

Identifizierung und Charakterisierung von
Intermediärfilament-Organisatoren in
Caenorhabditis elegans

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

dem Fachbereich Biologie

der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

vorgelegt von

Katrin Hüsken

geboren in Marburg an der Lahn

Mainz, Juli 2008

Datum der mündlichen Prüfung: 08.09.2008

Meinen Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

1	Einleitung	1
1.1	Intermediärfilamente	1
1.2	Der Nematode <i>Caenorhabditis elegans</i> als Modellorganismus	5
1.3	Intermediärfilamente in <i>C. elegans</i>	7
1.4	Der Darm von <i>C. elegans</i>	9
1.5	Ziele der Arbeit.....	11
2	Material und Methoden	12
2.1	Materialien	12
2.2	Puffer und Medien.....	15
2.3	DNA-Oligonukleotide	17
2.4	Plasmide	18
2.5	Restriktionsendonukleasen.....	19
2.6	Antikörper.....	19
2.7	Bakterienstämme	20
2.7.1	Kultivierung von XL1-Blue	20
2.7.2	Kultivierung von HB101	20
2.7.3	Kultivierung von HT115(DE3).....	20
2.7.4	Herstellung kompetenter Bakterien des Stammes XL1-Blue.....	21
2.7.5	Herstellung kompetenter Bakterien des Stammes HT115(DE3)	21
2.8	Molekularbiologische Methoden	22
2.8.1	PCR (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)	22
2.8.2	Restriktionsverdau	23
2.8.3	Dephosphorylierung von Vektoren	24
2.8.4	Ligation	24
2.8.5	Amplifikation von isolierter Plasmid-DNA in Bakterien	24
2.8.5.1	Transformation von Plasmiden in XL1-Blue-Bakterien	24
2.8.5.2	Transformation von RNAi-Plasmiden in HT115(DE3)-Bakterien.....	25
2.8.6	Präparation von Plasmid-DNA.....	25
2.8.7	Spektralphotometrische Bestimmung der DNA-Konzentration.....	25
2.8.8	DNA-Gelelektrophorese.....	26
2.8.9	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen	26
2.8.10	Sequenzierung von DNA	26
2.9	<i>C. elegans</i> -Methoden.....	26
2.9.1	<i>C. elegans</i> -Stammhaltung und Kryokonservierung	26
2.9.2	Erzeugung von Stadien-synchronen <i>C. elegans</i> -Populationen	27
2.9.3	Etablierung transgener <i>C. elegans</i> -Stämme.....	27
2.9.3.1	Integration extrachromosomaler <i>arrays</i>	28
2.9.4	Generierung von <i>C. elegans</i> -Männchen und Verpaarung	29

2.9.5	RNA-Interferenz.....	29
2.9.5.1	RNAi durch Füttern von dsRNA-produzierenden Bakterien	30
2.9.5.2	RNAi durch Injektion von dsRNA.....	30
2.9.6	Immunhistologie.....	31
2.9.6.1	Herstellung Poly-L-Lysin-beschichteter Objektträger	31
2.9.6.2	Gewinnung von Embryonen	31
2.9.6.3	Präparation von Därmen	32
2.9.6.4	Gefrierbruch und Fixierung.....	32
2.9.6.5	Antikörperinkubation.....	32
2.9.7	Phalloidin-Färbung.....	33
2.9.8	Fluoreszenzmarkierung des Darmlumens	33
2.10	Mikroskopie	33
2.10.1	Differentielle Interferenzkontrast-Mikroskopie nach Nomarski	33
2.10.2	Konfokale Laserscanmikroskopie	33
2.10.3	Elektronenmikroskopie	34
2.11	EMS-Mutagenese-Screen.....	34
2.12	Lokalisierung von Mutationen durch SNP-Kartierung	36
2.12.1	Chromosomale SNP-Kartierung	36
2.12.2	Subchromosomale Intervall-Kartierung	40
3	Ergebnisse.....	43
3.1	Etablierung eines <i>in vivo</i> -Systems zur Detektierung von fluoreszierenden Intermediärfilamenten	43
3.1.1	Verteilungsmuster von Intermediärfilamenten in <i>C. elegans</i>	43
3.1.1.1	Tests zur Spezifität der IFB-2- und IFC-2-Antikörper	45
3.1.2	Generation von transgenen Reporterstämmen zum Nachweis der IFB-2-Verteilung.....	46
3.1.2.1	Chromosomale Lokalisierung der <i>ifb-2::cfp</i> -Integrationen.....	49
3.2	Detektierbarkeit phänotypischer Veränderungen im IFB-2::CFP-Muster.....	51
3.3	Phänotypische und funktionelle Analysen nach <i>ifc-2</i> (RNAi) in IFB-2::CFP-exprimierenden Tieren	52
3.3.1	Entwicklung und Analyse des <i>ifc-2</i> (RNAi)-Phänotyps	53
3.3.2	Morphologische und funktionelle Untersuchungen der apikalen Junctionen in Abwesenheit von IFC-2.....	58
3.3.3	Analyse der apikalen Domäne des Darmepithels IFC-2-defizienter Tiere	60
3.4	Isolierung von Mutanten mit veränderten IFB-2::CFP-Mustern	61
3.5	Identifizierung der mutierten Gene mit Hilfe genetischer SNP-Kartierung und RNAi.....	64
3.5.1	Chromosomale Lokalisierung der Mutationen	64
3.5.1.1	Chromosomale Lokalisierung der Mutation des Stammes BJ132.....	64
3.5.1.2	Chromosomale Lokalisierung der Mutation des Stammes BJ133.....	66
3.5.1.3	Chromosomale Lokalisierung der Mutation des Stammes BJ134.....	66

3.5.2	Komplementierungstest der Mutationen der Stämme BJ133 und BJ134	67
3.5.3	Subchromosomale Intervall-Kartierung der Mutationsloci	68
3.5.3.1	Subchromosomale Lokalisierung der Mutation von BJ132	69
3.5.3.2	Subchromosomale Lokalisierung der Mutation von BJ133/BJ134	73
3.5.4	Identifizierung der mutierten Gene durch RNAi der Einzelgene in den Intervallen	75
3.5.4.1	Identifizierung des mutierten Gens des Stamms BJ132.....	75
3.5.4.1.a	Verteilung weiterer Intermediärfilamente in BJ132.....	76
3.5.4.2	Identifizierung des mutierten Gens der Stämme BJ133 und BJ134	77
3.6	IFO-1: Identifizierung und Charakterisierung eines neuen Intermediärfilament- Organisators	78
3.6.1	Sequenzanalysen von IFO-1	78
3.6.2	Interferenzkontrastdokumentation von <i>ifo-1</i> -Mutanten	81
3.6.3	Ultrastrukturelle Analyse von <i>ifo-1</i> -Mutanten.....	81
3.6.4	Expressionsanalysen von IFO-1.....	82
3.6.5	<i>Rescue</i> des <i>ifo-1</i> -Phänotyps durch Expression von IFO-1::YFP	84
3.6.6	Verteilung von IFC-2 in <i>ifo-1</i> -Mutanten.....	85
3.6.7	Junktionale Integrität in <i>ifo-1</i> -Mutanten.....	86
3.6.8	Intestinale Aktin-Verteilung in <i>ifo-1</i> -Mutanten	87
4	Diskussion.....	89
4.1	Etablierung eines <i>in vivo</i> -Modells mit Fluoreszenz-markierten Intermediär- filamenten zum Einsatz in optischen <i>Screens</i>	89
4.1.1	IFC-2 ist essentiell für die Stressresistenz der <i>endotube</i>	90
4.2	Identifizierung und Charakterisierung von Modulatoren des intestinalen Intermediärfilament-Systems	93
4.2.1	SMA-5: ein weiterer essentieller Faktor zur Aufrechterhaltung der Integrität des intestinalen Lumens	95
4.2.2	IFO-1 reguliert die Lokalisierung von Intermediärfilamenten und Aktin- filamenten in der subapikalen Enterozyten-Domäne	97
4.3	Fazit	100
5	Zusammenfassung	101
6	Literaturverzeichnis	102
7	Anhang.....	110
7.1	<i>C. elegans</i> Stämme	110
7.2	Kandidatengene des RNAi-Pilot- <i>Screens</i>	111
7.3	Amplimere zur chromosomalen SNP-Kartierung	112
7.4	<i>Alignment</i> der IFO-1-Sequenzen von drei <i>Caenorhabditis</i> -Arten	114
8	Abkürzungsverzeichnis.....	117
9	Abbildungsverzeichnis.....	119
10	Tabellenverzeichnis.....	122

1 EINLEITUNG

Das Zytoskelett eukaryotischer Zellen setzt sich aus drei Hauptkomponenten zusammen: den Aktinfilamenten (AF), den Mikrotubuli (MT) und den Intermediärfilamenten (IFs). Die drei Filamenttypen haben unterschiedliche Funktion und Strukturen, aber bilden dennoch zusammen ein integriertes Gesamtsystem, welches für viele zelluläre Prozesse essentiell ist. So reguliert das Zytoskelett neben der mechanischen Stabilisierung von Zellen auch den Transport von Vesikeln, Proteinen und Organellen, spielt eine Rolle bei Zellteilungs- und Migrationsprozessen, etabliert Zellpolarität und ist bei Mechanismen der zellulären Stressantwort beteiligt. Zur Erfüllung dieser Aufgaben bedarf es enorme Umstrukturierungsprozesse des Zytoskeletts, was eine gut aufeinander abgestimmte Regulierung der drei Filamenttypen voraussetzt. Besonders für eine dieser Zytoskelettkomponenten, den IFs, konnten bislang nur wenig assoziierte Proteine identifiziert werden (Coulombe et al., 2000; Coulombe and Wong, 2004; Izawa and Inagaki, 2006). Somit gestaltet sich die Identifizierung und Charakterisierung der zugrunde liegenden molekularen Mechanismen und Modulatoren schwierig. Dabei ist dies von besonderem Interesse, da IFs, je nach Zelltyp bis zu 85% vom Gesamtprotein einer Zelle ausmachen und in den unterschiedlichsten Anordnungen vorkommen: In kultivierten Zellen bilden sie feine, dreidimensionale Netzwerke, sie kommen in Form von dichten Bündeln in Neuronen und Keratinozyten vor, erscheinen als zytosolische Granula in mitotischen Zellen und wurden in Form von subapikalen Anreicherungen im Terminalgeflecht von Enterozyten beschrieben.

Es stellt sich also die Frage, welche Faktoren dazu beitragen das IF-Netzwerk zelltypspezifisch zu organisieren und schnell und effizient umzubauen, so dass bestimmte grundlegende Zellfunktionen stattfinden können. Zur Beantwortung dieser Frage und somit zur Identifizierung von IF-Modulatoren bietet sich der genetische Modellorganismus *C. elegans* an, der IFs exprimiert und der sich auf Grund seiner exzellenten methodischen Manipulierbarkeit hervorragend dazu eignet, derartige Studien durchführen zu können.

1.1 Intermediärfilamente

Intermediärfilamente sind neben Aktinfilamenten und Mikrotubuli die dritte filamentäre Komponente des Zytoskeletts. Ihren Namen verdanken sie ihrem Durchmesser, der mit 8-12 nm zwischen dem von Aktin (2-5 nm) und dem eines Mikrotubulus (~25 nm) liegt.

Neben den zytosolischen IFs, die ubiquitär, aber in einer Zelltyp-spezifischen Abundanz und Komposition exprimiert werden, gibt es nukleäre Lamine. Im Genom von Säugern kodieren ~67 Gene für zytoplasmatische IFs, während drei Gene für Lamine kodieren. Basierend auf

Sequenzhomologien werden 5 Multigenfamilien unterschieden (Tabelle 1-1). Dabei stellen die Keratine mit 54 Genen die größte Familie der IF-Proteine dar (Hesse et al., 2001; Hesse et al., 2004; Rogers et al., 2005; Schweizer et al., 2006).

Tabelle 1-1 Proteinfamilie der Intermediärfilamente (modifiziert nach Kim and Coulombe, 2007)

IF	Typ	Vorkommen	Schlüsselfunktion / assoziierte Krankheiten
Zytoplasmatisch			
Keratine ("sauer")	I (n=28)	K9-K28: Epithelial K31-K40: Haare, Nägel	Typ I und II Keratine bilden obligate 1:1 Heteropolymere, 54 Gene kodieren Keratine, Mutationen sind verantwortlich für > 20 Krankheiten (z.B.: Blasen-bildende Erkrankungen der Haut, Lebererkrankungen, Spindelhaare).
Keratine ("basisch")	II (n=26)	K1-K8 und K71- K74: Epithelial K81-K86: Haare	
Vimentin	III	Mesenchymal	Weitgehend im Embryo exprimiert.
Desmin	III	Muskulär	Kardiomyopathie
GFAP	III	Astrozyten/Glia	Alexander Krankheit
Peripherin	III	Periphere Neurone	Induziert nach neuronaler Beschädigung, Amyotrophe Lateralsklerose.
Neurofilamente (L, M, H)	IV	ZNS-Neurone	NF-L, -M, -H bilden obligate Heteropolymere mit α -Internexin. Beteiligt am Festlegen vom axonalen Durchmesser.
α -Internexin	IV	ZNS-Neurone	
Nestin	IV	Neuroepithelial	Marker für frühe Stammzellvorläufer in einigen Geweben.
Syncoilin	IV	Muskulär	Interagiert mit α -Dystrobrevin.
Synemin	IV	Muskulär	α - und β - Isoformen, β -Form auch bekannt als Desmuslin, bindet Aktin-assozierte Proteine.
Nukleär			
Lamin B1, B2	V	Kernlamina	Angereichert in Progenitor-Zellen.
Lamin A/C	V	Kernlamina	Unterliegt differentiell <i>Splicing</i> , angereichert in differenzierten Zellen, mutiert in Hutchinson-Gilford Progerie, Limb-Girdle Muskeldystrophie u.v.m.
Sonstige			
Phakinin (CP49)	undefiniert	Linse	CP49 und CP115 bilden perlenschnurförmige Filamente im Linsenepithel, mutiertes CP49 bedingt grauen Star.
Filensin (CP115)	undefiniert	Linse	

Im Gegensatz zu den Aktinfilamenten und den Mikrotubuli sind IFs unipolar aufgebaut und evolutionär weniger stark konserviert. Ein gemeinsamer dreiteiliger Grundaufbau innerhalb der zytoplasmatischen IFs ist dennoch gegeben: Neben variabler Kopf- und Schwanzdomäne (Coulombe and Omary, 2002) besteht ein Vertebraten-IF-Polypeptid aus der mittelständigen konservierten Stabdomäne, welche eine 310 Aminosäuren umfassende α -Helix darstellt (Abbildung 1-1). Der Mechanismus der Filamentbildung ist, im Vergleich zu Aktinfilamenten und Mikrotubuli, noch weitestgehend ungeklärt. Ausgehend von *in vitro* Untersuchungen nimmt man an, dass der molekulare Bau eines Intermediärfilaments mit der Vereinigung von zwei Monomeren zu einem löslichen, polaren *coiled-coil* Dimer beginnt (Herrmann and Aebi, 1998; Herrmann and Aebi, 2004). Zwei dieser Dimere lagern sich dann antiparallel, wahrscheinlich in partiell überlappender Anordnung, zu einem Tetramer

zusammen (Coulombe and Fuchs, 1990; Quinlan et al., 1985; Steinert et al., 1994). Die Tetramere assoziieren wiederum seitlich und longitudinal miteinander und bilden dadurch ein 2 nm dickes Protofilament. Mehrere dieser Protofilamente vereint bilden schließlich das 8-12 nm dicke, unpolare Intermediärfilament.

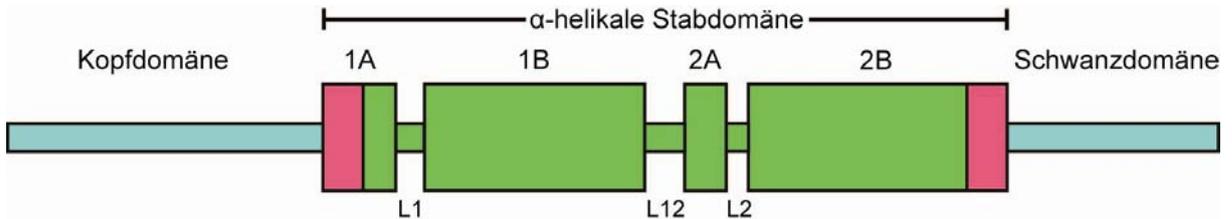


Abbildung 1-1 Schematische Darstellung eines zytosolischen IF-Polypeptids.

IF-Polypeptide zeigen die charakteristische dreigeteilte Domänenstruktur: N-terminal und C-terminal befinden sich nicht-helikale, variable Kopf- und Schwanzdomänen. Dazwischen liegt die konservierte, 310 Aminosäure und 48 nm lange (352 Aminosäuren in Laminen) Stabdomäne mit den vier α -helikalen Subdomänen 1A, 1B, 2A und 2B, die lange Heptad-Wiederholungen von hydrophoben/polaren Resten beinhalten. Verbunden werden diese vier Domänen durch die Linkersequenzen L1, L12 und L2. Die Grenzen der Stabdomäne (hier rot dargestellt) bestehen aus hochkonservierten 15-20 Aminosäuren langen Sequenzen, die essentiell für die Polymerisierung von IFs sind.

In Epithelzellen besteht die Hauptaufgabe der IFs im Schutz vor mechanischem Stress (Pekny and Lane, 2007). In der Zelle bilden sie ein Filamentgerüst und stehen über Desmosomen mit dem Zytoskelett benachbarter Epithelzellen in Verbindung (Kouklis et al., 1994). Dadurch wird eine lokal von außen einwirkende Kraft auf einen großflächigen Zellverband übertragen. Neben der zentralen Stützfunktion lassen aktuelle Untersuchungen vermuten, dass IFs weitaus mehr Funktionen übernehmen. Mutationen in IFs sind mit zahlreichen Krankheiten assoziiert (Tabelle 1-1), was auf zytoprotektive Wirkungen von nicht-mutierten IFs schließen lässt (Omary and Ku, 2006). Es wird desweiteren postuliert, dass IFs eine zentrale Rolle in der Etablierung epithelialer Polarität haben (Oriolo et al., 2007b; Toivola et al., 2004), indem sie als Gerüstproteine die polarisierte Kompartimentierung von einschichtigen Epithelien determinieren (Magin et al., 2007). IFs verstärken die Resistenz von Zellen gegenüber Drogen (Bauman et al., 1994) und schützen die Zelle vor toxischen Einflüssen (Inada et al., 2001). IFs beeinflussen desweiteren Proliferation und Apoptose der Zellen (Inada et al., 2001; Ku and Omary, 2006; Paramio et al., 1999) und haben Einfluss auf die Steuerung des Zellzyklus (Toivola et al., 2001). IFs spielen zudem eine wichtige Rolle bei dem Transport und der Positionierung von Zellorganellen sowie von Proteinen in subzellulären Kompartimenten (Georgatos and Maison, 1996; Toivola et al., 2005).

Die Verknüpfung der drei filamentösen Strukturproteine des Zytoskeletts ist zur Erfüllung seiner zahlreichen Aufgaben, die eine schnelle und präzise Umstrukturierung voraussetzen, essentiell. Als *Linker*-Proteine sind z.B. die Plakine zu nennen, deren vielseitigster Vertreter

das Plektin ist. Sie verknüpfen IFs, Aktinfilamente und Mikrotubuli miteinander (Fuchs and Karakesisoglou, 2001; Fuchs and Yang, 1999) und verbinden sie an Organellen und Adhäsionsstrukturen der Zelle (Fuchs and Karakesisoglou, 2001; Wiche, 1998).

Es gibt viele Hinweise, dass die Phosphorylierung von Intermediärfilamenten eine zentrale Rolle in der Organisation der IFs spielt (Omary and Ku, 2006; Tao et al., 2006; Windoffer and Leube, 2004; Woll et al., 2007). Dabei sind vor allem Kopf- und Schwanzdomänen mit zahlreichen Phosphorylierungsstellen versehen. Die Drogen-induzierte Änderung des Phosphorylierungsstatus hat z.B. ein drastisches Rearrangement des Keratinfilamentnetzes in kultivierten Zellen zur Folge (Strnad et al., 2002; Windoffer and Leube, 2004), und auch in pathologischen Fällen, wo es zu einer Umstrukturierung des Netzwerkes oder zu veränderten IF-Expressionsmustern kommt, werden hyperphosphorylierte IFs detektiert (Liao et al., 1997; Ridge et al., 2005; Toivola et al., 2002). Welche molekularen Signalwege bei den Phosphorylierungsänderungen eine Rolle spielen, ist jedoch weitgehend unbekannt.

Bislang konnten nur wenige IF-assoziierte Proteine (IFAPs) identifiziert werden. Ihr Vorkommen hängt von der jeweiligen IF-Klasse und dem Zelltyp ab (Coulombe et al., 2000; Coulombe and Wong, 2004; Izawa and Inagaki, 2006). Welche Rolle IFAPs bei der Regulation des IF-Aufbaus und -Abbaus sowie bei IF-Netzwerkbildung und -Netzwerkumstrukturierung einnehmen, ist bislang nicht bekannt. Als molekulare Mechanismen der IF-abhängigen Etablierung der Polarität von Epithelzellen werden Interaktionen mit dem mikrovillären Aktin-bindenden Protein Ezrin (Wald et al., 2005), Komponenten des γ -Tubulin-Ringkomplex (Oriolo et al., 2007a) und Faktoren des zellulären Vesikeltransports (Styers et al., 2005) diskutiert.

IFs findet man in den meisten Tiergruppen: Neben vielen Stämmen der Chordaten, den Vertebraten, Tunikaten und Urchordaten (Karabinos et al., 2001b; Wang et al., 2000) konnten IFs innerhalb der Evertebraten in 11 verschiedenen Phyla gefunden werden (Erber et al., 1998; Weber et al., 1989). Im Tierreich gibt es zwei zytoplasmatische IF-Prototypen, die man anhand ihrer Ähnlichkeit zu den nukleären IFs, den Laminen, unterscheidet: Dem ersten Prototyp, der innerhalb der Chordaten vorkommt, fehlen im Vergleich zu den Laminen 42 Aminosäuren bzw. sechs Heptaden der zentralen Unterdomäne 1b (Abbildung 1-1). Den zweiten IF-Prototyp findet man innerhalb der wirbellosen Phyla. Die Unterdomäne 1b weist hier die gleiche Länge wie in nukleären Laminen auf, nämlich 352 Aminosäuren. Außerdem enthalten viele, aber nicht alle protostomischen IFs ein zusätzliches, ca. 110 Aminosäuren langes Lamin-Homologie-Segment in ihrer C-terminalen Schwanzdomäne (Abbildung 3-2F). Innerhalb der Arthropoden findet man keine Gene, die für zytoplasmatische IFs kodieren (Rubin et al., 2000), was vermutlich eine Konsequenz der Ausbildung des Exoskeletts liegt und eine intrazelluläre Gewebestabilisierung somit weniger notwendig wird. Man vermutet

allerdings, dass in einigen, starkem mechanischen Stress ausgesetzten Geweben, wie z.B. den Flügelepithelzellen von *Drosophila*, spezialisierte Mikrotubuli die Funktionen der zytoplasmatischen IFs übernehmen, da diese dort in hoher Abundanz vorliegen (Bartnik et al., 1986; Mogensen and Tucker, 1988).

1.2 Der Nematode *Caenorhabditis elegans* als Modellorganismus

Der Fadenwurm *C. elegans* ist ein ca. 1 mm großer, frei in der Erde lebender Nematode, der sich von Bakterien und Pilzen ernährt. 1965 wurde *C. elegans* erstmals von dem Molekularbiologen Sidney Brenner, der auf der Suche nach einem idealen Modellorganismus zur Analyse der Genetik der Nervensystementwicklung war, als genetisches System im Labor eingesetzt. Sein 1974 erschienenes Werk „The genetics of *Caenorhabditis elegans*“ (Brenner, 1974) stellt eine wegweisende Arbeit in der Nematodenforschung dar. Mittlerweile hat sich der Nematode aufgrund seiner herausragenden Eigenschaften neben genetischen Systemen wie der Taufliege *Drosophila melanogaster* oder der Maus als Modellorganismus in vielen Gebieten der biologischen Forschung etabliert.

Im Labor kann *C. elegans* kostengünstig und einfach auf, mit *Escherichia coli* bewachsenen, Agar-Platten gehalten werden. Der Generationszyklus beträgt ca. drei Tage und ein adulter Wurm produziert insgesamt durchschnittlich 300 Nachkommen. *C. elegans* kommt als selbstbefruchtender Hermaphrodit (XX) oder als Männchen (XO) vor (Madl and Herman, 1979). Männchen entstehen durch spontane *nondisjunction* des X-Chromosoms während der Meiose und machen ca. 0,2% der Gesamtpopulation im Wildtyp Bristol Stamm N2 aus (Hodgkin et al., 1979). Unter Laborbedingungen lassen sich Männchen durch einen Hitzeschock leicht generieren, so dass neben der klonalen Amplifikation durch Hermaphroditen auch das Einkreuzen fremder genetischer Eigenschaften durch Verpaarung mit Männchen erfolgen kann.

Der adulte Hermaphrodit ist einfach gebaut: Nach Außen wird der Wurm durch eine dreischichtige, kollagene Kutikula umgeben, die die darunterliegende synzytiale Hypodermis und die in vier Quadranten unterteilte Körperlängsmuskulatur umgibt. Im Inneren befindet sich eine flüssigkeitsgefüllte Leibeshöhle, die als Antagonist gegen den Hautmuskelschlauch wirkt und so die sinusoidale Fortbewegung ermöglicht. Der anatomische Aufbau eines Hermaphroditen ist in Abbildung 1-2 gezeigt: Die paarigen Gonaden münden in den Uterus, aus dem die Eiablage durch die ventrale Vulva erfolgt. Der Verdauungstrakt durchzieht den Wurm fast in seiner gesamten Länge und besteht aus Pharynx, Darm und Rektum. Das einfach gebaute Nervensystem besteht aus einem zirkumpharyngealen Ganglion, von dem abgehend ein ventraler Hauptnervenstrang nach posterior zieht. Davon lateral abgehend

findet man Kommissuren, die sich dorsal zu einem zweiten, nach posterior gerichteten Nervenstrang vereinigen. Am posterioren Ende befindet sich ein zweites, jedoch kleineres Schwanzganglion.

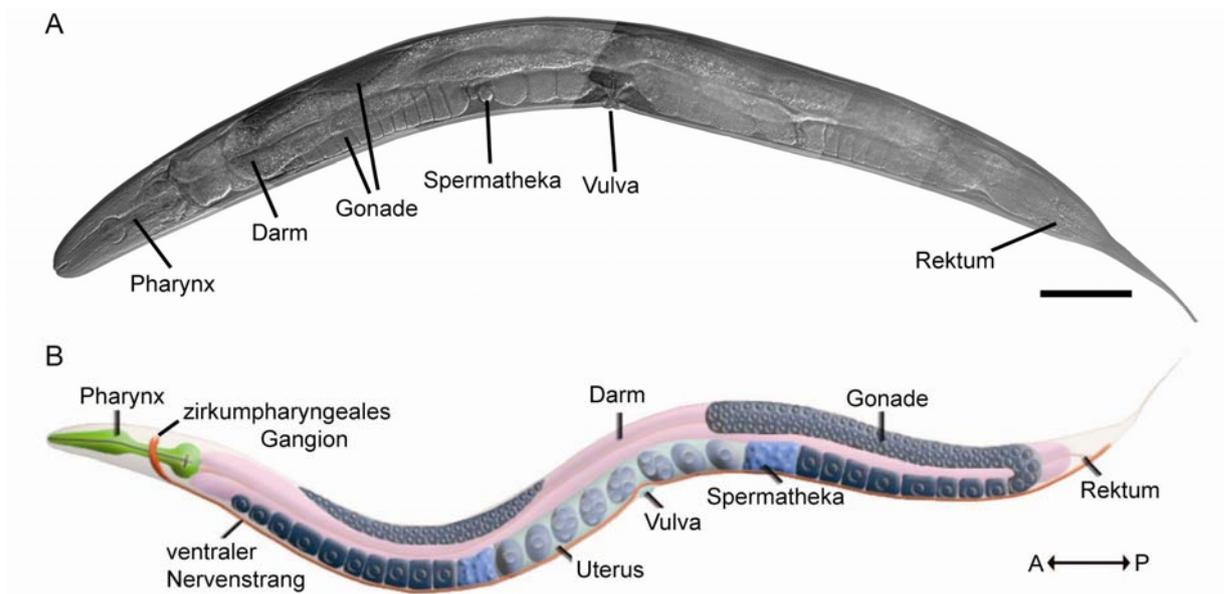


Abbildung 1-2 Darstellung des anatomischen Aufbaus eines adulten *C. elegans* Hermaphrodits.

Zusammengesetzte Interferenzphasenkontrast-Aufnahmen eines adulten Hermaphroditen (A) und graphische Darstellung des anatomischen Bauplans (B). Der Verdauungstrakt ist aufgeteilt in Pharynx, Darm und Rektum und durchzieht den Wurm fast in seiner ganzen Länge. Eier, die in den paarigen distalen Gonadenarmen gebildet und beim Durchlaufen der Spermatheka befruchtet werden, gelangen über den Uterus durch die Vulva nach Außen. Vom Nervensystem ist in B der zirkumpharyngeale Nervenring mit dem nach posterior laufendem ventralen Nervenstrang gezeigt.

A: anterior, P: posterior. Größenbalken: 100 µm.

(A) zur Verfügung gestellt von C. Abraham. (B) modifiziert aus www.wormatlas.org.

Die Embryonalentwicklung von *C. elegans* beginnt nach Befruchtung der Eier in der Spermatheka und ist nach ca. 12 Stunden abgeschlossen. Postembryonal durchlebt der Wurm vier Juvenilstadien, die Larvalstadien L1-L4, deren Übergänge durch jeweils eine Häutung gekennzeichnet sind. Ca. 50 Stunden nach dem Schlüpfen der L1 erreicht der zwittrige Wurm das Adultstadium und besteht jetzt aus genau 959 somatischen Zellen, ein Männchen besteht aus exakt 1031 somatischen Zellen. Durch diesen invariablen Zellstammbaum ist es möglich das Schicksal jeder Zelle vorherzusagen (Sulston et al., 1983). Somit konnte innerhalb von kurzer Zeit aufgrund der transparenten Kutikula unter Verwendung der 4-D-Mikroskopie der komplette Zellstammbaum erfasst werden (Schnabel et al., 1997).

Bei ungünstigen Umweltbedingungen kann *C. elegans* in ein Dauerstadium übergehen. So können z.B. Trockenheit oder Futtermangel von einer morphologisch modifizierten Larve, deren Reproduktions-Apparat zurückgebildet ist und die eine verdickte Kutikula zum Schutz

vor Austrocknung aufweist, über Monate überlebt werden. Verbessern sich die Umweltbedingungen, entwickelt sich daraus ein normales adultes Individuum.

C. elegans war der erste Vielzeller, dessen Genomsequenz vollständig aufgeklärt wurde (*C. elegans-Sequencing Consortium* in 1998). Das Genom umfasst ca. 20.000 Gene und ist auf sechs Chromosomen verteilt. Ein weiterer Grund für die Popularität des kleinen Nematoden ist die hervorragende genetische Manipulierbarkeit. Das Einbringen von Fremd-Genen erfolgt über das Injizieren von Plasmid-DNA in die synzytiale Gonade. Einige Nachkommen tragen das Transgen als extrachromosomales *array* und vererben es wiederum an ihre Nachkommen, so dass eine transgene Linie entsteht. Desweiteren kann reverse Genetik durch die einfache Applizierbarkeit und gute Funktionalität von RNAi betrieben werden. Neben der Injektion von dsRNA führt das Verfüttern von dsRNA-produzierenden Bakterien in den behandelten Tieren und deren Nachkommen zum *knockdown* des entsprechenden Gens. Eine RNAi-Bank mit ca. 16.000 RNAi-Klonen ist kommerziell erhältlich, was genomweites *Screening* mit relativ geringem Aufwand ermöglicht (Kamath and Ahringer, 2003). Auch klassische Mutagenese-*Screens*, z.B. EMS-induziert, werden zur Identifikation von Mutanten angewandt. Darüber hinaus laufen in der Internetplattform *Wormbase* (<http://www.wormbase.org/>) alle *C. elegans*-relevanten Informationen auf stets aktuellem Stand zusammen. Mutante Wurmstämme werden zentral im *Caenorhabditis elegans Genetics Center* (CGC) gesammelt und stehen so der Forschergemeinschaft auf Anfrage zur Verfügung.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass *C. elegans* ein leicht zu handhabendes, gut untersuchtes und genetisch manipulierbares Modellsystem darstellt, in dem molekulargenetische Studien und Funktionsanalysen exzellent durchführbar sind.

1.3 Intermediärfilamente in *C. elegans*

Im Genom des Wurms kodiert ein Gen für ein nukleäres Lamin und insgesamt 11 Gene kodieren für 15 zytoplasmatische IF-Polypeptide. Anhand von Sequenzhomologien werden die 11 Gene in 5 Familien unterteilt: A (*ifa-1* - *ifa-4*), B (*ifb-1*, *ifb-2*), C (*ifc-1*, *ifc-2*), D (*ifd-1*, *ifd-2*) und E (*ife-1*) (Dodemont et al., 1994; Karabinos et al., 2001a). Alle 11 Gene weisen die für Protostomier typische lange 1b-Domäne auf (Dodemont et al., 1994). Sechs der 11 Gene, nämlich die den A- und B-Subgruppen angehörenden, sind mit dem zusätzlichen Lamin-Homologie-Segment in der Schwanzdomäne ausgestattet (Karabinos et al., 2001a).

Pionierarbeit zur Charakterisierung der zytoplasmatischen IFs in *C. elegans* wurde durch Dr. Anton Karabinos in Form von Expressionsstudien und Funktionsanalysen geleistet

(Karabinos et al., 2001a; Karabinos et al., 2002; Karabinos et al., 2003; Karabinos et al., 2004). Angelehnt an diese Untersuchungen wurden die *C. elegans* IFs in drei systematische Expressionsgruppen unterteilt (Tabelle 1-2, zusätzlich zitierte Veröffentlichungen sind angegeben). Das IFA/IFB-1-System beinhaltet die vier IFA-Polypeptide und IFB-1. IFB-1 wird stets mit einem IFA-Protein koexprimiert und *in vitro*-Polymerisationsexperimente konnten aufzeigen, dass IFB-1 mit jedem IFA-Polypeptid lange Heterofilamente bilden kann (Karabinos et al., 2003). Das System erinnert daher an das obligate System der epithelialen Keratin-Heteropolymerisierung in Vertebraten. Die Polypeptide des IFA/IFB-1-Systems werden in epithelialen Organen exprimiert, wie z.B. in der Hypodermis oder im Pharynx (Tabelle 1-2).

Tabelle 1-2 Zusammenfassung der bisher durchgeführten Expressions- und Funktionsanalysen der zytoplasmatischen IFs von *C. elegans*

Soweit nicht anders vermerkt stammen alle Angaben aus Karabinos et al., 2001a; Karabinos et al., 2002; Karabinos et al., 2003; Karabinos et al., 2004.

IF	Expression	Letalität	Funktion
IFA/IFB-1-System: Expression in epithelialen Organen, Heteropolymerbildung von IFB-1 mit einem IFA.			
IFA-1	Koexprimiert mit IFB-1 in pharyngealen Marginalzellen, einigen Muskelzellen des Pharynx, pharyngeal-intestinale Valve, Vulva, Rektum, einigen Neuronen und Neuron-assoziierten Zellen.	+	Essentiell für Vitalität nach L1.
IFA-2	Synonym: MUA-6 (Hapiak et al., 2003). Koexprimiert mit IFB-1 in hypodermalen Zell-Zellkontakten.	+	Hypodermale Integrität, Befestigung der Muskulatur an die Körperwand (Hapiak et al., 2003).
IFA-3	Koexprimiert mit IFB-1 in embryonaler und larvaler Hypodermis.	+	Essentiell für Vitalität nach L1/L2. Befestigung der Kutikula an Hypodermis (Woo et al., 2004).
IFA-4	Koexprimiert mit IFB-1 in pharyngeal-intestinaler Valve der Larve, exkretorischen Zellen, Darm von Dauerlarven, einigen Schwanz-Neuronen, Rektum.	-	Unbekannt.
IFB-1	Koexprimiert mit einem IFA Polypeptid in pharyngealen Marginalzellen, einigen Muskelzellen des Pharynx, exkretorischen Zellen, Hypodermis, Vulva, Uterus, Rektum, einigen Neuronen und Neuron-assoziierten Zellen.	+	Embryonalentwicklung, epidermale Morphogenese (Woo et al., 2004).
IFB-2/IFD/IFE-1-System: Expression exklusiv im intestinalen Terminalgeflecht. Polymerbildung unbekannt.			
IFB-2	Intestinales Terminalgeflecht, intestinale Junktionen (Bossinger et al., 2004; Segbert et al., 2004).	-	Unbekannt.
IFD-1	Intestinales Terminalgeflecht.	-	Unbekannt.
IFD-2	Intestinales Terminalgeflecht.	-	Unbekannt.
IFE-1	Synonym: IFP-1. Intestinales Terminalgeflecht.	-	Unbekannt.
IFC-System: Expression in intestinalen und pharyngealen Junktionen. Polymerbildung unbekannt.			
IFC-1	Pharyngeale Junktionen der frühen Larve, intestinales Terminalgeflecht.	-	Unbekannt.
IFC-2	Pharyngeale und intestinale Junktionen, intestinales Terminalgeflecht.	-	Essentiell für normale Bewegung, Wachstum, Körpergröße und -form. RNAi bewirkt in wenigen Tieren Ruptur von Anus und/oder Vulva.

Die zweite Expressionsgruppe, das IFB-2/IFD/IFE-1-System, beinhaltet die IF-Polypeptide IFB-2, IFD-1, IFD-2 und IFE-1. Diese IFs werden alle exklusiv im Terminalgeflecht des größten epithelialen Organs, dem Darm exprimiert. Das sogenannte *terminal web* ist ein dichtmaschiges zytoskelettales Netzwerk, das im apikalen Enterozytenkompartiment unterhalb der Mikrovilli liegt und direkt mit den apikalen Junctionen (CeAJ) verknüpft ist. In welcher Form die IF-Polypeptide der zweiten IF-Gruppe miteinander polymerisieren ist unbekannt. Die dritte, sogenannte IFC-Gruppe, beinhaltet die IFs IFC-1 und IFC-2 (Tabelle 1-2), welche in den zellulären Junctionen des Darms und des Pharynx exprimiert werden. Ihre zusätzliche Präsenz im *terminal web* von Darmzellen lässt vermuten, dass sie als *linker* zwischen Proteinen der CeAJ und dem Terminalgeflecht fungieren könnten (Karabinos et al., 2004).

1.4 Der Darm von *C. elegans*

Der Darm von *C. elegans* ist eine einfache Röhre aus 20 Zellen, die klonal aus einer einzigen Zelle, der sogenannten E-Zelle hervorgehen (Sulston et al., 1983). Die apikale Oberfläche der Zellen ist mit einem dichten Mikrovillus-Saum ausgestattet, der das Darmlumen umgibt. Am anterioren Ende wird das Lumen von einem Zellquartett (int1) und darauf folgend von sieben hintereinander angeordneten Zellpaaren (int2-int8) umschlossen (Abbildung 1-3A). Funktionell übernimmt das Intestinum eine Vielzahl von Aufgaben. Primär muss die Sekretion von Verdauungsenzymen in das Lumen und die Absorption der Nährstoffe in die Darmzellen genannt werden (Sulston, 1976). Er dient außerdem als Speicherorgan, so befinden sich z.B. Lipidgranula im Zytoplasma. Desweiteren spielen Darmzellen eine essentielle Rolle in der Nährstoffversorgung der Eizellen, da Dotterprotein in den Enterozyten produziert und zur Oozyte transportiert wird (Kimble and Sharrock, 1983).

Der Darm von *C. elegans* ist das größte epitheliale Organ des Wurms. Epithelien sind Abschlussgewebe und bilden selektive Barrieren zwischen zwei Kompartimenten, um den Transport von Molekülen und Ionen zu steuern. Ermöglicht wird dies durch einen polaren Aufbau der Zellen im Epithelverband (Drubin and Nelson, 1996; Eaton and Simons, 1995). Die polaren Enterozyten umgeben mit ihren apikalen mikrovillösen Membranoberflächen das Lumen (Abbildung 1-3B), während die basalen Membrandomänen an die Basallamina der extrazellulären Matrix grenzen (Leung et al., 1999). Die lateralen Membrandomänen der Enterozyten stehen durch die Ausbildung spezialisierter Zell-Zell-Verbindungen, den elektronendichten apikalen Junctionen (CeAJ) (Abbildung 1-3C), mit benachbarten Epithelzellen in Kontakt (Legouis et al., 2000). CeAJ sind essentiell für die Integrität von benachbarten Darmzellen und sind Orte von interzellulären *Signalling*-Ereignissen.

Intrazellulär steht die CeAJ mit dem, dem Mikrovillus-Saum unterliegenden apikalen zytoskelettalen Terminalgeflecht der Intestinalzellen in Verbindung (Abbildung 1-3B). Die CeAJ gewährleistet somit Polarität und Adhäsivität im Epithelverband.

Der Darm stellt das Gewebe mit einer besonders großen Anzahl von IF-Proteinen dar. Mit insgesamt sechs Vertretern ist das *terminal web* reich an Intermediärfilamenten (Tabelle 1-2). Eine wichtige strukturgebende und stützende Funktion der IFs an dieser Stelle liegt nahe, denn das Terminalgeflecht ist Teil der *endotube* (Munn, 1984), einer für Nematoden einzigartigen funktionellen Einheit, die vermutlich als struktureller Stabilisator fungiert und zur Verankerung der überliegenden Mikrovilli des Bürstensaums dient (<http://www.wormbook.org/>).

Im Darmepithel von Säugern findet man ein analoges subapikales Terminalgeflecht, welches reich an filamentären Zytoskelett-Elementen ist. Ein struktureller Vergleich der beiden Systeme ist also möglich.

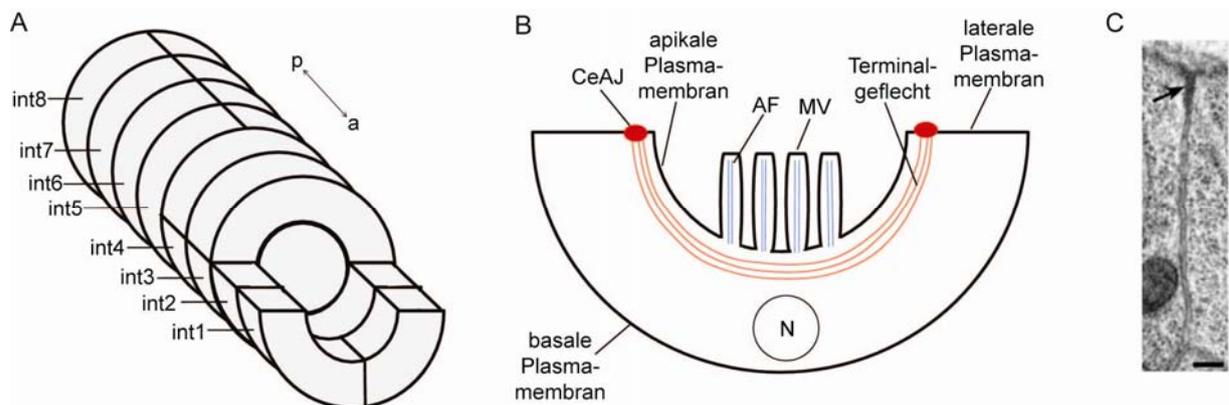


Abbildung 1-3 Schematischer Aufbau des *C. elegans* Darmrohrs (A) und eines Enterozyten (B) mit elektronenmikroskopischer Detailaufnahme der apikalen Junction (C).

(A) Schematische Darstellung der acht Segmente (int1-int8) des Darmrohrs, das insgesamt aus nur 20 Zellen besteht. int1 und int2 sind ohne die Partnerzellen dargestellt, so dass das Lumen geöffnet erscheint. int1 besteht im Gegensatz zu allen anderen Segmenten aus vier Zellen. Posterior (p), anterior (a). (B) Schematischer Querschnitt einer epithelialen Darmzelle. Die apikale Membrandomäne ist mit Mikrovilli (MV) besetzt, in denen Aktinfilamente (AF) vorkommen. Darunter liegt das zytoskelettale Terminalgeflecht, das reich an Intermediärfilamenten und ein Teil der rigiden *endotube* ist. Das *terminal web* projiziert in die apikalen Junctionen (CeAJ) der lateralen Plasmamembran. Die CeAJ gewährleistet Adhäsivität zur Nachbarzelle und ist somit für die Integrität des Darmepithels verantwortlich. Nucleus (N). (C) Elektronenmikroskopische Detailaufnahme einer querschnittenen apikalen Junction des Darmepithels. Der Pfeil weist auf den elektronendichten Bereich der CeAJ. Aus Cox and Hardin, 2004. Größenbalken: 100 nm.

1.5 Ziele der Arbeit

Die molekularen Regulationsmechanismen, die die Dynamik und den dreidimensionalen Aufbau des IF-Netzwerks im Gewebekontext determinieren, sind bislang ungeklärt. Bisherige *in vivo*-Studien wurden hauptsächlich in artifiziellen Zellkultursystemen durchgeführt, die die Situation einer Zelle im Gewebsverband nicht widerspiegelt. Mit Hilfe des genetischen Modellorganismus *C. elegans* sollten neue IF-Organisatoren und -Modulatoren identifiziert werden und die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen in diesem gut zugänglichen, organismischen *in vivo* Modell untersucht werden. Dementsprechend gliederten sich die Ziele der vorliegenden Arbeit wie folgt:

1. Etablierung von transgenen Wurmstämmen zur Detektion von IFs

Zur Herstellung eines *in vivo*-Systems sollten stabile transgene Wurmstämme generiert werden, die eine hochcharakteristische, leicht detektierbare und dem nativen Expressionssmuster entsprechende IF-Verteilung aufweisen. Zudem sollte geprüft werden, ob Veränderungen dieses Musters gut detektierbar sind.

2. Genomweiter *Screen* zur Identifizierung von IF-Modulatoren

Diese Würmer sollten dann in einem genomweiten optischen *Screen* eingesetzt werden, in dem Tiere mit phänotypisch veränderter, fluoreszierender IF-Verteilung isoliert und die betroffenen Gene identifiziert werden sollten.

