierende Exon mit E0 bezeichnet (Abb. 1).

Die Datenbank an cDNA Klonen von Kohara (1996) weist 18 Klone homolog zu *pcp-3* auf, die vom 5' und vom 3' Terminus ansequenziert wurden. Eine Überlagerung aller dieser Sequenzen deckt den größten Teil der vorhergesagten Exon-Intron Struktur dieses Gens ab.

Von *pcp-2* sind nur 5 cDNA Klone bekannt. Durch die Sequenzidentität dieser benachbarten Gene, wobei die vergleichenden Intronbereiche divergent sind, wird die Vorhersage der Genstruktur bekräftigt. Durch das auf Chromosom V vorliegende Gen *pcp-4*, welches zu den anderen beiden Genen auch divergente Introns besitzt, aber stark homolog in den Exons ist, entsteht eine kleine Gruppe von strukturell verwandten Genen. Zudem konnte durch Reaktion von reverser Transkriptase und anschließender PCR Reaktion der Bereich amplifiziert werden der von den cDNA Klonen zu *pcp-3* nicht abgedeckt wird. Dieses PCR Produkt besaß geringere Größe als das vergleichende PCR Produkt an genomischer *C. elegans* DNA (Daten nicht gezeigt). Es handelt sich um das Produkt, das auch in einem RNAi Klon, SFsjjF23B2.11, vorliegt (Struktur in Abb. 1A). Von Exon 0 von *pcp-3* ist kein cDNA Klon bekannt, RT-PCR in diesem Bereich war stets ohne Erfolg, so daß davon ausgegangen wird, daß dieses Exon falsch vorhergesagt wurde.

Prolylcarboxypeptidasen werden als Zymogene synthetisiert, d.h. ein zusätzliches N-terminales Propeptid muß abgespalten werden, um Aktivität zu erreichen. Eine vergleichbare Sequenz konnte aber nicht ermittelt werden, möglicherweise sind dies aber auch für *C. elegans* charakteristische Sequenzen. Bei Prolylcarboxypeptidasen wurde außerdem eine sogenannte Serinrepetition festgestellt werden (Dmochowska *et al.*, 1987, Tan *et al.*, 1993). Dies ist eine Sequenz von 26 Aminosäuren, die innerhalb der Primärstruktur sieben bis neun Wiederholungen besitzt. Der Start beginnt mit Serin oder Threonin, danach folgen in einigen Positionen bestimmte Aminosäuregruppen. Die Ähnlichkeit ist aber nicht sehr hoch, außerdem beginnt auch nicht jede Repetition mit Serin oder Threonin. Diese Repetition konnte in den *C. elegans* Prolylcarboxypeptidasen PCP-2, PCP-3, PCP-4, ZK112.1 und C26B9.5 nicht festgestellt werden. Infolge der hohen Sequenzidentität jedoch ergibt sich zwangsläufig auch die Tendenz, eine gewisse innere Wiederholung aufzuweisen, die unter nicht allzu strikten Vorgaben tendenziell auch vorherrscht.

Da α/β Hydrolasen funktional dimerisiert sind, könnte dies in PCP-2, PCP-3 und PCP-4 direkt durch die beiden Faltungseinheiten in einem Enzym funktionieren. Da aber die Ähnlichkeit der ersten Hydrolase zur Zweiten nicht sehr hoch ist (Tabelle 2), wäre auch ein Vorgang wie ‚domain swapping‘ denkbar, bei dem die erste, als vestigiale Domäne, nicht reaktiv beteiligt ist, aber im nicht dimerisierten Zustand das Monomer stabilisiert durch Bindung an die katalytische Domäne (Bennett *et al.*, 1995; Argiriadi *et al.*, 1999).

Tabelle 2: Ähnlichkeitsmatrix von α/β Hydrolasefaltungseinheiten

Es ist eine Matrix dargestellt, die eine mit PCGene ermittelte Ähnlichkeit zwischen den einzelnen α/β Hydrolase Faltungseinheiten wiedergibt. Zur Übersichtlichkeit sind die Vergleiche zwischen den jeweils zweiten (falls vorhanden) α/β Hydrolase Einheiten blau, die zwischen den ersten rot, der Vergleich beider Faltungseinheiten in einem Protein zueinander grün dargestellt. Zudem im Gesamtvergleich sind in normal schwarz die Vergleiche zu den α/β Hydrolase Einheiten von humanem PRCP, PCP-1 und zudem C46C2.4 dargestellt.

In der horizontalen Leiste ist zudem die Position der Aminosäuresequenz der Hydrolaseeinheit angegeben zur Gesamtlänge des Proteins.

% Identität		PRCP	PCP-1	PCP-2		PCP-3		PCP-4		C46C2.4
		AB	AB	AB 1	AB2	AB 1	AB2	AB 1	AB2	AB
		115-372/496	108-406/565	109-339/1080	642-875/1080	152-382/1121	685-917/1121	108-339/1042	613-843/1042	246-488/614
PRCP	AB	100								
PCP-1	AB	41,1	100							
PCP-2	AB 1	15,2	15,2	100						
	AB2	17,5	15,0	20,8	100					
PCP-3	AB 1	15,2	15,6	71,4	19,9	100				
	AB2	21,5	16,7	22,1	75,5	24,2	100			
PCP-4	AB 1	16,8	16,4	68,7	27,6	72,3	25,4	100		
	AB2	16,9	17,3	16,0	61,9	16,9	67,5	13,4	100	
C46C2.4	AB	18,1	19,8	15,2	40,6	21,2	44,2	20,7	43,3	100

3.1.3 Adulte RNAi Phänotypen von *pcp-2*, *pcp-3* und *pcp-4*: Das Auftreten von vulvalen Ausstülpungen und gonadale Migrationsfehler der DTC

Die drei *C. elegans* Gene *pcp-2*, *pcp-3* und *pcp-4* wurden auf ihre Funktion untersucht. Da von diesen Genen keine Mutante bekannt ist, wurden mögliche Funktionen dieser Carboxypeptidasen in der Morphogenese durch RNA induzierte Geninaktivierung (RNAi) ermittelt. Das Standardexperiment war die Verfütterung von dsRNA bildenden *E.coli* Zellen, wobei die dsRNA in einem gewählten Bereich zum betreffenden Gen homolog ist.

Zunächst wurde die Funktion von *pcp-3* untersucht. Es wurden hierfür Wildtyp L4 Larven mit dem Bakterienstamm SFsjjF23B2.11 gefüttert. Der homologe Bereich dieses RNAi Klon entspricht hauptsächlich Exon 5 der genomischen *pcp-3* Sequenz (Abb. 1A). Die Nachkommen dieser Würmer auf der Kulturplatte mit SFsjjF23B2.11 erwiesen sich im adulten Stadium als deutlich heller im Lichtmikroskop als Kontrolltiere, die auf NGM/OP50 Platten wuchsen. Der Grund ist möglicherweise geringere Fettakkumulation. Ferner war in diesem Experiment keine weitere Auffälligkeit zu erkennen.

Es wurden nun nachfolgend drei L4 Larven des *C. elegans* Stammes EC315 (*daf-2(m41)* III ; *myo-2::d1egfp*) (Reißner, Fröde und Schulze, unveröffentlicht) mit den Bakterien SFsjjF23B2.11 bei 25°C gefüttert. Die Nachkommen erreichten infolge der in EC315 vorhandenen *daf-2(m41)* Mutation das Dauerstadium. Nach Transfer dieser Kulturplatte nach 15,5°C entwickelten sich diese Dauerlarven weiter. Die adulten Nematoden zeigten eine pseudovulvale Ausstülpung, dem Phänotyp wird die Bezeichnung Ppv verliehen (Abb. 2). Bis auf einige vereinzelte Ausnahmen war dieser Phänotyp bei allen Tieren zu sehen. Ferner fiel

auf, daß sich dieser Phänotyp nicht direkt mit der Häutung zum adulten Stadium entfaltet, sondern erst einige Tage später auftrat. Die weitere Progression dieses Phänotyps mündete im Aufreißen der Struktur und der Entleerung des Körperinhalts, in der Regel intestinale Komponenten. Infolge dieser starken Verletzung stirbt der Wurm frühzeitig. Die Gesamtprogression erwies sich in den einzelnen Tieren als variabel, das finale Aufreißen der Struktur war nicht immer zu beobachten, vielmehr starben die meisten Tiere dieses Phänotyps sogar ohne das Aufreißen. Auch hier tritt der Tod frühzeitig ein, denn mit der pseudovulvalen Ausstülpung ist Eiablage über die zunächst richtig entwickelte Vulva zu Ende, die verbleibenden Embryonen schlüpfen im Elterntier und fressen dieses von innen auf. Dieser Phänotyp ist strikt abhängig davon, daß die Entwicklung über den Dauerzustand verläuft. Bei Kontrollentwicklung unter Verwendung unterschiedlicher Inkubationstemperaturen ohne Dauerarrest trat dieser Phänotyp nicht auf (Tabelle 3). Das bedeutet, daß hier zwischen Postdauerstadien, genannt PDL3, PDL4 und PDA, gegenüber den direkt reproduktiven Stadien, L3, L4 und Adult, unterschieden werden muß. Der Stamm EC315 enthält zusätzlich einen *gfp*-Reporter in Form eines integrierten chromosomalen Arrays, der unter Kontrolle des *myo-2* Promotors eine destabilisierte Variante des *gfp* (*d1EGFP*) exprimiert (K. Reisner, S. Fröde und E. Schulze, unveröffentlicht). Die GFP Expression dieses Stammes wird nicht beeinträchtigt durch RNAi von *pcp-3*. Das Experiment wurde mit den gleichen Parametern mit dem Stamm DR1564 wiederholt, der wie EC315 das *daf-2(m41)* Allel enthält. DR1564 besitzt nur diese Mutation in *daf-2*. Es soll gezeigt werden, daß der Phänotyp Ppv unabhängig von *myo-2::d1egfp* und der durch Integration dieses Konstrukts möglicherweise entstandenen Mutationen ist. Das phänotypische Ergebnis ist das Gleiche, jedoch ist die Penetranz deutlich verringert, teilweise nur noch um 10% Nematoden mit Ppv.

Das DAF-2 Protein wirkt in einem Insulin-ähnlichen regulatorischen Signalweg zur Bildung der Dauerlarve (Kimura *et al.*, 1997). Es wird nun gezeigt, daß der dargestellte Phänotyp immer auftritt, wenn die Entwicklung über den Dauerzustand verläuft, unabhängig von der Art des regulatorischen Signalwegs, der zur Dauerlarvenbildung führt. Demzufolge wird der Phänotyp bestätigt durch RNAi von *pcp-3* mittels der SFsjjF23B2.11 Bakterien in anderen genetischen *daf-c* Hintergründen. Es wurde der Stamm DR40 verwendet, der die *daf-1(m40)* Mutation trägt. DAF-1 ist im TGF β Signalweg in einem von DAF-2 unabhängigen Signalweg zur Dauerbildung aktiv (Georgi *et al.*, 1990). JT6130 enthält die Mutation *daf-21(p673)* aus dem chemosensorischen Signalweg der Dauerbildung (Dalley und Golomb, 1992). Gene dieser Signalkette wirken teilweise redundant zu Vertretern der TGF β Signalkaskade (Thomas *et al.*, 1993; Schackwitz *et al.*, 1996).

RNAi von *pcp-3* führte auch im *daf-1* und im *daf-21 daf-c* Hintergrund in PDA Nematoden zu Ppv, wobei die Penetranz vergleichbar ist zu *daf-2(m41)* in DR1564 ist. Im genetischen *daf-21* Hintergrund war die Penetranz etwas erhöht (Tabelle 3).

Zum gesamten Phänotyp gehört auch noch die ebenfalls charakteristische hellere Erscheinung der Tiere bei lichtmikroskopischer Betrachtung. Dabei fiel bei einer Reihe von Nematoden im Mikroskop auf, daß die Gonadenstruktur verändert ist (Abb. 2C). Charakteristisch waren unvollständig ausgebildete Gonaden, die keine normale Reflexion ausführten und linear blieben oder andere Malformationen aufwiesen. Der Bereich des Ovars mit den Keimzellen erscheint auch stets hell im Lichtmikroskop oder unter dem Binokular. Im Falle einer linearen und ventral ausgedehnten Gonade kann die Ausbildung von Oozyten ausbleiben, lediglich die Ansammlung von Keimbahnzellen ist dann ventral zu erkennen.

Da die Gene *pcp-2*, *pcp3*, *pcp-4* und C46C2.4 zueinander hohe Ähnlichkeit aufweisen (Abb. 1, Kapitel 3.1.2, Tabelle 2, Anhang 8.4 und 8.6), besteht die Möglichkeit, daß durch Verwendung der RNAi Fütterungsbakterien SFsjjF23B2.11 durch Kreuzreaktivität andere Gene als *pcp-3* affektiert werden und der beschriebene Phänotyp einem anderen Gen zugeordnet werden müßte. Es wurden demzufolge zwei weitere RNAi Fütterungsstämmen erstellt, die anderen Bereichen des *pcp-3* Gens homolog sind (Abb. 1A): 5'_11_CDS_fed mit Homologie vor allem zu Exon 1 und 2, welches für die erste α/β Hydrolasefaltungseinheit des Proteins kodiert und SFsjjF23B2.11_3UTR, welches der 3'UTR des Gens homolog ist. RNAi wurde also erneut im genetischen *daf-2(m41)*, *daf-1(m40)* und *daf-21(p673)* Hintergrund durchgeführt. Der Tabelle 3 ist zu entnehmen, daß der Phänotyp Ppv in allen Fällen wieder abhängig vom Dauerlarvenstadium auftritt, die Penetranz ist aber gering. Außerdem tritt auch der gonadale Phänotyp, sowie die hellere Erscheinung der Nematoden im lichtmikroskopischen Bild wieder auf. Das phänotypische Spektrum dieser Experimente beschränkt sich auf die dargestellten Phänotypen und erscheint trotz geringer Penetranz genspezifisch zu sein.

Tabelle 3: Penetranz des Phänotyps Ppv (pseudo-ausgestülpte Vulva) nach Inaktivierung des Gens *pcp-3* durch RNAi

Dargestellt sind die RNAi Fütterungsexperimente gegen *pcp-3* mit drei verschiedenen RNAi Bakterienstämmen (Spalte 3): SFsijF23B2.11 bildet homologe dsRNA gemäß Abbildung 1A gegen die mRNA von *pcp-3* im codierenden Bereich für die zweite α/β Hydrolasefaltungseinheit des Gens, 5'_11_CDS_fed entsprechend der ersten α/β Hydrolasefaltungseinheit und SFsijF23B2.11_3UTR entsprechend der 3'UTR der mRNA von *pcp-3*. Die Spalten 1 und 2 bezeichnen die unterschiedlichen *C. elegans* Stämme, die für diese RNAi Experimente verwendet wurden und das Larvalstadium (mit Anzahl), das auf die RNAi Fütterungsplatten gesetzt wurde. Ausgewertet wurden stets die Nematoden einige Zeit nach Ausbildung des adulten Stadiums, falls L4 Larven eingesetzt wurden, wurden die adulten Nachkommen betrachtet. L1st und L3st bedeutet Arrest- bzw. Hungerzustand im entsprechenden Stadium. Ferner ist das Temperaturprofil der Kulturplatten dargestellt, bei der die Experimente durchgeführt wurden. Dabei bedeutet 25°C-15,5°C, daß die Nachkommen der eingesetzten Nematoden bei 25°C kultiviert wurden, bis sie den Dauerarrest vollendet haben, zum Verlassen des Arrestzustands wurde die Platte nach 15,5°C transferiert. Es wurde untersucht, ob sich eine pseudovulvale Ausstülpung bildet (Spalte Phänotyp). Die Werte der Penetranz in % sind eine geschätzte Hochrechnung der Tiere mit Ppv an, bezogen auf die Gesamtnematodendichte der Platte, meist um 100 Tiere. Penetranzdaten ohne Prozentangabe bedeutete absolute Anzahl an Nematoden. Die Daten belegen die Ausbildung eines vom Dauerarrest abhängigen Phänotyp, wobei die Wirkung der zuvor aktiven Signalwege unabhängig ist.

[verwendete *C. elegans* Stämme: N2: Wildtyp; EC315: *daf-2(m41)*; *myo-2::d1egfp*; DR1564: *daf-2(m41)*; DR40: *daf-1(m40)*, JT6130: *daf-21(p673)*]

Stamm	Stadium	Futter	Temperatur	Phänotyp	Penetranz
EC315	3 L4	SFsijF23B2.11	25°C - 15,5°C	Ppv der F1	> 90%
DR1564	3 L4	SFsijF23B2.11	25°C - 15,5°C	Ppv der F1	ca. 10%
DR40	3 L4	SFsijF23B2.11	25°C - 15,5°C	Ppv der F1	ca. 10%
JT6130	3 L4	SFsijF23B2.11	25°C - 15,5°C	Ppv der F1	ca. 15%
DR1564	3 L4	5'_11_CDS_fed	25°C - 15,5°C	Ppv der F1	ca. 2%
DR40	3 L4	5'_11_CDS_fed	25°C - 15,5°C	Ppv der F1	ca. 2%
JT6130	3 L4	5'_11_CDS_fed	25°C - 15,5°C	Ppv der F1	ca. 2%
DR1564	3 L4	SFsijF23B2.11_3UTR	25°C - 15,5°C	Ppv der F1	ca. 2%
DR40	3 L4	SFsijF23B2.11_3UTR	25°C - 15,5°C	Ppv der F1	ca. 2%
JT6130	3 L4	SFsijF23B2.11_3UTR	25°C - 15,5°C	Ppv der F1	ca. 2%
DR1564	20 Dauerlarven	SFsijF23B2.11	15,5°C	Ppv der F0	18
DR40	20 Dauerlarven	SFsijF23B2.11	15,5°C	Ppv der F0	18
N2	20 Dauerlarven	SFsijF23B2.11	15,5°C	Ppv der F0	19
N2	3 L4	SFsijF23B2.11	15,5°C	Keine Ppv	
N2	3 L4	SFsijF23B2.11	20°C	keine Ppv	
N2	3 L4	SFsijF23B2.11	25°C	keine Ppv	
EC315	3 L4	SFsijF23B2.11	15,5°C	keine Ppv	
EC315	3 L4	SFsijF23B2.11	20°C	keine Ppv	
N2	20 L1 oder L3	SFsijF23B2.11	15,5°C	keine Ppv	
N2	20 L1 oder L3	SFsijF23B2.11	20°C	keine Ppv	
N2	20 L1 oder L3	SFsijF23B2.11	25°C	keine Ppv	
N2	20 L1st oder L3st	SFsijF23B2.11	15,5°C	keine Ppv	
N2	20 L1st oder L3st	SFsijF23B2.11	20°C	keine Ppv	
N2	20 L1st oder L3st	SFsijF23B2.11	25°C	keine Ppv	
DR1564	20 L1st oder L3st	SFsijF23B2.11	20°C	keine Ppv	
DR40	20 L1st oder L3st	SFsijF23B2.11	20°C	keine Ppv	

Um die Dauerlarvenabhängigkeit des Phänotyps näher zu zeigen, wurden direkt Dauerlarven mit SFsjjF23B2.11 gefüttert, die davor auf Standard NGM/OP40 angezogen wurden. Verwendet wurden DR40 (*daf-1(m40)*) und DR1564 (*daf-2(m41)*) Nematoden, die bei 25°C den Dauerzustand vollendeten, sowie N2 Dauerlarven, die bei 15,5°C, 20°C und 25°C auf ausgehungerten Platten entstanden sind. Die Wildtyp Dauerlarven entwickeln sich bei jeder Temperatur nach Futterzugabe, somit auch bei SFsjjF23B2.11, weiter bis zum adulten Nematoden, DR40 und DR1564 müssen bei 15,5°C den Dauerarrest mit den dsRNA bildenden Bakterien verlassen. Ein im Vergleich zu den bisherigen Experimenten ungewöhnlich hoher Anteil der Adulten zeigten die pseudovulvale Ausstülpung. Dagegen bildeten L1 und L3 arretierte sowie reproduktiv wachsende Nematoden bei nachfolgender Fortentwicklung mit SFsjjF23B2.11 als Futter diesen Phänotyp nicht aus, jedoch trat teilweise der Mig Phänotyp auf. Alle diese Experimente sind in Tabelle 3 zusammengefaßt.

Basierend auf diesen Experimenten zeigt sich deutlich, daß *pcp-3* Inaktivierung zu einem von Dauerlarvenentwicklung abhängigen Phänotyp, pseudovulvale Ausstülpung, kurz mit Ppv bezeichnet, führt. Ferner zeigt sich, daß entwicklungsunabhängig eine Mißbildung der Gonadenstruktur auftritt. Dies äußert sich darin, daß bei Migration der distalen Tipzelle (DTC) der sich entwickelnden Gonade die normale Reflexion um 180° nicht stattfindet, sondern die Gonade bleibt linear. Es handelt sich um einen Migrationsphänotyp, der in *C. elegans* mit Mig bezeichnet wird. Dieser Mig Phänotyp besitzt Ähnlichkeit zu einigen mutierten Allelen in *daf-12* oder *daf-9* (Antebi *et al.*, 1998, Gerisch *et al.*, 2001, Jia *et al.*, 2002).

Vergleichend dazu wurde auch eine Inaktivierung des Gens *pcp-2* mittels RNAi durchgeführt. Dabei trat der Phänotyp Ppv auf, wenn die Tiere ein Dauerlarvenstadium durchlaufen hatten. Beobachtet wurde dies mit DR1564 und DR40 Nematoden, die mit SFsjjF23B2.12 gefüttert wurden (Abb. 3B). Dieser RNAi Fütterungsstamm bildet dsRNA homolog zu Exon 4 der genomischen *pcp-2* Sequenz, welche für eine verbindende Region der beiden α/β Hydrolasefaltungseinheiten kodiert. Die Penetranz fällt vergleichend zu SFsjjF23B2.11, der RNAi von *pcp-3*, deutlich geringer aus. Es war bei diesen Tieren auch wieder der Mig Phänotyp deutlich, also abnormale Gonadenmorphologie infolge Fehler der DTC Migration. Es wurden einzelne Gonadenarme beobachtet, die entweder keine oder zwei Umkehrungen durchführten (Abb.3A, Anhang 8.7). Dieser Phänotyp wurde jedoch unabhängig vom Durchlaufen eines Dauerlarvenstadiums ausgebildet und trat mit mehr als 50% Penetranz auch im Wildtypstamm N2 bei reproduktiver Entwicklung auf. Die Varianz bei diesen Mig Phänotypen auf SFsjjF23B2.12 war hoch, es sind auch Nematoden mit verkürzten Gonadenarmen oder verlängerten Gonadenarmen nach der Umkehrung aufgefallen. Trotz abnormaler Form können diese Gonaden funktional sein, in Abbildung 3A erkennt man auch

deutlich neben der zweimal gewundenen Gonade reife Oozyten. Bei sehr starkem Phänotyp jedoch ist die gesamte Gonadenstruktur degradiert, dann finden auch keine funktionalen Keimbahnproliferationen statt oder die Oogenese bis zur befruchteten Zygote ist unvollständig (Abb. 3B). Das Auftreten des beschriebenen schwächeren Phänotyps läßt vermuten, daß *pcp-2* am Zustandekommen der korrekten DTC Migration beteiligt ist. Der pleiotrope Effekt von *pcp-2* liegt möglicherweise auch an homologer Degradierung von *pcp-3* mRNA durch SFsjjF23B2.12 in den Experimenten, oder die beiden Gene haben gegenseitig redundante Effekte. Schließlich trat auch bei Fütterung mit SFsjjF23B2.11 Bakterien, welche dsRNA gegen *pcp-3* gerichtet bilden, ein Mig Phänotyp mit nicht reflektierter Gonade auf. Dieser Phänotyp kann auch nur einen Gonadenarm betreffen, unabhängig davon, ob RNAi von *pcp-2* oder *pcp-3* durchgeführt wird. Dabei handelt es sich häufig, aber nicht ausschließlich, um die posteriore Gonade (Abb. 2C).

Die Genspezifität der RNAi von *pcp-2* wurde ebenfalls durch Erstellung weiterer RNAi Bakterien getestet (Abb. 1A). Die Klone 5'_12_CDSfed und SFsjjF23B2.12_3UTR, die gegen den 5' kodierenden Bereich von *pcp-2* bzw. dessen 3'UTR gerichtet sind (Abb. 1A), zeigten auch den Mig Phänotyp auf N2 und DR1564 unabhängig der Dauerentwicklung. Im PDA Stadium jedoch tritt auch hier teilweise Ppv auf. Deshalb erscheint es möglich, daß *pcp-2* und *pcp-3* teilweise redundante Wirkung zeigen.

Zur weiteren Bestätigung der Phänotypen wurde *in vitro* dsRNA synthetisiert auf Basis von SFsjjF23B2.11 und SFsjjF23B2.12. Diese wurde in die Gonade von DR1564 Hermaphroditen injiziert, außerdem wurden L1 Larven in einer Lösung mit dieser dsRNA suspendiert. In der nachfolgenden Entwicklung auf Standard NGM/OP50 Kulturplatten konnte in einigen Fällen bei SFsjjF23B2.11 dsRNA nach Durchlaufen des Dauerlarvenstadiums der Phänotyp Ppv im PDA beobachtet werden. Dieses Ereignis tritt nicht signifikant ein, stützt aber die bisherigen Ergebnisse, zumal keine neuen Phänotypen auftraten. Schwache Mig Phänotypen waren etwas häufiger sichtbar mit SFsjjF23B2.12 dsRNA, daneben wurden wenige Nematoden mit Ppv Phänotyp beobachtet. Mikroinjektion oder sogenanntes „Soaking“ in dieser Form sind keine geeigneten Experimente, um späte Phänotypen zu zeigen. Verfütterung von dsRNA bildenden Bakterien weist den Vorteil auf, daß auch späte Larvalstadien kontinuierlich durch RNAi affiziert werden. Dadurch scheint man die Penetranz von RNAi von manchen spät wirkenden Gene steigern zu können.

Da die Gene *pcp-4* und C46C2.4 hohe Ähnlichkeit zu *pcp-2* und *pcp-3* besitzt, wurden DR1564 Nematoden mit den entsprechenden RNAi Fütterungsstämmen, Y116F11B.3fed und SFsjjC46C2.4fed, angezogen. Dabei ist die gebildete dsRNA gegen *pcp-4* dem Exon 4 dieses Gens homolog und entspricht, wie auch schon bei SFsjjF23B2.12 gegen *pcp-2*, der

verbindenden Region der beiden α/β Hydrolasefaltungseinheiten (Abb. 1A). Der Klon SFsjiC46C2.4fed bildet dsRNA gegen einen großen Bereich der 3' kodierenden Sequenz des C46C2.4 Gens. Darunter befindet sich ein großer Teil, der homolog ist zu der einzigen α/β Hydrolasefaltungseinheit. Nach RNAi von *pcp-4* und C46C2.4 wurden erkennbare Phänotypen in der F1 weder nach strikt reproduktiver Entwicklung noch nach Durchlaufen eines Dauerlarvenstadiums beobachtet. Somit besitzt *pcp-4* zwar starke Ähnlichkeit zu *pcp-2* und *pcp-3*, scheint aber andere Funktionen in *C. elegans* auszuüben. Zudem ist offensichtlich die Divergenz groß genug, so daß dsRNA gegen *pcp-4* nicht gleichzeitig *pcp-2* und *pcp-3* affiziert. Auch C46C2.4 ist in diesem Zusammenhang scheinbar ohne Bedeutung.

Damit sind die beobachteten Phänotypen Ppv und Mig einzig dem Genpaar *pcp-2* und *pcp-3* zuzuordnen und nicht der Genwirkung einer Kreuzreaktivität mit anderen verwandten Genen.

3.1.4 Inaktivierung von *pcp-2* und *pcp-3* durch RNAi hat zum Zeitpunkt des Dauerstadiums noch keinen erkennbaren Einfluß auf die Entwicklung von Vulva und Gonade

Da der Phänotyp Ppv, pseudovulvale Ausstülpung, von *pcp-3* nur nach Durchlaufen des Dauerstadiums ausgebildet wird, wurde untersucht, wie der Status der Vulvavorläuferzellen (VPC) zu diesem Zeitpunkt aussieht. Bei der Häutung zur L3 Larve sind 6 VPCs vorhanden, damit auch bei der Dauerlarve (Ambros und Horvitz, 1984). Diese beginnen, sich während L3 und PDL3 zu teilen. Sie differenzieren letztlich im Adulten zu einer funktionalen Vulva. Im Übergang von der L3 zur L4 Larve ändert sich auch die Migrationsrichtung der DTC zur Ausbildung der U-förmigen Gonade. Abbildung 4A zeigt eine *daf-2(m41)* Dauerlarve. Sie repräsentiert die normale Dauerform, die Gonade ist bereits ein Stück ausgewachsen, zudem sind noch 6 VPCs vorhanden. Von anterior nach posterior sind das die Zellen V3.p, V4.p, V5.p, V6.p, V7.p und V8.p. Durch Signalisierung der Vulvaankerzelle (AC), die zur somatischen Gonade gehört, determiniert sie die ventral davon liegende Zelle V6.p zu ihrem primären Vulvadifferenzierungsschicksal. Bei RNAi von *pcp-3* durch Fütterung der Bakterien SFsjiF23B2.11, deren gebildete dsRNA die *pcp-3* mRNA durch homologe Bindung im kodierenden Bereich der zweiten α/β Hydrolasefaltungseinheit degradiert (Abb.1A), sind ebenfalls diese 6 VPCs in der *daf-2(m41)* Dauerlarve ungeteilt und regulär vorhanden (Abb. 4B). Es ist davon auszugehen, daß diese dann auch in der Folge reguläre Teilungen durchführen, da zunächst im jungen adulten Stadium eine funktionale Vulva vorhanden ist. Bei RNAi von *pcp-2* durch Fütterung der Bakterien SFsjiF23B2.12, deren gebildete dsRNA die *pcp-2* mRNA durch homologe Bindung im kodierenden Bereich zwischen den beiden α/β

Hydrolasefaltungseinheiten degradiert (Abb.1A), befinden sich im Dauerstadium diese 6 VPCs ebenfalls ungeteilt. Das Ergebnis paßt zur Tatsache, daß es auch möglich ist, daß RNAi Wirkung erst nach dem Dauerarrest effektiv die Ausbildung des Phänotyps Ppv auslösen kann. Bei den Gonaden zum Zeitpunkt der Dauerlarve fällt nur am Rande auf, daß die posteriore Gonade vergleichsweise etwas stärker entwickelt war, als die anteriore Gonade. Leicht ungleichmäßige Ausdehnung der Gonade zu diesem Zeitpunkt gab es sowohl bei RNAi von *pcp-2* als auch gegen *pcp-3* (Abb. 4A-C). Dies darf nicht überbewertet werden, da die somatische Gonade anterior wie posterior ansonsten normal aussieht, auch hat bis zum Zeitpunkt des Dauerarrests die Proliferation der Keimbahnzellen bereits begonnen. Es ist aus diesen Feststellungen zu schließen, daß es sich bei den beobachteten Phänotypen Ppv und Mig um späte Vorgänge bezüglich der Entwicklung von *C. elegans* handelt.

3.1.5 Analyse der Expression von *pcp-2* und *pcp-3* mit *gfp*-Konstrukten

Die Proteine PCP-2 und PCP-3 sind lysosomal lokalisierte Carboxypeptidasen, es könnte sich hierbei um Prolylcarboxypeptidasen handeln. Der Consensus von je 11 möglichen Glykosylierungsstellen sowie die N-terminale Signalsequenz, aber auch die Sequenz mit den vielen Leucinresten am Carboxyterminus (Signal aber nicht sehr spezifisch) deuten auf eine subzelluläre Lokalisierung der reifen Proteine in die Lysosomen hin.

Es wird aber nun untersucht, in welchen Geweben in *C. elegans* das Protein exprimiert wird. Dadurch erhält man ein Indiz, zu welchem Zeitpunkt das Protein im Nematoden verfügbar ist und in welchen Geweben möglicherweise *pcp-2* und *pcp-3* aktiv sind, um die Entwicklung von reproduktiven Organen zu steuern.

Die Akkumulation der mRNA von *pcp-2* und *pcp-3* konnte schon früher gezeigt werden. Hybridisierung von stadienspezifisch gebildeter mRNA an Microarrays, an die ssDNA Fragmente aller vorhergesagten *C. elegans* Gene gebunden sind, zeigt, daß die mRNA von *pcp-2* bereits signifikant ab dem L1 Larvalstadium gebildet wird. Ab diesem Zeitpunkt ist das Transkript dieses Gens bis ins adulte Stadium verfügbar, die Menge nimmt erst dann stetig ab (Hill *et al.*, 2000). Dieser Expressionszeitrahmen konnte auch durch *in situ* Hybridisierung an ganzen Nematoden stadienspezifisch bestätigt werden (Anhang 8.8). Zudem ist die Verfügbarkeit des Transkripts auf den gesamten Darm beschränkt. Hingegen akkumuliert das Transkript von *pcp-3* bereits ab dem 2-Zell Stadium im Embryo in den posterioren Zellen, die sich später zum Darm entwickeln (Anhang 8.8). Ein intensives Signal im Darm konnte vor allem im L3 Stadium beobachtet werden (Tabara *et al.*, 1996, Kohara, 2001).

Mit Hilfe von *gfp*-Konstrukten wurde untersucht, zu welchen Entwicklungszeitpunkten das Protein in welchen Geweben vorhanden ist. Dem zugrunde lag die Promotoraktivität der Gene *pcp-2* und *pcp-3*. Viele Introns in *C. elegans* sind kleiner als 100 bp. Längere Introns nahe dem 5' Ende eines Gens sind aber Kandidaten für regulative Sequenzen, z.B. transkriptionelle Enhancer (Fire *et al.*, 1990; Okkema *et al.*, 1993). Daher wurden *gfp* exprimierende Reporter erstellt, mit der Eigenschaft, daß nach dem Promotor kodierende Sequenz bis nach dem ersten Intron I_A verwendet wurde. In dem folgenden Exon ist im Leserahmen eine Fusion mit *gfp* gebildet worden (Abb. 1A). Mit der Darstellung des hierdurch in *C. elegans* gebildeten fluoreszierenden GFP-Fusionsproteins zeigt sich eine zeitliche Eingrenzung, zu der das PCP-2 und PCP-3 Wildtypprotein verfügbar ist. Der tatsächliche Zeitpunkt der benötigten Proteinaktivität ist dadurch nicht gegeben. Zudem sei bedacht, daß Prolylcarboxypeptidasen in der Regel ein Propeptid abspalten, um Aktivität zu erreichen. GFP-Reporter können diese Aktivitätsänderung nicht erfassen.

Es wurden transgene GFP Reporter Stämme hergestellt, die GFP in Abhängigkeit vom *pcp-2* oder vom *pcp-3* Promotor exprimieren. Durch Injektion in die Gonaden von DR1564 Hermaphroditen entstanden die *pcp-2::gfp* Reporterstämme EC1067 und EC1068 mit einem *daf-2(m41)* mutiertem genetischen Hintergrund. Durch Injektion des Transgens *pcp-3::gfp* in den Wildstamm N2 entstand der Stamm EC1052. Als Coinjektionsmarker wurde stets das Plasmid pRF4 verwendet, welches die dominante Mutation *rol-6(su1006)* trägt. Das Transgen wird in Form eines extrachromosomalen Array weitervererbt in das Soma und Keimbahn und erfährt daher mosaikartige Verteilung im Körper und ungleichmäßige Verteilung auf die Nachkommen. Die Beurteilung eines Expressionsmuster aus diesen Gegebenheiten ist die Summierung aller beobachteten Entwicklungszeitpunkte und Gewebe, in denen *gfp* exprimiert wird, wobei die untersuchten Tiere stets den Rol Phänotyp aufwiesen.

Die beiden unabhängig hergestellten *pcp-2::gfp* Stämme EC1067 und EC1068 zeigten gleiche Expression. Die Expression beginnt ab L3 Stadium nur in drei posterioren Darmzellen, int8L, int8R und int9R, und bleibt auf konstantem Niveau auf diese Zellen beschränkt bis ins adulte Stadium. Bemerkenswert ist dabei, daß ebenfalls die Dauerlarve *pcp-2* exprimiert (Abb. 5). Expression von *pcp-2* ist daher anscheinend nicht dem allgemeinen Silencing vieler Gene während des Dauerlarvenstadiums unterworfen. Es kann sich aber auch um die Translation bereits vorher gebildeter *pcp-2* mRNA handeln, die bereits signifikant ab dem L1 Stadium vorhanden ist (Hill *et al.*, 2000). Nur drei posterior gelegene Darmzellen von insgesamt 20 Zellen exprimieren *pcp-2::gfp* (Abb. 5), obwohl das Transkript in allen Darmzellen vorliegt (Tabara *et al.*, 1996, Kohara, 2001). Falls PCP-2 an der Steuerung der Migration der DTC der Gonade beteiligt ist, wäre es denkbar, daß diese sehr spezifische *pcp-2* Expression ausschließlich zur Bildung von Faktoren beiträgt, die etwa zum

Zeitpunkt L3m zur Umkehrung der Gonadenwachstumsrichtung führt, damit die typische U-Form entstehen kann.

Das Gen *pcp-3* zeigt ein anderes Expressionsmuster (Abb. 6). Bereits im Embryo kurz vor der Gastrulation beginnt Expression und akkumuliert vorwiegend im Darm (Abb. 6A-C). Die Expression ist auch in den frühen Larvalstadien deutlich im Darm zu erkennen (Abb. 6 D,E) und bleibt dort dann auch bis zum Adulten bestehen. Das schließt den Entwicklungsweg über die Dauerlarve mit ein.

Erst in späten Stadien findet noch zusätzliche *pcp-3::gfp* Expression statt. In Abbildung 6I ist die Expression des *pcp-3::gfp* in einem schematisierten adulten Hermaphroditen des Wildtyps N2 zusammengefaßt. Direkt an der terminalen Endwölbung des Pharynx befindet sich eine H-förmige Zelle, die exkretorische Zelle, zu dessen Nukleus hin das Expressionsprotein auch stärker sublokalisiert (Abb. 6F). Bei starker Expression ist die GFP-Fluoreszenz auch lateral in Strängen vom Kopf bis zum Schwanz sichtbar, wie es dem Verlauf der exkretorischen Kanäle entspricht. Es kann aber nicht ausgeschlossen werden, daß diese Strukturen lateral verlaufende Nerven sind. Diese enden allerdings am zentralen Nervenring um den posterioren Pharynx. Zwei nicht identifizierte Zellen auf der dorsalen Seite, wo die posteriore und die anteriore Gonade ihre Umkehrung vollführt, zeigen Expression (Abb. 6H). Diese Expression fällt spät in der Entwicklung auf, frühestens im L4 Stadium. Außerdem fällt beim adulten Nematoden an den seitlichen Vulvawülsten Expression auf, deren Expression anscheinend für finale Vulvaentwicklung nötig ist (Abb. 6G).

Die Akkumulation des GFP erfolgt subzellulär häufig am Kern (Abb. 6D,F). Würde Exon 0 falsch vorhergesagt worden sein, bestünde das im Expressionsprodukt gebildete Protein aus Signalsequenz, möglicherweise einem Propeptid, bevor nach einer kurzen verbindenden Region die Aminosäuresequenz des GFP käme (Abb. 1A). Es wäre denkbar, daß dieser kurze N-terminale Anteil diese ungewöhnliche Akkumulation favorisiert.

Die Verteilung der Expression des PCP-3 Proteins legt nahe, daß es sowohl generelle degradative Aufgaben erfüllen, aber auch an einigen speziellen Funktionen mitwirken könnte. Dies korreliert dann auch mit dem zeitlichen Auftreten des Proteins. In Abb. 6I erkennt man, daß Expression vom *pcp-3* Promotor dort stattfindet, wo die Gonade ihre Reflexion ausführt. Dorsal, gegenüber der Vulva, konnte selten auch etwas GFP Fluoreszenz einzeln punktuert ermittelt werden, an einer Stelle, an der die DTC Migration beider Gonadenarme wieder endet und die finale Gonadendifferenzierung zu diesem Zeitpunkt abgeschlossen wird. Auch das späte Auftreten von PCP-3 nahe den Vulvazellen korreliert mit der späten RNAi Wirkung.

3.1.6 Auslöschen der GFP-Fluoreszenz in den Reporterstämmen durch RNAi

Eine deutliche Zuordnung der RNAi Wirkung zum affizierten Gen gelang mit Hilfe der GFP Expressionsklone. Durch die folgenden RNAi Experimente wurde gezeigt, daß die Translation des Zielproteins verhindert wurde, wodurch die Spezifität der Geninaktivierung und den früher beschriebenen Phänotypen gesichert werden.

In den GFP-Reporterstämmen EC1052, EC1067 und EC1068 (vgl. Kapitel 3.1.5) wurde die Inaktivierung des Transgens durch RNAi an Hand des Auslösens der GFP Fluoreszenz verfolgt. Verwendet wurden die RNAi Fütterungsbakterien 5'_11_CDS_fed und 5'_12_CDS_fed, die dsRNA homolog zu *pcp-3* und *pcp-2* bilden. Gleichzeitig affiziert diese dsRNA auch die mRNA, die durch die Reporterkonstrukte *pcp-3::gfp* (pEXPR11PRO1GFP) und *pcp-2::gfp* (pEXPR12PRO1EGFP) gebildet wird (vgl. Abb. 1A). Es wurden je drei adulte Hermaphroditen von EC1052, EC1067 und EC1068 mit dem Rol Phänotyp des Coinjektionsmarkers auf RNAi Platten von 5'_11_CDSfed und 5'_12_CDSfed gesetzt bzw. zur Kontrolle auf Standard OP50 enthaltende Platten mit begrenzter Ablegezeit. Da bei extrachromosomalen Arrays nicht jeder Nachkomme das Array weitervererbt bekommt, wurde der Anteil von Rol Tieren mit GFP Fluoreszenz auf den Kontrollplatten bestimmt und mit dem Prozentsatz GFP fluoreszierender Nematoden an Rol Tieren nach RNAi verglichen. Es traten vernachlässigbar wenig Nematoden mit GFP Fluoreszenz auf, die infolge ungleichmäßiger somatischer Verteilung des Array nicht den Rol Phänotyp zeigten. In Tabelle 4 ist das Ergebnis dieser Beobachtung zusammengefaßt.

Aus der Tabelle ist erkennbar, daß die RNAi von *pcp-2* und *pcp-3* die Expression von GFP in den Reportertieren sehr deutlich verringert hat. Infolge der hohen Ähnlichkeit zwischen *pcp-2* und *pcp-3* wirkte die RNAi kreuzreaktiv zwischen diesen beiden Genen. Aus den Ergebnissen kann man sehen, daß *pcp-3* Funktionsverlust allein die adulte Morphologie von Gonade und Vulva ändern kann, und daß bei Funktionsverlust von *pcp-2* die DTC Migration fehlerhaft ist. Die übergreifenden Phänotypen in einzelnen Tieren entstehen vermutlich infolge Kreuzreaktivität der beiden RNAi-Typen. Einige Tiere zeigen nach RNAi den Ppv Phänotyp (Tabelle 4). Eventuell verlief bei diesen Tieren die Entwicklung über einen sofort wieder verlassenen Dauerarrest. Dies wäre bei dem genetischen *daf-2(m41)* Hintergrund im Stamm EC1068 bei der verwendeten Temperatur von 20°C in geringem Umfang möglich.