3. Charakterisierung der phänotypischen Veränderungen im funktionellen und zellbiologischen Kontext

Die im *Screen* identifizierten Kandidaten sollten entsprechend ihrer phänotypischen Veränderung weiter untersucht werden, um funktionelle phänotypische Alterationen im relevanten zellbiologischen Kontext zu charakterisieren und dadurch Mechanismen aufzudecken, die auch auf andere Systeme übertragbar sind.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Materialien

Tabelle 2-1 Materialien, Geräte, Software, Chemikalien, Enzyme und Kits

Kulturgefäße	
Erlenmeyerkolben	Roth, Karlsruhe
Petrischalen mit Nocken (Ø 100 mm)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Petrischalen ohne Nocken (Ø 35 und 60 mm)	Nunc, Wiesbaden
Röhrchen für Bakterienflüssigkultur (12 ml)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Mikroskope	
Axioplan 2	Zeiss, Jena
DM IRB	Leica, Wetzlar
EM Leo 906E	Zeiss, Jena
MZ16FA	Leica, Wetzlar
SMZ 1500	Nikon, Düsseldorf
TCS SP5	Leica, Wetzlar
Software	
Chromas 1.45	Technelysium, Tewantin, QLD, AUS
Clonemanager 7.01	Scientific & Educational Software, Cary, NC, USA
Illustrator CS3	Adobe, München
Image Pro Plus 5.12	Media Cybernetics, Gleichen
Photoshop CS3	Adobe, München
Sigma Plot 9	Systat Software GmbH, Erkrath
Geräte und Verbrauchsmaterialien	
Adhesive PCR Film	ABgene, Hamburg
Adhesive PCR Foil Seals	ABgene, Hamburg
Alufolie	VWR, Darmstadt
Autoklav Varioklav Typ 400	H+P Labortechnik, Oberschleißheim
Biofuge <i>fresco</i>	Heraeus, Hanau
Biofuge <i>pico</i>	Heraeus, Hanau
Blockthermostat BT 100	Kleinfeld Labortechnik, Gehrden
Brutschrank für Bakterien	Memmert, Schwabach
Calibrex 520 (NGM-Agar-Pumpe)	Fisher Scientific GmbH, Schwerte
Centrikon T-1065 (Ultrazentrifuge)	Kontron Instruments, Bletchley
Certomat R (Bakterienschüttler)	B. Braun, Melsungen
Certomat IS (Bakterienschüttler)	B. Braun, Melsungen
Cryo.s Einfrierröhrchen 2 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Deckgläser (24 x 32 mm; 24 x 24 mm; 18 x 18 mm)	Roth, Karlsruhe
Digitalkamera Hamamatsu 4742-95	Hamamatsu, Herrsching
Digitalkamera Hamamatsu ORCA-ER	Hamamatsu, Herrsching
Drigalskispatel	Roth, Karlsruhe
Eismaschine AF-10	Scotsman, Mailand
Elektrophoresekammer	Sigma-Aldrich, München
FemtoJet	Eppendorf, Hamburg

Material und Methoden

Flow Lamin Air TL 2448	Holten, Dreieich
Grids (Formvar)	SCI, München
Image Master VDS (Geldokumentationsgerät)	Pharmacia Biotech, Dübendorf
Immersionsöl	Merck, Darmstadt
Intelli Mixer RM-2L	ELMI Ltd., Riga
Kanülen 20G NEOJECT	Dispomed, Gelnhausen
Lagerboxen B50	A. Hartenstein GmbH, Versbach
Megafuge 1.0 R	Heraeus, Hanau
Mikromanipulator	Eppendorf, Hamburg
Milli-Q	Millipore, Schwalbach
Nanodrop ND-1000	Peqlab, Erlangen
Objektträger (76 mm x 26 mm)	Roth, Karlsruhe
Parafilm „M“	Sigma-Aldrich, München
Pasteurpipetten (2 ml)	Roth, Karlsruhe
PCR Platte 96 Loch	ABgene, Hamburg
PCR primus 96 advanced	Peqlap, Erlangen
PCR primus 96 plus	MWG Biotech, Martinsried
PCR-Reaktionsgefäße	ABgene, Hamburg
pH-Meter (pH 530)	VWR, Darmstadt
Pipet-Lite LTS™ 8-Kanal Pipette	Mettler-Toledo, Giessen
Plastikpipettierspitzen FinePoint™ LTS	Mettler-Toledo, Giessen
Plastikpipettierspitzen	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Plastikpipettierspitzen	Roth, Karlsruhe
Plastikpipettierspitzen	Sarstedt, Nümbrecht
Platindraht (Ø 0,2 mm)	VWR, Darmstadt
Reaktiongefäße (0,5, 1,5, 2, 15 und 50 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Replikator, 96 Pin	Boekel Scientific, Feasterville, PA
Scanner Perfection 1670	Epson, Meebusch
Schüttler Heidolph Reax 2000	Labotec, Remseck
Sealing Mat 96-Loch	VWR, Darmstadt
Skalpell	Roth, Karlsruhe
Sony XC-ST50CE	Leica, Wetzlar
Sterile Femtotips	Eppendorf, Hamburg
TransferMan NK2	Eppendorf, Hamburg
Ultracut E	Leica (Reichert Jung), Wetzlar
Ultrospec 2000	Pharmacia Biotech, Dübendorf
UV-Tisch NU72	Faust, Schaffhausen
VDS Film Rolls	GE Healthcare, München
Waage 1475	Sartorius, Göttingen
Wasserbad (Bioblock Scientific)	Fisher Scientific GmbH, Schwerte
Zahnstocher	Drogerie, Mainz
Zentrifugenröhrchen (25 mm x 89 mm)	Beraneck Laborgeräte, Weinheim
Chemikalien	
Aceton mind. 99,5%	Roth, Karlsruhe
Agar-Agar (Kobe)	Roth, Karlsruhe
Ammoniumchlorid [NH ₄ Cl]	Fluka, Seelze
Ampicillin	Roth, Karlsruhe
Bacto Agar	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Bacto Peptone	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg

Material und Methoden

Bleinitrat	Merck, Darmstadt
Borsäure	Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
Calciumchlorid [CaCl ₂ x2H ₂ O]	Roth, Karlsruhe
Carbenicillin	Roth, Karlsruhe
CrK(SO ₄) ₂ x 12H ₂ O	Fluka, Seelze
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma-Aldrich, München
Di-Kaliumhydrogenphosphat [K ₂ HPO ₄]	Roth, Karlsruhe
Di-Natriumhydrogenphosphat [Na ₂ HPO ₄]	Merck, Darmstadt
dNTPs	Fermentas, St. Leon-Rot
EDTA	Roth, Karlsruhe
Ethylmethansulfonat (EMS)	Sigma-Aldrich, München
Epoxy Resin (EPON 812)	Serva, Heidelberg
Ethanol 99% (pa)	Roth, Karlsruhe
Ethanol 99% (tech)	VWR, Darmstadt
Ethidiumbromid 1%	Roth, Karlsruhe
Fleischextrakt	Roth, Karlsruhe
Formaldehyd [CH ₂ O]	Roth, Karlsruhe
Gelatine	Sigma-Aldrich, München
Glucose D(+)	Sigma-Aldrich, München
Glutaraldehyd 25%	VWR, Darmstadt
Glycerin	Roth, Karlsruhe
Halocarbon Oil 700	Sigma-Aldrich, München
Hefeextrakt	Roth, Karlsruhe
HEPES (mind. 99,5%)	Roth, Karlsruhe
Isopropanol (mind. 99,5%)	Roth, Karlsruhe
Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Fermentas, St. Leon-Rot
Kaliumchlorid [KCl]	Roth, Karlsruhe
Kaliumcitrat	Roth, Karlsruhe
Kaliumdihydrogenphosphat (pa) [KH ₂ PO ₄]	Roth, Karlsruhe
Kaliumhydroxid [KOH]	Roth, Karlsruhe
Kanamycin	Roth, Karlsruhe
Magnesiumchlorid [MgCl ₂]	Merck, Darmstadt
Magnesiumsulfat [MgSO ₄ x7H ₂ O]	Roth, Karlsruhe
Methanol (pa)	Roth, Karlsruhe
Milchpulver (Naturaflo)	Töpfer, Dietmannsried
Moviol	Fluka, Seelze
Natriumazid	Sigma-Aldrich, München
Natriumchlorid [NaCl]	Roth, Karlsruhe
Natriumcitrat	Merck, Darmstadt
Natriumhypochlorit 5%	Sigma-Aldrich, München
Natriumhydroxid [NaOH]	Roth, Karlsruhe
Nonidet P-40 (NP-40)	Fluka, Seelze
Osmiumtetroxid	Roth, Karlsruhe
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt
Phalloidin (AlexaFluor 546-konjugiert)	MolecularProbes, Karlsruhe
Polyethylenglycol (6 000)	Fluka, Seelze
Poly-L-Lysin	Sigma-Aldrich, München
Propylenoxid	Serva, Heidelberg

Rinderserumalbumin [BSA]	Sigma-Aldrich, München
SDS	Serva, Heidelberg
Seakem® LE Agarose	Biozym, Oldendorf
Stickstoff	Linde, Wiesbaden
Sucrose	Sigma-Aldrich, München
Tetracyclin	Sigma-Aldrich, München
Tris Pufferan®	Roth, Karlsruhe
TRITC-Dextran (40 000)	Invitrogen, Molecular Probes, Karlsruhe
Trizma hydrochlorid	Sigma-Aldrich, München
Trypton/Pepton aus Casein	Roth, Karlsruhe
Tween 20	Merck, Darmstadt
Uranylacetat	Serva, Heidelberg
Wolframatophosphorsäurehydrat	Merck, Darmstadt
Xylencyanol	Merck, Darmstadt
Reagenziensätze (Kits)	
MAXIscrip ^t ®	Applied Biosystems, Darmstadt
Protease Inhibitor complete	Roche, Mannheim
Qiafilter Plasmid Maxi-Prep	Qiagen, Hilden
Qiaprep Spin Mini-Prep	Qiagen, Hilden
Qiaquick Gel Extraction	Qiagen, Hilden
Qiaquick PCR-Purification	Qiagen, Hilden
RNeasy	Qiagen, Hilden
Enzyme	
Alkalische Phosphatase [CIAP]	Fermentas, St. Leon-Rot
Phusion High-Fidelity DNA Polymerase	Bio Cat, Heidelberg
Proteinase K	Sigma-Aldrich, München
T4-DNA-Ligase	Fermentas, St. Leon-Rot
Taq-Polymerase	Eppendorf, Hamburg
DNA-Marker	
1 kb Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot
100 bp Ladder Plus	Fermentas, St. Leon-Rot
Massruler	Fermentas, St. Leon-Rot

2.2 Puffer und Medien

Tabelle 2-2 Puffer, Lösungen und Nährmedien

<i>C. elegans</i> Kultur	
NGM-Agar	3 g/l NaCl 16 g/l Bacto Agar 2,5 g/l Bacto Pepton
1 M KPO ₄ (pH 6,0)	0,8 M KH ₂ PO ₄ 0,2 M K ₂ HPO ₄
M9-Medium	41 mM Na ₂ HPO ₄ 25 mM KH ₂ PO ₄ 10 mM NaCl 20 mM NH ₄ Cl

Material und Methoden

Bleiche	1 g NaOH 10 ml 5% Natriumhypochlorid 40 ml ddH ₂ O
Einfriermedium	200 mM NaCl 100 mM KPO ₄ (pH 6,0) 60% Glycerin (v/v) 0,3 mM MgSO ₄
Immunfluoreszenz	
TBST	20 mM Tris (pH 8,0) 150 mM NaCl 0,2% Tween 20
Blockierlösung	1% BSA 1% Milchpulver 0,02% Natriumazid in TBST
Elvanol	1 g Mowiol in 4 ml PBS lösen (16 h) 2 ml Glycerin
Molekularbiologie	
1x (4x) Lysepuffer	50 mM (200 mM) KCl 10 mM (40 mM) Tris (pH 8,3) 2,5 mM (10 mM) MgCl ₂ 0,45% (1,8%) Nonidet P-40 0,45% (1,8%) Tween-20 0,01% (0,04%) (w/v) Gelatine 60 µg/ml (240 µg/ml) Proteinase K
10x Mikroinjektionspuffer	20% Polyethylenglycol (MW: 6.000) 200 mM KPO ₄ (pH 7,5) 30 mM Kaliumcitrat (pH 7,5)
TBE-Puffer	50 mM Tris 5 mM Borsäure 1 mM EDTA (pH 8,0)
10x DNA-Probenpuffer	30% (v/v) Glycerin 1% (w/v) SDS 50 mM EDTA 10 mM Tris-HCl 1 Spatelspitze Bromphenolblau 1 Spatelspitze Xylencyanol ad 100 ml ddH ₂ O
Bakterienkultur	
LB-Medium	10 g/l NaCl 10 g/l Trypton 5 g/l Hefeextrakt
LB-Agar	15 g/l Agar in LB-Medium
ENB-Medium	5 g/l NaCl 1,5 g/l KH ₂ PO ₄ 3,5 g/l K ₂ HPO ₄ 1 g/l Glucose 10 g/l Bacto Pepton 3 g/l Fleischextrakt
ENB-Agar	15 g/l Bacto Agar in ENB-Medium

SOC-Medium	10 g Trypton 2,5 g Hefeextrakt 0,3 g NaCl 0,09 g KCl 1,02 g MgCl ₂ 1,23 g MgSO ₄ ad 500 ml H ₂ O 20 mM Glucose
Elektronenmikroskopie	
PBS	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 10 mM Na ₂ HPO ₄ 2 mM KH ₂ PO ₄
Karnovsky-Lösung	3% Formaldehyd 2,5% Glutaraldehyd in PBS
Reynoldsche Bleicitratlösung	26,6 g/l Bleinitrat 35,2 g/l Natriumcitrat 16% NaOH (v/v)

2.3 DNA-Oligonukleotide

Alle Amplimere für PCR-Reaktionen wurden mit Hilfe des Programms Clonemanager entworfen und von der Firma MWG bezogen.

Tabelle 2-3 Verwendete Amplimere

Oligomer-Bezeichnung	Sequenz 5' → 3'
05-143	CCG CCG AAG CTT CCA TAG GGA AAT CGT GTT ATC
05-144	CCG CCG CTG CAG GAT GAA GTC GCT AAA ATT TTG
05-145	CCA CCA CTG CAG ATG TCG GCG GTT AGT TAT TCG
05-146	TTA TTA CTG CAG GCA GCG ACC GTC GTC TGG ATG
08-01	CCG CCG AAG CTT TGG TTT TAA ATT GTA TTT TAT AG
08-02	CCG CCG AAG CTT GCT GAA ATC GTA TTC GAA TTT TG
08-03	ATC ATC GGA TCC ATG GGA GAC CTA CAA GTC GAC
08-04	TCC TCC GGA TCC AAA TTT GGT CCA TCG CCG G
T7+W06B3.2 for	TAA TAC GAC TCA CTA TAG CAA AGA AGC ATG ACG ACG AA
T7+W06B3.2 rev	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GCC CAA TTT TCC ACA TTT TG

Zur Genotypisierung eines SNPs (*Single Nucleotide Polymorphism*) wurde der jeweilige genomische Bereich amplifiziert, anschließend wurde das PCR-Produkt mit der entsprechenden Restriktionsendonuklease verdaut und die resultierenden Fragmente gelelektrophoretisch aufgetrennt (Tabelle 2-4).

Tabelle 2-4 Amplimere mit entsprechenden Enzymen und resultierenden Fragmentgrößen zur Genotypisierung von SNPs

Oligomer-Bezeichnung	Sequenz 5' → 3'	Enzym SNP	Fragmentgröße [bp] N2 / Hawaii
C35C5_for	TTC TGC CGA GCT TCG AAT TG	<i>MaeIII</i>	469+115 / 584
C35C5_rev	TTC GGC GCG TTG AAT ACT CC		
C40H5[2]_for	GCT ATA TGC ACG CAG GTA AG	<i>ApeKI</i>	594 / 361+233
C40H5[2]_rev	AAA CGG GAA GTC GGT ATT CG		
F38A5_for	TTA ACC TTT GGA GTG ACT GCG	<i>XbaI</i>	546 / 303+243
F38A5_rev	GCA CCA TCT TCT GCT CCA AC		
K08F4.1_for	GAA AAT TGT CGC AAC AAC TGG	<i>DraI</i>	449+34 / 242+207+34
K08F4.1_rev	AGT TGA GTT GTT GCA TGG TGA		
M117.1_for	TAC GCC TGC CTA TTC TCA TG	<i>EcoRI</i>	473 / 229+244
M117.1_rev	AGT AAT CGA AGC GTC GTC G		
ZK445_for	GCG AGC TTC CAT CAC AAT CC	<i>DraI</i>	schneidet N2-DNA
ZK445_rev	TCC TCC GTT GCG GTA ATA GG		
ZK381_for	CTC GCC TTG TGC CCT GAT CTT	<i>PvuII</i>	661 / 301+360
ZK381_rev	GCT CGA TAC ACT GCG CCC AAA		
C23H4_for	CCT TCA ATC GCT TTT GTA GG	<i>BstBI</i>	schneidet Hawaii- DNA
C23H4_rev	GAT TTA CGT AAC GGC TGA GG		
C48A7_for	GTG TGG AAA AGG AGG AGT GC	<i>DraI</i>	447 / 243+204
C48A7_rev	GCC CCC GGA AAT CAG AAA TG		
C49H3_for	TTG CAG TTC GGA GTG TCT TAT	<i>DraI</i>	274+143 / 417
C49H3_rev	TGG CTC GGT GCA AGT CTA TTG		
D2096_for	ACG AAA AAT CAC AGA GGC GG	<i>EcoRI</i>	651+201 / 852
D2096_rev	AAT CAA CAA CGC ACG ACG AG		
C01F6_for	TCA GCG AGA AAA TAG ACA TCG	<i>NsiI</i>	343 / 203+140
C01F6_rev	AAC CTG TAC CTT GTT CAC CGC		

2.4 Plasmide

Tabelle 2-5 Rohvektoren und Koinjektionsmarker

Plasmid Bezeichnung	Eigenschaften	Resistenz	Herkunft
pVH20.01	<i>yfp</i> , promotorlos	Ampicillin	Dr. Hutter, Simon Fraser University, Burnaby, BC, Kanada
pVH10.10	<i>cfp</i> , promotorlos	Ampicillin	Dr. Hutter, Simon Fraser University, Burnaby, BC, Kanada
L4440	RNAi-Rohvektor; RNase-defizient, IPTG-induzierbare T7-RNA-Polymerase	Ampicillin	CGC, University of Minnesota, MN, USA
pCFJ104	<i>myo-3-MCHERRY-Fusion</i>	Ampicillin	Dr. Frøkjær-Jensen, University of Utah, UT, USA

2.5 Restriktionsendonukleasen

Tabelle 2-6 Restriktionsenzyme

Enzym	Schnittsequenz	Temperatur	Puffer	Herkunft
<i>ApeKI</i>	G [↓] CWGC	75°C	NEB 3	NEB, Frankfurt am Main
<i>BamHI</i>	G [↓] GATCC	37°C	BamHI	Fermentas, St. Leon-Rot
<i>BstBI</i>	TT [↓] CGAA	65°C	NEB 4	NEB, Frankfurt am Main
<i>DraI</i>	TTT [↓] AAA	37°C	Tango (yellow)	Fermentas, St. Leon-Rot
<i>EcoRI</i>	G [↓] AATTC	37°C	EcoRI	Fermentas, St. Leon-Rot
<i>HindIII</i>	A [↓] AGCTT	37°C	R (red)	Fermentas, St. Leon-Rot
<i>MaeIII</i>	N [↓] GTNACN	55°C	MaeIII	Roche, Mannheim
<i>NsiI</i>	ATGCA [↓] T	37°C	NEB 3	NEB, Frankfurt am Main
<i>PstI</i>	CTGCA [↓] G	37°C	O (orange)	Fermentas, St. Leon-Rot
<i>PvuII</i>	CAG [↓] CTG	37°C	G (green)	Fermentas, St. Leon-Rot
<i>XbaI</i>	T [↓] CTAGA	37°C	Tango (yellow)	Fermentas, St. Leon-Rot

W = A oder T; N = A, T, C oder G

2.6 Antikörper

Die Detektion von Proteinen erfolgte über die Bindung spezifische Antikörper, die über Fluoreszenz-markierte sekundäre Antikörper visualisiert wurden.

Tabelle 2-7 Primärantikörper

Primärantikörper	Spezies	Herkunft	Verdünnung Immunfluoreszenz
MH33 (anti-IFB-2)	Maus	Dr. Karabinos, MPI für Biophysikalische Chemie, Göttingen	1:100-1:200
anti-IFC-2 (Peptidepitop: NQAKHILEQTTAHR)	Meerschweinchen	Dr. Karabinos, MPI für Biophysikalische Chemie, Göttingen	1:10
anti-DLG-1	Kaninchen	Dr. Bossinger, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf	1:200

Tabelle 2-8 Sekundärantikörper

Sekundärantikörper	Spezies	Herkunft	Verdünnung Immunfluoreszenz
Cy3- α -Meerschweinchen-IgG	Ziege	Jackson/Dianova, Hamburg	1:500
Cy3- α -Maus-IgG	Ziege	Rockland/Biotrend, Köln	1:500
Cy2- α -Meerschweinchen-IgG	Ziege	Jackson/Dianova, Hamburg	1:100
Cy2- α -Kaninchen-IgG	Esel	Jackson/Dianova, Hamburg	1:100
Cy2- α -Maus-IgG	Ziege	Rockland/Biotrend, Köln	1:100

2.7 Bakterienstämme

Escherichia coli Bakterienstämme wurden als Futterbakterien für *C. elegans* und für Klonierungsversuche eingesetzt und kultiviert.

Tabelle 2-9 Bakterienstämme

Stamm	Spezies	Herkunft
HB101	<i>Escherichia coli</i>	DSMZ, Braunschweig
HT115(DE3)	<i>Escherichia coli</i>	CGC, University of Minnesota, MN, USA
XL1-Blue	<i>Escherichia coli</i>	DSMZ, Braunschweig

2.7.1 Kultivierung von XL1-Blue

XL1-Blue Bakterien wurden für Klonierungsexperimente verwendet. Eine mit einem Plasmid transformierte Kolonie des Bakterienstamms XL1-Blue wurde in LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum (Ampicillin oder Kanamycin) bei 37°C und 200 U/min über Nacht inkubiert bis eine Dichte von $OD_{595nm} < 1$ erreicht war. Anschließend erfolgte die Plasmidpräparation.

2.7.2 Kultivierung von HB101

Als Futterbakterien für *C. elegans* kamen Bakterien des Stammes HB101 in Gebrauch. Zunächst wurde eine Einzelkolonie von einer ENB-Agarplatte gepickt und in 4 ml ENB-Medium überimpft. Diese Vorkultur wurde über Nacht bei 37°C und 200 U/min inkubiert, danach in 300 ml ENB-Medium überführt und abermals bis zum Folgetag bei 37°C schüttelnd inkubiert. Die Bakterienkultur konnte bis zur Verwendung bei 4°C für ein bis zwei Monate aufbewahrt oder zur dauerhaften Lagerung in 15% Glycerin in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert werden. Zur erneuten Gewinnung von Einzelkolonien wurde ein Tropfen der aufgetauten Dauerkultur auf einer ENB-Platte ausgestrichen und über Nacht bei 37°C bebrütet.

2.7.3 Kultivierung von HT115(DE3)

Bakterien des Stammes HT115(DE3), welche den RNAi-Vektor L4440 mit entsprechendem Insert trugen, wurden als Futterbakterien bei RNAi-Experimenten mit *C. elegans* verwendet. Eine Einzelkolonie wurde mit Hilfe eines sterilen Zahnstochers in mit Ampicillin versetztes LB-Medium überführt und bei 37°C und 200 U/min über Nacht inkubiert. 200 µl dieser Flüssigkultur wurden auf eine RNAi-Platten gegeben und über Nacht bei Raumtemperatur gelagert. Bis zur Verwendung konnten die Platten zwei bis drei Monate bei 4°C aufbewahrt

werden. Zur dauerhaften Lagerung konnte 1 ml Flüssigkultur mit 15% Glycerin in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert werden.

2.7.4 Herstellung kompetenter Bakterien des Stammes XL1-Blue

Zur Klonierung der Vektoren wurden kompetente XL1-Blue Bakterien benötigt. Ein Tropfen einer aufgetauten XL1-Blue-Glycerinkultur wurde auf einer LB-Agar-Platte mit 12,5 µg/ml Tetracyclin ausgestrichen und bei 37°C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurde eine Einzelkolonie per Zahnstocher in 4 ml LB-Medium mit 10 µg/ml Tetracyclin überführt und bei 37°C und 200 U/min über Nacht inkubiert. Mit dieser Vorkultur wurde eine Großkultur im Verhältnis 1:50 angesetzt. Diese wurde schüttelnd inkubiert bis die Kultur eine $OD_{595nm}=0,6$ erreicht hatte. Die Bakterien wurden mit 4.000 U/min bei 4°C pelletiert und anschließend in der Hälfte des Kulturvolumens mit 30 mM $CaCl_2$ bei 4°C resuspendiert. Diese Suspension wurde für 20 bis 30 min bei 4°C inkubiert, danach pelletiert und in 1/20 des Kulturvolumens mit 30 mM $CaCl_2$ und 15% Glycerin gelöst. Davon wurden je 250 µl in Reaktionsgefäße aliquotiert, diese in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

2.7.5 Herstellung kompetenter Bakterien des Stammes HT115(DE3)

Zur Transformation von L4440-Vektoren wurden die für RNAi-Experimente spezifischen Bakterien HT115(DE3) verwendet. Zur Herstellung der kompetenten Zellen wurde zunächst ein Tropfen einer Glycerin-Dauerkultur auf einer LB-Agar-Platte mit 12,5 µg/ml Tetracyclin ausgestrichen und bei 37°C über Nacht inkubiert. Am Folgetag wurde eine Einzelkolonie der Platte in 4 ml LB-Medium mit 10 µg/ml Tetracyclin überführt und diese Vorkultur anschließend über Nacht schüttelnd inkubiert. Davon wurde eine Großkultur im Verhältnis 1:100 angesetzt, welche bei 37°C und 200 U/min solange heranwuchs bis eine $OD_{595nm}=0,4$ erreicht war. Die Bakterien wurden für 10 min bei 4°C und 3.000 U/min pelletiert und danach in der Hälfte des Kulturvolumens mit eiskaltem 50 mM $CaCl_2$ vorsichtig resuspendiert. Nach einer 30minütigen Inkubation erfolgte ein erneuter Zentrifugationsschritt für 10 min bei 4°C und 3.000 U/min. Das Pellet wurde in 1/10 des Kulturvolumens eiskalten 50 mM $CaCl_2$ gelöst. Die nun kompetenten Zellen wurden auf Eis aliquotiert und entweder sofort zur Transformation verwendet oder nach Zusatz von Glycerin zu einer Endkonzentration von 10% in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C bis zur Verwendung aufbewahrt.

2.8 Molekularbiologische Methoden

2.8.1 PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

Zur Amplifikation von DNA-Fragmenten wurde die Polymerase-Kettenreaktion durchgeführt. Dies geschieht in einer zyklischen Abfolge unter Verwendung von zwei komplementären, die Matrize flankierenden Oligonukleotiden (*Primer*) und einer temperaturstabilen DNA-Polymerase. Jeder Zyklus beginnt mit der Denaturierung der Matrize, dem folgt das Anlagern der *Primer* (*Annealing*) und schließlich die sukzessive DNA-Polymerisierung durch die Polymerase unter Verwendung zugefügter dNTPs (Elongation). Mit dieser Methode kann man selbst geringe DNA-Mengen hochspezifisch exponentiell vervielfältigen.

Analytische PCR-Reaktionen wurden mit der Taq-DNA-Polymerase durchgeführt, die statistisch gesehen eine Fehlerrate in der Amplifikation von ca. 1‰ aufweist. Die Länge der verwendeten *Primer* lag in der Regel bei ± 20 Nukleotiden und die entsprechenden *Annealing*-Temperaturen wurden 5-10°C niedriger als die Schmelztemperaturen der Oligonukleotide, die sich mit der Formel $T [^{\circ}\text{C}] = 2(A + T) + 4(C + G)$ berechnet, gewählt.

Tabelle 2-10 Pipettierschema für eine PCR mit Taq-DNA-Polymerase

PCR-Ansatz	
DNA-Matrize	10-100 ng
10x Taq-Puffer	5 μl
dNTPs (10 mM)	0,5 μl
Oligomer <i>forward</i> (1 μM)	5 μl
Oligomer <i>reverse</i> (1 μM)	5 μl
Taq-DNA-Polymerase	0,5 μl
ddH ₂ O	ad 50 μl

Tabelle 2-11 PCR-Programm für eine PCR mit Taq-DNA-Polymerase

Schritt	Temperatur [$^{\circ}\text{C}$]	Zeit [sec]	Zyklen
1. Initiale Denaturierung	94	30	1
2. Denaturierung	94	10	35
3. <i>Annealing</i>	55-68	20	
4. Elongation	72	30-60	
5. Finale Elongation	72	600	1

Zur Amplifikation von DNA-Fragmenten, die in Klonierungsexperimenten eingesetzt werden sollten, wurde die Phusion-DNA-Polymerase (BioCat, Heidelberg) verwendet, die eine ausgeprägte Fehlerkorrektur besitzt und somit DNA in einem hohen Maß fehlerfrei amplifizieren kann. Die in Klonierungen verwendeten Amplimere wiesen meist eine 5'-terminale Verlängerung auf, durch die modifizierte DNA-Fragmente gebildet wurden (z. B.

Einbau einer Restriktionsschnittstelle, Eliminieren eines Stoppkodons). Die spezifischen Anlagerungstemperaturen wurden bei den hier verwendeten komplexen *Primern* mit Hilfe des Programms Clonemanager ermittelt.

Tabelle 2-12 Pipettierschema für eine PCR mit Phusion-DNA-Polymerase

PCR-Ansatz	
DNA-Matrize	10-100 ng
5x HF-Puffer	10 µl
dNTPs (10 mM)	0,5 µl
Oligomer <i>forward</i> (1µM)	5 µl
Oligomer <i>reverse</i> (1µM)	5 µl
Phusion-DNA-Polymerase	0,5 µl
ddH ₂ O	ad 50 µl

Tabelle 2-13 PCR-Programm für eine PCR mit Phusion-DNA-Polymerase

Schritt	Temperatur [°C]	Zeit [sec]	Zyklen
1. Initiale Denaturierung	98	30	1
2. Denaturierung	98	10	35
3. <i>Annealing</i>	55-68	20	
4. Elongation	72	30-60	
5. Finale Elongation	72	600	1

2.8.2 Restriktionsverdau

Restriktionsendonukleasen können die Phosphodiesterbindungen doppelsträngiger DNA an einer für ein Enzym jeweils spezifischen, meist palindromischen Sequenz hydrolysieren. Das daraus resultierende Fragmentmuster liefert Erkenntnisse über die Verteilung entsprechender Restriktionsschnittstellen in einer DNA und somit Informationen über die verdaute DNA-Sequenz. Eine Enzymeinheit ist die Aktivität, die bei dem jeweiligen Temperaturoptimum 1 µg λ-DNA in einer Stunde spalten kann. Für analytische Zwecke wurden ca. 0,1 µg, für präparative Ansätze ca. 10 µg DNA eingesetzt. Die Inkubation erfolgte im Temperaturoptimum des Enzyms, welches meist bei 37°C lag. Zur Analyse erfolgte die Inkubation für 1 h, zu präparativen Zwecken wurde sie bis zu 16 h durchgeführt.

Tabelle 2-14 Pipettierschema für einen Restriktionsverdau

Restriktionsverdau	
DNA	0,1-10 µg
10x Puffer	1/10 des Endvolumens
Enzym	1 U/µg DNA
ddH ₂ O	ad Endvolumen

2.8.3 Dephosphorylierung von Vektoren

Vektorfragmente, deren Enden durch den Verdau mit dem gleichen Enzym entstanden sind, würden bei der Behandlung mit Ligase vorwiegend mit sich selber religieren, ohne ein weiteres DNA-Fragment einzubauen. Um diesen Vorgang möglichst zu unterbinden, wurden endständige Phosphatgruppen mit alkalischer Phosphatase (*calf intestine alkaline phosphatase* [CIAP]) abgespalten. So besaß nur das Insert die zur Ligation notwendige Phosphatgruppe und wurde dadurch mit einer höheren Wahrscheinlichkeit in den Vektor eingebaut. Die Reaktion erfolgte für 30 min bei 37°C.

Tabelle 2-15 Pipettierschema für eine Vektor-Dephosphorylierung

Dephosphorylierung von Vektoren	
Vektor-DNA	ca. 5 µg
10x Puffer	1/10 des Endvolumens
Enzym	1U/ pmol DNA
ddH ₂ O	ad Endvolumen

2.8.4 Ligation

Um DNA-Fragmente miteinander zu verbinden, muss eine Phosphodiesterbindung zwischen dem 3'-OH-Ende und dem 5'-P-Ende ausgebildet werden. Dies geschieht unter ATP-Verbrauch mit Hilfe des Enzyms T₄-DNA-Ligase. Eine Bindung kann nur bei kompatiblen DNA-Enden ausgebildet werden. Zur Berechnung der einzusetzenden Fragmentmenge in einem Ligationsansatz mit 25 ng Vektor, wurde folgende Formel verwendet:

$$\text{Masse (Fragment[ng])} = \frac{125\text{ng} \times \text{Länge (Fragment[bp])}}{\text{Länge (Vektor[bp])}}$$

Die in der Ligation eingesetzten DNA-Fragmente wurden zunächst mit Hilfe des *Qiaquick PCR Purification* Kits aufgereinigt, und in EB-Puffer oder ddH₂O aufgenommen, so dass sie frei von in vorherigen Schritten verwendeten Puffern und Enzymen waren. Nach Zugabe des spezifischen 10x Ligase-Puffers und 1 µl Ligase wurde die Ligation entweder für 1 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 16°C durchgeführt.

2.8.5 Amplifikation von isolierter Plasmid-DNA in Bakterien

2.8.5.1 Transformation von Plasmiden in XL1-Blue-Bakterien

Um Plasmid-DNA zu amplifizieren, wurde diese in Bakterien transformiert. Dazu wurden die bei -80°C gelagerten kompetenten XL1-Blue-Bakterien auf Eis aufgetaut und mit dem gesamten Ligationsansatz bzw. bereits getesteter Plasmid-DNA zunächst für 30 min auf Eis inkubiert, um die DNA gleichmäßig zu verteilen. Danach erfolgte ein Hitzeschock für 2 min

bei 42°C, bei dem die kompetenten Bakterien die DNA aufnehmen. Danach folgte eine weitere Inkubation für 10 min auf Eis. Nach Zugabe von 1 ml LB-Medium wurden die Zellen für 30 min bei 37°C inkubiert. Während dieser Zeit konnten die auf dem Plasmid kodierten, für die jeweilige Antibiotikum-Resistenz verantwortlichen Proteine synthetisiert werden. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation bei 3 000 rpm für 5 min. Das entstandene Pellet wurde vorsichtig in 50 µl LB-Medium resuspendiert. Die Suspension wurde auf eine bei 37°C vorgewärmte LB-Agar-Platte, welche mit dem jeweiligen Antibiotikum versetzt war, mit Hilfe des Drigalskispatels ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde eine Kolonie mit Hilfe eines sterilen Zahnstochers in 4 ml flüssiges LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum überführt und schüttelnd bei 200 U/min und 37°C inkubiert.

2.8.5.2 Transformation von RNAi-Plasmiden in HT115(DE3)-Bakterien

Die Transformation von RNAi-Plasmiden (Vektor L4440) in kompetente HT115(DE3)-Zellen erfolgte nach einem modifizierten Protokoll. Dabei wurden die kompetenten Zellen zunächst langsam auf Eis aufgetaut, dann 1-100 ng Plasmid-DNA hinzugefügt und für 30 min auf Eis inkubiert. Der Hitzeschock erfolgte für 1 min im 37°C Wasserbad. Nach Zugabe von 1 ml SOC-Medium wurde für 1 h bei 37°C schüttelnd inkubiert. 10 µl, 100 µl, 250 µl und 640 µl dieser Bakterienlösung wurden nun jeweils auf eine LB-Agarplatte, welche mit Tetracyclin und Ampicillin versehen war, ausgestrichen und diese Platten bei 37°C für 36 h inkubiert. Zum Animpfen einer Flüssigkultur wurde eine Kolonie in LB-Medium mit Ampicillin überführt und über Nacht schüttelnd bei 37°C inkubiert.

2.8.6 Präparation von Plasmid-DNA

Die Präparation von Plasmid-DNA erfolgte im Rahmen dieser Arbeit auf zwei verschiedene Arten. Für Präparationen im kleinen Maßstab (20 µg) wurden die Plasmide aus einer 4 ml Über-Nacht-Kulturen mit Hilfe des *Qiaprep Spin Mini-Prep* Kits isoliert. Um größere Mengen Plasmid-DNA (500 µg) in reinerem Zustand zu erhalten, wurde die Plasmid-DNA von Bakterien einer 100 ml Über-Nacht-Kultur mit dem *Qiafilter Plasmid Maxi-Prep* Kit präpariert.

2.8.7 Spektralphotometrische Bestimmung der DNA-Konzentration

Die Konzentrationsbestimmung von Plasmid-DNA eines *Maxi-Preps* wurde mit Hilfe des Photometers durchgeführt. Dazu wurde die DNA 1:50 und 1:100 mit EB-Puffer verdünnt und die Extinktion bei 260 nm und 280 nm bestimmt. Dabei entsprach eine $OD_{260nm} = 1$ einer Konzentration von 50 µg/ml dsDNA. Die Qualität der DNA wurde anhand des Quotienten von OD_{260nm}/OD_{280nm} bestimmt, wobei ein Wert zwischen 1,8 und 2,0 eine ausreichend gute Reinheit bedeutet.

2.8.8 DNA-Gelelektrophorese

DNA-Fragmente wurden zur Analyse gelelektrophoretisch aufgetrennt. Entsprechend der erwarteten Fragmentgrößen wurden Gele mit unterschiedlichen Agarosekonzentrationen hergestellt. Dazu wurde die entsprechende Menge Agarose in TBE-Puffer unter Aufkochen gelöst. Nachdem das flüssige Gel auf ca. 50°C abgekühlt war, wurde 0,5 µg/ml Ethidiumbromid zur DNA-Markierung hinzugefügt und der Inhalt in einen Gelschlitten gegossen. Je nach Probenanzahl und -volumen war ein entsprechender Kamm im oberen Ende des Gelschlittens eingelegt. Nach mindestens 15 min war das Gel fest und wurde in eine mit TBE-Puffer gefüllte Laufkammer überführt. Die DNA-Proben wurden mit 10 x Ladepuffer versehen und so neben einem geeigneten DNA-Größenmarker in die Taschen aufgetragen. Nun wurde eine Spannung von 60-120 Volt angelegt, wodurch die DNA aufgrund der unter diesen pH-Bedingungen negativ geladenen Phosphatreste zur Anode wandert. Anhand der Farbfront des im Probenpuffer enthaltenden Bromphenolblaus konnte abgeschätzt werden, wann die Auftrennung ausreichte und die DNA-Fragmente im Geldokumentationsgerät unter UV-Bestrahlung visualisiert und dokumentiert werden konnten.

2.8.9 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen

Zur Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde das Gel zunächst auf einen UV-Tisch (366 nm Wellenlänge) überführt, auf dem die DNA-Fragmente sichtbar gemacht wurden. Die entsprechende Bande wurde mit einem Skalpell ausgeschnitten und die DNA-Isolierung erfolgte mit dem *Qiaquick Gel Extraction Kit*.

2.8.10 Sequenzierung von DNA

Sämtliche DNA-Sequenzierungen wurden von der Firma *GENterprise Genomics* (Mainz) nach dem Kettenabbruchverfahren nach Sanger (Sanger et al., 1992) durchgeführt und die Chromatogramme mit den PC-Programmen Chromas, bzw. Clonemanager ausgewertet.

2.9 C. elegans-Methoden

2.9.1 C. elegans-Stammhaltung und Kryokonservierung

Zur Stammhaltung wurden die Tiere auf mit Bakterien beimpften NGM-Agar-Platten gehalten. Zur Herstellung der Platten wurde flüssiger 55°C warmer NGM-Agar mit 1 ml/l Cholesterin (5 mg/ml in 95% EtOH), 25 mM KPO₄, 1 mM MgSO₄ und 1 mM CaCl₂ versetzt und bei sterilen Bedingungen in Kulturschalen (Ø 35, 60 oder 100 mm) gegossen. Die Platten wurden bei Raumtemperatur für 30 bis 60 min getrocknet und konnten bei 4°C bis zu 2 Wochen gelagert werden. Jede Platte wurde mit 15-20 µl Bakterienflüssigkultur (HB101)

beimpft und über Nacht bei 37°C inkubiert, so dass ein konfluenten Bakterienrasen entsteht. Die Platten konnten nun für die *C. elegans*-Kultivierung verwendet werden. Zur Stammhaltung wurden die Tiere täglich mit Hilfe eines *wormpicks* umgesetzt. Dabei handelt es sich um einen in einer Pasteurpipettenspitze verschmolzenen Platindraht (Ø 0,2 mm), dessen Ende mit einer Flachzange plattgedrückt ist. Zur Stammhaltung wurden 4-5 L4-Tiere gepickt und auf eine neue bakterienbeimpfte NGM-Platte überführt.

Zur dauerhaften Kryokonservierung wurden fünf L4-Tiere auf eine NGM-Platte überführt und bei 20°C inkubiert bis sich kein Futter mehr auf der Platte befand und möglichst viele L1- und L2-Tiere vorhanden waren. Die Würmer wurden mit S-Basal von den NGM-Platten gespült, in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt, pelletiert und mit S-Basal gewaschen. Anschließend wurden die Tiere in 1 ml S-Basal und 1 ml Einfriermedium in Kryoröhrchen überführt, welche in einer Kryobox bei -80°C eingefroren wurde. Durch die Kryobox wurde ein schonendes Einfrieren gewährleistet, da sich die Temperatur pro Stunde nur um 1°C verringerte. Zur permanenten Lagerung wurden die Tiere in flüssigen Stickstoff überführt. Bei Bedarf wird der Inhalt eines aufgetauten Kryoröhrchens auf mehrere NGM-Platten verteilt und die lebenden Würmer nach zwei Tagen gepickt.

2.9.2 Erzeugung von Stadien-synchronen *C. elegans*-Populationen

Um Stadien-synchrone *C. elegans*-Kulturen zu erhalten, wurden adulte Würmer auf NGM-Platten mit M9-Medium in ein Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurden die Tiere dreimal mit M9-Medium gewaschen, pelletiert und für maximal 5 min mit Bleiche behandelt. Dies bewirkte, dass die Tiere starben und lediglich die Eier, die von einer dicken Kutikula umgeben sind, überlebten. Anschließend wurde das Pellet fünfmal mit reichlich M9-Medium gewaschen und die Eier in einem geringen Volumen M9-Medium resuspendiert, danach auf eine NGM-Platte ohne Futterbakterien gegeben und bei 20°C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden die geschlüpften L1-Larven mit M9-Medium von der Platte gewaschen und auf frische, mit HB101 beimpfte NGM-Platten (Ø 60 mm oder 100 mm) verteilt. Nach der entsprechenden Entwicklungszeit stand nun eine gleichaltrige Population für Experimente zur Verfügung.

2.9.3 Etablierung transgener *C. elegans*-Stämme

Die gängigste und einfachste Methode, um transgene *C. elegans* Stämme zu generieren, ist die Injektion der DNA in die distale synzytiale Gonade. Einige der Nachkommen dieser Würmer tragen die injizierte DNA als zirkuläres extrachromosomales *array*, welches sich von nun an wie ein zusätzliches Minichromosom verhält: es wird repliziert und segregiert bei jeder Zellteilung. Extrachromosomale *arrays* werden mit einer geringeren Frequenz als normale Chromosomen vererbt, so ist nicht jedes F1-Individuum ebenfalls transgen. Neben der DNA des Transgens wird oft ein Koinjektionsmarker verwendet, der zur Identifizierung

der transgenen Individuen verwendet wird. Koinjektionsmarker sowie die zu untersuchende DNA wurden standardmäßig jeweils in einer Konzentration von 20 ng/μl verwendet. Zur Bildung des großen extrachromosomalen *arrays* wird zusätzlich Träger-DNA benötigt, die in Form von DNA-Größenmarker auf eine DNA-Gesamtkonzentration von 200 ng/μl zugesetzt wurde. In manchen Fällen wurde zusätzlich Injektionspuffer im Mix verwendet, wobei gleich gute Resultate nur mit ddH₂O erzielt wurden.

Zur Herstellung eines Agarose-Pads für die Injektion wurde ein Tropfen 2%ige Agarose auf ein Deckgläschen gegeben und dieser sofort mit einem weiteren Deckglas flach gedrückt. Nach Entfernen des oberen Deckgläschens wurde ein kleiner Tropfen Halocarbon Oil auf den Agarose-Pad gegeben und mit Hilfe des *wormpicks* ein junger adulter Wurm in den Öltropfen überführt. Unter Verwendung einer vorne rundgeschmolzenen Pasteurpipette wurde der Wurm nun so positioniert, dass die distalen Gonadenarme lateral lagen und das Tier sich kaum bewegte. Unter dem Injektionsmikroskop (Leica DM IRB), welches mit einer Injektionsapparatur (FemtoJet) und einem Mikromanipulator ausgestattet war, wurde die Mikroinjektionsnadel, die den Injektionsmix enthielt, in die distalen Gonaden-Arme des Tiers eingestochen und die DNA eingepumpt. Nach Zugabe eines Tropfen M9 Mediums schwamm der Wurm aus dem Öl und wurde auf eine neue NGM-Platte überführt. Nach 3-4 Tagen wurden die Nachkommen auf die Präsenz des Transgens hin untersucht. Zur Etablierung eines Stammes wurden transgene F1-Tiere isoliert und die Vererbung des extrachromosomalen *arrays* an deren Nachkommen überprüft.

2.9.3.1 Integration extrachromosomaler *arrays*

Ein Nachteil bei extrachromosomalen transgenen Linien ist, dass keine 100%ige Transmission an die Nachkommen vorliegt. Desweiteren kommen häufig Mosaiktiere vor, die nicht in jeder Zelle transgen sind. Diese Nachteile sind für viele Experimentalansätze fatal, so dass stabile transgene Stämme benötigt werden. Dazu integriert man das extrachromosomale *array* eines transgenen Stammes in das Genom. Die ungerichtete Integration wurde im Rahmen dieser Arbeit durch UV-Bestrahlung, welche Strangbrüche im Genom bedingt, induziert.

Zur Etablierung von stabilen transgenen Linien wurden zunächst fünf 10 cm NGM-Platten mit jeweils 30 L4-Tieren versehen und diese mit 300 J/m² in einem Stratalinker 2400 bestrahlt. Nach drei Tagen bei 20°C wurden 500 F1-Tiere von diesen Platten vereinzelt. Diese trugen potentiell eine heterozygote Integration und wurden weitere drei Tage bei 20°C inkubiert. Von der Folgegeneration dieser F1-Tiere wurden jeweils zwei Individuen vereinzelt, die die potentielle Integration möglicherweise homozygot trugen. Wiederum die Nachkommen dieser insgesamt 1000 Einzeltiere wurden auf 100%iges Vorkommen des Transgens untersucht, was auf eine Integration des *arrays* schließen ließ. Nachdem sich die absolute Penetranz

über einige Generationen bestätigt hatte, wurde der Stamm noch fünfmal mit dem Wildtyp gekreuzt um weitere mögliche Mutationen zu eliminieren.

2.9.4 Generierung von *C. elegans*-Männchen und Verpaarung

Um kreuzungsgenetisch mit *C. elegans* arbeiten zu können, werden Männchen zur Verpaarung mit Hermaphroditen benötigt. Die Befruchtung der Eier durch das Fremdsperma des Männchens wird im Gegensatz zum Hermaphrodit-eigenen Sperma präferiert. Im Labor kann man die Bildung von Männchen durch einen Hitzeschock induzieren. Dadurch kann es zu *nondisjunction*-Ereignissen in der Meiose kommen, so dass Tiere mit nur einem X-Chromosom, also Männchen, entstehen.

Zur Induktion der Männchen-Bildung durch Hitzeschock wurden zunächst jeweils fünf L4-Würmer auf neue NGM-Platten transferiert. Diese Tiere wurden anschließend 5-6 h bei 30°C in einem Wärmeschrank inkubiert und danach bei 20°C gelagert. Nach 4 Tagen entwickelten sich junge Männchen in der F1-Population, die an der fächerförmigen Schwanzstruktur identifiziert werden konnten und für Verpaarungen verwendet werden konnten. Dazu wurden jeweils vier junge Männchen mit einem L4-Hermaphroditen auf eine Platte transferiert. Aus getrenntgeschlechtlich-befruchteten Eiern entwickelten zu einem bestimmten Anteil wiederum Männchen, was eine permanente Männchen-Haltung ermöglichte.

2.9.5 RNA-Interferenz

Das Phänomen der RNA-Interferenz (RNAi) wurde Ende der 90er Jahre in *C. elegans* entdeckt (Fire et al., 1998) und wurde mittlerweile sowohl in weiteren Invertebraten wie *Drosophila melanogaster* (Kennerdell and Carthew, 1998; Kennerdell and Carthew, 2000) und Vertebraten (Elbashir et al., 2001; Paddison and Hannon, 2002; Yang et al., 2001) beschrieben und weiter charakterisiert. Bei RNAi wird durch die Präsenz spezifischer doppelsträngiger RNAs (dsRNA) die Expression der komplementären Gene herunterreguliert. Dabei wird die Fremd-dsRNA zunächst durch das Enzym Dicer in 21-23mere, den sogenannte siRNAs gespalten. Diese binden an den sogenannten RISC (*RNA-induced silencing complex*), der nach seiner Aktivierung an die zelleigene mRNA bindet und deren Degradation induziert siehe z.B. Mocellin and Provenzano, 2004. Die natürlichen Funktionen von RNAi werden in zellulären Abwehrmechanismen gegen RNA-Viren oder Transposons und als Kontrollmechanismus der korrekten Genexpression durch translationale Repression vermutet.

Die hohe Spezifität und Effektivität des Phänomens macht man sich experimentell zu nutzen, indem man reverse Genetik ohne Mutagenese betreiben und Gene zeitlich variabel (z.B.

während der Entwicklung) ausschalten kann. So kann RNAi dazu beitragen, Genfunktionen und Pathways zu charakterisieren.

2.9.5.1 RNAi durch Füttern von dsRNA-produzierenden Bakterien

C. elegans ernährt sich von *E. coli* Bakterien. Dies und die Besonderheit, dass der RNAi-Effekt sich in *C. elegans* über die Zellgrenzen hinweg ausbreiten kann und sogar an die Nachkommen vererbt wird (Fire et al., 1998), nutzt man bei der methodischen Variante „RNA-Fütterung“ aus (Timmons et al., 2001). Dabei frisst der Wurm dsRNA-produzierende Bakterien eines zu untersuchenden Gens, die dsRNA wird intrazellulär durch die RNAi-Maschinerie prozessiert und der RNAi-Effekt ausgelöst.

Zur Durchführung eines RNAi-Fütterungs-Experiments wurde zuerst die cDNA oder ein Teil der cDNA des zu herunterregulierenden Gens in den Vektor L4440 kloniert, welcher zwei T7-Phagen-Promotoren für die T7-RNA-Polymerase besitzt. Da auf jedem Strang ein Promotor vorhanden ist, entstehen bei Präsenz der Polymerase zwei RNA-Moleküle, die zueinander komplementär sind. Diese lagern sich zusammen und bilden die doppelsträngige RNA. Kloniert man diesen Vektor in Bakterien des Stammes HT115(DE3), der zur erhöhten Effektivität RNaseIII-defizient ist, und der eine durch Isopropyl- β -D-thiogalaktosidase (IPTG)-induzierbare T7-RNA-Polymerase besitzt, kommt es zur Synthese spezifischer dsRNAs.

Zur Herstellung von RNAi-Platten wurden zusätzlich zu dem in Abschnitt 2.9.1 beschriebenen Protokoll zur Herstellung von NGM-Agarplatten 25 μ g/ml Carbenicillin und 1 mM IPTG bei 55°C zugegeben. Nach Beimpfung der Platten mit den RNAi-Bakterien erfolgte eine Inkubation bei Raumtemperatur über Nacht, in der die dsRNA-Produktion durch das IPTG im Agar induziert wurde. Jede Platte wurde mit jeweils zwei L4-Würmern versetzt und bei 20°C oder 25°C für drei Tage inkubiert. Danach erfolgte die phänotypische Auswertung der F1-Tiere am Fluoreszenzbinokular. In einigen Versuchsansätzen erfolgte die Behandlung mit RNAi über mehrere Generationen.

In einer erwerbbaeren *C. elegans*-spezifischen RNAi-Bank sind rund 86% der ca. 20 000 *C. elegans* Gene in den o.g. Vektor kloniert und in RNAi-Bakterien verpackt (Kamath and Ahringer, 2003). Dies ermöglicht eine schnelle Verfügbarkeit von Einzelkandidaten und erlaubt reverse Genetik in genomweiten *Screens*.

2.9.5.2 RNAi durch Injektion von dsRNA

Eine im Vergleich zur RNAi-Fütterung effektivere Variante der RNA-Interferenz ist das Injizieren von doppelsträngiger RNA.

Zunächst wurden zur Amplifikation der entsprechenden DNA-*Primer* entworfen, die zusätzlich an den 5' Enden T7-Erkennungstellen besitzen. 200 ng des PCR-Produkts wurden

zur *in vitro* Transkription zur Herstellung der dsRNA eingesetzt, welche nach Anleitung des *MAXIscript*® Kits erfolgte. Anschließend wurde eine Phenol/Chloroform-Extraktion zur Aufreinigung der RNA durchgeführt. Dazu wurde die gleiche Menge Phenol zur RNA-Probe gegeben, gevortext und für 1 min bei 13 000 U/min zentrifugiert. Diese Schritte wurden zweimal mit Chloroform wiederholt, wobei immer die obere wässrige Phase abgenommen und weiter bearbeitet wurde. Zur Fällung der RNA wurde das gleiche Volumen Isopropanol hinzugefügt und eine Inkubation über Nacht bei -20°C vorgenommen. Darauf folgte eine 30minütige Zentrifugation bei 13 000 U/min, nach Abnahme des Überstands wurden 70% Ethanol in DEPC-behandeltem Wasser zugegeben, weitere 15 min zentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Pellet leicht getrocknet, um es in 12 µl RNase-freiem Wasser zu resuspendieren. Zur Kontrolle wurde die RNA im Agarosegel aufgetrennt.

Die dsRNA wurde nun in junge adulte Würmer injiziert. Die Nachkommen wurden nach drei Tagen als Larven und nach sechs Tagen als adulte Tiere auf einen RNAi-Effekt hin untersucht.

2.9.6 Immunhistologie

2.9.6.1 Herstellung Poly-L-Lysin-beschichteter Objektträger

Zur Fixierung und anschließenden Antikörperfärbung der Tiere wurden Poly-L-Lysin-beschichtete Objektträger verwendet. Embryonen, L1-Tiere und präparierte Därme haften durch diese Beschichtung auf der Objektträgeroberfläche.

Zur Herstellung der Lösung wurden 200 ml Wasser auf 60°C erwärmt um darin 400 mg Gelatine zu lösen. Anschließend ließ man die Lösung auf 40°C abkühlen und gab 40 mg $\text{CrK}(\text{SO}_4)_2 \times 12 \text{H}_2\text{O}$ hinzu. Davon wurden 25 ml mit 25 mg Poly-L-Lysin gemischt. Diese Lösung war nach 24 Stunden gebrauchsfertig und konnte dauerhaft bei 4°C gelagert werden. Zur Beschichtung wurden 10 µl auf einem Objektträger verstrichen und zum Trocknen bei Raumtemperatur aufbewahrt. Poly-L-Lysin-beschichtete Objektträger konnten bis zu zwei Wochen bei Raumtemperatur gelagert werden.

2.9.6.2 Gewinnung von Embryonen

Zur Gewinnung von Embryonen früher Entwicklungsstadien wurden adulte, eiertragende Hermaphroditen in einen Tropfen M9-Lösung auf einen Objektträger überführt. Unter dem Binokular wurden die Tiere dann mit Hilfe eines Skalpell oder einer Spritzenadel aufgeschnitten, sodass die Eier herausquollen. Ältere Embryonalstadien wurden gewonnen, indem zunächst eine Platte mit vielen abgelegten Eiern mit M9-Medium beflutet wurde. Um die Embryonen auf Poly-L-Lysin-beschichtete Objektträger zu überführen, wurde eine, an einer Mundpipettierhilfe befestigte, ausgezogene Pasteurpipette verwendet. Die Embryonen

wurden damit angesaugt und anschließend durch druckvolles Auspipettieren auf Poly-L-Lysin-beschichteten Objektträgern befestigt.

2.9.6.3 Präparation von Därmen

Um Antikörperfärbungen an Därmen adulter Tiere durchführen zu können, mussten die Tiere ebenfalls aufgeschnitten werden. Zunächst wurden adulte Tiere in einen Tropfen M9-Medium auf einen Poly-L-Lysin beschichteten Objektträger gegeben. Anschließend wurde ihnen mit einem Skalpell entweder das Kopf- oder das Schwanzende abgetrennt. Durch den hohen Innendruck quoll der Darm und die Gonaden sofort nach außen und klebten am Untergrund fest.

2.9.6.4 Gefrierbruch und Fixierung

Die auf den Poly-L-Lysin-beschichteten Objektträgern klebenden Embryonen wurden auf ein Deckglas gelegt und das M9 Medium gleichmäßig mit einem Papiertuch soweit abgesaugt, dass die Embryonen direkten Kontakt mit dem Deckglas hatten, jedoch nicht von ihm zerquetscht wurden. Das genaue Erreichen dieses Quetschgrades ist essentiell für ein erfolgreiches Aufbrechen der Eihülle beim Gefrierbruch (Strome and Wood, 1983) und somit für das Eindringen der Antikörper. Die Präparate wurden sofort in flüssigen Stickstoff überführt und dort für mindestens 20 min inkubiert. Die Objektträger konnten bis zur weiteren Behandlung bei -80°C aufbewahrt werden. Vor der Fixierung wurde das Deckglas der eiskalten Objekte mit Hilfe eines Skalpells abgesprengt, wobei die Eihülle aufriss. Zur Fixierung wurden die Präparate zunächst 10 min in -20°C-kaltem Methanol und für 20 min ebenfalls bei -20°C in Aceton inkubiert. Zur Rehydrierung wurden die Präparate für jeweils 5 min zunächst in 90%igem, dann in 60%igem eiskalten Ethanol inkubiert und anschließend bei Raumtemperatur für 5 min mit 30%igem Ethanol behandelt. Daraufhin erfolgten zwei fünfminütige Waschschrte in TBST.