Tabelle 4: Auslöschung der GFP Fluoreszenz in Reportertieren durch RNAi

Es wurde RNAi durchgeführt an den GFP Reporterstämmen EC1052 (Transgen *pcp-3::gfp*), sowie EC1067 und EC1068 (Transgen *pcp-2::gfp*). In der Tabelle ist lediglich zum Stamm die Beschreibung des Array wiedergegeben. Es wurden nur die Rol Tiere aus den Nachkommen von je drei Hermaphroditen je Stamm und Experiment hinsichtlich des Auftretens von GFP Fluoreszenz ausgewertet. Die Optik des Fluoreszenzbinokulars wirkt begrenzend für die Fluoreszenzerfassung. Bemerkung: beobachteter Phänotyp einiger Nachkommen. Pig: Auftreten von hellerer Pigmentierung verglichen zu den Kontrolltieren mit Rol Fluoreszenz. Mig: Auftreten eines fehlerhaften DTC Migrationsphänotyp, korreliert teilweise mit Pig. Ppv: pseudovulvale Ausstülpung unter Angabe der Anzahl der beobachteten Tiere mit diesem Phänotyp

STAMM	OP50			RNAi von <i>pcp-2</i>			
	GFP	Rol gesamt	Prozent	GFP	Rol gesamt	Prozent	Bemerkung
EC1052 [<i>pcp-3::gfp</i> ; <i>rol-6(su1006)</i>]	20	26	77%	11	84	23%	Pig, Mig
EC1067 [<i>pcp-2::gfp</i> ; <i>rol-6(su1006)</i>]	10	37	27%	0	112	0%	Pig, Mig
EC1068 [<i>pcp-2::gfp</i> ; <i>rol-6(su1006)</i>]	9	48	19%	0	28	0%	Pig, Mig, 5x Ppv

STAMM	OP50			RNAi von <i>pcp-3</i>			
	GFP	Rol gesamt	Prozent	GFP	Rol gesamt	Prozent	Bemerkung
EC1052 [<i>pcp-3::gfp</i> ; <i>rol-6(su1006)</i>]	20	26	77%	5	69	7%	Pig, evtl. Mig
EC1067 [<i>pcp-2::gfp</i> ; <i>rol-6(su1006)</i>]	10	37	27%	0	16	0%	Pig, Mig
EC1068 [<i>pcp-2::gfp</i> ; <i>rol-6(su1006)</i>]	9	48	19%	0	65	0%	Pig, Mig, 2x Ppv

3.1.7 Verminderung der Fettakkumulation in RNAi phänotypischen F23B2.11 Dauerlarven in einem *daf-2(m41)* genetischem Hintergrund

Die Bildung cytoplasmatischer Fetttropfen ist ein normaler zellulärer Prozeß. Diese Tropfen sind neutrale Lipide, gewöhnlich Triacylglyceride als Fettsäureenergieserven oder Cholesterylester als Speicher für den Überschußanteil von zellularem Cholesterol (Goldstein und Brown, 1977; Brown und Goldstein, 1983). Als einer der frühen Marker für Fetttropfen wurde Nile blue eingesetzt (Smith, 1907, 1910). Aus kommerziellen Präparationen dieses nicht fluoreszierenden Lipidmarkers konnte Nile Red isoliert werden (Conn, 1953). Dabei erweist sich Nile Red als starkes Fluorochrom, welches unter geeigneten spektralen Bedingungen sensitiv *in vivo* Fett markieren kann (Greenspan *et al.*, 1985). Spezifische Anregung zur Detektion von Fetttropfen erfolgt bei 450 bis 500 nm und absorbiert nach rot verschobene Fluoreszenz von mehr als 528 nm (Greenspan und Fowler, 1985). Nile Red ist gemäß Baker (1958) ein Lysochrom. Es zeigt stärkste Löslichkeit und Fluoreszenz in organischen Lösungsmitteln, in wässriger Umgebung ist die Fluoreszenz stark verringert. Bei RNAi von *pcp-3* erschienen N2 Nematoden bei Entwicklung ohne Dauerarrest heller im lichtmikroskopischen Blick aus, die Ursache könnte neben dem Mig Phänotyp eine verringerte Fettakkumulation sein. Dauerlarven lagern ebenfalls Fett ein als Energiereserve

während ihrer entwicklungsarretierten Zeitperiode. Exemplarisch wurde am Dauerstadium eine *in vivo* Lipidtropfenmarkierung durchgeführt. Dazu wuchsen DR1564 Würmer in Anwesenheit des Lysochroms Nile Red auf mit dem Futter OP50 oder den RNAi Bakterien SFsjjF23B2.11 (Abb. 1A). Abbildung 7 zeigt eine Kontroll-Dauerlarve mit OP50 (Abb. 7B) im Vergleich mit einer mit *pcp-3* RNAi behandelten Dauerlarve (Abb. 7C). Die hell glänzenden roten Lipidtropfen sind nach *pcp-3* mRNA-Inaktivierung deutlich verringert, Größe und Form der Tropfen ist jedoch unbeeinflusst. Zum Vergleich wurden gleich alte Dauerlarven verwendet. Diese Erkenntnis stellt *pcp-3* und eventuell auch *pcp-2* in Zusammenhang mit Lipidstoffwechsel, die beobachteten Phänotypen könnten molekular darin kausal bedingt sein.

3.1.8 RNAi von C53D6.4, dem homologen Angiotensinrezeptor II von *C. elegans*, führt zu arretierten Embryonen und pseudovulvalen Ausstülpungen

Natürliche Substrate für menschliche Prolylcarboxypeptidase sind die Peptide [des-Arg9]Bradykinin und Angiotensin II (Tan *et al.*, 1993). BLAST Suche des humanen Bradykinin Rezeptor führte in *C. elegans* zum C39E6.6 Protein mit höchster Ähnlichkeit. Das Gen dazu wurde mit *npr-1* benannt und enkodiert einen G-Protein gekoppelten Rezeptor mit Ähnlichkeit zu Neuropeptid Y Rezeptoren. Das Gen reguliert das Sozialernährungsverhalten von *C. elegans* (de Bono und Bargmann, 1998). Dieses Gen ist nach bisherigen Erkenntnissen nicht mit der Proteinwirkung von *pcp-2/pcp-3* vereinbar. Außerdem gibt es zwei ähnliche Proteine in *C. elegans* vorhergesagt als verwandt zum Angiotensin II Rezeptor, ZC374.1 und C53D6.4 (The *C. elegans* Sequencing Consortium, 1998). In *Homo sapiens* existieren zwei Rezeptoren für Angiotensin II, Typ I und Typ II (Takayanagi *et al.*, 1992; O'Dowd *et al.*, 1993). Das Softwarepaket PcGene ermittelt 24% Sequenzidentität zwischen diesen beiden Rezeptoren, 18% Ähnlichkeit besitzt *C. elegans* C53D6.4 zu dem Typ I Rezeptor, der im Menschen auch hauptsächlich aktiv ist. ZC374.1 besitzt zu diesem Rezeptor 7,7% Identität. Der Vergleich zum *H. sapiens* Typ II Rezeptor ist mit 8% bei C53D6.4 und 13% bei ZC374.1 vergleichbar geringer. Zum gegenwärtigen Zeitpunkt wurde daher mittels RNAi die Funktion von C53D6.4 bei *daf-2(m41)* Hintergrund ermittelt (Tabelle 5). Dazu wurde ein RNAi Fütterungsklon, C53D6.4fed, erstellt. Auf Kulturplatten, die diesen Bakterienklon enthalten, wurden L1 und L4 Larven gesetzt, die bei unterschiedlichen Temperaturen das adulte Stadium erreichten. Zudem wurde während der Entwicklung das Temperaturprofil verändert. Die Entwicklung der L1 zum Dauerstadium erhielt man bei 25°C,

bei 15,5°C entwickelten sich diese zum Adultus. Im umgekehrten Fall entwickelten sich die L1 bis zum L3 Stadium bei 15°C, die Entwicklung bis zum Adulten fand bei 25°C statt.

Es zeigte sich, daß bei RNAi von dem Angiotensin II Rezeptor bei Entwicklung über das reproduktive Stadium L3 ein Großteil der F1 Embryonen in der Entwicklung arretiert wurde. Es könnte sich hier um einen maternalen Effekt handeln, denn nach Dauerarrest sterben die F1 Embryonen nicht. Jedoch zeigt sich die hohe Letalität bei erhöhter Temperatur bei der RNAi, jedoch nicht im vergleichenden Kontrollexperiment. So ist es auch möglich, daß diese Letalitätsrate bei den Dauerlarven infolge der geringeren späteren Inkubationstemperatur nicht erzielt wurde. Insgesamt bleibt festzustellen, daß dieser Angiotensin II Rezeptor C53D6.4 an der Embryonalentwicklung beteiligt ist, eventuell auch maternal affiziert. Eine frühe Kausalität im dritten Larvalstadium scheint möglich, jedoch kann der Rezeptor an dieser Stelle in keinen direkten Zusammenhang mit der *pcp-2/pcp-3* Wirkung gebracht werden.

Bei der Entwicklung zum Adulten über Dauerarrest konnten im C53D6.4 RNAi Experiment einige F0 Tiere mit Ppv ermittelt werden (Tabelle 5). In drastischen Fällen riß die Epidermis an der Vulva direkt auf und der Darminhalt wurde entleert, auch ohne vorherige charakteristische Ausstülpung an der Vulva (Abbildung 8). Diese Tiere hatten bis zum Zeitpunkt der phänotypischen Ausprägung keine Embryonen auf der Platte abgelegt, obwohl die Vulvastruktur funktional erschien.

Obwohl die Penetranz an Ppv im Experiment gering war, läßt die Art des Phänotyps einen Zusammenhang mit der *pcp-3* Genwirkung vermuten. Es erscheint, daß der Darm einen erhöhten Druck auf die Epidermis ausübt, das final das Aufreißen an der Vulva verursacht. Dies wäre eine Alternative zur Annahme, es handelt sich um einen entwicklungsmorphologischen Vorgang der Vulvabildung.

Tabelle 5: RNAi-Inaktivierung des Angiotensin II Rezeptor Proteins C53D6.4 in *C. elegans*

Die in diesem Experiment eingesetzten L1 Larven wurden arretiert bei der entsprechenden Temperatur, zu der spätere Fortentwicklung erfolgte. Stets wurden die Vitalität der Embryonen dieser F0 Tiere ausgewertet. C53D6.4fed ist der RNAi Bakterienstamm, der dsRNA gegen C53D6.4 bildet, bei Kontrolle wurden Standard NGM/OP50 Kulturplatten verwendet. In der letzten Zeile ist das Kontrollexperiment ohne RNAi als Futter dargestellt. Zeile 4: bei 25°C *daf-c* Entwicklung nach Wechsel zu 15,5°C erfolgt der Austritt aus dem Dauerstadium; Zeile 5 und 6: 15,5°C bis zur L3, dann Wechsel zu 25°C. Dem Ergebnis nach zu urteilen, ist die Vorgeschichte der Eltern wichtig für das Überleben der Embryonen in der F1. Der Phänotyp scheint aber seine Ausprägung erst bei 25°C zu zeigen, wenn reproduktive Entwicklung erfolgt.

Larvalstadium der F0 zu Beginn der RNAi	Fütterungsstamm	Temperatur	Gelege (F1) auf RNAi Platte		
			vitale Larven	tote Embryonen	Prozent Letalität
20 L1 Larven	C53D6.4fed	16°C	341	4	1,2%
20 L1 Larven	C53D6.4fed	20°C	99	1	1,0%
20 L4 Larven	C53D6.4fed	25°C	250	5	2,0%
20 L1 Larven	C53D6.4fed	25°C, Daueraustritt bei 15,5°C	194	4	2,0%
20 L1 Larven	C53D6.4fed	15,5°C bis L3, dann 25°C	102	80	44,0%
20 L1 Larven	Kontrolle	15,5°C bis L3, dann 25°C	104	3	2,8%

3.1.9 Im genetischen *daf-9(e1406)* Hintergrund propagiert möglicherweise *pcp-3* Vulvabildung

Es wurden Allele zu zwei Genen beschrieben, die während der Dauermorphogenese die Entwicklung abbrechen, *daf-9(e1406)* X und *daf-15(m81)* IV (Albert und Riddle, 1988). Insbesondere *daf-9* konnte kloniert werden, zudem wurde ein größeres Spektrum an Mutanten in diesem Gen bekannt. Jedoch können etwa ein Drittel der *daf-9(e1406)* arretierten Dauerlarven die Entwicklung bis zum Adulten fortsetzen, erreichen aber nicht Fertilität. Insbesondere pseudovulvale Ausstülpungen und/oder Fehler in der DTC Migration (keine reflektierte Gonade) wurden in diesen Adulten beobachtet (Gerisch *et al.*, 2001; Jia *et al.*, 2002). Infolge dieser hohen phänotypischen Ähnlichkeit zu den Beobachtungen an *pcp-2/pcp-3* wurde getestet, ob *pcp-3* Einfluß auf *daf-9* arretierte Dauerlarven nimmt. Zudem sei betont, daß es bei den beschriebenen Phänotypen in adulten *daf-9* Würmern Dauerarrest oder dauerähnlichen Arrest in der Entwicklungsgeschichte gab.

Es wurde RNAi von *pcp-3* durchgeführt mit den Bakterien SFsjjF23B2.11 bei 20°C (Struktur in Abb. 1A). Das Allel *daf-9(e1406)* ist im Stamm DR733 vorhanden. Hier ist das *daf-9* Allel chromosomal mit *lon-2(e678)* gekoppelt. Wegen der Infertilität liegt *daf-9(e1406)* heterozygot im Genom vor. Die homozygoten Tiere sind am sekundären Lon Phänotyp, der Nematode ist gegenüber dem Wildtyp deutlich länger, erkennbar. Nach RNAi war kein augenscheinlicher Unterschied zwischen F1 Adulten *Daf-9* phänotypischen Nematoden zu einer Vergleichskontrolle erkennbar. Es wurden Dauerlarven mit Lon Phänotyp untersucht (Abb.

9). Im RNAi Experiment fiel eine deutlich fortgeschrittene Keimbahnproliferation auf. Dies entspricht aber auch bereits früheren Beobachtungen regulärer *daf-9* mutierter Entwicklung (Albert und Riddle, 1988). Zudem fiel eine der Vulva ähnliche Struktur subkutikular auf. Ich konnte diese Beobachtung in Kontrolltieren nicht erfassen, jedoch kann nicht ausgeschlossen werden, daß in *daf-9* mutierter Entwicklung im Arrestzustand in einem gewissen Ausmaß weiterhin eine Entwicklung reproduktiver Organe inklusive Vulvaentwicklung stattfindet. Es erscheint aber möglich, daß bei Funktionsverlust von *pcp-3* im Arrestzustand weiter reproduktive Entwicklung propagiert wird. Dies würde bedeuten, daß *pcp-3* Aktivität heterochrone Fortentwicklung unterbindet bei Einmünden in den Dauerarrest oder nach Einmünden in das adulte Stadium. Der Signalweg, in dem *pcp-3* agiert, beschränkt sich dabei auf reproduktive Organe.

3.1.10 *pcp-3* Modulation im *daf-15(m81)* Hintergrund betrifft reproduktive Organentwicklung

Das zweite Gen, für welches Allele bekannt sind, die während der Dauermorphogenese die Entwicklung abbrechen, ist *daf-15* (Albert und Riddle, 1988). Deshalb wurde die Inaktivierung von *pcp-3* durch RNAi auch im genetischen Hintergrund *daf-15(m81)* getestet, unter der bei RNAi von *pcp-3* im *daf-9(e1406)* Hintergrund diskutierten Möglichkeit, diese Prolylcarboxypeptidase könnte bei entwicklungsbiologischen Arrestzuständen reproduktive Funktionen hemmen. Mutanten der Gene *daf-9* und *daf-15* bilden unvollständige Dauerlarven aus, dabei stellt *daf-15* noch nicht einmal die Nahrungsaufnahme ein und bildet somit die unvollständigere Dauerlarve. Epistasisuntersuchungen zeigten zudem, daß *daf-9* und *daf-15* in unterschiedlichen Reaktionswegen aktiv sind (Albert und Riddle, 1988). Somit ist *daf-15* für den Test der Hypothese ausreichend. Anders wäre es denkbar, daß *pcp-3* auch im gleichen Entwicklungsgang mit *daf-9* den mutierten Phänotyp durch das Allel *e1406* synergistisch verstärken könnte. In RNAi Experimenten im genetischen *daf-15(m81)* Hintergrund des Stammes DR732 führte die Inaktivierung von *pcp-3* zu vergleichbaren Phänotypen. Im Stamm DR732 sind chromosomal *daf-15(m81)* und *unc-22(s7)* heterozygot gekoppelt. Das homologe Chromosom IV enthält den diese beiden Gene auch umfassenden genetischen Balancer *nT1*. Es handelt sich dabei um einen reziproken Stückaustausch zwischen Chromosom IV und V, jede Aneuploidie von *nT1* ist letal, bei Homozygotie entsteht der Phänotyp Vul, ein adulter Nematode besitzt keine Vulva, die Ursache ist unbekannt (Ferguson und Horvitz, 1985). Gemäß Standard wurde wieder der RNAi Bakterienstamm SFsjjF23B2.11 verwendet. Das Experiment kann bei 20°C durchgeführt werden, um mögliche unerwünschte Effekte durch hohe Temperaturen zu vermeiden. Qualitative

Untersuchung führte zu Daf-15 unvollständigen Dauerlarven, gekoppelt mit Unc-22 gemäß Eigenschaften von DR732, die eine Ausstülpung aufweisen an einer Stelle, an der normalerweise die VPCs zu finden sind. Zudem ist kaum gonadale Struktur zu erkennen. So findet man dorsal der Ausstülpung direkt die Darmzellen dieser Dauerform (Abb. 10A), als ob sich die gonadalen somatischen Ursprungszellen Z1 und Z4 noch nicht weiter geteilt hätten. Vergleicht man dies mit der regulären Daf-15 Dauerlarve, so besitzt diese zumindest die somatische Gonade ausgeprägt, eventuell mit etwas fortgeschrittener Teilung der Keimbahnzellen (Abb. 10C).

In Kapitel 3.1.1 wird der Versuch der Rettung der Mutante in *daf-15(m81)* beschrieben. Es entstanden dabei unter anderem die Stämme EC1049 und EC1050, die im genetischen Hintergrund des Stammes DR732 das Wildtyp *pcp-3* Gen in einem extrachromosomalen Array enthalten. Zudem existieren drei weitere Stämme EC1038, EC1039 und EC1040 auf Basis von DR732, die das Cosmid F23B2 in einem Array besitzen. Bei Betrachtung von Kulturplatten von EC1049 und EC1050 fallen stets vereinzelt einige *daf-15(m81)* homozygote Nematoden auf, die das extrachromosomale Array mit dem Wildtyp *pcp-3* Gen enthalten und eine Ausstülpung, welche einer sich entwickelnden Vulva ähnlich sieht (Abb. 10B), aufweist. Nun sieht diese Struktur im Vergleich mit der bei RNAi von *pcp-3* gebildeten Struktur in *daf-9(e1406)* anders aus, aber in beiden Fällen erscheint ein Ansatz zur Bildung von Vulvawülsten erkennbar. Ferner erkennt man deutlich fortgeschrittene Keimbahnproliferation in einigen Fällen. Dies geschieht unkoordiniert, oder mündet wie im gezeigten Beispiel in totaler Degradation. In den Stämmen mit dem Cosmid F23B2 als Array, welches auch das Gen *pcp-3* beinhaltet, konnte dieser Phänotyp nicht beobachtet werden. Das läßt vermuten, daß in EC1049 und EC1050 eine deutlich stärkere Überexpression von *pcp-3* vorliegt als in EC1038, EC1039 und EC1040, was sich auch phänotypisch verändert auswirken kann.

Es erscheint nun auf der einen Seite möglich, daß *daf-15* Aktivität der *pcp-3* Aktivität antagonistisch gegenüber steht. Ferner würden sich dann *daf-9* und *pcp-3* synergistisch ergänzen. Aufgrund unterschiedlicher Expressionsgewebe muß jedoch eine Aktivität in einem gemeinsamen Signalweg ausgeschlossen werden. Der nukleare Hormonrezeptor DAF-12 ist in L3 und L4 Stadien in der DTC vorhanden (Antebi *et al.*, 2000), das könnte bedeuten, daß er dort die Expression eines Rezeptors kontrolliert, beispielsweise C53D6.4. Konzentrierte Umsetzung eines Substrats durch PCP-3 an den beiden Stellen, an denen die Gonadenausdehnung umdreht, würde durch Rezeptor vermittelte Signalisierung die DTC Migration zielgerichtet beeinflussen.

Es erscheint auf der anderen Seite möglich, daß *pcp-3* Modulation hypomorph agiert, d.h. im Organismus muß die Menge an PCP-3 Protein reguliert werden, ansonsten kommt es unabhängig der Variation zu gleichgerichteten Effekten. Wenn *pcp-3* Aktivität DTC Migration lenkt, auch entlang der anterior-posterior Achse infolge Darmexpression, würde das Fehlen von *pcp-3* zu abnormaler Gonadenstruktur führen, wie beobachtet. Ebenso würde im umgekehrten Fall der Überexpression eine Überreizung auf die DTC stattfinden, wodurch die einzelnen singulären Expressionsorte von *pcp-3* in ihrer Konzentrierung an Einfluß verlieren würden und demzufolge ebenfalls die DTC Migration beeinträchtigt wäre.

3.2 GON-12 REGULIERT FRÜH VULVABILDUNG UND SPÄT GONADENMORPHOLOGIE

Die Gene der beiden Prolylcarboxypeptidasen *pcp-2* und *pcp-3* kartieren innerhalb der chromosomalen Deletion *eDf18*. Diese besitzt eine Größe von etwa 0,6 centiMorgan und umfaßt 47 Cosmide, sie ist somit vergleichsweise klein. Innerhalb dieser Deletion wurde ein weiteres Gen, *gon-12*, identifiziert, bei dem Versuch Deletionen in *pcp-2* und *pcp-3* zu erzeugen. Wegen der Strategie, welche die *eDf18* Deletion ausnutzte, soll eine Übersicht der in diesem Zusammenhang aufgetretenen relevanten Phänotypen gegeben werden, um auch mögliche Konsequenzen auf *pcp-2* und *pcp-3* Mutationen abschätzen zu können. Des weiteren wird gezeigt, daß der neu identifizierte Locus nicht allelisch zu dem *pcp-2* oder *pcp-3* Gen ist. Das Gen reguliert zeitlich die frühe Vulvaentwicklung und beeinflusst in der späten Larvalentwicklung die Gonadogenese. Eine Testkreuzungen zum Überprüfen von Komplementation zu einer bereits bekannten Mutationen in diesem Bereich mit ähnlichem Phänotyp wurde durchgeführt.

3.2.1 Mutagenese mit DEB bzw. TMP und anschließender F1 Präkomplementationscreen führte zu einer neuen Mutante, beteiligt an Morphologie von Vulva und Gonade

Wegen der interessanten Phänotypen bei RNAi-Inaktivierung von *pcp-2* und *pcp-3* wurde versucht, Mutanten gegen diese Gene zu erzeugen. Es wurden Mutagene ausgewählt, die in der Lage sind, kleine Deletionen zu verursachen, die mittels PCR detektierbar sind. Zudem können die benutzten Mutagene DEB und TMP in *C. elegans* auch Punktmutationen verursachen (Barstead und Waterston, 1989, 1991). Um die Dauerabhängigkeit der Vulvaphänotypen des Genpaares *pcp-2/pcp-3* zu analysieren, wurde ein Stamm erzeugt, der eine diese Gene beinhaltende Deletion, *eDf18*, trägt und gleichzeitig temperatursensitiv Dauerlarven bildet, EC613 (*daf-2(m41)* III ; *eDf18 / dpy-20(e1282) unc-24(e138)* IV). Die Strategie bestand in der Mutagenisierung von Männchen des ebenso erstellten Stammes EC612 (*daf-2(m41)* III ; *him-8(e1489)* IV). Diese wurden nun mit EC613 gekreuzt. Phänotypen, die in der F1 auftreten entstehen durch Mutationen in Genen, die innerhalb der Deletion *eDf18* kartieren, genetisch komplementär zu *dpy-20* oder *unc-24* sind, oder die seltene dominante *C. elegans* Allele darstellen.

Unter Verwendung von beiden mutagenen Agenzien wurden insgesamt 340 Kreuzungsplatten erstellt und die adulte Nachfolgegengeneration ausgewertet, wobei die F1 Generation Entwicklung über den Dauerarrest vollzog. Insgesamt wurden 77 Tiere gepickt, die in den meisten Fällen durch eine ausgestülpte Vulva auffielen. In einigen Fällen waren auch gonadale Mißbildungen erkennbar, etwa in 25 Fällen. Natürlich gab es auch Kombinationen dieser Phänotypen. 19 der 77 Nematoden bildeten keine Nachkommen aus. Nach mikroskopischer Analyse dieser Tiere waren die Gonaden so stark degradiert, daß diese keine Funktionalität erreichten. Ob es sich um Mig Phänotypen handelte, ist nicht nachvollziehbar. In den meisten Fällen war zudem die Vulva ausgestülpt.

Die 58 restlichen Nematoden bildeten Nachkommen aus. PCR Analyse der direkten Nachkommen konnte keine Deletion in *pcp-2* oder *pcp-3* nachweisen.

Nur die Nachfolgegengenerationen eines Nematoden aus DEB Mutagenese waren in der Lage den Phänotyp zu reproduzieren, den dieser aufwies, als er bei dem 'Screen' entdeckt wurde. Dieser Stamm wurde mit EC1053 bezeichnet. Er zeichnet sich insgesamt sowohl durch veränderte Gonadenmorphologie, als auch durch pseudovulvale Ausstülpungen aus.

In EC1053 wurden Cosmide injiziert, die eine erwartete *pcp-2* oder *pcp-3* Mutation retten sollten zur Charakterisierung und Identifikation der Mutante. Es entstanden die Stämme EC1057-EC1061, die allesamt nicht den mutanten Phänotyp retten konnten. Ebenso fünf weitere Stämme EC1062-EC1066, die aus spezieller Injektion des *pcp-2* Wildtypgens entstanden, vermochten die Mutation in EC1053 nicht zu retten. Zudem wurde DNA dieses

Stammes präpariert. In mehreren PCR Reaktionen wurde davon das *pcp-2* und *pcp-3* Gen amplifiziert und nachfolgend sequenziert. Die vergleichende Sequenzanalyse ergab in EC1053 für *pcp-2* und *pcp-3* Wildtypsequenz. Demzufolge besitzt EC1053 eine Mutation, die innerhalb der Deletion *eDf18* kartiert, aber nicht in den beiden Carboxypeptidasegenen *pcp-2* und *pcp-3* liegt. Folgerichtig bekam diese Mutation eine eigene Genbezeichnung, *gon-12*, das zugehörige mutierte Allel heißt *ee1007*. Die Mutante wurde gegenwärtig zweimal ausgekreuzt, um sekundäre genomische Mutationen zu entfernen, die aus der Mutagenese stammen. Es resultieren vier Stämme, EC1069-EC1072, die *gon-12(ee1008)* enthalten.

3.2.2 Der adulte Phänotyp des *gon-12(ee1007)* IV Allels zeigt gonadale Mißbildungen und entwicklungsabhängig Ppv

Bei oberflächlicher Betrachtung der Nematoden des Stammes EC1053, fällt zunächst auf, daß die Nematoden wenig Motilität aufweisen, zudem liegen sie häufig regungslos im Agar und sehen wie ein griechisches Omega aus. Stattfindende Bewegung erfolgt meist unter dieser eingeschränkten Gesamtstruktur. Der Phänotyp dieser Mutante erinnert an den von *unc-24(e138)*. Beim Auskreuzen von EC1053 war es außerdem möglich, diese Unc Mutation zu isolieren. Sie bekam die Allelbezeichnung *ee1008*. Ein Komplementationstest gegen *unc-24(e138)* bestätigte eindeutig die Zugehörigkeit von *ee1008* zu *unc-24*. So entstand der Stamm EC1073: *unc-24(ee1008)* IV. Zwei unwahrscheinliche Rekombinationsereignisse im Bereich von 1,12 centiMorgan könnten vorgelegen haben. Dann wäre *ee1008* keine neue Mutation, sondern es würde sich um *e138* handeln. Denkbar ist dies schon, denn EC1053 enthält auch nicht die *him-8* Mutation, die eigentlich mit *gon-12* gekoppelt sein sollte.

Chromosomale Kartierung von *gon-12* im Stamm EC1053 innerhalb der Deletion *eDf18* wurde durch Komplementationskreuzung zweimal wiederholt bestätigt, einmal gegen EC613 und einmal gegen CB3823. Obwohl *unc-24* außerhalb der Deletion kartiert, wurde dennoch ein Unc Phänotyp in *eDf18/gon-12(ee1007) unc-24(ee1008)* festgestellt. Heterozygote *gon-12(ee1007) unc-24(ee1008)* Nematoden zeigen wt Verhalten und Morphologie.

Der ausgekreuzte Stamm EC1069 mit *gon-12(ee1007)* ist frei von *daf-2(m41)* III. Das Allel *ee1007* zeigt seine Effekte temperatursensitiv. Demzufolge ist durch die DEB Mutation hier eher eine Punktmutation entstanden. Bei 25°C tritt starke Gonadendegradation ein, zudem erfolgt Vakuolisierung (Abb. 11A). Dies geschieht zu geringem Anteil auch bei 20°C, selten bei 16°C. In diesem Fall ist die anteriore Gonade nicht reflektiert (siehe auch Anhang 8.7) und besteht nur aus Keimzellen, die einige Proliferationen auch durchgeführt hatten. Stärkere Degradationen sind möglich. Diese Art Phänotyp erzielt man auch dann, wenn man erst die L3 Larve oder eine frühe L4 Larve zur restriktiven Temperatur überführt. Im

umgekehrten Fall kommt es zur Ausbildung einer nahezu vergleichbaren Wildtypgonade, wenn der Wurm bis zu diesen Larvenstadien bei 25°C gehalten wird und dann zur permissiven Temperatur gestellt wird. Wie an Abbildung 11A zu erkennen ist, besitzt dieser Wurm normale Vulvamorphologie. Bei Durchführung der Temperaturänderung von der hohen zur niedrigen Temperatur entsteht eine pseudovulvale Ausstülpung, vergleichbar Ppv nach RNAi von *pcp-3*. Es sei aber erwähnt, daß Ppv bei dieser Untersuchung nicht die gesamte Population betrifft, sondern sich auf vereinzelte Exemplare beschränkt. Die Ausbeute ist aber zu steigern, wenn die Gesamtentwicklung vom Embryo bis zum Adulten bei 25°C verläuft. Das Maximum lag bei etwa 50%, meist liegt es jedoch um 10%. Aus diesen Ergebnissen erkennt man, daß *gon-12* an gonadalen und vulvalen Entscheidungen teilnimmt, die zeitlich getrennt sind. Zudem könnte man eine räumliche Aktivitätszugehörigkeit erwarten. Bei Entwicklung über 25°C *daf-c* Dauerarrest durch *daf-2(m41)*, Stämme EC1071 und EC1072, findet man nur selten Nematoden mit Ppv. Da hier der Daueraustritt bei 16°C stattfindet ist nachfolgende Gonadenentwicklung ohnehin nicht betroffen, die Gonaden sind normal gestaltet. Im Gegensatz zu *pcp-3* scheint *gon-12* jedoch früh aktiv zu sein bei der Vulvaentwicklung, außerdem tritt eine äußerlich gleich aussehende Ppv des Adulten hier präferentiell nach reproduktiver Gesamtentwicklung ein. Frühe Fehler in der Vulvaentwicklung scheinen in PDL3 und PDL4 korrigiert zu werden, so daß PDA eine normal gestaltete Vulva erhält.

Ferner wurden Gon-12 Männchen betrachtet (EC1070, EC1071). Die gonadale Struktur des Männchen besteht zwar nur aus einem Gonadenarm, dieser durchläuft aber auch eine Reflexion. In phänotypischen Gon-12 Männchen ist diese Struktur auch affektiert (Abb. 11B, C). Auch hier bilden sich Vakuolen aus, der Grad der Gonadendegradation fällt unterschiedlich aus. Vergleichbar den VPCs des Hermaphroditen sind Zellen, welche die Kopulationsbursa des Männchens bilden. In allen untersuchten Männchen ist dieses Organ aber regulär ausgebildet.

3.2.3 *gon-12(ee1007)* zeigt verfrühte larvale Teilungen der Vulvavorläuferzellen

Da *gon-12* früh in der Larvalentwicklung Aktivität zeigt, die je nach Entwicklungsgang im Adulten zu Ppv führt, wurden die VPCs im L3 bzw. Dauerstadium betrachtet (Abb. 12). Wie bereits oben ausgeführt, besitzen Wildtypdauerlarven 6 ungeteilte VPCs im Dauerstadium (Abb. 4A). Der Dauerarrest erfolgt an der L2m. Im reproduktiven Stadium sind an diesem Entwicklungszeitpunkt auch 6 VPCs zu erkennen, die aber in der Folge mit den Teilungen beginnen. Abbildung 12B zeigt eine bereits bei 25°C entstandene L2 Larve von EC1069. Dieser Stamm enthält keinen *daf-c* Hintergrund, deshalb handelt es sich hier auch nicht um

eine L2d. Bereits in diesem frühen Stadium hat sich V6.p verfrüht begonnen zu teilen. Die VPCs werden in der L1 erkennbar, bleiben aber bis ins frühe L3 Stadium ungeteilt. In diesem Fall scheint heterochrone Aktivität, beschleunigt durch die Mutation in *gon-12*, frühzeitig Proliferation determinierter VPCs zu aktivieren. Ganz im Gegensatz dazu ist die Gonadenentwicklung verzögert. Dies ist erkennbar, wenn die Lage der VPCs in Bezug zur Gesamtgröße der Gonadenausdehnung gesetzt wird. In Abbildung 12A, in der bereits eine Dauerlarve dargestellt ist, kann ein Vergleich mit Abbildung 4A erfolgen. Die Ausbildung der Gonade in der *gon-12(ee1007)* Mutante bei restriktiver Temperatur ist zu diesem Zeitpunkt bereits stark verzögert. Die Gonadenausdehnung einer L3 ist nicht stärker als in der präsentierten Dauerlarve. Die großen erkennbaren runden Zellen sind allesamt Zellen der somatischen Gonade, abstammend von den embryonal angelegten Zellen Z1 und Z4. Keimbahnproliferation ist verzögert. Natürlich besitzt auch die Dauerlarve bei der permissiven Temperatur bereits ein fortgeschrittenes Teilungsmuster der VPCs, die Ausprägung ist individuell abweichend (Abb. 12A). Diese Tätigkeiten sind typisch für heterochrone Aktivität. In diesem Fall erweckt es den Anschein, daß S2 Programm in der L2 nicht ausgeführt wird und statt dessen S3 Aktivität stattfindet. Bezüglich der VPCs wird mit Teilungsaktivität begonnen. Demzufolge fehlen der Gonadenentwicklung die Entscheidungen aus S2 Programmen. Sie kann ihr S3 Programm nicht ausführen, da die in S2 normal geschaffenen Grundlagen nicht vorhanden sind. Deshalb kommt es nicht zu Weiterentwicklung der Gonade. Diese Entwicklung kann aber noch revidiert werden. Wenn eine derartige L3 Larve zurück zur permissiven Temperatur kommt, kann sie offenbar diesen Verlust teilweise korrigieren. Wird *gon-12* Aktivität in späten Larvalstadien unterbunden, ist der Schaden nicht revidierbar. Die Dauerlarve weist besondere Entwicklungskompetenz auf, sie kann bei Austritt VPCs neu determinieren unter den bereits durch fortgeschrittene Aktivität höheren Anzahl von VPCs. Dadurch entsteht eine normale funktionale Vulva. Im reproduktiven L3 Stadium bleibt dieser Frühschaden bestehen und bildet Ppv im Adulten aus (Euling und Ambros, 1996b). Insbesondere fällt bei der frühen Wirkung von *gon-12* auf, daß es sich nicht direkt an morphologischen Prozessen beteiligt, denn die ausgeführten Prozesse folgen der vorhergesehenen Zelllinie, sowohl bei Vulva, als auch bei Gonadenentwicklung. Es ist lediglich der Zeitablauf beeinflusst.

3.2.4 Die Komplementation von *gon-12* mit *unc-129*.

Die chromosomale Deletion *eDf18* wurde nach darin kartierenden bekannten Genen und Mutationen durchsucht, die mit *gon-12(ee1007)* einen vergleichbaren Phänotyp aufweisen. Von den bereits charakterisierten Genen, kartiert *unc-129* in diesem Bereich, welches für ein TGF β Homolog in *C. elegans* kodiert, das für Migration der neuronalen Axone zuständig ist. In Zusammenhang mit *unc-130* reguliert es auch DTC Migration (Nash *et al.*, 2000). Das mutante Allel *unc-129(ev554)* wurde verwendet, um genetische Komplementation zwischen *unc-129* und *gon-12* zu testen. Wegen der gekoppelten *unc-24(ee1008)* Mutation wurde zunächst EC1069 mit *him-5(e1490)* Männchen gekreuzt. Männliche Nachkommen dieser Kreuzung konnten mit *unc-129(ev554)* Hermaphroditen erfolgreich weiterkreuzen. Ein großer Anteil dieser Nachkommen zeichnete sich durch übermäßig große Einschlüsse auf (Abb. 13). Das führt soweit, daß auch gonadale Strukturen beeinflusst sein können. Die meisten beobachteten Männchen mit *unc-129(ev554) / gon-12(ee1007) unc-24(ee1008)* hatten sehr stark zergliederte gonadale Struktur, daß mögliche Funktionalität ausgeschlossen erscheint (Abb. 13B). Die Gonaden der Hermaphroditen hingegen waren aktiv, jedoch war Wildtypausdehnung meist nicht gegeben. Nach Reflexion gab es sehr variable Ausdehnungen, von abgebrochener Weiterentwicklung bis zu übermäßiger Ausdehnung (Abb. 13A). Isoliert heterozygote Mutanten in *unc-129* oder *gon-12* zeigten Wildphänotyp. Daher könnte es sich bei *gon-12* und *unc-129* um den gleichen Genlocus handeln.

4 DISKUSSION

Von allen auf der Erde lebenden Tieren sind 80% Nematoden (Platt 1994). Die meisten Arten sind zwar freilebende Mikroorganismen, wie *Caenorhabditis elegans*, viele jedoch besitzen eine parasitische Lebensweise. Pflanzenparasitische Nematoden, vor allem *Meloidogyne* spp., reduzieren den Weltertrag an Nahrung und Saatgut um 12,3% (Sasser und Freckmann, 1987). 120 Millionen Menschen leiden in den Tropen unter lymphatischer Filariasis und Elephantiasis, welche Glieder und Genitalien betreffen. Der Grund liegt an den im Blut lebenden Nematoden *Brugia malayi* und *Wuchereria bancrofti* (Ottesen und Ramachandran, 1995). Viele parasitische Nematoden besitzen einen Lebenszyklus vergleichbar zu *C. elegans*. Dabei hat insbesondere auch die Dauerlarvenform Bedeutung, denn Organismen wie *Heterorhabditis bacteriophora* oder *Haemonchus contortus* wechseln während ihres Lebenszyklus von der freilebenden in eine parasitische Form. Am Übergang sind sie im infektiösen L3 Stadium arretiert. Dort können sie sich auf ihrem Schwanz aufstellen und mit dem Kopf nicken, um nach ihrem Wirt zu suchen (Zioni[Cohen-Nissan] et al., 1992, Smyth, 1994). Dies ist ein Verhalten, zu dem auch *C. elegans* Dauerlarven fähig sind (Croll und Matthews, 1977). *H. bacteriophora* bildet eine Mikroumwelt, indem er symbiotische Bakterien im Körper seines Wirts, einem Insekt, kultiviert (Gaugler und Kaya, 1990; Neelson, 1991). Daran stirbt der Wirt. Solange aber der Nahrungsvorrat ausreichend ist, erfolgt direkte reproduktive Entwicklung zu adulten Hermaphroditen oder Männchen. Im Mangelzustand jedoch wird die Entwicklung über das infektiöse L3 Stadium eingeleitet (Zioni[Cohen-Nissan] et al., 1992). Die Gesamtentwicklung dieses Nematoden ist homolog zu *C. elegans*. Ein weit verbreiteter Zwergnematode, der im Menschen parasitiert, ist *Strongyloides stercoralis*. Dieser besitzt ebenfalls einen freilebenden und einen parasitischen Lebenszyklus, der Übergang erfolgt auch hier über ein der Dauerlarve von *C. elegans* homologes infektiöses L3 Stadium (Review in Scowden et al., 1978). Die meisten Pflanzen und Tiere besitzen zumindest einen bezüglich ihren Lebensgewohnheiten angepassten parasitischen Nematoden. Der Grund liegt in der Fähigkeit zur Ausbildung einer schützenden Kutikula, zu biochemischer Adaptation und zur Ausprägung fakultativer Diapause (Blaxter und Bird, 1997), z.B. arretiert *H. contortus* seine Entwicklung zusätzlich im vierten Larvalstadium im Winter im Wirt (Armour und Duncan, 1987). Damit dient *C. elegans* als Modell zum Verständnis des Wirkens parasitischer Nematoden. Dies betrifft besonders Vorgänge, die mit der Entscheidung reproduktives Wachstum oder Bildung einer Dauerlarve zusammenhängen. Zudem wird erkennbar, daß Dauerformen in der Entwicklung von Nematoden fakultativ vorgesehen sind und einen festen Bestandteil im Lebenszyklus bilden. Der Arrestzustand wird dabei in einigen Fällen konstitutiv gebildet. Somit bedarf es der

Regulierung direkten Wachstums ohne Arrest, also auch der Morphogenese reproduktiver Organe. Dies ist auch ein Grund, weshalb in *C. elegans* meist Gene gefunden werden, die im Entscheidungsprozeß zweier differentieller Entwicklungswege wirken, welche die Entwicklung reproduktiver Organe beeinflussen. Dies betrifft die regulativen dauerspezifischen Signalkaskaden in der frühen Larvalentwicklung, aber auch heterochrone Gene, die bei der Häutung zum dritten Larvalstadium unterschiedliche stadienspezifische Programme, reproduktives L3 Stadium und fortgesetzte Entwicklung zum fertilen Adultus oder Dauerlarvenbildung, aktivieren oder reprimieren.

Caenorhabditis elegans besitzt in seiner postembryonalen Entwicklung zwei differentiell verschiedene Entwicklungswege. Zum einen besteht unter günstigen Ernährungsbedingungen die Möglichkeit sich rasch über 4 Häutungen zu einem sich reproduzierenden adulten Wurm zu entwickeln (Brenner, 1974; Byerly *et al.*, 1976a). Unter optimalen Bedingungen kann Wildtyp *C. elegans* etwa 46 Stunden nach Schlupf aus der Eihülle selbst Nachkommen produzieren (Hirsh *et al.*, 1976). Unter widrigen Bedingungen ist die Gesamtentwicklung deutlich verlangsamt. So kann es bereits im L1 Stadium zu einem Entwicklungsarrest kommen und das L2 Stadium mündet deutlich verzögert in das dritte Larvalstadium (Arasu *et al.*, 1991), in dem bei fortwährenden ungünstigen Bedingungen schließlich auch die Dauerlarve gebildet wird (Golden und Riddle, 1984a), die speziell angepaßt ist an längere Zeit von Nahrungsmangel und anderen Stressfaktoren (Cassada und Russell, 1975). Die Entscheidung zur Bildung der Dauerlarve enthält die Einleitung eines spezifischen morphogenetischen Programms. Die Entscheidung für reproduktive Entwicklung wird schließlich mit dem Austritt aus dem Dauerstadium getroffen, der dann auch wieder rasch verläuft. Ebenso gibt es entsprechende Entscheidungen am Ende jedes früheren Larvalstadiums. Diese bedeuten entweder Verharren und damit fortgesetzte Aktivität des momentanen stadienspezifischen genetischen Programms, oder Wechsel in das nächste Larvalstadium mit dessen molekularen Eigenschaften (Antebi *et al.*, 1998).

In dieser Arbeit wurden drei neue morphogenetische Gene von *C. elegans* identifiziert und funktional analysiert. Die lysosomalen Carboxypeptidasen *pcp-2* und *pcp-3* sind unter anderem im dritten Larvalstadium aktiv oder werden in Ihrer Aktivität durch Entscheidungen während dieses Stadiums beeinflußt. Dies betrifft Ihr Wirken bei der Migration der distalen Endzelle der Gonade. Zudem zeigt sich, daß durch unterschiedliches Entwicklungsschicksal diese Carboxypeptidasen unterschiedlich aktiv sind, da nur nach dem Dauerlarvenarrest durch Inaktivierung von *pcp-2* und/oder *pcp-3* die zunächst funktionale Vulva durch sekundäre Ausstülpung zerstört wird. Auch *gon-12* Aktivität beeinflußt die Funktion von reproduktiven Organen im Adultus, wobei auch hier die Begründung vorwiegend im dritten Larvalstadium liegt. Die Mechanismen der Regulierung zu richtiger Organentwicklung unterscheiden sich aber teilweise.

4.1 DIE UNGEWÖHNLICHEN LYSOSOMALEN CARBOXYPEPTIDASEN, PCP-2 UND PCP-3, REGULIEREN DIE MIGRATION DER DISTALEN TIP ZELLEN AN DER GONADE

Eine Carboxypeptidase spaltet C-terminal einzelne Aminosäuren von Peptiden oder Proteinen ab. Dadurch werden zum Beispiel bioaktive Peptide aktiviert oder inaktiviert (Skidgel, 1988). Die Hydrolasen Neuraminidase (Sialidase) und β -Galaktosidase sind Teil eines lysosomalen multienzymatischen Komplex, der zudem ein sogenanntes „protective Protein“ enthält (Verheijen *et al.*, 1982, 1985). Dieses Protein enthält die enzymatische Aktivität einer Carboxypeptidase basierend auf der Ähnlichkeit zum KEX1 Protein aus *Saccharomyces cerevisiae* (Dmochowska *et al.*, 1987, Galjart *et al.*, 1988, Tranchemontagne *et al.*, 1990). Seine Aufgabe besteht in der Aggregation zu dem Komplex, Stabilisierung der β -Galaktosidase und Expression der Sialidase Aktivität (d'Azzo *et al.*, 1982, Verheijen *et al.*, 1985, van der Horst *et al.*, 1989). Der typische Komplex besteht aus Protomeren von 66 kDa Neuraminidase, 63 kDa β -Galaktosidase und einem Heterodimer aus 32 und 20 kDa Carboxypeptidase Protomeren, die zusammen über Disulphitbrücken verbunden sind (Galjart *et al.*, 1988; van der Horst *et al.*, 1989). Alle bislang von mir verglichenen lysosomalen Carboxypeptidasen enthalten eine α/β Hydrolasefaltungseinheit, die von mir gefundenen drei *C. elegans* Carboxypeptidasen, PCP-2, PCP-3 und PCP-4 jedoch enthalten diese Struktur zweimal, dabei besitzt jede Faltungseinheit ein Molekulargewicht von 26 kDa. Stabilität und Aktivität von Carboxypeptidasen ist abhängig von der Dimerisierung (Zhou *et al.*, 1991). Dimerisierung ist wahrscheinlich auch für diese *C. elegans* Proteine entscheidend. Die Ähnlichkeit zwischen der jeweils ersten zur zweiten α/β Hydrolasefaltung ist nicht sehr hoch. Es wäre denkbar, daß die erste Domäne als vestigiale Domäne in einem sogenannten 'domain swapping' Mechanismus an die zweite katalytische Domäne bindet, dadurch das Monomer im nicht dimerisierten Zustand stabilisiert, dabei aber auch das Protein in einen inaktiven Zustand versetzt (Benett *et al.*, 1995, Argiriadi *et al.*, 1999). Im menschlichen 'protective protein' und in der Carboxypeptidase II vom Weizen erfolgt Dimerisierung über den Carboxyterminus des Proteins (Zhou *et al.*, 1991, Liao *et al.*, 1992). Die menschliche Prolylcarboxypeptidase PRCP weist, wie auch das KEX-1 Protein der Hefe am C-Terminus eine Serinrepetition auf, die einen Beitrag zur Dimerisierung leisten könnte (Tan *et al.*, 1993, Dmochowska *et al.*, 1987). Es konnte dafür zwar für PCP-1, PCP-2, PCP-3 und PCP-4 keine entsprechende Sequenz gemäß den Charakteristika von PRCP und KEX-1 gefunden werden, aber die Homologie in diesem Bereich der Proteine zueinander ist hoch. Auf der anderen Seite besitzen die Proteine PCP-3 und PCP-4, infolge der hohen Übereinstimmung in diesem Bereich auch PCP-2, eine als DUF274 bezeichnete Domäne. Im *C. elegans*

Genom zeigt sich, daß mehrere Gene, die diese Domäne kodieren, häufig nebeneinander angeordnet sind. Struktur und Funktion der DUF274 Domäne sind nicht bekannt, es handelt sich aber um ein Spezifikum von *C. elegans*. Es wäre denkbar, daß PCP-2, PCP-3 und PCP-4 Dimerisierung über diese Domäne vermitteln. Lysosomale Lokalisierung kann bei diesen Proteinen über mögliche Glykosylierungsstellen erfolgen, je 11 Consensussequenzen bei PCP-2 und PCP-3, neun bei PCP-4, an denen an Aspartat Mannose-6-Phosphat kovalent gebunden werden könnte (Anhang 8.6). Dieses Oligosaccharid kann an den Lysosomen durch den Mannose-6-Phosphat Rezeptor erkannt werden (Review in von Figura, 1991). Zudem beginnt die Primärstruktur jedes dieser Proteine mit einer Signalsequenz, die benutzt wird, um das intrazelluläre Sortieren von Proteinen in der Zelle zu ermöglichen (Nielsen *et al.*, 1997). Von dem Gen *pcp-3* wurden ursprünglich sieben Exons vorhergesagt (The *C. elegans* Sequencing Consortium, 1998). Das erste Exon wurde mit E0 bezeichnet (Abb. 1A). Für diese Vorhersage gibt es allerdings keine Evidenzen. Keiner der 18 cDNA Klone von *pcp-3* aus der Genbibliothek von Kohara (1996) weist Sequenzidentität in diesem Bereich auf. Die strukturell stark verwandten Proteine *pcp-2* und *pcp-4* weisen diese Sequenz ebenfalls nicht auf. Durch RT-PCR, die jeden mRNA Bereich von *pcp-3* aus Gesamt-RNA-Präparationen vom Wildstamm *C. elegans* revers amplifizieren konnte, wurde nie ein Produkt erhalten, das Exon 0 beinhaltet. Eventuelle Degradation des 5' mRNA Endes von *pcp-3* vor der RT-PCR kann jedoch nicht ausgeschlossen werden. Würde das Gen mit Exon 1 beginnen, wäre eine reguläre Signalsequenz vorhanden. Demzufolge nehme ich an, daß Exon 0 von der Computeranalyse der genomischen Sequenzdaten von *C. elegans* falsch vorhergesagt wurde.

Der Verlust jedes der Proteine des oben erwähnten lysosomalen Komplex führt zu Krankheiten im männlichen *Homo sapiens* basierend im lysosomalen Speicherverhalten. Dabei wird unterschieden zwischen Sialidosis auf Grund von Neuraminidase Defekten (Chantz *et al.*, 1977), Gangliosidosis durch Verlust der β -Galaktosidaseaktivität (Okada und O'Brien, 1968) und Galactosialidosis in Folge Defizienzen der Carboxypeptidaseaktivität (Wenger *et al.*, 1978). Galactosialidosis vereint die Symptome der beiden anderen Krankheitsbilder, da sowohl Neuraminidase als auch β -Galaktosidase in ihrer Aktivität beeinträchtigt sind. Darunter fällt die Akkumulation von Oligosacchariden und Gangliosiden in Geweben, cerebellare Ataxie, Myoklonus, Laufstörungen und auffällige makuläre kirschrote Flecken (Wenger *et al.*, 1978, Palmeri *et al.*, 1986). Die Krankheiten beruhen auf dem fehlenden Abbau von Substraten durch verantwortliche Hydrolasen in den Lysosomen von Geweben, in denen entsprechende enzymatische Aktivität benötigt wird. Dabei werden bei fehlender Aktivität von β -Galaktosidase im wesentlichen Glykosphingolipide, Oligosaccharide und Keratansulphat lysosomal eingelagert (Review in Pshezhetsky und Ashmarina, 2001). Der Grundbaustein von Glykosphingolipiden ist Sphingosin. Insbesondere

Sphingosin-1-Phosphat ist im Vertebraten für Migration während der Organogenese des Herzes verantwortlich, indem es an einen spezifischen G-Protein gekoppelten Transmembranrezeptor bindet (Kupperman *et al.*, 2000). Die Signalisierung steuert zelluläre Prozesse, wie Zellproliferation, Differenzierung, Apoptose und Migration. Dabei interagiert es auch mit Proteinen wie AKT und PI3-Kinase. Migration erfolgt entlang von Zellen mit einer extrazellulären Matrix aus Fibronectin (Review in Pyne und Pyne, 2002). Dabei kontrolliert diese extrazelluläre Matrix über Strukturveränderungen Signalkaskaden (Sechler und Schwarzbauer, 1998). Insbesondere in *C. elegans* ist Fibronectin auch an den Gonaden insbesondere an der distalen Endzelle (DTC) exprimiert (Fitzgerald und Schwarzbauer, 1998). Somit erscheint es denkbar, daß *pcp-2/pcp-3* die DTC Migration in einer derart vergleichbaren Signalkaskade reguliert beim Übergang von der zweiten zur dritten Phase. Das bedeutet, daß es in den Lysosomen nach RNAi von *pcp-2/pcp-3* nicht nur zur Verhinderung im Abbau von Sphingolipiden kommt, sondern vielmehr auch ein zur Migration erforderliches Signalmolekül nicht gebildet wird. Ceramidase ist auch ein lysosomales Protein, welches Sphingosin und freie Fettsäuren aus Ceramid bildet. Dies ist ein finaler Prozeß der Sphingolipid Degradation (Ferlinz *et al.*, 2001). Es wäre gleichzeitig möglich, das entstandene Sphingosin in diesem Zellorganell zu phosphorylieren und als Signalmolekül zu sekretieren. Auch in *Drosophila* ist eine mögliche Beteiligung von Sphingolipiden an Migrationsvorgängen bekannt, sie regulieren dort aktive Bewegung von Keimzellen zur sich entwickelnden somatischen Gonade (Starz-Gaiano *et al.*, 2001).

Eine Verbindung des Sphingosin-1-Phosphat Rezeptors mit Komponenten der Insulinsignalkaskade könnte eine Erklärung der geringeren Fettakkumulation im Darm und der Hypodermis des Nematoden nach RNAi gegen das lysosomale Carboxypeptidase Duo *pcp-2 / pcp-3* sein.

Normale Migration der DTC erfolgt in drei Phasen (Anhang 8.7). In der frühen L3 Larve 25 Stunden nach dem Schlupf aus der Eihülle migrieren die anteriore und die posteriore DTC zunächst entlang der ventralen Muskelbänder sich vom mittleren Körperbereich, dem Entstehungsort der Vulva, entfernend. In der zweiten Phase am Ende der L3 30 Stunden nach Schlupf reorientieren sich die DTCs und migrieren Richtung dorsalem Muskelband. In der dritten Phase erfolgt erneute Änderung der Migrationsrichtung, nun zurück entlang des dorsalen Muskelstrangs zum mittleren Körperbereich (Hedgecock *et al.*, 1987).

Das Genpaar *pcp-2 / pcp-3* zeigt deutlich, daß diese spezifisch die Migration der DTCs beeinflussen, Keimbahnproliferationen wurden nämlich nahezu nicht beeinflusst. Dieser Phänotyp war auch sichtbar, als RNAi von *pcp-2* und *pcp-3* an den GFP Reportern zur spezifischen Auslöschung der GFP Fluoreszenz durchgeführt wurde. Häufig, aber nicht ausschließlich, betrafen die Migrationsphänotypen die posteriore DTC, hingegen entwickelte sich der anteriore Gonadenarm häufig wie die Wildtypgonade. Nash *et al.* (2000) konnte

diesen Aspekt auch bereits an mutierten Allelen von *unc-130* beobachten. Das zeigt, daß die Entwicklung der einzelnen Gonadenarme unabhängig voneinander erfolgt. An den schwächeren Ausprägung der RNAi Phänotypen erkennt man deutlich, daß es sich um DTC Migration handelt. Bei einem starken RNAi Phänotyp erfolgten nämlich so weitreichende DTC Migrationsfehler, daß die gesamte Gonadenstruktur mißgebildet ist. Dann ist auch der Phänotyp steril. Diese maximale phänotypische Ausprägung könnte der Nullphänotyp sein. Dies ist eine mögliche Ursache, daß bei Mutagenese mit DEB oder TMP keine Mutante in *pcp-2* oder *pcp-3* entwickelt werden konnte. Bei einer Suche nach vergleichbaren Phänotypen zu RNAi von *pcp-2* und *pcp-3* durch F1 Präkomplementation wurden mutagenisierte Männchen gegen eine Deletion in diesem Bereich gekreuzt. Viele sterile Tiere befanden sich darunter mit pseudovulvalen Ausstülpungen und stark mißgebildeten Gonaden. Diese sterilen Tiere könnten durch Mutation in *pcp-2* oder *pcp-3* entstanden sein. Die mutagenisierten Tiere wurden hier gegen einen Stamm mit einer relativ kleinen chromosomalen Deletion, *eDf18*, gekreuzt. Die F1 Nachkommen, die einen Phänotyp zeigen, besitzen normalerweise ihre Ursache in veränderter Wirkung eines Gens, das innerhalb dieser Deletion kartiert. Es ist unwahrscheinlich, daß viele Gene, die gleiche oder ähnliche Phänotypen hervorrufen innerhalb einer kleinen Deletion kartieren.

Ein RNAi Phänotyp betrifft häufig nicht eine Gesamtpopulation, weiterhin fällt die phänotypische Ausprägung in den einzelnen Individuen verschieden aus. Von den stärksten beobachteten Phänotypen erwartet man, daß diese einer vollständigen Inaktivierung der Genaktivität entsprechen. In einer Mutante hingegen tritt ein Effekt meist mit maximaler Penetranz in jedem einzelnen Tier auf. Selbst Punktmutationen, wenn sie in konservierten Regionen des Gens auftreten können starke Phänotypen bedeuten, wie Letalität oder Infertilität.

Die mRNA (Kohara, 2001) und auch das Protein von *pcp-3* werden bereits früh im Embryo gebildet und akkumuliert in Darmzellen. Dennoch konnten keine frühen Phänotypen ermittelt werden. Der Migrationsphänotyp entsteht durch Entscheidungen, die während der Larvalentwicklung getroffen werden, weil es reicht, während der frühen Larvalstadien durch RNAi *pcp-3* Genwirkung zu inaktivieren, um die Migration der DTCs zu stören. Auch die Eversion an der Vulva kann durch larvale RNAi Inaktivierung nach dem Dauerlarvenstadium erfolgen. Dieser mit Ppv bezeichnete Phänotyp tritt auch dann auf, wenn das Gen *pcp-3* bei Dauerlarven während des Austritts aus dem Arrest inaktiviert wird. Das bedeutet, daß *pcp-3* für frühe embryonale Funktionen verantwortlich ist, die durch die angewandten Untersuchungsmethoden nicht auffielen, oder das Protein ist inaktiv und es bedarf einer späteren Aktivierung. Wäre dem so, könnte man aber durch späte RNAi keinen Phänotyp erhalten. Der Phänotyp Ppv tritt auch nur auf, wenn die Entwicklung den Dauerarrest

beinhaltet. Das bedeutet, daß nach Dauerarrest das Protein neu gebildet wird. Im *pcp-3::gfp* Reporterstamm war zwar GFP in den Darmzellen in der Dauerlarven zu erkennen, aber GFP hat eine lange Halbwertszeit. Das Protein könnte schon vorher gebildet worden sein. Tatsächlich liegt dann in der Dauerlarve kein PCP-3 vor. Der Phänotyp Pvp wird somit durch RNAi ausgelöst, weil die neue Produktion von *pcp-3* unterbunden wird. Das bedeutet aber trotzdem, daß bei durchgängig reproduktiver Entwicklung dieses Protein für die Aufrechterhaltung der adulten Struktur der Vulva nicht notwendig ist, da in diesem Fall auch frühe RNAi Wirkung, auch bereits während der Embryonalentwicklung Pvp nicht auslöst.

Die Gonadenentwicklung ist wahrscheinlich unabhängig von der intestinalen Expression. Sowohl nach Dauerarrest im PDL3 Stadium, als auch dem L3 Stadium aus reproduktiver Entwicklung erfolgt spät *pcp-3* Expression in zusätzlichen Zellen, wie im exkretorischen System, aber auch in vereinzelt unbestimmten Zellen, die dort positioniert sind, wo sich die DTCs zu dem späten L3 Stadium befinden (Anhang 8.7, Abb. 6I). Die DTC migriert aber von diesem Signal weg, so daß es möglich erscheint, daß diese *pcp-3* Expression verhindert, daß nach Phase 2 die hintere DTC wieder in posteriore Richtung weiter migriert. Gegenüber der Vulva auf der dorsalen Seite wurde auch Expression beobachtet, dieses Signal könnte die Migration schließlich beenden. RNAi Inaktivierung von *pcp-3* verhindert die Migration nicht. Jedoch erfolgt ohne ausreichende Faktoren, welche die Richtung bestimmen, dieser Vorgang unkoordiniert und es entstehen variabel morphologisch ausgebildete Gonaden.

Das PCP-2 Protein entsteht erst während des L3 Stadiums, obwohl auch hier die mRNA bereits während des L1 Stadiums in allen Darmzellen akkumuliert. In der L3 und in der Dauerlarve wird das Protein aber nur in wenigen posterioren Darmzellen exprimiert. Entweder enthält das verwendete Konstrukt in dem Reporter nicht ausreichend regulatorische Bereiche zur Ermittlung eines vollständigen Expressionsmusters, da regulatorische Bereiche auch in ferner Distanz zum Gen vorliegen können oder innerhalb der Introns des Gens, oder die mRNA von *pcp-2* unterliegt einer Translationskontrolle. Diese Expression könnte einen Grund darstellen, weshalb häufiger bei DTC Migrationsfehlern, z.B. auch in mutierten *unc-130* Allelen (Nash *et al.*, 2000), die posteriore Gonade betroffen ist. Sie zeigt gleichzeitig, daß anterior und posterior partiell andere Arten der Kommunikation mit den DTCs vorliegen. Bei Betrachtung von Dauerlarven nach RNAi von *pcp-2* und *pcp-3* fällt häufig auch auf, daß die posteriore Gonade bereits weiter entwickelt ist als die anteriore Gonade, und es zeigt sich auch schon zu einem früheren Zeitpunkt ein gewisses Ungleichgewicht in der Entwicklung beider Gonadenarme. Zudem erkennt man, daß zu einem Teil *pcp-2* und *pcp-3* auch in früherer Embryonalentwicklung an DTC Migration mitwirken.

Es konnte nicht unterschieden werden, für welche differenzierten Funktionen *pcp-2* und *pcp-3* zuständig sind. Die beiden Gene sind sehr ähnlich, deshalb wird die Expression beider Gene durch RNAi gegen eines der beiden beeinträchtigt. Beide Gene könnten aber auch redundant wirken, so daß beide Proteine DTC Migration und Vulvaentwicklung steuern.

Am lysosomalen Multienzymkomplex sind vorwiegend Vertreter der Serincarboxypeptidasen beteiligt. Die Gene *pcp-2* und *pcp-3* besitzen Ähnlichkeit zur humanen Prolylcarboxypeptidase (PRCP), welche synonym auch lysosomale Serincarboxypeptidase oder Angiotensinase C genannt wird (Tan *et al.*, 1993). Humanes PRCP ist zudem nahe verwandt mit Cathepsin A (Galjart *et al.*, 1988, Morreau *et al.*, 1992), aber auch zu Carboxypeptidase Y (Hayashi *et al.*, 1973). PRCP spaltet an Peptiden C-terminal Aminosäuren ab, die mit Prolin über Peptidbindung verknüpft sind, wie bei Angiotensin II und III (Tan *et al.*, 1993). Es besteht die Möglichkeit, daß *pcp-2* und *pcp-3* dieselbe Reaktion katalysieren, da der homologe Angiotensinrezeptor C53D6.4 in *C. elegans* nach Inaktivierung durch RNAi einen bzgl. der ausgestülpten Vulva vergleichbaren Phänotyp zeigt, wie *pcp-2* und *pcp-3*. Dieser Rezeptor besitzt aber noch andere Funktionen, erkennbar an der aufgetretenen embryonalen Letalität im RNAi Experiment. Gegenwärtig konnte im Menschen festgestellt werden, daß Blockade von Angiotensin II dem Insulinsignalweg entgegenwirkt und dadurch Typ II Diabetes vorbeugt (Sharma *et al.*, 2002).

4.2 *pcp-2* UND *pcp-3* INAKTIVIERUNG BEEINTRÄCHTIGT SEKUNDÄR DIE MORPHOLOGIE UND FUNKTION DER VULVA

Kontrollpunkte jedes Larvalstadiums sind an Signale aus der Umwelt gekoppelt, wie Pheromonkonzentrationen, Temperatur oder Nahrungsvorräte. Die hieraus resultierenden ökologischen und physiologischen Signale in *C. elegans* modulieren dabei heterochrone Aktivität, die dann stadienspezifische Aktivitäten reguliert (Antebi *et al.*, 1998). Metabolische Kontrolle ist an dieser Stelle von entscheidender Bedeutung. Dafür verantwortlich ist der Rezeptor DAF-2, ein Insulinrezeptor (Kimura *et al.*, 1997). Der entscheidende Ligand im Vertebraten ist Insulin (Brown *et al.*, 1955). Dessen Ausschüttung im Pankreas bei erhöhtem Blutzuckergehalt führt zur Expression von Genen, die den Metabolismus von Synthese der Glucose auf Produktion von Glykogen und Fett umstellen (Kahn, 1994). Insbesondere auch die Aktivität zweier insulinähnlicher Wachstumsfaktoren bestätigte die Bedeutung dieser Signalwirkung auch auf Entwicklungskontrolle (Rinderknecht und Humbel, 1978a, 1978b). Im Genom von *C. elegans* existieren 37 mit Insulin verwandte Gene, jedoch nur ein Rezeptor (Pierce *et al.*, 2001). Die Aktivierung dieses Rezeptors reguliert metabolische Kontrolle auf

Grund der Wirkung des am Ende der intrazellulären Signalübertragung stehenden Transkriptionsfaktors DAF-16 (Lin *et al.*, 1997, Ogg *et al.*, 1997). Mutanten im DAF-2 Rezeptor lagern verstärkt Fett und Glykogen ein. Dieses Ereignis ist in frühen Larvalstadien mit den metabolischen Vorgängen bei der Dauerlarvenbildung verknüpft (Kimura *et al.*, 1997). Zudem besitzen adulte *daf-2* Mutanten aus demselben Grund eine verlängerte Lebensspanne (Kenyon *et al.*, 1993). Diese beiden Phänotypen der *daf-2* Mutanten sind auch verbunden mit Schutz vor oxidativem Streß durch Expression von Mangan Superoxiddismutase, einem bekannten Zielgen des Transkriptionsfaktors DAF-16 (Honda und Honda, 1999). Der Verlust von *pcp-3* Aktivität zeigte geringere Fettakkumulation in Dauerlarven und adulten Tieren. Diese spezielle Untersuchung wurde nur im genetischen Hintergrund der *daf-2(m41)* Mutante mit dem *in vivo* Lipidmarker Nile Red durchgeführt. Die Ergebnisse wurden aber auch auf Grund der mikroskopischen Lichtbrechung an Dauerlarven mit anderem genetischem Hintergrund bestätigt, z.B. mit *daf-1(m40)* aus dem TGF β Signalweg der Dauerlarvendetermination. Das Gen wirkt demzufolge der *daf-2* Aktivität entgegen, jedoch vermag es den Dauerphänotyp nicht zu blockieren. Es wurde gezeigt, daß neuronales Signalisieren über den DAF-2 Rezeptor genügt, alle bekannten Aufgaben vollständig zu absolvieren (Wolkow *et al.*, 2000). Speziell in der Dauerentwicklung ist die Insulinsignalisierung vom Gewebetyp, welcher diesbezüglich aktiv wirkt, unabhängig. Wenn demzufolge irgendein Gewebe aktiv über DAF-2 signalisiert, bedeutet dies, daß das Tier die reproduktive Entwicklung ausführt (Apfeld und Kenyon, 1998). Diese beiden Aussagen deuten darauf hin, daß Zielgene von DAF-16 an der Bildung eines sekundären Signals beteiligt sind, die dem gesamten Nematodenkörper mitteilen, daß Dauerlarvenbildung festgelegt wurde. Insofern bilden *daf-2(m41)* Nematoden bei *pcp-3* Inaktivierung Dauerlarven aus, da DAF-16 aktiv ist. Das Fehlen von *pcp-3* führt zwar dazu, daß diese Dauerlarven weniger nachweisbare Lipide einlagern, jedoch werden viele andere dauermorphologische Prozesse entsprechend dem genetischen Dauerlarven Entwicklungsprogramm korrekt ausgeführt. Es erscheint denkbar, daß *pcp-3* Aktivität infolge der Wirkung des Transkriptionsfaktors DAF-16 benötigt wird, um im Dauerstadium Lipideinlagerung zu ermöglichen.

Die Insulinsignalkaskade zeigt aber noch andere Funktionen. Es konnte gezeigt werden, daß bei 27°C *unc-64* und *unc-31* verstärkt Dauerlarven bilden. Epistasis Untersuchungen mit unterschiedlich mutierten Stämme ergaben dabei, daß diese Gene im Insulinweg aktiv sind (Ailion *et al.*, 1999). Bei dieser Temperatur unterliegt *C. elegans* anscheinend einem erhöhtem Streßfaktor, dem durch Bildung der Dauerlarve ausgewichen wird. Dabei wird Morphogenese unabhängig von der Pheromonkonzentration eingeleitet. Insulin und TGF β Signalkaskaden signalisieren in veränderter Form, um zügig auf veränderte Umweltbedingungen reagieren zu können (Ailion und Thomas, 2000). Dabei kodiert *unc-64*

ein Syntaxin, *unc-31* für ein CAPS Protein. *unc-31* ist ausschließlich neuronal exprimiert (Livingstone, 1991). Insbesondere *unc-64* ist aber weitläufiger in unterschiedlichen sekretorischen Geweben exprimiert, wie auch im Darm (Saifee *et al.*, 1998). Da diese beiden Gene abhängig von der DAF-2 Rezeptor Wirkung agieren, und für Gene kodieren, die für regulierte Ca^{2+} Freisetzung in der Zelle verantwortlich sind (Ogawa *et al.*, 1998, Saifee *et al.*, 1998, Ann *et al.*, 1997), scheint der Insulinrezeptor auch eine Phospholipase C aktivieren zu können, die Inositoltriphosphat (IP3) aus PIP2 bildet (Shibatohge *et al.*, 1998). In *C. elegans* existiert aber nur ein Rezeptor für IP3, kodiert durch *itr-1*, dem ursprünglich Fehler bei der Ovulation zugeordnet wurden (Fleming *et al.*, 1996, Clandinin *et al.*, 1998). Ferner ist ITR-1 aber im wesentlichen in *C. elegans* mit ultradianen Rhythmen gekoppelt, wie Defekation, pharyngeale Pumprate, was entsprechend auch durch intestinale und pharyngeale Expression des Rezeptors gekoppelt ist (Santo *et al.*, 1999). Es ist sinnvoll, daß Dauerbildung diese beiden Prozesse unterbindet. Defekation ist ein ultradianer Rhythmus, der ansonsten unabhängig von Umwelteinflüssen agiert. Dabei basiert die 50 Sekunden Rhythmik auf nachfolgender Kontraktion der posterioren, dann der anterioren Körpermuskulatur, sowie schließlich der Darmmuskulatur (Thomas, 1990, Liu und Thomas, 1994). Muskelkontraktion ist auch im Vertebraten mit Ca^{2+} Ausschüttung verbunden, z.B. auch der ultradiane Rhythmus des Herzschlags (Giles *et al.*, 1986).

PCP-2 und PCP-3 sind im Darm lokalisiert, PCP-2 ist sogar nur in einigen posterioren Darmzellen vorhanden. Beide Gene zeigen einen Phänotyp, der von der Dauerbildung abhängt. Zudem fällt, gemessen an der Lipideinlagerung, ein grundsätzlicher metabolischer Defekt bei der *pcp-2/pcp-3* Geninaktivierung auf. Dieser Phänotyp fügt sich in den Zusammenhang zur Insulinsignalkaskade ein. Zudem konnten keine Entwicklungsfehler in der Vulvabildung beobachtet werden, schließlich können junge Adulte normal Eier ablegen. Das Auftreten der pseudovulvalen Ausstülpung ist den Beobachtungen gemäß meist mit einer Darmausdehnung gekoppelt. Häufig entlädt sich auch der Darminhalt später nach außen. Dieser Effekt wird unregelmäßig beobachtet und könnte demzufolge aus unterschiedlichen physiologischen Ernährungsbedingungen des Einzeltieres stammen. Weiterhin tritt dieser Phänotyp erst einige Tage nach Ausbildung der postdauer Adulten auf. Es erscheint denkbar, daß in PDA Tieren infolge des Fehlens der PCP-2/PCP-3 Carboxypeptidasen der Defekationszyklus nicht wieder aufgenommen wird. Dies begründet auch die Ausdehnung in Daf-15 dauerähnlichen Larven, die noch Futter aufnehmen können.

Mit dem Dauerlarvenarrest muß auch die Entwicklung reproduktiver Organe gestoppt werden. Zwei Gene, *daf-9* und *daf-15*, besitzen mutierte Allele, die zu unvollständiger Dauerlarvenbildung führen. Damit verbunden ist auch, daß reproduktive Organentwicklung nicht vollständig inaktiviert wurde. Eine *daf-9(e1406)* Dauerlarve führt noch Keimbahnproliferationen durch (Albert und Riddle, 1988). Wenn dies gleichzeitig kombiniert wird mit Inaktivität des *pcp-3* Gens, so zeigt sich deutlich, daß die *daf-9* Wirkung verstärkt wird, die Gonade ist deutlich weiter ausgebildet, zudem entsteht aus den Vulvavorläuferzellen eine der Vulva ähnliche Struktur. Auch *daf-15* Dauerlarven reagieren auf den Verlust von *pcp-3*. Der Metabolismus der Dauerlarve ist gestört, große Lipideinlagerungen fallen auf (vgl. Abb. 10A und 10C). Überexpression von *pcp-3* im *daf-15(m81)* Hintergrund hingegen führt zu fortgeschrittener Gonadenentwicklung und Fortschritt in der Vulvaentwicklung. Die Wirkung von *pcp-3* im mutierten Hintergrund von *daf-15* ist gegenteilig zu den bisherigen Beobachtungen. Das ist ungewöhnlich und läßt vermuten, daß diese beiden Gene im gleichen oder einem parallelen Signalweg wirken und daß auch *daf-15* Funktion mit Entwicklung von reproduktiven Organen verknüpft ist.

Interessant ist an dieser Stelle aber auch daß bei Überexpression und nach Inaktivierung von *pcp-3* Aktivität in beiden Fällen eine Ausstülpung an der Vulva entsteht. Es kann sich um gegenteilige Effekte handeln, die sich im Phänotyp ähnlich auswirken. Es zeigt sich aber zudem, daß die Menge an PCP-3, die gebildet wird, genau reguliert werden muß, damit Wildphänotyp entstehen kann.

Vergleicht man die Gonadenstruktur der arretierten *daf-15* Dauerlarve mit einer Wildtyp oder *daf-2(m41)* Dauerlarve, so fällt auf, daß die Gonadenentwicklung zu einem früheren Zeitpunkt arretiert ist, denn man erkennt im wesentlichen in der Gonadenstruktur nur die somatischen Ursprungszellen. Die Wirkung von *pcp-3* im *daf-9*- und *daf-15* Hintergrund ist ein weiteres Indiz dafür, daß *pcp-3* Aktivität für reproduktive Organentwicklung im dritten Larvalstadium benötigt wird.

4.3 DIE WIRKUNG VON TGF β SIGNALLEN IN DER ENTWICKLUNG VON REPRODUKTIVEN ORGANEN

Das infektiöse Stadium des parasitischen Nematoden *Ancylostoma caninum* entspricht dem Dauerstadium von *C. elegans*. Der Austritt aus dem Dauerstadium kann über Hemmstoffe von Neurotransmittern, die auf die Insulinsignalkaskade Einfluß nehmen, verhindert werden (Tissenbaum *et al.*, 2000). Auf der anderen Seite können *in vitro* durch Zugabe von TGF β gewebebearbeitete L3 Nematoden von *A. caninum* reaktiviert werden (Arasu, 2001). Das belegt die Wirkung von TGF β auch beim Austritt aus dem Dauerstadium. Das für die Entstehung des Dauerstadiums von *C. elegans* aktive TGF β wird durch *daf-7* kodiert (Ren *et al.*, 1996). Unter günstigen Umweltbedingungen ist im L1 Larvalstadium die *daf-7* mRNA mit deutlich erhöhter Konzentration gegenüber anderen Larvalstadien vorhanden, sie nimmt aber während der folgenden Larvalstadien zunehmend ab. Nahrungsmangel und Pheromon jedoch senken den *daf-7* mRNA Pegel deutlich ab, so daß die TGF β -Signaltransduktion unterbunden ist, damit ist auch kein TGF β im dauerspezifischen L2d Stadium vorhanden im Gegensatz zum reproduktiven L2-Stadium. (Ren *et al.*, 1996). Alle bekannten Mutationen in *daf-7* bedeuten Funktionsverlust und verhindern TGF β Signaltransduktion, sie sind damit *daf-c*. Allerdings sind alle diese Mutationen in TGF β auch temperatursensitiv inklusive der Nullmutation, das bedeutet, daß Wildtyp TGF β bei höheren Temperaturen für reproduktive Entwicklung verantwortlich ist und der Umweltfaktor Temperatur im wesentlichen auf die TGF β -Signalkette Einfluß nimmt (Ren *et al.*, 1996). Die stadienspezifische Expression des TGF β ist auch räumlich beschränkt auf das amphidiale Neuronenpaar ASI. Durch dieses Paar sensorischer Neuronen im Kopf kann *C. elegans* auch auf veränderte Umweltbedingungen im Dauerstadium reagieren, wenn z.B. der Pheromonpegel sinkt oder die Verfügbarkeit von Nahrung wieder gestiegen ist, um auf den darauf folgenden TGF β - Anstieg das Dauerstadium zu beenden (Ren *et al.*, 1996).

Der Rezeptor für DAF-7 ist DAF-4, eine Serin/Threonin-Rezeptor-Protein-Kinase mit Homologie zu Typ II Aktivin Rezeptor Kinasen in Mammaliern (Estevez *et al.*, 1993). Ligandenbindung an den Typ II Rezeptor führt zu einer Heterodimerisierung mit einer Typ I Aktivin-Rezeptor-Kinase, welche durch nachfolgende Phosphorylierung auch aktiviert wird (ten Dijke *et al.*, 1996). Dieser für Dauerlarvenentwicklung verantwortliche Rezeptor ist DAF-1, welches ebenfalls eine Serin/Threonin-Rezeptor-Protein-Kinase ist (Georgi *et al.*, 1990). Die Expression von *daf-1* und *daf-4* erfolgt in allen postembryonalen Stadien. Dabei wird *daf-1* im wesentlichen im Kopfbereich, unter anderem in den Amphidien, im ventralen Nervenstrang, in einigen Neuronen des Phasmids oder der Mechanosensorik und in der distalen Endzelle (DTC) der Gonade exprimiert. *daf-4* hingegen findet Expression im Pharynx, in der Hypodermis, im Darm, aber auch in einigen Neuronen des Kopfes, im

ventralen Nervenstrang und in wenigen Schwanzneuronen des Phasmids. Die neuronale Koexpression beider TGF β -Rezeptoren beweist den endokrinen Signalweg, bei dem vom sensorischen Neuron ASI das TGF β sekretiert wird, das Signal von weiteren Neuronen detektiert wird und auf andere Zelltypen weiter vermittelt wird (Patterson *et al.*, 1997, Gunther *et al.*, 2000).

In *C. elegans* ist nur eine Typ II Aktivin-Rezeptor-Kinase vorhanden, DAF-4 (The *C. elegans* Sequencing Consortium, 1998). Von den Typ I Rezeptor Kinasen hingegen gibt es mehrere. Das zeigt sich auch in den pleiotropen Phänotypen von *daf-4* Mutanten, die Dauerbildung, Migration, Körpergröße und männliche Kopulationsbursa betreffen (Review in Patterson und Padgett, 2000). Zur Ausbildung der männlichen Schwanzstruktur wird der TGF β Sma/Mab Signalweg verwendet. Neben verändertem Spikulum der Kopulationsbursa gehört zum mutierten Phänotyp auch ein kleiner Körper. Daher heißen die namengebenden SMAD Proteine *sma-2*, *sma-3* und *sma-4* auch Zwergene (Savage *et al.*, 1996). Das hier agierende TGF β wird kodiert durch *dbl-1*, der Typ I Rezeptor durch *sma-6* (Krishna *et al.*, 1999, Suzuki *et al.*, 1999). Ein Zielgen dieses Signalwegs ist *lon-1*, welches die Körpergröße negativ beeinflusst, jedoch nicht die männliche Schwanzmorphologie (Maduzia *et al.*, 2002).

In einer ungewöhnlichen TGF β Signalkette wird die Migration von Nervenzellen und der distalen Endzelle der Gonade gesteuert. Diese Signalkaskade wirkt innerhalb einer errichteten dorso-ventralen Polarität. Die zielgerichtete Führung von auswachsenden Axonen innerhalb dieser Achse erfordert sekretierte, dem Laminin ähnliche, Netrin Faktoren (Ishii *et al.*, 1992, Kennedy *et al.*, 1994, Serafini *et al.*, 1994). Diese wirksame Signalkaskade benötigt das lösliche UNC-6/Netrin Signal und die Transmembranrezeptoren UNC-5 und UNC-40/DCC (Leung-Hagesteijn *et al.*, 1992, Ishii *et al.*, 1992, Chan *et al.*, 1996). Normale Migration der DTC, wie bereits oben erwähnt, erfolgt in drei Phasen (Anhang 8.7). Die zweite von ventral nach dorsal Phase fehlt meist in den Mutanten von *unc-6*, *unc-5* und *unc-40*. Phase drei findet dann auch im ventralen Bereich des Nematoden statt (Hedgecock *et al.*, 1990, Su *et al.*, 2000). Dabei wird *unc-6* in ventralen Neuroglia und wachsenden Axonen exprimiert (Wadsworth *et al.*, 1996). Expression konnte auch in den Motoneuronen beobachtet werden, die in ihrer Migration von Mutationen in *unc-5* beeinflusst werden und in der DTC. Dabei beginnt die zellautonome Expression in den DTCs erst mit Einsetzen der zweiten gonadalen Migrationsphase. UNC-6-UNC-5 Wechselwirkung führt zu einer Migration vom Netrinsignal weg (Su *et al.*, 2000). Dorsale Repulsion konnte auch durch *unc-5* Expression in berührungssensitiven Neuronen gezeigt werden (Hamelin *et al.*, 1993). Hingegen ist das mitverantwortliche *unc-40* während der gesamten Migrationsphase in den DTCs und in axonalen Wachstumskegeln exprimiert (Chan *et al.*, 1996).

Der UNC-5 Rezeptor besteht N-terminal auf der extrazellulären Seite aus zwei Immunglobulin-Domänen, gefolgt von zwei Thrombospondin Typ I (TSP) Domänen. Nach

der Transmembrandomäne befindet sich im intrazellulären Bereich eine SH3 ähnliche Domäne zur weiteren Signalübermittlung (Leung-Hagesteijn *et al.*, 1992). Es konnte gezeigt werden, daß TGF β Moleküle an TSP Typ I Domänen binden können (Schultz-Cherry *et al.*, 1994, 1995). Ein TGF β Molekül, kodiert durch *unc-129*, ist an Migrationsphänotypen von Motorneuronen beteiligt. Seine Wirkung ist unabhängig von einem Typ II TGF β Rezeptor (Colavita *et al.*, 1998). Das Gen konnte als Suppressor von *unc-5* Mutationen identifiziert werden. Mutanten in *unc-129* sind in ihrer Bewegung beeinträchtigt. Die Ausprägung dieses Unc Phänotyp ist jedoch variabel. Der Grund liegt in möglicherweise zufälliger Zielanpeilung der wachsenden Axone (Colavita und Culotti, 1998). Die bekannten Mutanten in *unc-129* zeigen keine Migrationsphänotypen der DTCs, darunter befinden sich auch zwei Mutationen, *ev554* und *ev557*, die ein Stopcodon in der CDS von *unc-129* verursachen. Das dritte Allel *ev566* zeigt hypomorph auftretende neuronale Migration (Colavita *et al.*, 1998). Exprimiert wird *unc-129* in der dorsalen Körpermuskulatur, den Motorneuronen, einigen weiteren Neuronen im Kopfbereich und in vier Zellen, welche die Vulva umgeben. Ferner ergab sich aber, daß bei Expression von *unc-129* in allen Zellen der Körpermuskulatur jedoch Migration der DTCs gestört wird (Colavita *et al.*, 1998). Der forkhead Transkriptionsfaktor *unc-130* inhibiert die ventrale Expression von *unc-129*. Mutanten in *unc-130* zeigen veränderte männliche Kopulationsbursen, fehlerhafte Migration der Motorneuronen und der DTCs. In allen die zweite Phase der DTC-Migration betreffenden Mutationen ist häufiger die der posterioren Gonade beeinträchtigt. Durch seine Wirkung auf die männliche Kopulationsbursa konnte festgestellt werden, daß *unc-130* auch den *dbl-1/sma-6* TGF β Signalweg beeinflusst. Umgekehrt zeigen aber Doppelmutanten in *dbl-1* und *unc-130* auch DTC Migrationsdefekte (Nash *et al.*, 2000). Nun wird *dbl-1* auch im ventralen Nervenstrang exprimiert, dadurch ist auch die *sma/Mab* Signalwirkung als entgegengesetzt ventralisierender TGF β Signalweg aktiv (Suzuki *et al.*, 1999).

Da die zweite Phase der Migration mit dem L3 Stadium korreliert, zeigt sich auch eine umfassende Wirkung heterochron agierender Gene zu diesem Zeitpunkt. Mutanten in *daf-9* und *daf-12* zeigen nur die erste Phase der DTC Migration, die gesamte Gonade ist linearisiert (Anhang 8.7) und expandiert anterior teilweise so weit, daß sie neben dem terminalen Bulbus des Pharynx endet. Mutationen in diesen beiden Genen unterbinden Phase zwei und drei der DTC Migration, die beide zeitlich während dem L3 Stadium beginnen (Antebi *et al.*, 1998, Gerisch *et al.*, 2001, Jia *et al.*, 2002). Es besteht ein direkter Zusammenhang zwischen Heterochronie und DTC Migration, da Mutanten in *daf-9* und *daf-12* nicht *unc-5* exprimieren (Su *et al.*, 2000).

In *gon-12(ee1007)* konnte wahrscheinlich ein neues mutiertes *unc-129* Allel identifiziert werden, da *gon-12(ee1007)/unc-129(ev554)* die adulte männliche Morphologie der Gonade und die Migration der DTC in Hermaphroditen beeinflusst, obwohl die Allele einzeln heterozygot Wildphänotyp aufweisen. Obwohl bislang bekannte Mutanten in *unc-129* keine DTC Migrationsdefekte aufweisen, ergab sich infolge fehlender räumlich kontrollierter Expression dieses TGF β dennoch eine Beteiligung (Colavita *et al.*, 1998). Das *ee1007* Allel zeigt temperatursensitiv DTC Migrationsdefekte. Auffällig ist, daß der ursprünglich durch DEB Mutagenese erstellte Stamm EC1053 mit *gon-12(ee1007)* eine sekundäre Mutation trägt, die *unc-24* zugeordnet werden konnte. Bei Komplementation von EC1053 gegen Stämme, welche die chromosomale Deletion *eDf18* tragen, gab es einen Unc Phänotyp, obwohl *unc-24* nicht innerhalb dieser Deletion kartiert. Die drei bekannten *unc-129* Allele beeinträchtigen die Migration von Axonen der Motoneuronen innerhalb der dorsoventralen Achse. Bei der Fehlfunktion erfolgt die Migration unkoordiniert und synaptische Verknüpfungen erfolgen zufällig. Dadurch entsteht ein Unc Phänotyp, der individuell unterschiedlich ist. Es ist demzufolge anzunehmen, daß auch das Allel *ee1007* axonale Migration beeinträchtigt.

Durch Temperatursensitivität ist die Möglichkeit vorhanden, den Zeitpunkt von Genfunktionen zu ermitteln, indem zu bestimmten Entwicklungszeitpunkten Nematoden von der permissiven zur restriktiven Temperatur gebracht werden. Dies wirkt sich direkt auf die Struktur des Proteins aus, welches dadurch in der nativen Konformation instabil wird und deshalb seine Funktionen nicht mehr ausüben kann. Durch geschickte Temperaturveränderungen kann durch diese Besonderheit von *C. elegans* ermittelt werden, wann Proteine tatsächlich benötigt werden. Kein anderes Experiment erlaubt es, so leicht funktionale Proteinwirkung zu analysieren. GFP Reporter zeigen lediglich die Verfügbarkeit eines Proteins, RNAi zeigt veränderte Phänotypen verglichen zum Wildtyp, erlaubt aber keine Rückschlüsse auf den Zeitpunkt der notwendigen Aktivität des betroffenen Gens. Steht eine Mutante mit mehreren Phänotypen zur Verfügung, die kausal bedingt aus stadienspezifisch unterscheidbaren Proteinaktivitäten resultieren, so ist es auch möglich, diese Zeitpunkte spezifisch zu bestimmen. Das GON-12 Protein ist für richtige Migration der DTC verantwortlich. Bei Transfer der *gon-12(ee1007)* Mutante in 25°C restriktiver Temperatur im L3 Stadium oder im L4 Stadium wird die Migration gestört. In beiden Fällen betrifft das bei *gon-12* auch die Fertilität. Dies ist ein Unterschied zu den Fehlern in der Migration nach RNAi von *pcp-2* und *pcp-3*, bei deren morphologisch abnormalen Gonadenstrukturen dennoch Nachkommen entstehen können, ihre Anzahl könnte geringer sein als 300 beim Wildtyp. Jede Temperaturmodulation vor dem L3 Stadium führte zu einem Wildtyp Migrationsphänotyp bei *gon-12(ee1007)*, wenn ab L3 die permissive Temperatur vorliegt, im Idealfall 15,5°C, denn auch bei 20°C treten einige Nematoden mit

Migrationsdefekten auf. Der Transfer adulter Nematoden zur restriktiven Temperatur degradiert eine ehemals vollständig ausgebildete Gonade nicht.

Mit der Expression von *unc-5* bindet ventral UNC-6 an diesen Rezeptor in den DTCs. Das veranlaßt DTC Migration zum Übergang in die zweite dorsal gerichtete Phase, hier wirkt nun das TGF β Signal auf den Rezeptor, wodurch möglicherweise die dritte Phase der Migration eingeleitet wird. Durch die Mutation kann aber keine erfolgreiche Fortentwicklung stattfinden. Es wäre denkbar, daß eine Mutation im TGF β Molekül dessen Konformation in der Form ändert, daß dieses schwächer mit *unc-5* an der DTC interagiert. Hingegen würde das Fehlen von *unc-129*, wie in den Allelen *ev554* und *ev557*, keinen großen Schaden bedeuten, da auch noch andere Migrationsfaktoren wirken, wie z.B. *pcp-2* oder *pcp-3*.

UNC-129 wurde auch in einigen Zellen der Vulva nachgewiesen. Dies korreliert mit der Beobachtung, daß im L3 Stadium verfrühte Teilungen der VPCs beobachtet wurden.

Es muß aber dennoch bemerkt werden, daß die *ee1007* Komplementarität mit *ev554* nicht eindeutig war. Es gab zwar einige schwach auffällige Uncs. Auffälliger war ein leicht veränderter DTC Migrationsphänotyp sowie ein hoher Anteil an Fetteinschlüssen. So ist es auch denkbar, daß sich zwei heterozygote Genotypen synergistisch phänotypisch auswirken. Die Beteiligung von *ee1007* an Migrationsphänotypen ist vergleichbar zu Mutanten in der Gonadenmorphologie von *daf-9* und *daf-12*. Ferner sind die Effekte durch *ee1007* dem zeitlichen Rahmen L3 bis L4 Larve zuzuordnen. Wenn *ee1007* ein anderes Gen betrifft, so ist anzunehmen, daß es auch in einer Signalkaskade mitwirkt, die wie die Interaktion von *unc-5* mit *unc-6* heterochronisch beeinflusst wird, da keine grundsätzlichen morphologischen Entwicklungsprogramme fehlerhaft ausgeführt werden, sondern die Ereignisse zeitlich verändert stattfinden bzw. ganze Entwicklungsereignisse fehlen.