2.9.6.5 Antikörperinkubation

Die spezifischen Primäantikörper wurden in Blockierlösung verdünnt und 50 µl pro Objektträger auf die fixierten Tiere appliziert. Die Präparate wurden mit einem Deckgläschen bedeckt und über Nacht bei 4°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Deckglas vorsichtig mit TBST abgewaschen und zweimal für 5 min in TBST gewaschen. Die gleichartig durchgeführte Inkubation der Sekundäantikörper erfolgte anschließend für 1,5 h abgedunkelt bei Raumtemperatur, ebenfalls in der feuchten Kammer. Nach zwei fünfminütigen Waschschrten mit TBST wurde das Präparat mit einem Tropfen Elvanol und einem Deckglas eingebettet und bis zur Analyse am Fluoreszenzmikroskop bei 4°C gelagert.

2.9.7 Phalloidin-Färbung

Zur Markierung von Aktinfilamenten mit AlexaFluor 546-Phalloidin wurden Därme, wie in Abschnitt 2.9.6.3 beschrieben, präpariert. Anschließend fand eine Inkubation in der Phalloidin/Fixierungslösung (Phalloidin Stammlösung [1 mg/ml in PBS] 1:100 verdünnt in 75% Methanol und 3,7% Formaldehyd) für 30 min bei Raumtemperatur statt. Darauf folgten zwei Waschschriffe für je 10 min in PBT und eine einstündige Inkubation mit AlexaFluor 546-Phalloidin (1:100) bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer. Nach zweimaligem Waschen mit PBT wurden die Tiere mit einem Tropfen Elvanol versehen und ein Deckgläschen aufgelegt. Die Auswertung fand am Fluoreszenzmikroskop statt.

2.9.8 Fluoreszenzmarkierung des Darmlumens

Um das Darmlumen zu markieren, wurden adulte Tiere für 30 min in PBS mit 5 mg/ml TRITC-konjugiertem Dextran (40.000 MW) inkubiert. Anschließend wurden die Tiere zwei- bis dreimal mit M9-Medium gewaschen und auf einen Objektträger mit Agarose-Pad in 1 M Natriumazid überführt um eine mikroskopische Auswertung durchführen zu können.

2.10 Mikroskopie

Zur Dokumentation von *C. elegans* wurden verschiedene optische Systeme verwendet. Zur Dokumentation von ganzen Würmern wurden diese standardmäßig in einem Tropfen 1 M Natriumazid aufgenommen und auf einen mit Agarose-Pad-beschichteten Objektträger überführt und ein Deckgläschen aufgelegt.

2.10.1 Differentielle Interferenzkontrast-Mikroskopie nach Nomarski

Zur Erzeugung von differentiellen Interferenzphasenkontrast-Aufnahmen wurde ein Zeiss Axioplan 2, ausgestattet mit einer Hamamatsu ORCA-ER Kamera, verwendet. In einigen Fällen wurden DIC-Bilder mit dem konfokalen Laserscanning-Mikroskop Leica TCS SP5 aufgenommen. Die Bilder wurden mit Hilfe der Software Adobe Photoshop CS3 nachbearbeitet und Bildcollagen mit dem Adobe Illustrator CS3 angefertigt.

2.10.2 Konfokale Laserscanmikroskopie

Konfokale Laserscanning-Aufnahmen wurden mit einem Leica TCS SP5 Mikroskop-System erstellt. Die Bildstapel wurden mit der Software ImagePro Plus übereinander gelagert und mit Adobe Photoshop CS3 bearbeitet bzw. in machen Fällen mit dem 3D-Rekonstruktionsprogramm Amira animiert.

2.10.3 Elektronenmikroskopie

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei Fixierungsmethoden für die Elektronenmikroskopie angewandt, die gleich gute Ergebnisse erzielten.

(i) Adulte Tiere wurden für 2 h in einer Lösung aus 0,7% Glutaraldehyd, 0,7% Osmiumtetroxid und 10 mM HEPES fixiert und anschließend für weitere 3 h mit 2% Osmiumtetroxid in 10 mM HEPES inkubiert. Nach Waschen in ddH₂O und einer Inkubation in einer 1%igen Uranylacetat Lösung für 24 h wurden die Tiere jeweils zweimal in 50% und 70% Ethanol für jeweils 15 min rehydriert.

(ii) Alternativ wurden die Tiere in frisch angesetzter Karnovsky-Lösung für 24 h bei 4°C inkubiert, dann dreimal für jeweils 15 min in PBS mit 6,9% Sucrose gewaschen und schließlich in 2% Osmiumtetroxid, gelöst in PBS, postfixiert. Anschließend wurden die Tiere in PBS gewaschen und zweimal für je 15 min in 50%igem Ethanol dehydriert. Dem folgte eine Über-Nacht-Inkubation in 70% Ethanol mit 0,5% Uranylacetat und 1% Wolframsphorsäurehydrat.

Die weiteren Schritte waren identisch für beide Fixierungsmethoden: Es folgten aufeinanderfolgende Inkubationen für jeweils zweimal 15 min in 80%, 90% und 96% Ethanol. Nach weiteren drei, je 20 min dauernden Inkubationen in 98% Ethanol wurden die Tiere zweimal für je 15 min mit Propylenoxid behandelt und danach in Epoxy-Resin eingebettet. Dies polymerisierte für 3 Tage bei 60°C und wurde anschließend getrimmt, um überschüssiges Kunstharz zu entfernen. Mit Hilfe eines Ultramikrotoms und eines Diamantmessers wurden von der Oberfläche ca. 50-60 nm dünne Transversalschnitte angefertigt. Diese Schnitte wurden in einen mit Wasser gefüllten Trog aufgefangen und auf Kupfergrids übertragen, die mit Formvar beschichtet waren. Zur Nachkontrastierung der Schnitte wurde diese zunächst für 8 min in 8%iger Uranylacetatlösung inkubiert und anschließend 1 min in Reynoldscher Bleicitratlösung behandelt. Die Präparate wurden im Transmissionselektronenmikroskop untersucht und mit einer Digitalkamera dokumentiert.

2.11 EMS-Mutagenese-Screen

Im Rahmen dieser Arbeit wurde Ethylmethansulfonat (EMS) verwendet, um Mutationen im *C. elegans* Genom hervorzurufen. EMS bedingt vornehmlich Punktmutationen (ca. 82% Transitionen, ca. 4% Transversionen) und in ca. 13% der Fälle entstehen kleinere Deletionen (4bp bis 18kbp). Verwendet man es in der hier angewendeten Art und Weise, wirkt es mit einer Frequenz von 5×10^{-4} , was in *C. elegans* einer Mutation pro 2000 Genloci pro haploidem Genom entspricht. Geht man davon aus, dass *C. elegans* 20 000 Gene aufweist, müssen in

einem genomweiten *Screen* somit 1000 haploide Genome mutagenisiert werden, um statistisch gesehen jeden Locus einmal zu treffen. Diese Zahl möchte man um ein vielfaches erhöhen, um möglichst viele Mutationsereignisse zu erhalten.

In dem hier durchgeführten *Screen* wurden P0-Tiere mit EMS behandelt, was in deren Keimbahn Mutationsereignisse erzeugt, so dass die F1-Generation zwei separat mutagenisierte haploide Chromosomensätze aufweist. Rezessive Mutationen wurden dementsprechend erst in der F2-Generation ausgeprägt, da hier Mutationen erstmals homozygot auftreten können. Demzufolge wurde die zweite Filialgeneration auf mutante Phänotypen untersucht.

Zunächst wurden 15 große NGM-Agarplatten (Ø 10 cm) benötigt, welche möglichst dichte Populationen von vornehmlich jungen L4-Stadien aufwiesen. Die Tiere wurden mit M9-Medium von den Platten in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt, zweimal mit M9 gewaschen und schließlich in einem Endvolumen von 4 ml aufgenommen. Dazu wurden nun 20 µl EMS gegeben, um eine Endkonzentration von ca. 47 mM zu erhalten. Die Würmer wurden so für 4 h bei Raumtemperatur in einem Taumelschüttler inkubiert. Alle mit EMS in Berührung gekommenen Spitzen, Handschuhe und Reaktionsgefäße wurden gesondert gesammelt und anschließend in 3% KOH dekontaminiert. Nach der Inkubation wurde die EMS-Lösung abgenommen und die Tiere zweimal mit M9-Medium gewaschen. Dieser mit EMS verseuchte Überstand wurde in einem Becherglas gesammelt und zur Dekontaminierung mit einigen KOH-Pellets versehen. Die Tiere wurden nun auf 3 große NGM-Agarplatten verteilt und für mindestens 2 h bei Raumtemperatur inkubiert.

Anschließend wurden möglichst viele lebende L4-Tiere auf mehrere große NGM-Platten überführt und diese für ca. 24 h heranwachsen gelassen. Am nächsten Tag wurden 40 Platten mit jeweils vier eiertragenden Würmern versehen. Nach 4 h wurden diese auf neue Platten umgesetzt und die so gewonnenen Ablageplatten bei 20°C für drei Tage inkubiert. Insgesamt erfolgten 3 konsekutive Ablagezeiträume à 4 h, so dass eine Gesamtzahl von 120 Ablageplatten verwendet wurden. Um sicher zu gehen, dass zwei sich ähnelnde Mutanten nicht von demselben Mutationsereignis abstammten, war es wichtig zu verzeichnen, welche Ablageplatten von identischen Elterntieren stammten. Die Ablageplatten wurden nun so lange inkubiert bis die F1-Tiere wiederum Eier abgelegt hatten und die ersten F2-Würmer zu schlüpfen begannen. Nun wurden die F1-Tiere sehr vorsichtig mit M9-Medium abgewaschen um möglichst viele F2-Eier auf der Platte zu hinterlassen. Vorher wurden die F1-Individuen noch gezählt, da dies der Anzahl an mutagenisierten diploiden Genomen entsprach und eine Aussage über die Vollständigkeit eines genomweiten *Screens* gab. Die Tiere der F2-Generation wurden nun zum Heranwachsen bei 20°C inkubiert und nach 2-3 Tagen am Fluoreszenzbinokular auf phänotypische Veränderungen im intestinalen Intermediärfilament-

Muster untersucht. Einzelne Mutanten wurden auf kleine NGM-Kulturplatten isoliert und bei 15°C herangezogen. Um weitere Mutationen im Genom zu beseitigen, wurden die isolierten Mutanten fünfmal mit N2-Männchen rückgekreuzt.

2.12 Lokalisierung von Mutationen durch SNP-Kartierung

Zur Identifizierung der mutierten Gene, welche die phänotypischen Veränderungen der im EMS-Mutagenese-Screen isolierten Mutanten bedingte, wurde die sogenannte „SNP-Kartierung“ angewandt. Das Kartieren von Mutationen mit Hilfe von Einzel-Nukleotid-Polymorphismen (SNPs) wurde erstmals im Jahr 2001 von Wicks und Kollegen beschrieben (Wicks et al., 2001). Dabei werden DNA-Sequenz-Polymorphismen zwischen dem Wildtyp-Bristol-Stamm (N2) und dem nah verwandten Hawaii-Stamm (CB4856) als genetische Marker verwendet. Der Hawaii-Stamm weist eine uniforme hohe Dichte dieser Marker auf und knapp 3 500 der SNPs sind als „snip-SNPs“ identifiziert, was bedeutet, dass sie eine Restriktionsschnittstelle modifizieren. Die Genotypisierung eines derartigen SNPs kann über den Restriktionsverdau eines PCR-Produkts erfolgen, welcher den Bereich des SNPs enthält. Anhand des resultierenden charakteristischen Bandenmusters kann man N2- und Hawaii-DNA unterscheiden.

2.12.1 Chromosomale SNP-Kartierung

Um herauszufinden, welches Chromosom eine Mutation oder eine andere genetische Veränderung (z.B. Insertion eines Transgens) trägt, wurde ein für *C. elegans* etabliertes standardisiertes System nach Davis und Kollegen angewandt (Davis et al., 2005), mit dem auch bereits eine grobe subchromosomale Lokalisierung erfolgen konnte. Dies umfasst eine Auswahl von acht, recht gleichmäßig verteilten SNPs pro Chromosom, die alle eine *DraI*-Schnittstelle modifizieren (siehe Abbildung 2-1). So entsteht eine Gesamtzahl von 48 SNPs, für die jeweils ein *Primer*paar entworfen wurde. Alle 96 Oligomere wurden so gewählt, dass sie bei identischen PCR-Bedingungen ein jeweils 300-500 bp großes PCR-Produkt amplifizieren. Da sämtliche Reaktionsschritte in 96-Loch Platten stattfinden, wurde so ein leicht anwendbares und effizientes System etabliert, was mit Hilfe einer 8-Kanal-Pipette und einem 96-Pin-Replikator einen schnellen Durchlauf von chromosomalen Kartierungsexperimenten ermöglichte.

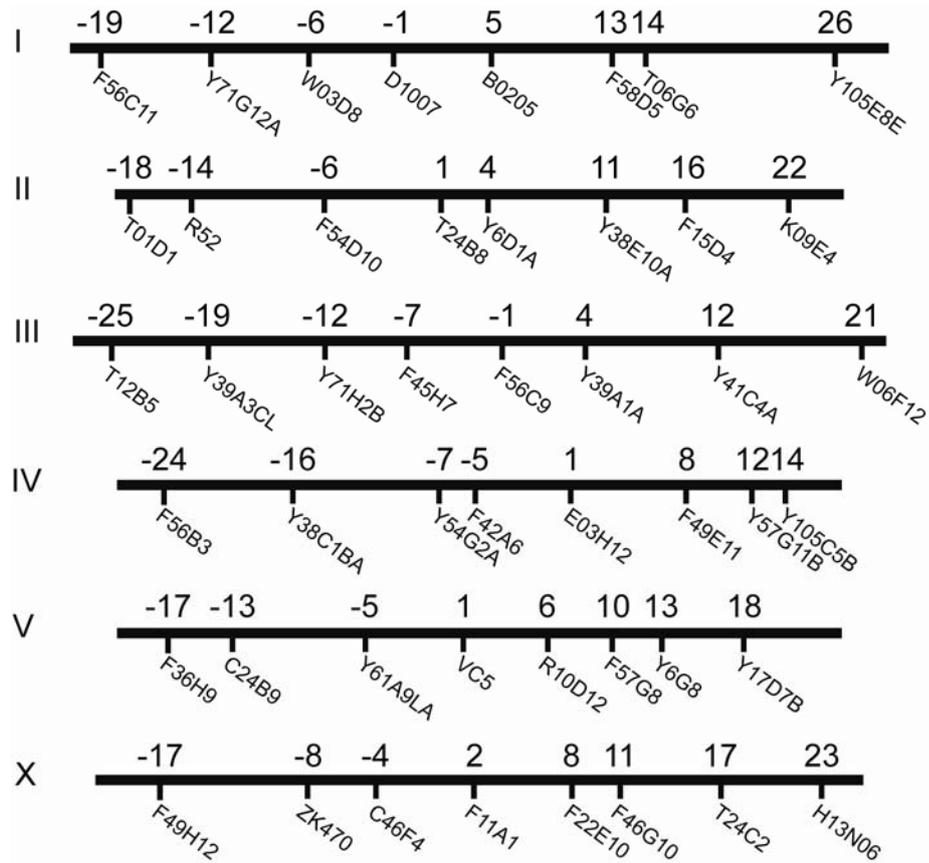


Abbildung 2-1 Genetische Positionen der 48 SNPs, die zum chromosomalen Kartieren verwendet wurden.

Schematische Darstellung der sechs *C. elegans* Chromosomen (I-X) mit den für die chromosomale Kartierung ausgewählten 8 SNPs pro Chromosom (jeweils oben: genetische Position in cM; unten: SNP-Bezeichnung). Alle diese SNPs modifizieren jeweils eine *DraI*-Schnittstelle. Zur Amplifikation von 300-500 bp großen Bereichen, die den jeweiligen SNP enthalten, wurden Primerpaare entworfen, die unter identischen PCR-Bedingungen amplifizieren (Primersequenzen siehe Abschnitt 7.3). Abbildung modifiziert nach Davis et al., 2005.

Zur Durchführung eines chromosomalen Kartierungsexperiments (Abbildung 2-2) wurde zunächst ein L4-Wurm des zu untersuchenden mutanten Stammes mit 4 Männchen des Hawaii-Stammes verpaart. Die resultierenden heterozygoten F1-Hermaphroditen wurden vereinzelt und wiederum deren Nachkommen im Experiment verwendet. Zum einen wurden 30 Tiere, die homozygot für das zu untersuchende Merkmal waren (im Weiteren als „mutant“ bezeichnet) in ein PCR-Reaktionsgefäß mit 20 µl Lysepuffer übertragen und andererseits 30 Tiere, die das Merkmal nicht ausgeprägt hatten (im Weiteren als „nichtmutant“ bezeichnet), also heterozygot oder aber homozygot Wildtyp waren, in ein mit 20 µl Lysepuffer gefülltes PCR-Gefäß überführt. Die Tiere wurden für mindestens 20 min bei -80°C eingefroren und anschließend bei 65°C für 1 h lysiert. Nach der Inaktivierung der Proteinase für 15 min bei 95°C wurden die Lysate in getrennten PCR-Mastermixen eingesetzt.

Tabelle 2-16 Pipettierschema eines PCR-Mastermix für eine 96-Loch-PCR-Platte im chromosomalen SNP-Kartierungsexperiment

PCR-Mastermix	
Lysat	20 µl
10x Taq-Puffer	52 µl
dNTPs (10 mM)	10,4 µl
Taq-DNA-Polymerase	3,12 µl
ddH ₂ O	424 µl

Jeweils 9,8 µl der PCR-Mastermixe wurden nun in eine 96-Loch-PCR-Platte pipettiert, so dass im Wechsel eine Reihe mit DNA mutanter Tiere und eine Reihe mit DNA von nichtmutanten Tieren besetzt war (Abbildung 2-2). Die *Primerpaare* waren vorab ebenfalls in eine zweite Mikrotiterplatte überführt worden, so dass jeweils zwei benachbarte 8-Loch-Reihen identische Amplimerpaare in einer Endkonzentration von je 10 µM enthielten. So waren z.B. in den ersten beiden Reihen die *Primer* zur Amplifikation der SNP-beihaltenden DNA-Bereiche von Chromosom I lokalisiert, in Reihen drei und vier die *Primerpaare* für Chromosom II usw. Die Oligonukleotidpaare wurden mit einem 96-Pin-Replikator in die 96 PCR-Mastermixe überstempelt, die PCR-Platte mit einer Silikonmatte abgedeckt und die PCR-Reaktion, wie in Tabelle 2-17 beschrieben, durchgeführt.

Tabelle 2-17 PCR-Programm zur chromosomalen SNP-Kartierung

Schritt	Temperatur [°C]	Zeit [sec]	Zyklen
1. Initiale Denaturierung	94	120	1
2. Denaturierung	94	15	35
3. <i>Annealing</i>	60	45	
4. Elongation	72	60	
5. Finale Elongation	72	300	1

Die PCR-Produkte wurden anschließend für mindestens 4 h bei 37°C mit *DraI* verdaut, indem man 6 µl aus dem in Tabelle 2-18 dargestellten Mastermix pro Loch hinzufügte und die Platte luftdicht mit einer selbstklebenden Folie verschloss.

Tabelle 2-18 Mastermix für den *DraI*-Restriktionsverdau im 96-Loch-Format zur SNP-Kartierung

Mastermix Restriktionsverdau	
10x Puffer	160 µl
<i>DraI</i> (50 U/µl)	10,4 µl
ddH ₂ O	435 µl

Jedem Loch wurde 2 µl 10x DNA-Probenpuffer zugefügt und die DNA-Fragmente auf einem 2,5%igem Agarosegel aufgetrennt. Dabei wurden die Proben mutanter und nichtmutanter Tiere der jeweils gleichen PCR-Reaktion nebeneinander aufgetragen, so dass die Bandenmuster direkt verglichen werden konnten (Abbildung 2-2).

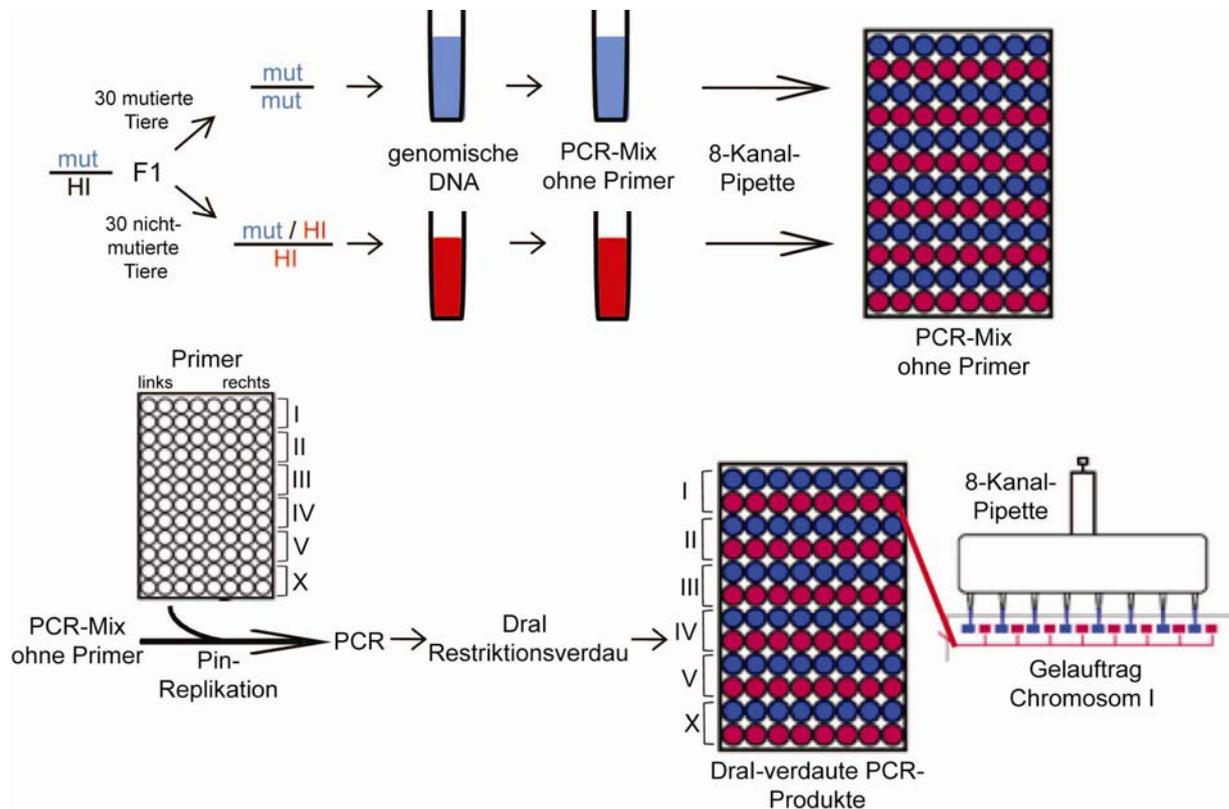


Abbildung 2-2 Prozedur der chromosomalen SNP-Kartierung im 96-Loch-Format.

Heterozygote F1-Tiere aus der Verpaarung des zu untersuchenden Stammes mit dem polymorphen Hawaii-Stamm wurden vereinzelt und zum einen 30 mutante (blau), zum anderen 30 nichtmutante (rot) Nachkommen gepoolt und lysiert. Die Lysate wurden als Matrizen in zwei separaten PCR-Mastermixen ohne *Primer* eingesetzt, welche anschließend in alternierenden 8-Loch-Reihen einer 96-Loch-PCR-Platte überführt wurden. Die 96 Amplimere wurden bereits paarweise in eine zweite Mikrotiterplatte pipettiert, so dass jeweils zwei benachbarte 8-Loch-Reihen identische *Primer*paare des jeweiligen Chromosoms enthielten. Mit Hilfe eines 96-Pin-Replikators wurden nun die *Primer* in die Mastermix-Platte überführt. Nach der PCR wurden die Proben mit *DraI* verdaut und gelelektrophoretisch analysiert. Um einen direkten Vergleich von mutanter und nichtmutanter Probe vornehmen zu können, wurden die Proben von mutanten und nichtmutanten Matrizen aus identischen PCR-Reaktionen per 8-Kanal-Pipette nebeneinander aufgetragen, indem zunächst die erste 8-Loch-Reihe (mutant) in jede zweite Tasche überführt wurde und dann die zweite Reihe in die freien Taschen dazwischen pipettiert wurde. Abbildung modifiziert nach Davis et al., 2005.

Die chromosomale Zuordnung eines Merkmals erfolgte nach dem im Folgenden beschriebenen Prinzip: Ein nichtgekoppeltes Merkmal erkannte man daran, dass die 30 gepoolten mutanten und nichtmutanten Tieren für dieses Chromosom Hawaii- und Wildtyp-SNPs in gleicher Häufigkeit besaßen, die Banden also in identischer Stärke amplifiziert wurden. Dies ist bedingt durch die statistisch gesehene gleichmäßige Verteilung von Hawaii- und N2-Chromosomen in einem entsprechend großen Pool von Genomen, die aus einer Verpaarung hervorgegangen sind. Im Gegensatz dazu weist das Chromosom, auf dem die Mutation liegt, in den gepoolten mutanten Tieren deutlich stärkere N2-Banden als Hawaii-

Banden auf, da die Mutation im N2-Hintergrund generiert wurde und die homozygote Mutation Selektionsmerkmal war. Zusätzlich kann eine grobe subchromosomale Zuordnung erfolgen, denn je näher ein SNP am Locus des Merkmals liegt, desto stärker ausgeprägt ist dieser Unterschied der Bandendicke, da Ereignisse der homologen Rekombination zwischen Hawaii- und N2-Genom mit verringerter Wahrscheinlichkeit in der Nähe des genomischen Selektionsmarkers auftreten.

2.12.2 Subchromosomale Intervall-Kartierung

Zur weiteren Identifizierung eines mutanten Locus wurde das sogenannte Intervall-Kartieren angewandt. Prinzipiell nähert man sich dabei dem Locus einer genetischen Veränderung durch sukzessive Verkleinerung des genomischen Bereichs, in dem sie sich befindet. Dabei wird das bereits beschriebene Prinzip zum Nachweis von „snip-SNPs“ angewandt. Durch die Analyse von benachbarten SNPs wird der Bereich, in dem die genetische Veränderung liegen kann, sukzessive verkleinert. Im Gegensatz zur chromosomalen Kartierung werden beim Intervall-Kartieren die Genotypen von mutanten F2-Individuen aus der Verpaarung mit Hawaii-Männchen, und nicht die gepoolte DNA einer Vielzahl von Tieren analysiert. So werden möglichst viele Einzeltiere identifiziert, die ein Ereignis der homologen Rekombination, also Hawaii-SNPs, in der Nachbarschaft des zu untersuchenden Merkmals aufweisen. Diese Tiere werden im zweiten Schritt für weitere SNPs, die in dem ermittelten Intervall liegen, untersucht. Liegen Orte der Rekombination näher an der Mutation als der untersuchte SNP, konnte das Mutation-tragende Intervall weiter verkleinert werden. Statistisch gesehen erfolgen Ereignisse der homologen Rekombination mit stets geringer werdender Wahrscheinlichkeit je näher man der genetischen Veränderung, nach der selektioniert wird, kommt. Deshalb ist es essentiell, möglichst viele rekombinante Individuen zu identifizieren, die weitere Informationen über den Ort der genetischen Veränderung geben können. Wird das Intervall auf diese Weise auf einen Bereich, der eine überschaubare Anzahl von Genen beinhaltet, begrenzt, kann die weitere Identifizierung des betroffenen Gens durch einen *Rescue*-Experimentalansatz erfolgen.

Davis und Kollegen haben auch für die Intervall-Kartierung ein im 96-Loch-Format durchführbares System etabliert (Davis et al., 2005), welches im Rahmen dieser Arbeit zum Kartieren der im EMS-Mutagenese-Screen isolierten Mutanten angewandt wurde (siehe Abbildung 2-3). Dazu wurden zunächst 96 mutante F2-Hermaphroditen, die aus der Verpaarung mit Hawaii-Würmern resultierten, vereinzelt und für ca. 1 Woche bei 20°C inkubiert bis eine dichte, fast verhungerte Population entstanden war. Dann wurden die Tiere mit Wasser abgewaschen und in jeweils ein Loch einer 96-Loch-PCR-Platte überführt (Abbildung 2-3). Die abgewaschenen Platten wurden bei 15°C aufbewahrt. Die 96-Loch-Platte wurden für 15 min auf Eis inkubiert, so dass die Würmer unbeweglich wurden und zu

Boden sanken. Anschließend wurde der Überstand bis auf 45 µl abgenommen und die Platte zur weiteren Verwendung bei -80°C eingefroren. Vor der in Abschnitt 2.12.1 bereits beschriebenen Lyse wurden 15 µl 4x Lysepuffer pro Loch hinzugefügt. Die so gewonnenen 96 PCR-Matrizen wurden bis zu ihrer Verwendung bei -80°C gelagert und dann mit Hilfe des 96-Pin-Replikators in die PCR-Ansätze überstempelt (Abbildung 2-3), die bereits durch das Überführen von 9,8 µl des PCR-Mastermixes (Tabelle 2-19) pro Loch in eine 96-Loch-PCR-Platte vorbereitet waren.

Tabelle 2-19 Pipettierschema eines PCR-Mastermixes für eine 96-Loch-PCR-Platte im Intervall-Kartierungsexperiment

PCR Mastermix	
Amplimer <i>forward</i> (100 µM)	2 µl
Amplimer <i>reverse</i> (100 µM)	2 µl
10x Taq-Puffer	100 µl
dNTPs (10 mM)	20 µl
Taq-DNA-Polymerase (5 U/µl)	6 µl
ddH ₂ O	850 µl

Die Einstellungen der PCR-Maschine entsprachen dem in Abschnitt 2.12.1 beschriebenen Protokoll (Tabelle 2-17). Zunächst wurden die drei SNPs des chromosomalen Kartierungsexperiments untersucht, die laut Bandenmuster am nächsten an der Mutation lagen. Der entsprechende *DraI*-Verdau erfolgte wie bereits in Tabelle 2-18 protokolliert. Die Proben wurden im 2,5%igem Agarosegel aufgetrennt. Zur Kontrolle wurden identisch behandelte reine Hawaii-DNA, reine N2-DNA und eine Mix-DNA aus gleichen Anteilen N2 und Hawaii aufgetragen. Rekombinante Individuen waren an der Präsenz von Hawaii-Banden zu identifizieren und es konnte eine erste Einschränkung des Intervalls erfolgen, wenn die Mutation in dem Bereich zwischen den drei SNPs lag und Individuen für zwei SNPs rekombinant waren.

Mit den Matrizen der Rekombinanten wurden weitere Genotypisierungen von SNPs innerhalb des nun erstmals eingegrenzten Intervalls durchgeführt. Dazu wurden entsprechende snip-SNPs aus Datenbanken ausgewählt und Oligonukleotide für einen, den SNP einschließenden Bereich, entworfen. Nach PCR und entsprechendem Restriktionsverdau erfolgte wiederum die Analyse und somit die weitere Einschränkung des Bereichs in dem die Mutation lag. Diese sukzessive Annäherung an die genetische Position der Mutation erfolgte parallel mit der weiteren Identifizierung von Rekombinanten. War ein Intervall von bis zu 200 Genen erreicht, wurden RNAi-Experimente der Einzelgene des Intervalls in Wildtyp-Würmern durchgeführt um das für den Phänotyp verantwortliche Gen zu identifizieren.

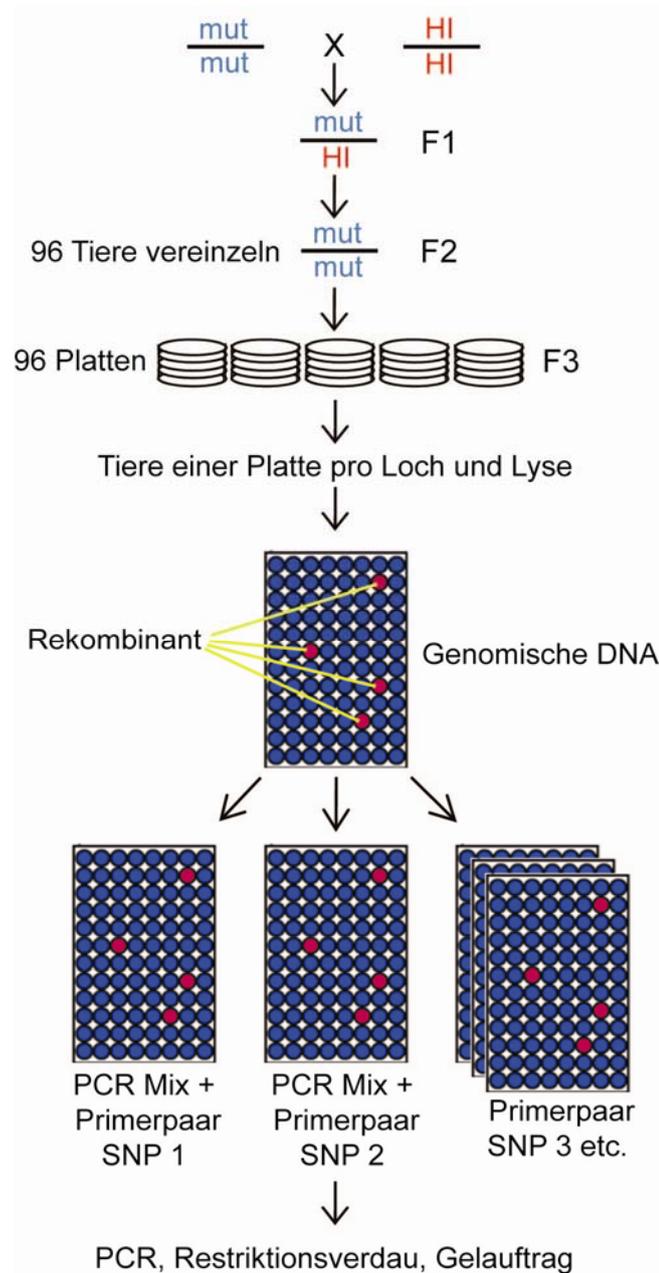


Abbildung 2-3 Prozedur der Intervall-Kartierung im 96-Loch-Format.

Im Gegensatz zur chromosomalen Kartierung werden beim genetischen Intervall-Kartieren einzelne rekombinante Linien benötigt. Dazu werden 96 NGM-Platten mit jeweils einem mutanten Hermaphrodit der F2 aus der Verpaarung mit Hawaii-Männchen besetzt. Die F3-Tiere werden von den Platten gewaschen und in die Löcher einer 96-Loch-Platte überführt und lysiert. Anschließend werden die 96 Wurm-Lysate als Matrizen mit Hilfe eines 96-Pin-Replikators in die PCR-Mastermixe in 96-Loch-PCR-Platten überstempelt. Zunächst erfolgt nun die Genotypisierung von den drei SNPs, die im chromosomalen Kartierungsexperiment am nächsten an der Mutation lagen. Auf diese Weise werden rekombinante Linien identifiziert, die Hawaii-DNA in der Nachbarschaft der Mutation aufweisen. So wird das Intervall erstmals eingegrenzt. Dem folgt die Identifizierung von weiteren snip-SNPs im Intervall mit Hilfe von Datenbanken, dem Entwurf von entsprechenden *Primern* und der Genotypisierung der rekombinanten DNAs. So kann eine sukzessive Verkleinerung des Mutation-tragenden DNA-Abschnitts erfolgen.

Abbildung modifiziert nach Davis et al., 2005.

3 ERGEBNISSE

3.1 Etablierung eines *in vivo*-Systems zur Detektierung von fluoreszierenden Intermediärfilamenten

Ein Ziel dieser Arbeit war es, ein *C. elegans* Modell zu etablieren, das fluoreszierende Intermediärfilamente exprimiert. Diese sollten ein hochcharakteristisches, leicht zu detektierendes Expressionsmuster zeigen, welches ihrer endogenen Verteilung entspricht und in optischen *Screens* zur Identifizierung von Faktoren, welche Einfluss auf die IF-Organisation haben, eingesetzt werden können.

3.1.1 Verteilungsmuster von Intermediärfilamenten in *C. elegans*

Im *C. elegans*-Genom wurden 11 Gene identifiziert, die zytoplasmatische Intermediärfilamente kodieren (Dodemont et al., 1994; Dodemont et al., 1990; Karabinos et al., 2001a). IF-Polypeptide befinden sich in allen epithelialen Organen des Wurmes, so kommen sie z.B. in Form von dichten IF-Bündeln in pharyngealen Marginalzellen (Karabinos et al., 2003) vor, fungieren als essentielle Linker-Elemente in der Hypodermis (Bartnik et al., 1986; Hapiak et al., 2003) oder sind als polarisiertes Netzwerk im *terminal web* von Darmzellen zu finden (Bossinger et al., 2004; Karabinos et al., 2002; Karabinos et al., 2004; Van Furden et al., 2004).

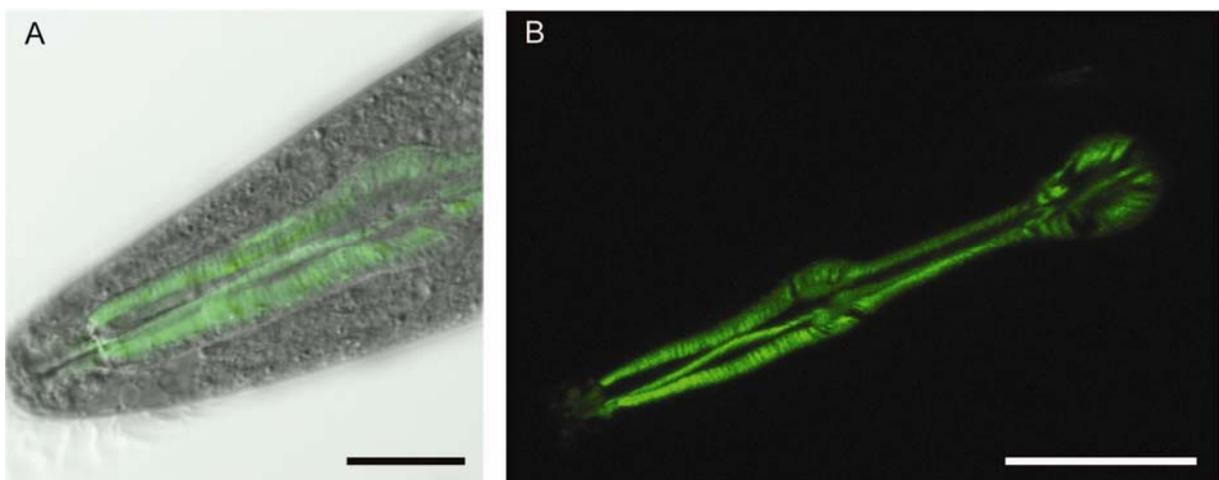


Abbildung 3-1 Pharyngeale Expression von IFA-1a::GFP in Tieren des Stammes EC668.

Das Intermediärfilament IFA-1 wird in den Marginalzellen des Pharynx exprimiert und bildet dort dicht nebeneinander gestapelte, apikobasal verlaufende Filamentbündel.
Anterior links unten. Größenbalken: 50 μ m.

Der von Dr. Anton Karabinos generierte transgene Stamm EC668 exprimiert das Fusionsprotein IFA-1a::GFP, was eine Analyse des Expressionsmusters ermöglicht (Karabinos et al., 2003). Ein distinktes, hochcharakteristisches Muster der IFA-1a-Expression

konnte in den Marginalzellen des Pharynx detektiert werden, wo die IF-Polypeptide in dicht nebeneinander gelagerten, apikobasal verlaufenden IF-Bündeln auftreten (Abbildung 3-1). Dieser Stamm könnte ein Kandidat für einen optischen *Screen* zur Identifizierung von IF-Fehlverteilungen sein.

Zur weiteren Evaluierung von IF-Verteilungsmustern im Hinblick auf einen Einsatz in einem optischen *Screen* wurden mit Hilfe von monospezifischen Antikörpern Immunfluoreszenzmarkierungen der beiden IF-Polypeptide IFB-2 und IFC-2, die im Terminalgeflecht von Intestinalzellen vorkommen, durchgeführt (Bossinger et al., 2004; Francis and Waterston, 1985; Karabinos et al., 2001a; Karabinos et al., 2002).

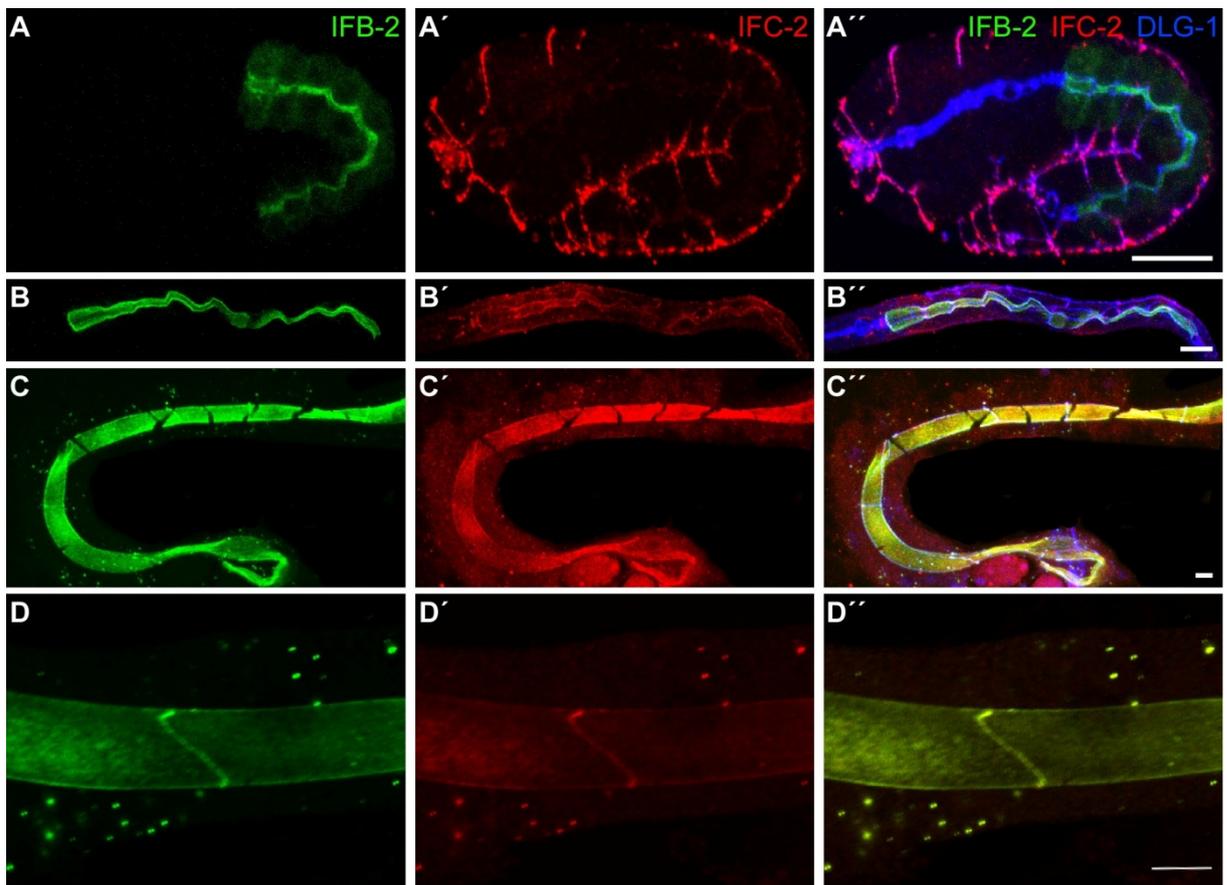


Abbildung 3-2 Immunfluoreszenz-Mikroskopie zur Darstellung der Intermediärfilamente IFB-2 und IFC-2 und dem junctionalen Protein DLG-1 in verschiedenen Entwicklungsstadien von *C. elegans*.

Während der Morphogenese des Embryos akkumuliert das IF-Protein IFB-2 um das sich entwickelnde Darmlumen (A) und kolokalisiert mit DLG-1 (A'). Zusätzlich ist IFB-2 diffus im Zytoplasma verteilt. IFC-2 hingegen ist in diesem Stadium nur sehr schwach im Darm nachweisbar, der Antikörper reagiert jedoch sehr stark mit den Junctionen der Hypodermis (A'). Letzteres beruht auf einer Kreuzreaktion mit einem nicht-IF-Epitop (siehe 3.1.1.1). Während der Larvalentwicklung (L3) ist IFB-2 fast ausschließlich in der subapikalen Region und in den DLG-1-markierten intestinalen Junctionen nachweisbar (B, B''). Das IFC-2-Signal im Darm ist in diesem Stadium deutlich stärker (vergleiche A' mit B') und konzentriert sich an den Junctionen. In isolierten Därmen von adulten Tieren findet man eine vollständige Kolokalisation von IFB-2 (C,D) und IFC-2 (C',D') vor. Beide IFs sind um das intestinale Lumen angereichert und bilden ein dichtes filamentöses Netzwerk (die schwarzen Unterbrechungen in C-C'' sind Gewebisse, die während der Präparation entstanden sind). Zusätzlich kolokalisieren beide Proteine an den apikalen Junctionen und in zytoplasmatischen Aggregaten (D-D'').

Anterior links (A-B'', D-D''); der Darm in C-C'' liegt gekrümmt, so dass anterior unten nach rechts zeigt. Größenbalken: 10 μm (A'', D''), 50 μm (B'', C'').

Abbildungen A,B,C: Tobias Wiesenfahrt.

In frühen Embryonalstadien zeigt sich zunächst eine deutliche Differenz der Expressionen beider Proteine: IFB-2 konnte in Intestinalzellen diffus zytoplasmatisch und apikal konzentriert um das entstehende Darmlumen nachgewiesen werden (Abbildung 3-2A), was mit früheren Untersuchungen übereinstimmt (Bossinger et al., 2004; Karabinos et al., 2004; Segbert et al., 2004). Im Gegensatz dazu findet in diesem Stadium eine sehr schwache Reaktion des IFC-2-Antikörpers mit seinem Epitop in den Darmzellen statt (Abbildung 3-2A'). Die stärkste IFC-2-Fluoreszenz konnte als multipunktiertes Muster entlang der Zellgrenzen der Hypodermiszellen detektiert werden, was eine junktionale Anreicherung nahelegt (Abbildung 3-2A'). Dies wird durch die Kolokalisierung mit dem Junktion-spezifischen Protein DLG-1 unterstützt (Abbildung 3-2A''). In späteren Entwicklungsstadien ist die IFB-2-Fluoreszenz weiterhin periluminal im Bereich der *endotube* angereichert (Abbildung 3-2B,C,D). Die stärkste Immunfluoreszenz wurde in den apikalen Junktionen detektiert (Abbildung 3-2D), was in Übereinstimmung mit früheren immunelektronenmikroskopischen Untersuchungen steht, die IFB-2 entlang des gesamten junktionalen Komplexes und der elektronendichten *endotube* zeigen (Bossinger et al., 2004). Zusätzlich wurde IFB-2 in punktförmigen zytoplasmatischen Anreicherungen detektiert (z.B. Abbildung 3-2D), die bislang noch nicht beschrieben sind. Diese fluoreszierenden Aggregate entstehen zuerst im L3-Stadium, akkumulieren zunehmend in den folgenden Entwicklungsstadien und kommen in größter Häufigkeit im posterioren Darmabschnitt von alten Hermaphroditen vor (vergleiche Abbildung 3-2B mit Abbildung 3-2C,D). Die intestinale Färbung von IFC-2 nimmt im Laufe der Entwicklung zu und weist in L3 Tieren eine prominente Abundanz im apikalen Bereich von Enterozyten auf (Abbildung 3-2B'). Dieses intestinale Expressionsmuster steht in großer Übereinstimmung mit der detektierten IFB-2-Fluoreszenz, was die Kolokalisation in der periluminalen *endotube* und die Doppelmarkierung der apikalen Junktionen (Abbildung 3-2C-D'') zeigt.

3.1.1.1 Tests zur Spezifität der IFB-2- und IFC-2-Antikörper

Um die Spezifität der verwendeten Antikörper zu testen, wurden Tiere mit RNAi behandelt und anschließend Immunfärbung durchgeführt. Wie erwartet resultiert *ifb-2* (RNAi) im vollständigen Verlust der intestinalen IFB-2-Fluoreszenz. Nach der Applikation von *ifc-2* (RNAi) gegen beide Spleiß-Varianten a und b und der Immunfärbung eines Epitops, welches in beiden Isoformen vorhanden ist, ist die darmspezifische IFC-2-Färbung nicht mehr detektierbar, jedoch persistiert überraschenderweise die starke multipunktierte hypodermale IFC-2-Verteilung im Embryo (Abbildung 3-3A',B'). Weiterhin ist auch die pharyngeale IFC-2-Färbung (Karabinos et al., 2002) und die Markierung der somatischen Gonade in adulten präparierten Tieren nachweisbar (siehe Pfeil in Abbildung 3-3C'). Um zu zeigen, dass RNAi generell in der Hypodermis effektiv ist, wurden parallel Doppel-RNAi-Experimente gegen

dlg-1 und *ifc-2* durchgeführt, die zeigten, dass DLG-1 intestinal und hypodermal effektiv herunterreguliert wird (nicht gezeigt).

Diese Beobachtungen zeigen, dass die anti-IFC-2-Antikörper unspezifisch mit weiteren Epitopen in hypodermalen Junctionen, Pharynxzellen und der somatischen Gonade reagieren, die nicht mit einer IFC-2-Produktion in Verbindung stehen. Folglich ist die Synthese von IFC-2 darmspezifisch.

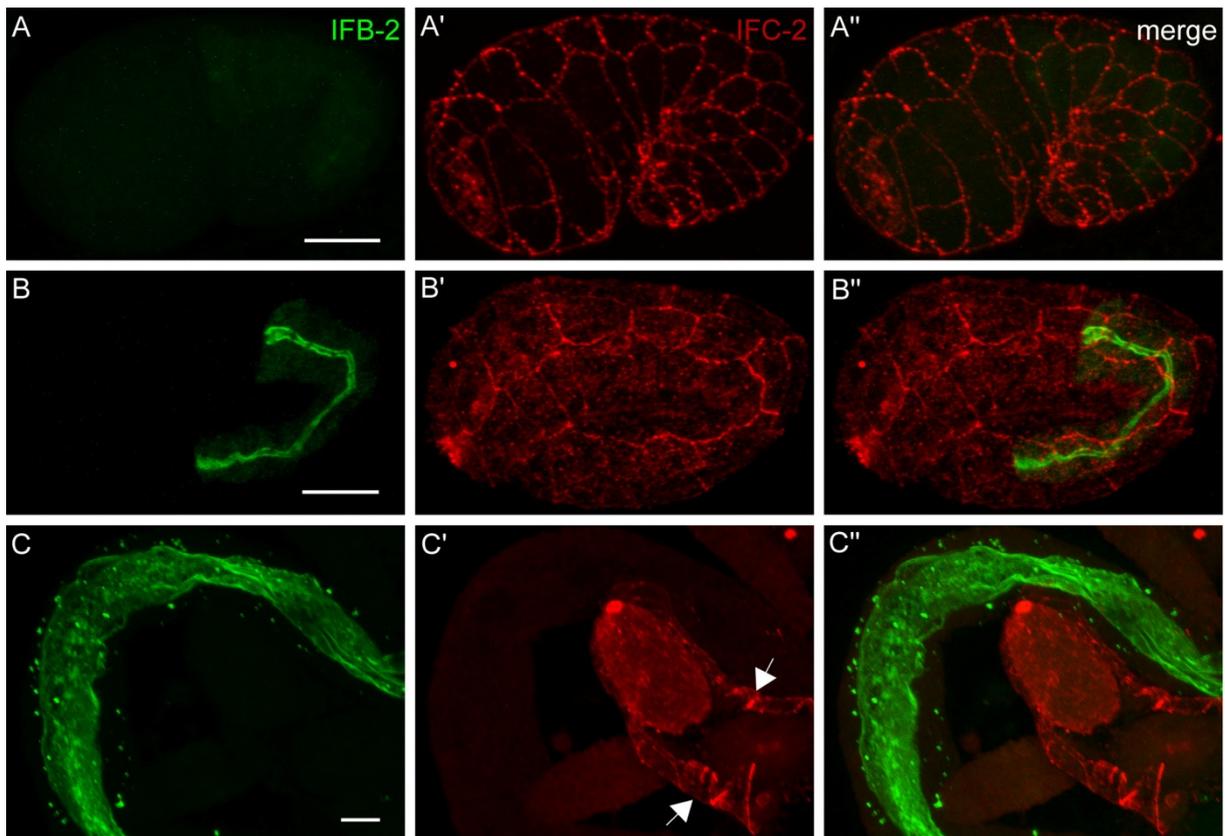


Abbildung 3-3 Fluoreszenz-Mikroskopie von IFB-2::CFP-Tieren, die mit *ifc-2* (RNAi) und mit IFC-2-Antikörpern behandelt wurden.