4.4 gon-12 IST FÜR DEN ZEITPUNKT DER TEILUNG DER VULVAVORLÄUFERZELLEN MITVERANTWORTLICH

Die Vulvaentwicklung nimmt einen besonderen Stellenwert ein, da deren Entwicklungsbeginn und damit dessen Signalisierung mit der Entscheidung S3 oder S3d korreliert, und somit bedarf es auch einer differenzierten heterochronen Synchronisierung. Bereits während der L1 werden sechs linear angeordnete Vulvavorläuferzellen (VPC) hypodermalen Ursprungs geboren, V3.p – V8.p. Sie sind ventral im Einklang mit der Lage des fertigen Organs positioniert. Erst 20 Stunden später im L3 Stadium beginnen diese Zellen sich zu teilen (Sternberg und Horvitz, 1986). Das Schicksal jeder VPC hängt von interzellulär agierenden Signalen ab: einer induzierenden somatischen gonadalen Zelle, der Vulva-Anker-Zelle (AC) (Sulston und White, 1980; Kimble, 1981), der inhibitorisch wirkenden Hypodermis (Herman und Hedgecock, 1990) und den benachbarten VPCs (Sternberg, 1988; Sternberg und Horvitz, 1989). Die VPCs nehmen die Signale auf und nehmen ein bei der L2m spezifisches Entwicklungsschicksal an, 1°, 2° oder 3° (Sternberg und Horvitz, 1986; Greenwald *et al.*, 1983; Ferguson *et al.*, 1987). Im Wildtyp nimmt V6.p 1° an und durchläuft drei weitere vollständige Teilungszyklen und bildet acht Zellen, die Vulva ausbilden. P5.p und P7.p durchlaufen dann 2°, erreichen jeweils aber nur sieben Tochterzellen, die auch Vulva bilden. Die anderen drei VPCs mit dem Entwicklungsschicksal 3° teilen sich einmal und fusionieren dann zu der multinukleären syncytialen Hypodermiszelle hyp7 (Sternberg und Horvitz, 1986; Greenwald *et al.*, 1983; Ferguson *et al.*, 1987).

Die VPCs liegen bei der L2m direkt unterhalb der somatischen Gonade, V6.p direkt unterhalb von AC, es gibt keinen Kontakt zwischen AC und den anderen VPCs. Alle VPCs besitzen gleiche Kompetenz für 1°, 2° und 3°, jedoch entsteht im Wildtyp stets das Muster 3°-3°-2°-1°-2°-3° (Sulston und White, 1980; Sternberg und Horvitz, 1986). AC signalisiert über einen EGF ähnlichen Faktor. LIN-3 ist das membranständige EGF-Vorläuferprotein, von dem EGF proteolytisch abgespalten wird. EGF ist damit im Bereich V6.p am höchsten und ist geringer vertreten im Bereich um V5.p und V7.p (Hill und Sternberg, 1992; Katz *et al.*, 1995). Der Rezeptor für EGF ist LET-23, eine Rezeptortyrosinkinase (Aroian *et al.*, 1990). Durch positive Signalisierung wird in P6.p 1° induziert (Koga und Oshima, 1995; Simske und Kim, 1995). Eine Zelle mit 1° induziert in den Nachbarzellen 2° über Lin-12/Notch Signaltransduktion (Wilkinson und Greenwald, 1995). Die äußeren Zellen werden weder zu 1° noch zu 2° induziert. Mit zugleich inhibitorischer Wirkung durch hyp7 erhalten V3.p, V4.p und V8.p die Determination zu 3° (Levitan und Greenwald, 1998, Ferguson und Horvitz, 1989).

Nach Bindung von LIN-3 an den LET-23 EGF Rezeptor in V6.p, dimerisiert und autophosphoryliert der Rezeptor. SEM-5 enthält eine SH2 Domäne, mit der es an den aktivierten Rezeptor binden kann, und zwei SH3 Domänen zur Bindung von einem Guanylnukleotid austauschfaktor (GEF), kodiert durch *sos-1* (Clark *et al.*, 1992; Chang *et al.*, 2000). GEF wird benötigt, um membrangebundenes RAS Protein zu aktivieren, indem dessen gebundenes GDP in GTP umgewandelt wird. *C. elegans* RAS ist in *let-60* kodiert (Han und Sternberg, 1990, Han *et al.*, 1990). Über eine Kaskade von Proteinkinasen wird das initiale Signal zum Kern vermittelt. RAS bindet und phosphoryliert LIN-45, ein RAF Protein (Han *et al.*, 1993). Dieses übermittle das Phosphat an MEK-2 (Kornfeld *et al.*, 1995, Wu *et al.*, 1995). Schließlich wird die MAPK MPK-1 aktiviert (Lackner *et al.*, 1994, Wu und Han, 1994). MAPK des Vertebraten kann direkt in den Nukleus eintreten und dort Transkriptionsfaktoren phosphorylieren (Marshall, 1994). Dieser sogenannte RAS Signalweg inhibiert den Transkriptionsfaktor LIN-1, er enthält ETS Domänen (Beitel *et al.*, 1995). Aktives LIN-1 inhibiert den Entwicklungsweg 1°. Mutationen in *lin-1* führen zu einem Multivulva (Muv) Phänotyp. Epistasisanalyse bestätigt *lin-1* am Ende des RAS Signalwegs (Ferguson *et al.*, 1987; Lackner *et al.*, 1994, Wu und Han, 1994). *lin-31* kodiert, wie auch schon *daf-16*, einen HNF3/forkhead Transkriptionsfaktor. Funktionsverlust in *lin-31* führt zu Muv, aber auch fehlende Ausbildung einer Vulva ist möglich, Regulation durch MAPK ist nicht klar (Miller *et al.*, 1993). Die Zielgene von LIN-1 und LIN-31 Protein sind unbekannt.

Nach diesen beschriebenen induktiven Signalen, welche die VPCs determinieren, beginnen die Zellteilungen, später Zellmigration, schließlich differenzieren 22 Vulvazellen zu einem stark muskulösen Eiablageapparat. Der Zeitpunkt dieser Teilungen unterliegt heterochroner Kontrolle auf der Ebene der Transition von der Gap1- zur Synthese-Phase des Zellzyklus (Euling und Ambros, 1996a). Mutationen, die *lin-14* oder *lin-28* Funktionsverlust bedeuten, führen zu verfrühter Teilung der VPCs, obgleich das Teilungsmuster korrekt abläuft (Ambros und Horvitz, 1984; Euling und Ambros, 1996a). Wildtypdauerlarven sind arretiert bei der L2m, d.h. es hat sich noch keine der sechs VPCs geteilt. Mit dem Austritt aus der Dauerlarve werden die Stadien PDL3 und PDL4 durchgeführt, welche die gleichen Entwicklungsereignisse ausführen, gemäß der reproduktiven L3 und L4 (Liu und Ambros, 1991). In einer heterochronen *lin-28(lf)* Mutante, die das S2 Programm mit der charakteristischen Teilung der hypodermalen Seamzellen nicht ausführt, finden auch verfrüht Teilungen der VPCs statt. Die Determination des Schicksals der einzelnen VPCs fand dadurch auch verfrüht in *lin-28(lf)* statt (Euling und Ambros, 1996b). Eine Dauerlarve unter diesen Bedingungen weist eine partiell entwickelte Vulva auf. Infolge der Frühentwicklung der *lin-28* Mutante entsteht unter reproduktiven Bedingungen ein Spätschaden, es entsteht eine nichtfunktionale, sich ausstülpnde Vulva. Im Gegensatz dazu entsteht eine funktionale Vulva, wenn die Entwicklung den Dauerzustand enthielt (Euling und Ambros, 1996b). Der

Dauerzustand konserviert „Lebensalter“ (Klass und Hirsh, 1976), darüber hinaus können Fehlprozesse der Entwicklung durch Respezifikation erneuert werden (Liu und Ambros, 1991, Euling und Ambros, 1996b).

Ein entsprechender Prozeß findet auch bei der Vulvaentstehung in *gon-12(ee1007)* Mutanten statt. Von der Mutante gibt es Stämme, die gleichzeitig das *daf-2(m41)* Allel besitzen und Stämme ohne ein *daf-c* Allel. Eine frühe Exposition von *gon-12(ee1007)* in die restriktive Temperatur führt zu einer Ausstülpung der Vulva. Wenn es infolge des *daf-2(m41)* Allels Dauerlarvenentwicklung gab, entstand im Adultus schließlich eine Wildtypvulva. Dabei hat sich gezeigt, daß die Teilungen zum Zeitpunkt der L2m bereits fortgeschritten sind. Mit Austritt aus dem Dauerstadium wird erneut EGF Signaltransduktion durch die Ankerzelle der Vulva induziert und in PDA Nematoden entsteht eine normale funktionale Vulva. In der reproduktiven L3 hingegen wird in *gon-12(ee1007)* das Teilungsmuster noch einmal wiederholt, es entsteht eine zu hohe Anzahl an Zellen. Dies führt zu Fehlentwicklung in der Morphogenese. Wenn *gon-12(ee1007)* allelisch zu *unc-129* ist, könnte dies bedeuten, daß *unc-129* Expression neben *unc-130* auch unter Kontrolle der heterochron zu diesem Zeitpunkt wirkenden Gene *daf-9* und *daf-12* steht. Mit Expression von *unc-129* in späten Larvalstadien in vier Zellen, welche die Vulva umgeben, wird dann erst deren Entwicklung durch Aktivierung der EGF Signalkette ermöglicht, eventuell durch Interaktion mit den Adaptermolekülen *sem-5* und *sos-1* über einen TGF β Rezeptor (Clark *et al.*, 1992, Chang *et al.*, 2000). Das ist konsistent mit der Struktur des EGF Rezeptors, der 8 Bindestellen für SH2 Domänen besitzt, über die alle seine Funktionen positiv und negativ reguliert werden (Lesca und Sternberg, 1997).

Wenig ist bekannt über die Morphogenese der späteren Vulvaentwicklung. Viele Gene wurden entdeckt, deren Mutation bei der Eversion der Vulva in ihrer finalen Phase zu Problemen führen, dies wird als Evi Phänotyp bezeichnet. Das führt zu Fehlern bei der Invagination bei der Morphogenese oder zu großen Ausstülpungen. Viele der entdeckten Mutationen mit diesem Phänotyp weisen gleichzeitig Keimbahn- und somatische Gonadenmißbildungen auf (Seydoux *et al.*, 1993). Auch die terminale Differenzierung der Vulva steht unter Kontrolle heterochron agierender Gene. Für späte larvale Entwicklung ist *lin-29* zuständig. Auch mutierte Allele in diesem Gen weisen den Evi Phänotyp auf (Bettinger *et al.*, 1996, 1997). Vergleichend dazu ist *lin-29* ebenfalls für finale Entwicklung der männlichen Kopulationsbursa verantwortlich (Euling *et al.*, 1999). Insbesondere die Entwicklung des Spikulums wird vergleichend zur Vulva Entwicklung in einem EGF Rezeptor abhängigen Signalweg festgelegt. Nicht alle Komponenten, die in dieser Kaskade bislang bekannt sind, wirken allerdings auch in der Entwicklung männlicher Schwanzstrukturen (Ferguson und Horvitz, 1985, Katz *et al.*, 1995, Chamberlin und Sternberg, 1994). Da *gon-12*

unter Kontrolle heterochroner Gene wirkt, wie es durch den Mig Phänotyp und die verfrühte Teilung der VPCs auffiel, wurde der Einfluß auf männliche geschlechtsspezifische Merkmale getestet. Es zeigte sich aber, daß *gon-12* zwar auch erwartungsgemäß die Migration der männlichen Gonade beeinträchtigt, jedoch wurde keine abnormale männliche Kopulationsbursa und keine abnormen Spikulae beobachtet. Das Allel *gon-12(ee1007)* beeinflusst die Teilung der VPCs zwar früh, aber bzgl. der Gonadenmigration wurde ein deutlich späterer Zeitraum der Aktivität ermittelt, da auch in der späten L3 bis frühe L4 noch die gonadale Migration beeinträchtigt wird. Dieses Gen agiert somit zeitlich aufeinander folgend verschiedene Funktion. Ein später Effekt auf Morphogenese von Vulva und männlicher Kopulationsbursa wurde hingegen nicht festgestellt.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Diese Arbeit beschreibt drei neu identifizierte Gene, welche die Migration der beiden distalen Endzellen (DTCs) der somatischen Gonade in *Caenorhabditis elegans* regulieren. Die hermaphroditische Gonade entwickelt sich in einem dreiphasigen Entwicklungsprozess: In Phase eins migrieren die DTCs entlang der ventralen Muskelbänder, sich dabei vom mittleren Körperbereich, ihrem Ursprung, entfernend. In Phase zwei reorientiert sich die Migrationsrichtung, die Ausdehnung erfolgt nun vom ventralen zum dorsalen Körperbereich. Schließlich in Phase drei dreht die Richtung erneut, jetzt am dorsalen Muskelband bis annähernd zurück zum mittleren Körperbereich. Phase zwei und der Beginn von Phase drei finden während des dritten Larvalstadiums statt. Die Vorgänge während dieses Stadiums werden heterochron reguliert, im wesentlichen von *daf-12*. Manche *daf-12* Mutanten führen spezifische Entwicklungsprozesse des dritten Larvalstadiums nicht aus. Hier fehlen dann Phase zwei und drei der Gonadenentwicklung, so daß der adulte Nematode eine linear ausgedehnte Gonade aufweist. Die Gene *pcp-2*, *pcp-3* und *gon-12* sind ebenfalls innerhalb dieses Zeitrahmens der Gonadenentwicklung aktiv. Die Gene *pcp-2* und *pcp-3* kodieren für Carboxypeptidasen, die wahrscheinlich Teil eines lysosomalen Multienzymkomplexes sind. *gon-12* ist eine neu erstellte Mutation und ist allelisch zu *unc-129*, einem TGF β . Es reguliert die späte Migration der DTC zusammen mit UNC-5 und UNC-6/Netrin innerhalb einer physiologischen polaren Achse ventral nach dorsal.

Abhängig von dem morphologisch differentiellen Zustand während des dritten Larvalstadiums, d.h. Dauerlarve oder direkt reproduktiv wachsendes L3 Stadium, beeinflussen alle drei Gene auch die Entwicklung der Vulva, erkennbar an einer pseudovulvalen Ausstülpung im nachfolgenden adulten Hermaphroditen. Hier zeigt sich erneut deutlich die heterochrone Kontrolle durch/von *gon-12*. Die Vulvavorläuferzellen (VPCs) teilen sich verfrüht bei mutiertem *gon-12(ee1007)* Allel. Dies wirkt sich bei direkter Fortentwicklung in einer Vulvausstülpung des Adulten aus, weil sich in der L3 das reguläre Teilungsprogramm noch einmal wiederholt. Dadurch entsteht eine zu hohe Zahl an Zellen, welche die Vulva bilden. Nach Austritt aus dem Dauerlarvenstadium kommt es zu einer Neudifferenzierung. Aus den Zellen, die sich verfrüht geteilt haben, werden sechs neue VPCs determiniert, welche die Vulvabildung einleiten. Dadurch entsteht nun eine normale funktionale Vulva.

Die Gene *pcp-2* und *pcp-3* hingegen wirken sich eher indirekt auf die Vulva aus, da bei Inaktivierung dieser Gene diese zunächst normal gebildet wird. Sie reißt aber meist erst nach Ablauf einiger adulter Lebenszeit auf, falls die individuelle Entwicklung den Dauerlarvenarrest aufwies. Über diese Wunde fällt der Darm nach außen. Dieser Effekt ist wahrscheinlich mit gestörter metabolischer Kontrolle am Ende des Dauerarrests zu erklären. Vermutlich werden bei fehlender Aktivität einige unbekannte spezifische Substrate des lysosomalen Multienzymkomplexes in Darmzellen werden bei fehlender Aktivität nicht umgesetzt. Daraus würde dann die Ausstülpung der Vulva als Spätfolge entstehen.

6 LITERATURVERZEICHNIS

Ailion, M., Inoue, T., Weaver, C.I., Holdcraft, R.W. und Thomas, J.H. (1999): Neurosecretory control of aging in *Caenorhabditis elegans*. *Proceedings of the national academy of science USA* 96, 7394-7397

Ailion, M. und Thomas, J.H. (2000): Dauer formation induced by high temperatures in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 156, 1047-1067

Albert, P.S., Brown, S.J. und Riddle, D.L. (1981): Sensory control of dauer larva formation in *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Comparative Neurology* 198, 435-451

Albert, P.S. und Riddle, D.L. (1983): Developmental alterations in sensory neuroanatomy of the *Caenorhabditis elegans* dauer larva. *Journal of Comparative Neurology* 219, 461-481

Albert, P.S. und Riddle, D.L. (1988): Mutants of *Caenorhabditis elegans* that form dauer-like larvae. *Developmental Biology* 126, 270-293

Alessi, D.R., Andjelkovic, M., Caudwell, B., Cron, P., Morrice, N., Cohen, P., Hemmings, B.A. (1996) Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. *EMBO Journal* 15, 6541-6551

Alessi, D.R., Deak, M., Casamayor, A., Caudwell, F.B., Morrice, N., Norman, D.G., Gaffney, P., Reese, C.B., MacDougall, C.N., Harbison, D., Ashworth, A. und Bownes, M. (1997a): 3-Phosphoinositide-dependent protein kinase-1 (PDK1): structural and functional homology with the *Drosophila* DSTPK61 kinase. *Current Biology* 7, 776-789

Alessi, D.R., James, S.R., Downes, C.P., Holmes, A.B., Gaffney, P.R., Reese, C.B. und Cohen, P. (1997b): Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase Balpha. *Current Biology* 7, 261-269

Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. und Lipman, D.J. (1997): Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* 25, 3389-3402

Ambros, V. (1989): A hierarchy of regulatory genes controls a larva-to-adult developmental switch in *C. elegans*. *Cell* 57, 49-57

Ambros, V. (2000): Control of developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Current opinions in Genetics and Development* 10, 428-433

Ambros, V. und Horvitz, H.R. (1984): Heterochronic mutants of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Science* 226, 409-416

Ambros, V. und Horvitz, H.R. (1987): The *lin-14* locus of *Caenorhabditis elegans* controls the time of expression of specific postembryonic developmental events. *Genes and Development* 1, 398-414

Ann, K., Kowalchuk, J. A., Loyet, K. M. und Martin, T. F. J. (1997): Novel Ca²⁺-binding protein (CAPS) related to UNC-31 required for Ca²⁺-activated exocytosis. *Journal of Biological Chemistry* 272, 19637-19640

Antebi, A., Culotti, J.G. und Hedgecock, E.M. (1998): *daf-12* regulates developmental age and the dauer alternative in *Caenorhabditis elegans*. *Development* 125, 1191-1205

Antebi, A., Yeh, W.-H., Tait, D., Hedgecock, E.M. und Riddle, D.L. (2000): *daf-12* encodes a nuclear receptor that regulates the dauer diapause and developmental age in *C. elegans*. *Genes and Development* 14, 1512-1527

Apfeld, J. und Kenyon, C. (1998): Cell nonautonomy of *C. elegans daf-2* function in the regulation of diapause and life span. *Cell* 95, 199-210

Apweiler, R., Attwood, T.K., Bairoch, A., Bateman, A., Birney, E., Biswas, M., Bucher, P., Cerutti, L., Corpet, F., Croning, M.D.R., Durbin, R., Falquet, L., Fleischmann, W., Gouzy, J., Hermjakob, H., Hulo, N., Jonassen, I., Kahn D., Kanapin, A., Karavidopoulou, Y., Lopez, R., Marx, B., Mulder, N.J., Oinn, T.M., Pagni, M., Servant, F., Sigrist, C.J.A. und Zdobnov, E.M. (2001): The InterPro database, an integrated documentation resource for protein families, domains and functional sites. *Nucleic Acids Research* 29, 37-40

Arasu, P. (2001): *In vitro* reactivation of *Ancylostoma caninum* tissue-arrested third-stage larvae by transforming growth factor-beta. *Journal of Parasitology* 87, 733-738

Arasu, P., Wightman, B. und Ruvkun, G. (1991): Temporal regulation of *lin-14* by the antagonistic action of two other heterochronic genes *lin-4* and *lin-28*. *Genes and Development* 5, 1825-1833

Argiriadi, M.A., Morisseau, C., Hammock, .D. und Christiansson, D.W. (1999): Detoxification of environmental mutagens and carcinogens: Structure, mechanism, and evolution of liver epoxide hydrolase. *Proceedings of the national academy of science USA* 96, 10637-10642

Armour, J. und Duncan, M. (1987): Arrested larval development in cattle nematodes. *Parasitology Today* 3, 171-176

Aroian, R.V., Koga, M., Mendel, J.E., Ohshima, Y. und Sternberg, P.W. (1990): The *let-23* gene necessary for *Caenorhabditis elegans* vulval induction encodes a tyrosin kinase of the EGF receptor subfamily. *Nature* 348, 693-699

Baker, J.R. (1958): Principles of biological microtechnique. A study of fixation and dyeing. *Methuen & Co. Ltd.* London

Barnes, T.M., Jin, Y., Horvitz, H.R., Ruvkun, G. und Hekimi, S. (1996): The *Caenorhabditis elegans* behavioral gene *unc-24* encodes a novel bipartite protein similar to both erythrocyte band 7.2 (stomatins) and nonspecific lipid transfer protein. *Journal of Neurochemistry* 67, 46-57

Barstead, R.J. und Waterston, R.H. (1989): The basal component of the nematode dense-body is vinculin. *Journal of Biological Chemistry* 264, 10177-10185

Barstead, R.J. und Waterston, R.H. (1991): Vinculin is essential for muscle function in the nematode. *Journal of Cell Biology* 114, 715-724

Bateman, A., Birney, E., Cerruti, L., Durbin, R., Eddy, S.R., Griffiths-Jones, S., Howe, K.L., Marshall, M. und Sonnhammer, E.L. (2002): The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Research* 30, 276-280

Beitel, G.J., Tuck, S., Greenwald, I. und Horvitz, H.R. (1995): The *Caenorhabditis elegans* gene *lin-1* encodes an ETS-domain protein and defines a branch in the vulval induction pathway. *Genes and Development* 9, 3149-3162

Bennett, M.J., Schlunegger, M.P. und Eisenberg, D. (1995): 3D domain swapping: a mechanism for oligomer assembly. *Protein science* 4, 2455-2468

Bernstein, H.D. (2000): A surprising function for SRP RNA? *Nature Structural Biology* 7, 179-181

Bettinger, J.C., Lee, K. und Rougvie, A.E. (1996): Stage-specific accumulation of the terminal differentiation factor LIN-29 during *Caenorhabditis elegans* development. *Development* 122, 2517-2527

Bettinger, J.C., Euling, S., Rougvie, A.E. (1997): The terminal differentiation factor LIN-29 is required for proper vulval morphogenesis and egg laying in *Caenorhabditis elegans*. *Development* 124, 4333-4342

Birnboim, H.C., Doly, J. (1979): A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7, 1513-1523

Birnby, D.A., Link, E.M., Vowels, J.J., Tian, H., Colacurcio, P.L. und Thomas, J.H. (2000): A transmembrane guanylyl cyclase (DAF-11) and Hsp90 (DAF-21) regulate a common set of chemosensory behaviors in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 155, 85-104

Blaxter, M. und Bird, D. (1997): Parasitic Nematodes. In *C. elegans* II (ed. D.L. Riddle, T. Blumenthal, B.J. Meyer and J.R. Priess), 851-878. NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press

Brenner, S. (1974): The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 77, 71-94

Brovermann, S., MacMorris, M. und Blumenthal, T. (1993): Alteration of *Caenorhabditis elegans* gene expression by targeted transformation. *Proceedings of the national academy of science USA* 90, 4359-4363

Brown, H., Sanger, F. und Kitai, R. (1955): The structure of sheep and pig insulins. *Biochemical Journal* 60, 556-565

Brown, M.S. und Goldstein, J.L. (1983): Lipoprotein metabolism in the macrophage: implications for cholesterol deposition in atherosclerosis. *Annual Review in Biochemistry* 52, 223-261

Brunet, A., Bonni, A., Zigmond, M.J., Lin, M.Z., Juo, P., Hu, L.S., Anderson, M.J., Arden, K.C., Blenis, J. und Greenberg, M.E. (1999): Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell* 96, 857-868

Buchner, J. (1999): Hsp90 & Co. – a holding for folding. *Trends in biochemical sciences* 24, 136-141

Bullock, W.O., Fernandez, J.M. und Short, J.M. (1987): XL1-blue: a high efficiency plasmid transforming recA *Escherichia coli* strain with β -Galactosidase selection. *Biotechniques* 5, 376-378

Byerly, L., Cassada, R.C. und Russell, R.L. (1976a): The life cycle of the nematode *Caenorhabditis elegans*. I. Wild-type growth and reproduction. *Developmental Biology* 51, 23-33

Byerly, L., Scherer, S. und Russell, R.L. (1976b): The life cycle of the nematode *Caenorhabditis elegans*. II. A simplified method for mutant characterization. *Developmental Biology* 51, 34-48

Caplan, A.J. (1999): Hsp90's secrets unfold: new insights from structural and functional studies. *Trends in Cell Biology* 9, 262-268

Cassada, R.C. und Russell, R.L. (1975): The Dauer-Larva: A postembryonic developmental variant of the nematode *C. elegans*. *Developmental Biology* 46, 326-342

Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W.W. und Prasher, D.C. (1994): Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* 263, 802-805

Chamberlin, H.M. und Sternberg, P.W. (1994): The *lin-3/let-23* pathway mediates inductive signalling during male spicule development in *Caenorhabditis elegans*. *Development* 120, 2713-2721

Chan, S.S., Zheng, H., Su, M.W., Wilk, R., Killeen, M.T., Hedgecock, E.M. und Culotti, J.G. (1996): UNC-40, a *C. elegans* homolog of DCC (Deleted in Colorectal Cancer), is required in motile cells responding to UNC-6 netrin cues. *Cell* 87, 187-195

Chang, C., Hopper, N.A. und Sternberg, P.W. (2000): *Caenorhabditis elegans* SOS-1 is necessary for multiple RAS-mediated developmental signals. *EMBO Journal* 19, 3283-3294

Cantz, M., Gehler, J. und Spranger, J. (1977): Mucopolidosis I: increased sialic acid content and deficiency of an alpha-N-acetylneuraminidase in cultured fibroblasts. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 74, 732-738

Christian, J.L. und Nakayama, T. (1999): Can't get no SMADisfaction: Smad proteins as positive and negative regulators of TGF- β family signals. *Bioessays* 21, 382-390

Clandinin, T.R., DeModena, J.A. und Sternberg, P.W. (1998): Inositol triphosphate mediates a RAS-independent response to LET-23 receptor tyrosine kinase activation. *Cell* 92, 523-533

Clark, S.G., Stern, M.J. und Horvitz, H.R. (1992): *C. elegans* cell-signalling gene *sem-5* encodes a protein with SH2 and SH3 domains. *Nature* 356, 340-344

Coburn, C.M. und Bargmann, C.I. (1996): A putative cyclic nucleotide-gated channel is required for sensory development and function in *C. elegans*. *Neuron* 17, 695-706

Coburn, C.M., Mori, I., Ohshima, Y. und Bargmann, C.I. (1998): A cyclic nucleotide-gated channel inhibits sensory axon outgrowth in larval and adult *Caenorhabditis elegans*: a distinct pathway for maintenance of sensory axon structure. *Development* 125, 249-258

Cochrane, J.E. und Skopek, T.R. (1994a): Mutagenicity of butadiene and its epoxide metabolites: I. Mutagenic potential of 1,2-epoxybutene, 1,2,3,4-diepoxybutane and 3,4-epoxy-1,2-butanediol in cultured human lymphoblasts. *Carcinogenesis* 15, 713-717

- Cochrane, J.E. und Skopek, T.R. (1994b): Mutagenicity of butadiene and its epoxide metabolites: II. Mutational spectra of butadiene, 1,2-epoxybutene and diepoxybutane at the hprt locus in splenic T cells from exposed B6C3F1 mice. *Carcinogenesis* 15, 719-723
- Colavita, A., Krishna, S., Zheng, H., Padgett, R.W. und Culotti, J.G. (1998): Pioneer axon guidance by UNC-129, a *C. elegans* TGF-beta. *Science* 281, 706-709
- Colavita, A. und Culotti, J.G. (1998): Suppressors of ectopic UNC-5 growth cone steering identify eight genes involved in axon guidance in *Caenorhabditis elegans*. *Developmental Biology* 194, 72-85
- Conn, H.J. (1953): Biological stains. *Sixth Ed. Williams and Wilkins*. Baltimore
- Coulson, A., Huynh, C., Kozono, Y. und Shownkeen, R. (1995): The physical map of the *Caenorhabditis elegans* genome. In *Methods in Cell Biology* (ed. Epstein, H.F. und Shakes, D.C.) 48, 533-550
- Coulson, A., Kozono, Y., Lutterbach, B., Shownkeen, R., Sulston, J. und Waterston, R. (1991): YACs and the *C. elegans* genome. *Bioessays* 13, 413-417
- Coulson, A., Sulston, J., Brenner, S. und Karn, J. (1986): Toward a physical map of the genome of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Proceedings of the national academy of Science USA* 83, 7821-7825
- Coulson, A., Waterston, R., Kiff, J., Sulston, J. und Kohara, Y. (1988): Genome linking with yeast artificial chromosomes. *Nature* 335, 184-186
- Croll, N.A. und Matthews, B.E. (1977): Biology of Nematodes. *Halsted Press*, New York
- Dalley, B.K. und Golomb, M. (1992): Gene expression in the *Caenorhabditis elegans* dauer larva: developmental regulation of Hsp90 and other genes. *Developmental Biology* 151, 80-90
- D'Azzo, A., Hoogeveen, A., Reuser, A.J., Robinson, D. und Galjaard, H. (1982): Molecular defect in combined beta-galactosidase and neuraminidase deficiency in man. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 79, 4535-4539

De Bono, M. und Bargmann, C.I. (1998): Natural variation in a neuropeptide Y receptor homolog modifies social behaviour and food response in *C. elegans*. *Cell* 94, 679-689

Dmochowska, A., Dignard, D., Henning, D., Thomas, D.Y. und Bussey, H. (1987): Yeast KEX1 gene encodes a putative protease with a carboxypeptidase B-like function involved in killer toxin and alpha-factor precursor processing. *Cell* 14, 573-584

Dorman, J.B., Albinder, B., Shroyer, T., Kenyon, C. (1995): The *age-1* and *daf-2* genes function in a common pathway to control the lifespan of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 141, 1399-1406

Eddy, S.R. (1998): Profile hidden Markov models. *Bioinformatics* 14, 755-763

Eeckman, F.H. und Durbin, R. (1995): ACeDB and macace. *Methods in Cell Biology* 48, 583-605

Emmons, S.W., Klass, M.R. und Hirsh, D. (1979): Analysis of the constancy of DNA sequences during development and evolution of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Proceedings of the national academy of science USA* 76, 1333-1337

Estevez, M., Attisano, L., Wrana, L., Albert, P.S., Massagué, J. und Riddle, D.L. (1993): The *daf-4* gene encodes a bone morphogenetic protein receptor controlling *C. elegans* dauer larva development. *Nature* 365, 644-649

Euling, S., Bettinger, J.C., Rougvie, A.E. (1999): The LIN-29 transcription factor is required for proper morphogenesis of the *Caenorhabditis elegans* male tail. *Developmental Biology* 206, 142-156

Euling, S. und Ambros, V. (1996a): Heterochronic genes control cell cycle progress and developmental competence of *C. elegans*. *Cell* 57, 49-57

Euling, S. und Ambros, V. (1996b): Reversal of cell fate determination in *Caenorhabditis elegans* vulval development. *Development* 122, 2507-2515

Feinbaum, R. und Ambros, V. (1999): The timing of *lin-4* RNA accumulation controls the timing of postembryonic developmental events in *Caenorhabditis elegans*. *Developmental Biology* 210, 87-95

Ferguson, E.L. und Horvitz, H.R. (1985): Identification and characterization of 22 genes that affect the vulval cell lineages of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 110, 17-72

Ferguson, E.L. und Horvitz, H.R. (1989): The multivulva phenotype of certain *Caenorhabditis elegans* mutants results from defects in two functionally redundant pathways. *Genetics* 123, 109-121

Ferguson, E.L., Sternberg, P.W. und Horvitz, H.R. (1987): A genetic pathway for the specification of the vulval cell lineages of *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 326, 259-267

Ferlinz, K., Kopal, G., Bernardo, K., Linke, T., Bar, J., Breiden, B., Neumann, U., Lang, F., Schuchman, E.H. und Sandhoff, K. (2001): Human acid ceramidase: processing, glycosylation, and lysosomal targeting. *Journal of Biological Chemistry* 276, 35352-35360

Fesenko, E.E., Kolesnikov, S.S. und Lyubarsky, A.L. (1985): Induction by cyclic GMP of cationic conductance in plasma membrane of retinal rod outer segment. *Nature* 313, 310-313

Fire, A. (1986): Integrative transformation of *Caenorhabditis elegans*. *EMBO Journal* 5, 2673-2680.

Fire, A., Harrison, S. und Dixon, D. (1990): A modular set of lacZ fusion vectors for studying gene expression in *Caenorhabditis elegans*. *Gene* 93, 189-198

Fire, A. und Waterston, R. (1989): Proper expression of myosin genes in transgenic nematodes. *EMBO Journal* 8, 3419-3428

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, 806-811

- Fitzgerald, M.C. und Schwarzbauer, J.E. (1998): Importance of the basement membrane protein SPARC for viability and fertility in *Caenorhabditis elegans*. *Current Biology* 8, 1285-1288
- Fleming, J.T., Baylis, H.A., Satelle, D.B. und Lewis, J.A. (1996): Molecular cloning and *in vitro* expression of *C. elegans* and parasitic nematode ionotropic receptors. *Parasitology* 113, s175-s190
- Franke, T.F., Kaplan, D.R., Cantley, L.C. und Toker, A. (1997): Direct regulation of the Akt proto-oncogene product by phosphatidylinositol-3,4-bisphosphat. *Science* 275, 665-668
- Fraser, A.G., Kamath, R.S., Zipperlen, P., Martinez-Campos, M., Sohrmann, M. und Ahringer, J. (2000): Functional genomic analysis of *C. elegans* chromosome I by systematic RNA interference. *Nature* 408, 325-330
- Frech, M., Andjelkovic, J., Ingley, E., Reddy, K.K., Falck, J.R. und Hemmings, B.A. (1997): High affinity binding of inositol phosphates and phosphoinositides to the pleckstrin homology domain of RAC/protein kinase B and their influence on kinase activity. *Journal of Biological Chemistry* 272, 8474-8481
- Furuyama, T., Nakazawa, T., Nakano, I. und Mori, N. (2000): Identification of the differential distribution patterns of mRNAs and consensus binding sequences for mouse DAF-16 homologues. *Biochemical Journal* 349, 629-634
- Galjart, N.J., Gillemans, N., Harris, A., van der Horst, G.T., Verheijen, F.W., Galjaard, H. und d'Azzo, A. (1988): Expression of cDNA encoding the human "protective protein" associated with lysosomal beta-galactosidase and neuraminidase: homology to yeast proteases. *Cell* 54, 755-764
- Gaugler, R. und Kaya, H. (1990): The entomopathogenic nematodes in biological control. *CRC Press*, Boca Raton
- Georgi, L.L., Albert, P.S. und Riddle, D.L. (1990): *daf-1*, a *C. elegans* gene controlling dauer larva development, encodes a novel receptor protein kinase. *Cell* 61, 635-645

Gerisch, B., Weitzel, C., Kober-Eisermann, C., Rottiers, V. und Antebi, A. (2001): A hormonal signaling pathway influencing *C. elegans* metabolism, reproductive development, and life span. *Developmental Cell* 1, 841-851

Giles, W., van Ginneken, A. und Shibata, E.F. (1986): Ionic currents underlying cardiac pacemaker activity: a summary of voltage-clamp data from single cells. In *Cardiac Muscle: The Regulation of Excitation Contraction Coupling*, (ed. R.D. Nathan), 1-27, Orlando, Academic Press Inc.

Golden, J.W. und Riddle, D.L. (1982): A pheromone influences larval development in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Science* 218, 578-580

Golden, J.W. und Riddle, D.L. (1984a): The *C. elegans* dauer larva: developmental effects of pheromone food and temperature. *Developmental Biology* 102, 368-378

Golden, J.W. und Riddle, D.L. (1984b): A pheromone-induced developmental switch in *Caenorhabditis elegans*: Temperature-sensitive mutants reveal a wild-type temperature-dependent process. *Proceedings of the National Academy of Science, USA* 81, 819-823

Golden, J.W. und Riddle, D.L. (1984c): A *Caenorhabditis elegans* dauer-inducing pheromone and an antagonistic component of the food supply. *Journal of Chemical Ecology* 10, 1265-1280

Golden, J.W. und Riddle, D.L. (1985): A gene affecting production of the *C. elegans* dauer-inducing pheromone. *Molecular and general Genetics* 198, 534-536

Goldstein, J.L. und Brown, M.S. (1977): The low-density lipoprotein pathway and its relation to atherosclerosis. *Annual review in Biochemistry* 46, 897-930

Gottlieb, S. und Ruvkun, G. (1994): *daf-2*, *daf-16* and *daf-23*: Genetically interacting genes controlling dauer formation in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 137, 107-120

Greenspan, P., Mayer, E.P. und Fowler, S.D. (1985): Nile Red: A selective fluorescent stain for intracellular lipid droplets. *The Journal of Cell Biology* 100, 965-973

Greenspan, P. und Fowler, S.D. (1985): Spectrofluorometric studies of the lipid probe, Nile red. *The Journal of Lipid Research* 26, 781-789

Greenwald, I.S., Sternberg, P.W. und Horvitz, H.R. (1983): The *lin-12* locus specifies cell fates in *Caenorhabditis elegans*. *Cell* 34, 435-444

Gunther, C.V., Georgi, L.L. und Riddle, D.L. (2000): A *Caenorhabditis elegans* type I TGF β receptor can function in the absence of type II kinase to promote larval development. *Development* 127, 3337-3347

Hamelin, M., Zhou, Y., Su, M.W., Scott, I.M. und Culotti, J.G. (1993): Expression of the UNC-5 guidance receptor in the touch neurons of *C. elegans* steers their axons dorsally. *Nature* 364, 327-330

Hammond, S.M., Berntsen, E., Beach, D. und Hannon, G.J. (2000): An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature* 404, 293-296

Han, M. und Sternberg, P.W. (1990): *let-60*, a gene that specifies cell fates during *C. elegans* vulval induction, encodes a ras protein. *Cell* 63, 921-931

Han, M., Aroian, R.V. und Sternberg, P.W. (1990): The *let-60* locus controls the switch between vulval and nonvulval cell fates in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 126, 899-913

Han, M., Golden, A., Han, Y. und Sternberg, P.W. (1993): *C. elegans lin-45 raf* gene participates in *let-60* ras-stimulated vulval differentiation. *Nature* 363, 133-140

Hanahan, D., Jesse, J. und Bloom, F.R. (1991): Plasmid transformation of *Escherichia coli* and other bacteria. *Methods Enzymol* 204, 63-113

Hayashi, R., Moore, S. und Stein, W.H. (1973): Carboxypeptidase from yeast. Large scale preparation and the application to COOH-terminal analysis of peptides and proteins. *Journal of Biological Chemistry* 248, 2296-2302

Hedgecock, E.M., Culotti, J.G. und Hall, D.H. (1990): The *unc-5*, *unc-6* and *unc-40* genes guide circumferential migrations of pioneer axons and mesodermal cells on the epidermis in *C. elegans*. *Neuron* 4, 61-85

Hedgecock, E.M., Culotti, J.G., Hall, D.H. und Stern, B.D. (1987): Genetics of cell and axon migrations in *C. elegans*. *Development* 100, 365-382

Hedgecock, E.M. und White, J.G. (1985): Polyploid tissues in the nematode *C. elegans*. *Developmental Biology* 107, 128-133

Heldin, C.H., Miyazono, K., ten Dijke, P. (1997): TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature* 390, 465-471

Herman, R.K. und Hedgecock, E.M. (1990): Limitation of the size of the vulval primordium of *Caenorhabditis elegans* by *lin-15* expression in surrounding hypodermis. *Nature* 348, 169-171

Hill, A.A., Hunter, C.P., Tsung, B.T. Tucker-Kellogg, G. und Brown, E.L. (2000): Genomic analysis of gene expression in *C. elegans*. *Science* 290, 809-812

Hill, R.J. und Sternberg, P.W. (1992): The gene *lin-3* encodes an inductive signal for vulval development in *C. elegans*. *Nature* 358, 470-476

Hirsh, D., Oppenheim, D. und Klass, M. (1976): Development of the reproductive system of *Caenorhabditis elegans*. *Developmental Biology* 49, 200-219

Hodgkin, J. (1986): Sex determination in the nematode *C. elegans*: Analysis of *tra-3* suppressors and characterization of *fem* genes. *Genetics* 114, 15-52

Hodgkin, J. (1995): Genetic nomenclature guide. *Caenorhabditis elegans*. *Trends in Genetics* (Sonderband) 24-25

Hodgkin, J., Horvitz, H.R. und Brenner, S. (1979): Nondisjunction mutants of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 91, 67-94

- Honda, Y. und Honda, S. (1999): The *daf-2* gene network for longevity regulates oxidative stress resistance and Mn-superoxide dismutase gene expression in *Caenorhabditis elegans*. *Faseb Journal* 13, 1385-1393
- Hong, Y., Lee, R.C. und Ambros, V. (2000): Structure and function analysis of LIN-14, a temporal regulator of postembryonic developmental events in *Caenorhabditis elegans*. *Cell Biology* 20, 2285-2295
- Hope, I.A. (1991): „Promotor trapping“ in *Caenorhabditis elegans*. *Development* 113, 399-408
- Horvitz, H.R., Brenner, S., Hodgkin, J. und Herman, R.K. (1979): A uniform genetic nomenclature for the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Molecular and General Genetics* 175, 129-133
- Horvitz, H.R. und Sternberg, P.W. (1991): Multiple intercellular signaling systems control the development of the *Caenorhabditis elegans* vulva. *Nature* 351, 535-541
- Hunter, T. (1995): When is a lipid kinase not a lipid kinase? When it is a protein kinase. *Cell* 83, 1-4
- Inoue, T. und Thomas, J.H. (2000): Targets of TGF- β signaling in *Caenorhabditis elegans* dauer formation. *Developmental Biology* 217, 102-204
- Ishii, N., Wadsworth, W.G., Stern, B.D., Culotti, J.G., Hedgecock, E.M. (1992): UNC-6, a laminin-related protein, guides cell and pioneer axon migrations in *C. elegans*. *Neuron* 9, 873-881
- Jia, K., Albert, P.S. und Riddle, D.L. (2002): DAF-9, a cytochrome P450 regulating *C. elegans* larval development and adult longevity. *Development* 129, 221-231
- Johnson, T.E., Mitchell, D.H., Kline, S., Kemal, R. und Foy, J. (1984). Arresting development arrests aging in the nematode *C. elegans*. *Mechanisms of ageing and development*. 28, 23-40
- Kahn, C.R. (1994): Banting Lecture. Insulin action, diabetogenes, and the cause of type II diabetes. *Diabetes* 43, 1066-1084

Kapeller, R. und Cantley, L.C. (1994): Phosphatidylinositol-3-kinase. *Bioessays* 16, 565-576

Katz, W.S., Hill, R.J., Clandinin, T.R. und Sternberg, P.W. (1995): Different levels of the *C. elegans* growth factor LIN-3 promote distinct vulval precursor fates. *Cell* 82, 297-307

Kennedy, T.E., Serafini, T., de la Torre, J.R., Tessier-Lavigne, M. (1994): Netrins are diffusible chemotropic factors for commissural axons in the embryonic spinal cord. *Cell* 78, 425-435

Kenyon, C., Chang, J., Gensch, E., Rudner, A. und Tabtiang, R. (1993): A *C. elegans* mutant that lives twice as long as wild type. *Nature* 366: 404-405

Kimble, J. (1981): Alterations in cell lineage following laser ablation of cells in the somatic gonad of *Caenorhabditis elegans*. *Developmental Biology* 87, 286-300

Kimble, J. und Hirsh, D. (1979): The post-embryonic cell lineages of the hermaphrodite and male gonads in *C. elegans*. *Developmental Biology* 70, 396-417

Kimble, J.E. und White, J.G. (1981): On the control of germ cell development in *Caenorhabditis elegans*. *Developmental Biology* 81, 208-219

Kimura, K.D., Tissenbaum, H.A., Liu, Y., Ruvkun, G. (1997): *daf-2*, an Insulin Receptor-Like Gene That Regulates Longevity and Diapause in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 277, 942-946

Kirschner, M.W. und Hara, K. (1980): A new method of local vital staining of amphibian embryos using ficoll and „crystals“ of Nile Red. *Mikroskopie* 36, 12-15

Klass, M. und Hirsh, D. (1976): Non-aging developmental variant of *Caenorhabditis elegans*. *Nature (London)* 260, 523-525

Klippel, A., Kavanaugh, W.M., Pot, D. und Williams, L.T. (1997): A specific product of phosphatidylinositol 3-kinase directly activates the protein kinase Akt through its pleckstrin homology domain. *Molecular Cell Biology* 17, 338-344

Koga, M. und Ohshima, Y. (1995): Mosaic analysis of the *let-23* gene function in vulval induction of *Caenorhabditis elegans*. *Development* 121, 2655-2666

Kohara, Y. (1996): Large scale analysis of *C. elegans* cDNA. *Tanpakushitsu Kakusan Koso* 41, 715-720

Kohara, Y. (2001): Systematic analysis of gene expression of the *C. elegans* genome. *Tanpakushitsu Kakusan Koso* 46, 2425-2431

Komatsu, H., Mori, I., Rhee, J.S., Akaike, N. und Ohshima, Y. (1996): Mutations in a cyclic nucleotide-gated channel lead to abnormal thermosensation and chemosensation in *C. elegans*. *Neuron* 17, 707-718

Kornfeld, K., Guan, K.-L. und Horvitz, H.R. (1995): The *Caenorhabditis elegans* gene *mek-2* is required for vulval induction and encodes a protein similar to the protein kinase MEK. *Genes and Development* 9, 756-768

Korswagen, H.C., Durbin, R.M., Smits, M.T. und Plasterk, R.H.A. (1996): Transposon Tc1-derived, sequence-tagged sites in *Caenorhabditis elegans* as markers for gene mapping. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 93, 14680-14685

Kramer, J.M., French, R.P., Park, E.C. und Johnson, J.J. (1990): The *Caenorhabditis elegans* *rol-6* gene, which interacts with the *sqt-1* collagen gene to determine organismal morphology, encodes a collagen. *Molecular Cell Biology* 10, 2081-2089

Krishna, S., Maduzia, L.L. und Padgett, R.W. (1999): Specificity of TGFbeta signaling is conferred by distinct type I receptors and their associated SMAD proteins in *Caenorhabditis elegans*. *Development* 126, 251-260

Kumar, S., Tamura, K., Jakobsen, I.B. und Nei, M. (2001): MEGA2: molecular evolutionary genetics analysis software. *Bioinformatics* 17, 1244-1245

Kupperman, E., An, S., Osborne, N., Waldron, S. und Stainier, D.Y. (2000): A sphingosine-1-phosphate receptor regulates cell migration during vertebrate heart development. *Nature* 406, 192-195

- Lackner, M.R., Kornfeld, K., Miller, L.M., Horvitz, H.R. und Kim, S.K. (1994): A MAP kinase homologue, *mpk-1*, is involved in ras-mediated induction of vulval cell fates in *Caenorhabditis elegans*. *Genes and Development* 8, 160-173
- Larsen, P.L., Albert, P.S. und Riddle, D.L. (1995): Genes that regulate both development and longevity in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 139, 1567-1583
- Lawyer, F.C., Stoffel, S., Saiki, R.K., Myambo, K., Drummond, R., Gelfand, D.H. (1989): Isolation, characterization, and expression in *Escherichia coli* of the DNA polymerase gene from *Thermus aquaticus*. *Journal of Biological Chemistry* 264, 6427-6437
- Lee, R.C., Feinbaum, R.L. und Ambros, V. (1993): The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNA's with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 75, 843-854
- Leibowitz, S.F., und Alexander, J.T. (1998): Hypothalamic serotonin in control of eating behaviour, meal size and body weight. *Biological Psychiatry* 44, 851-864
- Lesa, G.M. und Sternberg, P.W. (1997): Positive and negative tissue-specific signaling by a nematode epidermal growth factor receptor. *Molecular Biology of the Cell* 8, 779-793
- Letunic, I., Goodstadt, L., Dickens, N.J., Doerks, T., Schultz, J., Mott, R., Ciccarelli, F., Copley, R.R., Ponting, C.P. und Bork, P. (2002): Recent improvements to the SMART domain-based sequence annotation resource. *Nucleic Acids Research* 30, 242-244
- Leung-Hagesteijn, C., Spence, A.M., Stern, B.D., Zhou, Y., Su, M.-W., Hedgecock, E.M. und Culotti, J.G. (1992): UNC-5, a transmembrane protein with immunoglobulin and thrombospondin type 1 domains, guides cell and pioneer axon migrations in *C. elegans*. *Cell* 71, 289-299
- Levitan, D. und Greenwald, I. (1998): LIN-12 protein expression and localization during vulval development in *C. elegans*. *Development* 125, 3101-3109
- Liao, D.I., Breddam, K., Sweet, R.M., Bullock, T. und Remington, S.J. (1992): Refined atomic model of wheat serine carboxypeptidase II at 2.2-Å resolution. *Biochemistry* 31, 9796-9812

- Lin, K., Dorman, J.B., Rodan, A. und Kenyon, C. (1997): *daf-16*: An HNF-3/forkhead family member that can function to double the life-span of *Caenorhabditis elegans*. *Science* 278, 1319-1322
- Liu, D.W. und Thomas, J.H. (1994): Regulation of a periodic motor program in *C. elegans*. *Journal of Neuroscience* 14, 1953-1962
- Liu, Z. und Ambros, V. (1991): Alternative temporal control systems for hypodermal cell differentiation in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 350, 162-165
- Livingstone, D. (1991): Studies on the *unc-31* gene of *Caenorhabditis elegans*. *Doctoral thesis*, University of Cambridge, Cambridge U.K.
- Maduzia, L.L., Gumienny, T.L., Zimmerman, C.M., Wang, H., Shetgiri, P., Krishna, S., Roberts, A.F. und Padgett, R.W. (2002): *lon-1* regulates *Caenorhabditis elegans* body size downstream of the *dbl-1* TGF beta signaling pathway. *Developmental Biology* 246, 418-428
- Maeda, I., Kohara, Y., Yamamoto, M. und Sugimoto, A. (2001): Large-scale analysis of gene function in *Caenorhabditis elegans* by high-throughput RNAi. *Current Biology* 11, 171-176
- Maehama, T. und Dixon, J.E. (1998): The tumour suppressor PTEN/MMAC1 dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate. *Journal of Biological Chemistry* 273, 13375-13378
- Malone, E.A. und Thomas, J.H. (1994): A screen for nonconditional dauer-constitutive mutations in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 136, 879-886
- Malone, E.A., Inoue, T., und Thomas, J.H. (1996): Genetic analysis of the roles of *daf-28* and *age-1* in regulating *Caenorhabditis elegans* dauer formation. *Genetics* 143, 1193-1205
- Marshall, C.J. (1994): Signal transduction. Hot lips and phosphorylation of protein kinases. *Nature* 367, 686

Mayer, M.P. und Bukau, B. (1999): Molecular chaperones: the busy life of Hsp90. *Current Biology* 9: R322-R325

Mello, C.C., Kramer, J.M., Stinchcomb, D. und Ambros, V. (1991): Efficient gene transfer in *C. elegans*: Extrachromosomal maintenance and integration of transforming sequences. *EMBO Journal* 10, 3959-3970

Miller, R.E. (1981): Pancreatic neuroendocrinology: peripheral neural mechanisms in the regulation of the Islets of Langerhans. *Endocrine Reviews* 2, 471-494

Miller, L.M., Gallegos, M.E., Morisseau, B.A. und Kim, S.K. (1993): *lin-31*, a *Caenorhabditis elegans* HNF-3/fork head transcription factor homolog, specifies three alternative cell fates in vulval development. *Genes and Development* 7, 933-947

Moore, J., Engelberg, A. und Bairoch, A. (1988): Using PC/GENE for protein and nucleic acid analysis. *Biotechniques* 6, 566-572

Morreau, H., Galjart, N.J., Willemsen, R., Gillemans, N., Zhou, X.Y. und d'Azzo, A. (1992): Human lysosomal protective protein. Glycosylation, intracellular transport, and association with beta-galactosidase in the endoplasmic reticulum. *Journal of Biological Chemistry* 267, 17949-17956

Morris, J.Z., Tissenbaum, H.A. und Ruvkun, G. (1996): A phosphatidylinositol-3OH kinase family member regulating longevity and diapause in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 382, 536-539

Moss, E.G., Lee, R.C. und Ambros, V. (1997): The cold shock domain protein LIN-28 controls developmental timing in *C. elegans* and is regulated by the *lin-4* RNA. *Cell* 88, 637-646

Nash, B., Colavita, A., Zheng, H., Roy, P.J. und Culotti, J.G. (2000): The forkhead transcription factor UNC-130 is required for the graded spatial expression of the UNC-129 TGF-beta guidance factor in *C. elegans*. *Genes and Development* 14, 2486-2500

Nealson, K.H. (1991): Luminescent bacteria symbiotic with entomopathogenic nematodes. In Symbiosis as a source of evolutionary innovation. ed. L. Margulis and R. Fester, MIT Press, Cambridge, Massachusetts, 205-218

Nielsen, H., Jacob Engelbrecht, J., Søren Brunak, S. und von Heijne, G. (1997): Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Engineering* 10, 1-6

O'Dowd, B.F., Heiber, M., Chan, A., Heng, H.H., Tsui, L.C., Kennedy, J.L., Shi, X., Petronis, A., George, S.R. und Nguyen, T. (1993): A human gene that shows identity with the gene encoding the angiotensin receptor is located on chromosome 11. *Gene* 136, 355-360

Ogawa, H., Harada, S., Sassa, T., Yamamoto, H. und Hosono, R. (1998): Functional properties of the *unc-64* gene encoding a *Caenorhabditis elegans* syntaxin. *Journal of Biological Chemistry* 273, 2192-2198

Ogg, S., Paradis, S., Gottlieb, S., Patterson, G.I., Lee, L., Tissenbaum, H.A. und Ruvkun, G. (1997): The fork head transcription factor DAF-16 transduces insulin-like metabolic and longevity signals in *C. elegans*. *Nature* 389, 994-999

Ogg, S. und Ruvkun, G. (1998): The *C. elegans* PTEN homolog, DAF-18, acts in the insulin-receptor-like metabolic signaling pathway. *Molecular Cell* 2, 887-893

Okada, S., O'Brien, J.S. (1968): Generalized gangliosidosis: beta-galactosidase deficiency. *Science* 160, 1002-1004

Okkema, P., White-Harrison, S., Plunger, V., Aryana, A. und Fire, A. (1993): Sequence requirements for myosin gene expression and regulation in *C. elegans*. *Genetics* 135, 385-404

Ollis, D.L., Cheah, E., Cygler, M., Dijkstra, B., Frolow, F., Franken, S.M., Harel, M., Remington, S.J., Silman, I. und Schrag, J. (1992): The alpha/beta hydrolase fold. *Protein Engineering* 5, 197-211

Ottesen, E.A. und Ramachandran, C.D. (1995): Lymphatic filariasis. Infection and disease: Control strategies. *Parasitology Today* 11, 129-131

- Palmeri, S., Hoogeveen, A.T., Verheijen, F.W. und Galjaard, H. (1986) Galactosialidosis: molecular heterogeneity among distinct clinical phenotypes. *American Journal of Human Genetics* 38, 137-148
- Paradis, S. und Ruvkun, G. (1998): *Caenorhabditis elegans* Akt/PKB transduces insulin receptor-like signals from AGE-1 PI3 kinase to the DAF-16 transcription factor. *Genes and Development* 12, 2488-2498
- Paradis, S. und Ruvkun, G. (1999): A PDK1 homolog is necessary and sufficient to transduce AGE-1 PI3 kinase signals that regulate diapause in *Caenorhabditis elegans*. *Genes and Development* 13, 1438-1452
- Parish, S., Fleenor, J., Xu, S., Mello, C. und Fire, A. (2000): Functional anatomy of a dsRNA trigger. Differential requirement for the two trigger strands in RNA interference. *Molecular Cell* 6, 1077-1087
- Patterson, G.I. und Padgett, R.W. (2000): TGF beta-related pathways. Roles in *Caenorhabditis elegans* development. *Trends in Genetics* 16, 27-33
- Patterson, G.I., Koweeck, A., Wong, A., Liu, Y. und Ruvkun, G. (1997): The DAF-3 Smad protein antagonizes TGF- β -related receptor signaling in the *Caenorhabditis elegans* dauer pathway. *Genes and Development* 11, 2679-2690
- Pierce, S.B., Costa, M., Wisotzkey, R., Devadhar, S., Homburger, S.A., Buchman, A.R., Ferguson, K.C., Heller, J., Platt, D.M., Pasquinelli, A.A., Liu, L.X., Doberstein, S.K. und Ruvkun, G. (2001): Regulation of DAF-2 receptor signaling by human insulin and *ins-1*, a member of the unusually large and diverse *C. elegans* insulin gene family. *Genes and Development* 15, 672-686
- Platt, H.M. (1994): The phylogenetic systematics of free-living nematodes. ed. S. Lorenzen, The Ray Society, London, i-ii (Vorwort)
- Popham, J.D. und Webster, J.M. (1979): Aspects of the fine structure of the dauerlarva of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Canadian Journal of Zoology* 57, 794-800

Prasher, D.C., Eckenrode, V.K., Ward, W.W., Prendergast, F.G. und Cormier, M.J. (1992): Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene* 111, 229-233

Pshezhetsky, A.V. und Ashmarina, M. (2001): Lysosomal multienzyme complex: biochemistry, genetics, and molecular pathophysiology. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology* 69, 81-114

Pyne, S. und Pyne, N.J. (2002) Sphingosine 1-phosphate signalling and termination at lipid phosphate receptors. *Biochim Biophys Acta* 1582, 121-131

Reinhart, B.J., Slack, F.J., Basson, M., Pasquinelli, A.E., Bettinger, J.C., Rougvie, A.E., Horvitz, H.R. und Ruvkun, G. (2000): The 21-nucleotide *let-7* RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 403, 901-906

Ren, P., Lim, C.S., Johnsen, R., Albert, P.S., Pilgrim, D. und Riddle, D.L. (1996): Control of *C. elegans* larval development by neuronal expression of a TGF β homolog. *Science* 274, 1389-1391

Riddle, D.L., Swanson, M.M. und Albert, P.S. (1981): Interacting genes in nematode dauer larva formation. *Nature* 290, 668-671

Riddle, D. L. und Albert, P.S. (1997): Genetic and Environmental Regulation of Dauer Larva Development. In *C. elegans* II (ed. D.L. Riddle, T. Blumenthal, B.J. Meyer and J.R. Priess), 739-768 Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York

Rinderknecht, E., und Humbel, R.E. (1978a): The amino acid sequence of human insulin-like growth-factor I and its structural homology with proinsulin. *Journal of Biological Chemistry* 253, 2769-2776

Rinderknecht, E., und Humbel, R.E. (1978b): Primary structure of human insulin-like growth-factor II. *FEBS Letters* 89, 283-286

Rouault, J.-P., Kuwabara, P.E., Sinilnikova, O.M., Duret, L., Thierry-Mieg, D. und Billaud, M. (1999): Regulation of dauer larva development in *Caenorhabditis elegans* by *daf-18*, a homologue of the tumor suppressor PTEN. *Current Biology* 9, 329-332

Ruan, Y., Chen, C., Cao, Y. und Garofalo, R.S. (1995): The *Drosophila* insulin receptor contains a novel carboxyl-terminal extension likely to play an important role in signal transduction. *Journal of Biological Chemistry* 270, 4236-4243

Ruvkun, G., Ambros, V., Coulson, A., Waterston, R., Sulston, J. und Horvitz, H.R. (1989): Molecular genetics of the *Caenorhabditis elegans* heterochronic gene *lin-14*. *Genetics* 121, 501-516

Ruvkun, G. und Hobert, O. (1998): The taxonomy of developmental control in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 282, 2033-2041

Saifee, O., Wei, L. and Nonet, M.L. (1998): The *Caenorhabditis elegans unc-64* locus encodes a syntaxin that interacts genetically with synaptobrevin. *Molecular Biology of the Cell* 9, 1235-1252

Saiki, R.K., Scharf, S., Fallona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A. und Arnheim, N. (1985): Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230, 1350-1354

Santo, P.D., Logan, M.A., Chisholm, A.D. und Jorgensen, E.M. (1999): The inositol triphosphate receptor regulates a 50-second behavioral rhythm in *C. elegans*. *Cell* 98, 757-767

Sasser, J.N. und Freckmann, D.W. (1987): A world perspective on nematology: The role of the society. In *Vistas on nematology* (ed. J.A. Veech und D.W. Dickson), Society of nematologists, Hyattsville, Maryland, 7-14

Savage, C., Das, P., Finelli, A.L., Townsend, S.R., Sun, C.-Y., Baird, S.E. und Padgett, R.W. (1996): *Caenorhabditis elegans* genes *sma-2*, *sma-3* and *sma-4* define a conserved family of transforming growth factor β pathway components. *Proceedings of the National Academy of Science, USA* 93, 790-794

Schackwitz, W.S., Inoue, T. und Thomas, J.H. (1996): Chemosensory neurons function in parallel to mediate a pheromone response in *C. elegans*. *Neuron* 17, 719-728

Schauer, I.E. und Wood, W.B. (1990): Early *C. elegans* embryos are transcriptionally active. *Development* 110, 1303-1317

Scheibel, T. und Buchner, J. (1998): The Hsp90 complex - a superchaperone machine as a novel drug target. *Biochemical Pharmacology* 56, 675-682

Schierenberg, E. und Cassada, R. (1986): Der Nematode *Caenorhabditis elegans*. *Biologie in unserer Zeit* 1, 1-17

Schultz, J., Milpetz, F., Bork, P. und Ponting, C.P. (1998): SMART, a simple modular architecture research tool: identification of signaling domains. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 95, 5857-5864

Schultz-Cherry, S., Chen, H., Mosher, D.F., Misenheimer, T.M., Krutzsch, H.C., Roberts, D.D. und Murphy-Ullrich, J.E. (1995): Regulation of transforming growth factor-beta activation by discrete sequences of thrombospondin 1. *Journal of Biological Chemistry* 270, 7304-7310

Schultz-Cherry, S., Ribeiro, S., Gentry, L. und Murphy-Ullrich, J.E. (1994): Thrombospondin binds and activates the small and large forms of latent transforming growth factor-beta in a chemically defined system. *Journal of Biological Chemistry* 269, 26775-26782

Scowden, E.B., Schaffner, W. und Stone, W.J. (1978): Overwhelming strongyloidiasis: an unappreciated opportunistic infection. *Medicine (Baltimore)* 57, 527-544

Sechler, J.L. und Schwarzbauer, J.E. (1998): Control of cell cycle progression by fibronectin matrix architecture. *Journal of Biological Chemistry* 273, 25533-25536

Serafini, T., Kennedy, T.E., Galko, M.J., Mirzayan, C., Jessell, T.M. und Tessier-Lavigne, M. (1994): The netrins define a family of axon outgrowth-promoting proteins homologous to *C. elegans* UNC-6. *Cell* 78, 409-424

Seydoux, G., Savage, C. und Greenwald, I. (1993): Isolation and characterization of mutations causing abnormal eversion of the vulva in *Caenorhabditis elegans*. *Developmental Biology* 157, 423-436

Sharma, A.M., Janke, J., Gorzelniak, K., Engeli, S. und Luft, F.C. (2002): Angiotensin blockade prevents type 2 diabetes by formation of fat cells. *Hypertension* 40, 609-611

Shibatohge, M., Kariya, K., Liao, Y., Hu, C.D., Watari, Y., Goshima, M., Shima, F. und Kataoka, T. (1998): Identification of PLC210, a *Caenorhabditis elegans* phospholipase C, as a putative effector of Ras. *Journal of Biological Chemistry* 273, 6218-6222

Short, J.M., Fernandez, J.M., Sorge, J.A. und Huse, W.D. (1988): Lambda ZAP: a bacteriophage lambda expression vector with *in vivo* excision properties. *Nucleic Acids Res.* 16, 7583-7600

Simske, J.S. und Kim, S.K. (1995): Sequential signalling during *Caenorhabditis elegans* vulval induction. *Nature* 375, 142-146

Skidgel, R.A. (1988): Basic carboxypeptidases: regulators of peptide hormone activity. *Trends in Pharmacological Science* 9, 299-304

Slack, F.J., Basson, M., Liu, Z., Ambros, V., Horvitz, H.R. und Ruvkun, G. (2000): The *lin-41* RBCC gene acts in the *C. elegans* heterochronic pathway between the *let-7* regulatory RNA and the LIN-29 transcription factor. *Molecular Cell* 5, 659-669

Sladek, F.M., Melian, A. und Howard-Flanders, P. (1989): Incision by UvrABC excinuclease is a step in the path to mutagenesis by psoralen crosslinks in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 86; 3982-3986

Smyth, J.D. (1994): Introduction to animal parasitology. *Hodder and Stoughton*, London

Smith, J.L. (1907): On the simultaneous staining of neutral fat and fatty acids by oxazine dyes. *The Journal of Pathology and Bacteriology* 12, 1-4

Smith, J.L. (1910): The staining of fat by Nile-Blue sulphate. *The Journal of Pathology and Bacteriology* 15, 53-55

Snow, M.I. und Larsen, P.L. (2000): Structure and expression of *daf-12*: a nuclear hormone receptor with three isoforms that are involved in development and aging in *Caenorhabditis elegans*. *Biochimica et Biophysica Acta* 1494, 104-116

Starz-Gaiano, M., Cho, N.K., Forbes, A. und Lehmann, R. (2001): Spatially restricted activity of a *Drosophila* lipid phosphatase guides migrating germ cells. *Development* 128, 983-991

Stein, L., Sternberg, P., Durbin, R., Thierry-Mieg, J. und Spieth, J. (2001): WormBase: network access to the genome and biology of *Caenorhabditis elegans*. *Nucleic Acids Research* 29, 82-86

Sternberg, P.W. (1988): Lateral inhibition during vulval induction in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 335, 551-554

Sternberg, P.W. und Horvitz, H.R. (1986): Pattern formation during vulval development in *Caenorhabditis elegans*. *Cell* 44, 761-772

Sternberg, P.W. und Horvitz, H.R. (1989): The combined action of two intercellular signaling pathways specifies three cell fates during vulval induction in *C. elegans*. *Cell* 58, 679-693

Stinchcomb, D.T., Shaw, J.E., Carr, S.H. und Hirsh, D. (1985): Extrachromosomal DNA transformation of *Caenorhabditis elegans*. *Molecular Cell Biology* 5, 3484-3496

Stroschein, S.L., Wang, W., Zhou, S., Zhou, Q. und Luo, K. (1999): Negative feedback regulation of TGF- β signaling by the SnoN oncoprotein. *Science* 286, 771-774

Su, M., Merz, D.C., Killeen, M.T., Zhou, Y.T., Zheng, H., Kramer, J.M., Hedgecock, E.M. und Culotti, J.G. (2000): Regulation of the UNC-5 netrin receptor initiates the first reorientation of migrating distal tip cells in *Caenorhabditis elegans*. *Development* 127, 585-594

Sulston, J.E., Albertson, D.G. und Thomson, J.N. (1980). The *C. elegans* male: post-embryonic development of non-gonadal structures. *Developmental Biology* 78, 542-576

Sulston, J., Mallet, F., Staden, R., Durbin, R., Horsnell, T. und Coulson, A. (1988): Software for genome mapping by fingerprinting techniques. *CABIOS* 4, 125-132

Sulston, J.E., Schierenberg, E., White, J.G. und Thomson, J.N. (1983). The embryonic cell lineage of the nematode *C. elegans*. *Developmental Biology* 100, 64-119

Sulston, J.E. und Brenner, S. (1974): The DNA of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 77, 95-104

Sulston, J.E. und Horvitz, H.R. (1977): Post-embryonic cell lineages of the nematode *C. elegans*. *Developmental Biology* 56, 110-156

Sulston, J.E. und White, J.G. (1980): Regulation and cell autonomy during postembryonic development of *Caenorhabditis elegans*. *Developmental Biology* 78, 577-597

Sun, Y., Liu, X., Eaton, E.N., Lane, W.S., Lodish, H.F. und Weinberg, R.A. (1999a): Interaction of the Ski oncoprotein with Smad3 regulates TGF- β signaling. *Molecular Cell* 4, 499-509

Sun, Y., Liu, X., Ng-Eaton, E., Lodish, H.F. und Weinberg, R.A. (1999b): SnoN and Ski protooncogenes are rapidly degraded in response to transforming growth factor β signaling. *Proceedings of the National Academy of Science, USA* 96, 12442-12447

Suzuki, Y., Yandell, M.D., Roy, P.J., Krishna, S., Savage-Dunn, C., Ross, R.M., Padgett, R.W. und Wood, W.B. (1999): A BMP homolog acts as a dose-dependent regulator of body size and male tail patterning in *Caenorhabditis elegans*. *Development* 126, 241-250

Swanson, M.M. und Riddle, D.L. (1981): Critical periods in the development of the *Caenorhabditis elegans* dauer larva. *Developmental Biology* 84, 27-40

Sze, J.Y., Victor, M., Loer, C., Shi, Y. und Ruvkun, G. (2000): Food and metabolic signalling defects in a *Caenorhabditis elegans* serotonin-synthesis mutant. *Nature* 403, 560-564

Tabara, H., Motohashi, T. und Kohara, Y. (1996): A multi-well version of *in situ* hybridization on whole mount embryos of *Caenorhabditis elegans*. *Nucleic Acids Research* 24, 2119-2124

Tabara, H., Grishok, A. und Mello, C.C. (1998): RNAi in *C. elegans*: soaking in the genome sequence. *Science* 282, 430-431

Takayanagi, R., Ohnaka, K., Sakai, Y., Nakao, R., Yanase, T., Haji, M., Inagami, T., Furuta, H., Gou, D.F., Nakamuta, M. *et al.* (1992): Molecular cloning, sequence analysis and expression of a cDNA encoding human type-1 angiotensin II receptor. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 183, 910-916

Tan, F., Morris, P.W., Skidgel, R.A., Erdos, E.G. (1993): Sequencing and cloning of human prolylcarboxypeptidase (angiotensinase C). Similarity to both serine carboxypeptidase and prolylendopeptidase families. *Journal of Biological Chemistry* 268, 16631-16638

ten Dijke, P., Miyazono, K. und Heldin, C.H. (1996): Signaling via heteroligomeric complexes of type I and type II serine/threonine kinase receptors. *Current opinions in Cell Biology* 8, 139-145

The *C. elegans* Sequencing Consortium (1998). Genome sequence of the nematode *C. elegans*: A platform for investigating biology. *Science* 282, 2012-2018

Thomas, J.H. (1990): Genetic analysis of defecation in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 124, 855-872

Thomas, J.H., Birnby, D. und Vowels, J. (1993): Evidence for parallel processing of sensory information controlling dauer formation in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 134, 1105-1117

Thompson, J.D., Higgins, D.G. und Gibson, T.J. (1994): CLUSAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 11, 4673-4680

- Timmons, L., Court, D.L. und Fire, A. (2001): Ingestion of bacterially expressed dsRNAs can produce specific and potent genetic interference in *Caenorhabditis elegans*. *Gene* 263, 103-112
- Timmons, L. und Fire, A. (1998): Specific interference by ingested dsRNA. *Nature* 395, 854
- Tissenbaum, H.A. und Ruvkun, G. (1998): An insulin-like signaling pathway affects both longevity and reproduction in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 148, 703-717
- Tissenbaum, H.A., Hawdon, J., Perregaux, M., Hotez, P., Guarente, L. und Ruvkun, G. (2000): A common muscarinic pathway for diapause recovery in the distantly related nematode species *Caenorhabditis elegans* and *Ancylostoma caninum*. *Proceedings of the national academy of science USA* 97, 460-465
- Toker, A. und Cantley, L.C. (1997): Signalling through the lipid products of phosphoinositide-3-OH kinase. *Nature* 387: 673-676
- Tranchemontagne, J., Michaud, L. und Potier, M. (1990): Deficient lysosomal carboxypeptidase activity in galactosialidosis. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 168, 22-29
- Trent, C., Purnell, B., Gavinski, S., Hagemann, J., Chamblin, C. und Wood, W.B. (1991): Sex-specific transcriptional regulation of the *C. elegans* sex-determining gene *her-1*. *Mechanisms in Development* 34, 43-56
- van der Horst GT, Galjart NJ, d'Azzo A, Galjaard H, Verheijen FW. (1989): Identification and *in vitro* reconstitution of lysosomal neuraminidase from human placenta. *Journal of Biological Chemistry* 264, 1317-1322
- Verheijen, F., Brossmer, R. und Galjaard, H. (1982): Purification of acid beta-galactosidase and acid neuraminidase from bovine testis: evidence for an enzyme complex. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 108, 868-875
- Verheijen, F.W., Palmeri, S., Hoogeveen, A.T. und Galjaard, H. (1985): Human placental neuraminidase. Activation, stabilization and association with beta-galactosidase and its protective protein. *European Journal of Biochemistry* 149, 315-321

von Figura, K. (1991): Molecular recognition and targeting of lysosomal proteins. *Current Opinions in Cell Biology* 3, 642-646

Vowels, J.J. und Thomas, J.H. (1992): Genetic analysis of chemosensory control of dauer formation in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 130, 105-123

Wadsworth, W.G., Bhatt, H., Hedgecock, E.M. (1996): Neuroglia and pioneer neurons express *unc-6* to provide global and local netrin cues for guiding migrations in *C. elegans*. *Neuron* 16, 35-46

Wang, C.H., Koch, A.L. (1978): Constancy of growth on simple and complex media. *Journal of Bacteriology* 136, 969-975

Wenger, D.A., Tarby, T.J., Wharton, C. (1978): Macular cherry-red spots and myoclonus with dementia: coexistent neuraminidase and beta-galactosidase deficiencies. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 82, 589-595

Wightman, B., Bürglin, T.R., Gatto, J., Arasu, P. und Ruvkun, G. (1991): Negative regulatory sequences in the *lin-14* 3'-untranslated region are necessary to generate a temporal switch during *Caenorhabditis elegans* development. *Genes and Development* 5, 1813-1824

Wightman, B., Ha, I. und Ruvkun, G. (1993): Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell* 75, 855-862

Wilkinson, H.A. und Greenwald, I. (1995): Spatial and temporal patterns of *lin-12* expression during *C. elegans* hermaphrodite development. *Genetics* 141, 513-526

Wolkow, C., Kimura, K., Lee, M. und Ruvkun, G. (2000): Regulation of *C. elegans* life-span by insulin-like signaling in the nervous system. *Science* 290, 147-150

Wood, W.B., ed. (1988): The nematode *Caenorhabditis elegans*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, New York

Woodcock, D.M., Crowther, P.J., Doherty, J., Jefferson, S., Decruz, E., Noyer-Weidner, M., Smith, S.S., Michael, M.Z. und Graham, M.W. (1989): Quantitative evaluation of *Escherichia coli* host strains for tolerance to cytosine methylation in plasmid and phage recombinants. *Nucleic Acids Res.* 17, 3469-3478

Wu, Y., Han, M. und Guan, K.-L. (1995): MEK-2, a *Caenorhabditis elegans* MAP kinase kinase, functions in Ras-mediated vulval induction and other developmental events. *Genes and Development* 9, 742-755

Wu, Y. und Han, M. (1994): Suppression of activated *let-60* ras defines a role of *Caenorhabditis elegans sur-1* MAP kinase in vulval differentiation. *Genes and Development* 8, 147-159

Yandell, M.D., Edgar, L.G. und Wood, W.B. (1994): Trimethylpsoralen induces small deletion mutations in *Caenorhabditis elegans*. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 91; 1381-1385

Yeh, W.H. (1991): Genes acting late in the signaling pathway for *Caenorhabditis elegans* dauer larval development. *Doctoral Thesis*. University of Missouri, Columbia, USA

Zamore, P.D., Tuschl, T., Sharp, P.A. und Bartel, D.P. (2000): RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21-23 nucleotide intervals. *Cell* 101, 25-33

Zhou, X.Y., Galjart, N.J., Willemsen, R., Gillemans, N., Galjaard, H. und d'Azzo, A. (1991): A mutation in a mild form of galactosialidosis impairs dimerization of the protective protein and renders it unstable. *EMBO Journal* 10, 4041-4048

Zioni(Cohen-Nissan), S., Glazer, I. und Segal, D. (1992): Life cycle and reproductive potential of the nematode *Heterorhabditis bacteriophora* strain HP88. *Journal of Nematology* 24, 352-358

Zwaal, R.R., Mendel, J.E., Sternberg, P.W. und Plasterk, R.H.A. (1997): Two neuronal G proteins are involved in chemosensation of the *C. elegans* dauer inducing pheromone. *Genetics* 145, 715-727

7 ABBILDUNGEN

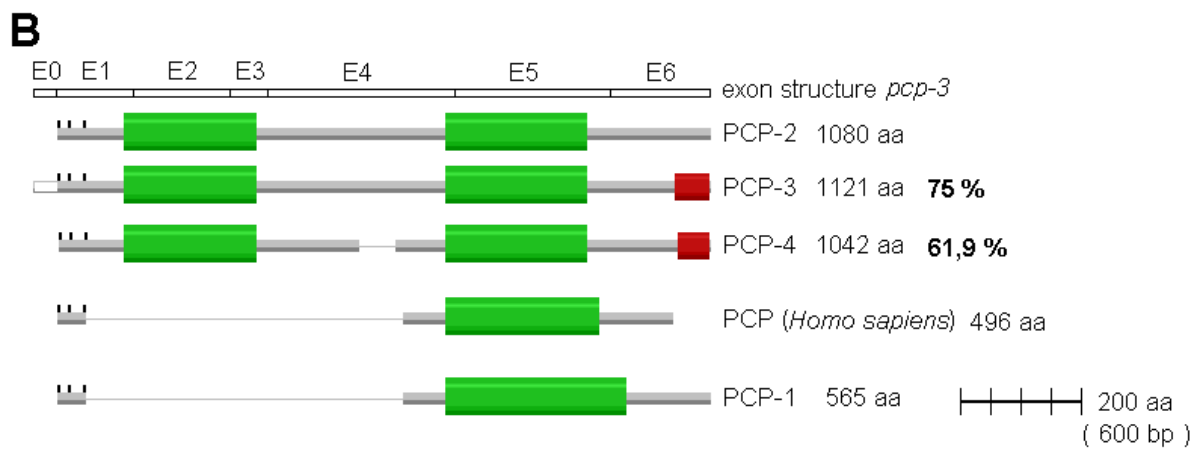
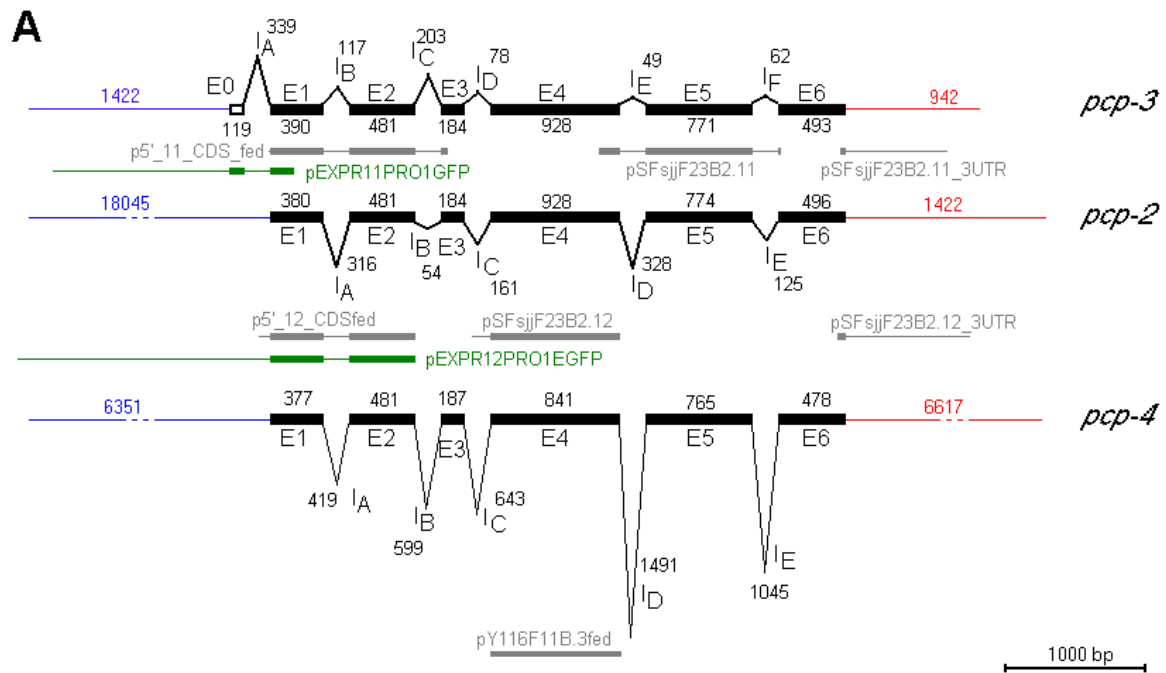


Abbildung 1: Genstruktur und Proteinprimärstruktur lysosomaler Carboxypeptidasen von *C. elegans*

A: codierende Sequenz von *pcp-2*, *pcp-3* und *pcp-4*, die Exons sind durch die schwarzen Boxen dargestellt, ihre Länge ist maßstabsgetreu dargestellt. Um dabei vergleichende Betrachtung zu ermöglichen, ist die Introngröße durch die vertikale Ausdehnung beschrieben. Die genauen Größen der Einzelteile sind zusätzlich angegeben in bp. Blau dargestellt ist die gesamte 5' nicht-translatierte Region bis zum vorherigen Gen, das gleiche gilt für die 3'UTR des Gens (rot). Unterhalb jeder CDS sind die genomischen Bereiche angedeutet, die für GFP-Reporter (grün) und RNAi Experimente (grau) in Plasmiden verwendet wurden. Die Bezeichnung bei jedem Fragment entspricht dem Namen des experimentell relevanten kompletten Plasmids.

B: Proteinprimärstruktur; die Anordnung wurde senkrecht untereinander unter Berücksichtigung der Homologien zueinander gewählt. Die Exonstruktur von *pcp-3* ist oberhalb dargestellt. Zu Beginn jeder Primärstruktur findet sich ein Signalpeptid und eine Propeptidsequenz (schwarze Abgrenzungen). Die Prozentangaben beziehen sich auf den Vergleich zu *pcp-2* in der Aminosäuresequenz. Grün markiert sind die α/β -Hydrolase Domänen, rot markiert ist die DUF274 Domäne. Die dünne verbindende Linie in den unteren drei Proteinen bezeichnet eine Lücke in der Homologie gemäß Sequenzvergleich.

In A und B ist das erste Exon von *pcp-3* in einem nicht ausgefüllten Rahmen dargestellt, da diese für 41 aa kodierende Sequenz untypisch gegenüber den anderen Proteinen ist, ich bezeichne es deshalb auch mit E0 (siehe dazu auch den Text).

Die Daten entstammen The *C. elegans* Sequencing Consortium (1998). Die Darstellung in B war möglich nach Proteinsequenzvergleich an der Pfam Datenbank (Bateman *et al.*, 2002), die *Mus musculus* α/β -Hydrolasefaltungseinheit (Acc.No. PF00561) ist die Referenzdomäne, Proteinsequenzvergleich mit PcGene (Moore *et al.*, 1988) und BLAST Sequenzvergleich von α/β -Hydrolase Proteinen in *C. elegans* (Altschul *et al.*, 1997).

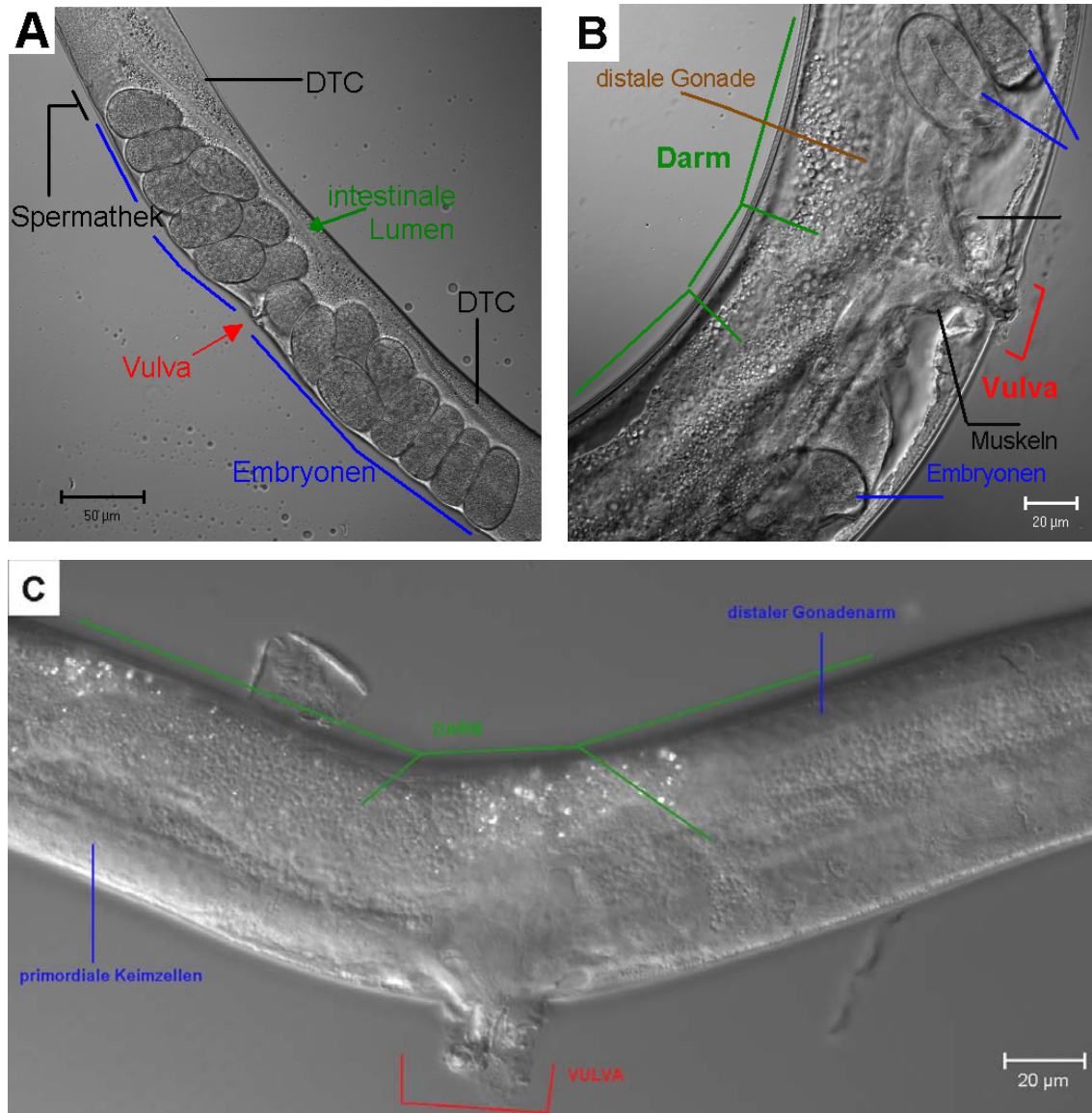


Abbildung 2: Phänotyp bei Inaktivierung des *pcp-3* Gens durch RNAi

A: Gonade und Vulva eines adulten Hermaphroditen des Wildtyps N2

Seitlich der Vulva zweigen zwei Gonadenarme ab, die in dieser unmittelbaren Nähe mit Embryonen gefüllt sind. Es folgt beidseits die Spermatheka, in der die Oozyten selbst befruchtet werden. Hier nicht dargestellt ist die Reihe der Oozyten vor der Spermatheka, die die weitere dorsale Ausdehnung der Gonade einnehmen. Mit der Umkehrung der Gonade bis zur Gonadenspitze, an der somatischen distalen Tipzelle (DTC), befinden sich die unterschiedlichen Meiosestadien bis hin zu den primordialen Keimzellen in unmittelbarer DTC Nähe. Der ventrale Gonadenbereich ist hier außerhalb des Fokus. In C ist die typische Struktur der Zellkerne des gonadalen Syncytiums deutlicher erkennbar.

B: Adulter Hermaphrodit des Stammes EC315 (*daf-2(m41)* III ; *myo-2::d1egfp*), dargestellt nach RNAi- Inaktivierung des *pcp-3*-Gens und durchlaufenem Dauerlarvenstadium

Die Gonadenstruktur ist weitgehend normal, jedoch beginnt sich die Vulva auszustülpen. Man erkennt, daß der Darm gegen die Vulva drückt. In diesem Bild sind zwei Arme der Vulvamuskulatur von insgesamt acht Armen zu erkennen. Dieses Tier beginnt spät, die Vulva nach außen auszustülpen (Ppv), erkennbar an den späten Embryonalstadien in der Gonade, z.B. das Schlinge Stadium bei den beiden oberen Embryonen.

C: Deutlich fortgeschrittene Ausstülpung der Vulva in EC315 nach RNAi von *pcp-3*

Die Vulvastruktur ist aufgerissen, der Darm drückt nach außen. Hier ist zudem eine Degradation der Gonade zu erkennen, die linke posterior gerichtete Gonadenseite ist nur ventral ausgedehnt ohne Reflexion, der anteriore Gonadenarm besitzt die U-Form, war aber nicht funktional, bis zur Vulva besteht auch dieser Arm nur aus der wabenartigen Struktur der Keimzellen.