(A-A'') Komma-Stadium; (B-B'') Pflaume-Stadium; (C-C'') isolierter Darm eines adulten Tieres. Die *ifc-2* (RNAi)-Behandlung resultiert in einem vollständigen Verlust der intestinalen IFC-2-Antikörper-Reaktivität (vergleiche mit Abbildung 3-2 A',B',C'), während nicht-intestinale Fluoreszenz persistiert (Pfeile zeigen auf die somatische Gonade). Dies zeigt, dass der IFC-2-Antikörper an ein weiteres, nicht-IFC-2-Epitop in diesen Zellen bindet. Anterior links (A-B''); der Darm in C-C'' liegt gekrümmt, so dass anterior nach unten zeigt. Größenbalken: 10 µm. Abbildungen A,B: Tobias Wiesenfahrt.

3.1.2 Generation von transgenen Reporterstämmen zum Nachweis der IFB-2-Verteilung

Die immunologischen Expressionsanalysen in Abschnitt 3.1.1 zeigten ein hochspezifisches charakteristisches und leicht zu erkennendes intestinales IFB-2-Muster. Die gute Dokumentierbarkeit von IFB-2 im dichten apikalen Terminalgeflecht der *endotube* und in den apikalen Junctionen, vor allem aber die Tatsache, dass ein solches intestinales IF-reiches

Terminalgeflecht auch in Vertebraten auftritt und somit ein systemischer Vergleich erfolgen könnte, gaben den Anlass dieses IF-Polypeptid fluoreszierend in *C. elegans* zu exprimieren und auf Tauglichkeit zum Einsatz in optischen Screens zu testen.

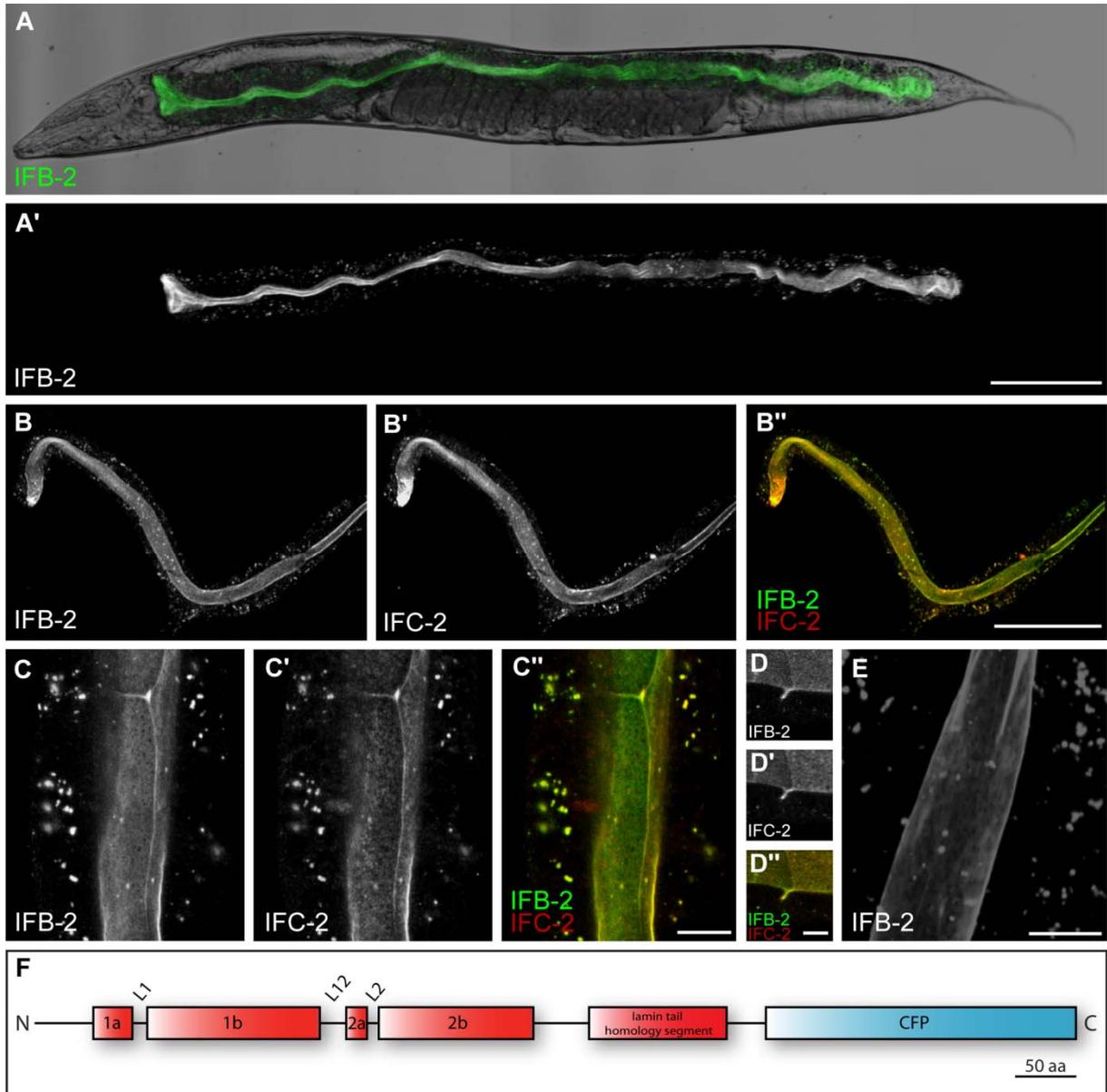


Abbildung 3-4 Fluoreszenz-Mikroskopie von IFB-2::CFP-exprimierenden Strukturen des transgenen Stammes BJ52.

(A-A') Überblick über die IFB-2::CFP-Verteilung in einem adulten Hermaphrodit. Die Überlagerung des Phasenkontrastbildes und der Fluoreszenzaufnahme zeigt die exklusive Expression des Transgens in intestinalen Zellen, wo IFB-2::CFP, neben einigen punktförmigen zytoplasmatischen Aggregaten, vornehmlich im subapikalen Zellkompartiment vorhanden ist. Dieses Muster entspricht der endogenen Verteilung von IFB-2 (vergleiche mit Abbildung 3-2). (B-D'') Überblick- und Detaildarstellungen von IFB-2::CFP (B,C,D) und anti-IFC-2-Detektion (B',C',D'); überlagert in (B'',C'',D'') im subapikalen filamentösen Netzwerk, in der apikalen Junktion (C-D'') und in den zytoplasmatischen punktförmigen Aggregaten (B-C''). (E) Die vergrößerte Aufsicht auf das Filament-Netzwerk zeigt regelmäßige kleine Lücken des engen Maschenwerks. (F) Schematische Darstellung des Fusionsproteins IFB-2::CFP mit dem aminoterminalen IFB-2-Polypeptid, welches aus einer Kopfdomäne, der charakteristischen Stabdomäne (beinhaltet *cois* 1a, 1b, 2a und 2b, die durch die Linkerregionen L1, L12 und L2 verbunden sind), aus dem Carboxyterminus mit dem Lamin-Homologie-Segment (Domainzuordnung nach Dodemont et al., 1994) und dem CFP-Modul besteht (Größenbalken: 50 Aminosäuren [aa]).

Anterior links (A-B'', D-D''); Anterior oben (C-C'',E). Größenbalken: 100 µm (A,B), 10 µm (C), 5 µm (D,E).
Abbildung B: Tobias Wiesenfahrt.

Zunächst wurde eine 1994 bp-große Promotorregion *upstream* des Startkodons des *ifb-2* Genlokus über PCR amplifiziert. Dazu wurden die Amplimere 05-143 und 05-144 (Tabelle 2-3) verwendet und als Matrize wurde Wurmlysat eingesetzt. Das PCR-Produkt wurde über die Schnittstellen *HindIII* und *PstI* in den promotorlosen, *cfp*-tragenden Expressionsvektor pVH10.10 ligiert. Im zweiten Klonierungsschritt wurde die 1646 bp-große *ifb-2*-cDNA mit Hilfe der Oligomere 05-145 und 05-146 (Tabelle 2-3) aus *C. elegans*-Gesamt-cDNA amplifiziert und über *PstI*-Schnittstellen in den *Pifb-2*-tragenden Vektor eingefügt. Das so entstandene Fusion-Genkonstrukt *ifb-2::cfp* wurde nun zur Etablierung eines transgenen Wurmstamms durch Mikroinjektion verwendet. Fluoreszierende Nachkommen dieser Tiere, die das Hybridprotein IFB-2::CFP (Abbildung 3-4F) exprimieren, wurden vereinzelt. Der so generierte Stamm BJ33 trägt das Transgen als extrachromosomales *array*. Die Analyse des IFB-2::CFP-Expressionsmusters war identisch mit dem in Abbildung 3-2 dargestellten immunhistologischen Nachweis von IFB-2. Die Fluoreszenz war darmzellspezifisch und wies das charakteristische *endotube*-ähnliche subapikale Muster auf.

Für den Einsatz in einem optischen *Screen* wurden *C. elegans*-Stämme benötigt, die ein möglichst invariables und stabiles Verteilungsmuster des IFB-2::CFP-Transgens aufweisen, um Veränderungen des Fluoreszenzmusters möglichst leicht identifizieren zu können. Aus diesem Grund war es notwendig, stabile Linien zu generieren, bei denen das Transgen im Genom integriert ist. Die Integration des extrachromosomalen *arrays* in das *C. elegans* Genom erfolgte durch UV-Bestrahlung, was zu ungerichteten Strangbrüchen im Genom führt. Auf diese Weise wurden acht unabhängige Linien isoliert (BJ49-BJ56), die das Transgen an unterschiedlichen Stellen im Genom tragen.

Die detaillierten Untersuchungen des IFB-2::CFP Musters der stabilen Stämme (Abbildung 3-4, Abbildung 3-5, Filme 1 und 2) bestätigten die Identität mit der endogenen Verteilung von IFB-2 (Abbildung 3-2). In adulten Würmern ist der Großteil der IFB-2-Polypeptide im subapikalen Zytoplasma lokalisiert, wo sie ein dichtes, feinfaseriges Netzwerk bilden, in dem in regelmäßigen Abständen kleine Fenestrations vorkommen (Abbildung 3-4C,E). Beachtliche Anreicherungen von IFB-2::CFP wurden in Bereichen detektiert, wo benachbarte Zellen aufeinander treffen (Abbildung 3-4C,D). Dort fluoresziert der gesamte junctionale Komplex (siehe Vergrößerung von benachbarten lateralen Membranen in Abbildung 3-4D). Weiterhin wurden multiple fluoreszierende zytoplasmatische Granula beobachtet (Abbildung 3-4A',B,C,E). Die Kolokalisierung von IFB-2::CFP mit dem endogenen IFC-2 ist ebenfalls fast vollständig gegeben (Abbildung 3-4B-D").

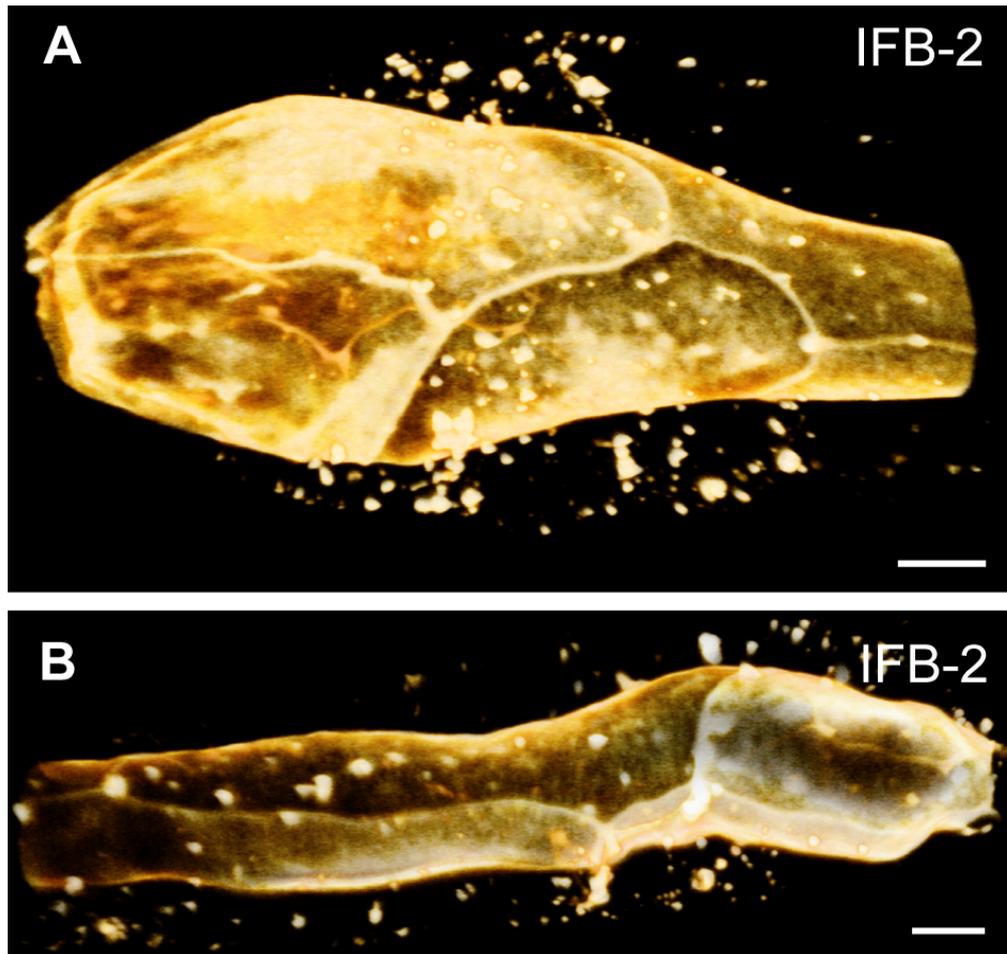


Abbildung 3-5 3D-Rekonstruktion von konfokalen Fluoreszenzaufnahmen des anterioren (A) und posterioren (B) intestinalen IFB-2::CFP-Musters von BJ52-Tieren.

IFB-2::CFP-markiert die apikalen Zellgrenzen, das feinmaschige Netzwerk, welches das Lumen umgibt und zytoplasmatische Aggregate (3D-Animationen siehe Filme 1 und 2). Anterior links. Größenbalken: 20 µm.

Zusammenfassend zeigt sich die IFB-2::CFP-Verteilung aller etablierten stabilen transgenen Stämme überzeugend identisch mit dem endogenen IFB-2-Muster, was den Rückschluss zulässt, dass stabile Integrianten von *ifb-2::cfp* als zuverlässige Reporterstämme für die intestinale IFB-2-Verteilung und -Dynamik dienen können.

3.1.2.1 Chromosomale Lokalisierung der *ifb-2::cfp*-Integrationen

Die chromosomale Zuordnung einer genetische Veränderungen im Genom von *C. elegans* erfolgte im Rahmen dieser Arbeit mit Hilfe des von Davis und Kollegen (Davis et al., 2005) etablierten Systems zur genetischen Kartierung mit Hilfe von *Single Nucleotide Polymorphisms* (SNPs), die über die Verpaarung mit Hawaii-Männchen eingebracht werden. Dabei ermöglicht eine Auswahl von acht gleichmäßig verteilten SNPs pro Chromosom, die alle eine *DraI*-Restriktionsschnittstelle modifizieren und alle mit Hilfe von Amplimeren unter gleichen PCR-Bedingungen genotypisiert werden können, eine schnelle und präzise

Versuchsdurchführung im 96-Loch-Platten-Format. Die Information über die Integrationsorte der stabilen, transgenen IFB-2::CFP-Stämme war für spätere Kreuzungen mit anderen Stämmen, die ebenfalls genetische Veränderungen trugen, hilfreich.

Zur Lokalisierung der Integrationsorte wurden zunächst Hawaii-Männchen mit einem Hermaphroditen des jeweiligen integrierten Stammes verpaart. Die F2-Generation wurde zur Analyse verwendet, indem zum einen ein Pool aus 30 fluoreszierenden Tieren, die homo- oder heterozygot für das Transgen waren (mutant) und zum anderen ein Pool aus 30 nicht-fluoreszierenden Tieren (nichtmutant) untersucht wurde. Die Interpretation der resultierenden Gelbilder erfolgte auf folgende Art und Weise: Lag die Integration nicht auf einem Chromosom, fand man zwischen mutanten und nichtmutanten Tieren keine Unterschiede in der Amplifikationsstärke von Hawaii- und N2-DNA-Fragmenten aller SNPs des Chromosoms (siehe Abbildung 3-6A). Eine Kopplung der genetischen Veränderung an ein Chromosom erkannte man hingegen daran, dass die DNA der mutanten Tiere ein stärkeres Signal bei der Amplifikation von N2-DNA-Fragmenten und gleichzeitig schwächer ausgeprägte Hawaii-Banden im Vergleich zu nichtmutanten Tieren aufwiesen (siehe Abbildung 3-6B). Der Unterschied zwischen mutant und nichtmutanten DNA-Fragment-Stärken wurde größer je näher ein SNP am Integrationsort lag. So konnte eine grobe subchromosomale Lokalisierung erfolgen.

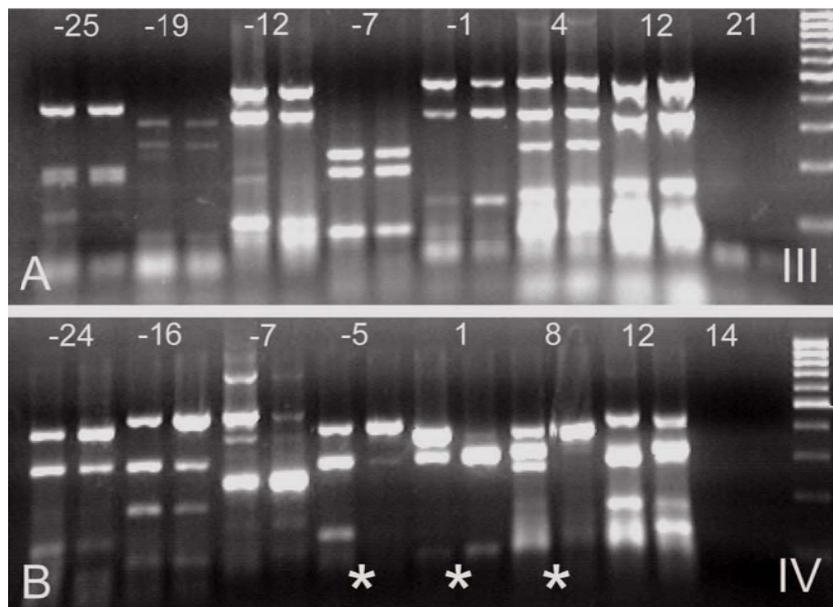


Abbildung 3-6 Darstellung von zwei Gelen des Kartierungsexperiments eines IFB-2::CFP-Transgens.

SNP-Genotypisierungen der Chromosomen III (A) und IV (B) für den Stamm BJ49. Paarweise nebeneinander sind die Proben IFB-2::CFP-tragender (mut) und nicht-transgener (n-mut) Tiere aufgetragen, die für je ein SNP genotypisiert wurden. Die Integration liegt nicht auf Chromosom III, da alle SNPs ein ausgeglichenes Verhältnis von N2- zu Hawaii-DNA-Fragmentstärken zwischen mut und n-mut Proben aufweisen (A). Das Transgen ist auf Chromosom IV integriert, was durch die Genotypisierung der SNPs in B deutlich wird: Ein erheblicher Unterschied in der Ausprägungsstärke der Banden zwischen mut und n-mut Proben ist bei den SNPs zu erkennen, die an den Positionen -5 cM, 1cM und 8 cM (mit * markiert) des Chromosoms liegen.

Auf diese Weise konnten die Integrationsorte von sieben Linien lokalisiert werden, die auf Chromosom II, IV oder V liegen (Tabelle 3-1).

Tabelle 3-1 Chromosomale Lokalisierungen der *ifb-2::cfp*-Integrationen

Stamm	Integration auf Chromosom #
BJ49	IV
BJ50	II
BJ51	V
BJ52	V
BJ53	nicht bestimmt
BJ54	IV
BJ55	II
BJ56	II

3.2 Detektierbarkeit phänotypischer Veränderungen im IFB-2::CFP-Muster

Ein Hauptkriterium für die Verwendung eines Reporterstamms in einem optischen *Screen* nach IF-Organisatoren war die leichte Detektierbarkeit von Veränderungen des stereotypen, fluoreszierenden IF-Verteilungsmusters. Im Idealfall sollte die Identifizierung von Alterationen bereits bei geringer Vergrößerung am Fluoreszenzbinokular möglich sein, um einen höchstmöglichen Durchlauf erzielen zu können. Um Veränderungen im Intermediärfilament-Netzwerk des Darms zu induzieren und somit zu prüfen, ob die IFB-2::CFP-Reporterstämme dieses Kriterium erfüllen können, wurden systematische RNAi-Experimente mit den insgesamt sechs intestinalen IFs IFB-2, IFC-1, IFC-2, IFD-1, IFD-2 und IFE-1 in IFB-2::CFP-exprimierenden Würmern durchgeführt. Die Applikation von *ifb-2* (RNAi) führte zum Verlust des fluoreszierenden Signals, was als Kontrolle zur Funktionalität der RNAi-Experimente im Darm angesehen wird. Der *knockdown* der weiteren Intermediärfilamente führte im Falle von *ifc-2* (RNAi) zu einer schon am Binokular deutlich detektierbaren phänotypischen Veränderung, die sich in Form von blasenförmigen Erweiterungen des subapikalen Fluoreszenzmusters zeigte (Abbildung 3-7). Deletionen der übrigen IFs hatten keine offensichtlich detektierbaren Auswirkungen auf das IFB-2::CFP-Muster. Der gleichzeitige *knockdown* von mehreren IFs des Darms hatte in allen Kombinationen, in denen *ifc-2* (RNAi) beteiligt war, den in Abbildung 3-7 gezeigten phänotypischen Effekt. Andererseits konnte in keinem der kombinatorischen IF-RNAi-Experimente, in denen IFC-2 nicht betroffen war, weder dieser, noch ein anderer offensichtlicher Phänotyp beobachtet werden.

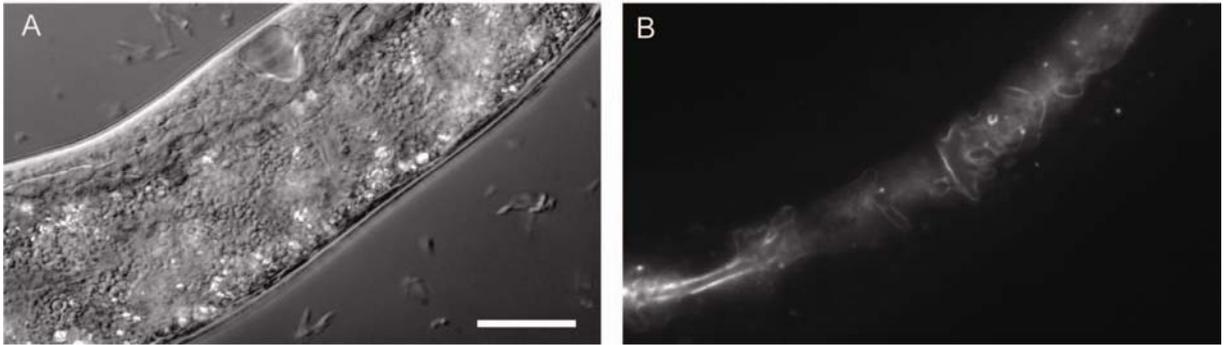


Abbildung 3-7 Phänotypische Veränderung des IFB-2::CFP-Musters nach *ifc-2* (RNAi).

Nach der Applikation von *ifc-2* (RNAi) durch Füttern kommt es zu strukturellen Veränderungen im apikalen Verteilungsmuster von IFB-2::CFP in BJ49-Tieren. Diese phänotypischen Alterationen sind bereits bei kleiner Vergrößerung im lebenden Tier detektierbar. Anterior links unten. Größenbalken: 50 µm.

Diese Vorabexperimente bestätigten die Möglichkeit der Detektion von Veränderungen des stereotypen IFB-2::CFP-Musters bereits bei geringer Vergrößerung, was eine Verwendung in einem genomweiten optischen *Screen* eindrücklich rechtfertigt.

3.3 Phänotypische und funktionelle Analysen nach *ifc-2* (RNAi) in IFB-2::CFP-exprimierenden Tieren

Die *ifc-2* (RNAi)-spezifischen Alterationen ließen vermuten, dass IFC-2 eine Schlüsselrolle innerhalb des intestinalen IF-Systems einnimmt. Zusammen mit der im Rahmen dieser Arbeit bereits ausgearbeiteten *endotube*-spezifischen Lokalisierung von IFC-2 (Abschnitt 3.1.1.1), gaben die oben beschriebenen ersten Beobachtungen einer phänotypischen Veränderung der *endotube* nach IFC-2-Depletion Anlass für genauere morphologische und funktionelle Untersuchungen dieses Phänotyps.

Karabinos und Kollegen publizierten bereits die Ergebnisse von RNAi-Experimenten der intestinalen Intermediärfilamente in *C. elegans*. Demnach führt RNAi von *ifb-2* zu keinem offensichtlichen Phänotyp, nach dem *knockdown* von *ifc-2* konnten jedoch bereits phänotypische Veränderungen beobachtet werden: *ifc-2* (RNAi) führt, je nach Applikationsart und Temperatur (Kamath et al., 2003; Karabinos et al., 2003; Karabinos et al., 2004), zu einem schwachen *dumpy*-Phänotyp (gestauchte Körperform) (Karabinos et al., 2001a) und zu stärkeren Veränderungen. Diese betrafen mit einer geringen Penetranz nur 3-16% der Tiere und umfassten die Ruptur von Vulva und/oder Anus und die unkoordinierte Bewegung der Tiere.

An dieser Stelle muss gesagt werden, dass momentan kein mutantes Allel von *ifc-2* verfügbar ist. Die in der *Wormbase* (<http://www.wormbase.org/>) verzeichneten Allele *gk226* und *tm2502* betreffen ein benachbartes Gen, welches fälschlicherweise als Teil des *ifc-2* Gens dargestellt ist (*Wormbase* Auflage WS183). Im Rahmen dieser Arbeit konnte immunhistochemisch gezeigt werden, dass Tiere, die diese Allele tragen keine Veränderungen in der Synthese und Verteilung von IFC-2 aufzeigen. Anstatt der in der *Wormbase* vorhergesagten drei Isoformen werden demzufolge nur zwei synthetisiert, die an Exon 11 des *Wormbase* Schemas beginnen. Das Vorkommen dieser Isoformen wurde bereits beschrieben (Dodemont et al., 1994) und konnte auch durch Immunoblots bestätigt werden (Karabinos et al., 2002; Karabinos et al., 2004). Sie werden als IFC-2a (entspricht Exon 11-16 des *Wormbase* Schemas und c₂-L laut Dodemont et al. 1994) und IFC-2b (entspricht Exon 11-21 des *Wormbase* Schemas und c₂-H laut Dodemont et al. 1994) bezeichnet.

Die im Rahmen der folgenden Untersuchungen durchgeführten RNAi-Experimente wurden mit Wildtyp-Tieren (N2) und mit verschiedenen, im N2-Hintergrund generierten IFB-2::CFP-exprimierenden Stämmen durchgeführt (BJ33 und stabil integrierte Stämme BJ49-BJ56) und aber auch mit Tieren des Stammes BJ92, die das RNAi-hypersensitive Allel *eri-1(mg366)* tragen.

3.3.1 Entwicklung und Analyse des *ifc-2* (RNAi)-Phänotyps

Für die *ifc-2* (RNAi)-Experimente wurden zwei verschiedene RNAi-Konstrukte verwendet, die zu gleichen Resultaten führten. Ein Konstrukt richtet sich gegen den Abschnitt, der durch Exon 2 und 3 kodiert wird und regelt somit beide Spleiß-Varianten herunter, während das zweite Konstrukt gegen die 3'-nichtkodierende Region von Isoform *ifc-2a* gerichtet ist. Die RNAi-Experimente wurden bei unterschiedlichen Temperaturen durchgeführt (15°C, 20°C, 25°C). Wird *ifc-2* nun durch Füttern von dsRNA-produzierenden Bakterien herunterreguliert (siehe Abschnitt 2.9.5.1), zeigt sich in L1-Tieren keine Veränderungen, die IFB-2::CFP-Verteilung bleibt in den Darmzellen polar apikal bestehen (Abbildung 3-8A,A'). Erste leichte Abnormalitäten der, das ellipsoide Lumen umrundenden, subapikalen IFB-2-Fluoreszenz wurde in späteren Larvalstadien beobachtet: Das Muster erscheint an manchen Darmabschnitten diffuser und ragt weiter in das Zytoplasma der Enterozyten hinein (Abbildung 3-8B,B'). Diese Invaginationen sind in älteren Entwicklungsstadien stärker ausgeprägt und unterbrechen die charakteristische Fluoreszenz der *endotube* an mehreren Positionen (Abbildung 3-8C,C'). Vergleicht man die Fluoreszenzaufnahmen mit den entsprechenden Interferenzkontrastbildern wird deutlich, dass die blasenförmigen IFB-2-Strukturen luminale Invaginationen umranden, die in die Darmzellen hineinreichen (Abbildung 3-8D,D'). Erstaunlicherweise wird der Phänotyp stärker, wenn man Tiere über

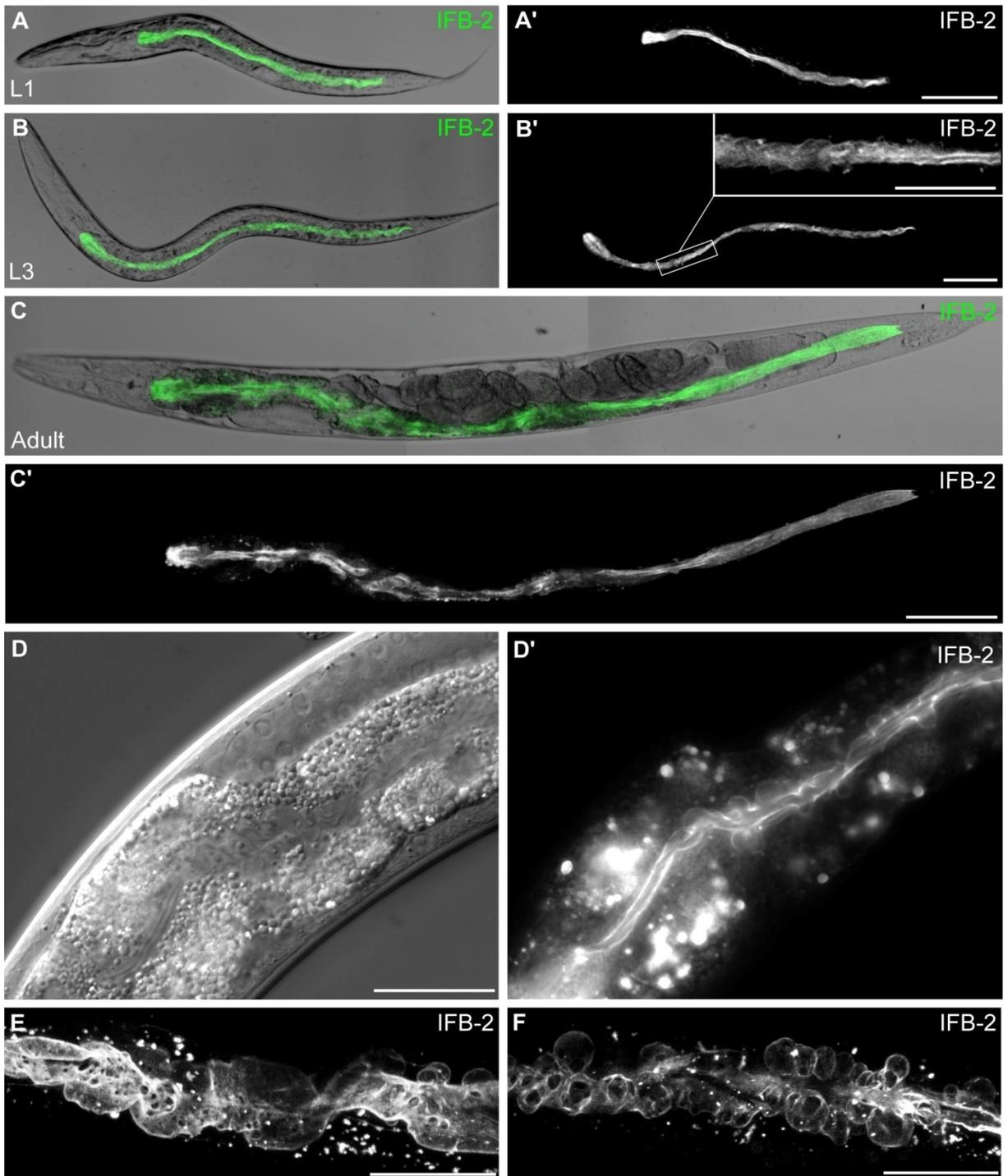


Abbildung 3-8 Identifizierung des progressiven *ifc-2* (RNAi)-Phänotyps durch IFB-2::CFP-Detektion in Larvalstadien (A-B') und adulten BJ52-Tieren (C-F).

(A,A') In L1 Tieren führt *ifc-2* (RNAi) zu keinen sichtbaren Veränderungen des IFB-2::CFP-Musters, ab L3-Stadium (B,B') hingegen sind erste, leichte Abweichungen ausgeprägt: Die apikal konzentrierte IFB-2::CFP-Verteilung erscheint diffuser (B'), was durch die Präsenz von vielen, kleinen Ausstülpungen bedingt wird (siehe Ausschnittsvergrößerung in B'). (C-D') In adulten Tieren sind diese blasenförmigen Veränderungen der IFB-2-Fluoreszenz sehr viel ausgeprägter. Diese großen Ausbuchtungen decken sich mit einer ebenso veränderten Lumenform (Nomarski-Aufnahme in D). Die Ausprägung des Phänotyps wird stärker, wenn die Tiere über mehrere Generationen mit *ifc-2* (RNAi) behandelt werden (E,F): Die blasenförmigen Strukturen sind am stärksten ausgeprägt und über die gesamte Darmlänge verteilt.

Anterior links. Größenbalken: 50 µm (A',B',D), 25 µm (Ausschnitt in B',E,F), 100 µm (C').

Abbildung D: Tobias Wiesenfahrt.

mehrere Generationen mit *ifc-2* (RNAi) behandelt (Abbildung 3-8E,F). 97% der so behandelten Tiere (n = 60) zeigen den Phänotyp, wobei 75% starke Veränderungen (Abbildung 3-8E,F) und 22% schwächere Ausbildungen aufweisen (Abbildung 3-8C,D). Alle Ausstülpungen sind kontinuierlich mit IFB-2::CFP umgeben, was auf eine intakte *endotube* hinweist. Die bereits beschriebenen Vulva- oder Anus-Rupturen (Karabinos et al., 2004) als Folge des *ifc-2-knockdowns* wurden hier nicht beobachtet. Um zu untersuchen, ob die Würmer den durch Karabinos und Kollegen (Karabinos et al., 2001a) beobachteten *dumpy*-Phänotyp aufweisen, wurde die Größe der Tiere bestimmt. Weder in der Länge noch im Durchmesser unterscheiden sich *ifc-2* (RNAi)-behandelte und nicht-behandelte Tiere signifikant.

Der Blasen-Phänotyp konnte auch in N2-Tieren durch *ifc-2* (RNAi) induziert werden. In Interferenzphasenkontrast-Aufnahmen konnte das erweiterte und blasenförmig ausgestülpte intestinale Lumen dokumentiert werden (Abbildung 3-9). Der Bürstensaum zeigt sich normal ausgebildet und IFB-2 konnte in Immunfärbungen kontinuierlich um die Aussackungen detektiert werden. Der Phänotyp war in N2-Tieren im Vergleich zu IFB-2::CFP-exprimierenden Tieren insgesamt etwas weniger stark ausgeprägt.

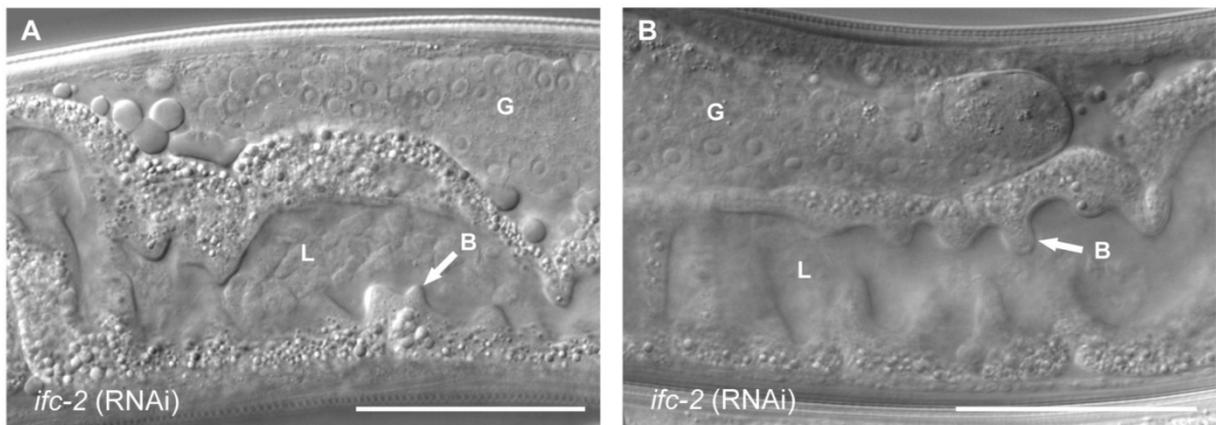


Abbildung 3-9 Interferenzkontrast-mikroskopische Aufnahmen von adulten, mit *ifc-2* (RNAi)-behandelten N2-Tieren.

Nach *ifc-2* (RNAi)-Behandlung über drei Generationen erscheint das intestinale Lumen (L) von N2-Tieren stark geweitet und blasenförmig deformiert. Der Bürstensaum (B) ist jedoch normal ausgebildet. (G) Gonade. Anterior links. Größenbalken: 50 μ m.
Abbildungen: Tobias Wiesenfahrt.

Durch die Bildung der blasenförmigen Ausstülpungen kommt es zu einer deutlichen Volumenzunahme des Darmlumens und somit zu einer Vergrößerung der apikalen Membrandomäne der Enterozyten. Um zu untersuchen, ob diese Oberflächenzunahme Konsequenzen auf die Ausbildung von apikalen Strukturen hat, wurden weitere hochauflösende mikroskopische Aufnahmen angefertigt. In Interferenzphasenkontrastbildern zeigte sich, dass der Bürstensaum normal entlang der Lumenoberfläche ausgebildet ist

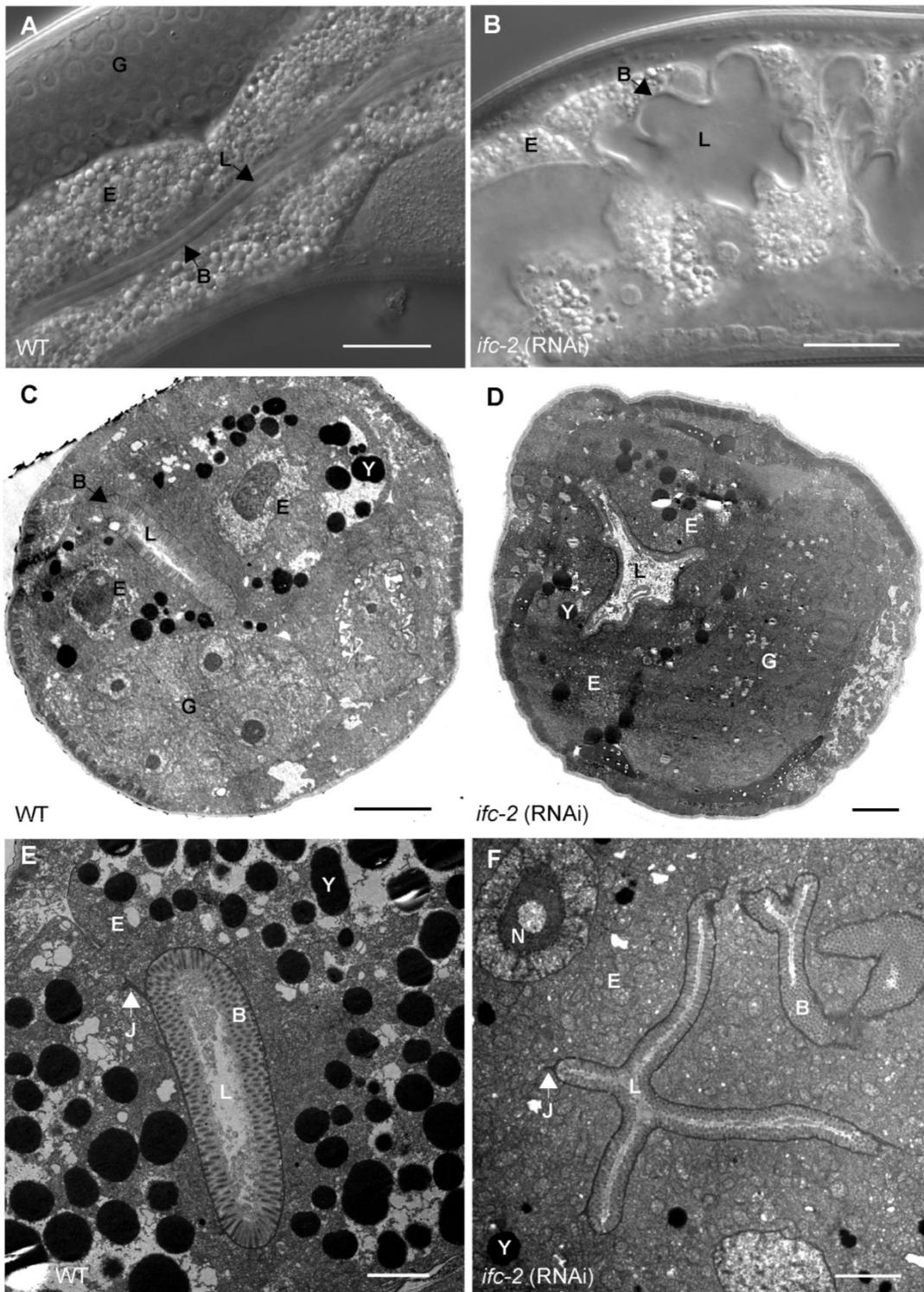


Abbildung 3-10 Vergleich von Wildtyp- (A,C,E) und *ifc-2* (RNAi)-behandelten Tieren (B,D,F) mit Hilfe von Interferenzkontrast- und Elektronenmikroskopie.

(A,B) Nomarski-Aufnahmen zeigen, dass der Bürstensaum (als B markiert) im Wildtyp und in *ifc-2* (RNAi)-behandelten Tieren gleichartig aussieht, wo hingegen das Darmlumen (L) der mutanten Tiere beachtlich geweitet erscheint und viele blasenähnliche Ausstülpungen aufweist, die sich in das Enterozytenzytoplasma erstrecken (E). (G) Gonade. Anterior links. (C-F) Elektronenmikroskopische Queransichten von Därfen adulter Tiere zur Darstellung der luminalen Veränderungen (L) in *ifc-2* (RNAi)-behandelten Tieren. Es sind keine ultrastrukturellen Abnormalitäten des mikrovillären Bürstensaums (B) und der apikalen Junctionen (J) zu erkennen. Die Anzahl der Dottergranula (Y) in *ifc-2* (RNAi)-Enterozyten (E) ist geringer als im Wildtyp. (G) Gonade, (N) Nukleus.

Größenbalken: 25 μ m (A,B), 5 μ m (C,D), 2 μ m (E,F).

Abbildungen A,B: Tobias Wiesenfahrt.

(Abbildung 3-10B). Elektronenmikroskopische Analysen von querschnittenen Tieren stellten wiederum die enorme Oberflächenvergrößerung und multiplen Ausstülpungen des intestinalen Lumens in *ifc-2* (RNAi)-Würmern (Abbildung 3-10D,F) im Vergleich zu nichtbehandelten Tieren (Abbildung 3-10C,E) dar. Ultrastrukturelle Detailbetrachtungen des Mikrovillus-Saums zeigten jedoch keine Veränderungen der Dichte der Mikrovilli (vergleiche Abbildung 3-10E und F). Auch die Länge einzelner Mikrovilli (N2: $603,4 \pm 15,61$ nm [n = 11]; N2 *ifc-2* (RNAi): $585,05 \pm 15,83$ nm [n = 11]) wies keinen signifikanten Unterschied auf ($p = 0,419$). Im Durchmesser (N2: $105,22 \pm 3,15$ nm [n = 11]; N2 *ifc-2* (RNAi): $107,45 \pm 1,84$ nm [n = 11]) waren diese ebenfalls nicht signifikant verändert ($p = 0,5478$).

Weitere ultrastrukturelle Detailaufnahmen zeigten, dass im Mikrovillizentrum korrekt angeordnete Aktinfilamente vorkommen, die basal mit der elektronendichten *endotube* in Kontakt stehen (Abbildung 3-11). Die *endotube* umfasst alle Invaginationen vollständig (z.B. Abbildung 3-10F) und ist in *ifc-2* (RNAi)-behandelten Tieren und im Wildtyp gleichermaßen dick ausgebildet (Abbildung 3-11). Es konnten keine weiteren ultrastrukturellen Veränderungen beobachtet werden, obgleich eine reduzierte Anzahl an Dottergranula in den Enterozyten von *ifc-2-knockdown*-Tieren im Vergleich zu unbehandelten Würmern auffiel.

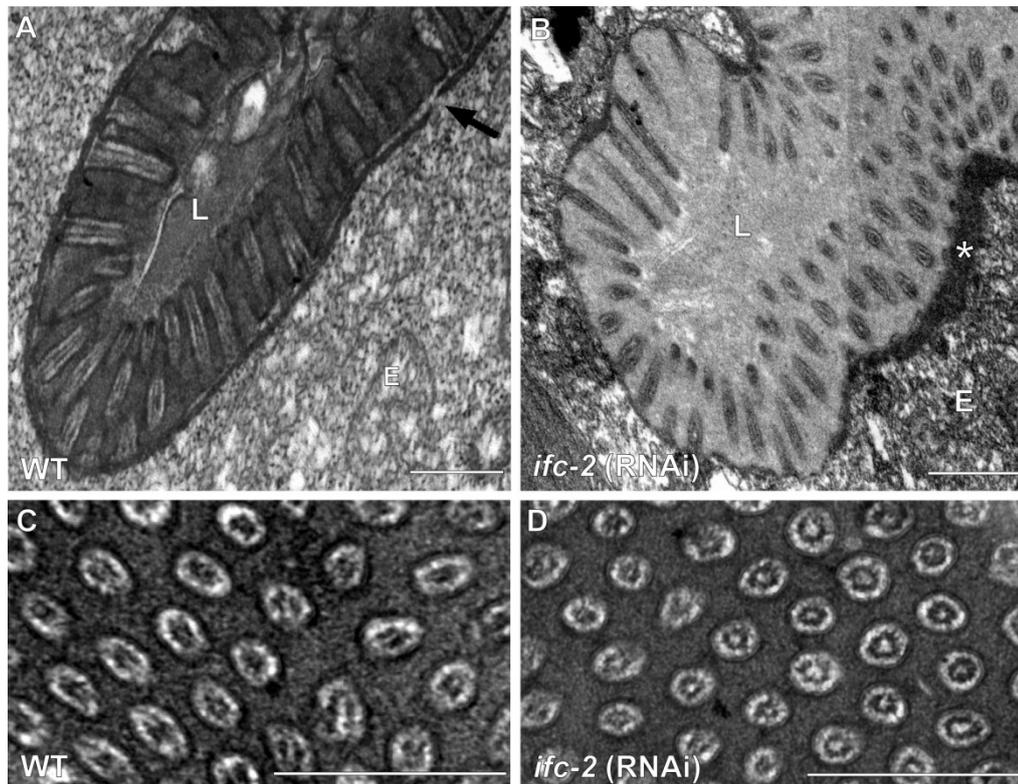


Abbildung 3-11 Ultrastrukturelle Details von Därmen adulter Wildtyp- (A,C) und *ifc-2* (RNAi)- (B,D) Würmer.

Die elektronendichte *endotube* (mit einem Stern markierte leicht schräge Aufsicht in B) weist gelegentlich Lücken auf (Pfeil in A) und die gleichförmigen Mikrovilli mit den charakteristisch gebündelten Aktinfilamenten (Längsschnitte in A,B; Querschnitte in C,D) sind in Abwesenheit von IFC-2 und im Wildtyp gleichartig ausgeprägt. (L) Lumen, (E) Enterozytenzytoplasma. Größenbalken: 500 nm.

3.3.2 Morphologische und funktionelle Untersuchungen der apikalen Junctionen in Abwesenheit von IFC-2

Angesichts der drastischen luminalen Oberflächenvergrößerung in *ifc-2* (RNAi)-behandelten Tieren stellt sich die Frage nach der korrekten Anordnung, Morphologie und Funktionalität der apikalen Junctionen des Darmepithels. Um dies zu untersuchen, wurde zunächst das Junction-spezifische Protein DLG-1 immunhistologisch nachgewiesen. Im Wildtyp umfasst der junctionale Komplex die Zellen vollständig in ihrer Peripherie (Abbildung 3-12A-A''). In Abwesenheit von IFC-2 bleibt diese Kontinuität erhalten, auch wenn die luminalen Defekte in den Präparaten der isolierten Därme stellenweise eine zackenförmige Verformung des junctionalen Gürtels bedingen (Abbildung 3-12C-C''). Elektronenmikroskopische Detailanalysen der junctionalen Morphologie weisen keine Unterschiede zwischen Wildtyp- und *ifc-2* (RNAi)-behandelten Tieren auf (Abbildung 3-12B,D).

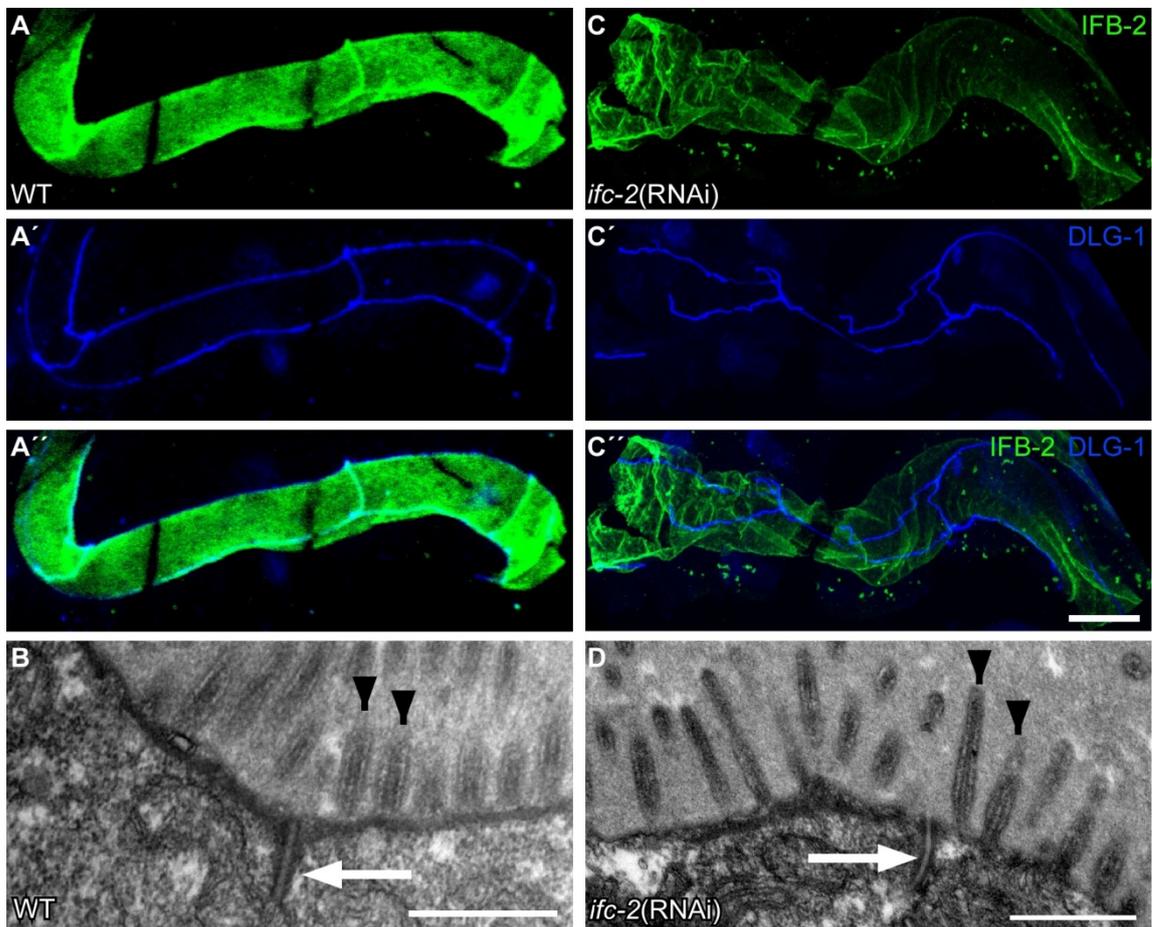


Abbildung 3-12 Immunfluoreszenzmikroskopischer und ultrastruktureller Vergleich intestinaler apikaler Junctionen von Wildtyp (A-B) und *ifc-2* (RNAi)-behandelten Würmern (C-D).