A und B: konfokale Laser-Scanning Mikroskopie mit LSM510 (Zeiss), C: SPOT RT CCD Kamera

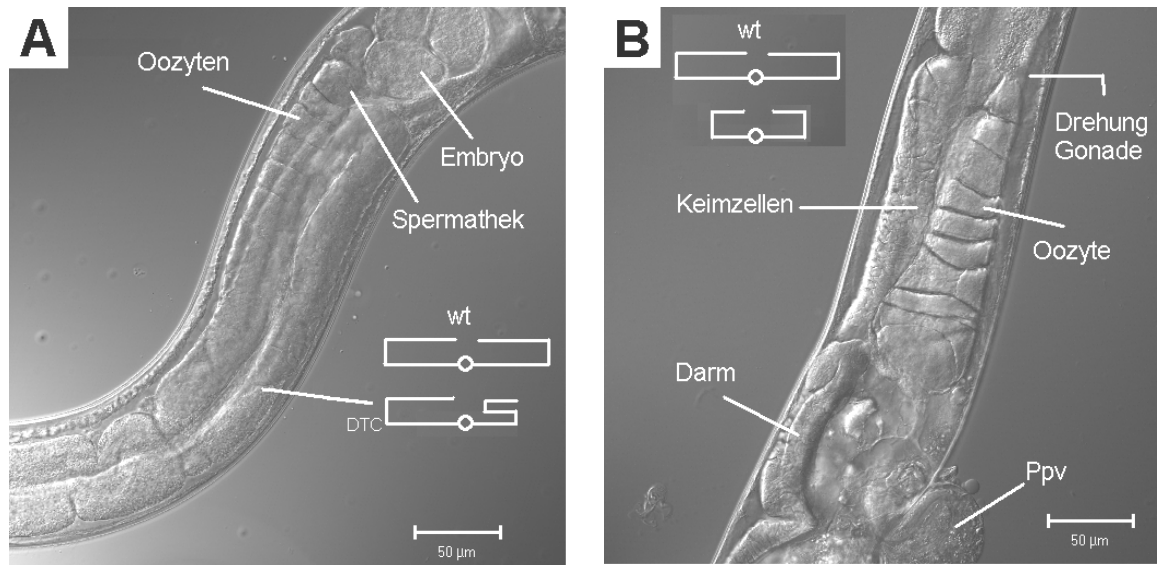


Abbildung 3: RNAi Phänotyp von *pcp-2* im genetischen *daf-1(m40)* Hintergrund

In diesen Abbildungen handelt es sich um Adulte mit Dauerarrest in ihrer Entwicklungsgeschichte, das ist für gonadale Phänotypen jedoch belanglos. Man erkennt eine Gonadenstruktur, die zwei Umkehrungen aufweist, dennoch vollständig funktional ist (A). In einem stärkeren Phänotyp Adulten ist die Gonadenstruktur eher degradiert, Entwicklung bis zur Ausprägung von Oozyten findet statt, jedoch sind keine Embryonen sichtbar, an der entsprechenden Stelle findet man eine eher vakuoläre Struktur (B). Das Schema vergleicht die vorliegende Gonadenstruktur mit der des Wildtyps. Der Kreis symbolisiert die Vulva, links den anterioren, rechts den posterioren Gonadenarm. Die Längsausdehnung der Gonadenstruktur ist etwa nur halb so weit, wie bei Wildtyp (wt) Nematoden. Eine Wildtypansicht ist in Abbildung 2A zu sehen.

Konfokale Laserscanning Mikroskopie mit LSM510 (Zeiss).

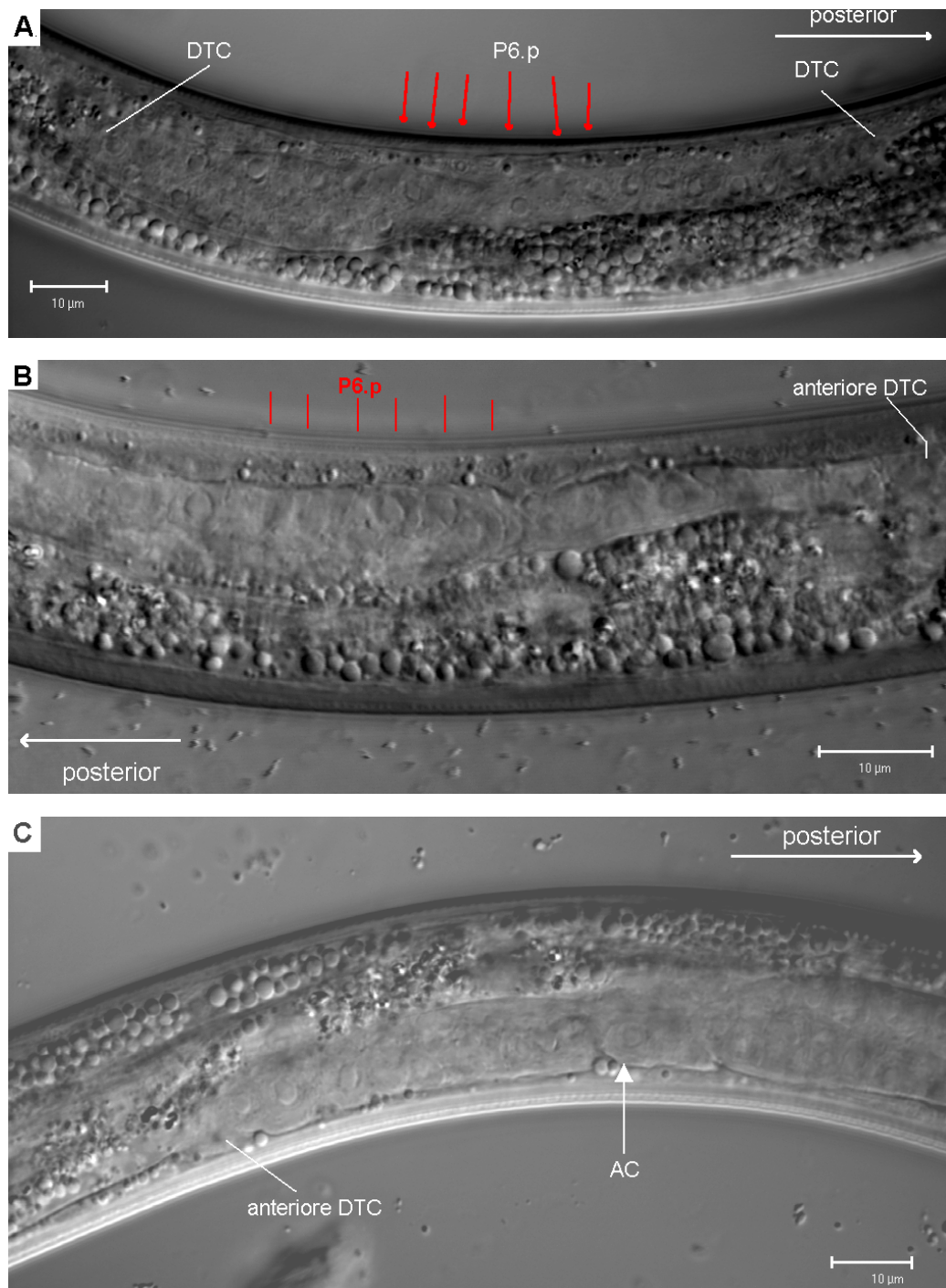


Abbildung 4: Gonade und VPCs von *daf-2(m41)* Dauerlarven des Stammes DR1564 nach RNAi Inaktivierung der Gene *pcp-2* und *pcp-3*

A: Normale *daf-2(m41)* Dauerlarve; B: Dauerlarve nach RNAi von *pcp-3*; C: Dauerlarve nach RNAi gegen *pcp-2*. In A und B sind die VPCs markiert, in C die Vulvaankerzelle (AC). Beim Dauerarrest sind stets 6 VPCs vorhanden, in C liegen sie jedoch außerhalb des Fokus und sind nicht sichtbar. Bei RNAi Inaktivierung von *pcp-2* bzw. *pcp-3* erfolgt eine etwas stärkere gonadale Proliferation mit posteriorer Ausdehnung.

Konfokale Laserscanning Mikroskopie mit LSM510 (Zeiss).

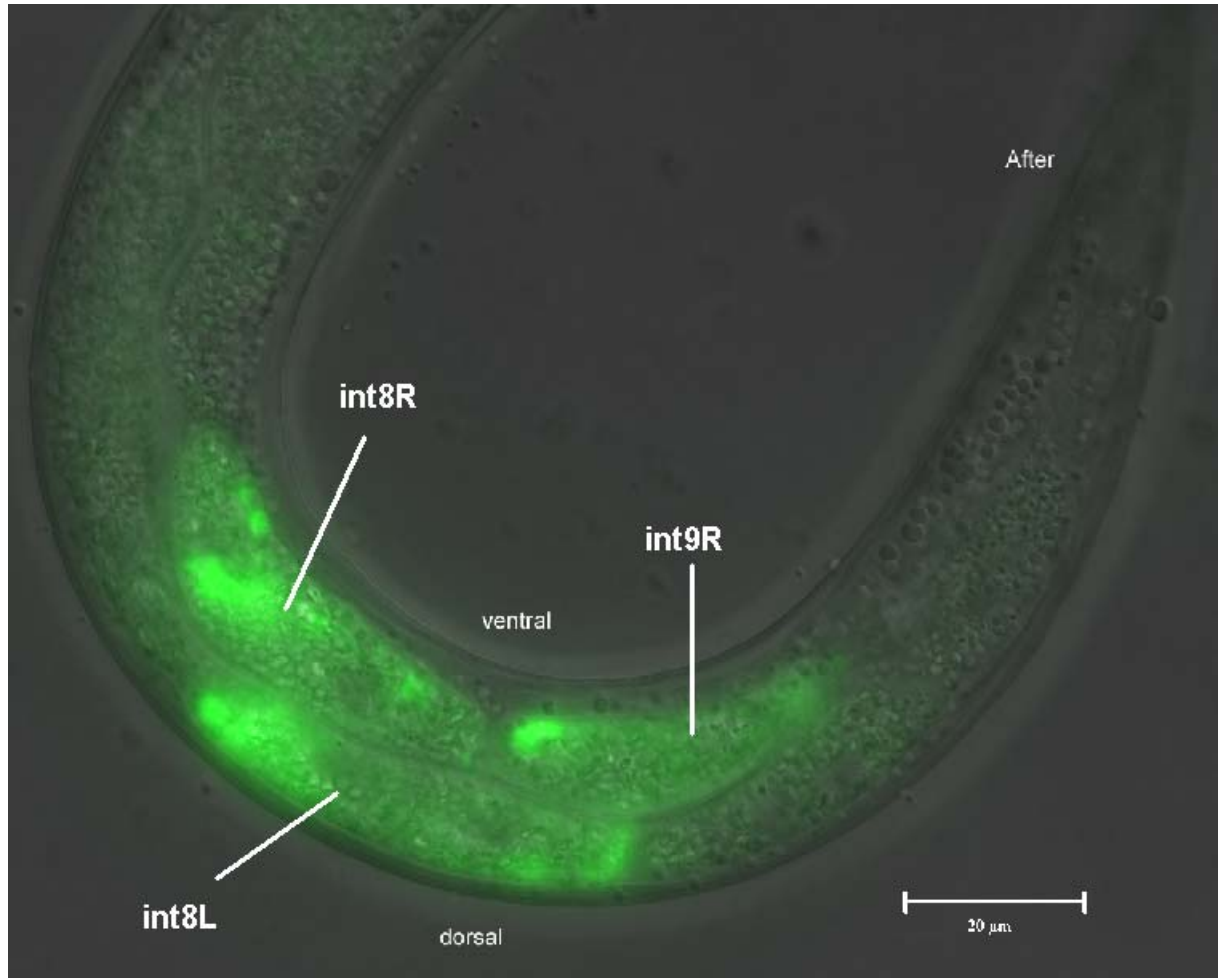


Abbildung 5: Expression von *pcp-2::gfp* in drei Darmzellen der Dauerlarve

Diese Dauerlarve zeigt *gfp* Expression unter Kontrolle des *pcp-2* Promotors. Die Expression ist auf drei posterior gelegene Darmzellen beschränkt, int8L, int8R und int9R. Es handelt sich um diejenigen Zellen, in deren Nachbarschaft sich die Entwicklungsrichtung der sich ausdehnenden Gonade ändern wird. DIC Kontrast- und Fluoreszenz Aufnahme sind übereinander gelegt worden.

Die Aufnahme entstand mit einer SPOT RT CCD Kamera am LSM510 Stativ.

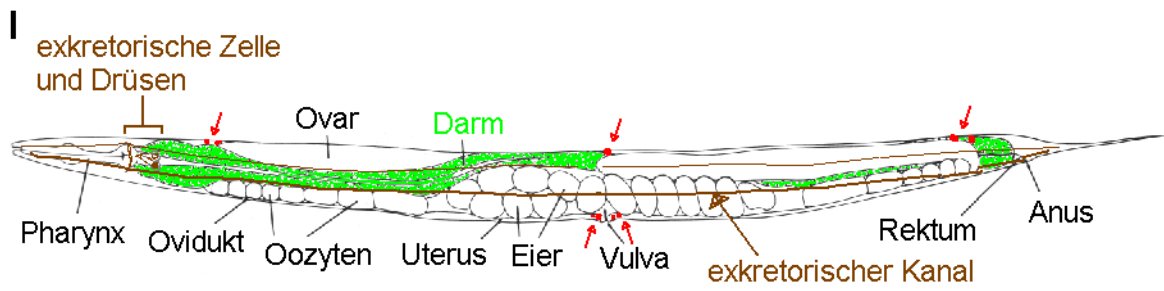
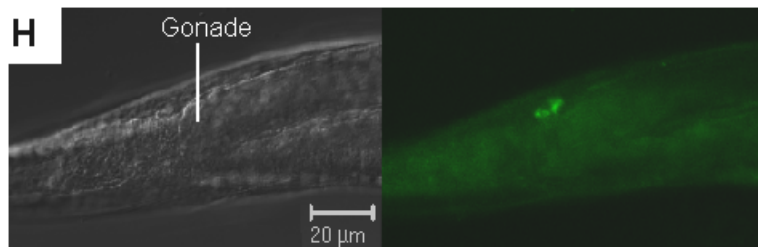
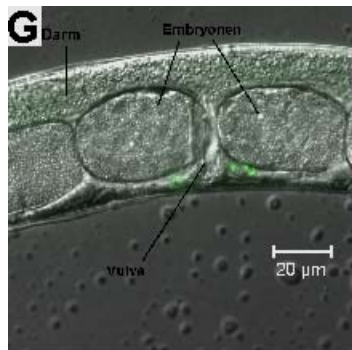
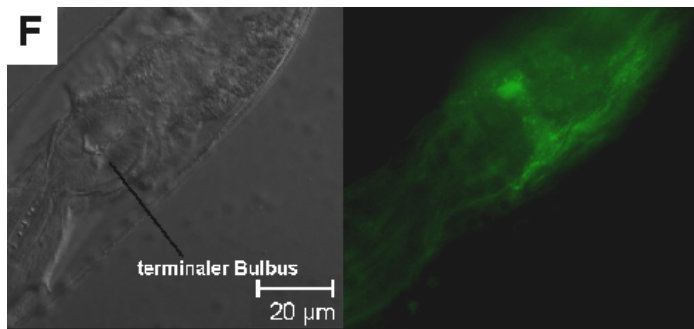
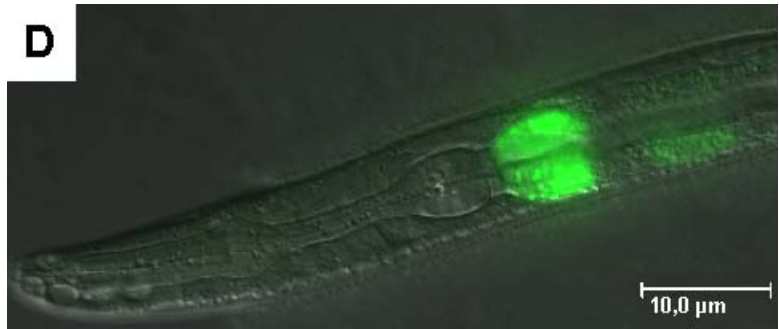
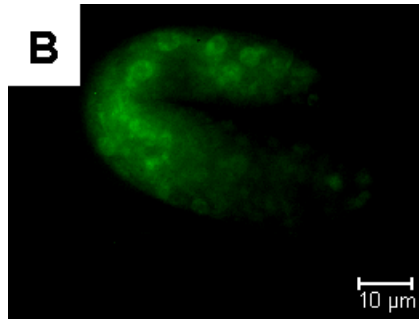
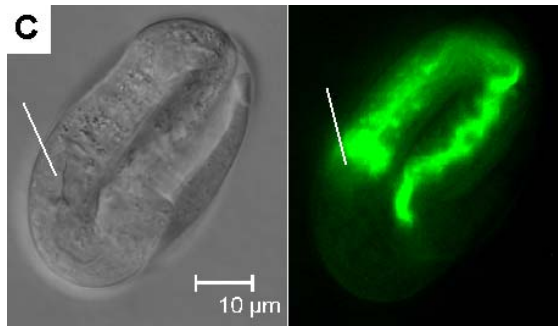
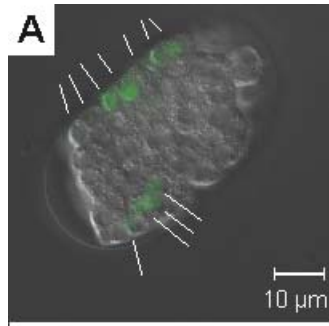


Abbildung 6: Expression von *pcp-3::gfp*

In A-C erkennt man embryonale Expression. Expression beginnt kurz vor der Gastrulation in vereinzelt Zellen (Markierungsstriche) (A), möglicherweise assoziiert mit der später beobachteten Darmexpression im Brezelstadium der Embryonalentwicklung, der terminale Bulbus des Pharynx ist markiert (C). Abbildung B zeigt das vorrausgehende Schlingestadium, hier erkennt man in der Mitte des Wurms eine Reihe an großen stark leuchtenden Zellen, evtl. die Darmzellen.

In D und E ist Darmexpression im L1 Larvalstadium gezeigt. Da es sich im Wurmstamm um ein extrachromosomales Array handelt, welches das Expressionskonstrukt trägt, tritt Variabilität im Expressionsmuster auf. Insbesondere in D erkennt man 2 leuchtende Darmzellen, wobei sich hauptsächlich die Expression auf den großen polyploiden Nukleus konzentriert.

F: Der starke grün leuchtende Bereich markiert den Kern der exkretorischen Zelle eines Adulten im Bereich des terminalen Bulbus des Pharynx. Cytoplasmatische GFP Fluoreszenz dehnt sich hier auch auf die lateral entlang des gesamten Nematodenkörpers verlaufenden exkretorischen Kanäle aus (nur schwach sichtbar).

G: adulte Expression nahe der Vulva, die Vulva selbst in Aufsicht

H: Ebenfalls adulte Expression auf der dorsalen Seite oberhalb der Gonadenumdrehung posterior; symmetrisch dazu existiert diese Expression auch an der anterioren Gonade (nicht gezeigt, siehe Schema in I).

I: Schema eines adulten Hermaphroditen. Farblich markiert sind alle beobachteten Expressionsorte. In Grün der Darm, in Braun das gesamte exkretorische System, teilweise zeigten auch die exkretorischen Drüsen GFP Fluoreszenz. In Rot sind die Bereiche markiert, die in Vulva und nahe der Gonaden Expression zeigten, deren Zellzugehörigkeit aber ungeklärt ist. In seltenen Fällen war Expression auf der dorsalen Seite gegenüber der Vulva zu erkennen in Form eines einzelnen Punktes.

Abbildung A-G wurde mit der SPOT RT Kamera aufgenommen, H mit dem LSM510 Modul.

In A, D, G und E wurde Nomarski DIC Kontrast mit der GFP Fluoreszenz Aufnahme übereinandergelegt, B zeigt nur die Fluoreszenzaufnahme, in C, F und H sind DIC Kontrast und Fluoreszenz nebeneinander zu sehen. Basis für I ist das Schema aus Sulston und Horvitz (1977).

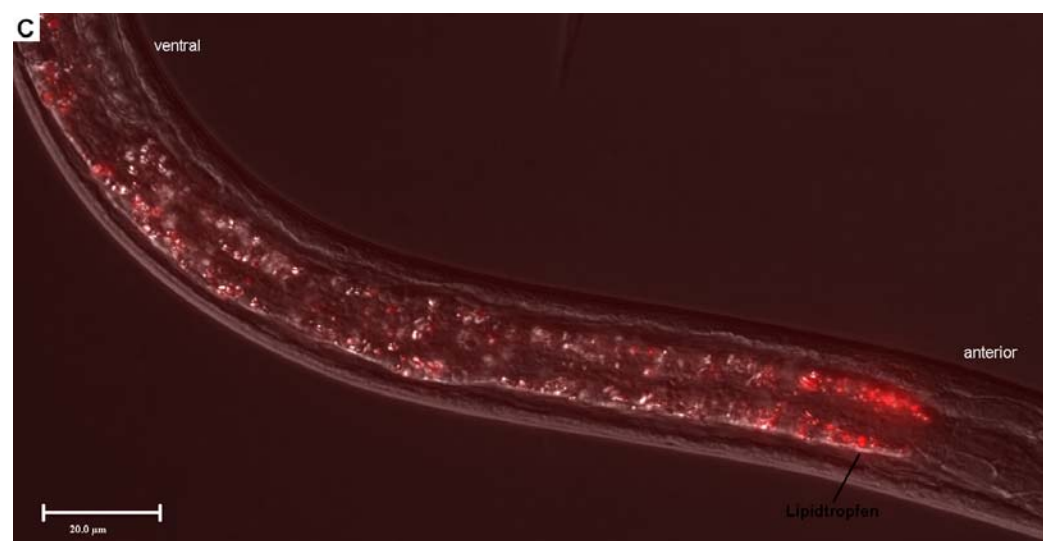
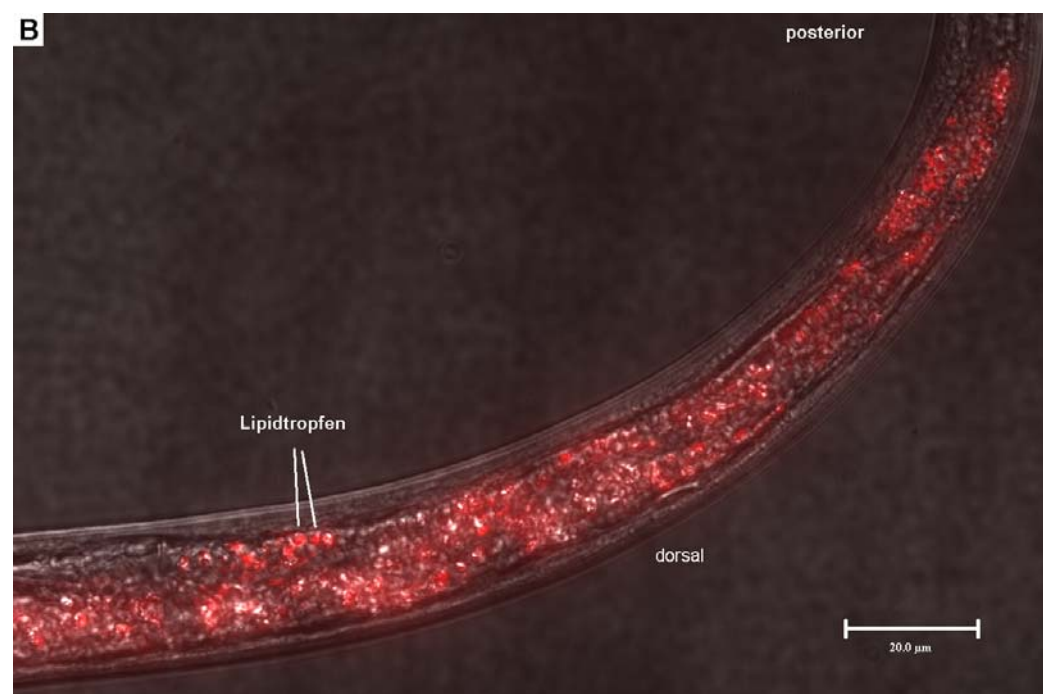
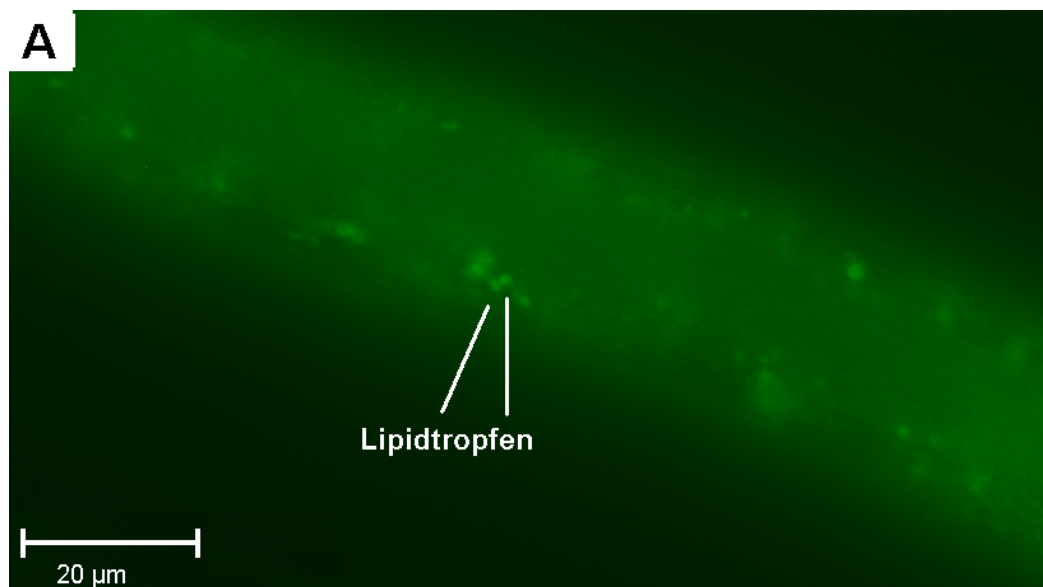


Abbildung 7: Verringerte Lipidspeicherung in Dauerlarven nach
Inaktivierung von *pcp-3* durch RNAi

Die Dauerlarven mit *daf-2(m41)* Genotyp wurden mit Nile Red zur Darstellung der Lipidtropfen gefärbt.

A: Darm einer Dauerlarve bei spezifischer Anregung der Nile Red Fluoreszenz bei 488 nm

Die heller leuchtenden grünen Flecke entsprechen den Lipidtropfen, es stört jedoch die Autofluoreszenz des Darmes. Fluoreszenzaufnahme

B: Darm einer Dauerlarve bei Anregung der Nile Red Fluoreszenz bei 546 nm und Registrierung bei 590 nm.

Die weniger spezifische Anregungswellenlänge macht die Lipidtropfen deutlicher sichtbar. Überlagerung von Interferenzkontrast und Fluoreszenzaufnahme.

C: Darm einer Dauerlarve nach Inaktivierung von *pcp-3* durch RNAi

Wellenlängen des anregenden und des registrierten Lichtes wie B. Belichtungszeit gegenüber B deutlich erhöht. Man erkennt, daß die Zahl und Dichte der Lipidtropfen gegenüber der Kontrolle (B) deutlich herabgesetzt ist.

Aufnahmen mit CCD Kamera SPOT RT auf LSM510-Stativ (Zeiss)

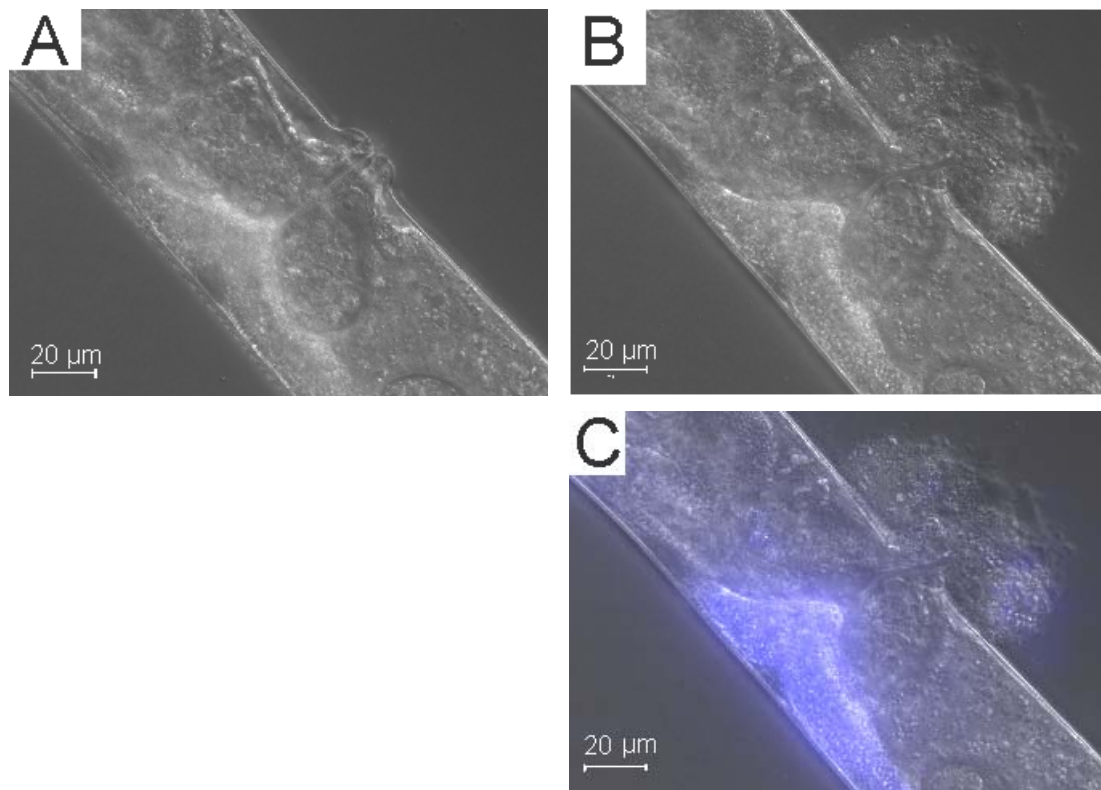


Abbildung 8: RNAi von C53D6.4, dem homologen Angiotensin II Rezeptor von *C. elegans*

Es handelt sich hier in A-C um das gleiche Tier. Zunächst ist eine normal strukturierte Vulva vorhanden (A), jedoch wurden über diese Vulva keine Embryonen abgelegt. Die Vulva riß nach einiger Zeit direkt unter dem Deckglas des Präparats auf (B). Dieses Schicksal erfuhren auch einige Tiere direkt auf der Kulturplatte. Die Aufnahme (C) mit der Autofluoreszenz des Darms bei einer Anregungswellenlänge von 365 ± 12 nm zeigt, daß sich seitlich des Vulvaaufrisses der Darminhalt entleerte, erkennbar an der bläulichen Tönung. Bereits Abbildung A läßt eine Ausstülpung des Darmes direkt zur Vulva erkennen.

Die Aufnahmen: CCD Kamera SPOT RT auf LSM510-Stativ (Zeiss)

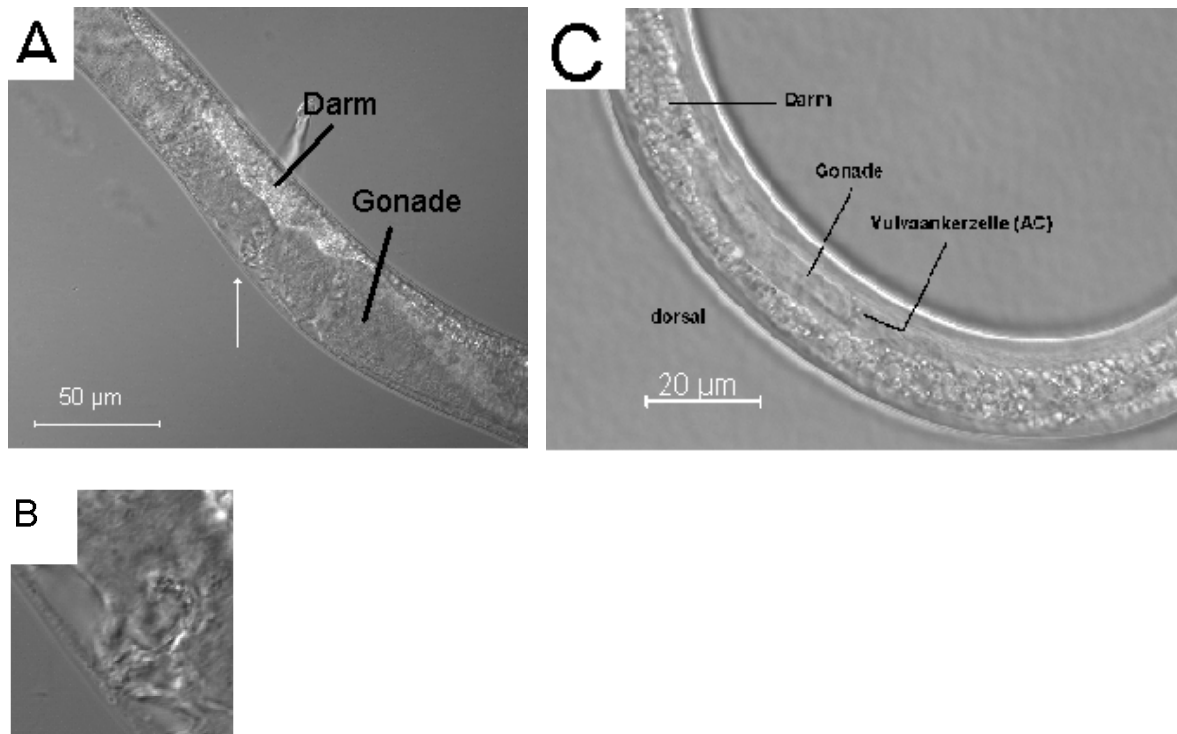


Abbildung 9: RNAi von *pcp-3* im genetischen *daf-9(e1406)* Hintergrund

In A ist der mittlere Körperbereich einer *daf-9* Dauerlarve zu erkennen. Auffällig an diesem unter RNAi Bedingungen aufgewachsenem Nematoden ist die ventral gelegene Struktur, die ähnlich einer vollständig entwickelten Vulva ist (Pfeil). Diese befindet sich zudem unterhalb der die Dauerlarve einschließenden Kutikula (B, Vergrößerung). Ventral ausgebreitet beidseits dieser Struktur fällt eine für dieses Larvenstadium ungewöhnlich vergrößerte Gonadenstruktur auf. Diese entspricht aber nicht typischer Form und Strukturierung und wirkt ungeordnet (Vergleich zu Abb. 4A).

In der Kontrolle von *daf-9(e1406)* (C) ist lediglich die Ankerzelle der Vulva zu erkennen. Ebenfalls ist gonadale Progression deutlich geringer fortgeschritten.

Das Entwicklungsalter in C ist deutlich höher als in A/B (ca. 2 Wochen gegenüber 2d als *Daf-9* Dauer). Da *daf-9(e1406)* bei allen Temperaturen *daf-c* ist, sind diese Nematoden alle bei 20°C entstanden.

A und B: Konfokale Laser Scanning Mikroskopie (Zeiss); C: CCD Kamera Spot RT auf LSM510-Stativ (Zeiss)

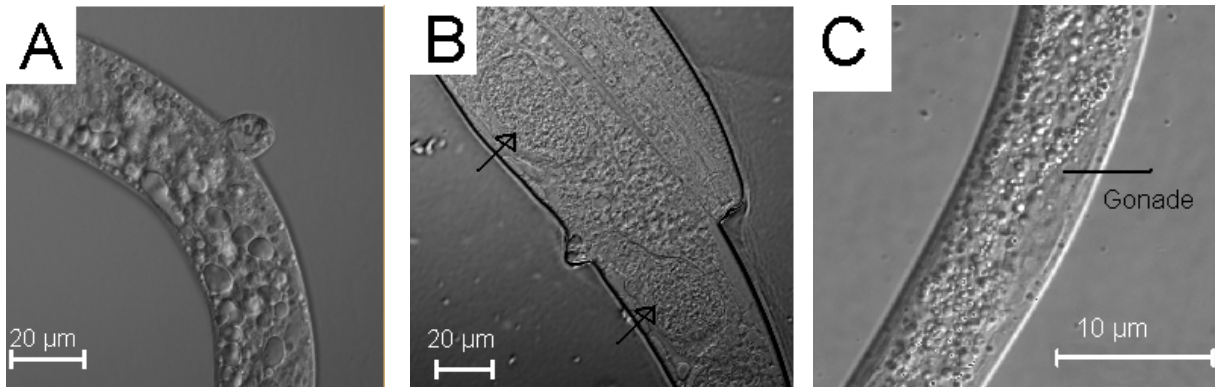


Abbildung 10: Modulation der *pcp-3* Aktivität in *daf-15(m81)* Hintergrund

A: *daf-15(m81) unc-22(s7)* dauerähnliche Larve nach RNAi mit einer großen Ausstülpung in der Mitte des Körpers, ventral gelegen. Der Lage gemäß wären an dieser Stelle die VPCs in einer Wildtypdauerlarve. Gonadale Vorläufer sind nicht erkennbar.

B: *daf-15(m81) unc-22(s7)* dauerähnliche Larve. Diese entstammt Nachkommen von DR732 Hermaphroditen, denen eine DNA Lösung mit einem PCR Produkt von wt *pcp-3* injiziert wurde. Es handelt sich demnach um einen Überexpressionsphänotyp von *pcp-3*. Zu erkennen sind zwei kugelartige Strukturen (Pfeile) gonadaler Zugehörigkeit die zentral miteinander verbunden sind. Hier knüpft eine zentrale Ausstülpung an. Sie ähnelt durch die beiden sichtbaren Wülste einer mißgebildeten Vulva.

C: *daf-15(m81) unc-22(s7)* dauerähnliche Larve (Kontrolle). Die Gonade besteht hier im wesentlichen nur aus den somatischen Zellen, die großen kugeligen Zellen innerhalb dieser Struktur. Keimbahnproliferation hat bislang kaum stattgefunden.

A und B: Konfokales Laser-Scanning Mikroskop (Zeiss); C: CCD Kamera Spot RT auf LSM510-Stativ

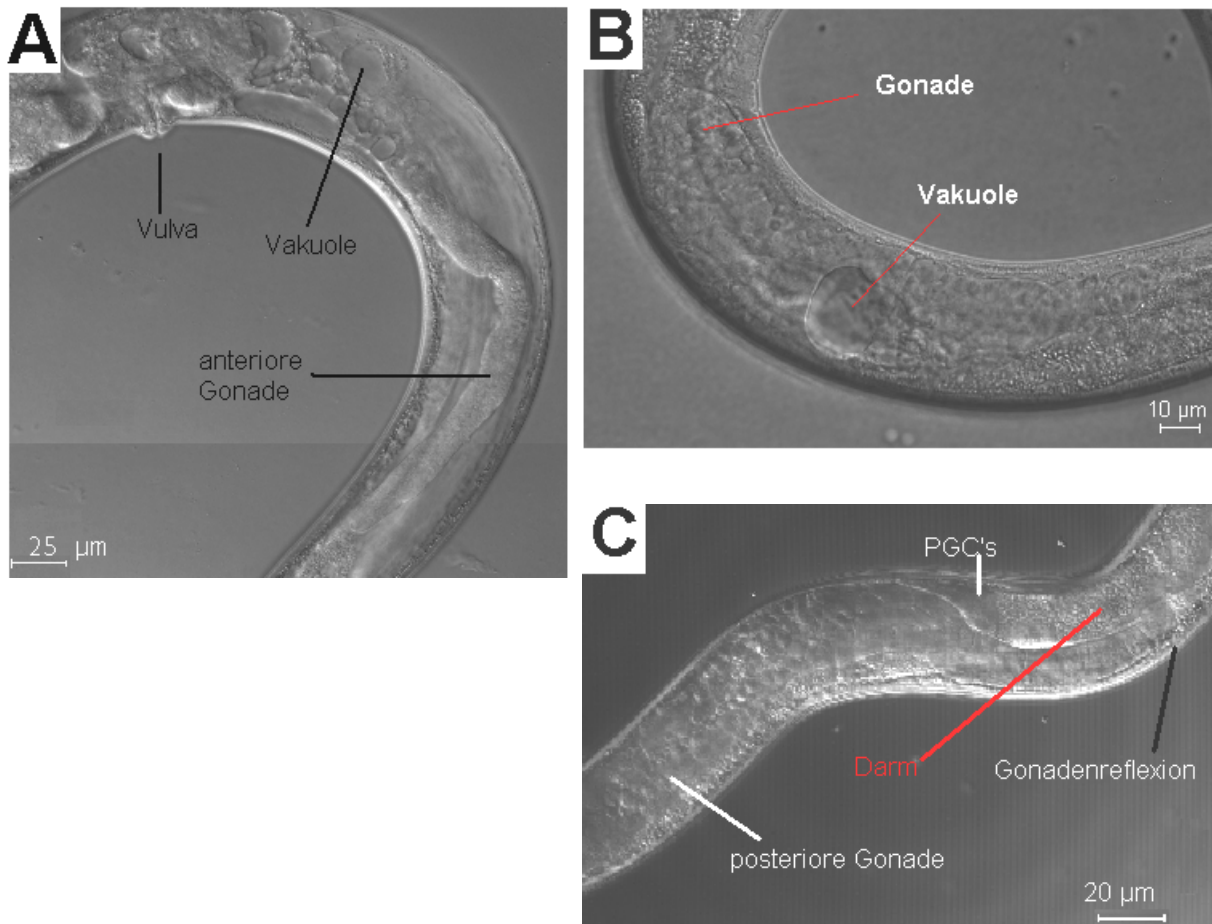


Abbildung 11: adulter Phänotyp von *gon-12(ee1007)*

A: Hermaphrodit mit normal ausgebildeter Vulva, aber Vakuolisierung im anterioren Gonadenbereich, diese Arm ist zudem nur linear ausgeprägt. Der innere *C. elegans* Körper besitzt viel unbeanspruchten Raum. Zwei überlappende Bilder wurden hier übereinandergelegt, um die jeweiligen Einzelbilder zu ergänzen.

B: Männchen von EC1070: *gon-12(ee1007) unc-24(ee1008)* IV ; *him-5(e1490)* V; lineare Gonade, ohne Reflexion, mit großer zentral gelegener Vakuole. Gonadenarm am Ende stark verdickt.

C: gesundes Männchen von EC1070: *gon-12(ee1007) unc-24(ee1008)* IV ; *him-5(e1490)* V; in der Nähe der DTC der Gonade befinden sich die Keimzellen (PGCs), die Gonade verläuft ventral in anteriore Richtung, dreht dann um, verläuft bis zur Kloake dorsal und wechselt posterior von dort auf die ventrale Seite. Im Bereich der Spermatogenese (posteriore Gonade) nimmt sie beinahe die gesamte ventral-dorsale Ausdehnung ein. Das Vas deferens am Ende ist geringer voluminös.

Aufnahmen: CCD Kamera Spot CCD auf LSM510-Stativ (Zeiss)

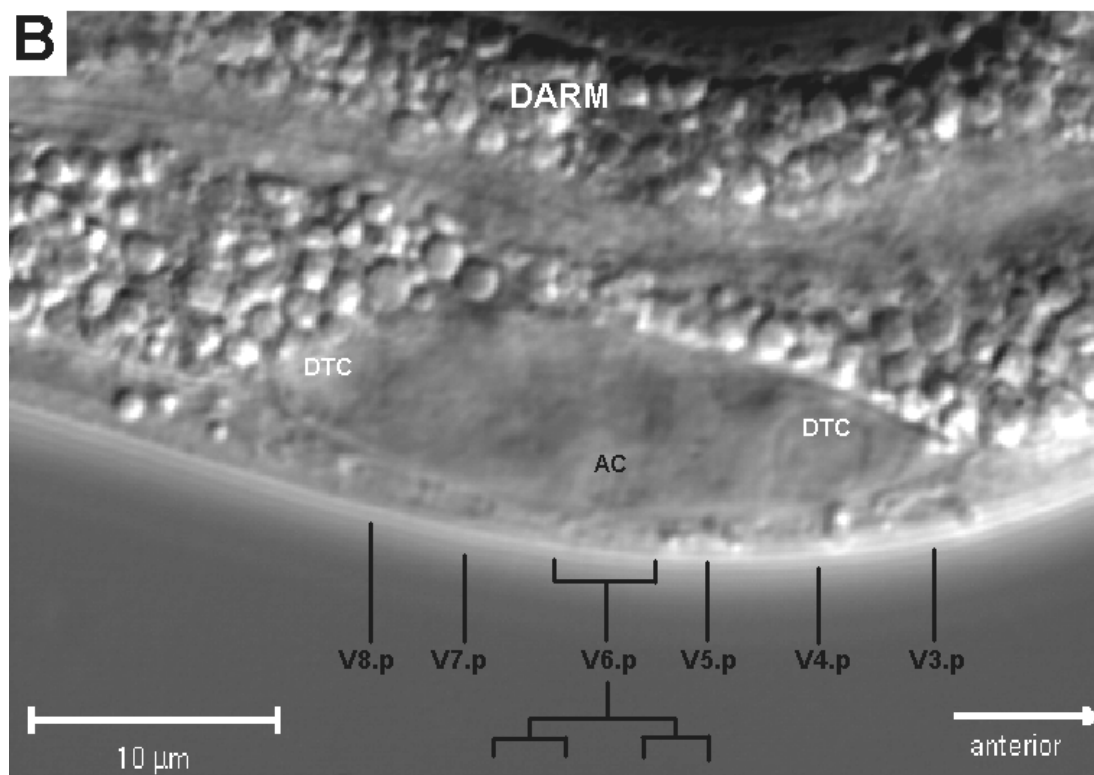
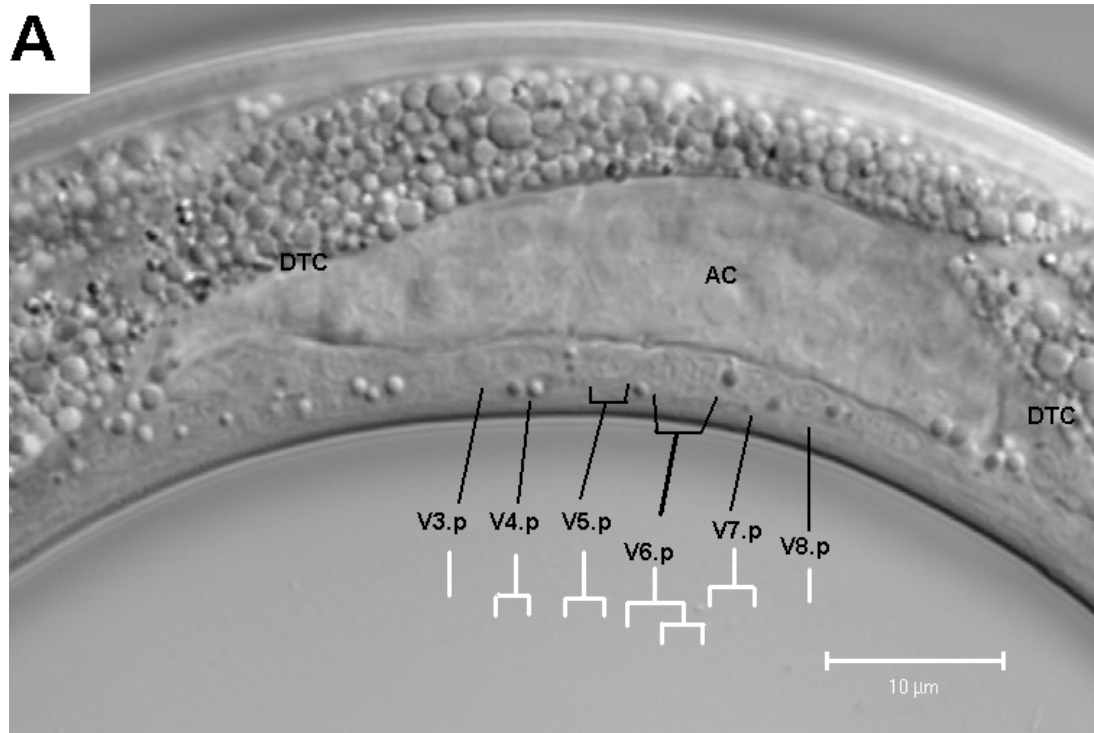


Abbildung 12: VPCs und Gonade von *gon-12(ee1007)* IV

A: Dauerlarve von EC1053: *daf-2(m41)* III ; *gon-12(ee1007) unc-24(ee1008)* IV bei 25°C

Die Gonade besteht fast ausschließlich aus den Zellen der somatischen Gonade, erkennbar an der Größe, z.B. der Vulvaankerzelle oder der distalen Tip Zellen (DTCs). Direkt unter der AC befindet sich V6.p, welche bereits fortgeführte Teilungen zeigt (Schema).

B: L2 Larve von EC1069: *gon-12(ee1007) unc-24(ee1008)* IV bei 25°C

Die Gonadenentwicklung steht zurück, auch viele untersuchte L3 Larven zeigen nicht mehr, als die somatische Gonade. V6.p hat bereits Teilungen durchgeführt und ist damit seiner Entwicklung voraus.

Aufnahmen: Konfokales Laser-Scanning Mikroskop LSM510 (Zeiss)

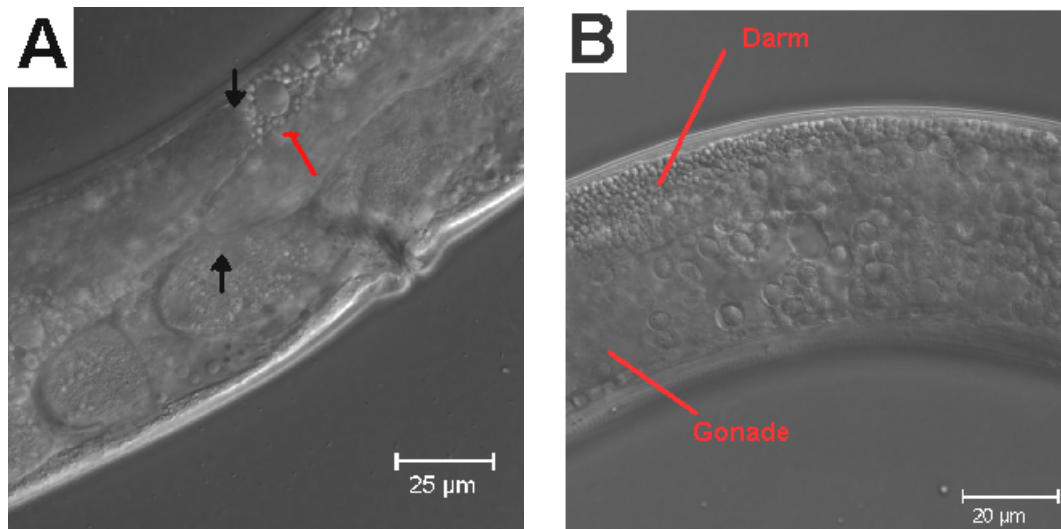


Abbildung 13: Adulte *unc-129(ev554) / gon-12(ee1007) unc-24(ee1008) IV*

A: Hermaphrodit, der verlängerte Gonadenarme besitzt, die DTCs sind markiert (schwarze Pfeile). Das Tier weist eine deutlich erhöhte Ansammlung großer Einschlußkörper auf.

B: Männchen, deutlich erhöhte Lipidansammlung im Körper, die Gonade ist mit diesen Partikeln auch zersetzt und nicht funktional.

Aufnahmen mit CCD Kamera SPOT RT auf LSM510-Stativ (Zeiss)

8 ANHANG

8.1 GENOMISCHE SEQUENZ VON *pcp-2* UND *pcp-3*

Die Sequenz ist gegenüber der in der Datenbank des NIH wiedergegebenen Sequenz der Cosmide C07C7 (Acc.No. Z68295) und F23B2 (Acc.No. Z82266) komplementiert und invertiert, damit die Gene in vorwärts Orientierung mit Startcodon ATG beginnen. es wurden 1940 bp Promotorsequenz von F23B2.12 (*pcp-2*) und 942 bp 3'UTR von F23B2.11 (*pcp-3*) dargestellt. Ab dort beginnt die codierende Sequenz von F23B2.10. Gelb unterlegt sind die codierenden Sequenzen von F23B2.12 und F23B2.11. Es ist die Exon / Intron Struktur der Analyse früher ermittelter elektronischer Vorhersage übernommen worden (The *C. elegans* Sequencing Consortium, 1998).

CDS von F23B2.12:

Pos. 1941-2320, 2637-3117, 3172-3355, 3517-4444, 4773-5546, 5672-6167

CDS von F23B2.11:

Pos.: 7591-7709, 8044-8433, 8551-9031, 9235-9418, 9497-10424, 10474-11244, 11307-11799

Unterstrichen dargestellt sind verwendete Oligonukleotide und Consensus Sequenzen von Restriktionsendonukleasen, die für Klonierungen von Bedeutung sind. Bei überlappenden Sequenzen sind die genauen Primerpositionen Kapitel 2.1.4 zu entnehmen.

→ und ← symbolisieren die 5' nach 3' Verlängerung der Primer durch DNA Polymerasen.

```

1 ACACAAATTT TGATTGGTAC AAACCACATA CCAAATTAAG GCCGAAAAGT GAAGTTAAAA
61 TAGTATGTTG ACTGTTTTTT GTAATAGTTG ATGACGTGAA AGGAAATTTT CAGTTCTGAA
121 AATAGGGTAC AAAATGCTGA AAGTCCCGAA AATAGTCTAC GCTTCTGGAT TTTAGGACGT SF_F23B2.12expr1/2_f →
181 CACAAATAAA AACCAGATGT TTTCGTCTGA TTTAGACAAA ATGGGTCTGA ACCCAATTAA
241 TTTTAAAGT TATTTTCAAT CTGAGGAGAT CCAATGGAAA AATGAAACAC AAAAATAAAA
301 AAGTTTTGGT ATTATGCTCT GATCGTAAAA ATAATTTTCA TGTTTATGTT TTTCAATTTT
361 TCCGTTTCAC ATCAAGCTTT TCAAAGATAC AAAAATAGTT CACAGTTAAT AATTAATAAG
421 ACAGGAACAC ACTTCTCGCT CAACGTAATT TTTGTTTTCT TTACAATTTT TTTGTTCTGG
481 GAAAATGGAA TTATTTTCCA AGCGCAACTT TTCAGGTTTT CTGAAAATTC GTTGATTTAT
541 TTCCTGTTTT CTCACTGGA ATTTATAAAA ATATGTAACG TACCATAAGA ATTTCCAAAA
601 TGGGGTCACA GTTATTTGGT AATTTTTTGT AAACACTTTG TAATTCGAAA TACTATTCTG
661 GGATCCAGAA TTTCCAAATT GCAATTCCTC CAAAAAAAAC CTTTATAGACA TGTCTTTTAA
721 AAAATTTATA AAAATTTATA TATAAAAACT GTAACAAGA CTTCATTCC AACTTATAG
781 TATTTTTATG CGTTCCGAGT AAACCTCCCC GACTGTAAAC CGGCTTTAAA GGTACGAAAA
841 CTCCTTCAA AGAATCTATG ATTTTTTGTG AGGAATATGA TTTTATGAGT CATGATGAAA
901 CCAATTTTAT TTACATGTTC ACGATAAAAA TTTGAAATG ATATAATATC GTAGACTTGA
961 ATTCTTCGTC ATCACGGATC CGGATCTGTT TGCCAAGAAG CAGGAACTTC ATGTTAATTG
1021 TCCCTCTCT ATGTCACAGA TTCGCTGGAA AATTAACATC TCTAACAGT TATCAATCCG
1081 CTATGACGAC ATCATTGATA ACTAATTTTA ATTTTAAATC ATCATTGAG TAGATAGAAG
1141 GCTGTTTTAT TGGCTTGAT TATCATCGAA ACCATAATAT TTTATGTGAA AATGAATTTT
1201 ACGTGATAAA ATTAATTGCA ATTTGATGTC ATCACTATTG TGGGCGGAGA AAGTTTAAAA
1261 AATGATTTGG AAAATTTTCT AGTTTATTA AACAGTTTAC TTCTTAGTTT AGCATTTAAA
1321 CGAGTCATCT TTGTTTGGAT TTTAATTTTA GTACCTCATA CTCGTGCCTT AAGGGGTTTC
1381 GCGTTTTGCC AAATTTAGCT ATAATTTAAA ACTTTACAAA TTGCCGCAGC TGTCCGAAGA
1441 TCAATTTGTT GTTGATTTAT TAAATTTAAA AAAAATAATA TTCAGCATAT TTTAATAGTT
1501 TATTCCTGTA TTTTGTGTA TATTTCTCAA ATTAATAAAA CAATCTCAGG TCGTTGTCAA
1561 AGACAATTTT GCAAGATTTA GATTTTCAAC AACATTTGAT TTTTCCACC TTGGCATAAA
1621 ACATTTTTTG TAAGAAAATT TTAGGTAGTC TCGTTATGAA ATTTGAGACC ATTTCTGAGTT

```

1681	CATTCAATCA	AAAACCCAAA	AATGATACTC	CCTCTTTGAT	ACAGTGCAAA	TTGATTCTTT	
1741	GGTAGCATA	CAGATGCCTG	CAAGCTTATC	AATTAAGGGA	AAAGTGCAC	GCTTTTCAAA	
1801	GATATACTA	AAACAATTGA	AAAACACTTG	ATTTCTCAAAA	GCTAACAGTC	GTGGAGCTAC	12ex1-f →
1861	TAGTTAATAA	AAATGAATTT	CCGGATTATA	TGTATCAAAA	TTTGAAATAT	AAAAAATTC	BcuI
1921	AACATGTATT	TTCAGGGGTA	ATGACTCGAA	ATCTACTACT	TCTGACACTT	CTGGTGTCA	Exon 1
1981	TTGTGTTAGC	AATCATTTCC	AATCATTTACC	ATTTCAAAAA	GCATCTTAAG	AGAGGAAGTC	
2041	GCAAATATGG	TAATAGTGAA	ACAGCTATGA	CCACTGGATA	TATGGCACAA	AATTTGGATC	
2101	ATTTAATTTG	AAATGCTTCT	GGAACTTTTA	CTCAAAGATA	TTTGTACAGT	CAGCAATATA	
2161	CTCTACATCA	GAGGACTGCA	TTTTTGTATG	TATCTGGAGT	TGAAGGACCA	AACGTCGTTC	
2221	TTGATGATAG	AATCCCAATT	GTGAAGACTG	CAAAACAGTT	CGGAGCAACC	ATTTTCACAT	
2281	TGGAGCACAG	ATTTATGGA	GAGTCAAAGC	CAAAATGTTGA	GTAAGTAAGA	CACAGTAAAA	
2341	TAGAAACTCA	TGGATGCATT	GAAATCTTAT	AACGCTTTTA	TAACAAAAAT	ATCATTTAAC	
2401	GAAACTATAT	TTTTAAAAAA	GTATGAAAAA	ACTTCTACCA	ACTTTTTGAA	AAAAGGAACA	
2461	GTGCATFCCG	AAAGTCTTTA	TACAAAATTG	TGAGGGGCGA	TACATACTTT	CTATAAAAAT	12ex2/3-f → bzw.
2521	TGTAACGTGC	ATTTTACGAAA	ATTTTAGTAGA	TGCACCTGAC	TGTGAAAAATA	TGAAACAATG	12ex1-b ←
2581	AATTGTAGCG	TTTTTTTTC	TGAAAAATAA	ACAAGTTAGG	ATAATTCAAT	TTTCAGCAAA	Exon 2
2641	CTTGATGCAT	ACAACCTTCG	CCATCTCAAT	TCATTTCAAG	CAACCCAGGA	CGTGATTTCT	
2701	TTCAATAAA	ACGCAAAATG	TCAATTCAAT	ATGGATCAAG	ATGTCAGATG	GGTTGCTCTG	
2761	GGTATTGGAT	ATGGTGGAA	TATTGCTGCA	GAAGCAAGAA	AGTTGGATCC	CAATTCTGTT	
2821	TCTGGGGTTA	TTGCTAGTTC	AACACCGTTG	ACCCATGAGT	ATGATTTTTG	CGGTTTCAAT	
2881	CACCGAGTTG	CAATGATTTT	GGCTGAAACT	GGTGGTTCAC	TTTGTATATG	TAAAGTTGCT	
2941	AATGGATTCG	CTGATATTCG	AGAAGCAATG	AAGACGCCAG	AAGGCAGATT	AAATATATCT	
3001	GATTTGTTTC	AATTGAATCC	ACGACTCAAT	GAAACCGCTC	TTAATTATAA	CGACATTCAA	
3061	ATGTTTTTAT	TGGCAATTAT	TGCACCATT	CAAGAAATCG	TTGAGTTCAA	TGATGATGTA	SF_F23B2.12expr1_b ←
3121	AGTTGAATTT	TATTTAATGA	GCACTTAAAA	ATTTAAAGAT	TTTTCATTTA	GTTTCGATCTT	Exon 3
3181	TCCATTGCCG	ACTTGTGCAC	AACAATTGAC	AAAAGTAATT	GGACGAATAT	GGAAGTTGTA	
3241	TATCAAGCAT	ATGCTACTT	GAGTACTACC	TTAGATGGAT	TCCGCTGGACC	AATGGACATT	
3301	TCTTATCAAG	ATTTCTGAGA	TAGTTTAGGA	GATCAGAGCG	TGGATTCAGG	ATGGAGTATG	12ex4-f →
3361	TTTACTAAAC	GTTTTAATAT	ATTTTACACT	AGAATGGGGC	TTACAAAGTG	TGCATTTTCA	SF_sjj_F23B2.12_b →
3421	AGAGTAACA	TTATAAAATT	CGATCTTTAG	AGGTGCTTTT	GAATTAATTA	AAACTCCACT	und 12ex2/3-b ←
3481	CTCCAATAA	TATTTTAAAT	CCTTATAAAT	TTTTAGTTGA	TAATCGGATA	TGGCAATATC	Exon 4
3541	AAGTTTGCAC	TGAATTTGGA	TGGTTTTATA	CTACAAATGA	CAACGAGCAA	GGATTATTTG	
3601	GACCTGTGGT	ACCTGCAAGT	TTATTCCTCA	ATCAATGCTT	TGATATATTC	CCTGACGCCA	
3661	ATCTCACTGC	TACAGGACTC	CGAGACTCAA	TAATCAATTA	CAATAACTTT	TATGGTTCAT	
3721	CATATGACTA	TTCTGGAACA	AACGCAGTTT	TTACAAATGG	AATGAATGAT	CCATGGCCGAG	
3781	AACCTGGAAA	AACATCTACC	GGAGACTTTT	CCGTTGTTGC	TTATCTCATT	CCAGACGCTT	
3841	CGACTGCCAG	TGACATGTTT	CCTGGAAATA	CTAACAAATC	ATTCATTAT	CAAGCTCATA	
3901	ACTTGATGAC	TGAGAATATT	AATGTTTGGT	TAAATGGTCC	AAGAAATCCA	AAAACCTTTG	
3961	TTAATAACCAC	TGTTCCATGG	ACTCGTCCCT	ACTGGGGAGA	ATATGGAAAG	TTTCGAGAAA	
4021	CTATGCTGAA	ACAAGAAGTT	GAATCTAAAT	TCTCAAACCT	TGAAAATGGC	CGAACATCTG	
4081	AAAAGACATT	CCCAGAACCT	AAATTCAAAA	AAGTTTTCCCT	CGGAAGACCA	CCACATGGAT	
4141	TCCTCCAGA	ATCAGACTTC	AATATGAGTC	CAGATGACTA	TCCAGCTGGT	TTTGAACCTG	
4201	GATCATTCGG	GCAGAGACAA	GATCATTTTA	ATAATCAAAA	TGCGGATTTT	TTCCAACAAA	
4261	GATTCTTCAA	GAACACACAA	TGGGCCAAAC	CAGGAGGTCC	AAATTTCTTA	ATGATTGGAG	
4321	GAGAAGGACC	AGACAAGACA	AGTTGGGTTT	TGAATGAGAA	TCTTCCATAT	TTGATATGGG	
4381	CAAAAAATA	TGGAGCAACT	GTTTATATGT	TGGAACATAG	ATTTACCGGA	GAAAGTCGTG	
4441	TGGGGTAAAGT	ACAGTTTGT	TTGATTTTTC	AAAATGTTAC	TTAATATTTC	AATGTGGCTT	SF_sjj_F23B2.12_f ←
4501	TGTCTGTGAC	GCTACTGCCA	ATTATTGATG	TTTTCTAGTTT	TTAATTTTTT	TAAAAACGTT	12ex5-f →
4561	CCAATGTTAG	AAAAATATTT	TTTTTTGCCG	AATTCGCAAA	ATGTTTGAAA	AATTGAAAGA	
4621	AAAATCAGTA	GCCCTGCCCA	CAACTTTCCT	TTTTTGCATC	GAATTTTTTA	TTGACAGCAG	12ex4-b ←
4681	ATAAGCTTCG	ATTTTGTTTT	CACTTTGTCT	GCAACTTCTT	GAAATCTTGT	GAAACTAATC	HindIII
4741	AAACAAGACA	ATATTTTTC	CTATTTTTC	AGAGATAAAG	CAAACCTTCA	TGCTCTTTCC	Exon 5
4801	TCGCTACAAA	TGATTTATGA	TATTGCTGAT	TTCATAAGAA	GTGTCATAT	CAAATCAGGA	
4861	ACTTCAAATC	CTTGGATTAC	ATTCCGGTGA	TCATATTCTG	GTCTTATTTT	TGCGTGGACA	
4921	AGAGAAGTAT	TCCCAGAACT	TGTAGTGGGC	GCCGTTGCCT	CTTCAGCACC	AGTTTTTGCC	
4981	AAGACAGATT	TTTATGAGTA	CTTGTGGTT	GCAGAGAATG	CTATCAGAAG	TTATAACTCA	
5041	ACCTGTGCCG	ATAGAATTCA	AGAAGGATTT	AATTCAAATGA	GAGCTTTATT	CTTAACCCAA	
5101	GGAGGAAGAC	AAACACTGTC	GTCCATGTTT	AAGCTAGATC	CACCATTTGC	TGATAACGTT	
5161	ACTGATATTG	ATCAACATTA	CTTCTTTTCA	AATATTTTAT	CAAATTTCCA	AGGAGACGTT	
5221	CAGTATTCTG	GTGATAACAT	GGGATCATAT	GCAAATAGTT	ATGGAATCCC	TGATATGTGC	
5281	AAGATTATGA	CAAAATGATC	AAATACTCCA	TTGAATAATA	TTGTTGCTTT	TAACGAGTAT	
5341	ATGGCTAATT	TTTATAATGG	AGGAGGACCA	TACTTTGGAT	TGGATAACAG	TTATCAGGAT	
5401	ATGATTAACT	TTTTGATAAA	TGCAAAGGAT	TTTGACCAAT	ATCGCGGAAGC	ATCGCTTTTA	
5461	TGGACGTGGC	AGACTTGTCT	CGAGTTTGGT	TATTTCCAAT	CTGCTGACTC	TGGAATGTTG	
5521	ATTTTTGGAT	CGCCAACACC	TGTAAGTAT	GTTAGAAAAG	AAAACCCAAA	AATGATACGT	
5581	AGACTAGCTT	TTGATGAACT	CTTATGCAAA	TTTAAAGTCA	GCATTATAAA	AAAATGCATT	12ex6-f →
5641	ATAAATGTTA	AGTTGTAATT	CGGGATTTCA	GTTTCTTCAT	TCAAATTTGC	ATGGATGTTT	Exon 6
5701	TCAACAATTA	CTACCAAAGA	AGCGCAATTG	ATCCGATGGT	TGACAACACA	AATTACATGT	12ex5-b ←
5761	ATGGAGAACG	ATTTCCATTT	AGAGGATCGA	ATGTTGATAT	TCCAATTTGA	AATAAGGATC	
5821	CATGGCATGC	ACTTGGTCTG	TATTAATCCAA	CTGATTCATC	AGTTGTTTCA	TACTTAATCG	
5881	ATGGAATGTC	TCATTTGCTG	GATATGTATC	CAGCTAGAGA	TGCCGATGTT	CCAGGGCTTA	
5941	AAGTTGTGAG	AGATCTCATT	GATCAAAATA	TTGCCATCTG	GTTGAATCAA	GCACCACCTT	
6001	CAACTGGAAC	AACCCGACCA	TCTGGAACAT	GTTCAACAGC	TTCACCAGGG	ACTGGGTCAA	
6061	CTTCTCAACC	TGTAACAGCT	ACAACGTAC	AGGCAACTAC	CAAATCTACC	ACTTCAGTTA	
6121	CTGTTTTTAA	GCCCTTCATT	GCCATGCTTG	TTAGTTATCT	CTTGTAATAA	TGTATATTAA	SF_F23B2.12_3UTR_f →
6181	CACAACATA	TGTTACGATT	ATTAGAAAAA	AAAACCTTGA	AAATTAGGTT	TTCAATAAAA	

6241	<u>ACTGTTTTGA</u>	AATATAATCA	TAAAATTGTT	TGGAAAATTA	TACTCCCTGA	ACAAAATATT	12ex6-b ←
6301	TTTATTACAT	TCCAACCTTC	ACATTTTCAA	CATGTTTTAA	TACTTTGCC	TAAACGTAGA	SFF23B2.11g(2)_b →
6361	<u>AATGCCCTTA</u>	TTTTTCGCAA	CCAATATTAT	CAGTTTCATA	CCTTTTTTCA	ATAAAAAATGC	bzw. SFF23B2.11g_b →
6421	GCTTATAGAA	CCTTGAAACA	CAAAATTAA	ACACTGAAAA	TAAAAAGAGA	GAACTACATT	
6481	GTTATAGGAA	AATGCTTTTG	AAGATCATT	TTTTTAGAAA	TAAAAAAAAT	CAACTGTTTC	
6541	ATTATATCA	TTTAAGAGGA	ACGTGGAAAT	AGTCGTTCAA	TGCGAAAAA	TAGTGTGGCA	
6601	ACTTCATTTG	AGAAAAATCA	GAATATCATT	TAAAAAAAAT	AATATTTTGG	TAATTTCTGT	
6661	TTTTAGAATA	TGGTTTCTAC	TATTCATT	TTTACAAATC	TAATTCCTA	GAGATCCGAT	
6721	GAAACTAGAG	TTGTTAATGG	CGTCACCTTG	CTGAAAAAAG	GCAATTGGTT	CTTATGAAAT	
6781	TTCCGAAACA	GTCATAATTT	TATCTTTTAC	TCAAATGAT	CCACAACGA	AATGAAACCA	
6841	AAAATGTTTC	CCGACGCCAT	TTTTCGTTTC	GAACAGTCTA	TGTTTCAACA	GATCAACTAT	
6901	TTGTCAATCA	TTTGTGTGAT	TGGAAAAAT	GTTTGAAGAC	TAAACCGATA	AAATGGCAC	
6961	TTTTTGGAGCA	TAGGCAACAC	ATTTCTACTC	CCCCAACAGT	TCTTATCGCT	ACTGCAAAAA	
7021	CCAATTTTGT	ATAAAAGTCG	GTCAATACTA	AGAGGCTTTT	GCACATTTTT	ACACTTCTTG	SF_F23B2.12_3UTR_b ←
7081	ATGGCTATCA	GCTCATATGT	TGATAAGCAT	TTTTACGACG	AATTTATTCT	GAACTTACT	
7141	GTTTCTGTAT	GAAGTGTGGT	TAAAATAGTC	TCTATTTTAA	CAGAGATCTT	TTGTGACTTG	
7201	GAAAACCACT	TTCTTTTGA	AGCGTAAAT	TTAATACTTA	ATTTATTTAA	TTAAAGTTTC	
7261	TCATGTTAGA	GAAGTTACGG	CTGCAAACTG	AAACTAAATG	TCTCTAGCCA	ATTGTCTTCA	
7321	GAAATTAAC	CAATATCATA	CTTCTGAAAA	GTGACACTAT	GTTCTCAGTG	TTTTTGAAC	
7381	TTTAGCCACT	TTCCCTAGGG	AATTTAATTA	TCATTGTGGA	TAAAAATTTT	GCATAGGTAC	
7441	AAAAAAAATA	CTTACGCCCT	CTTAGTGCCC	ACAGCAAAAC	GAGACGTGAA	ATTCATAAT	
7501	TAGTTACTGG	AATTTCCAAT	AAATAATTTT	AGAATTGCCT	GAATCTATAC	GATTTAAGCA	SF_F23B2.11_P1_b →
7561	ACCAGATCCC	AGGCAACAG	GCAGGCACGT	<u>ATGCCTACAA</u>	<u>TTTCACACTC</u>	<u>TATAAGAGTA</u>	Exon 1
7621	<u>AACACTTCAA</u>	<u>ACCGCAAAAA</u>	<u>CAATCAAACCT</u>	<u>CGTAATGTTG</u>	<u>TTATCATTGA</u>	<u>CAAAATTTAT</u>	
7681	<u>TTTTTTAGTT</u>	<u>TTGCAATAA</u>	<u>ACGTTTTTGG</u>	TACAACCCAG	TTTTTTATCT	TTCTCAATTT	
7741	CCCCCAACA	TATTTCAAAA	CTTTGAAAA	AAAAATTTCT	CGAGCTTATC	AAATTCACGT	
7801	AACAGTTGCA	TTTCGCTCCC	GATCTTTAAC	TGATAGTGT	CTGATAACTG	CCTGAATCAT	
7861	CGCTTTGAAT	GATCATTTAA	TGGGAGTTTT	TATCAATTAC	ACTAAAAACT	TCTAGTTGCA	
7921	AACATTGAAT	TTTTAGTCGA	TTGAGCGTTT	ACCATCAGGC	ATTAACATTT	TTTCAAGCAA	
7981	CTTTGAAACT	TAATAAAAATA	CTTCAAATTC	AAATTAATCC	CTAAATAACG	AATTCATTTT	EcoRI
8041	<u>CAGGGTAATG</u>	<u>CTTCGAAACC</u>	<u>TACTTTTGCT</u>	<u>TGCCGTTCTG</u>	<u>GCTGCAGTTG</u>	<u>CATTAGCTAT</u>	Exon 2
8101	<u>AATCCCTAAT</u>	<u>CATTATCAT</u>	<u>TCAAAGAGCA</u>	<u>TCTCAATAAA</u>	<u>GGTGCTCGCA</u>	<u>AAAAATGGAAA</u>	
8161	TATTGATGCA	AGTATTACCG	CTGGGTATAT	<u>GCTTCAAAGT</u>	<u>TTGGATCATT</u>	<u>TCATTGGAAA</u>	SF_F23B2.11expr_f ←
8221	<u>TGCTTCTGGA</u>	<u>ACGTTTTTCTC</u>	<u>AAAGATATTT</u>	<u>CTACACTCAA</u>	<u>CAGTACACTT</u>	<u>TACATCAGAG</u>	
8281	<u>GACTGCATTG</u>	<u>TTGTACGTAT</u>	<u>CGGCAGATGG</u>	<u>AGTAGAAGAA</u>	<u>GCAGCTGTCA</u>	<u>TTTCTGATGA</u>	
8341	<u>AAGAAATCCA</u>	<u>ATTGTGAAGA</u>	<u>CTGCAAAACA</u>	<u>GTTTGGAGCA</u>	<u>ACCATTTTCT</u>	<u>CATTGGAGCA</u>	
8401	<u>CAGATATTAT</u>	<u>GGACAGTCAA</u>	<u>GACCAAACCT</u>	<u>CGA</u> GTAAGTG	AAACACAGGA	AAATAGTCTT	
8461	TAAACTGAAA	TCTTCTTTAA	ACTGAAAAAA	AAAAATGTAG	TCTTTCAAAA	ATAAAACCAA	
8521	CAAAGTACAT	TACGAATCAT	CATTTTACAG	<u>CAAGTTTGAT</u>	<u>GCACAAAATC</u>	<u>TCCGTCATCT</u>	Exon 3
8581	<u>CAATTCCTC</u>	<u>CAAGCTATTC</u>	<u>TGGATATTAT</u>	<u>TTCCCTCATA</u>	<u>AAGTCTGTTA</u>	<u>ATGTTCAAAT</u>	
8641	CAACATGGAT	CCTGATGTCA	GATGGGTCT	CTGGGGAGCC	GGCTACGGTG	GTATTCTTGC	
8701	CGCTGAGGCA	AGAAAATGGG	ATCCTGTAAC	AATTTCTGGA	GTGATCGCCA	GTTTACTCTC	
8761	ACTCACTCAT	TTATATGATT	TTTGGCAATT	CAATGATCAA	GTGGCAACCA	CATTTTCTCA	
8821	AGTTGGTGGT	GGTCTCTGTT	ACAACAAGGT	TCGCCAAGGA	TTTGGCGATA	TTCGTCAAGC	
8881	TATGAGAACA	CCAGAAGGTA	GAAGAAATGT	GTCTTCTTTG	TTCCAATTGA	ATCCACGACT	
8941	CGACAGACT	CCACTCAATT	ACAATGACGT	GCAGATTTTC	TATTTGTTAA	TTATTGCACC	
9001	<u>ATTCCAGCAA</u>	<u>ATTGTTCAAT</u>	<u>TTAATAATGA</u>	<u>TGTGAGTTTA</u>	<u>TTATTATTTA</u>	<u>TCAAACGGCA</u>	SF_F23B2.11_P1_f ←
9061	<u>GCAGACTATG</u>	<u>ATCAGATATA</u>	<u>TATAGCAGAG</u>	<u>ATGTCTTTGA</u>	<u>TCATAGCTTT</u>	<u>AAAAACAAGAC</u>	
9121	ATAGCTTTTG	CTGAAGACCT	ATTTAAATTA	CCAGAGGATG	TAATATCCGT	TCATGTTTTC	SF_F23B2.11_P2_b →
9181	AAAGGCCGCC	TGGCCAAGTG	TTGCGCAAAC	AGTTTGATTT	TTTGATGTTT	TCAGTTCAAT	Exon 4
9241	ATCTCTAATT	<u>CCGACATGTG</u>	<u>CACAACAATT</u>	<u>GACAAAAGTA</u>	<u>CCTGGACGAA</u>	<u>TATGGAAGTT</u>	SF_F23B2.11expr3_f ←
9301	GTTCTGCAAG	CGTATGTCTA	CTTGAGTACT	ACCATAACTG	GCTCGTTTCA	ACCAATGGTT	
9361	<u>ACATCTTATC</u>	<u>AAACTATTGT</u>	<u>TAATGATCTT</u>	<u>GGAAATCAA</u>	<u>GCGCTTCTTC</u>	<u>ACCATATCGT</u>	
9421	AAGTTTACAC	ATAAACTTTT	TCTCAAAAAA	GCCAGAAAAT	AAGTCACATT	TCTCAACCTC	
9481	AAAAACAAT	TTACAGTCGA	TCAACGTATG	TGGCAATACC	AAACTTGCAC	TGAATTCGGA	Exon 5
9541	<u>TGGTTCTACA</u>	<u>CTACAATAA</u>	<u>CAATGAAAAC</u>	<u>GGGCTATTGT</u>	<u>GAGCAGTCTG</u>	<u>CCCTGGAAGT</u>	
9601	TTATTCTCTA	ATCAGTGTCT	TGATATATTC	CCTGATGCCA	ATCTCACTGC	TACTTCTATT	
9661	CGAGACTTGG	TCATTGAATA	TAATAACTAC	TATGGATCTG	CTTTCGATTA	TTCTGGAACA	
9721	AATGCAGTTT	TCACCAACGG	ACTTCTTGAT	CCATGGACTA	TCCTTGGAAA	AAAGTCAACT	
9781	GGAGACTTCT	CTGTTGTCTC	ATATATAATT	CCAGGAGCTT	CATTTGCCAG	TGACATGTTT	
9841	CGGGGAGACA	CTAACAATTC	ATTCATTATT	CATGCTCATG	CTTTGATGGC	TGAGAATATT	
9901	AATGTTTGGG	TGAATGGTCC	AAGGAATCCA	AAAACCTTTT	TGAACACTAC	CATTCATGG	
9961	ACTCGTCTCT	AATCGGCTCA	ATCTGTAAT	CTCCGTGAGA	GTGTATTGAA	GCAAGAAAT	
10021	GAATCCAGT	TTTTCAAACT	TGGTATGAT	GTTCATCTA	AGAAGACTTA	TCCCGAACCA	
10081	AAATTCAAGA	AAGTCTTTCT	CGGAAGACCA	CCACATGGAT	TCCTCCCAGA	ACCAGATTAT	
10141	GAACCAAGG	AAGACGCCTA	TCCACCAGGT	TTCGAACAGG	GAACCTTCCG	ACAGAGACAA	SFF23B2.11rnai-b →
10201	GATCATTTCC	ATAACCAAAA	CGCCGATTTT	TTCCAACAGA	AATTTCTCAA	AAACGCACAA	
10261	TGGGCCAAC	AAGGAGCC	AAATTTCTTA	ATGATGGAG	GAGAAGACC	AGAGAGTCC	
10321	AGATGGGTGT	TAAATGAGAA	TATCACTTAT	TTGACATGGG	CTAAGAAGTA	TGGAGCAACT	
10381	<u>GTTTACCTTT</u>	<u>TGGAGCACAG</u>	<u>ATTCTATGGA</u>	<u>GACAGTGTG</u>	<u>TTGGTAAGA</u>	<u>CACTAACGTT</u>	SF_F23B2.11_P2_f ←
10441	<u>TTACTGACTT</u>	<u>TGTAATTTGT</u>	<u>TTATTCACTT</u>	<u>CAGAGATAAC</u>	<u>ACAAATTTCA</u>	<u>AGCTTCTGAA</u>	Exon 6
10501	<u>TTCTCTTCAA</u>	<u>ATGCTATATG</u>	<u>ATCTCGCTGA</u>	<u>ATTTATCAAG</u>	<u>GCCGTGAATA</u>	<u>TCAGAACAGG</u>	
10561	<u>AACTTCAAAT</u>	<u>CCTTGATTA</u>	<u>CATTTGGAGG</u>	<u>ATCTTATCT</u>	<u>GGAGCCATGT</u>	<u>CCCTTGGAT</u>	
10621	GAGAGAAGTA	TTCCCCGATC	TTGTAGTCGG	AGCCGTTGCT	TCATCAGGAC	CAGTTTATGC	
10681	GAAAACAGAT	TTCTATGAGT	ATTTGATGGT	TGTAGAGAAC	TCTGTTCCGT	GGTACAATTC	
10741	TAAGTGTGCT	GATAATATTC	AATCTGGATT	CGATGCTATT	CGAACACTGT	TTCTGACAAA	
10801	AGAAGGACGT	CAAAATCTTT	CAAGCATCTT	CCAATTGCAA	CCACCATTTT	CTGATAGTGT	

```

10861 TACTGATACT GACCAGCATT ACTTCTTCTC AAATGTATAT GGAAACTTCC AAGGAGCTGT
10921 CCAATATTCT GGAGACAACA CTGGCCCATATA TGCAAACGGA TATGGAATTC CTGATATGTG
10981 CAAGATATATG TCAAAATGACT CTAACACTCC ATTGAATAAT ATTGTTGCAT TCAATCAGTT
11041 TATGATTATT TTCTACAACG GAGGACAATA CACAGGAATG GATAATAACT ATCAGAACAT
11101 GATTACTTAT TTGAAAACCTG CTCAACATTA TGGACCCGAC TCTGCTGCAG GACTCCTCTG
11161 GACTTGGCAG ACTTGTCTCCG AATTTGGGATA TTTCCAGTCT GCAGACTCTG GAAATGGTAT
11221 CTTTGGGATCT CCAACACCTG TGAAATAAGT TTTTGAATT ATTCACCGAA ATTGAAAATT
11281 TAATTTCAAA TCTTATTAAT TTTTAGTATG TACGTTCAAA TGTGCATGGA CGTCTTTAAC SF23B2.11rnai-f ←
11341 AACCAATACC AGAGACAACG TATTGACTAT TCAATGCAA ACACCAATTA CAAATACGGA Exon 7
11401 GAGCGTTTCC ATTATAGAGG AACAAATGTG GTTCTTCCAA ATGGAAATGT TGATCCTTGG
11461 CATGCACTTG GTCTGTATTA TCCAACCTGAT TCATCAGTTG TTTTACTACT AATCGATGGA
11521 ACTGCTCATT GTGCTGATAT GTATCCAGCT AGAGATGCCG ATGTTCCAGG GCTCAAGGTT
11581 GTCAGAGATC TCGTGCATCA AAATATTGCT AAATGGTTGA ATCAATCTCC AGCCACTGGA
11641 GCAACCCAGA TACCTGGAAC TGGTTCAACA GCTAAACCAG GGACTGGATC AACTTCTCAA
11701 CCTGTAACAG CTTCAACTGT TCAGGCTACA ACTAAATCTA CCTCATCTGC TACTATTACC SF_F23B2.11_3UTR_f →
11761 TTGTCAATCA TTGCCATTTT CGCTAGATAT CTTTTGTAAA ATTTATTTGC ATTATGAAAT
11821 TGTTTTATTT TTATGAATTA TATGATAATG TATTATATGA TAATATATAC TACTGTTTCT
11881 ACCACTTTTC TGTAATGAAA AATATGTTCT GGAAAATGCG GTCATTCGTT ACTTGAAAGG
11941 AAATATTTTC GACTAGAACG TCATAACGCTG TTAGGATGGA AAAATGAAAG ATGTACCAAC SF23B2.11g_f ←
12001 TATGGCGAGT TTTAGTTATT TTTAAATAAA CCTAAATCTT GTGTACGGCA TAACATCAGG
12061 CCCTTAGTAT GGAGATGTGA CATCGCCCAG TTACAACAGA GAGTGCATGT TTGTGTCTAA
12121 ATGGTTGTTA TGATAGGAGT CAACGCCGCT CTTTGTGAGCT CTCTCTTTG TGCGTTGTAA
12181 CTGGGCGATG TCACATCTTG ATACCATGTC CAGAAATGTTT TGACAAAAGAA CTCACAATAG
12241 TTGGTACATC TTTCATTCGG ACATCCTCTC ACATTATGAC GTTCTAGTCG AAAATATTCG
12301 TTTTCTTTAT TGATTGCAGC TGTGCCATAT GCGATTGAAC TAACTAGGGA ATTATCGTTT
12361 TTTCTTACTC TTTTGGAAAAC ACGATTTATT TCACGTGTAG CATCAGATAG GAATGTTAAC
12421 ACCAAAACATA TGGGATCTTT TGAGTTCTCT CTCAAAATCC GTAAGAAAAA TGTAAATAT
12481 TTGAGTGTGA ACATGGAAGA TTGCTGAACT TTTGGTTGTA TCTTGTGAC AAAATAATAT SF_F23B2.11_3UTR_b ←
12541 TTTGAGGAAA TTTTATAACC GATATATTTT CACAATTTT ATCGTATTGT TAATCGCTTT
12601 GATAAACAAA ACAAGGTGTT TGTGTTTACT TGCTCATCGT TAAAATGTCT TTATTTGACA
12661 ATTTTCTTCG TATTTGGAGT CACTATTAAC TACTCAATAT CGAATTTAAA ACATTCATTT
12721 AAAATTTAAA ATTTCCGCAC A

```

8.2 RESTRIKTIONSKARTE DES VEKTORS L4440

Die Gesamtgröße des L4440 ist 2790 bp. Die MCS des Vektors befindet sich flankiert von zwei T7 Promotoren. Diese befinden sich an Pos. 18 bp bis 38 bp und 240 bp bis 220 bp. Die Sequenz ist der Dokumentation von Vektoren des Vektorkits 1999 von Andrew Fire zu entnehmen unter der momentanen URL: <http://ftp.ciwemb.edu> (Timmons and Fire, 1998). U bezeichnet Restriktionsendonukleasen, deren Consensus Sequenz nur einmal vorkommt, D bezeichnet Restriktionsenzyme, deren Consensus doppelt im L4440 vorliegt. Angegeben ist die Position in bp. Es befinden sich erwartungsgemäß die meisten Restriktionsenzyme mit einfach vorliegendem Consensus in der MCS zwischen den beiden T7 Promotoren. Gelb unterlegt sind die in den Klonierungen verwendeten Restriktionsendonukleasen. Es sei darauf hingewiesen, daß *EcoRI* und *BamHI* je zwei Schnittstellen in L4440 besitzt, d.h. es muß bei der Planung einer Klonierung darauf geachtet werden, daß das zweite verwendete Enzym nicht zwischen den beiden Enzymen liegt (z.B. *EcoRI*, *PstI*).

T7↓	18	<i>VspI</i>	D	133	<i>PmaCI</i>	U	203	<i>DraII</i>	U	942	<i>BspHI</i>	D
	47	<i>BglII</i>	U	133	<i>BsaAI</i>	D	206	<i>PssI</i>	U	977	<i>SspI</i>	D
	55	<i>EcoRV</i>	D	137	<i>MluI</i>	U	207	<i>ApaI</i>	U	1110	<i>ApaLI</i>	D
	60	<i>ClaI</i>	D	137	<i>AflIII</i>	D	207	<i>HgiJII</i>		1180	<i>AclI</i>	D
	65	<i>EcoRI</i>	D	143	<i>BamHI</i>	D	209	<i>HgiCI</i>		1242	<i>AcyI</i>	U
	73	<i>Ecl1136II</i>	U	149	<i>AvaI</i>	D	209	<i>Asp718I</i>	U	1301	<i>ScaI</i>	U
	75	<i>HgiJII</i>		149	<i>XmaI</i>	U	213	<i>KpnI</i>	U	1389	<i>CfrI</i>	
	75	<i>SacI</i>	U	151	<i>SmaI</i>	U	T7↑ 253	<i>CfrI</i>		1412	<i>Afa22MI</i>	D
	79	<i>DsaI</i>	D	153	<i>Nli387/7</i>	D	337	<i>PvuII</i>	U	1413	<i>PvuI</i>	D
	80	<i>Mlu113I</i>	U	159	<i>PstI</i>	U	367	<i>Afa22MI</i>	D	1553	<i>AclI</i>	D
	82	<i>SacII</i>	U	161	<i>EcoRI</i>	D	368	<i>PvuI</i>	D	1559	<i>MstI</i>	D
	88	<i>NotI</i>	U	169	<i>EcoRV</i>	D	387	<i>MstI</i>	D	1607	<i>VspI</i>	D
	88	<i>XmaIII</i>	U	173	<i>HindIII</i>	U	482	<i>Bme142I</i>		1829	<i>HgiCI</i>	
	88	<i>CfrI</i>		180	<i>ClaI</i>	D	484	<i>HaeII</i>		1950	<i>BspHI</i>	D
	95	<i>XbaI</i>	U	188	<i>SalI</i>	U	490	<i>Bme142I</i>		2196	<i>HaeI</i>	
	101	<i>BcuI</i>	U	189	<i>AccI</i>	U	492	<i>HaeII</i>		2356	<i>ApaLI</i>	D
	107	<i>BamHI</i>	D	190	<i>HindII</i>	U	534	<i>Eco56I</i>	U	2428	<i>Bme142I</i>	
	113	<i>AgeI</i>	U	194	<i>AvaI</i>	D	536	<i>NaeI</i>	U	2430	<i>HaeII</i>	
	120	<i>NcoI</i>	U	194	<i>XhoI</i>	U	568	<i>HgiJII</i>		2648	<i>HaeI</i>	
	120	<i>DsaI</i>	D	196	<i>SciI</i>	U	598	<i>HgiCI</i>		2659	<i>HaeI</i>	
	120	<i>StyI</i>	U	198	<i>Nli387/7</i>	D	639	<i>BsaAI</i>	D	2670	<i>AflIII</i>	D
	125	<i>NheI</i>	U	203	<i>Bsp120I</i>	U	847	<i>SspI</i>	D	2674	<i>NspI</i>	U

nachfolgende Restriktionsenzyme schneiden L4440 Double T-7 script II nicht.