(A-A'',C-C'') Immunfluoreszenz-Aufnahmen von IFB-2 und DLG-1 in isolierten Därmen. Trotz der schwerwiegenden luminalen Veränderungen, die in Abwesenheit von IFC-2 auftreten, wird DLG-1 weiterhin in Zell-Zell-Grenzbereichen exprimiert (C''). Anterior links. (B,D) Elektronenmikroskopische Querschnitte von Därmen adulter Wildtyp-(B) und *ifc-2* (RNAi)-behandelter Tiere zeigen keine Unterschiede im ultrastrukturellen Aufbau der Mikrovilli (Pfeilspitzen) und der apikalen Junctionen (Pfeile). Größenbalken: 50 µm (C; gilt auch für A), 500 nm (B,D).

Abbildungen A,C: Tobias Wiesenfahrt.

Um die junctionale Integrität zu untersuchen, wurden Würmer mit TRITC-markiertem, Membran-impermeablem Dextran gefüttert. Im Wildtyp ist das ellipsoide Lumen angefärbt, ohne dass Dextran in die Zwischenzellräume gelangt oder in die Enterozyten aufgenommen wird, IFC-2 als Bestandteil der *endotube* umfasst das Lumen vollständig (Abbildung 3-13 A-A'', Film 3). In Tieren, die IFC-2-defizient sind, dringt der fluoreszierende Farbstoff in die blasenförmigen Strukturen ein, was beweist, dass diese mit dem Lumen in Verbindung stehen, auch wenn diese Verbindungen oft ein geringen Durchmesser aufweisen und sich die daraus entspringenden Ausstülpungen stark blasenförmig erweitern (Abbildung 3-13B', Film 4). Bemerkenswerterweise dringt kein Dextran in die Interzellularräume, was zeigte, dass die epitheliale Barrierefunktion erhalten bleibt (Abbildung 3-13 B-B'', Film 4).

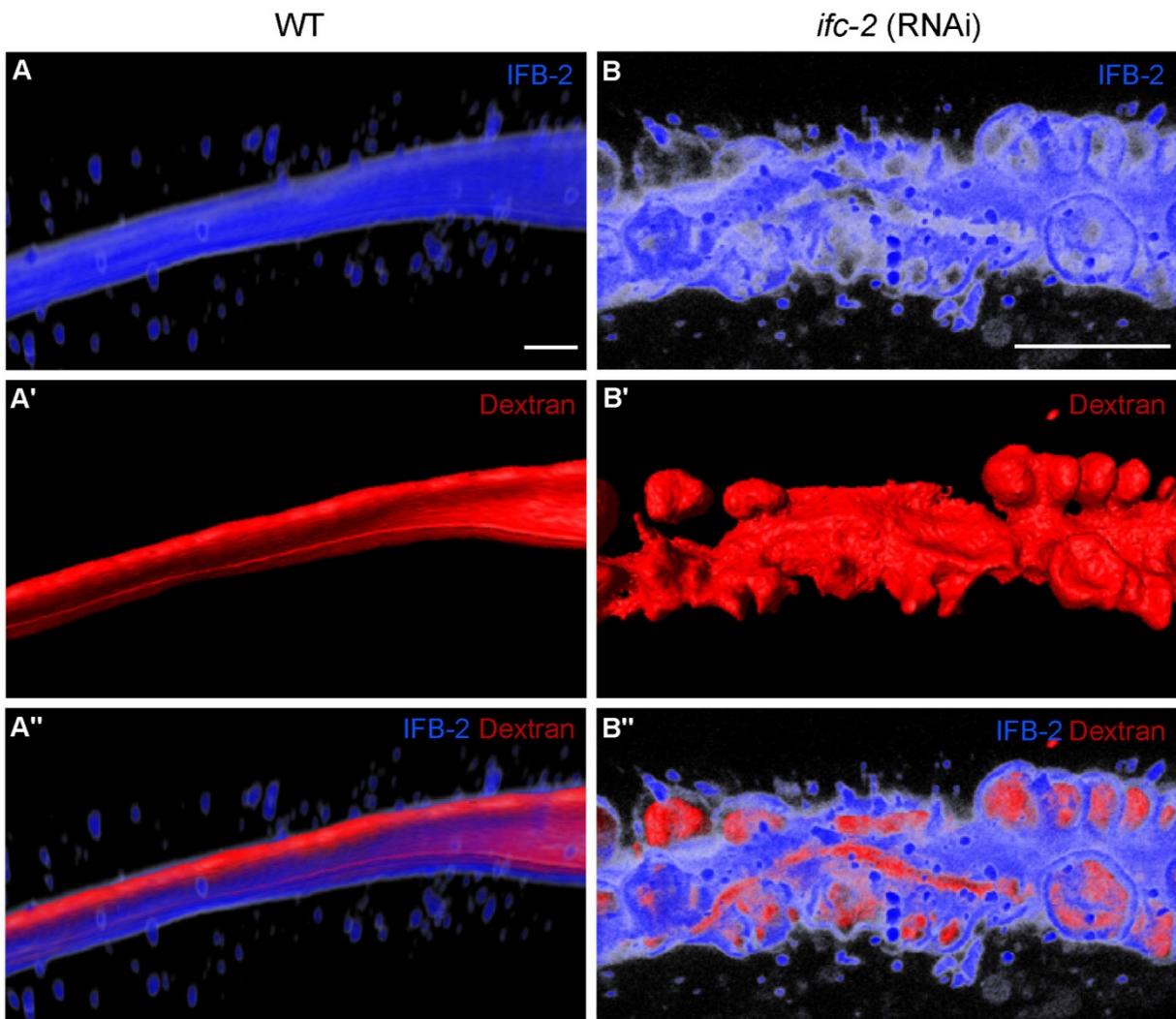


Abbildung 3-13 3D-Rekonstruktion konfokaler Aufnahmen von Wildtyp- und *ifc-2* (RNAi)-behandelten Tieren zur Darstellung der IFB-2::CFP-Verteilung (A,B) und der Lumenfärbung durch die Aufnahme von TRITC-Dextran (A',B'; überlagert in A'',B'').

Die Barriere-Funktion des Darmepithels ist in Abwesenheit von IFC-2 und den daraus resultierenden luminalen Deformationen intakt. Die entsprechenden Filme 3 und 4 zeigen, dass IFB-2 die Ausstülpungen vollständig umgrenzt, auch wenn IFB-2 lokal reduziert erscheint.

Anterior links. Größenbalken: 10 μ m (A,B).

3.3.3 Analyse der apikalen Domäne des Darmepithels IFC-2-defizienter Tiere

Vorausgegangene Studien, die die Fehlverteilung von apikalen Membranproteinen in Keratin-defizienten Darmzellen der Maus aufzeigten (Ameen et al., 2001; Toivola et al., 2004), gaben Anlass dazu, die Verteilung von intestinalen apikalen Membranmarkern in den mit *ifc-2* (RNAi)-behandelten Würmern zu untersuchen. Zunächst wurde die Verteilung des fluoreszierenden Oligopeptidtransporters OPT-1::GFP (Nehrke, 2003) betrachtet. In Wildtyp-

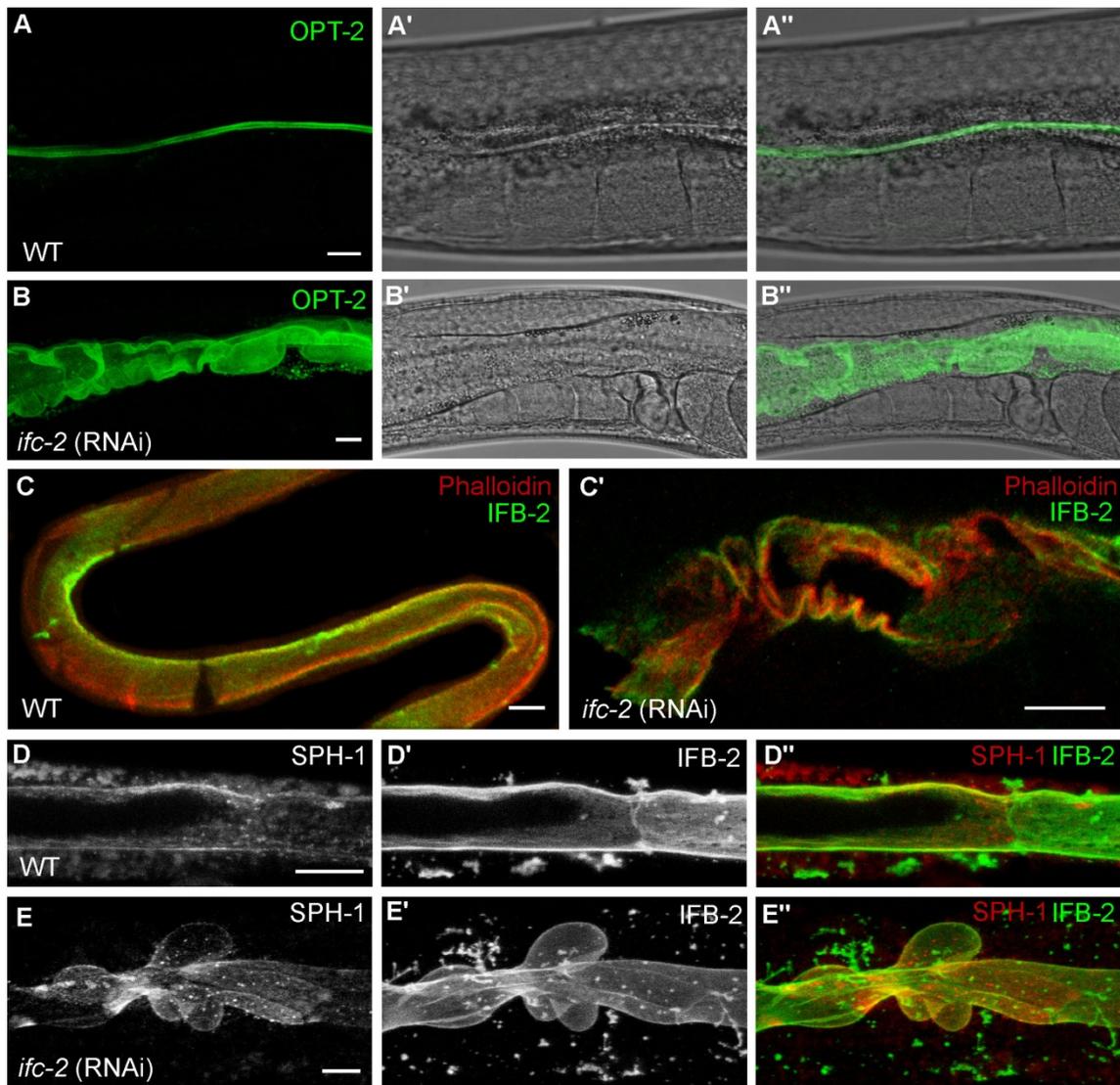


Abbildung 3-14 Fluoreszenzaufnahmen von intestinalen apikalen Zellmarkern in unbehandelten (A-A'',C,D-D'') und mit *ifc-2* (RNAi)-behandelten Tieren (B-B'',C',E-E'') zeigen keine Veränderungen der apikobasalen Polarität in Abwesenheit von IFC-2.

(A-B'') Aufnahme von OPT-2::GFP-exprimierenden Tieren. Die Verteilung des fluoreszierenden Oligopeptidtransporters ist in *ifc-2* (RNAi)-Tieren ebenfalls in der apikalen Enterozytenmembran vorzufinden. (C,C') Doppel-Fluoreszenz-Darstellung von AlexaFluor 546-konjugiertem Phalloidin (rot) und IFB-2::CFP (grün) in isolierten Dämen adulter Tiere. In Abwesenheit von IFC-2 verbleibt die Phalloidin-Verteilung in unmittelbarer Nähe und etwas weiter apikal von IFB-2::CFP (C'). (D-E'') Doppel-Fluoreszenz Aufnahme von BJ65. Das synaptische Vesikelprotein SPH-1::YFP (D,E und rot in D'',E'') ist, genau wie IFB-2::CFP (D',E'; grün in D'',E'') im adluminalen Bereich der Darmzellen angereichert. Diese Kolo-kalisation ist in *ifc-2* (RNAi)-Tieren unverändert (vergleiche D'' mit E'').

Anterior links. Größenbalken: 10 μ m.

Abbildung C: Tobias Wiesenfahrt.

Tieren lokalisiert OPT-1 exklusiv in der adluminalen Plasmamembran (Abbildung 3-14A-A''), und auch in IFC-2-defizienten Tieren bleibt OPT-1 mit der Plasmamembran assoziiert, die alle blasenförmige Ausstülpungen umgibt (Abbildung 3-14B-B''). Desweiteren wurde die Lokalisierung des Vesikelmembran-Proteins SPH-1 untersucht, welches ein weiterer Marker der intestinalen apikalen Domäne ist (Abraham et al., 2006). SPH-1::GFP ist im Wildtyp über der IFB-2::CFP-enthaltenden *endotube* angereichert (Abbildung 3-14D-D''). Eine gleichartige Anordnung findet man ebenfalls in Tieren, die multiple *ifc-2* (RNAi)-induzierte Aussackungen aufweisen (Abbildung 3-14E-E'').

Da die Fehlverteilung anderer Zytofilamente in Intermediärfilament-defizienten Systemen mehrfach beschrieben ist (Ameen et al., 2001; Oriolo et al., 2007b; Wald et al., 2003; Wald et al., 2005), wurden die *ifc-2* (RNAi)-Tiere mit AlexaFluor 546-konjugiertem Phalloidin behandelt und die Verteilung von Aktinfilamenten dokumentiert. Dabei fiel kein Unterschied zwischen Wildtyp- und IFC-2-*knockdown* Tieren auf (Abbildung 3-14C-C').

3.4 Isolierung von Mutanten mit veränderten IFB-2::CFP-Mustern

Würmer, die das hochcharakteristische und stabile IFB-2::CFP-Muster zeigen, wurden in optischen *Screens* eingesetzt, um neue Faktoren zu identifizieren, die Einfluss auf die IF-Netzwerkbildung haben. Zunächst wurde unter Verwendung der genomweiten RNAi-Bank ein Ansatz der reversen Genetik gewählt: In einem RNAi-Pilot-Screen wurden 132 Kinasen, 54 Phosphatasen, 13 Polaritätsfaktoren sowie 16 zytoskelettale und junktionale Strukturproteine, die von Genen der Chromosome I, III und V kodiert werden (Tabelle 7-2), systematisch herunterreguliert und die Auswirkung auf die IFB-2-Verteilung analysiert. In keinem Fall konnten deutlich sichtbare Veränderungen des IFB-2::CFP-Musters nachgewiesen werden. Neben der Möglichkeit, dass der Verlust keines dieser untersuchten Proteine Auswirkungen auf die IFB-2::CFP-Verteilung hat, sind auch andere Gründe, wie embryonale Letalität und/oder unvollständiger RNAi-Effizienz, denkbar. Daher wurde zur Identifizierung von IF-Organisatoren ein anderer Ansatz gewählt und ein klassischer Mutagenese-Screen mit EMS-Behandlung durchgeführt (siehe Abschnitt 2.11).

Insgesamt wurden knapp 6.500 haploide Genome untersucht, so dass statistisch gesehen jeder Locus etwa 6,5x mutagenisiert wurde (siehe Abschnitt 2.11). Die Selektion der Tiere erfolgte am Fluoreszenzbinokular. Es konnten insgesamt drei unabhängige Mutanten mit veränderten IFB-2-Mustern identifiziert und isoliert werden. Nach fünfmaligem Rückkreuzen mit N2-Männchen konnten stabile Populationen bei 15°C etabliert werden: die Stämme BJ132 (*kc1*), BJ133 (*kc2*) und BJ134 (*kc3*). Eine genaue phänotypische Analyse der modifizierten IFB-2-Muster erfolgte am konfokalen Laserscanmikroskop.

Die Detailbetrachtungen zeigten, dass das IFB-2-Muster in Tieren des Stammes BJ132 blasenförmige Ausstülpungen aufweist (Abbildung 3-15B, Abbildung 3-16A), die dem *ifc-2* (RNAi)-Phänotyp ähneln (vergleiche mit Abbildung 3-8). Die Aussackungen entspringen der *endotube* kreisförmig (Abbildung 3-16A) und erweitern sich ins Zytoplasma der Enterozyten. Ähnlich dem *ifc-2* (RNAi)-Phänotyp nimmt die Häufigkeit und Ausgeprägtheit der Blasen mit dem Alter der Tiere zu, wobei der Phänotyp ab dem Entwicklungsstadium L3 erstmalig auftritt (vergleiche mit Abbildung 3-8). Die Würmer des Stammes BJ132 weisen keine Temperatursensitivität auf und können bei bis zu 25°C in Kultur gehalten werden. Die Morphologie der Darmzellen erscheint verändert, im Enterozyten-Zytoplasma befinden sich weniger zytoplasmatische Granula als im Wildtyp.

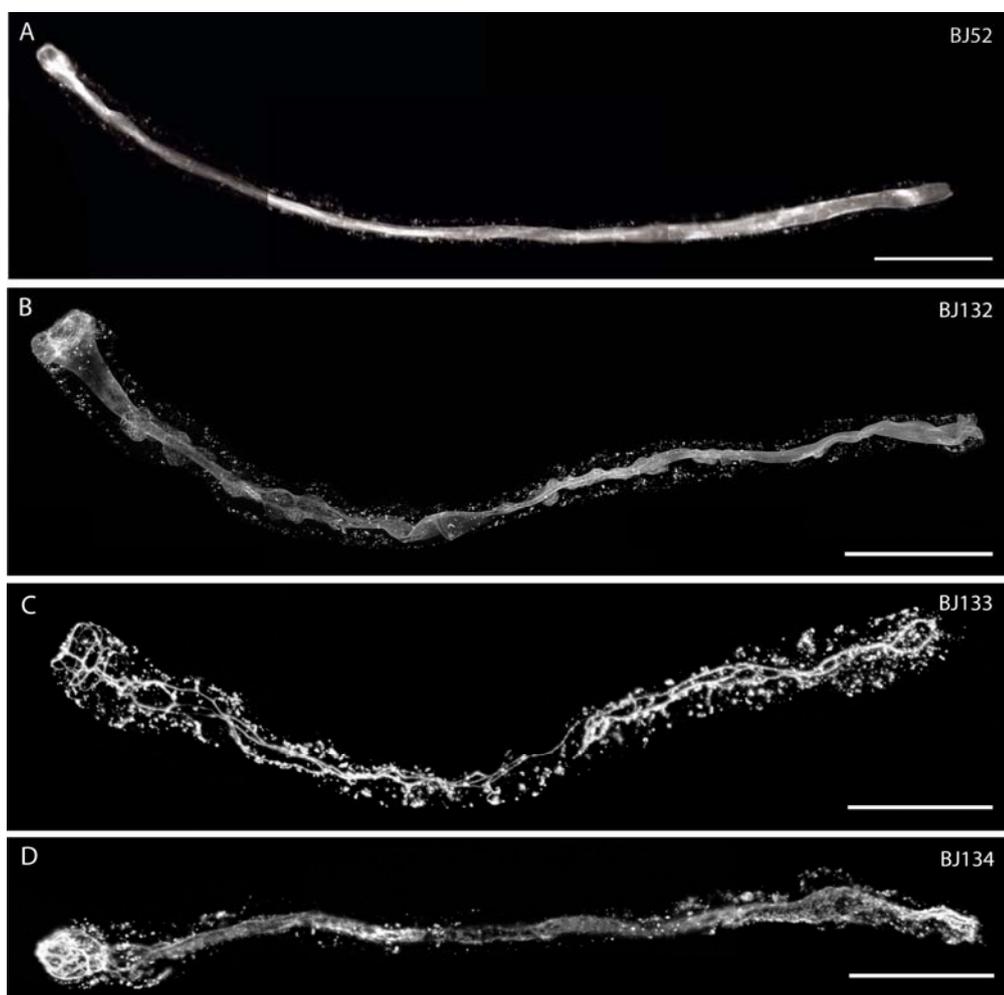


Abbildung 3-15 Dokumentation der veränderten intestinalen IFB-2::CFP-Muster der mutierten Stämme BJ132 (B), BJ133 (C) und BJ134 (D) im Vergleich zum Wildtyp-Stamm BJ52 (A).

(A-D) Fluoreszenzaufnahmen von intestinaler IFB-2::CFP-Expression in ganzen Tieren. In Würmern des mutierten Stammes BJ132 (B) weist das Darmlumen blasenförmige Ausstülpungen auf, die dem *ifc-2* (RNAi)-Phänotyp ähneln (vergleiche mit Abbildung 3-8 C', D'). Die Därme der isolierten Mutante BJ133 (C) zeigen ein stark verändertes IFB-2::CFP-Muster: Das dichte Netzwerk des Terminalgeflechts ist nicht mehr vorhanden, IFB-2::CFP wird vermehrt in zytoplasmatischen Aggregaten exprimiert und akkumuliert an Enterozyten-Zellgrenzen, so dass ein linienförmiges Muster entsteht. Die dritte Mutante BJ134 (D) weist eine Auflockerung und Auflösung des dichten IF-Netzwerkes auf, die teilweise ebenfalls bis zur linearen Anordnung der IFs entlang der Zellgrenzen führt. Anterior links. Größenbalken: 100 µm.

Tiere des Stammes BJ133 zeigen starke Veränderungen der IFB-2::CFP-Verteilung (Abbildung 3-15C, Abbildung 3-16B). Es liegt eine vollständige Auflösung des dichtmaschigen Intermediärfilament-Netzwerkes vor. Zudem kommt es zu einer Anreicherung von IFB-2::CFP entlang der apikalen Junctionen, die paarweise linienförmig von anterior nach posterior laufen und die an den Zellgrenzen benachbarter Enterozyten strickleiterartig miteinander verbunden sind. Da das erste Darmsegment (int1) aus vier Zellen besteht, sieht man im anterioren Darmende ein entsprechendes IFB-2-Muster, welches vier Zellen umfasst (Abbildung 3-16B). Desweiteren fällt die große Anzahl prominenter zytoplasmatischer IFB-2-Aggregate auf, deren Größe die der im Wildtyp vorkommenden punktförmigen IFB-2-Anreicherungen deutlich übersteigt (vergleiche Abbildung 3-15A mit Abbildung 3-15C). Der phänotypische Allgemeinzustand der Tiere ist im Vergleich zu BJ132 schlechter: Bei Haltungstemperaturen über 20°C werden kaum noch Nachkommen produziert und selbst bei 15°C - 20°C ist die Anzahl der Nachkommen im Vergleich zum Wildtyp deutlich reduziert, was bereits in einer geringen Anzahl an Embryonen im Hermaphroditen detektierbar ist. Manche Tiere sind steril und produzieren überhaupt keine Eier. Die Generationszeit ist im Vergleich zum Wildtyp verlängert. Der Darm ist in BJ133 Tieren oft Granula-arm und erscheint transparenter als in nichtmutanten Tieren. Die Würmer sind im Allgemeinen weniger beweglich und aktiv als der Wildtyp.

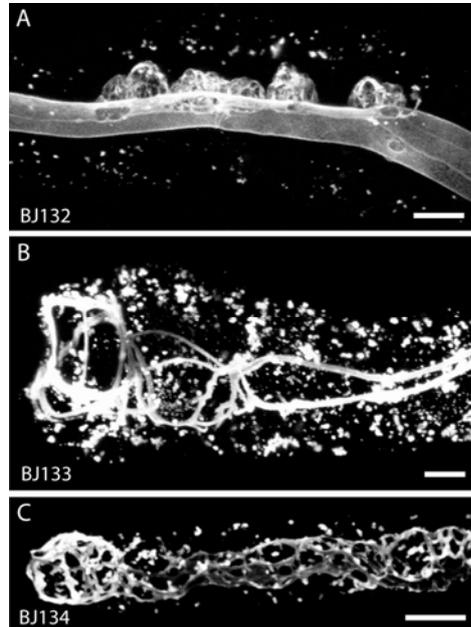


Abbildung 3-16 Detailaufnahmen der veränderten intestinalen IFB-2::CFP-Muster der mutierten Stämme BJ132 (A), BJ133 (B) und BJ134 (C).

(A) Vergrößerte Darstellung der intestinalen IFB-2::CFP-Verteilung eines adulten Hermaphroditen des Stammes BJ132, mit multiplen blasenförmigen Ausstülpungen des IF-Netzwerkes, die der *endotube* kreisförmig entspringen. (B) Fluoreszenzaufnahme des IFB-2::CFP-Musters im anterioren Darmende eines BJ133-Tieres zeigt die Konzentration der IFs an den Zellgrenzen und die in großer Anzahl vorkommenden Aggregate im Zytoplasma. (C) Der anteriore Darmabschnitt eines BJ134-Tieres weist eine Auflösung des feinmaschigen IFB-2::CFP-Netzwerkes auf. Anterior links. Größenbalken: 10 µm.

Tiere der dritten Mutante, des Stammes BJ134 zeigen ebenfalls eine deutliche Auflockerung und Auflösung des dichtmaschigen Intermediärfilament-Netzwerkes, auch in Form von großen Fenestrations (Abbildung 3-15D, Abbildung 3-16C). Auffällig sind desweiteren die, wie schon in BJ133-Tieren beschriebenen, zahlreichen großen Aggregate im Enterozyten-Zytoplasma. Auch die mutanten Würmer des Stammes BJ134 sehen allgemein recht krank aus und sind weniger aktiv. Sie vermehren sich kaum bei Haltungstemperaturen über 20°C. Die Nachkommenzahl ist im Vergleich zum Wildtyp reduziert und die Generationszeit verlängert. Manche Tiere produzieren keine Nachkommen. Der Darm erscheint zudem transparent und morphologisch verändert.

3.5 Identifizierung der mutierten Gene mit Hilfe genetischer SNP-Kartierung und RNAi

Um neue Intermediärfilament-Regulatoren zu identifizieren, war es nach der Isolierung der Mutanten mit veränderten IF-Mustern essentiell zu wissen, welche Gene für die Phänotypen verantwortlich sind. Durch einen Ansatz der SNP-Kartierung, in dem *Single Nucleotide Polymorphisms* (SNPs) als genetische Marker zum Einsatz kommen (siehe Abschnitt 2.12), konnten genetische Intervalle identifiziert werden, welche die Mutationen beinhalten. Durch anschließende, am Wildtyp applizierte, systematische RNAi-Experimente der Einzelgene der Intervalle konnten letztendlich die Gene identifiziert werden, die den jeweiligen mutanten Phänotyp auslösen.

3.5.1 Chromosomale Lokalisierung der Mutationen

Der erste Schritt ist die chromosomale Lokalisierung der Mutation, durch die bereits eine grobe subchromosomale Kopplung erkennbar wird. Das Prinzip wurde bereits zur Lokalisierung der IFB-2::CFP-Integrationen in Abschnitt 3.1.2.1 erläutert. Durch den genotypischen Vergleich von je acht, gleichmäßig auf den Chromosomen verteilten SNPs von mutanten und nichtmutanten DNA-Pools von F2-Tieren aus der Verpaarung mit dem Hawaii-Stamm kann die chromosomale Zuordnung erfolgen: Das Mutations-tragende Chromosom weist mit geringerer Häufigkeit Hawaii-DNA auf und mit größerer Häufigkeit N2-DNA-Banden, denn die Mutation wurde im N2-Hintergrund generiert.

3.5.1.1 Chromosomale Lokalisierung der Mutation des Stammes BJ132

Die gepoolten DNAs von jeweils 30 mutanten und 30 nichtmutanten Tieren der F2 aus der Verpaarung des im N2-Hintergrund generierten Stammes BJ132 mit Hawaii-Männchen wurden für die 48 SNPs (Davis et al., 2005) genotypisiert. In Abbildung 3-17 sind die Gelbilder der Genotypisierungen aller 48 SNPs zur chromosomalen Lokalisierung der Mutation von BJ132 dargestellt. Um einen direkten Vergleich des Fragmentmusters eines

SNPs zwischen mutanten und nichtmutanten Tieren zu ermöglichen, wurden die Proben jeweils in benachbarten Spuren aufgetragen.

Betrachtet man die Gelbilder, fällt auf, dass benachbarte Spuren der SNPs der Chromosome I, II, III, IV und V ein gleichartiges Bandenmuster mit gleichmäßiger Bandenstärke aufweisen (Abbildung 3-17). Dies bedeutet, dass die Mutation nicht auf einem dieser Chromosome liegt, da eine gleichmäßige Verteilung von Hawaii- und N2-DNA vorliegt. Eine Kopplung der Mutation des Stammes BJ132 liegt auf dem X-Chromosom vor, da hier einige SNPs eine deutliche Differenz in der Amplifikationsstärke gleicher Fragmente zwischen DNAs mutanter und nichtmutanter Tiere aufweisen (Abbildung 3-17, Abbildung 3-18).

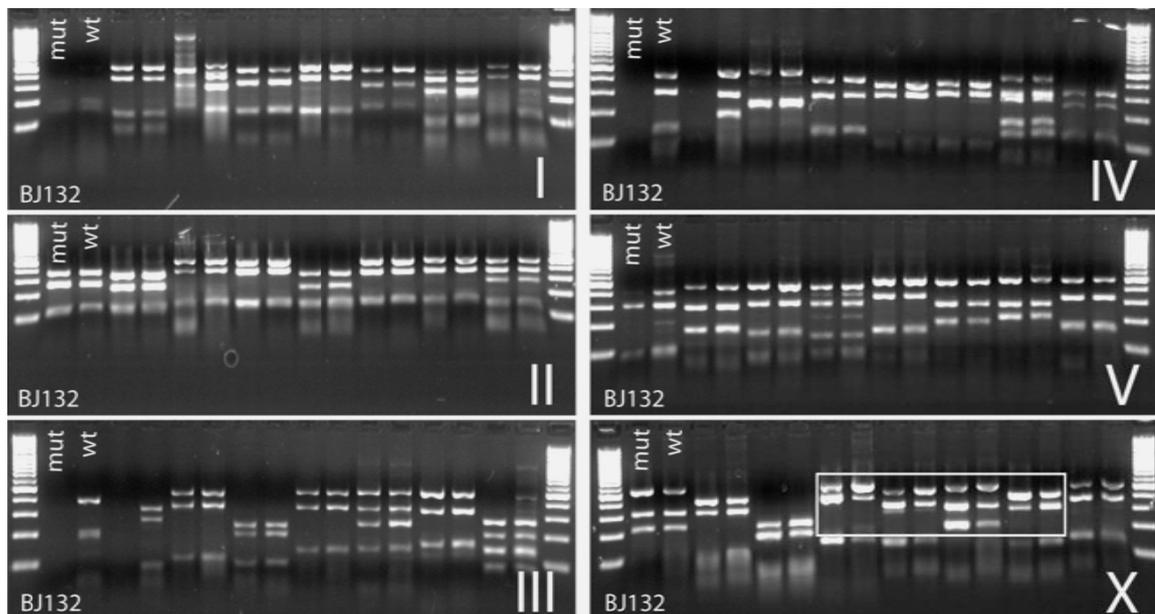


Abbildung 3-17 Gelbilder der Genotypisierung aller 48 SNPs zur chromosomalen Lokalisierung der Mutation von BJ132.

Jedes Gelbild zeigt die Genotypisierung von jeweils acht SNPs eines Chromosoms (I-X). Dabei sind die Amplifikate der DNAs von mutanten (mut) und nichtmutanten (wt) Tieren für jeweils jeden SNP nebeneinander aufgetragen. Die Mutation liegt nicht auf den Chromosomen I, II, III, IV oder V, da kein Unterschied in den Hawaii- und N2-Bandenstärken zwischen mutanten und nichtmutanten Tieren auffällt. Eine Kopplung der Mutation liegt für Chromosom X vor, da die Amplifikationsstärken von einigen N2- und Hawaii-SNPs zwischen mutanten und nichtmutanten DNAs einen deutlichen Unterschied aufweist (siehe umrandete Spuren).

Um eine erste subchromosomale Lokalisierung der Mutation von BJ132 vornehmen zu können, fand eine genauere Betrachtung der SNPs des X-Chromosoms statt (Abbildung 3-18). Die größten Differenzen in der Ausprägung von N2- und Hawaii-DNA zwischen mutanten und nichtmutanten Tieren fand man bei den SNPs an den Positionen 2 cM, 8 cM und 11 cM des X-Chromosoms, was auf eine enge Kopplung in diesem Bereich hinweist (siehe * in Abbildung 3-18).

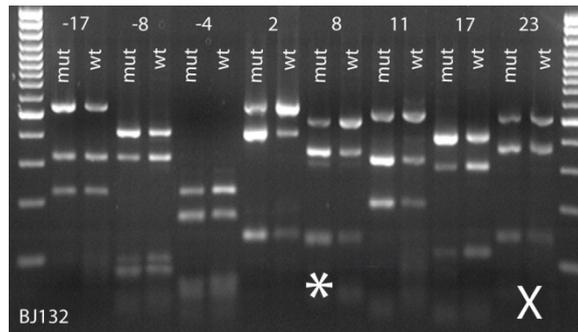


Abbildung 3-18 Gelbild zur groben subchromosomalen Lokalisation der Mutation von BJ132.

Detailanalyse der Genotypisierung der acht SNPs des X-Chromosoms im chromosomalen Kartierungsexperiment der Mutante BJ132. Die genetischen Positionen der SNPs sind in cM über den entsprechenden Spuren verzeichnet. Nebeneinander aufgetragen sind die verdauten PCR-Produkte von mutanten (mut) und nichtmutanten (wt) Tieren. Der Stern markiert den vermuteten Ort der Mutation, da die SNPs in diesem Bereich die größten Unterschiede in den Bandendicken zwischen mutanten und nichtmutanten DNAs aufweisen.

3.5.1.2 Chromosomale Lokalisierung der Mutation des Stammes BJ133

Für die Mutante BJ133 konnte auf die oben beschriebene Weise eine Kopplung der Mutation auf Chromosom IV nachgewiesen werden (Abbildung 3-19). Die größten Differenzen in den Amplifikationsstärken von mutanten und nichtmutanten DNA-Fragmenten liegen bei den Positionen -5 cM, 1 cM und 8 cM.

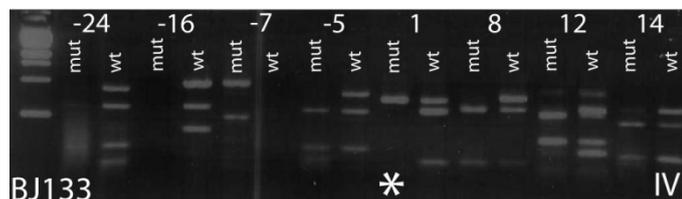


Abbildung 3-19 Gelbild zur chromosomalen Lokalisation der Mutation von BJ133.

Analyse der Genotypisierung der SNPs des vierten Chromosoms der chromosomalen Kartierung der Mutante BJ133. Die genetischen Positionen der SNPs sind in cM angegeben. Die verdauten PCR-Produkte von mutanten (mut) und nichtmutanten (wt) Tieren für den jeweiligen SNP sind nebeneinander aufgetragen. Der Stern markiert den Ort der engsten Kopplung der Mutation, da die SNPs in diesem Bereich die größten Unterschiede in den Bandendicken zwischen mutanter und nichtmutanter DNA aufweisen.

3.5.1.3 Chromosomale Lokalisierung der Mutation des Stammes BJ134

Analog den bereits beschriebenen chromosomalen Kartierungsexperimenten wurde die chromosomale Lokalisierung der Mutation für den Stamm BJ134 bestimmt. Es konnte eine eindeutige Zuordnung der Mutation auf das vierte Chromosom gezeigt werden (Abbildung 3-20). Bemerkenswerterweise lagen die größten Unterschiede in den Amplifikationsstärken zwischen mutanten und nichtmutanten DNA-Fragmenten, genau wie für die Mutante BJ133 bei den SNPs, die an den Positionen -5 cM, 1 cM und bei 8 cM liegen, vor. Dies und die Tatsache, dass sich die phänotypischen Veränderungen des IFB-2::CFP-Musters ähneln, lässt vermuten, dass es sich bei den Mutanten um allelische Variationen eines Gens handelt.

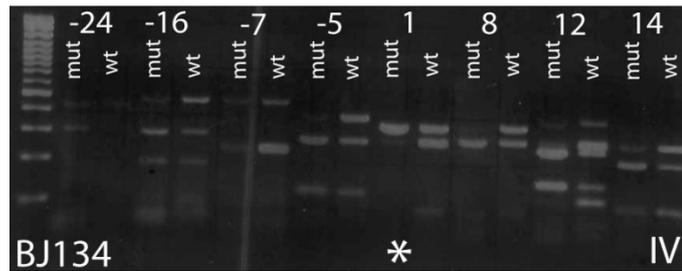


Abbildung 3-20 Gelbild zur chromosomalen Lokalisierung der Mutation von BJ134.

Analyse des chromosomalen Kartierungsexperiments auf Chromosom IV. Es liegt eine enge Kopplung im Bereich -5 cM, 1 cM und 8 cM vor, was anhand der deutlichen Unterschiede der Bandendicken zwischen mutanten und nichtmutanten DNAs von genotypisierten SNPs an diesen Stellen aufgezeigt wird.

3.5.2 Komplementierungstest der Mutationen der Stämme BJ133 und BJ134

Da die Daten der chromosomalen Kartierungen für BJ133 (*kc2*) und BJ134 (*kc3*) eine erstaunlich gleichartige Lokalisierung auf Chromosom IV ergaben und sich die phänotypischen Veränderungen beider Stämme ähneln, wurde ein Komplementierungstest durchgeführt, um zu prüfen, ob es sich bei den unabhängigen Mutanten um zwei allelische Variationen eines Gens handelt. Prinzipiell wird dabei untersucht, ob aus der Verpaarung der beiden Mutanten F1-Tiere hervorgehen, die den mutanten Phänotyp aufweisen. Ist dies der Fall, können sich die beiden genetischen Veränderungen nicht komplementieren und es handelt sich um zwei mutante Allele des gleichen Gens.

Zunächst wurden mutante Tiere benötigt, die das Allel *kc2* homozygot tragen und die IFB-2::CFP (*kcls6*) nicht exprimieren. Dies ist essentiell, um aus der Verpaarung mit BJ134-Tieren die Nachkommen, die tatsächlich aus der Fremdbefruchtung hervorgegangen sind am Vorhandensein der Fluoreszenz identifizieren zu können. Dazu wurden BJ133 mit N2-Männchen verpaart und heterozygote F1-Hermaphroditen isoliert (Abbildung 3-21). Aus deren Nachkommen wurden mutante Tiere vereinzelt, die potentiell heterozygot für IFB-2::CFP sind. Wiederum deren Nachkommen, die die blaue Fluoreszenz nicht mehr vorweisen, wurden im nächsten Schritt verwendet, um den Stamm BJ142 zu etablieren (Abbildung 3-21). Parallel dazu wurden BJ134-Tiere mit N2-Männchen verpaart und die daraus resultierenden Männchen der F1, die heterozygot für *kc3* und *kcls6* sind, mit einem BJ142-Hermaphrodit gekreuzt. Die Nachkommen dieser Tiere wurden auf das Vorkommen des mutanten Phänotyps untersucht. Dabei wurde festgestellt, dass 50% der fluoreszierenden Nachkommen den Phänotyp aufweisen. Somit konnte bewiesen werden, dass es sich bei den beiden Stämmen BJ133 und BJ134 um allelische Varianten eines Gens handelt, da die beiden Mutationen sich nicht komplementieren.

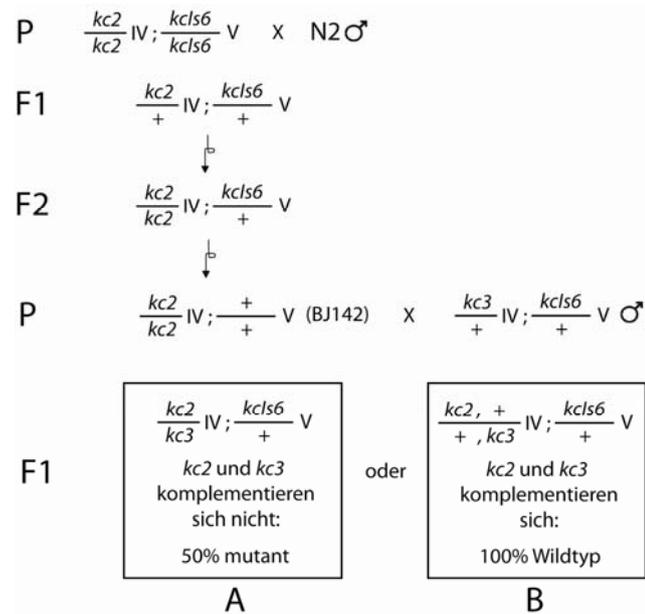


Abbildung 3-21 Schematische Darstellung der Kreuzungen des Komplementierungstests von BJ133 (*kc2*) und BJ134 (*kc3*).

Für den Komplementierungstest der beiden mutanten Stämme BJ133 (*kc2*) und BJ134 (*kc3*) wurden zunächst Tiere benötigt, die homozygot für *kc2* sind, den Fluoreszenzmarker IFB-2::CFP (*kcls6*) jedoch nicht mehr tragen: Aus der Verpaarung von BJ133 mit N2-Männchen ging die uniforme F1-Generation hervor, die heterozygot für beide Merkmale ist. Durch Selbstbefruchtung (Pfeil mit Schleife) entstand die F2, von denen Tiere vereinzelt wurden, die den mutanten Phänotyp tragen und schwach blau fluoreszieren, also heterozygot für *kcls6* sind. Deren Nachkommen, die *kcls6* nicht mehr tragen (Stamm BJ142), wurden mit Männchen verpaart, die aus einer Verpaarung von BJ134 mit N2-Männchen hervorgegangen und heterozygot für beide Merkmale sind. Man fand, wie in A dargestellt, dass 50% der fluoreszierenden Nachkommen den mutanten Phänotyp tragen, demzufolge können sich beide Allele nicht komplementieren. Würde es sich um zwei Mutationen in unterschiedlichen Genen handeln, wären keine mutanten Tiere aus dieser Verpaarung hervorgegangen (dargestellt in B).

3.5.3 Subchromosomale Intervall-Kartierung der Mutationsloci

Im nächsten Schritt, der subchromosomalen Feinkartierung, wurden im Gegensatz zum chromosomalen Kartieren keine DNA-Pools eingesetzt, sondern es wurden rekombinante mutante Linien untersucht, die von Einzeltieren der F2 abstammen. Die Identifizierung von Rekombinanten erfolgte über die Genotypisierung von den drei, in der chromosomalen Kartierung am engsten gekoppelt erscheinenden SNPs (siehe Abschnitte 3.5.1.1 - 3.5.1.3). So wurden Individuen identifiziert, die in der Nachbarschaft der Mutation Hawaii-DNA aufweisen. Tiere, die für zwei benachbarte SNPs rekombinant sind, gaben eine Information über den Ort der Mutation, da eine erste Eingrenzung des Intervalls, in dem sich die im N2-Hintergrund generierte Mutation befindet, erreicht werden konnte. Dem folgte die weitere Charakterisierung der rekombinanten Linien, die die Mutation eingrenzen, indem weitere SNPs innerhalb des Intervalls untersucht wurden. So erfolgte eine sukzessive weitere Verkleinerung des genomischen Bereichs, in dem sich die Mutation befindet. Je näher man der genetischen Veränderung kam, desto seltener ist ein Rekombinationsereignis. Meist ist daher das Fehlen von rekombinanten Linien oder aber von geeigneten SNPs der Grund dafür, dass man sich der Mutation mit dieser Methode nicht weiter annähern kann. Befanden

sich eine überschaubare Anzahl von bis zu 200 Genen in einem Intervall, wurden RNAi-Experimente der Einzelgene durchgeführt und die Nachkommen der behandelten Tiere auf die Präsenz des Phänotyps der Mutante untersucht.

3.5.3.1 Subchromosomale Lokalisierung der Mutation von BJ132

Zunächst sollten mutante F2-Linien identifiziert werden, die in der Nachbarschaft der Mutation rekombinant waren. Dies erfolgte durch den Nachweis von Hawaii-DNA an einem oder mehreren der drei am engsten gekoppelten SNPs an den Positionen 2 cM, 8 cM oder 11 cM. In Abbildung 3-22 ist beispielhaft die Genotypisierung von 48 mutanten F2-Linien für diese drei SNPs dargestellt. Die mit einem Stern gekennzeichneten Spuren markieren die rekombinanten Proben, in denen Hawaii-DNA homozygot oder heterozygot nachgewiesen werden konnte. Als Kontrolle wurde Hawaii-DNA (H), N2-DNA (N) und ein Mix aus beiden DNAs (M) aufgetragen.

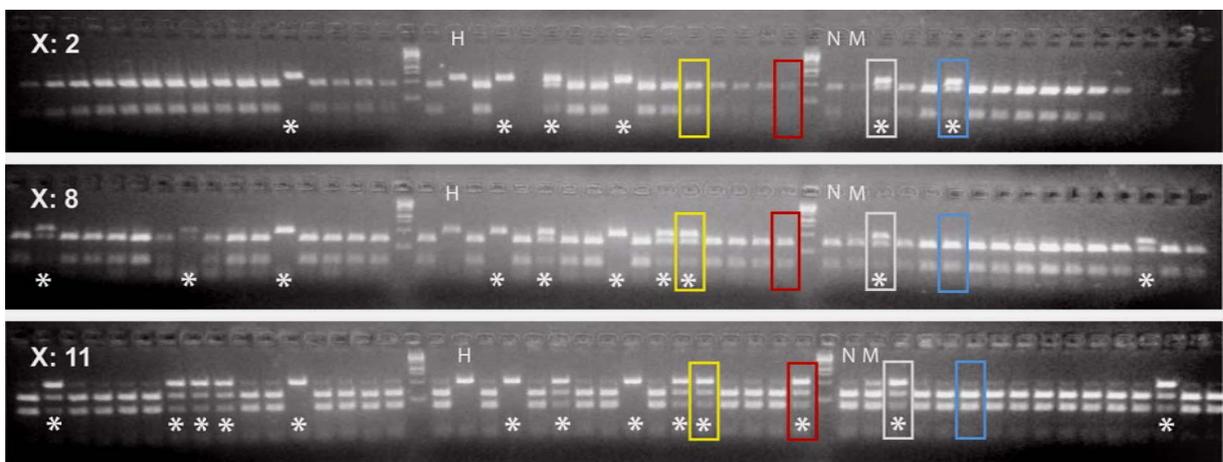


Abbildung 3-22 Darstellung von DNA-Gelen zur Identifizierung von Rekombinanten des Stammes BJ132.

Genotypisierung von 48 DNAs mutanter F2-Tiere aus der Verpaarung von BJ132 mit Hawaii an den SNPs der Positionen X: 2 cM, X: 8 cM und X: 11 cM. Die Identifizierung von rekombinanten Linien (mit * markiert) erfolgte über den Nachweis von Hawaii-DNA. Die weiß markierte Probe ist ein Beispiel für einen «Mispick», also eine fälschlicherweise als mutant geglaubte Wurmlinie, die für alle drei SNPs Hawaii-DNA aufzeigt. Die blau markierte Probe ist ein Beispiel für eine, für den SNP X: 2 cM rekombinante Linie. Die rot umrandete Probe ist für den SNP X: 11 cM rekombinant, während die gelb markierte Probe Hawaii-DNA an den Positionen X: 8 cM und X: 11 cM aufweist. Somit wird der Bereich, in dem die Mutation liegt, auf das genetische Intervall zwischen X: 2 cM und X: 8 cM begrenzt.
Kontrollen: (H) Hawaii-DNA, (N) N2-DNA, (M) Hawaii/N2 Mix-DNA.

Beim Vergleich von identischen Proben, die in den Gelen der drei genetischen Positionen untereinanderstehen, erhält man eine erste Information über die Begrenzung des Intervalls: Betrachtet man beispielsweise die blau markierten Proben in Abbildung 3-22 wird deutlich, dass diese DNA für den SNP an Position X: 2 cM rekombinant ist, jedoch nicht für die SNPs an Stelle X: 8 cM oder X: 11 cM. Die Mutation muss also an einer Position liegen, die größer als 2 cM ist. Im Gegensatz dazu sind rekombinante Linien zu finden, die für die Positionen X: 11 cM rekombinant sind, jedoch nicht für die beiden anderen untersuchten SNPs (rot

markierte Spuren in Abbildung 3-22), was bedeutet, dass die Mutation an einer chromosomalen Position, die kleiner als X: 11 cM ist, liegen muss. Eine aussagekräftige Information erhält man von den DNA-Proben, die, wie in Abbildung 3-22, gelb markiert sind: Diese DNA weist für den SNP an Position X: 2 cM N2-DNA auf, die SNPs an den Positionen X: 8 cM und X: 11 cM sind jedoch rekombinant. Dies bedeutet, dass die Mutation auf einer genetischen Position, die kleiner als X: 8 cM ist, liegen muss. Zusammengefasst konnte somit eine erste Einschränkung des Mutation-tragenden Intervalle erfolgen, da der mutante Locus zwischen den genetischen Positionen X: 2 cM und X: 8 cM liegen muss.

Als Konsequenz dieser ersten Begrenzung des Intervalls konnte zur Identifizierung von weiteren Rekombinanten die Genotypisierungen von lediglich zwei SNPs, nämlich denen an Positionen X: 2 cM und X: 8 cM vorgenommen werden. So konnten weitere rekombinante Linien identifiziert werden, die entweder an Position X: 2 cM (blau umrandet in Abbildung 3-23) oder an X: 8 cM (gelb umrandet in Abbildung 3-23) Hawaii-DNA aufwiesen. Das häufigere Vorkommen von Rekombinanten für Position X: 2 cM im Vergleich zu X: 8 cM deutet auf eine engere Kopplung der Mutation an die Position X: 8 cM hin.

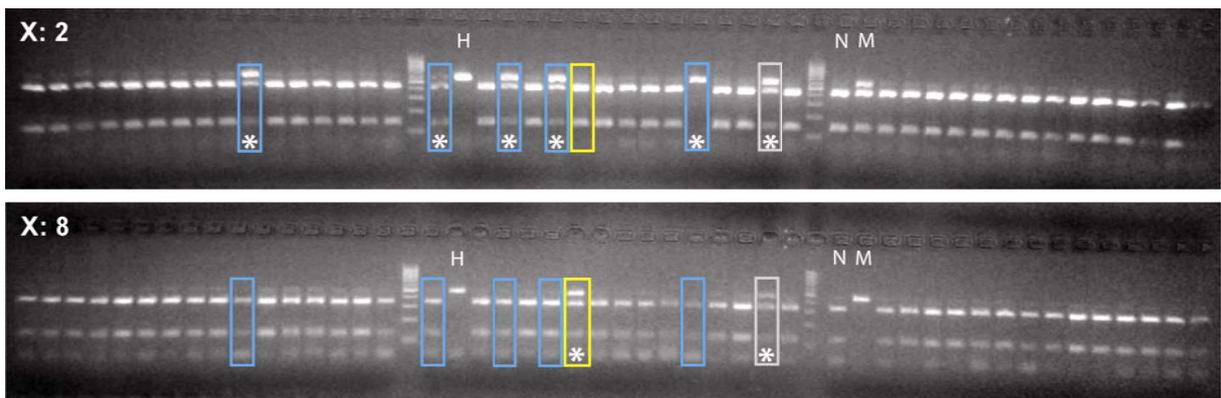


Abbildung 3-23 Darstellung von DNA-Gelen zur Identifizierung von Rekombinanten des Stammes BJ132 nach erster Einschränkung des Intervalls.

Zur Identifizierung von neuen Rekombinanten wurden weitere DNAs mutanter F2-Tiere (hier sind beispielhaft 48 dargestellt) aus der Verpaarung von BJ132 mit Hawaii an den SNPs der Positionen X: 2 cM, X: 8 cM genotypisiert. Rekombinante sind mit * gekennzeichnet. Die fälschlicherweise untersuchte nichtmutante Linie ist weiß markiert. Für X:2 cM-rekombinante DNAs sind blau markiert und in gelb ist die Probe umrandet, die für den SNP an Position X: 8 cM rekombinant ist. Kontrollen: (H) Hawaii-DNA, (N) N2-DNA, (M) Hawaii/N2 Mix-DNA.

Insgesamt wurden auf diese Weise 300 mutante F2-Linien aus der Verpaarung von BJ132 mit Hawaii genotypisiert, von denen 51 als rekombinant für die untersuchten SNPs identifiziert werden konnten. Im nächsten Schritt ging es darum, diese 51 DNAs weiter zu charakterisieren, um mehr Information über die Lokalisierung der Mutation im Intervall zu erhalten. Dazu wurden sie für SNPs genotypisiert, die sich im eingegrenzten Bereich befinden. Diese SNPs wurden aus einer SNP-Datenbank des Jorgensen-Labors ausgewählt, die *Primer* zur Amplifikation des entsprechenden Bereichs entworfen und die PCR-Produkte

mit dem jeweiligen Enzym verdaut. So wurden im abgesteckten Intervall vier weitere SNPs an den genomischen Positionen X: 3,21 cM, X: 4,35 cM, X: 6,6 cM, X: 6,97 cM auf die Präsenz von rekombinanter Hawaii-DNA untersucht (Abbildung 3-24). Sukzessive konnte so das Intervall, in dem die Mutation liegt, eingeschränkt werden: Betrachtet man beispielhaft die blau gekennzeichnete rekombinante Probe 6:4G der Abbildung 3-24, so ist diese für X: 3,21 cM, X: 4,35 cM und X: 6,6 cM rekombinant, die Mutation muss also an einer genetischen Position, die größer als X: 6,6 cM ist liegen. Aus der entgegengesetzten Richtung zeigt die Genotypisierung des SNPs X: 6,97 cM, dass es eine rekombinante Linie an dieser Stelle gibt (gelb markiert in Abbildung 3-24), wodurch der Ort der Mutation kleiner als X: 6,97 cM positioniert wird.

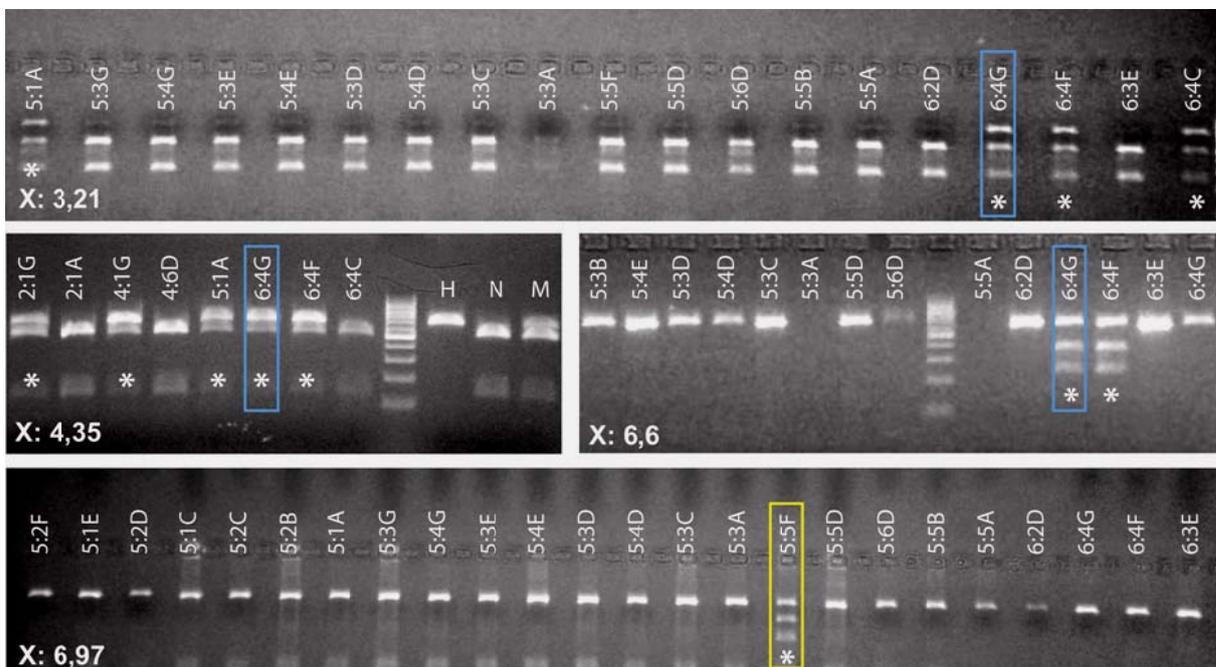


Abbildung 3-24 Darstellung von DNA-Gelen zur weiteren Charakterisierung rekombinanter Linien von BJ132 im Intervall X: 2 cM – X: 8 cM.

Nach der Identifizierung der Rekombinanten (z.B. «5:1A») für das Intervall X: 2 cM – X: 8 cM erfolgte die weitere Einschränkung des Bereichs, in dem die Mutation liegt, durch die Genotypisierung von ausgewählten SNPs (X: 3,21 cM, X: 4,35 cM, X: 6,6 cM, X: 6,97 cM) im Intervall. Rekombinante sind mit * gekennzeichnet. Blau markiert ist die DNA der Linie 6:4G, die Hawaii-DNA an den SNPs der Positionen X: 3,21 cM, X: 4,35 cM und X: 6,6 cM aufweist. Gelb markiert ist die rekombinante DNA von 5:5F an Position X: 6,97 cM. Dadurch erfolgt die Begrenzung des Mutation-tragenden Intervalls auf den Bereich zwischen Position X: 6,6 cM und X: 6,97 cM.

Die Daten der Genotypisierung der SNPs von 51 Rekombinanten im Intervall X: 2 cM - X: 11 cM wurde tabellarisch und farblich kodiert zusammengefasst (Tabelle 3-2). Insgesamt konnten drei Linien identifiziert werden, die bis einschließlich des SNPs X: 6,6 cM rekombinant waren (2:1G, 6:4G, 6:4F). Weiterhin konnte in einem Fall Hawaii-DNA bis inklusive des SNPs X: 6,97 cM nachgewiesen werden (5:5F). Der Ort der Mutation konnte

Ergebnisse

somit durch sukzessive Intervall-Kartierung auf den Bereich zwischen diesen beiden SNPs begrenzt werden.

Tabelle 3-2 Tabellarische Zusammenfassung der Ergebnisse der subchromosomalen Intervall-Kartierung auf dem X-Chromosoms für BJ132

Jede Zeile stellt eine untersuchte rekombinante *C. elegans* Linie dar (z.B. 1:2F), die für verschiedene, jeweils in den Spalten stehenden SNPs untersucht wurde (z.B. F11A2 an der genetischen Position X:2 cM). Die PCR-Ergebnisse für die jeweiligen SNPs sind farblich codiert (siehe Farblegende). Dabei sind «nicht PCR-gestützte» Ergebnisse eines SNPs logische Konsequenzen, die sich durch die PCR-Analysen von benachbarten SNPs ergaben.

Rek.Linie #	Untersuchte SNPs auf Chromosom X [cM]						
	F11A2 (~2)	ZK445 (3,21)	C35C5 (4,35)	C40H5 (6,6)	C23H4 (6,97)	F22E11 (~8)	F46G10 (~11)
1:2F	Yellow	Green	Green	Green	Green	Green	Green
1:1E	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
1:6A	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Yellow
2:1H	Yellow	Green	Green	Green	Green	Green	Green
2:1G	Yellow	Green	Green	Green	Green	Green	Green
2:1F	Yellow	Green	Green	Green	Green	Green	Green
2:2F	Yellow	Green	Green	Green	Green	Green	Green
2:1A	Yellow	Green	Green	Green	Green	Green	Green
2:3E	Yellow	Green	Green	Green	Green	Green	Green
2:5B	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Yellow
3:2H	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Yellow
3:1E	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Yellow
3:2E	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Yellow
3:1D	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Yellow
3:3C	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Yellow
3:4C	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Yellow
3:4A	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Yellow
3:6F	Yellow	Green	Green	Green	Green	Green	Green
4:1G	Yellow	Green	Green	Green	Green	Green	Green
4:1E	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Yellow
4:2E	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Yellow
4:2C	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Yellow
4:1B	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Yellow
4:3G	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Yellow
4:5E	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Yellow
4:6D	Yellow	Green	Green	Green	Green	Green	Green
5:2F	Green	Green	Green	Green	Green	Yellow	Orange
5:1E	Green	Green	Green	Green	Green	Yellow	Orange
5:2D	Green	Green	Green	Green	Green	Yellow	Orange
5:1C	Green	Green	Green	Green	Green	Yellow	Orange
5:2C	Yellow	Green	Green	Green	Green	Green	Green
5:2B	Yellow	Green	Green	Green	Green	Green	Green
5:1A	Yellow	Green	Green	Green	Green	Green	Green
5:3G	Green	Green	Green	Green	Green	Yellow	Orange
5:4G	Yellow	Green	Green	Green	Green	Green	Green
5:3E	Yellow	Green	Green	Green	Green	Green	Green
5:4E	Yellow	Green	Green	Green	Green	Green	Green
5:3D	Yellow	Green	Green	Green	Green	Green	Green
5:4D	Yellow	Green	Green	Green	Green	Green	Green
5:3C	Yellow	Green	Green	Green	Green	Green	Green
5:3A	Yellow	Green	Green	Green	Green	Green	Green
5:5F	Green	Green	Green	Green	Green	Yellow	Orange
5:5D	Yellow	Green	Green	Green	Green	Green	Green
5:6D	Yellow	Green	Green	Green	Green	Green	Green
5:5B	Green	Green	Green	Green	Green	Yellow	Orange
5:5A	Yellow	Green	Green	Green	Green	Green	Green
6:2D	Yellow	Green	Green	Green	Green	Green	Green
6:4G	Yellow	Green	Green	Green	Green	Green	Green
6:4F	Yellow	Green	Green	Green	Green	Green	Green
6:3E	Yellow	Green	Green	Green	Green	Yellow	Orange
6:4C	Yellow	Green	Green	Green	Green	Green	Green

Farblegende:	Hawaii-DNA (PCR-gestützt)	Hawaii-DNA (nicht PCR-gestützt)	N2-DNA (PCR-gestützt)	N2-DNA (nicht PCR-gestützt)	PCR-Fehler
--------------	---------------------------	---------------------------------	-----------------------	-----------------------------	------------

Durch die Intervall-Kartierung konnte die Lokalisierung der Mutation somit auf einen Bereich zwischen X: 6,6 cM und X: 6,97 cM begrenzt werden. Dabei wurde die Anzahl der rekombinanten Linien zunehmend geringer, je näher man sich der Mutation auf dem Chromosom näherte (Abbildung 3-25). Die Analyse dieses chromosomalen Abschnitts wurde mit Hilfe der Internetplattform *Wormbase* durchgeführt und zeigte, dass in diesem 0,5 Mb-großen genomischen Intervall 94 Gene liegen.

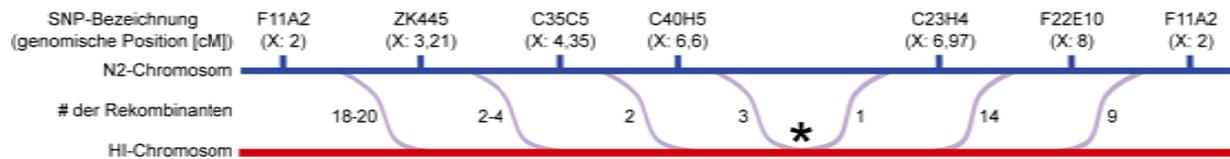


Abbildung 3-25 Graphische Zusammenfassung der Rekombinationsereignisse der 51 untersuchten Linien des Intervall-Kartierungsexperiment für die Mutante BJ132.

In der Meiose kommt es zwischen N2-Chromosom (blau) und Hawaii-Chromosom (rot) zu Rekombinationsereignissen durch *Crossover* (violette Verbindungslinien zwischen den Chromosomen). Von den für BJ132 untersuchten 51 Rekombinanten weisen 9 Linien ein Ereignis der homologen Rekombination zwischen den SNPs X: 8 cM (F22E10) und X: 11 cM (F46G10) auf. Je näher man der Mutation (*) kommt, desto weniger Rekombinationsereignisse finden statt. So wurden hier drei Linien identifiziert, die das Ereignis der homologen Rekombination zwischen X: 6,6 cM und der Mutation tragen und nur eine Linie, die dies zwischen der Mutation und X: 6,97 cM aufweist.

3.5.3.2 Subchromosomale Lokalisierung der Mutation von BJ133/BJ134

Zur Lokalisierung der allelischen Mutationen *kc2* und *kc3* wurde der Stamm BJ134 in einem, analog dem oben beschriebenen subchromosomalen Kartierungsexperiment eingesetzt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3-3 zusammengefasst. Die ersten rekombinanten Tiere konnten über die im chromosomalen Kartieren als am engsten gekoppelt gezeigten SNPs IV: -5 cM, IV: 1 cM und IV: 8 cM identifiziert werden. So konnte auch das Intervall erstmals auf den Bereich zwischen IV: 1 cM und IV: 8 cM eingegrenzt werden. Von 250 vereinzelt mutanten F2-Tieren konnten insgesamt 45 Linien identifiziert werden, die an diesen Positionen Hawaii-DNAs aufweisen. Im Intervall wurden sukzessive insgesamt acht weitere SNPs genotypisiert (IV: 3,21 cM, IV: 3,25 cM, IV: 3,34 cM, IV: 3,49 cM, IV: 3,77 cM, IV: 4,05 cM, IV: 4,5 cM, IV: 5,2 cM). Auf diese Weise konnte der Bereich durch zwei rekombinante Linien für den SNP an Position IV: 3,21 cM und durch eine, für am SNP IV: 3,34 cM rekombinante Linie eingegrenzt werden (Tabelle 3-3, Abbildung 3-26). Keine dieser drei Linien wies jedoch Hawaii-DNA am SNP IV: 3,25 cM auf (Tabelle 3-3, Abbildung 3-26), was eine weitere Eingrenzung des Intervalls an dieser Position unmöglich machte und zugleich eine enge Kopplung dieses SNPs und der Mutation nahelegt. Demnach konnte ein 0,8 Mb großer und 174 Gene kodierender genomischer Bereich, in dem sich die Mutationen der Stämme BJ133 und BJ134 befinden, identifiziert werden.

Ergebnisse

Tabelle 3-3 Tabellarische Zusammenfassung der Ergebnisse des subchromosomalen Intervall-Kartierung auf Chromosom IV für BJ134

Jede Zeile steht auch hier für eine untersuchte rekombinante *C. elegans* Linie (z.B. 1:1F), die für verschiedene, jeweils in den Spalten stehenden SNPs untersucht wurde (z.B. F42A5 an der genetischen Position IV:-5 cM). Die PCR-Ergebnisse für die jeweiligen SNPs sind farblich codiert (siehe Farblegende).

Rek. Linie #	Untersuchte SNPs auf Chromosom IV [cM]										
	F42A5 (~-5)	E03H12 (~1)	F38A5 (3,21)	F42A5 (3,25)	C48A7 (3,34)	F42A5 (3,49)	D2096 (3,77)	C01F6 (4,05)	K08F4.1 (4,5)	M117.1 (5,2)	F49E1 1 (~8)
1:1H											
1:1E											
1:2E											
1:2C											
1:1A											
1:3H											
1:3G											
1:4G											
1:3D											
1:3C											
1:4B											
1:3A											
1:4A											
1:5G											
1:5C											
1:6A											
2:1H											
2:2G											
2:1F											
2:2F											
2:2B											
2:4G											
2:3E											
2:3A											
2:4A											
2:5G											
2:6G											
2:6F											
3:1E											
3:1B											
3:2B											
3:4A											
3:6G											
3:5F											
4:1E											
4:2B											
4:4G											
4:4F											
4:3E											
4:3B											
4:5B											
4:6B											
5:5D											
5:6B											

Farblegende:	Hawaii-DNA (PCR-gestützt)	Hawaii-DNA (nicht PCR-gestützt)	N2-DNA (PCR-gestützt)	N2-DNA (nicht PCR-gestützt)
--------------	---------------------------	---------------------------------	-----------------------	-----------------------------

Ergebnisse

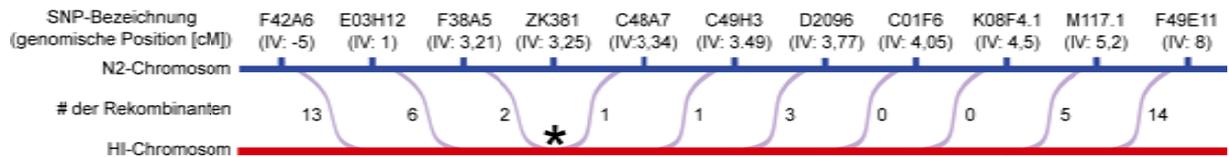


Abbildung 3-26 Graphische Zusammenfassung der Rekombinationsereignisse der 45 untersuchten Linien des Intervall-Kartierungsexperiment für die Mutante BJ134.

Dokumentation der Rekombinationsereignisse der 45 rekombinanten Linien, die bei der Intervall-Kartierung der Mutante BJ134 untersucht wurden. Es wird deutlich, dass die Anzahl an Rekombinationsereignissen von N2-DNA (blau) zu Hawaii-DNA (rot) abnimmt, je mehr man sich der Mutation (*) näherte. Für den SNP F38A5 an Position IV: 3,25 konnte keine rekombinante Linie identifiziert werden.

3.5.4 Identifizierung der mutierten Gene durch RNAi der Einzelgene in den Intervallen

Durch die SNP-Kartierungs-Ansätze konnte die Anzahl der Kandidatengene in den Intervallen auf eine überschaubare Anzahl von Genen reduziert werden, sodass im nächsten Experimentalschritt zur Identifizierung der mutanten Loci die systematische Applikation von RNAi gegen die Einzelgene erfolgen konnte. Dabei wurden IFB-2::CFP-Tiere des Stammes BJ52 mit RNAis gegen die in den Intervalls befindlichen Gene behandelt und ihre Nachkommen auf das Auftreten des Phänotyps hin untersucht. Dabei wurden zunächst alle Kandidaten, die sich in der RNAi-Bank (Kamath and Ahringer, 2003) befinden, appliziert und wenn nötig in einem zweiten Schritt die verbleibenden Kandidaten über Injektion von dsRNA herunterreguliert.

3.5.4.1 Identifizierung des mutierten Gens des Stamms BJ132

Die RNAi-Experimente zur Identifizierung der Mutation in BJ132 wurden im Labor unseres Kooperationspartners Dr. Olaf Bossinger von Tobias Wiesenfahrt durchgeführt. Von den insgesamt 94 Genen im Intervall sind 60 in der RNAi-Bank vorhanden und konnten direkt über das Verfüttern der entsprechenden Bakterien appliziert werden (Abschnitt 2.9.5.1). Der Phänotyp des Stammes BJ132 konnte jedoch durch keine der Proben erzielt werden. Aus diesem Grund wurden die dsRNAs der verbliebenen 34 Gene durch *in vitro* Transkription hergestellt und der RNAi-Effekt in BJ52 Tieren durch Injektion der dsRNA induziert. Dadurch wurde das, für den BJ132 Phänotyp verantwortliche Gen identifiziert: Die Applikation von *sma-5* (RNAi) (amplifiziert mit den Primern T7+W06B3.2for und T7+W06B3.2rev) führte in den Nachkommen dieser Tiere zu den charakteristischen blasenförmigen Alterationen des IFB-2::CFP-Musters (Abbildung 3-27). *sma-5* liegt laut *Wormbase* an Position X:7.01 +/- 0.016 cM und kodiert eine Serin/Threonin-Kinase, die ein Homolog der MAP-Kinase MAPK7/ERK5 in Säugern ist (Watanabe et al., 2005).

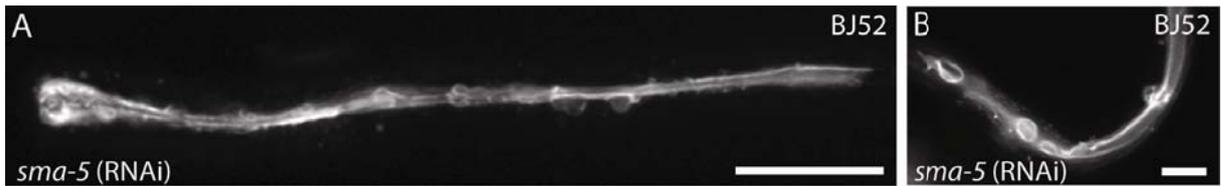


Abbildung 3-27 Fluoreszenzmikroskopische Dokumentation der IFB-2::CFP-Expression von BJ52-Tieren nach Behandlung mit *sma-5* (RNAi).

Nach Applikation von *sma-5* (RNAi) an BJ52-Tieren zeigen die Nachkommen den charakteristischen BJ132-Phänotyp. Die IFB-2::CFP-Verteilung zeigt blasenförmige Erweiterungen entlang der *endotube* auf (A,B).

Anterior links. Größenbalken: 100 μ m (A), 20 μ m (B).

Abbildung: Tobias Wiesenfahrt.

3.5.4.1.a Verteilung weiterer Intermediärfilamente in BJ132

Um zu testen, ob die *sma-5* Mutation (*kc1*) Auswirkungen auf weitere Intermediärfilamente in *C. elegans* hat, wurden die Verteilungsmuster von IFC-2 und IFA-1a in BJ132 Würmern untersucht. Durch Immunfluoreszenzfärbungen konnte gezeigt werden, dass intestinales IFC-2 in gleicher Weise fehlverteilt vorliegt wie IFB-2::CFP (Abbildung 3-28A-C). Die *sma-5*-Mutation des Stammes BJ132 hat keine Auswirkungen auf das Verteilungsmuster von IFA-1a::GFP. In den pharyngealen Marginalzellen doppelt-transgener Tiere des *sma-5*-mutanten Stammes BJ144, die auch IFB-2::CFP exprimieren, liegen die GFP-markierten IFs unverändert dicht gepackt in parallelen, apikobasal verlaufenden Filamentbündeln vor (Vergleiche Abbildung 3-28D mit dem Wildtyp in Abbildung 3-1).

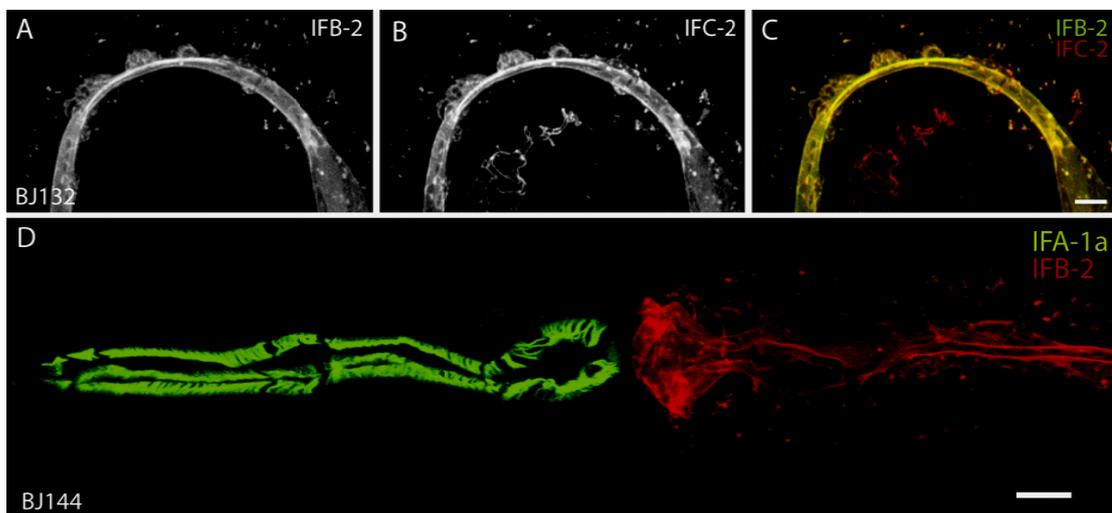


Abbildung 3-28 Doppelfluoreszenzaufnahmen von immundetektiertem IFC-2 und IFB-2::CFP an präparierten Därmen des Stammes BJ132 (A-C) und von einem BJ144-Tier, das IFA-1a::GFP und IFB-2::CFP koexprimiert (D).

(A-C) Der isolierte Darm eines BJ132-Tieres zeigt die typischen blasenförmigen Erweiterungen der intestinalen apikalen IFB-2::CFP-Verteilung (A). Die Immunfärbung gegen das IF-Polypeptid IFC-2 (B) zeigt die gleichartige Fehlverteilung von IFB-2 und IFC-2, was besonders bei der Überlagerung beider Kanäle deutlich wird (C). (D) Doppelt-transgene Tiere, die das *sma-5*-Allel *kc1* tragen, IFB-2::CFP und IFA-1a::GFP koexprimieren, zeigen keine Veränderungen im stereotypen Verteilungsmuster des in den Marginalzellen des Pharynx lokalisierten Intermediärfilaments IFA-1a.

Anterior links unten (A,B,C); links (D). Größenbalken: 10 μ m.

3.5.4.2 Identifizierung des mutierten Gens der Stämme BJ133 und BJ134

Die RNAi-Experimente zur Identifizierung der Mutation von BJ133/BJ134 wurden ebenfalls von Tobias Wiesenfahrt aus der AG Bossinger durchgeführt. Durch die SNP-Kartierung konnte ein Intervall mit 147 Genen identifiziert werden, in welchem das mutierte Gen der Stämme BJ133 (*kc2*) und BJ134 (*kc3*) lag. 97 der Gene sind in der RNAi-Bank vorhanden und konnten über RNAi-Fütterung getestet werden. Dieser Ansatz war erfolgreich und der charakteristische Phänotyp der Mutanten BJ133 und BJ134, der mit der Auflösung des dichtmaschigen IF-Netzwerks einhergeht, konnte in BJ52-Tieren durch *knockdown* des Gens *F42C5.10* erzielt werden (Abbildung 3-29). Die Mutationen der Stämme BJ133 und BJ134 liegen somit in dem bislang uncharakterisierten Gen, das laut *Wormbase* an Position IV: 3,32 cM liegt.

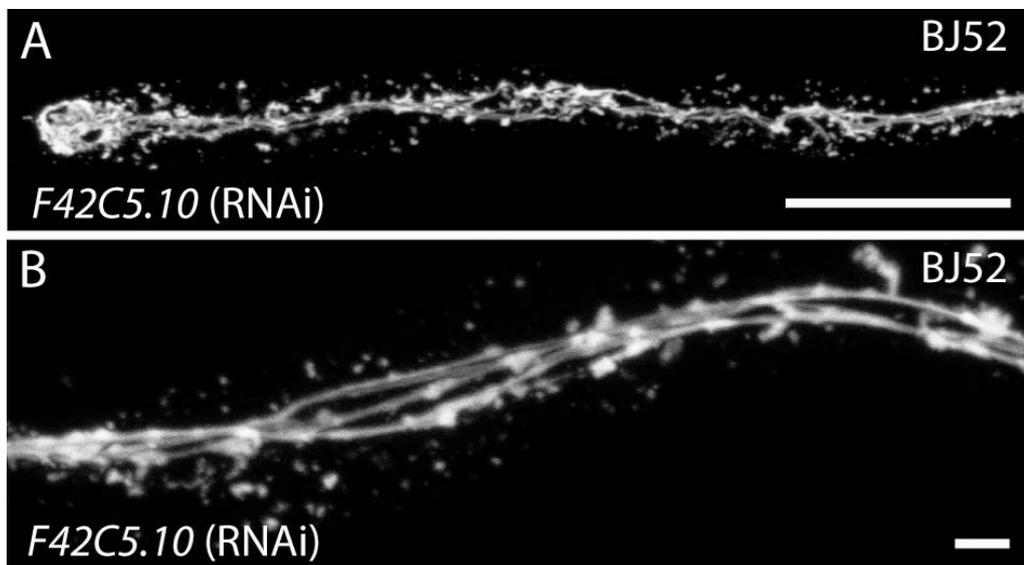


Abbildung 3-29 Fluoreszenzmikroskopische Dokumentation der IFB-2::CFP-Expression von BJ52-Tieren nach Behandlung mit *F42C5.10* (RNAi).

Nach Applikation von *F42C5.10* (RNAi) an BJ52-Tieren, zeigen die Nachkommen den charakteristischen Phänotyp der mutanten Stämme BJ133 und BJ134. Das engmaschige IF-Netzwerk ist aufgelöst und durch große Fenestrationsen unterbrochen (A). Die Detailaufnahme zeigt die Akkumulation von IFB-2::CFP entlang der apikalen Junctionen (B). Anterior links. Größenbalken: 50 μ m.

3.6 IFO-1: Identifizierung und Charakterisierung eines neuen Intermediärfilament-Organisators

Die Stämme BJ133 und BJ134 tragen mutante Allele des bislang uncharakterisierten Gens F42C5.10. Aufgrund der dramatischen Fehlverteilung von IFB-2::CFP in diesen Tieren wurde diesem Gen der Name *ifo-1* (*intermediate filament organizer*) gegeben.

Im Folgenden werden Untersuchungen zur Charakterisierung von *ifo-1* aufgezeigt, die eine Sequenz- und Domänenanalyse beinhalten, sowie die weitere Dokumentation des *ifo-1*-Phänotyps, die Charakterisierung des IFO-1 Expressionsmusters und erste funktionelle Studien.

3.6.1 Sequenzanalysen von IFO-1

Anhand der Gen-Voraussage der *Wormbase* handelt es sich beim genetischen Locus *ifo-1* um einen 5927 bp großen Abschnitt, der 13 Exone enthält (Abbildung 3-30A). Daraus wird eine 3879 bp mRNA transkribiert, die in ein 1292 Aminosäure-langes Polypeptid translatiert wird (Abbildung 3-30B). Das Polypeptid hat laut *Wormbase* einen isoelektrischen Punkt von 6,28 und eine molekulare Masse von 148,4 kDa.

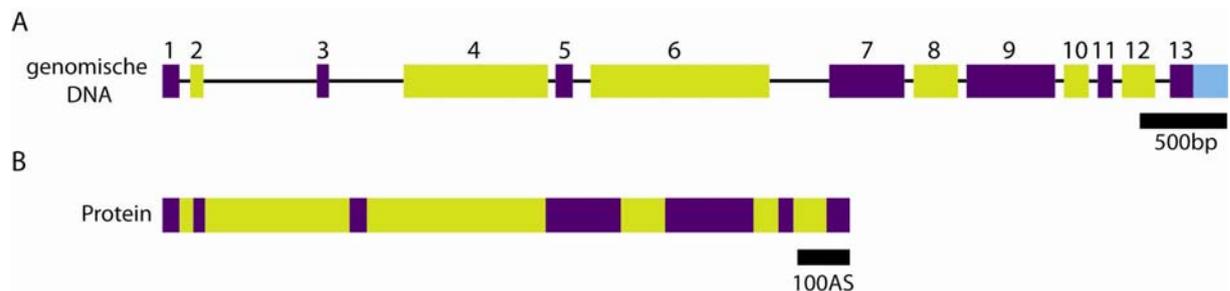


Abbildung 3-30 Schematische Darstellung der genomischen *ifo-1*-DNA (A) und des IFO-1-Proteins (B).

Die genomische Position von *ifo-1* liegt zwischen 7 326 647bp und 7 320 721bp auf Chromosom IV. Der Bereich ist 5 927bp groß. Insgesamt wurden 13 Exone (1-13 in A) über ESTs bestätigt. So entsteht eine 3 879 bp lange cDNA, die in ein 1 292 Aminosäure langes Polypeptid translatiert wird (B).

(A) 5'-Ende links, 3'-Ende rechts. Blaue Box=3'UTR. (B) N-Terminus links, C-Terminus rechts. AS=Aminosäuren.

Die Datenbank AceView (Thierry-Mieg and Thierry-Mieg, 2006) sagt für das *ifo-1*-Gen eine alternative Spleiß-Variante voraus. Sie beginnt an Aminosäureposition 918 und reicht bis 1152 des Polypeptids (grau hinterlegt in Abbildung 3-31, wobei die Möglichkeit besteht, dass die zweite Spleiß-Variante bis zum 5'-Ende der langen Variante reichen könnte und somit eine trunkierte Version des langen Proteins darstellen würde (Thierry-Mieg and Thierry-Mieg, 2006). Der genomische Abschnitt umfasst 850 bp und beinhaltet 4 Exone. Das vorhergesagte kurze Protein umfasst 235 Aminosäuren (27,2 kDa) und der isoelektrische Punkt liegt bei 6,8.

Ergebnisse

```
1      MGDLQVDLNA ALVAVKQKCV DLDEQIRREN DRSENRRGRY LGVRRYIYAL
51     TTKKNENHLQ RRRGSLTRVY VEQKFYRSKS VPSPDQVQRL EDCTQDYGPN
101    DEERLEYVET VDAPLEELIK EDQSHRHVVS QRLPQGHGEW DHELAVYEED
151    GGSGLLEDRT LTVRAGDHPF GMNQFNEVAE DISARIAKFF AEKEENHIRT
201    RELSLSVHPV YHQSNGBDAYT SFGMSRSKSM GSVAHAEHQ T SNNQHSSETH
251    GTASSTQSRP RLDQVSSTTK SLSNLFVSDT RHDYNSRYGN YVSGYGHYGT
301    PLPPAKNQEV MPKMPAKKSE HIYDEPIHRT STTNVYSSTY ERKYDFKTTF
351    PPEIEMPEGY HDYYDPSKFM FLDAGKYYQG NITRPLHYSY SRDYLEKYSY
401    YDGT SRLPSP APPKTPEPAY TVLNRSEDLP HHPTHLSFSF PDYYDHATQI
451    ILSRDPGLEH IPYKIGPFAD YYDNVHRIIL SHTKDLDHCK IVIPSFDPDY
501    DLSTRYEV LH RVEDILHEPI VIEEYPAYCP YEDTKYEVQE KSVTLDDHEI
551    YEEV YEPPLP PLPPPAPPV VHVLYNYTRDH DHIVFVPLLP YIPPPPPPPA
601    EIIHVATPAE VIEEPEPVP VPAKRHYDDL YIGNDALDVS VSPHFNQSD
651    QKNLGLEKSV TDRVREMERA MRGEERERLL EEEKRRKYLE LQNEIKAARE
701    YEEEHAYEEI QESKNTPCPV SQPILIPSVF VPVAVPEPIP EKPKRTWQPP
751    PKSEEF LDEH IDKPLGPVIF HELIYRNGFL LKMNEENHIL SQTRPVSHPV
801    SRANSRPTTP GLEIKTIDFP RLDDAASPRD HSDSAGNVDY VHKHIERYNA
851    KDASVVQDSH DESRAHSHML SNTVQTHHS QLINQNQATH YDAYATSQHS
901    NAQEYSTVHG SQTHRGSVVY DEPHGQVVYD IPHDQEH HHHY DTVHVQH HHH
951    HHYHTDGSEH VHHYHQDENA HQHSTAENEH IHYHHTTSNE NAHHHHSVQN
1001   EKDIYQLAQ SNQSIQMSK TNNWDEQNIQ SSKRAHIEAH IPVNSPFVKR
1051   EDSRVSTTSH VSTASTATT GTVVQCSNSL NRQNIAPPLK IQNGNSESYH
1101   EHNHHQHVHF DSVENSENIA HQCKSTSLD YQPVHVGHVK NLAKLFNKPD
1151   EKPLTTEQVI YRVSAAPP GH HLEPEIKPRP RSLPRIPLDE IELHEHGSKD
1201   HMTRHHHEMH QGTVDEHSEH GYSIGGAQR IDVSARTSST VMHSPPVQVQ
1251   HNSYYHRQSS DEESIRVRRV YKALDDTSML SPVSLSGDGP NF
```

Abbildung 3-31 Aminosäuresequenz von IFO-1.

Die 1292 Aminosäure lange Sequenz von IFO-1 beinhaltet 106 Histidine (H) (8,2% der Gesamtsequenz) und 100 Proline (7,7% der Gesamtsequenz). Die durch AceView vorhergesagte Spleiß-Variante beginnt an Position 918 und ist 235 Aminosäuren lang (grau hinterlegt). Laut *Wormbase* besitzt IFO-1 eine Prolin-reiche Domäne, in der der Prolin-Gehalt (P) 31% beträgt (Position 555-628; gelb hinterlegt). Der Prolin-reiche Abschnitt ist Teil einer FH2-Domäne (Position 561-1161; rot umrandet).

Zur Identifizierung von IFO-1-Homologen anderer Organismen wurden verschiedene BLAST-Programme angewandt (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, Swiss-Prot auf <http://ExpASy.org>). Eindeutig konnten auf diese Weise Orthologe in den nah verwandten Nematoden *Caenorhabditis briggsae* und *Caenorhabditis japonica* gefunden werden (*Alignment* siehe Abschnitt 7.4). Orthologe Proteine in anderen Organismen oder überzeugend konservierte Proteindomänen konnten mit diesen Datenbanken nicht identifiziert werden. In der *Wormbase* hingegen sind für IFO-1 unter Berufung auf die Datenbank INTERPRO zwei konservierte Motive verzeichnet, die durch die anderen BLAST-Analysen nicht detektiert wurden. Dabei handelt es sich erstens um eine Prolin-reiche Region (IPR000694; gelb hinterlegt in Abbildung 3-31), die 74 Aminosäuren lang ist und 23 Proline enthält. Der Prolin-Anteil in diesem Abschnitt beträgt 31% und ist, im Vergleich zu 7,7% Prolin-Gehalt in der Gesamtsequenz, enorm erhöht. Die Prolin-reiche Domäne ist ein Teil der zweiten konservierten Region, einer Aktin-bindenden FH2-Domäne (Formin-Homologie) (IPR015425; rot umrandet in Abbildung 3-31). FH2-Proteine spielen eine wichtige Rolle bei der Reorganisierung des Aktin-Zytoskeletts (Shimada et al., 2004; Wallar and Alberts, 2003).

Desweiteren ist der große Anteil an Histidin in der IFO-1-Sequenz auffällig. Insgesamt kommen 106 Histidine vor (rot in Abbildung 3-31), die 8,2% der Aminosäurekomposition des Proteins darstellen. Die durchschnittliche Häufigkeit von Histidinen in Proteinen beträgt 2,3% (Doolittle, 1989). Histidin-Reichtum ist eine Eigenschaft des Filament-assoziierten Proteins Filaggrin, das im Stratum granulosum der Haut vorkommt und an der Bildung von Filamentbündeln und -aggregaten beteiligt ist (Listwan and Rothnagel, 2004; Steinert et al., 1981).

Die Protein-Interaktionsdatenbank STRING (<http://string.embl.de/>) zeigt zwei Interaktionspartner für IFO-1 auf, die durch *Yeast-Two-Hybrid*-Versuche identifiziert wurden (Li et al., 2004) (Walhout et al., 2000). Zum einen ist dies die MAP-Kinase MPK-1 und zum anderen SEL-10, ein Mitglied der CDC4/CUL-1 Proteinfamilie der E2-E3-Ubiquitin-Ligasen.

Ein Hydrophobizitätstest der Aminosäuresequenz von IFO-1 nach Kyte und Doolittle, durch die Datenbank Swiss-Prot zeigte keine großen Bereiche an, die eine besonders starke Hydrophobizität aufweisen. Rückschließend kann man daher davon ausgehen, dass IFO-1 keine Transmembrandomänen enthält und es sich vermutlich um ein zytoplasmatisches Protein handelt.

3.6.2 Interferenzkontrastdokumentation von *ifo-1*-Mutanten

Aufgrund der dramatischen IF-Fehlverteilung in den *ifo-1* Mutanten stellte sich die Frage nach den Konsequenzen auf die allgemeine intestinale Morphologie. Dazu wurden adulte Würmer der Stämme BJ133 (*kc2*) oder BJ134 (*kc3*) interferenzphasenkontrastmikroskopisch untersucht. Es zeigte sich, dass das Darmlumen unregelmäßig lokal erweitert ist und teils perlenschnurartig verformt vorliegt (Abbildung 3-32).

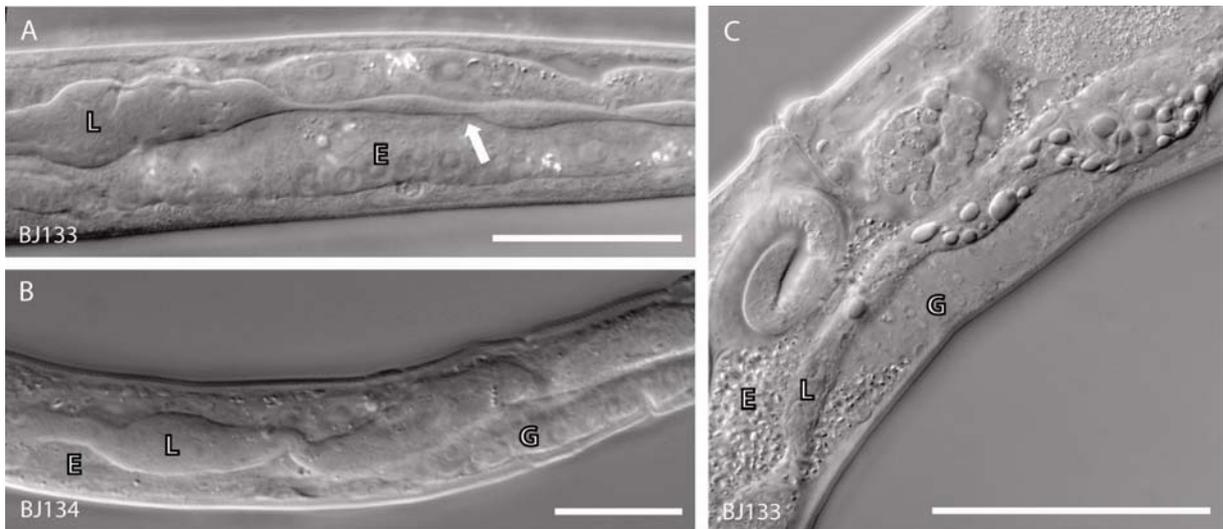


Abbildung 3-32 Interferenzphasenkontrast-Dokumentation von *ifo-1*-mutanten Tieren.

In beiden *ifo-1*-Mutanten kommen lokale Erweiterungen des intestinalen Lumens (L) vor, die teilweise perlenschnurartig angeordnet sind (Pfeil in A). (E) Enterozyte, (G) Gonade. Anterior links (A,B) oder links unten (C). Größenbalken: 100 μ m. Abbildungen: Tobias Wiesenfahrt.

3.6.3 Ultrastrukturelle Analyse von *ifo-1*-Mutanten

Elektronenmikroskopische Untersuchungen sollten die ultrastrukturellen Veränderungen der *ifo-1*-Mutanten aufzeigen. Bereits in der Übersichtsbetrachtung des Darmes ist eine deutliche Modifikation der apikalen Junctionen erkennbar: Lateral der elektronendichten junktionalen Bereiche angrenzender Enterozyten wurden Akkumulationen detektiert, die im Wildtyp nicht vorkommen (vergleiche Abbildung 3-33 mit Abbildung 3-10E, Abbildung 3-12B). Diese Beobachtung geht konform mit den junktionalen Akkumulationen der Intermediärfilamente, die bereits fluoreszenzmikroskopisch detektiert werden konnten (z.B. Abbildung 3-16B). Zusätzlich konnte bei höherer Vergrößerung eine deutliche Reduktion der Dicke der *endotube* beobachtet werden, die zudem wellenförmig und nicht stabil geradlinig wie im Wildtyp verläuft (vergleiche Abbildung 3-33B mit Abbildung 3-11A). Der, der *endotube* überliegende Mikrovillus-Saum des Darmes von *ifo-1*-mutanten Tieren ist ultrastrukturell unverändert (Abbildung 3-33B).

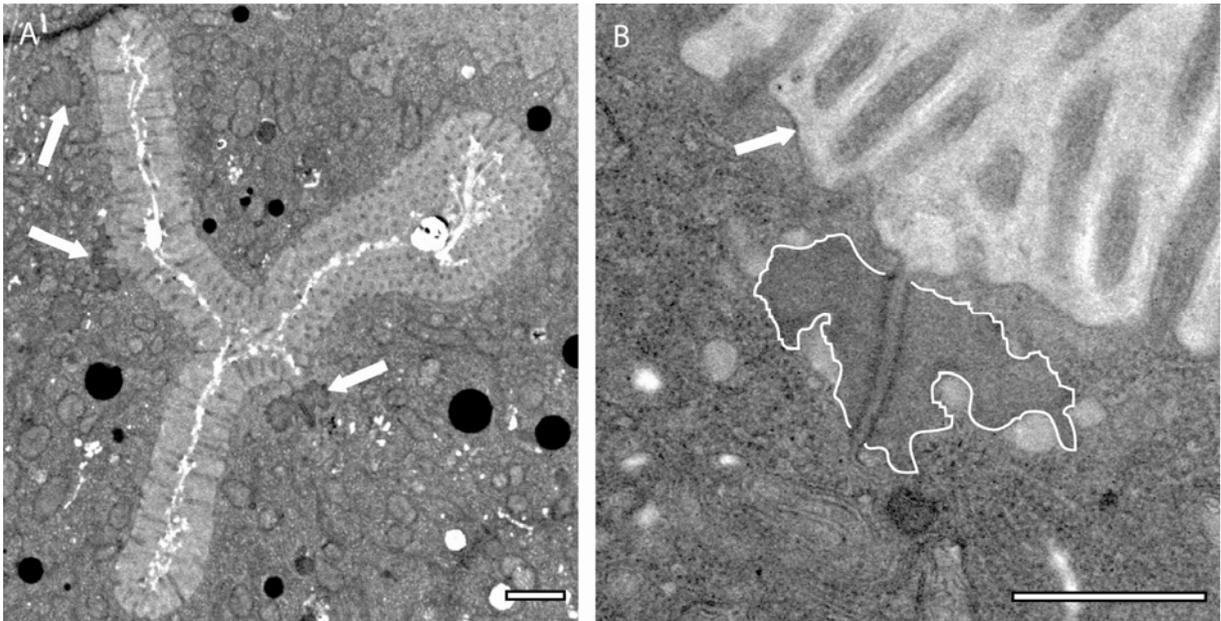


Abbildung 3-33 Elektronenmikroskopische Dokumentation von Därmen querschnittener Tiere der Stämme BJ142 (*kc2*) (A) und BJ143 (*kc3*) (B).

(A) Bereits in der Übersichtsdarstellung des intestinalen Lumens eines BJ142 Tieres sieht man an beiden Seiten der apikalen Junctionen benachbarter Enterozyten deutliche Aggregate, die eine höhere Elektronendichte im Vergleich zum Zytoplasma aufweisen (siehe Pfeile in A) und im Wildtyp nicht vorkommen (vergl. Abbildung 3-10E und Abbildung 3-12B). (B) Bei höherer Vergrößerung zeigt sich neben den beidseitigen Akkumulationen (weiß umrandet in B) eine, dem Mikrovillus-Saum unterliegende nur dünn ausgebildete elektronendichte *endotube* (siehe Pfeil in B), diese verläuft zudem wellenförmig und nicht geradlinig wie im Wildtyp (vergl. Abbildung 3-11A). Größenbalken: 1 μ m (A), 500 nm (B).

3.6.4 Expressionsanalysen von IFO-1

Um das Expressionsprofil von *ifo-1* untersuchen zu können, sollten Wurmstämme etabliert werden, die fluoreszierendes IFO-1 exprimieren. Dazu wurden zunächst entsprechende Genkonstrukte hergestellt.

Im ersten Schritt wurde eine 1256 bp große Promotorregion *upstream* des Startkodons des *ifo-1*-Genlokus über PCR unter Verwendung der Amplimere 08-01 und 08-02 (siehe Tabelle 2-3) amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde über *HindIII*-Schnittstellen in die *cfp*- (pVH10.10) und *yfp*- (pVH20.01) tragenden Expressionsvektoren ligiert. So entstanden die Promotorkonstrukte *Pifo-1::cfp* und *Pifo-1::yfp*, die zur Analyse der Promotoraktivität mit dem Koinjektionsmarker pCFJ104 (*myo-3::mcherry*) zur Etablierung von transgenen Reporterstämmen BJ152 (*Pifo-1::YFP*) und BJ153 (*Pifo-1::CFP*) injiziert wurden.

Im zweiten Klonierungsschritt wurde die 3897 bp große *ifo-1*-cDNA mit Hilfe der Oligomere 08-03 und 08-04 (siehe Tabelle 2-3) aus *C. elegans*-Gesamt-cDNA amplifiziert und über *BamHI*-Schnittstellen in die *Pifo-1*-tragenden Vektoren eingefügt. Die so entstandenen Fusions-Genkonstrukte *ifo-1::cfp* und *ifo-1::yfp* wurden nun zur Etablierung transgener Wurmstämme, ebenfalls zusammen mit dem Koinjektionsmarker *myo-3::mcherry* verwendet.

Nachkommen der injizierten Tiere, die MYO-3::MCHERRY exprimieren, wurden vereinzelt und auf ihre die Präsenz der entsprechenden Fluoreszenz untersucht. Die transgenen, das fluoreszierende Hybridprotein exprimierenden Stämme BJ154 (IFO-1::YFP) und BJ155 (IFO-1::CFP) wurden identifiziert und isoliert.

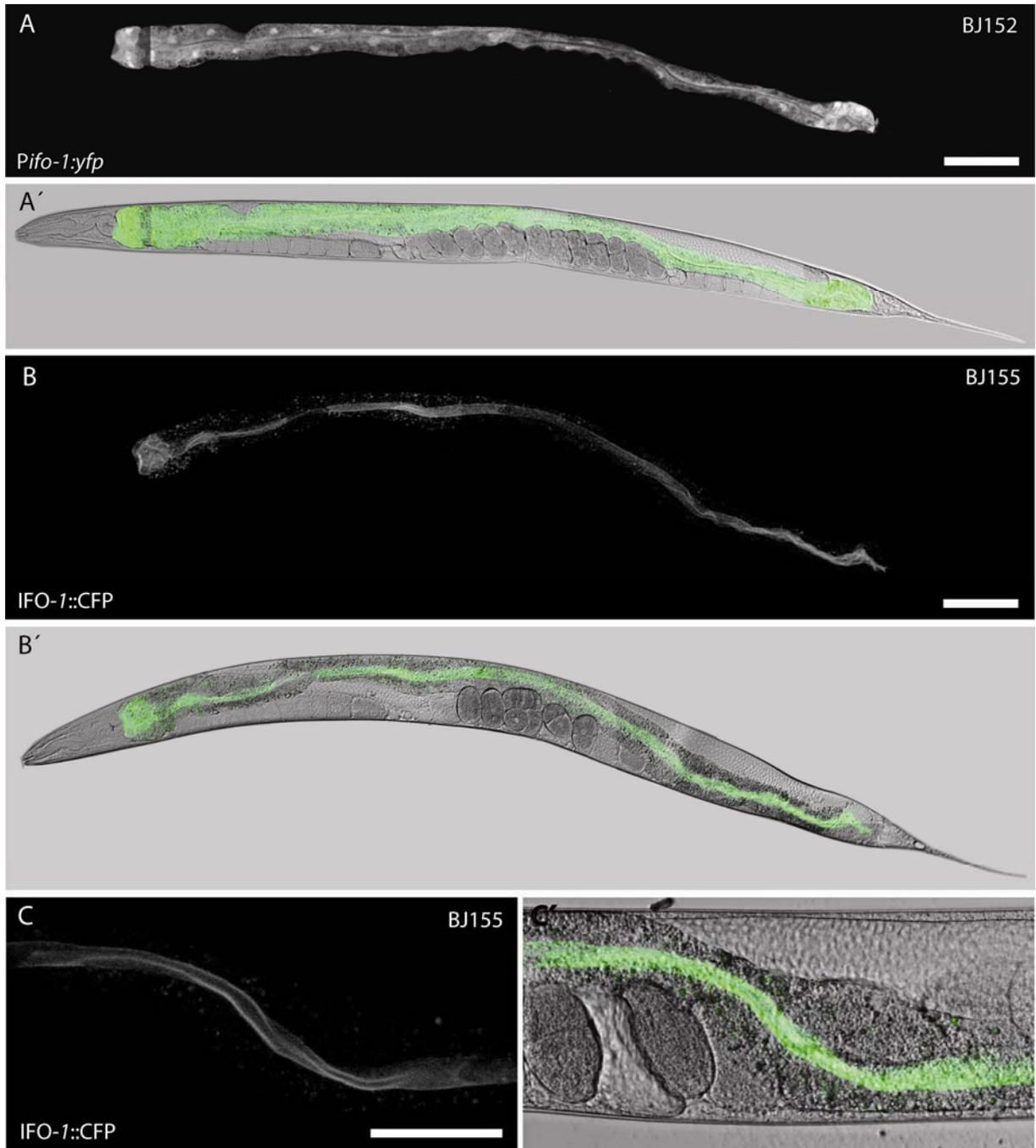


Abbildung 3-34 Mikroskopische Expressionsanalysen von *Pifo-1*::YFP- (A-A') und IFO-1::CFP- (B-C') exprimierenden adulten Tieren.