<i>AatII</i>	<i>AflIII</i>	<i>AsuII</i>	<i>AvrII</i>	<i>BalI</i>	<i>BbeI</i>	<i>BclI</i>	<i>Bsp1407I</i>
<i>BspMII</i>	<i>BstEII</i>	<i>Eco47III</i>	<i>EheI</i>	<i>EspI</i>	<i>HpaI</i>	<i>MfeI</i>	<i>NarI</i>
<i>NdeI</i>	<i>NruI</i>	<i>PpuMI</i>	<i>SauI</i>	<i>SnaBI</i>	<i>SphI</i>	<i>SplI</i>	<i>StuI</i>

8.3 KARTIERUNG DES DAF-15 LOKUS AUF CHROMOSOM IV

Die in den Abbildungen schematisch dargestellten Daten sind der Datenbank ACeDB (Eeckman und Durbin, 1995) der Aktualisierung in WS51 entnommen.

Abbildung A: schematische Darstellung von Chromosom IV

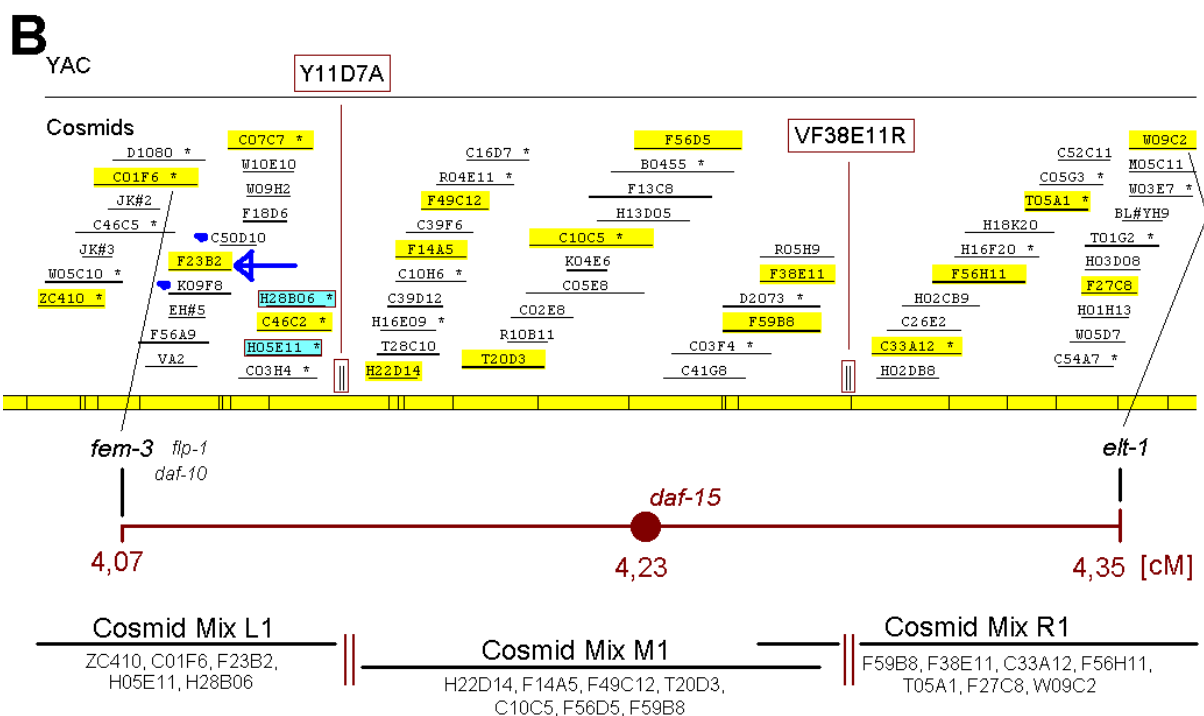
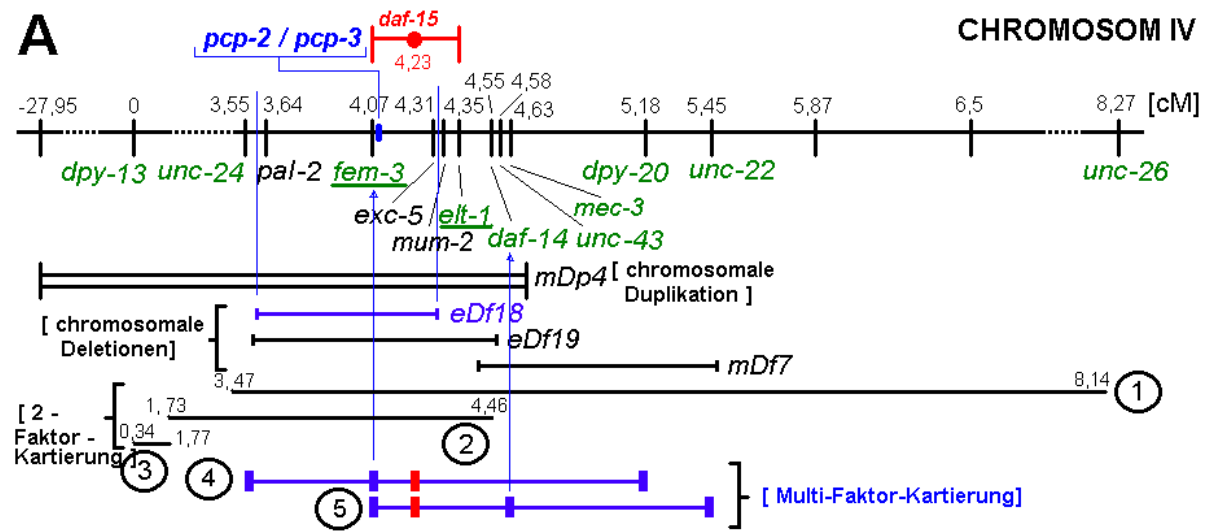
Die Zahlen repräsentieren in centi-Morgan die Positionen von Chromosom IV. Die grün dargestellten Gene sind die bereits klonierten Gene, deren Positionen auf dem Chromosom dadurch eindeutig identifiziert sind. Alle anderen Gene sind in ihrer Lage nur durch diverse Kartierungsexperimente identifiziert. Zunächst ist die Lage einiger chromosomaler Rearrangements dargestellt in Bezug zum gesamten Chromosom: Die Duplikation *mDp4* beinhaltet *daf-15*, *dpy-13*, *unc-24* und *daf-14*, *eDf18* deletiert *daf-15*, *pal-2*, *exc-5* und *fem-3*, jedoch nicht *unc-24*, *mum-2* und *elt-1* (Bereich durch blaue Begrenzungen besonders hervorgehoben), *eDf19* deletiert *daf-15*, *elt-1*, *fem-3*, *pal-2* und *daf-14*, jedoch nicht *unc-24* und *unc-43*. Mit 2-Faktor Kartierung konnte ein statistisch relevanter Bereich für den *daf-15* Locus ermittelt werden, dazu sind die Ergebnisse folgender Experimente zugänglich durch Messung der Ereignisse der Rekombination an folgenden Basisstämmen: *dpy-13(e184) / daf-15(m81)* IV (1), *daf-15(m81) unc-26(e184) / + +* (2) und *daf-15(m81) unc-24(e138) / + +* IV (3). Die angegebenen Werte sind die Endpositionen bezogen auf Chromosom IV innerhalb eines 95% Konfidenzintervalles (Albert und Riddle, 1988). Mit 3-Faktor Markierung kann die Position eines unbekanntens Gens relativ zu bekannten Genen kartiert werden. Zwei entscheidende Kartierungen dieser Art sind dargestellt nach Beurteilung von Rekombinationsereignissen folgender Stämme: *fem-3(e1996) dpy-20(e1282) / unc-24(e138) daf-15(m81)* IV (4) und *daf-15(m81) unc-22(s7) / fem-3(e1996) mec-3(e1338)* IV (5). Rot dargestellt ist stets der Bezug zu *daf-15*, erkennbar an der Positionsmarkierung in (4) und in (5), sowie die eindeutige Beschränkung des Locus auf den Bereich zwischen den beiden klonierten Genen *fem-3* und *elt-1* (unterstrichen), diese drei entscheidenden einschränkenden Experimente sind blau markiert (*eDf18*, (4) und (5)). Zudem erkennt man, daß *pcp-2* und *pcp-3* ebenfalls innerhalb der Deletion *eDf18* kartieren.

Abbildung B: Die physikalische Kartierung des *daf-15* Locus zwischen den klonierten Genen *fem-3* und *elt-1*

Die gelbe Leiste repräsentiert den physikalisch kartierten Bereich von Chromosom IV, die Begrenzungsstriche markieren sequenzierte Areale durch überlappend sequenzierte Cosmide (gelb unterlegt) des 'The *C. elegans* Sequencing Consortium' (1998). Die anderen Cosmide kartieren gemäß Hybridisierung wie angedeutet. Das begrenzende Gen *fem-3* befindet sich in Cosmid C01F6, *elt-1* in W09C2. Der Bereich wird nicht komplett durch Cosmide abgedeckt, deshalb ist zudem ein YAC Y11D7A sowie ein weiterer Klon VF38E11R verfügbar, um die Lücken zu füllen (rot eingerahmt). In diesem Bereich sind 121 Gene

vorhergesagt, davon sind aber nur die Gene *flp-1* und *daf-10* charakterisiert worden, sie befinden sich beide in Cosmid F23B2 (Pfeil). Rettung des durch *daf-15(m81)* verursachten Phänotyps wurde initiiert durch Injektion von Cosmidmischungen in den Stamm DR732 mit dieser Mutation versucht. Die Mischungen heißen L1, M1 und R1. Die in diesen Mischungen verwendeten Cosmide sind aufgelistet worden. Von C46C2 konnte keine brauchbare Cosmidpräparation erzielt werden, stattdessen wurden die überlappenden Cosmide H05E11 und H28B06 (blau unterlegt) verwendet. Zudem wurde das YAC Y11D7A in DR732 injiziert, sowie auch einzeln die sequenzierten Cosmide der Mischung des Bereichs von L1. Eine Rettung des Phänotyps durch *daf-15(m81)* wurde nicht beobachtet.

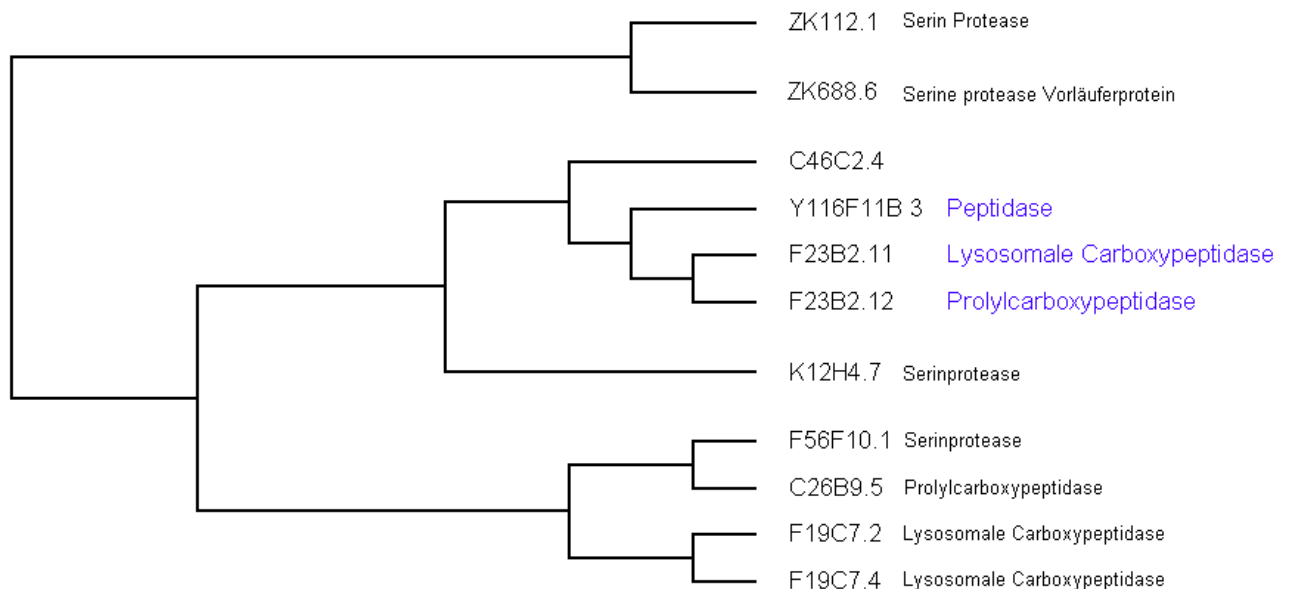
F23B2 (Pfeil) beinhaltet auch die Gene *pcp-2* und *pcp-3*, von *pcp-2* jedoch nicht die Promotorregion, weshalb zusätzlich die überlappenden Cosmide K09F8 und C50D10 Verwendung fanden.



8.4 DIE α/β HYDROLASE PROTEINE IN *C. ELEGANS*

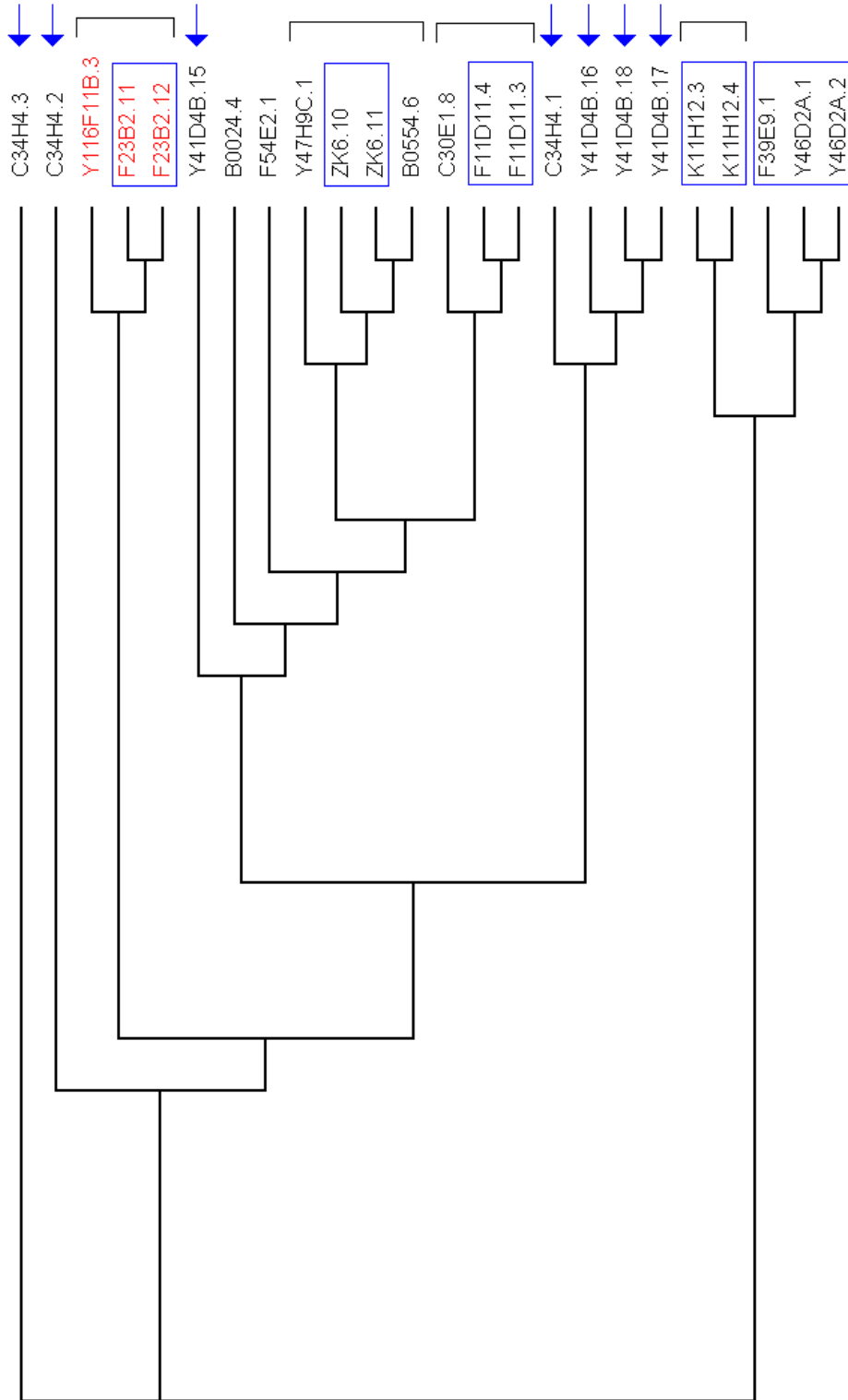
Nachfolgend ist eine graphische Präsentation der Verwandtschaftsbeziehungen von lysosomal sekretierten Carboxypeptidasen mit α/β Hydrolase Faltungseinheit in *C. elegans* dargestellt. Die für die vorliegende Arbeit relevanten Proteine sind farbig markiert. Im darauf folgenden ungewurzelten Verwandtschaftsbaum sind diese Proteine in der Gesamtheit der *C. elegans* Proteine mit α/β Hydrolase Faltungseinheit dargestellt. In roter Markierung sind im weitesten Sinne Gruppen von Carboxypeptidasen erfaßt, braun dargestellt eher eine funktional heterogene Zusammenstellung, blau eingefärbt zeigt sich die prominenteste Gruppe, die fast ausschließlich aus Lipasen der Klassen 1, 2 und 3 besteht, die funktional mit Lipid Stoffwechsel und Abbau in Verbindung stehen.

Die funktionale Zuordnung jedes Proteins wurde den Daten des The *C. elegans* Sequencing Consortium (1998) entnommen.



8.5 PROTEINE MIT DUF274 DOMÄNE IN *C. ELEGANS*

Im Nachfolgenden ist ein Baum dargestellt, der die Ähnlichkeiten der Proteine mit DUF274 Domäne abbildet. Das Abbild entstammt einem multiplen Proteinsequenzvergleich aus 21 *C. elegans* Proteinen, die lediglich die DUF274 Domäne besitzen gemäß INTERPRO Datenbank. Zusätzlich wurde der Bereich der Proteine von F23B2.11 und Y116F11B.3 mit einbezogen, der gemäß PFAM Analyse Ähnlichkeit zu DUF274 besitzt. F23B2.12 weist aber auch diesen Sequenzbereich auf und ist mit einbezogen worden. Die blauen Kästen markieren diejenigen Proteine, deren Gene im Genom direkt benachbart sind. Das Cluster aus sieben Genen, welche aber im Sequenzvergleich nicht direkt benachbart sind, sind mit einem blauen Pfeil markiert. Diese Gene weisen aber alle gleiche Orientierung zueinander im Genom auf. Mit einer zusätzliche Klammer sind diejenigen Proteine markiert, deren CDS im Genom aus nachfolgend annähernd gleich großen Exons besteht (siehe vergleichend Abbildung 1A). Dies betrifft in einigen Fällen nicht den gesamten Bereich der CDS, ist aber signifikant auffällig.

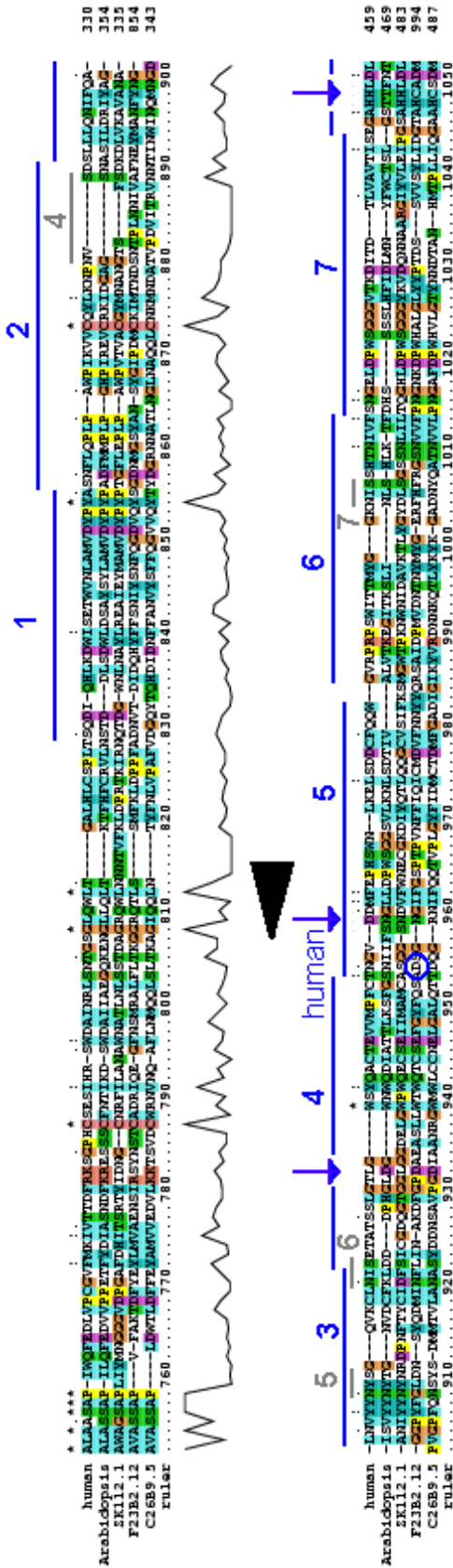


8.6 DARSTELLUNG DER CHARAKTERISTIKA VON PROLYLCARBOXYPEPTIDASEN

Es sind zwei multiple Sequenzvergleiche dargestellt.

Das erste Alignment beinhaltet als Referenz humane Prolylcarboxypeptidase (PRCP; Tan *et al.*, 1993), sowie eine PCP aus *Arabidopsis thaliana*. Diese stehen im Vergleich zu drei Prolylcarboxypeptidasen aus *C. elegans*. Dadurch wird die höchste Konservierung wichtiger Proteinbereiche deutlich. Zu Beginn der Sequenz ist mit rotem Balken die Signalsequenz der Proteine dargestellt für intrazelluläre Lokalisierung der Proteine. Diese liegt stets am N-Terminus eines Proteins, damit bezeichnet der erste Balken die Signalsequenz von PCP-2 (F23B2.12), der zweite Balken die Sequenz humanen PRCPs. In lila ist die auf das Signal folgende Sequenz eines möglichen Propetids humanen PRCPs markiert. Die dicken schwarzen horizontal verweisenden Pfeile markieren die Enden vorhergesagter α/β Hydrolase Faltungseinheit. Grau markiert sind die Stellen humaner möglicher Glykosylierungsstellen mit dem Consensus NXS/T. Man erkennt, daß diese Positionen in den einzelnen Proteinen variieren, sie sind in späterer Abbildung für die Proteine PCP-1, PCP-2, PCP-3 und PCP-4 markiert worden. Die dicken blauen Pfeile markieren die stark konservierten Aminosäuren Serin, Asparaginsäure und Histidin der katalytischen Einheit der α/β Hydrolase Faltung. Zu beachten ist, daß das Aspartat nicht in allen Sequenzen an der gleichen Stelle erscheint. In der Alignment Position 993 ist das Aspartat von PCP-2 markiert, welches gemäß Endposition der Faltungseinheit und in Übereinstimmung mit dem nachfolgenden Sequenzvergleich eher für das reaktive Zentrum in Frage kommt. Blaue Balken markieren die einzelnen repetitiven Serineinheiten von je 26aa, die finale Neunte jedoch ist verkürzt.

Der zweite Sequenzvergleich befaßt sich speziell mit der sehr ähnlichen Gruppe von *C. elegans* Carboxypeptidasen F23B2.11, F23B2.12, Y116F11B.3 und zusätzlich C46C2.4 gemäß Anhang 8.4. Die Farbcodierung ist ähnlich. Die Glykosylierungsstellen der unterschiedlichen Carboxypeptidasen sind unterschiedlich markiert: F23B2.11 (grün), F23B2.12 (dunkelblau), Y116F11B.3 (rot), C46C2.4 (hellblau). In braun sind die Aminosäuren 1-41 von PCP-3 markiert. Würden diese fehlen, begönne das nachfolgende Protein mit einem Methionin gefolgt von einer zu den anderen Proteinen vergleichbaren Signalsequenz, die in den ersten 41 Aminosäuren nicht vorhanden ist. Da 2 α/β Hydrolaseeinheiten vorliegen, sind auch 2 reaktive Zentren zu erwarten (nicht C46C2.4), mit blauen Pfeilen markiert.

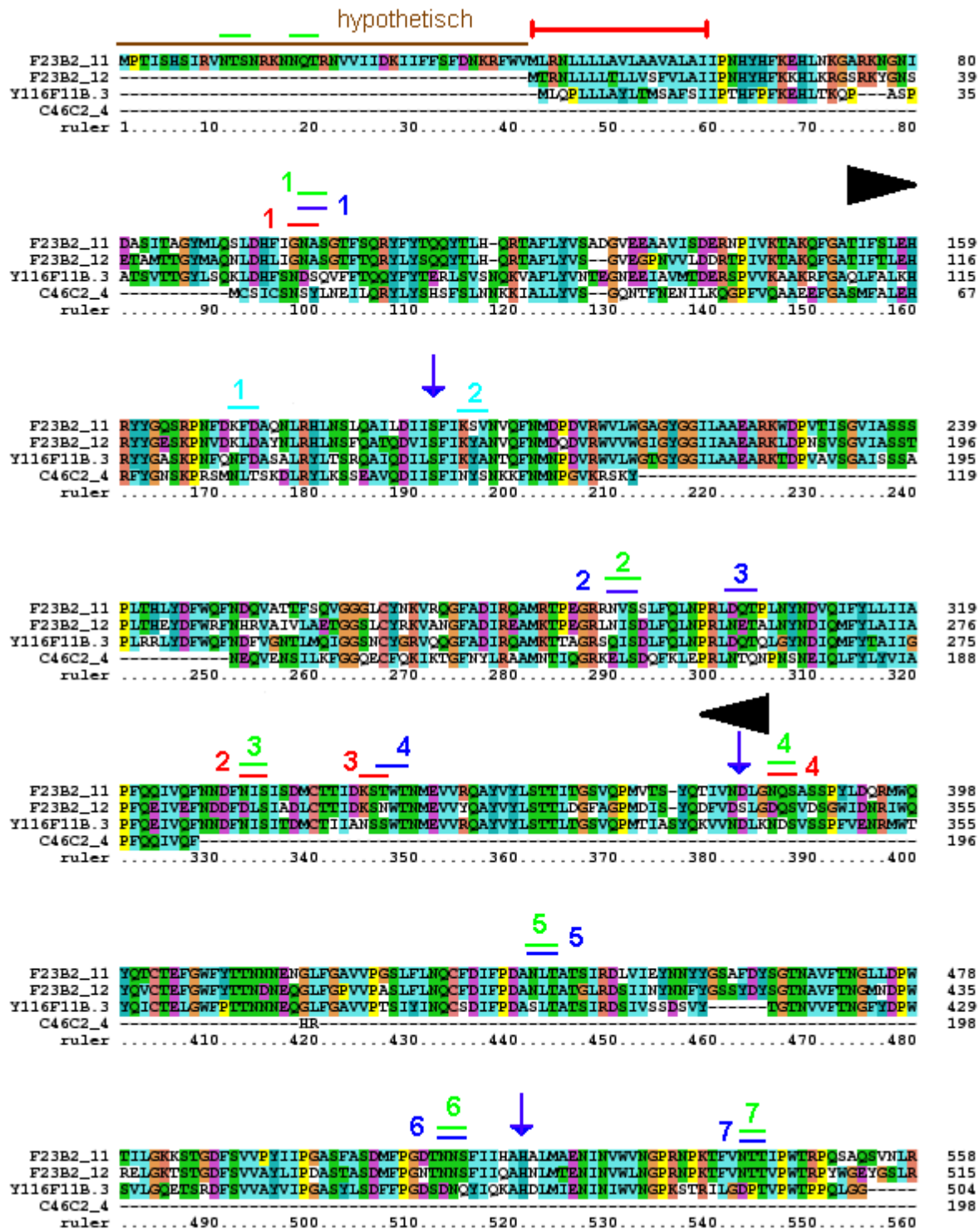






human

8 9

Sequenzvergleich 2:

Carboxypeptidasen PCP-3, PCP-2, PCP-4 und C46C2.4



		<u>8</u>	
F23B2_11	ESVLKQELIESRFSKLGDDVPSKKTFFPEPKFKKVFGRPPHGFLPEPDYELKEDAYPPGFEGSTFRQRQDHFNNQADFFQ		638
F23B2_12	ETMLKQEVESKFSKLENGRISSEKTFPEPKFKKVFGRPPHGFLPESEDFNMSPPDYAGFETSSFRQRQDHFNNQADFFQ		595
Y116F11B.3	-----SEASELASSKVFS-----RITLE--R-----TPSRGIFHRRHLEILLASSYPAGFEQSTFRQRQDHFDDLNVDFQ		566
C46C2_4	-----		199
ruler570.....580.....590.....600.....610.....620.....630.....640		
			
		<u>8</u>	<u>5</u>
F23B2_11	QKFFKNAQWAKQGGPQFLMIGGGPESARWVLENIITVITWAKKYGATVYVLELHRRFYGDSVVGDNINFKLLNQLMLYDI		718
F23B2_12	QRFFKNTQWAKPGGPNFLMIGGSEPKASWVLENLPLYIWKAKKYGATVYVLELHRRFYGDSRVGDNINFKLLNQLMLYDI		675
Y116F11B.3	QKFFKNSQWAKPGGPNFLMIGGSEAEAGESWVLEKLPWLLSAQKYGATVYVLELHRRFYGDSLWGNNTNLLLSLQVLYDS		646
C46C2_4	QRFFKNSKYAKEGGPQFLCIGQDGRDENSIRFDVFAVVEKAQKFGATVYVLELHRRFYGDSNVGDNSDLSKLSLQMLYDI		279
ruler650.....660.....670.....680.....690.....700.....710.....720		
			
		<u>9</u>	
F23B2_11	AEFIKAVNIRDTGTSNPWITFGGYSYGAMSAMREVFPPDLVVGAVASSGPVYAKTDFEYIIMVVENSVRRYNSRCADNIQS		798
F23B2_12	ADFIKRSVNIKSGTGNPWITFGGYSYGLISAKTREVFPPELVVGAVASSAPVFAKIDFEYIIMVAENSIRSYNSRCADRIQE		755
Y116F11B.3	AEFIKAINYKQSSTPWITFGRRFPF--LSAWTRAIFPDLVVGAVASSGAILAKTDFEYIIMVMEIIRKYDNRCADRIKQ		724
C46C2_4	AEIIRKEENLKNITGTSNPWITFGGYSYGMLSAMREIFHEFVVGAVASSAPILAKTDFEYIIMVVEDVFRRYDICTYNAIKK		359
ruler730.....740.....750.....760.....770.....780.....790.....800		
		<u>9</u>	<u>10</u>
		<u>3</u>	<u>6</u>
F23B2_11	GFDAIRTLFLFKGGRONLSSIFQLQPPFSDSVLEDDQHYFFSNVYGNFQGAVQYSGDNTGPNYANGYGIPTMCKIMSHDSN		878
F23B2_12	GFNSMRALFLKGGROTLSSMPKLDPPFADNVDDIDQHYFFSNVYGNFQGDVQYSGDNMGSYANSYGIPTMCKIMTNSN		835
Y116F11B.3	GFDEIRGLFLFSEGRDLSKIFQLLPGFSENVETDDQHYFFSNVYGNFQLAVQFSGDNGSPWADSYGIPTMCRFMTG-AG		803
C46C2_4	GFLEIQRMFLIEDGRDKLSKLPFSYPALRNPFSETRKHEFLDLADPFETSVQYAGYSSGAFAKQS---KK--LKN---		430
ruler810.....820.....830.....840.....850.....860.....870.....880		
			
		<u>7</u>	
F23B2_11	TPLNIVAFNCFMIIFYNGG-CYVGMNNYQNMITYLKTAGHYGPDAAAGLLWFWQACEFPGYFQSADSGNGIFGSPTPV		957
F23B2_12	TPLNIVAFNCFMIFNYGGGPFGLDNSYQDMINFLINAKDFGPDAAEALLWFWQACEFPGYFQSADSGNGIFGSPTPV		915
Y116F11B.3	TPLDNIVAFNCFMIFNYGGGTYVGMNNYQNMITYLKNKSKDYGEVDPQLLWFWQCTEYGGFQSADSGSGLFGSPVPV		883
C46C2_4	KPKGVDVNOQDDISTENDGL-----I-----NMWQCTEFGFYQSTDTGNSIFGN-VPV		478
ruler890.....900.....910.....920.....930.....940.....950.....960		
			
		<u>4</u>	<u>5</u>
		<u>6</u>	<u>7</u>
F23B2_11	NMYVQCMQDVFNNQYQRTSIDYSIANTNYKYGERPHYRGTNVVLPNGRVDPWHALGLYTPEDSSVVSYLIDGTAHCADMY		1037
F23B2_12	NFFIQCIMQDVFNNYQRTSAIDPMVDNTNYMYGERPHFRGNSVVPVNGNKPWHALGLYTPEDSSVVSYLIDGTAHCADMY		995
Y116F11B.3	SFLIQCMQDLPNGTYDRKIDSLIDFTNYKYGGRDNFRGNSVVFVINGIDPHYVVLGLENPSSVVSYLIDGSSHCADMF		963
C46C2_4	SYFVQCMQDLPNGTYTRANDKQVGRLENHKKYDGTVEFNATNVVFLNGDADPWSPLGLKNSIDPSSVVSFLINGSSHCVDMY		558
ruler970.....980.....990.....1000.....1010.....1020.....1030.....1040		
		<u>8</u>	<u>11</u>
		<u>8</u>	<u>9</u>
F23B2_11	PARDADVPGLKVVRDLVDQNIKWLNQSP-ATGANCIPGTGSAKPGTGSSTSCPVTASTVQATTKSTSSATIELSFIAIF		1116
F23B2_12	PARDADVPGLKVVRDLIDQNIKWLNQAPPSTGTCVOTSGTSTASPGTGSSTSCPVTASTVQATTKSTSSATIELSFIAIF		1075
Y116F11B.3	PARDSDVPGLKVARDLVDQNIKWLNQGVNITTDALITSNSTSYSTLYSLEPT-----ETKSTSVNRVFIQFCVIM		1036
C46C2_4	SETDDLPDLKTRARKIVDENIEKWLNSIT--ETKSP--NSANYP--RAIN--SLAVLIVYVIVL		614
ruler1050.....1060.....1070.....1080.....1090.....1100.....1110.....1120		
F23B2_11	ARVILL-	1121	
F23B2_12	VSVILL-	1080	
Y116F11B.3	FDFLVL	1042	
C46C2_4	-----	614	
ruler		

8.7 MIGRATION DER DISTALEN TIP ZELLE (DTC)

Die Form jeden Gonadenarms entsteht durch die Geschichte des Migrationsverlaufs der distalen Endzelle (DTC). Migration der DTC der somatischen Gonade verläuft in drei Phasen. In der Abbildung ist stets die Entwicklung der posterioren Gonade dargestellt, unten ist ventral, oben dorsal, links anterior und rechts posterior. A: Wildtyp N2; B: Mutante in *unc-5*, *unc-6* oder *unc-40*, C: Mutante in *mig-6*, D: Mutanten in *dig-1* oder *mig-4*, E: Mutanten in *daf-12* oder *daf-9* (*mig-8* ist die alte Bezeichnung), F und G: RNAi von *pcp-2* und *pcp-3*, H: Mutante in *gon-12*.

Nachfolgend ist die Beschreibung für die Entwicklung nach Hedgecock *et al.* (1987) im Wildtyp (Abb. A) dargestellt.

Phase 1: Migration der DTC entlang der ventralen Muskelbänder in posteriore Richtung. Der Startpunkt der Migration liegt dorsal der Vulvavorläuferzellen, die im Adulten den Eiablageapparat ausbilden. Beginn der Migration ist 25 Stunden nach Schlupf der L1 Larve aus der Eihülle, der Nematode befindet sich dann im frühen L3 Stadium.

Phase 2: Ventral nach Dorsal; die Migrationsrichtung erfährt eine Reorientierung, die DTC wendet sich von den ventralen Muskelbändern ab und orientiert sich zum dorsalen Muskelband, in dem das TGF β Signal des Migrationsfaktors *unc-129* exprimiert wird. Zudem migriert die DTC dabei auch in Richtung eines dorsal auf ein kleines Areal punktförmig exprimierten *pcp-3* Signals hin (siehe auch Abbildung 6H und 6I). Bei dieser Reorientierung der DTC ist ebenso PCP-2 Protein in den umgebenden Darmzellen erkennbar (Abb. 5). Der Zeitpunkt dieser Migrationsphase findet 30 h nach Schlupf im späten L3 Stadium statt.

Phase 3: erneute Migrationsänderung. Die DTC migriert entlang des dorsalen Muskelbands zurück zur Körpermitte und beendet die Migration ungefähr dorsal der Vulva.

Beispiele für Mutanten:

B: *unc-5*, *unc-6* und *unc-40*: Phase 2 fehlt, dadurch findet Phase 3 auch auf der ventralen Seite statt.

C: *mig-6*: Nur Phase 2 wird ausgeführt, Die Gonade ist dann natürlich nicht funktional.

D: *mig-4* und *dig-1*: Phase 1 und 3 nur auf der dorsalen Seite, da der gesamte Gonadenursprung mißplaziert auf der dorsalen Körperseite liegt.

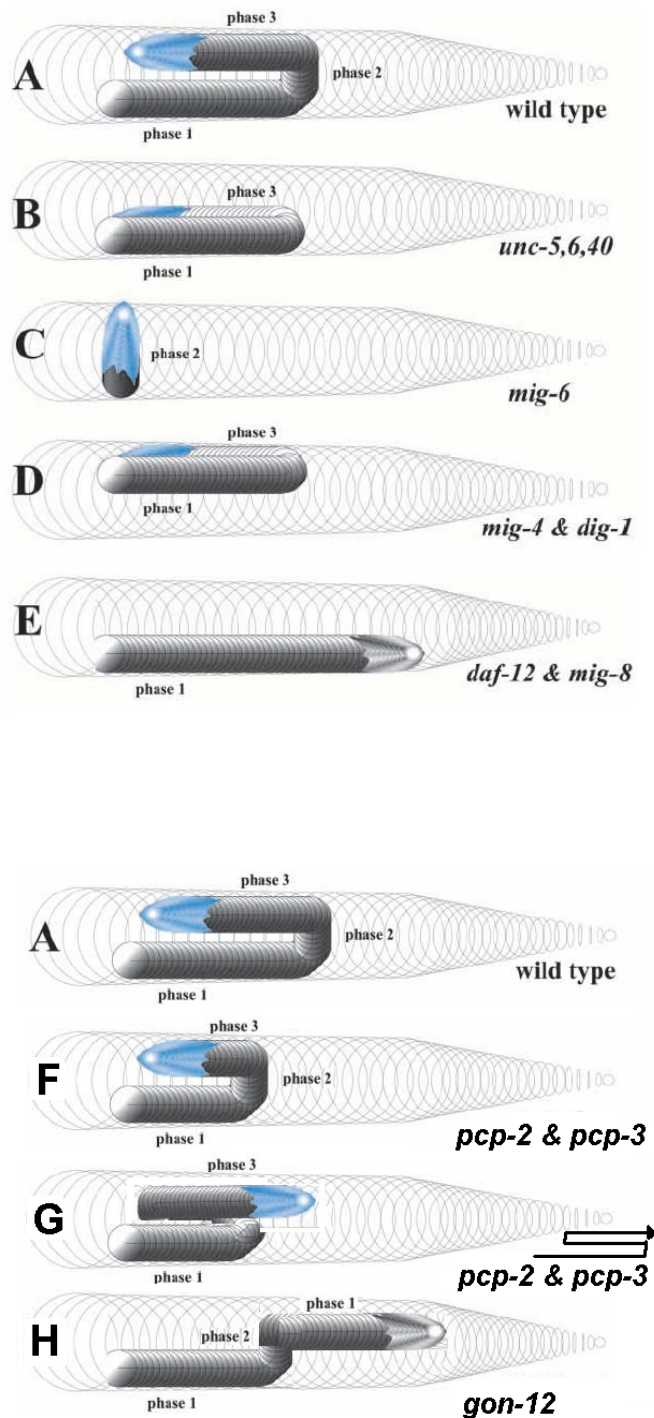
E: *daf-12* und *daf-9* (*mig-8*): heterochrone Gene die das Schicksal im dritten Larvalstadium kontrollieren. Migrationsrichtungsänderung von Phase 2 und 3 fehlen, nur eine lineare Gonade entsteht.

F: RNAi von *pcp-2* und *pcp-3*, Phase 2 verfrüht

G: RNAi von *pcp-2* und *pcp-3*, Phase 2 verfrüht, eine zweite Umkehrung der Wachstumsrichtung erfolgt (der Anschaulichkeit ist diese Drehung daneben erneut abgebildet)

G: Mutante in *gon-12*, Phase 3 erfolgt in falscher Richtung, entspricht Wiederholung Phase 1 auf dorsaler Seite.

Die Abbildung wurde Su *et al.*, (2000) entnommen. Graphiken F-H entsprechend dieser Vorlage erstellt.



8.8 EXPRESSIONSDATEN VON *PCP-2* UND *PCP-3* DURCH *IN SITU* HYBRIDISIERUNG



A-C: *in situ* Hybridisierung von *pcp-3* mit einer Sonde des cDNA Klon
YK43E11 (Acc.No. D34264)

A: 4-Zell Stadium, mRNA von *pcp-3* akkumuliert posterior, vorwiegend in der P2 Zelle

B: Schlinge: *pcp-3* Signal peripher um den Embryo entlang der Längsachse

C: L3 Stadium, das Signal durch Hybridisierung ist im gesamten Darm

D, E: *in situ* Hybridisierung von *pcp-2* mit einer Sonde des cDNA Klon
YK52C6 (Acc.No. D64433 und D67414)

D: Zwei L2 Larven mit Signal im gesamten Darm, im posterioren Bereich aber verstärkt (zwei übereinander gelegte Einzelbilder unterschiedlicher Größenordnung)

E: L4 Larve mit Signal im gesamten Darm

Die Bilder wurden der Datenbank NextDB (Kohara, 2001) entnommen unter der URL:
<http://nematode.lab.nig.ac.jp/dbest/keysrch.html>. Die Bilder wurden nachträglich mit
Standard Graphik Software verarbeitet. Kalibrierungsmarkierungen standen nicht zur
Verfügung.

Lebenslauf

Name: Stephan Fröde
Geburt: 18. Juni 1975 in Neuburg an der Donau
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig
Eltern: Roland Fröde und Anita Fröde geb. Biecker
Geschwister: Angela Fröde (24 J.)

Werdegang

Jan. 2000 – Dez- 2002 Promotion

„Drei neu identifizierte Gene in der Morphogenese von *Caenorhabditis elegans*: *pcp-2*, *pcp-3* und *gon-12* sind sowohl während dem dritten Larvalstadium, als auch im alternativen Dauerlarvenstadium aktiv und regulieren die Entwicklung reproduktiver Organe“.

Dabei wissenschaftlicher Angestellter im III. zoologischen Institut - Entwicklungsbiologie der Georg August Universität Göttingen
Die Arbeit wird von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) im Rahmen des Sonderforschungsbereichs (SFB) 271, „molekulare Genetik morphoregulatorischer Prozesse“, gefördert im Teilprojekt A14, „Molekulare Analyse der Morphogenese der Dauerlarve von *Caenorhabditis elegans*“.
Die Projektleitung hat Dr. Ekkehard Schulze inne, Leiter des Instituts war bis März 2001 Prof. Dr. Ulrich Grossbach, nachfolgend kommissarische Leitung durch PD. Dr. S. Hoyer-Fender.

Okt. 1994 – Dez. 1999 Studium; Abschluß: Diplom Biologe

Diplom-Studiengang in Biologie; Georg August Universität in Göttingen
Die abschließende Diplomarbeit wurde auch im III. zoologischen Institut - Entwicklungsbiologie in derselben Abteilung angefertigt.
Das Thema der Arbeit war: „Molekulare Untersuchungen zur biologischen Bedeutung des singulären Histon H1 Gens in *Dictyostelium discoideum*“.

Sep. 1985 – Jul. 1994 Gymnasium; Abschluß: allgemeine Hochschulreife (Abitur)

Gymnasium Donauwörth mit Abschluß des Abitur