(A-A') Adulter Wurm des Stammes BJ152, der YFP unter der Kontrolle des *ifo-1*-Promotors exprimiert. Die Fluoreszenz ist ausschließlich in Enterozyten vorhanden. (B-C') Detektion des Fusionsproteins IFO-1::CFP in adulten Tieren des Stammes BJ155. Das Hybridprotein lokalisiert darmspezifisch im apikalen Zellkompartiment (C') und in punktförmigen zytoplasmatischen Aggregaten (B,C).

Anterior links. Größenbalken: 100 μ m (A,B), 50 μ m (C).

Die mikroskopische Analyse von Tieren des Stammes BJ152 zeigt, dass der gewählte Promotorbereich von *ifo-1* funktionell ist und YFP gewebsspezifisch und ausschließlich in Enterozyten synthetisiert wird (Abbildung 3-34A,A'). Die mikroskopische Untersuchung von Tieren des Stammes BJ155 zeigt, dass das Fusionsprotein spezifisch im subapikalen Zellkompartiment lokalisiert (Abbildung 3-34B-C'). Zusätzlich sind einige fluoreszierende punktförmige Aggregate im Zytoplasma detektierbar (Abbildung 3-34B,C).

3.6.5 *Rescue* des *ifo-1*-Phänotyps durch Expression von IFO-1::YFP

Unter einem *Rescue*-Experiment versteht man die „Rettung“ eines durch eine Mutation bedingten Phänotyps durch das Einbringen des Wildtyp-, also des „gesunden“ Gens. Um zu kontrollieren, ob das klonierte Wildtyp *ifo-1*-Konstrukt den Phänotyp heilen kann, wurden mutanten Würmern der Stämme BJ133 und BJ134 das *ifo-1::yfp*-Konstrukt injiziert. Als Koinjektionsmarker wurde wiederum *myo-3::mcherry* verwendet und rot fluoreszierende Nachkommen isoliert. Bereits bei Betrachtung der resultierenden Stämme BJ156 und BJ157 am Fluoreszenzbinoskop konnte die wiederhergestellte deutliche apikale Polarisierung von IFB-2::CFP und eine merkliche Reduktion der zytoplasmatischen Granula detektiert werden. Bei der Detailbetrachtung am Mikroskop (Abbildung 3-35) wurden diese Beobachtungen bestätigt, es fiel jedoch auf, dass das IFB-2::CFP-Netzwerk in einigen Tieren und Bereichen der *endotube* nicht vollständig dicht ausgebildet ist und von großen Fenestrations unterbrochen wird (Abbildung 3-35 A anterior, B). Wie gravierend der Unterschied zwischen

BJ133 [*ifo-1::yfp*(+)]

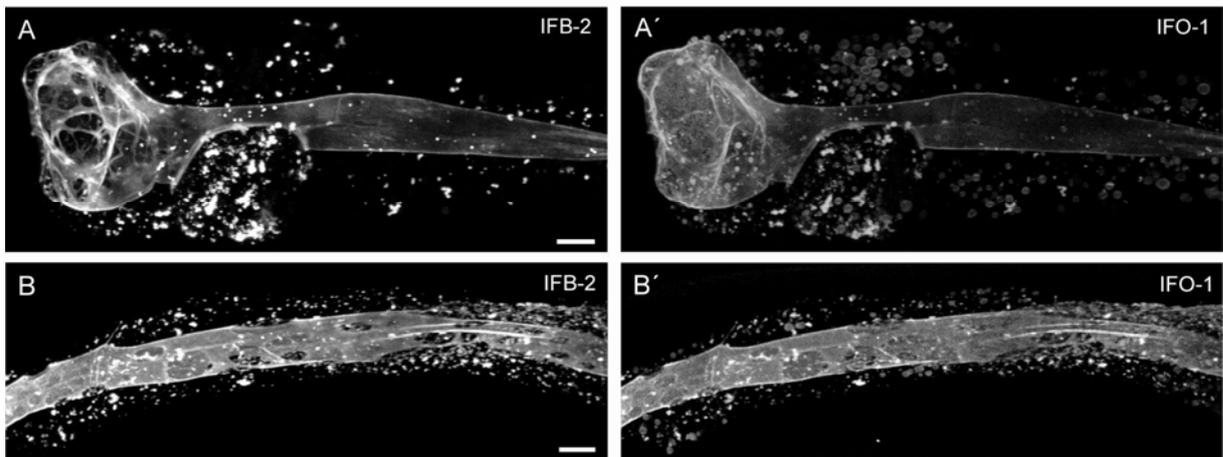


Abbildung 3-35 Doppelfluoreszenz-Mikroskopie von IFB-2::CFP-exprimierenden BJ156-Tieren (A,B), deren phänotypische Veränderungen fast vollständig durch IFO-1::YFP (A',B') geheilt sind.

(A,A') Das anteriore Darmende eines BJ156-Mosaiktieres zeigt eine apikale Polarisierung von IFB-2::CFP (A) in der *endotube*, was durch das Einbringen von IFO-1::YFP bedingt wurde. Die nach unten gerichtete Zelle in (A) zeigt den *ifo-1*-Phänotyp weiterhin und ist somit nicht geheilt. Das IFB-2::CFP-Netzwerk ist partiell durch große Fenestrations unterbrochen (A,B), was auf einen unvollständigen *Rescue* hinweist. Anterior links. Größenbalken: 10 μ m.

einer Darmzelle, die den *Rescue* nicht aufweist und benachbarten, geheilten Enterozyten ist, zeigt sich in Mosaiktieren, die das extrachromosomale *array* nicht in jeder Zelle tragen (nach unten gerichtete Zelle in Abbildung 3-35 A,A' ist nicht geheilt). Zusammenfassend kann man sagen, dass *ifo-1::yfp* den mutanten Phänotyp der Stämme BJ133 und BJ134 wenigstens partiell heilen kann.

Um die räumliche Verteilung von IFB-2 und IFO-1 zu untersuchen wurde an Tieren, die den *Rescue* aufweisen fluoreszenzmikroskopisch Detailuntersuchungen durchgeführt. Diese Analysen zeigten, dass IFO-1 und IFB-2 in der *endotube* kolokalisieren (Abbildung 3-36A,B), aber dass IFO-1::YFP im Gegensatz zu IFB-2::CFP nicht in den apikalen Junctionen angereichert ist (Abbildung 3-36B). Ebenfalls kolokalisieren beide Proteine nicht in den zytoplasmatischen Aggregaten der Enterozyten (Abbildung 3-36C).

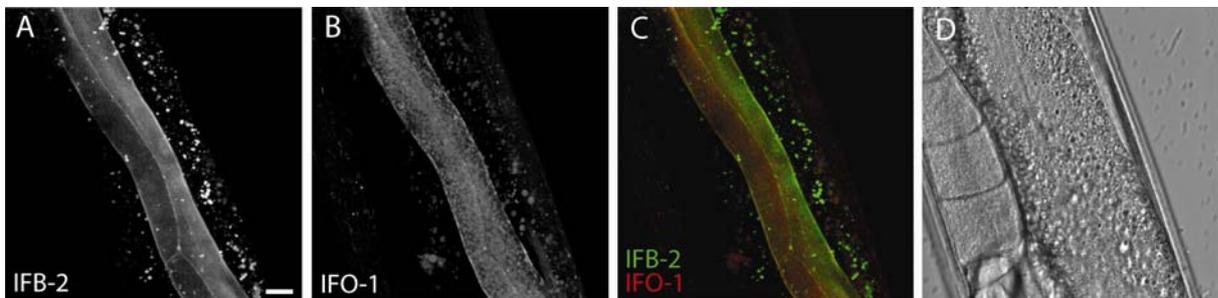


Abbildung 3-36 Fluoreszenzmikroskopische Detailaufnahmen eines Tiers des Stammes BJ156, das die Hybridproteine IFB-2::CFP (A) und IFO-1::YFP (B) koexprimiert.

(A) IFB-2::CFP-Expression in der apikalen *endotube* mit deutlicher junctionaler Anreicherung und zytoplasmatischen Aggregaten. (B) IFO-1::YFP lokalisiert ebenfalls apikal, jedoch in einer granulären Anordnung, eine Anreicherung entlang der Junctionen liegt nicht vor. Eine Überlagerung beider Kanäle (C) zeigt eine Kolokalisation der beiden Proteine in der *endotube*, aber keine Kolokalisation von IFB-2 und IFO-1 in den zytoplasmatischen Granula. (D) zeigt die zugehörige Nomarski-Aufnahme.

Anterior oben links. Größenbalken: 10 μ m.

3.6.6 Verteilung von IFC-2 in *ifo-1*-Mutanten

Es stellte sich die Frage, ob *ifo-1* als IFB-2-spezifischer Organisator fungiert oder auch die Verteilung anderer intestinaler Intermediärfilamente reguliert. Um dies zu testen, wurde die immunhistologische Detektion von IFC-2 an präparierten Därmen der Stämme BJ133 und BJ134 durchgeführt und Doppelfluoreszenzaufnahmen am konfokalen Laserscanmikroskop angefertigt. Die Analyse brachte für beide mutante Stämme ein eindeutiges Ergebnis: IFC-2 ist in identischer Weise fehlverteilt wie das intestinale Intermediärfilament IFB-2 (Abbildung 3-37). Weitere Immunfärbungen an Därmen der *ifo-1*-mutanten Stämmen BJ142 und BJ143, die IFB-2::CFP nicht exprimieren, zeigten ebenfalls die charakteristische Fehlverteilung beider IFs.

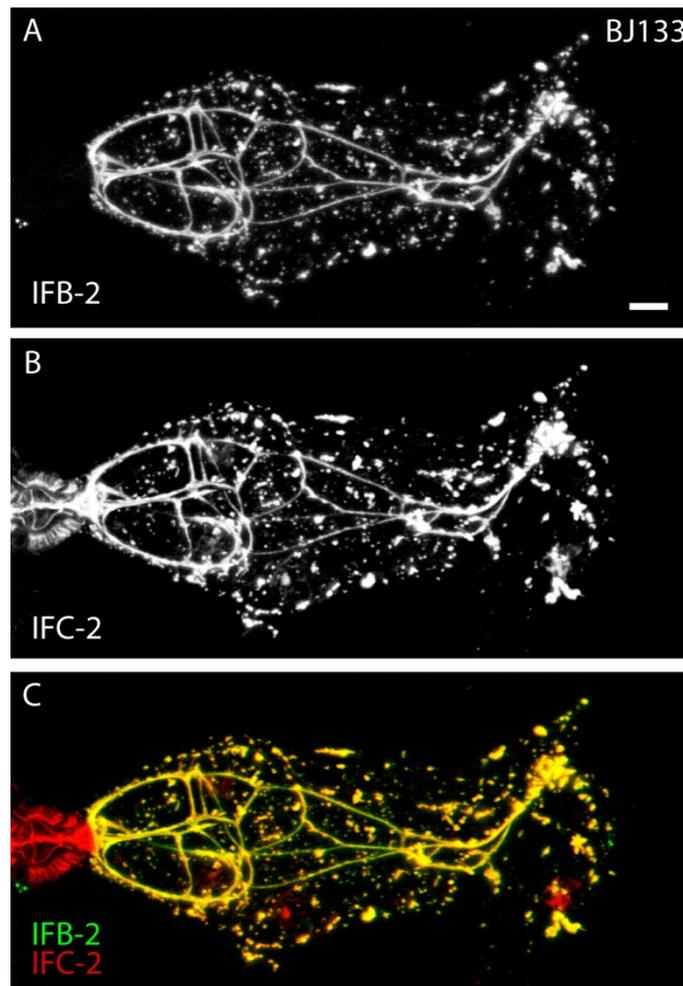


Abbildung 3-37 Doppelfluoreszenz-Aufnahme des anterioren Abschnitts eines isolierten BJ133-Darms zur Darstellung der Verteilung von IFB-2::CFP (A) und von IFC-2 durch Immundetektion (B).

In Abwesenheit von IFO-1 zeigt IFC-2 (B) die identische Fehlverteilung wie IFB-2::CFP (A): Die Überlagerung beider Kanäle (C) zeigt eine eindeutige intestinale Kolokalisierung der IFs sowohl entlang der Zellgrenzen als auch in den zytoplasmatischen Granula.

Anterior links. Größenbalken: 10 μm .

3.6.7 Junktionale Integrität in *ifo-1*-Mutanten

Aufgrund der enormen IF-Aggregatbildung entlang den intestinalen apikalen Junktionen in *ifo-1*-Mutanten ergab sich die Frage, ob die Junktionen intakt sind und somit die funktionelle Integrität des Epithels gewährleistet ist. Um dies zu testen wurden Würmer mit TRITC-markiertem Dextran gefüttert und fluoreszenzmikroskopisch untersucht (Abbildung 3-38). So konnte gezeigt werden, dass es nicht zum Eintritt von TRITC-Dextran in die Interstitien von Enterozyten kommt, selbst wenn das Lumen die bereits in Abbildung 3-32 aufgezeigten, teils perlenschnurartigen Erweiterungen aufweist (Abbildung 3-38A'). Die Funktionalität der apikalen Junktionen ist demnach trotz der lateralen IF-Anreicherungen erhalten.

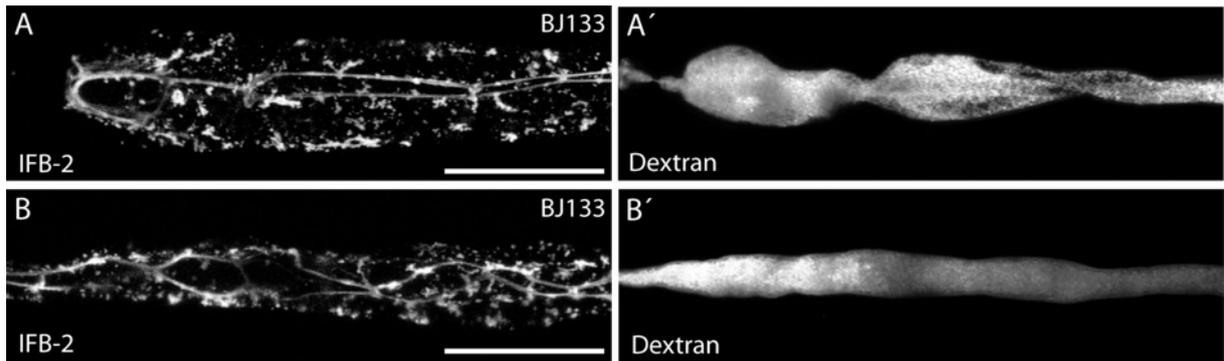


Abbildung 3-38 Doppelfluoreszenzmikroskopie von IFB-2::CFP- (A,B) exprimierenden *ifo-1*-mutanten Tieren, die zur Lumen-Färbung TRITC-Dextran (A',B') aufgenommen haben.

Im anterioren Darmende eines BJ133-Tieres (A-A') zeigen sich perlschnurartige Erweiterungen des intestinalen Lumens, die Barrierefunktion des Darmepithels bleibt jedoch intakt, da es auch im weiteren Darmverlauf (B,B') zu keinem Austreten von TRITC-markiertem Dextran in die Interstitien der Enterozyten kommt. Anterior links. Größenbalken: 50 µm.

3.6.8 Intestinale Aktin-Verteilung in *ifo-1*-Mutanten

Die Fehlverteilung weiterer Zytoskelettfilamente wurde in IF-defizienten Systemen mehrfach beschrieben (Ameen et al., 2001; Oriolo et al., 2007b; Wald et al., 2003; Wald et al., 2005). Aus diesem Grund wurde die intestinale Aktin-Verteilung (MacQueen et al., 2005) in *ifo-1*-mutanten Tieren untersucht. Dazu wurden die mutanten Würmer mit Tieren eines Reporterstammes gekreuzt, die das Mikrovilli-spezifische Aktin ACT-5 GFP-markiert exprimieren. Zur Vergleichbarkeit erfolgte die Analyse der ACT-5::GFP-Verteilung im Wildtyp und den Mutanten am konfokalen Laserscannmikroskop mit identischen Geräteeinstellungen und ohne die Nachbehandlung der Bilder mittels Bildbearbeitungsprogrammen. Im Wildtyp lokalisiert ACT-5::GFP in der apikalen Enterozytendomäne (Abbildung 3-39A), wo es apikal des Terminalgeflechts in den Mikrovilli vorliegt. Die Analyse der Mutanten zeigte, dass diese apikale ACT-5::GFP-Intensität in Tieren, die das mutante Allel *ifo-1(kc2)* tragen, drastisch reduziert ist und in manchen Bereichen des Darms fast vollständig fehlt (Abbildung 3-39B).

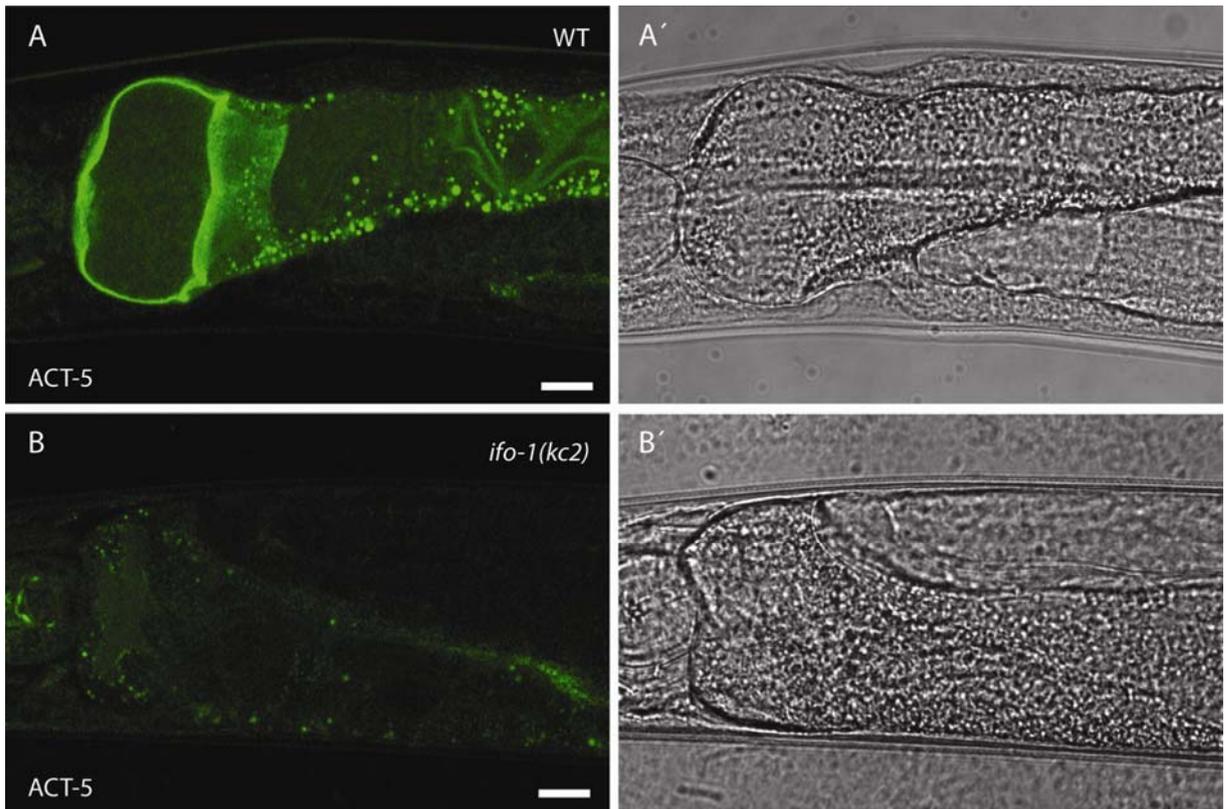


Abbildung 3-39 Fluoreszenzmikroskopie der intestinalen ACT-5::GFP-Verteilung im Wildtyp (A,A') und in *ifo-1(kc2)*-Mutanten (B-C').

Die ACT-5::GFP-Verteilung im anterioren Darmabschnitt in Wildtyp-Tieren (A) liegt apikal, denn dort ist ACT-5 in den Mikrovilli des Darmes lokalisiert. In Tieren, die das mutante Allel *ifo-1(kc2)* tragen, fehlt die deutliche apikale Lokalisation von ACT-5, während die bereits im Wildtyp detektierten fluoreszierenden zytoplasmatischen Aggregate persistieren (B). Zur Vergleichbarkeit der Fluoreszenz-Intensitäten wurden alle Abbildungen mit identischen *Laser-* und *Pinhole*-Einstellungen am konfokalen Laserscanmikroskop aufgenommen; außerdem erfolgte keine Nachbearbeitung der Bilder mit dem Bildbearbeitungsprogramm Photoshop. Anterior links. Größenbalken: 20 μ m.

4 DISKUSSION

4.1 Etablierung eines *in vivo*-Modells mit Fluoreszenz-markierten Intermediärfilamenten zum Einsatz in optischen Screens

Der Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* ist ein genetisch gut zugänglicher und leicht manipulierbarer wirbelloser Modellorganismus, der sich hervorragend für Studien an IFs eignet. Im Gegensatz zu der Taufliege *Drosophila melanogaster*, die keine zytoplasmatischen IFs vorweisen kann, befinden sich im Genom des Wurms 11 zytoplasmatische IF-Gene. Im Vergleich zu Zellkultursystemen arbeitet man in *C. elegans* gesamtorganismisch *in vivo*, so dass Auswirkungen von genetischen- oder anderen manipulativen Eingriffen im funktionellen Gewebekontext untersucht werden können.

Im Rahmen dieser Arbeit gelang es, transgene *C. elegans*-Stämme zu etablieren, die fluoreszierende IFs exprimieren und als Modellsysteme für die Untersuchung und Identifikation von IF-Modulatoren in genetischen Screens eingesetzt werden konnten. Das Modell musste dafür drei Kriterien erfüllen: Erstens sollte das fluoreszierende Muster der Verteilung der endogenen IFs entsprechen, zweitens sollte das Expressionsmuster eine immer gleichartige, hochcharakteristische und distinkte Verteilung aufweisen und drittens sollten Veränderungen in diesem Muster bereits bei kleinen Vergrößerungen gut detektierbar sein, so dass die Evaluierung der Alteration bereits am Fluoreszenzbinokular erfolgen konnte. Letzteres sollte gegeben sein, um einen großen Durchlauf an Proben in kurzer Zeit erzielen zu können. Transgene Würmer, die IFB-2::CFP exprimieren, erfüllen diese Kriterien, denn das fluoreszierende Expressionsmuster entspricht dem endogenen Verteilungsmuster von IFB-2, was durch Antikörperfärbungen nachgewiesen werden konnte (Abbildung 3-2). Neben einigen zytoplasmatischen Granula lokalisiert IFB-2::CFP hochspezifisch im apikalen Zellkompartiment der großen Enterozyten und ist dort Teil des zytoskelettalen Terminalgeflechts (Abbildung 3-4, Abbildung 3-5). Hochauflösende Detailaufnahmen zeigten zudem, dass IFB-2 zusätzlich in Bereichen der CeAJ angereichert ist (Abbildung 3-2D, Abbildung 3-4C,D, Abbildung 3-5). Die charakteristische polare IFB-2-Verteilung ist bereits bei relativ kleiner Vergrößerung am Fluoreszenzbinokular gut erkennbar. Veränderungen im stereotypen IFB-2::CFP-Muster wurden durch RNAi-Experimente der fünf weiteren IFs des *terminal webs* provoziert. Im Fall von *ifc-2* (RNAi) führte dies zu phänotypischen Alterationen in Form von blasenförmigen Ausstülpungen, die bereits am Binokular deutlich detektierbar waren (detaillierte Diskussion siehe Abschnitt 4.1.1). Dies beweist die Induzierbarkeit von leicht detektierbaren Veränderungen im IFB-2::CFP-Netzwerk. Wie bereits in Abschnitt 3.3.1 beschrieben, ist der *ifc-2* (RNAi)-Phänotyp in IFB-2::CFP-exprimierenden Tieren stärker ausgeprägt als in gleichbehandelten N2-Würmern. Dies weist auf eine erhöhte Sensitivität

des IF-Netzwerkes in den transgenen Tieren hin und rechtfertigt somit den Einsatz in einem optischen *Screen* auf der Suche nach Veränderungen im IF-System zusätzlich. Der Grund für die erhöhte Grundfragilität des Systems kann die Fusion des IF-Polypeptids mit dem C-terminalen CFP-Protein sein, wodurch die korrekte Vernetzung der IF-Untereinheiten oder der Kontakt zu anderen (zytoskelettalen) Elementen des Terminalgeflechts beeinträchtigt sein kann.

Insgesamt konnten durch UV-Bestrahlung acht unabhängige IFB-2::CFP-transgene Linien hergestellt werden, die das vormals extrachromosomale *array* an unterschiedlichen Stellen im Genom integriert aufweisen. Die chromosomale Kartierung der Integrationsorte konnte für sieben Stämme mit Hilfe von SNP-Kartierungsexperimenten erfolgen (siehe Abschnitt 3.1.2.1). Die Tatsache, dass Integrationen auf insgesamt drei unterschiedlichen Chromosomen vorliegen, erhöht die Anzahl an Kombinationsmöglichkeiten beim kreuzungsexperimentellen Arbeiten mit anderen chromosomalen Markern oder Mutationen.

Die hier generierten Stämme eignen sich hervorragend zur Identifizierung von intestinalen IF-Organisatoren. Desweiteren können die IFB-2::CFP-Tiere in *Screens* zur Identifizierung von Zellpolaritätsfaktoren oder junktionalen Organisatoren eingesetzt werden, da das IF-System eine charakteristische subapikale polare Verteilung aufweist und mit der CeAJ in Verbindung steht. Ein weiterer attraktiver Ansatz zur parallelen Suche nach IF-Modulatoren in anderen Geweben ist der Einsatz von doppelt-transgenen Wurmstämmen, die neben IFB-2::CFP z. B. auch IFA-1a::GFP stabil integriert exprimieren. Die Verwendung eines solchen Stammes in einem Mutagenese-*Screen* erlaubt die gleichzeitige Identifizierung von allgemeinen und gewebsspezifischen IF-Modulatoren.

4.1.1 IFC-2 ist essentiell für die Stressresistenz der *endotube*

Der Darm von *C. elegans* ist einer Vielzahl von mechanischen Kräften ausgesetzt: Der durch die eingepumpte Nahrung bedingte, nach außen gerichtete luminale Innendruck, die durch die sinusoidale Fortbewegungsweise benötigte transversale Flexibilität, die den Darm entlang seiner anterior-posterioren Achse verlaufenden Kontraktionsbewegungen des Defäkationszyklus und der nach innen gerichtete hydrostatische Druck des Pseudocoels. Zusätzlich müssen wechselnde osmotische Druckdifferenzen zwischen intestinalem Lumen und Pseudocoel von den Intestinalzellen aufgefangen werden. All dies setzt die Existenz eines stabilisierenden Systems voraus, welches das Darmrohr gegenüber mechanischem und osmotischem Stress widerstandsfähig macht und dadurch hilft, die Integrität des Darmrohrs und des intestinalen Epithels und somit die Lumenform beizubehalten. Dies stellt die Grundvoraussetzung zur normalen Prozessierung der Nahrung und folglich zur optimalen Aufnahme von Nährstoffen dar. Die Existenz eines solchen Systems wird sichtbar, wenn man Darmpräparationen vornimmt und die *endotube* auch nach dieser immensen

mechanischen Manipulation als intakte, stabile Einheit verbleibt (McGhee, 2007; Munn and Greenwood, 1983; Munn, 1984). Der Bereich des elektronendichten, subapikalen Netzwerks enthält sehr wahrscheinlich die Strukturen, die für diese Stabilisierung verantwortlich sind (McGhee, 2007). Das IF-System im Terminalgeflecht kann diese benötigten Eigenschaften hervorragend aufbieten: die IFs lokalisieren in der *endotube* (Bossinger et al., 2004) und haben bekannterweise protektive Funktionen gegenüber mechanischem und osmotischem Stress in diversen Systemen und Geweben (Herrmann et al., 2007; Magin et al., 2007; Pekny and Lane, 2007). Außerdem kommt die hohe Viskoelastizität und Flexibilität von IFs hinzu, die, kombiniert mit ihren dynamischen Reaktionen auf Deformationen und schneller Wiedererlangung der Ursprungsform (Janmey et al., 1991; Ku et al., 1999), weitere Eigenschaften für die Aufrechterhaltung des stabilen Darmrohres darstellen. Die Tatsache, dass der Darm von *C. elegans* reich an IFs ist und insgesamt sechs verschiedene Gene exprimiert werden (Karabinos et al., 2003; Karabinos et al., 2004) lässt vermuten, dass IFs wichtige Funktionen in Enterozyten übernehmen. Die von Dr. Karabinos und Kollegen durchgeführten RNAi-Experimente zeigten jedoch in den meisten Würmern keine oder nur milde phänotypische Veränderungen in Abwesenheit von intestinalen IFs auf. Nur einige Tiere zeigten deutliche phänotypische Alterationen (Karabinos et al., 2001a; Karabinos et al., 2003; Karabinos et al., 2004). Im Gegensatz dazu konnten im Rahmen dieser Arbeit, unabhängig vom genetischen Hintergrund drastische phänotypische Veränderungen der luminalen Form nach *ifc-2* (RNAi) mit einer Penetranz von 97% beobachtet werden (Abbildung 3-8, Abbildung 3-9). Der Einsatz des IFB-2::CFP-Stamms ermöglichte die Analyse der Entstehung des Phänotyps während der Entwicklung und im lebenden adulten Tier. Es konnte gezeigt werden, dass die ellipsoide Morphologie des Lumens während der Larvalentwicklung verloren geht, weil blasenförmige Ausstülpungen der *endotube* auftreten, deren Häufigkeit und Ausprägungsgrad mit der Zeit zunehmen. Die Stärke des Effekts erreicht ihren Höhepunkt, wenn RNAi über drei Generationen appliziert wird (Abbildung 3-8E,F). Letzteres impliziert die generelle Möglichkeit, dass einige RNAi-induzierte Veränderungen noch nicht in der F1-Generation detektierbar sind und es zur vollen Ausprägung eines Phänotyps notwendig ist RNAi über mehrere Generationen anzuwenden. Zusammengefasst kann man also sagen, dass der Verlust von IFC-2 zu einer progressiven blasenförmigen Verformung des ellipsoiden Darmlumens führt. Die Tatsache, dass die initiale luminale Formgebung in Abwesenheit von IFC-2 normal verläuft (Abbildung 3-12), gibt einen direkten *in vivo* Beweis dafür, dass das IF-System eine stressprotektive Funktion hat. Das Fehlen von IFC-2 führt zu einer Reduktion der Belastbarkeit der *endotube* gegenüber mechanischem Stress, so dass diese den unterschiedlichen mechanischen Kräften und Drücken, die auf sie einwirken, nicht standhalten kann. Es kann andererseits nicht ausgeschlossen werden, dass auch nicht-mechanische Faktoren zur Entstehung

dieses Phänotyps beitragen. So könnten z. B. Stress-induzierte Signalkaskaden oder die fehlregulierte Synthese und Lokalisierung von apikalen Membrankomponenten an der Ausbildung der beobachteten Veränderungen beteiligt sein.

Die *ifc-2* (RNAi)-induzierten, gravierenden morphologischen Defekte der *endotube* hatten überraschenderweise keine detektierbaren funktionellen Konsequenzen für den Wurm (siehe Abschnitt 3.3.1). Auch die normale Entwicklung der intestinalen Zellpolarität (Abbildung 3-14) ist in Anbetracht der Tatsache erstaunlich, dass das IF-Netzwerk vermutlich eines der intrazellulären Hauptverbindingssysteme zwischen den CeAJ ist und mit ihnen eine transzelluläre Einheit bildet. Die in IFC-2-defizienten Tieren normal verteilten intestinalen Aktinfilamente (Abbildung 3-14C,D) reichen daher vermutlich, zusammen mit den restlichen IFs des Terminalgeflechts zur Ausbildung und Aufrechterhaltung der epithelialen Polarität der Enterozyten aus. Ultrastrukturelle Analysen der CeAJ zeigten normal ausgebildete Junctionen (Abbildung 3-12D) und eine Wildtyp-Verteilung des Junction-spezifischen Proteins DLG-1 (Abbildung 3-12C'). Die Überprüfung der Barrierefunktion des Darmepithels zeigte, dass die Funktionalität der Junctionen auch in Abwesenheit von IFC-2 gewährleistet ist (Abbildung 3-13). Der *ifc-2* (RNAi)-induzierte Verlust der *endotube*-Integrität hat demnach keine Auswirkungen auf die korrekte Ausbildung und Funktionalität der CeAJ.

Die Tatsache, dass in Keratin 8-mutanten Zellen und Geweben von Säugern ein deformierter Bürstensaum und Veränderungen im *Targeting* von Membranproteinen beobachtet wurden (Oriolo et al., 2007b; Toivola et al., 2004; Wald et al., 2003; Wald et al., 2005), implizieren die mögliche Präsenz derartiger Veränderungen auch in *C. elegans*. Ultrastrukturelle Untersuchungen der apikalen Membrandomäne in IFC-2-defizienten *C. elegans*-Därmen zeigten jedoch keine deutlichen Veränderungen auf (Abbildung 3-10, Abbildung 3-11), und auch die Verteilungsmuster von mehreren apikalen Zytoskelett- und Membrankomponenten waren nicht betroffen (Abbildung 3-14). Die an einigen Stellen weniger stark ausgeprägte IFB-2::CFP-Netzwerk-Dichte und die reduzierte Anzahl von Dottergranula im Enterozytenzytoplasma können jedoch als Folge der veränderten Netzwerkzusammensetzung interpretiert werden. Ein wichtiger Aspekt der *ifc-2* (RNAi)-induzierten intestinalen Lumen-Deformationen ist die erhebliche Oberflächenvergrößerung der apikalen Membrandomäne. Die Tatsache, dass alle apikalen Elemente der deformierten *endotube* strukturell unverändert sind, zeugt von einer enormen kompensatorischen Kapazität des Darms. Selbst wenn der primäre Defekt aufgrund eines mechanisch geschwächten IF-Netzwerks entsteht, müssten in einem zweiten Schritt intrazelluläre Signalwege zum Einsatz kommen, um die beobachteten kompensatorischen Veränderungen zu leisten. Die gegenseitige Beziehung zwischen IFs und Signalwegen ist Gegenstand neuerer Forschungsarbeiten in Säugern (Pallari and Eriksson, 2006). Es ist daher möglich,

dass die reduzierte mechanische Belastbarkeit der *endotube* in IFC-2-*knockdown* Tieren zur Aktivierung von Signalkaskaden führt, die wiederum den beobachteten Phänotyp bedingen. Die Veränderungen haben jedoch keine Konsequenzen für die Anzahl der abgelegten Eier, der Nachkommen oder die korrekte Entwicklung.

Erstaunlicherweise wurden die blasenförmigen Veränderungen des Darmlumens nur in Abwesenheit eines einzigen IFs, nämlich IFC-2 detektiert (siehe Abschnitt 3.2). Systematische RNAi-Experimente der weiteren intestinalen IFs zeigten keine auffälligen phänotypischen Veränderungen des hochspezifischen apikalen IFB-2::CFP-Musters. Auch kombinatorische RNAi-Ansätze, in denen mehrere IFs gleichzeitig herunterreguliert wurden, zeigten den Blasen-Phänotyp nur wenn *ifc-2* (RNAi) beteiligt war. Im Rückschluss lässt dies entweder vermuten, dass IFC-2, im Gegensatz zum Heteropolymer-bildenden IFA/IFB-1-System, Homopolymere bildet, da derartige phänotypische Veränderungen bei keinem der weiteren IF-*knockdowns* auftreten, oder dass der Polymerisierungspartner von IFC-2 austauschbar ist und IFC-2, ähnlich wie IFB-1, mit mehreren anderen IF-Polypeptiden heteropolymerisieren kann. Dies muss in weiteren Experimenten wie z.B. *in vitro*-Polymerisationsstudien überprüft werden. Eindeutig lässt sich anhand der hier erzielten Erkenntnisse jedoch sagen, dass das darmspezifische IFC-2 (Abbildung 3-3) eine besondere Rolle unter den IFs des intestinalen Terminalgeflechts einnimmt, da es als einziges eine Funktion bei der Stabilisierung der *endotube* hat und sein Verlust durch keines der anderen IFs funktionell kompensiert wird.

Zusammenfassend wurde gezeigt, dass ein intaktes intestinales IF-Netzwerk essentiell für die Aufrechterhaltung der Integrität der *endotube* ist, die wiederum die korrekte Lumen-Ausbildung in *C. elegans* bedingt. Damit gelang ein *in vivo*-Beweis für den essentiellen Beitrag eines intakten IF-Netzwerks zur Stressprotektion.

4.2 Identifizierung und Charakterisierung von Modulatoren des intestinalen Intermediärfilament-Systems

Ein zunächst durchgeführter RNAi-Pilot-Screen, der den *knockdown* von insgesamt 215 Kinasen, Phosphatasen, zytoskelettalen Genen sowie Polaritätsfaktoren umfasste, führte nicht zum Erfolg (siehe Abschnitt 3.4), obwohl Kandidatengene vor dem Hintergrund ausgewählt wurden, dass Phosphorylierungsänderungen von IFs und Wechselwirkungen mit anderen Zytoskelettelementen und Polaritätsfaktoren in anderen Systemen als Organisationsmechanismen gelten (Ameen et al., 2001; Toivola et al., 2004; Oriolo et al., 2007a; Oriolo et al., 2007b; Magin et al., 2007). Als Grund dafür kommen natürlich die Möglichkeiten in Frage, dass keines der Gene Einfluss auf das intestinale IF-System hat

oder dass die phänotypischen Veränderungen minimal sind und somit am Binokular nicht detektiert werden konnten. Es kann jedoch auch an der Tatsache liegen, dass RNAi durch Füttern nicht für jedes Gen effizient ist. Um letztere Möglichkeit auszuschließen wurde ein EMS-Mutagenese-Screen zur Identifizierung von Tieren mit veränderten IFB-2::CFP-Mustern durchgeführt. Insgesamt konnten dadurch drei mutante Linien mit modifizierten intestinalen IF-Netzwerken isoliert werden. Die Veränderungen waren bereits am Fluoreszenzbinokular bei relativ kleiner Vergrößerung sichtbar. Der EMS-Mutagenese-Screen erwies sich mit insgesamt 3233 untersuchten diploiden Genomen theoretisch als nicht-gesättigt. Um weitere, auch hypomorphe Mutanten zu isolieren empfiehlt es sich daher, in einem erneuten *Screening*-Versuch bei höheren Vergrößerungen nach Individuen mit Veränderungen im IFB-2::CFP-Muster zu suchen, da so auch schwache Alterationen des IF-Netzwerkes detektierbar sind.

Die Anwendung dieser *forward*-Genetik-Methode, in der zunächst Tiere mit mutanten Phänotypen identifiziert wurden, bedingte die darauffolgende Suche nach den verantwortlichen Genen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden genetische Kartierungen unter Verwendung der *SNP-Mapping*-Methode durchgeführt (siehe Abschnitt 3.5). Bereits bei den chromosomalen Kartierungen der Integrationsorte der IFB-2::CFP-Transgene bewies sich das von Davis und Kollegen etablierte, im 96-Loch-Format applizierbare und standardisierte System als verlässliche Methode zur Ortung von genetischen Veränderungen. So konnten auch die chromosomalen Zuordnungen der mutanten Allele der drei Stämme BJ132, BJ133 und BJ134 auf die Chromosomen X und IV problemlos erfolgen. Ein Komplementierungstest ergab, dass es sich bei den Mutationen der Stämme BJ133 und BJ134 um allelische Varianten desselben Gens handelt. Zur weiteren subchromosomalen Lokalisierung wurde das Verfahren der Intervall-Kartierung angewandt, bei dem man sich dem Ort einer Mutation auf einem Chromosom stets weiter annähert, indem man über den Nachweis von Hawaii-SNPs, die durch Ereignisse der homologen Rekombination in die Nachbarschaft der Mutationen gelangen, das Mutation-tragende Intervall sukzessive verkleinert. Die Intervalle konnten so im Falle von BJ132 (*kc1*) auf unter 100 Gene und für BJ133/BJ134 (*kc2/kc3*) auf unter 200 Gene reduziert werden. Im nächsten Schritt wurden diese Gene durch RNAi an nicht-mutanten Tieren sukzessive ausgeschaltet und somit die Gene, deren *knockdown* die jeweiligen Phänotypen bedingte, identifiziert.

4.2.1 SMA-5: neben IFC-2 ein weiterer essentieller Faktor zur Aufrechterhaltung der Integrität des intestinalen Lumens

Die phänotypischen Veränderungen des Stammes BJ132 sind auf eine Mutation im Gen *sma-5* zurückzuführen. SMA-5 ist eine Serin/Threonin-Kinase, die ein Homolog der MAP-Kinase BMK1/MAPK7/ERK5 in Säugern ist (Watanabe et al., 2005). BMK1/ERK5 wird als Folge von oxidativem Stress oder Hypoosmolarität aktiviert (Abe et al., 1996; Chao et al., 1999) und reguliert in Zellkultursystemen Proliferation und Zellzyklus (Chao et al., 1999; Kato et al., 1998). Der *knockout* von BMK1/ERK5 hat embryonale Letalität von Mäusen mit vaskulären und kardiovaskulären Defekten zur Folge (Regan et al., 2002; Sohn et al., 2002). Bislang wurden *C. elegans-sma-5*-Mutanten im Hinblick auf ihre kleine Körpergröße untersucht. Von daher wurde postuliert, dass, neben dem bekannten Körpergröße-regulierenden DBL-1/TGF β -Signalweg, ein MAP-Kinase-Signalweg an der Regulation der Körpergröße beteiligt ist (Watanabe et al., 2007; Watanabe et al., 2005). SMA-5 wurde dabei eine regulative Aufgabe in Zellwachstumsprozessen und nicht etwa während der Zellteilung zugesprochen, da die Anzahl der Zellen in *sma-5*-Mutanten dem Wildtyp entsprechen (Watanabe et al., 2007; Watanabe et al., 2005). Die in den Studien von Watanabe und Kollegen beschriebenen *sma-5*-Mutanten tragen die Allele *n678* oder *tm448* und zeigten neben der kleinen Körpergröße auch ein langsames Wachstum und die irreguläre Verteilung von einer insgesamt reduzierten Anzahl intestinaler Granula auf. Bis auf die reduzierte Körpergröße treffen diese Veränderungen auch auf die hier isolierten BJ132-Tiere zu. Zwar müssen Messungen von Körperlängen und -dicken von *sma-5* (*kc1*)-tragenden Tiere noch erfolgen, um statistisch zu bestätigen, dass keine Reduktion der Körpergröße vorliegt, der direkte visuelle Vergleich zu einem Wildtyp-Tier weist jedoch keine deutlichen Unterschiede auf. Dies kann bedeuten, dass das hier isolierte Allel *kc1* hypomorph im Vergleich zu den durch Watanabe und Kollegen untersuchten Allelen *n678* und *tm448* ist. Blasenförmige Ausstülpungen des intestinalen Lumens wurden durch Watanabe und Kollegen nicht explizit beschrieben, sind jedoch in der Abbildung 6B der Publikation Watanabe et al., 2005 schwach ausgeprägt erkennbar. SMA-5 wird im Darm, in exkretorischen Zellen, in der Hypodermis und im Pharynx exprimiert (Watanabe et al., 2005). Die Deletion von SMA-5 zeigte hier keine Auswirkungen auf die Verteilung des in den pharyngealen Marginalzellen exprimierten IFs IFA-1a (Abbildung 3-28D), was eine darmspezifische Funktion von SMA-5 nahe legt. Um dies zu prüfen, soll die Verteilung der hypodermalen IFs in *kc1*-tragenden Tieren untersucht werden, indem man diese Würmer mit IFB-1::GFP-exprimierenden Tieren (Stamm CZ3464) kreuzt.

Auffällig ist die große Ähnlichkeit der zeitlichen und strukturellen Ausprägung des intestinalen *sma-5*-Phänotyps zu den blasenförmigen, luminalen Alterationen, die durch *ifc-2* (RNAi) ausgelöst werden (vergleiche z.B. Abbildung 3-16A mit Abbildung 3-8F). Die Ausstülpungen

bilden sich im Laufe der Larvalentwicklung und nehmen mit der Zeit an Größe und Anzahl zu. SMA-5 kann aufgrund dieser Beobachtung, neben IFC-2, eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der mechanischen Stressresistenz der *endotube* zugeschrieben werden, die wiederum die korrekte intestinale Lumenform von *C. elegans* bedingt (siehe Abschnitt 4.1.1). Neben einem intakten IF-Netzwerk spielt somit auch ein MAP-Kinase-Signalweg eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der Integrität der *endotube*. Ob SMA-5 und IFC-2 im gleichen Weg aktiv sind, bleibt bis hierhin offen. Ein Hinweis können *ifc-2* (RNAi)-Experimente in BJ132-Tieren geben: Tritt dabei eine deutliche Verstärkung der phänotypischen Ausprägungen auf, lässt dies auf zwei unabhängige Regulationswege schließen, da die Phänotypen sich addieren. Bleiben die Alterationen unverändert stark, agieren SMA-5 und IFC-2 vermutlich im selben Signalweg. Aufgrund der Tatsache, dass die Phosphorylierung durch MAP-Kinasen Einfluss auf korrekte IF-Funktion und -Anordnung in Säugern haben (Omary and Ku, 2006; Windoffer and Leube, 2004; Woll et al., 2007) ist sogar eine direkte Interaktion denkbar, bei der SMA-5 den Phosphorylierungsstatus von IFC-2 direkt reguliert und dadurch Filamentbildung und/oder Vernetzung im Terminalgeflecht steuert. FRET-Experimente an Tieren, die IFC-2 und SMA-5 fluoreszierend exprimieren sollen daher durchgeführt werden, um zu prüfen, ob beide Faktoren direkt miteinander interagieren.

Um den *sma-5* (*kc1*)-Phänotyp, auch im Vergleich zu den *ifc-2* (RNAi)-induzierten Veränderungen und zu den bereits vorhandenen *sma-5*-Allelen, weiter zu charakterisieren, müssen zusätzliche Untersuchungen erfolgen. Durch elektronenmikroskopische Analysen soll die ultrastrukturelle Morphologie von apikalen Zellkompartimenten, wie der CeAJ, der elektronendichten *endotube* und der Mikrovilli untersucht werden. Es sollen außerdem die Verteilungsmuster der fluoreszierenden apikalen Marker OPT-2, SPH-1 und ACT-5 analysiert werden, um zu prüfen, ob die epitheliale Polarität intakt ist. Zur Identifizierung von weiteren Proteinen, die in Signalwegen zur Regulierung der *endotube*-Integrität beteiligt sind, soll einerseits die Wiederholung des hier durchgeführten *Screens* mit gezielter Suche nach weiteren Kandidaten mit blasenförmigen Veränderungen des Darmlumens erfolgen und andererseits soll ein *Suppressor-Screen* mit BJ132 Tieren durchgeführt und dadurch Kandidaten isoliert werden, die den Phänotyp nicht mehr aufweisen. Um zu testen, ob es sich bei der SMA-5-abhängigen Integrität des IF-Netzwerks um einen konservierten Mechanismus handelt, kann ein Säugerzellkultursystem zum Einsatz kommen. Darin soll getestet werden, ob Zellen, die Fluoreszenz-markierte Keratine exprimieren und mit siRNA gegen das endogene SMA-5-Ortholog BMK1/MAPK7/ERK5 behandelt werden, Veränderungen im Keratin-Netzwerk, auch oder besonders nach Einwirkung von mechanischem Stress aufweisen.

4.2.2 IFO-1 reguliert die Lokalisierung von Intermediärfilamenten und Aktinfilamenten in der subapikalen Enterozyten-Domäne

Im EMS-Mutagenese-Screen konnten die zwei mutanten Allele *kc2* und *kc3* des Gens F42C5.10 isoliert werden. Aufgrund der phänotypischen Alterationen der IF-Verteilung wurde dem bislang uncharakterisierten Gen der Name *ifo-1* (*intermediate filament organizer*) gegeben. Dass dieses Gen tatsächlich für die beobachteten Veränderungen verantwortlich ist, konnte hier einerseits durch den erfolgreichen *Rescue* des mutanten Phänotyps durch Injektion von *yfp*-fusioniertem Wildtyp-*ifo-1* gezeigt werden und andererseits durch die erfolgreiche Generierung der charakteristischen IF-Fehlverteilung durch *ifo-1* (RNAi) (Abbildung 3-35, Abbildung 3-36, Abbildung 3-29). Die letztendliche Bestätigung konnte mittlerweile die AG Bossinger durch Sequenzierungen der *ifo-1*-Allele liefern: *kc2* trägt an Position 79 bp ein Stopkodon, und im Falle von *kc3* wird an Position 919 bp durch einen Basenaustausch eine Spleiß-DNA-Sequenz modifiziert.

In *ifo-1*-Mutanten liegen die fluoreszierenden IFs des apikalen Terminalgeflechts nicht mehr in Form eines engmaschigen, das intestinale Lumen ellipsoid umgebenden Netzwerks vor, sondern als zytoplasmatische Granula und als prominente Akkumulationen entlang der junktionalen Kontakten benachbarter Darmepithelzellen (Abbildung 3-15C,D, Abbildung 3-16B,C, Abbildung 3-37). Diese Beobachtungen konnten elektronenmikroskopisch bestätigt werden: lateral der CeAJ befinden sich große elektronendichte Aggregate (Abbildung 3-33). Da zudem gezeigt wurde, dass IFO-1 im apikalen Bereich von Enterozyten, jedoch nicht in den CeAJ exprimiert wird (Abbildung 3-36), kann postuliert werden, dass IFO-1 im apikalen Darmzellkompartiment für die Lokalisierung und/oder Vernetzung der IFs verantwortlich ist. Zusätzlich zeigt dies, dass die IFs durch ein IFO-1-unabhängiges System mit der CeAJ verbunden sind (Abbildung 4-1A). In Abwesenheit von IFO-1 entfällt die Verankerung der IFs im subapikalen Terminalgeflecht und es kommt zur kompletten Fehllokalisierung der IFs entlang der Zell-Zellkontakte (Abbildung 4-1B). IFO-1 ist somit an der korrekten apikalen Verteilung von IFs in Darmepithelzellen beteiligt. In diesem Zusammenhang soll geprüft werden, ob IFO-1 für andere Prozesse zur Etablierung von epithelialer Zellpolarität essentiell ist. Deswegen sollen verschiedene Fluoreszenz-markierte Polaritätsfaktoren, wie z. B. ERM-1 oder OPT-1 als apikale Membranmarker oder LET-413 als basolateraler Marker, in *ifo-1*-mutante Tiere eingebracht werden. Ebenfalls bleibt zu untersuchen, welche Komponenten neben den IFs Teil der CeAJ-assoziierten- und/oder zytoplasmatischen Anreicherungen sind und welche Proteine des Terminalgeflechts in *ifo-1*-Mutanten subapikal persistieren und somit Teil der residualen elektronendichten Zone bleiben. Auch ist bis jetzt unklar, ob IFO-1 und IFB-2 direkt oder indirekt miteinander interagieren. Aufschluss darüber können Koimmunopräzipitationsexperimente und/oder FRET-Untersuchungen geben.

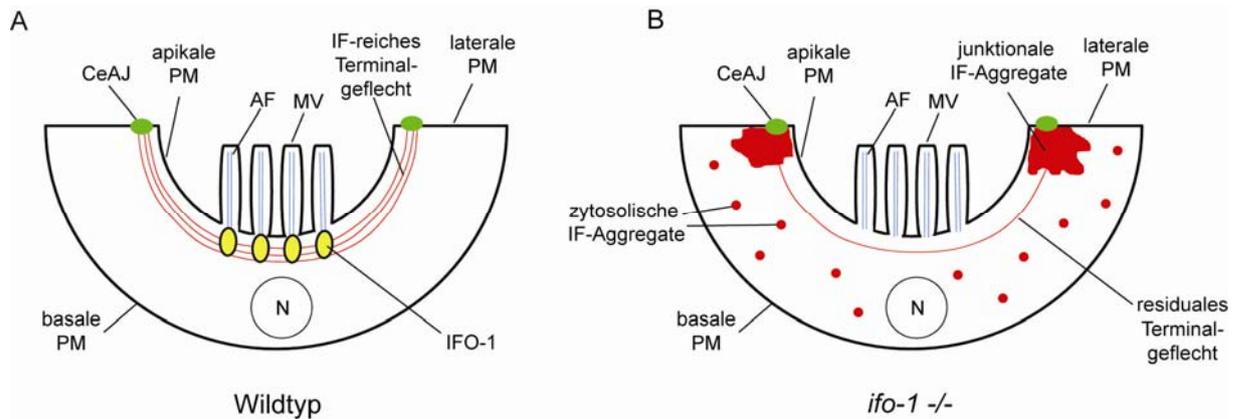


Abbildung 4-1 Modell zur IFO-1-Verteilung und -Funktion in Wildtyp- (A) und *ifo-1*-defizienten (B) Enterozyten.

(A) Im Wildtyp lokalisiert IFO-1 subapikal und ist direkt oder indirekt für die Lokalisation der IFs des Terminalgeflechts verantwortlich. (B) In IFO-1-defizienten Enterozyten aggregieren die IFs lateral an den apikalen Junctionen (CeAJ), da die Verankerung im subapikalen *terminal web* durch IFO-1 wegfällt. Zusätzlich treten vermehrt punktförmige zytosolische IF-Anreicherungen auf.

Plasmamembran (PM), Aktinfilamente (AF), Mikrovilli (MV), Intermediärfilamente (IF), Nucleus (N).

Der Verlust von IFO-1 hat eine Reduktion der intestinalen Aktin-Fluoreszenz zur Folge (Abbildung 3-39). Diese Beobachtung konnte durch Phalloidin-Färbungen an präparierten Därmen von *ifo-1*-mutanten Tieren bestätigt werden (Experimente durchgeführt von Tobias Wiesenfahrt, AG Bossinger). Dies weist darauf hin, dass IFO-1 nicht nur IFs reguliert, sondern dass es sich vielmehr um einen allgemeinen Zytoskelett-Organisator handelt. Um dies weiter zu prüfen soll die Verteilung von weiteren Zytoskelettelementen, wie z.B. Mikrotubuli in *ifo-1*-mutanten Tieren untersucht werden. Darüberhinaus kann die Tatsache, dass in IFO-1-defizienten Tieren Aktinfilamente und IFs subapikal fehlen, bedeuten, dass IFO-1 ein *Linker*-Protein zwischen beiden Filamenttypen darstellt. Da Aktin nicht in den IF-Aggregaten der CeAJ angereichert ist, wird vermutet, dass ungekoppeltes Aktin abgebaut wird. Erstaunlicherweise sehen die Aktinbündel in den Mikrovilli ultrastrukturell unverändert aus (Abbildung 3-33). Im Hinblick auf die durchgeführten Nachweismethoden von Aktin, impliziert dies zum einen, dass ACT-5 Terminalgeflecht-spezifisch ist und die Aktinfilamente der Mikrovilli aus anderen Aktinproteinen bestehen. Zum anderen kann die schwache Phalloidin-Bindung an die Aktinfilamente der Mikrovilli mit einer schlechten Zugänglichkeit des Fluoreszenz-markierten Phalloidins begründet werden.

ifo-1 kodiert für ein 1292 Aminosäuren langes Polypeptid. Daneben existiert vermutlich eine trunkierte Spleiß-Variante, die den carboxyterminalen, ca. 350 Aminosäuren langen Teil des Proteins, umfasst (siehe Abschnitt 3.6.1). Unter Verwendung von verschiedenen BLAST-Datenbanken konnten bisher keine eindeutigen *ifo-1*-Orthologe in Organismen anderer Phyla identifiziert werden. Lediglich die beiden *Caenorhabditis*-Arten *C. briggsae* und *C. japonica* konnten Orthologe aufweisen. Dies spricht zunächst dafür, dass es sich bei IFO-1

möglicherweise um ein *Caenorhabditis*-spezifisches Protein handelt. Da man allerdings bei Säugern ein analoges Zytofilament-reiches Terminalgeflecht im Darmepithel vorfindet (Hirokawa et al., 1982), ist ein systemischer Vergleich, vor allem wenn weitere Interaktionspartner von IFO-1 und somit die zugrundeliegenden Signalwege und Interaktionsnetze identifiziert werden können, dennoch zu erwarten. Die *Alignments* der *Caenorhabditis*-Orthologe weisen N-terminal die größten Homologie-Bereiche auf (siehe Abschnitt 7.4), was auf funktionelle Domänen hinweisen kann. Zur Identifikation der funktionell relevanten Regionen empfiehlt es sich allerdings *Rescue*-Experimente mit verschiedenen Teilstücken des Proteins durchzuführen. Es bleibt außerdem zu prüfen, ob die trunkierte Version von IFO-1 tatsächlich existiert, indem sie aus Wurm-Gesamt-cDNA amplifiziert werden soll. Gelingt dies, kann wiederum ein *Rescue*-Experiment mit der kurzen Variante zeigen, ob der C-terminale Bereich von IFO-1 die funktionell relevanten Domänen enthält. Die *Wormbase* zeigt in der IFO-1-Aminosäuresequenz eine Prolin-reiche Domäne auf, die den vorderen Teil einer ebenfalls vorhergesagten FH2 (*formin-homology*)-Domäne darstellt (Abbildung 3-31). FH2-Domänen kommen in Forminen vor, wo sie in den meisten Fällen eine vorgelagerte Prolin-reiche FH1-Domäne aufweisen (Wallar and Alberts, 2003; Zigmond et al., 2003). Dies weist darauf hin, dass es sich bei der Prolin-reichen Region von IFO-1 um eine Form einer FH1-Domäne handeln kann. Formine kommen ubiquitär in Eukaryoten vor (Rivero et al., 2005) und sind außerordentlich wirksame Regulatoren der Aktindynamik. Prolin-reiche FH1-Domänen können mit Profilin interagieren, welches die Aktin-Polymerisation stimuliert (Witke, 2004) und FH2-Domänen sind für die Dimerisierung und für die Nukleation von G-Aktin *in vitro* notwendig und wirken als Gegenspieler von „capping“-Proteinen, indem sie zum einen am Plusende assoziieren und zum anderen lineare Aktinfilamente nukleieren (Otomo and Rosen, 2005; Otomo et al., 2005; Shimada et al., 2004). IFO-1 wird zwar nicht als Formin-Protein klassifiziert, allerdings geben diese Vorhersagen Hinweise darauf, dass IFO-1 Aktin- und/oder Profilin-bindende Eigenschaften haben kann. Dies unterstreicht die Behauptung, dass IFO-1 die apikale Aktinverteilung reguliert. Die in der *Wormbase* verzeichneten Domänen-Vorhersagen sind allerdings durchaus kritisch zu betrachten, da durch keine weitere Proteindatenbank die FH2-Domäne der IFO-1-Sequenz vorhergesagt wurde. Der aufgezeigte auffällige Histidin-Reichtum von IFO-1 (Abbildung 3-31) erinnert an das Intermediärfilament-assoziierte Protein Filaggrin, dem eine Funktion bei der Filamentbündelung zugesprochen wird (Listwan and Rothnagel, 2004; Steinert et al., 1981). Basierend auf diesen vorhergesagten Sequenzeigenschaften gilt es in weiteren jedoch gezielten Interaktionsstudien zu überprüfen, ob IFO-1 direkt oder indirekt an IFs und/oder an Aktin bindet. Die in der *Wormbase* gelisteten Interaktionspartner von IFO-1 wurden in *Yeast-Two-Hybrid*-Versuchen identifiziert (Li et al., 2004; Walhout et al., 2000). Dabei handelt es sich um die MAP-Kinase MPK-1 und um SEL-10, einer E2-E3-Ubiquitin-

Ligase. Diese Interaktionen legen eine mögliche Phosphorylierung und/oder Ubiquitinierung von IFO-1 nahe. Ob es sich bei IFO-1 tatsächlich um ein Phosphoprotein oder ein ubiquitiniertes Protein handelt und ob MPK-1 und SEL-10 dafür tatsächlich verantwortlich sind, muss experimentell überprüft werden.

Zusammengefasst konnte gezeigt werden, dass es sich bei IFO-1 um ein neuartiges Protein handelt, welches im subapikalen Zellkompartiment von Enterozyten in *C. elegans* exprimiert wird und für die korrekte Lokalisierung von IFs und Aktinfilamenten im Terminalgeflecht verantwortlich ist.

4.3 Fazit

In dieser Arbeit konnte ein *in vivo*-Modell zur Untersuchung von Intermediärfilamenten etabliert werden. Die stabilen *C. elegans*-Stämme eignen sich zum Einsatz in optischen *Screens* auf der Suche nach veränderten IF-Mustern im Darm, da Alterationen der subapikal lokalisierten IFs leicht detektierbar sind. So konnte zunächst gezeigt werden, dass IFC-2 als einziges der insgesamt sechs intestinalen IFs eine Rolle bei der Aufrechterhaltung der luminalen Form einnimmt. Dem intestinalen IF-System kann daher eine Funktion im Rahmen der Stressresistenz der *endotube* zugeschrieben werden. In einem genomweiten *Screen* konnten drei Kandidaten isoliert werden, die veränderte IF-Muster aufweisen. Durch SNP-Kartierung wurden die zwei verantwortlichen Gene identifiziert. SMA-5, eine MAP-Kinase, ist ebenfalls für die Aufrechterhaltung der stressresistenten *endotube* verantwortlich, da die IF-Alterationen in Form von blasenförmigen luminalen Ausstülpungen denen von *ifc-2* (RNAi) entsprechen. Eine detaillierte Untersuchung der Veränderungen mit funktionellen Studien muss noch erfolgen. Es bleibt zudem zu prüfen, ob und in welcher Reihenfolge beide Faktoren Mitglieder einer Kaskade sind und ob es sich um einen konservierten Mechanismus handelt. Desweiteren konnten zwei mutante Allele des bislang uncharakterisierten Gens *ifo-1* (*intermediate filament organizer*) isoliert werden. IFO-1 wird im apikalen Zellkompartiment, aber nicht in der CeAJ exprimiert. In *ifo-1*-Mutanten kommt es zu einer kompletten Fehlverteilung der subapikalen IFs in Form von prominenten Anlagerungen lateral der apikalen Junctionen und in Form von zytoplasmatischen Aggregaten. Zudem sind die apikalen Aktinfilamente stark reduziert. Daraus ergibt sich die attraktive Hypothese, dass IFO-1 als *Linker* zwischen Intermediärfilamenten und Aktinfilamenten fungiert.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Intermediärfilamente (IFs) sind neben Mikrotubuli und Aktinfilamenten die dritte filamentäre Komponente des Zytoskeletts. Sie wirken als mechanische Stabilisatoren, sind außerdem an Zelldifferenzierung, Proliferation und Apoptose beteiligt und tragen zu Zellpolarität bei. IFs sind dynamische Strukturen, die zelltypspezifisch in unterschiedlichen Anordnungen und Abundanzen vorkommen und von Signalkaskaden beeinflusst werden. Die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen dieser fein abgestimmten Prozesse sind weitgehend unbekannt. In dieser Arbeit sollte deswegen ein Tiermodell entwickelt werden, um Regulatoren der IF-(Netzwerk)-Organisation *in vivo* zu untersuchen und zu identifizieren. Dazu wurde *C. elegans* ausgewählt, da es sich hierbei um einen genetisch gut charakterisierten und leicht manipulierbaren Organismus handelt, in dessen Genom elf Gene für zytoplasmatische IFs kodieren.

Zunächst wurden stabil transgene *C. elegans*-Linien generiert, die fluoreszierende IFs exprimieren. Es konnte gezeigt werden, dass das darmspezifische IFB-2::CFP im Bereich des apikalen Junctionskomplex verankert ist und nahezu vollständig im subapikalen Terminalgeflecht der Enterozyten lokalisiert, das als Teil der *endotube* besonders stabil und widerstandsfähig ist. Wenn diese Tiere mit dsRNA gegen das ebenfalls im Terminalgeflecht exprimierte IF *ifc-2* behandelt wurden, entwickelten sich blasenförmige Ausstülpungen des Darmlumens, die auf eine Schwächung der rigiden und formgebenden *endotube* hinwiesen und damit einen direkten *in vivo*-Beweis für die stressprotektive Funktion des intestinalen IF-Netzwerks lieferten.

Die leichte Detektierbarkeit des IFB-2::CFP-Musters wurde in einem optischen *Screen* ausgenutzt, bei dem nach chemischer Mutagenese nach Veränderungen im IF-Muster gefahndet wurde. Hierbei wurden drei Mutanten isoliert. In Komplementierungsanalysen stellte sich heraus, dass es sich in zwei Fällen um Allele desselben Gens handelt. Die Identifizierung der betroffenen Gene gelang durch eine PCR-basierte Kartierung von *single nucleotide polymorphisms* nach Verpaarung mit dem Hawaii-Stamm (*snp-mapping*) und anschließender RNAi-Analyse der Einzelgene in den identifizierten Chromosomenabschnitten. Im einen Fall handelte es sich um das *sma-5*-Gen, einer Serin/Threonin-Kinase mit Homologie zu den MAP-Kinasen MAPK7/ERK5 der Säuger. Hier wurden, ebenso wie beim *ifc-2* (RNAi)-Phänotyp, progressive blasenförmige Ausstülpungen des Darmlumens beobachtet. Die beiden anderen Allele tragen Mutationen in einem bisher nicht näher charakterisierten Gen. In diesen Würmern kommt es zu einer vollständigen Auflösung des IFB-2::CFP-Netzwerks mit prominenten Akkumulationen um die apikalen Junctionen. Das Darmlumen ist stellenweise geweitet und das elektronendichte Terminalgeflecht fehlt fast vollständig, die Integrität des Darmepithels ist jedoch nicht kompromittiert. Die anderen IFs des Terminalgeflechts sind ebenfalls fehlverteilt, und die intestinale Expression von Aktin ist stark reduziert. Expressionskonstrukte des Gens zeigten weiterhin, dass es darmspezifisch synthetisiert wird und mit den IFs im Terminalgeflecht kolokalisiert. Das Protein ist, ähnlich wie das IF-assoziierte Filaggrin der Säuger ausgesprochen histidinreich. Es enthält außerdem eine Prolin-reiche Domäne, die Teil einer potentiellen Aktin-Bindedomäne ist. Auf Grund all dieser Eigenschaften wird die Bezeichnung IFO-1 (*intermediate filament organizer*) für das neue Protein vorgeschlagen, das möglicherweise als struktureller Zytoskelett-Linker wirkt.

Die vorgestellten Ergebnisse untermauern die Bedeutung von *C. elegans* für die Identifizierung von Faktoren, die IF-Netzwerke regulieren, und die Möglichkeit, Defekte im lebenden Gesamtorganismus zu bestimmen.

6 LITERATURVERZEICHNIS

- Abe, J., Kusuvara, M., Ulevitch, R. J., Berk, B. C. and Lee, J. D.** (1996). Big mitogen-activated protein kinase 1 (BMK1) is a redox-sensitive kinase. *J Biol Chem* **271**, 16586-90.
- Abraham, C., Hutter, H., Palfreyman, M. T., Spatkowski, G., Weimer, R. M., Windoffer, R., Jorgensen, E. M. and Leube, R. E.** (2006). Synaptic tetraspan vesicle membrane proteins are conserved but not needed for synaptogenesis and neuronal function in *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 8227-32.
- Ameen, N. A., Figueroa, Y. and Salas, P. J.** (2001). Anomalous apical plasma membrane phenotype in CK8-deficient mice indicates a novel role for intermediate filaments in the polarization of simple epithelia. *J Cell Sci* **114**, 563-75.
- Bartnik, E., Osborn, M. and Weber, K.** (1986). Intermediate filaments in muscle and epithelial cells of nematodes. *J Cell Biol* **102**, 2033-41.
- Bauman, P. A., Dalton, W. S., Anderson, J. M. and Cress, A. E.** (1994). Expression of cytokeratin confers multiple drug resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 5311-4.
- Bossinger, O., Fukushige, T., Claeys, M., Borgonie, G. and McGhee, J. D.** (2004). The apical disposition of the *Caenorhabditis elegans* intestinal terminal web is maintained by LET-413. *Dev Biol* **268**, 448-56.
- Brenner, S.** (1974). The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* **77**, 71-94.
- Chao, T. H., Hayashi, M., Tapping, R. I., Kato, Y. and Lee, J. D.** (1999). MEKK3 directly regulates MEK5 activity as part of the big mitogen-activated protein kinase 1 (BMK1) signaling pathway. *J Biol Chem* **274**, 36035-8.
- Coulombe, P. A., Bousquet, O., Ma, L., Yamada, S. and Wirtz, D.** (2000). The 'ins' and 'outs' of intermediate filament organization. *Trends Cell Biol* **10**, 420-8.
- Coulombe, P. A. and Fuchs, E.** (1990). Elucidating the early stages of keratin filament assembly. *J Cell Biol* **111**, 153-69.
- Coulombe, P. A. and Omary, M. B.** (2002). 'Hard' and 'soft' principles defining the structure, function and regulation of keratin intermediate filaments. *Curr Opin Cell Biol* **14**, 110-22.
- Coulombe, P. A. and Wong, P.** (2004). Cytoplasmic intermediate filaments revealed as dynamic and multipurpose scaffolds. *Nat Cell Biol* **6**, 699-706.
- Cox, E. A. and Hardin, J.** (2004). Sticky worms: adhesion complexes in *C. elegans*. *J Cell Sci* **117**, 1885-97.
- Davis, M. W., Hammarlund, M., Harrach, T., Hullett, P., Olsen, S. and Jorgensen, E. M.** (2005). Rapid single nucleotide polymorphism mapping in *C. elegans*. *BMC Genomics* **6**, 118.
- Dodemont, H., Riemer, D., Ledger, N. and Weber, K.** (1994). Eight genes and alternative RNA processing pathways generate an unexpectedly large diversity of cytoplasmic intermediate filament proteins in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Embo J* **13**, 2625-38.

- Dodemont, H., Riemer, D. and Weber, K.** (1990). Structure of an invertebrate gene encoding cytoplasmic intermediate filament (IF) proteins: implications for the origin and the diversification of IF proteins. *Embo J* **9**, 4083-94.
- Doolittle, R. F.** (1989). Redundancies in protein sequences. *Prediction of protein structure and the principles of protein conformation*, 599-623.
- Drubin, D. G. and Nelson, W. J.** (1996). Origins of cell polarity. *Cell* **84**, 335-44.
- Eaton, S. and Simons, K.** (1995). Apical, basal, and lateral cues for epithelial polarization. *Cell* **82**, 5-8.
- Elbashir, S. M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K. and Tuschl, T.** (2001). Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* **411**, 494-8.
- Erber, A., Riemer, D., Bovenschulte, M. and Weber, K.** (1998). Molecular phylogeny of metazoan intermediate filament proteins. *J Mol Evol* **47**, 751-62.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E. and Mello, C. C.** (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **391**, 806-11.
- Francis, G. R. and Waterston, R. H.** (1985). Muscle organization in *Caenorhabditis elegans*: localization of proteins implicated in thin filament attachment and I-band organization. *J Cell Biol* **101**, 1532-49.
- Fuchs, E. and Karakesisoglou, I.** (2001). Bridging cytoskeletal intersections. *Genes Dev* **15**, 1-14.
- Fuchs, E. and Yang, Y.** (1999). Crossroads on cytoskeletal highways. *Cell* **98**, 547-50.
- Georgatos, S. D. and Maison, C.** (1996). Integration of intermediate filaments into cellular organelles. *Int Rev Cytol* **164**, 91-138.
- Hapiak, V., Hresko, M. C., Schriefer, L. A., Saiyasisongkham, K., Bercher, M. and Plenefisch, J.** (2003). *mua-6*, a gene required for tissue integrity in *Caenorhabditis elegans*, encodes a cytoplasmic intermediate filament. *Dev Biol* **263**, 330-42.
- Herrmann, H. and Aebi, U.** (1998). Structure, assembly, and dynamics of intermediate filaments. *Subcell Biochem* **31**, 319-62.
- Herrmann, H. and Aebi, U.** (2004). Intermediate filaments: molecular structure, assembly mechanism, and integration into functionally distinct intracellular Scaffolds. *Annu Rev Biochem* **73**, 749-89.
- Herrmann, H., Bar, H., Kreplak, L., Strelkov, S. V. and Aebi, U.** (2007). Intermediate filaments: from cell architecture to nanomechanics. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 562-73.
- Hesse, M., Magin, T. M. and Weber, K.** (2001). Genes for intermediate filament proteins and the draft sequence of the human genome: novel keratin genes and a surprisingly high number of pseudogenes related to keratin genes 8 and 18. *J Cell Sci* **114**, 2569-75.
- Hesse, M., Zimek, A., Weber, K. and Magin, T. M.** (2004). Comprehensive analysis of keratin gene clusters in humans and rodents. *Eur J Cell Biol* **83**, 19-26.

- Hirokawa, N., Tilney, L. G., Fujiwara, K. and Heuser, J. E.** (1982). Organization of actin, myosin, and intermediate filaments in the brush border of intestinal epithelial cells. *J Cell Biol* **94**, 425-43.
- Hodgkin, J., Horvitz, H. R. and Brenner, S.** (1979). Nondisjunction Mutants of the Nematode CAENORHABDITIS ELEGANS. *Genetics* **91**, 67-94.
- Inada, H., Izawa, I., Nishizawa, M., Fujita, E., Kiyono, T., Takahashi, T., Momoi, T. and Inagaki, M.** (2001). Keratin attenuates tumor necrosis factor-induced cytotoxicity through association with TRADD. *J Cell Biol* **155**, 415-26.
- Izawa, I. and Inagaki, M.** (2006). Regulatory mechanisms and functions of intermediate filaments: a study using site- and phosphorylation state-specific antibodies. *Cancer Sci* **97**, 167-74.
- Janmey, P. A., Euteneuer, U., Traub, P. and Schliwa, M.** (1991). Viscoelastic properties of vimentin compared with other filamentous biopolymer networks. *J Cell Biol* **113**, 155-60.
- Kamath, R. S. and Ahringer, J.** (2003). Genome-wide RNAi screening in *Caenorhabditis elegans*. *Methods* **30**, 313-21.
- Kamath, R. S., Fraser, A. G., Dong, Y., Poulin, G., Durbin, R., Gotta, M., Kanapin, A., Le Bot, N., Moreno, S., Sohrmann, M. et al.** (2003). Systematic functional analysis of the *Caenorhabditis elegans* genome using RNAi. *Nature* **421**, 231-7.
- Karabinos, A., Schmidt, H., Harborth, J., Schnabel, R. and Weber, K.** (2001a). Essential roles for four cytoplasmic intermediate filament proteins in *Caenorhabditis elegans* development. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 7863-8.
- Karabinos, A., Schulze, E., Klisch, T., Wang, J. and Weber, K.** (2002). Expression profiles of the essential intermediate filament (IF) protein A2 and the IF protein C2 in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Mech Dev* **117**, 311-4.
- Karabinos, A., Schulze, E., Schunemann, J., Parry, D. A. and Weber, K.** (2003). In vivo and in vitro evidence that the four essential intermediate filament (IF) proteins A1, A2, A3 and B1 of the nematode *Caenorhabditis elegans* form an obligate heteropolymeric IF system. *J Mol Biol* **333**, 307-19.
- Karabinos, A., Schunemann, J. and Weber, K.** (2004). Most genes encoding cytoplasmic intermediate filament (IF) proteins of the nematode *Caenorhabditis elegans* are required in late embryogenesis. *Eur J Cell Biol* **83**, 457-68.
- Karabinos, A., Wang, J., Wenzel, D., Panopoulou, G., Lehrach, H. and Weber, K.** (2001b). Developmentally controlled expression patterns of intermediate filament proteins in the cephalochordate *Branchiostoma*. *Mech Dev* **101**, 283-8.
- Kato, Y., Tapping, R. I., Huang, S., Watson, M. H., Ulevitch, R. J. and Lee, J. D.** (1998). Bmk1/Erk5 is required for cell proliferation induced by epidermal growth factor. *Nature* **395**, 713-6.
- Kennerdell, J. R. and Carthew, R. W.** (1998). Use of dsRNA-mediated genetic interference to demonstrate that frizzled and frizzled 2 act in the wingless pathway. *Cell* **95**, 1017-26.
- Kennerdell, J. R. and Carthew, R. W.** (2000). Heritable gene silencing in *Drosophila* using double-stranded RNA. *Nat Biotechnol* **18**, 896-8.

- Kim, S. and Coulombe, P. A.** (2007). Intermediate filament scaffolds fulfill mechanical, organizational, and signaling functions in the cytoplasm. *Genes Dev* **21**, 1581-97.
- Kimble, J. and Sharrock, W. J.** (1983). Tissue-specific synthesis of yolk proteins in *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol* **96**, 189-96.
- Kouklis, P. D., Hutton, E. and Fuchs, E.** (1994). Making a connection: direct binding between keratin intermediate filaments and desmosomal proteins. *J Cell Biol* **127**, 1049-60.
- Ku, N. O. and Omary, M. B.** (2006). A disease- and phosphorylation-related nonmechanical function for keratin 8. *J Cell Biol* **174**, 115-25.
- Ku, N. O., Zhou, X., Toivola, D. M. and Omary, M. B.** (1999). The cytoskeleton of digestive epithelia in health and disease. *Am J Physiol* **277**, G1108-37.
- Legouis, R., Gansmuller, A., Sookhareea, S., Boshier, J. M., Baillie, D. L. and Labouesse, M.** (2000). LET-413 is a basolateral protein required for the assembly of adherens junctions in *Caenorhabditis elegans*. *Nat Cell Biol* **2**, 415-22.
- Leung, B., Hermann, G. J. and Priess, J. R.** (1999). Organogenesis of the *Caenorhabditis elegans* intestine. *Dev Biol* **216**, 114-34.
- Li, S., Armstrong, C. M., Bertin, N., Ge, H., Milstein, S., Boxem, M., Vidalain, P. O., Han, J. D., Chesneau, A., Hao, T. et al.** (2004). A map of the interactome network of the metazoan *C. elegans*. *Science* **303**, 540-3.
- Liao, J., Ku, N. O. and Omary, M. B.** (1997). Stress, apoptosis, and mitosis induce phosphorylation of human keratin 8 at Ser-73 in tissues and cultured cells. *J Biol Chem* **272**, 17565-73.
- Listwan, P. and Rothnagel, J. A.** (2004). Keratin bundling proteins. *Methods Cell Biol* **78**, 817-27.
- MacQueen, A. J., Baggett, J. J., Perumov, N., Bauer, R. A., Januszewski, T., Schriefer, L. and Waddle, J. A.** (2005). ACT-5 is an essential *Caenorhabditis elegans* actin required for intestinal microvilli formation. *Mol Biol Cell* **16**, 3247-59.
- Madl, J. E. and Herman, R. K.** (1979). Polyploids and sex determination in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* **93**, 393-402.
- Magin, T. M., Vijayaraj, P. and Leube, R. E.** (2007). Structural and regulatory functions of keratins. *Exp Cell Res* **313**, 2021-32.
- McGhee, J. D.** (2007). The *C. elegans* intestine. *WormBook*, 1-36.
- Mocellin, S. and Provenzano, M.** (2004). RNA interference: learning gene knock-down from cell physiology. *J Transl Med* **2**, 39.
- Mogensen, M. M. and Tucker, J. B.** (1988). Intermicrotubular actin filaments in the transalar cytoskeletal arrays of *Drosophila*. *J Cell Sci* **91 (Pt 3)**, 431-8.
- Munn, E. A. and Greenwood, C. A.** (1983). Endotube-brush border complexes dissected from the intestines of *Haemonchus contortus* and *Ancylostoma caninum*. *Parasitology* **87 (Pt1)**, 129-37.

- Munn, E. A., Greenwood, C.A.** (1984). The occurrence of submicrovillar endotube (modified terminal web) and associated structures in the intestinal epithelia of nematodes. *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.* **306**, 1–18.
- Nehrke, K.** (2003). A reduction in intestinal cell pH due to loss of the *Caenorhabditis elegans* Na⁺/H⁺ exchanger NHX-2 increases life span. *J Biol Chem* **278**, 44657-66.
- Omary, M. B. and Ku, N. O.** (2006). Cell biology: skin care by keratins. *Nature* **441**, 296-7.
- Oriolo, A. S., Wald, F. A., Canessa, G. and Salas, P. J.** (2007a). GCP6 binds to intermediate filaments: a novel function of keratins in the organization of microtubules in epithelial cells. *Mol Biol Cell* **18**, 781-94.
- Oriolo, A. S., Wald, F. A., Ramsauer, V. P. and Salas, P. J.** (2007b). Intermediate filaments: a role in epithelial polarity. *Exp Cell Res* **313**, 2255-64.
- Otomo, T. and Rosen, M. K.** (2005). [Structure and function of Formin homology 2 domain]. *Tanpakushitsu Kakusan Koso* **50**, 1088-93.
- Otomo, T., Tomchick, D. R., Otomo, C., Panchal, S. C., Machius, M. and Rosen, M. K.** (2005). Structural basis of actin filament nucleation and processive capping by a formin homology 2 domain. *Nature* **433**, 488-94.
- Paddison, P. J. and Hannon, G. J.** (2002). RNA interference: the new somatic cell genetics? *Cancer Cell* **2**, 17-23.
- Pallari, H. M. and Eriksson, J. E.** (2006). Intermediate filaments as signaling platforms. *Sci STKE* **2006**, pe53.
- Paramio, J. M., Casanova, M. L., Segrelles, C., Mittnacht, S., Lane, E. B. and Jorcano, J. L.** (1999). Modulation of cell proliferation by cytokeratins K10 and K16. *Mol Cell Biol* **19**, 3086-94.
- Pekny, M. and Lane, E. B.** (2007). Intermediate filaments and stress. *Exp Cell Res* **313**, 2244-54.
- Quinlan, R. A., Schiller, D. L., Hatzfeld, M., Achtstatter, T., Moll, R., Jorcano, J. L., Magin, T. M. and Franke, W. W.** (1985). Patterns of expression and organization of cytokeratin intermediate filaments. *Ann N Y Acad Sci* **455**, 282-306.
- Regan, C. P., Li, W., Boucher, D. M., Spatz, S., Su, M. S. and Kuida, K.** (2002). Erk5 null mice display multiple extraembryonic vascular and embryonic cardiovascular defects. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 9248-53.
- Ridge, K. M., Linz, L., Flitney, F. W., Kuczmarski, E. R., Chou, Y. H., Omary, M. B., Sznajder, J. I. and Goldman, R. D.** (2005). Keratin 8 phosphorylation by protein kinase C delta regulates shear stress-mediated disassembly of keratin intermediate filaments in alveolar epithelial cells. *J Biol Chem* **280**, 30400-5.
- Rivero, F., Muramoto, T., Meyer, A. K., Urushihara, H., Uyeda, T. Q. and Kitayama, C.** (2005). A comparative sequence analysis reveals a common GBD/FH3-FH1-FH2-DAD architecture in formins from Dictyostelium, fungi and metazoa. *BMC Genomics* **6**, 28.

- Rogers, M. A., Edler, L., Winter, H., Langbein, L., Beckmann, I. and Schweizer, J.** (2005). Characterization of new members of the human type II keratin gene family and a general evaluation of the keratin gene domain on chromosome 12q13.13. *J Invest Dermatol* **124**, 536-44.
- Rubin, G. M., Yandell, M. D., Wortman, J. R., Gabor Miklos, G. L., Nelson, C. R., Hariharan, I. K., Fortini, M. E., Li, P. W., Apweiler, R., Fleischmann, W. et al.** (2000). Comparative genomics of the eukaryotes. *Science* **287**, 2204-15.
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A. R.** (1992). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. 1977. *Biotechnology* **24**, 104-8.
- Schnabel, R., Hutter, H., Moerman, D. and Schnabel, H.** (1997). Assessing normal embryogenesis in *Caenorhabditis elegans* using a 4D microscope: variability of development and regional specification. *Dev Biol* **184**, 234-65.
- Schweizer, J., Bowden, P. E., Coulombe, P. A., Langbein, L., Lane, E. B., Magin, T. M., Maltais, L., Omary, M. B., Parry, D. A., Rogers, M. A. et al.** (2006). New consensus nomenclature for mammalian keratins. *J Cell Biol* **174**, 169-74.
- Segbert, C., Johnson, K., Theres, C., van Furden, D. and Bossinger, O.** (2004). Molecular and functional analysis of apical junction formation in the gut epithelium of *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol* **266**, 17-26.
- Shimada, A., Nyitrai, M., Vetter, I. R., Kuhlmann, D., Bugyi, B., Narumiya, S., Geeves, M. A. and Wittinghofer, A.** (2004). The core FH2 domain of diaphanous-related formins is an elongated actin binding protein that inhibits polymerization. *Mol Cell* **13**, 511-22.
- Sohn, S. J., Sarvis, B. K., Cado, D. and Winoto, A.** (2002). ERK5 MAPK regulates embryonic angiogenesis and acts as a hypoxia-sensitive repressor of vascular endothelial growth factor expression. *J Biol Chem* **277**, 43344-51.
- Steinert, P. M., Cantieri, J. S., Teller, D. C., Lonsdale-Eccles, J. D. and Dale, B. A.** (1981). Characterization of a class of cationic proteins that specifically interact with intermediate filaments. *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**, 4097-101.
- Steinert, P. M., North, A. C. and Parry, D. A.** (1994). Structural features of keratin intermediate filaments. *J Invest Dermatol* **103**, 19S-24S.
- Strnad, P., Windoffer, R. and Leube, R. E.** (2002). Induction of rapid and reversible cytokeratin filament network remodeling by inhibition of tyrosine phosphatases. *J Cell Sci* **115**, 4133-48.
- Strome, S. and Wood, W. B.** (1983). Generation of asymmetry and segregation of germ-line granules in early *C. elegans* embryos. *Cell* **35**, 15-25.
- Styers, M. L., Kowalczyk, A. P. and Faundez, V.** (2005). Intermediate filaments and vesicular membrane traffic: the odd couple's first dance? *Traffic* **6**, 359-65.
- Sulston, J. E.** (1976). Post-embryonic development in the ventral cord of *Caenorhabditis elegans*. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **275**, 287-97.
- Sulston, J. E., Schierenberg, E., White, J. G. and Thomson, J. N.** (1983). The embryonic cell lineage of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol* **100**, 64-119.

- Tao, G. Z., Toivola, D. M., Zhou, Q., Strnad, P., Xu, B., Michie, S. A. and Omary, M. B.** (2006). Protein phosphatase-2A associates with and dephosphorylates keratin 8 after hypotonic stress in a site- and cell-specific manner. *J Cell Sci* **119**, 1425-32.
- Thierry-Mieg, D. and Thierry-Mieg, J.** (2006). AceView: a comprehensive cDNA-supported gene and transcripts annotation. *Genome Biol* **7 Suppl 1**, S12 1-14.
- Timmons, L., Court, D. L. and Fire, A.** (2001). Ingestion of bacterially expressed dsRNAs can produce specific and potent genetic interference in *Caenorhabditis elegans*. *Gene* **263**, 103-12.
- Toivola, D. M., Krishnan, S., Binder, H. J., Singh, S. K. and Omary, M. B.** (2004). Keratins modulate colonocyte electrolyte transport via protein mistargeting. *J Cell Biol* **164**, 911-21.
- Toivola, D. M., Nieminen, M. I., Hesse, M., He, T., Baribault, H., Magin, T. M., Omary, M. B. and Eriksson, J. E.** (2001). Disturbances in hepatic cell-cycle regulation in mice with assembly-deficient keratins 8/18. *Hepatology* **34**, 1174-83.
- Toivola, D. M., Tao, G. Z., Habtezion, A., Liao, J. and Omary, M. B.** (2005). Cellular integrity plus: organelle-related and protein-targeting functions of intermediate filaments. *Trends Cell Biol* **15**, 608-17.
- Toivola, D. M., Zhou, Q., English, L. S. and Omary, M. B.** (2002). Type II keratins are phosphorylated on a unique motif during stress and mitosis in tissues and cultured cells. *Mol Biol Cell* **13**, 1857-70.
- Van Furden, D., Johnson, K., Segbert, C. and Bossinger, O.** (2004). The *C. elegans* ezrin-radixin-moesin protein ERM-1 is necessary for apical junction remodelling and tubulogenesis in the intestine. *Dev Biol* **272**, 262-76.
- Wald, F. A., Figueroa, Y., Oriolo, A. S. and Salas, P. J.** (2003). Membrane repolarization is delayed in proximal tubules after ischemia-reperfusion: possible role of microtubule-organizing centers. *Am J Physiol Renal Physiol* **285**, F230-40.
- Wald, F. A., Oriolo, A. S., Casanova, M. L. and Salas, P. J.** (2005). Intermediate filaments interact with dormant ezrin in intestinal epithelial cells. *Mol Biol Cell* **16**, 4096-107.
- Walhout, A. J., Sordella, R., Lu, X., Hartley, J. L., Temple, G. F., Brasch, M. A., Thierry-Mieg, N. and Vidal, M.** (2000). Protein interaction mapping in *C. elegans* using proteins involved in vulval development. *Science* **287**, 116-22.
- Wallar, B. J. and Alberts, A. S.** (2003). The formins: active scaffolds that remodel the cytoskeleton. *Trends Cell Biol* **13**, 435-46.
- Wang, J., Karabinos, A., Schunemann, J., Riemer, D. and Weber, K.** (2000). The epidermal intermediate filament proteins of tunicates are distant keratins; a polymerisation-competent hetero coiled coil of the Styela D protein and *Xenopus* keratin 8. *Eur J Cell Biol* **79**, 478-87.
- Watanabe, N., Ishihara, T. and Ohshima, Y.** (2007). Mutants carrying two sma mutations are super small in the nematode *C. elegans*. *Genes Cells* **12**, 603-9.
- Watanabe, N., Nagamatsu, Y., Gengyo-Ando, K., Mitani, S. and Ohshima, Y.** (2005). Control of body size by SMA-5, a homolog of MAP kinase BMK1/ERK5, in *C. elegans*. *Development* **132**, 3175-84.

- Weber, K., Plessmann, U. and Ulrich, W.** (1989). Cytoplasmic intermediate filament proteins of invertebrates are closer to nuclear lamins than are vertebrate intermediate filament proteins; sequence characterization of two muscle proteins of a nematode. *Embo J* **8**, 3221-7.
- Wiche, G.** (1998). Role of plectin in cytoskeleton organization and dynamics. *J Cell Sci* **111** (Pt 17), 2477-86.
- Wicks, S. R., Yeh, R. T., Gish, W. R., Waterston, R. H. and Plasterk, R. H.** (2001). Rapid gene mapping in *Caenorhabditis elegans* using a high density polymorphism map. *Nat Genet* **28**, 160-4.
- Windoffer, R. and Leube, R. E.** (2004). Imaging of keratin dynamics during the cell cycle and in response to phosphatase inhibition. *Methods Cell Biol* **78**, 321-52.
- Witke, W.** (2004). The role of profilin complexes in cell motility and other cellular processes. *Trends Cell Biol* **14**, 461-9.
- Woll, S., Windoffer, R. and Leube, R. E.** (2007). p38 MAPK-dependent shaping of the keratin cytoskeleton in cultured cells. *J Cell Biol* **177**, 795-807.
- Woo, W. M., Goncharov, A., Jin, Y. and Chisholm, A. D.** (2004). Intermediate filaments are required for *C. elegans* epidermal elongation. *Dev Biol* **267**, 216-29.
- Yang, S., Tutton, S., Pierce, E. and Yoon, K.** (2001). Specific double-stranded RNA interference in undifferentiated mouse embryonic stem cells. *Mol Cell Biol* **21**, 7807-16.
- Zigmond, S. H., Evangelista, M., Boone, C., Yang, C., Dar, A. C., Sicheri, F., Forkey, J. and Pring, M.** (2003). Formin leaky cap allows elongation in the presence of tight capping proteins. *Curr Biol* **13**, 1820-3.

7 ANHANG

7.1 *C. elegans* Stämme

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene *C. elegans* Stämme verwendet und generiert.

Tabelle 7-1 Verwendete *C. elegans* Stämme

Stamm	Genotyp	Herkunft
N2	Wildtyp	CGC
BJ33	<i>kcEx4 [ifb-2::cfp]</i>	
BJ49	<i>kcls6 [ifb2::cfp]IV</i>	
BJ50	<i>kcls19 [ifb2::cfp]II</i>	
BJ51	<i>kcls20 [ifb2::cfp]V</i>	
BJ52	<i>kcls21 [ifb2::cfp]V</i>	
BJ53	<i>kcls22 [ifb2::cfp]</i>	
BJ54	<i>kcls23[ifb2::cfp]IV</i>	
BJ55	<i>kcls24 [ifb2::cfp]II</i>	
BJ56	<i>kcls25 [ifb2::cfp]II</i>	
BJ65	<i>oxEx466[lin-15(+), sph-1::yfp];kcEx4[ifb-2::cfp]</i>	AG Leube
BJ68	<i>eri-1(mg366)IV; ifb-2::cfp (kcls21)V; ifa-1a::egfp (ex)</i>	
BJ79	<i>ifb-2::cfp (kcls21)V; ifa-1a::egfp (ex)</i>	
BJ92	<i>eri-1(mg366)IV; ifb-2::cfp (kcls6)</i>	
EG2977	<i>lin-15(n765ts) X; oxEx466 [lin-15(+), sph-1::yfp]</i>	AG Jorgensen
CB4856	Polymorpher „Hawaii“-Stamm	CGC
OPT-2-GFP	<i>opt-2::gfp</i>	Steve Nehrke
BJ132	<i>ifb-2::cfp (kcls21)V; (kc1)X</i>	
BJ133	<i>ifb-2::cfp (kcls21)V; (kc2)IV</i>	
BJ134	<i>ifb-2::cfp (kcls21)V; (kc3)IV</i>	
BJ141	<i>(kc1)X</i>	
BJ142	<i>(kc2)IV</i>	
BJ143	<i>(kc3)IV</i>	
BJ144	<i>(kc1)X; ifa-1a::egfp (ex)</i>	
tm2502-tragend	<i>ifc-2(tm2502)X</i>	CGC
JM125	<i>act-5::gfp</i>	
BJ152	<i>kcEx26[Pf42c5.10:YFP; Pmyo-3:mcherry]</i>	
BJ153	<i>kcEx27[Pf42c5.10:CFP; Pmyo-3:mcherry]</i>	
BJ154	<i>kcEx28[F42C5.10::YFP; Pmyo-3:mcherry]</i>	
BJ155	<i>kcEx29[F42C5.10::CFP; Pmyo-3:mcherry]</i>	
BJ156	<i>ifb-2::cfp (kcls21)V; (kc2)IV; kcEx28[F42C5.10::YFP; Pmyo-3:mcherry]</i>	
BJ157	<i>ifb-2::cfp (kcls21)V; (kc3)IV; kcEx28[F42C5.10::YFP; Pmyo-3:mcherry]</i>	
BJ158	<i>(kc2)IV; kcEx28[F42C5.10::YFP; Pmyo-3:mcherry]</i>	
BJ159	<i>(kc3)IV; kcEx28[F42C5.10::YFP; Pmyo-3:mcherry]</i>	
BJ160	<i>ifb-2::cfp (kcls21)V; kcEx28[F42C5.10::YFP; Pmyo-3:mcherry]</i>	

7.2 Kandidatengene des RNAi-Pilot-Screens

Tabelle 7-2 Liste der Gene, die im RNAi-Pilot-Screen herunterreguliert wurden

Polaritätsfaktoren; Zytoskelett-Proteine; Junktionale Proteine		
<i>spc-1</i>	<i>hmr-1</i>	<i>tba-1</i>
<i>ajm-1</i>	<i>hmp-1</i>	<i>tba-2</i>
<i>crb-1</i>	<i>apr-1</i>	<i>tba-3</i>
<i>dlg-1</i>	<i>let-413</i>	<i>tba-5</i>
<i>zen-1</i>	<i>par-3</i>	<i>tba-7</i>
<i>act-5</i>	<i>par-6</i>	<i>tbb-1</i>
<i>erm-1</i>	<i>cyk-4</i>	<i>tbb-2</i>
<i>sma-1</i>	<i>vab-10</i>	<i>tbb-5</i>
<i>unc-70</i>	<i>mua-3</i>	<i>tbb-6</i>
<i>nfm-1</i>	<i>mup-4</i>	
Kinasen		
<i>aak-1</i>	F255.5	<i>pat-4</i>
<i>aakb-2</i>	F26D11.1	<i>pgk-1</i>
<i>air-1</i>	F30A10.1	<i>pkc-1</i>
<i>akt-1</i>	F48G7.9	<i>plk-1</i>
<i>arf-1.2</i>	F52B5.2	<i>pnk-1</i>
<i>atl-1</i>	F52C9.3	<i>pkk-1</i>
<i>atm-1</i>	F57C9.1	<i>prk-1</i>
B0285.1	<i>gck-1</i>	<i>prk-2</i>
B0336.6	<i>gck-2</i>	R08D7.7
<i>bmk-1</i>	<i>gck-3</i>	R107.2
<i>bub-1</i>	<i>gck-4</i>	R11A5.4
C01H6.9	<i>gcy-34</i>	R151.4
C13B9.2	<i>glh-1</i>	<i>rgs-5</i>
C14B9.8	<i>gpr-2</i>	<i>rskn-1</i>
C26F1.7	<i>grk-2</i>	<i>rskn-2</i>
C34G6.5	<i>gsk-3</i>	<i>sas-5</i>
C50F4.2	<i>gska-3</i>	<i>sel-5</i>
C56G2.1	H37N21.1	<i>skpt-1</i>
<i>cdk-1</i>	<i>kin-10</i>	<i>smg-1</i>
<i>cdk-2</i>	<i>kin-14</i>	<i>spd-2</i>
<i>cdk-5</i>	<i>kin-18</i>	<i>spe-6</i>
<i>cdk-8</i>	<i>kin-19</i>	<i>spk-1</i>
<i>cdk-9</i>	<i>kin-23</i>	T03F1.8
<i>cdka-1</i>	<i>kin-30</i>	T10B11.2
<i>cic-1</i>	<i>kin-31</i>	T25E12.4
<i>cit1.2</i>	<i>kin-33</i>	T27A3.6
<i>ckb-1</i>	<i>kin-34</i>	<i>tag-251</i>
<i>ccb-2</i>	<i>kup-1</i>	<i>tag-59</i>
<i>ckb-3</i>	<i>let-502</i>	<i>tag-83</i>
<i>ckb-4</i>	<i>ife-1</i>	<i>tlk-1</i>
<i>ckk-1</i>	<i>lit-1</i>	<i>unc-112</i>

<i>cku-80</i>	<i>irk-1</i>	<i>unc-68</i>
D2023.6	M03C11.1	<i>vab-8</i>
<i>daf-4</i>	<i>mig-10</i>	<i>vps-34</i>
<i>dapk-1</i>	<i>mlk-1</i>	W02H5.8
<i>dgk-3</i>	<i>mom-4</i>	W04B5.5
<i>dlk-1</i>	<i>mpk-1</i>	W07G4.3
<i>dyf-5</i>	<i>mtk-1</i>	Y106G6E.6
<i>efk-1</i>	<i>nab-1</i>	Y52D3.1
<i>efl-1</i>	<i>nhr-246</i>	<i>zak-1</i>
<i>egl-4</i>	<i>ogt-1</i>	ZC581.1
<i>eps-8</i>	<i>pak-4</i>	ZC581.9
F14B4.2	<i>par-1</i>	ZK370.5
F25H5.3	<i>par-4</i>	ZK632.3
Phosphatasen		
B0511.7	F43C1.1	<i>pph-1</i>
C13G3.3	<i>fbp-1</i>	<i>pph-5</i>
C16A3.2	<i>fem-2</i>	<i>pph-6</i>
C27A7.1	<i>Gfi-2</i>	<i>ptp-1</i>
C30A5.4	<i>Gsp-1</i>	R01H10.7
C34B7.2	<i>Gsp-3</i>	R10E4.9
C50C3.7	<i>Gsp-4</i>	<i>sdf-9</i>
<i>cdc-25.1</i>	<i>lda-1</i>	<i>sur-6</i>
<i>cdc-25.2</i>	K08B12.3	<i>tag-83</i>
<i>cdc.25.3</i>	<i>Mtm-1</i>	<i>tag-93</i>
<i>cel-1</i>	<i>Mtm-3</i>	<i>uda-1</i>
D2092.2	<i>Nab-1</i>	W09c5.7
F02E9.7	<i>Ndx-2</i>	W09D10.4
F08F3.8	<i>Ndx-7</i>	Y110A7A.6
F13G3.5	<i>Ndx-8</i>	Y32H12A.4
F18E2.1	<i>Ocrl-1</i>	Y71H2AM.20
F26A3.4	<i>Paa-1</i>	ZK856.8
F30A10.6	<i>Pef-1</i>	ZK973.3

7.3 Amplimere zur chromosomalen SNP-Kartierung

Tabelle 7-3 *Primer*-Bezeichnungen und -Sequenzen mit Angabe der Lokalisierung auf der Original-96-Loch-Platte des Herstellers MWG

Ort in 96-Loch Originalplatte	<i>Primer</i> Bezeichnung	Sequenz
A01	I,26f	ATT ATT AAC GGC CAC GGT GA
B01	I,14f	TTG AAA TCC CCT TTA AAA TCC C
C01	I,13f	TCC TGG ATA ATC CCC AAA AA
D01	I,5f	ATC TGG CAC CAA ATA TGA GTC G
E01	I,-1f	AAA ATA TCA GGA AAG AGT TTC GG
F01	I,-6f	GTT TTC ACT TTT GCC GGT GT
G01	I,-12f	TCG AAA TCA GGG AAA AAT TGA
H01	I,-19f	ATG CCA GTG ATA AGG AAC GG
A02	I,26r	CCC ACA CAC TCT CAC CTT CA
B02	I,14r	ACA CTG GGT ACC TGA CTC ATG C

Anhang

C02	I,13r	CCC TGC CAT TGA TCT TGT TT
D02	I,5r	AAT CTC GAT TTT CAA GGA GTG G
E02	I,-1r	TTT AAA GAT TAA GGG TGG AGC G
F02	I,-6r	TGA AGG CGC ATA TAC AGC AG
G02	I,-12r	ACG ATT TTC GGG GAG TTT TT
H02	I,-19r	TCA CAT CCC TTG TCG ATG AA
A03	II,22f	CCA CTG GCT ATA AGC TTT TCT AGG
B03	II,16f	TTC CAG GTA ATA CAC ATA CAA CTC C
C03	II,11f	ACC GTT TAA TAG GAT TAT TTG GG
D03	II,4f	TTC TTC AAA AAG TCT AGG TTC AGC A
E03	II,1f	TCA AAA ACT TAC AAT CAA TTC TCG
F03	II,-6f	TTG TGA GCT TAT ATC TCA GTT GTC G
G03	II,-14f	CTG TGC TGT TGA CGA TAT TGG
H03	II,-18f	CCG AAT TTT CAA ATG GAT GC
A04	II,22r	TAA GGA TTT CAG GCT TTT AGG C
B04	II,16r	AAA AAC ACA AAG TTC AAA AAC CC
C04	II,11r	AAG TCT GCG GAA TAA TTG ATG G
D04	II,4r	GGG GAC GAA AAC GGA GTT TG
E04	II,1r	CCA GAA AAT CTG CAC AGA AGG
F04	II,-6r	AGA TTT GGT TAG AAA TAT CAC CGC
G04	II,-14r	ATG TCT CAT TGC AAA ATT CGG
H04	II,-18r	CCA TTG GAA TTG CAC ACA AA
A05	III,21f	AGC AGG CTC ACC ATC ATC ATC A
B05	III,12f	ATC AAG TTT CTG ATT GCT CTT TCC
C05	III,4f	AGC GTT AAA GTA TCG GTT ATT TCG
D05	III,-1f	AAA AAT ACA TGT CTA CAC AAC CCG
E05	III,-7f	AAT TTG AAT CAG TGA CTT TTG GC
F05	III,-12f	GAG GAA CCA AAT CTG GCG TA
G05	III,-19f	TCC CAA TTT CCC TCT AAA AAC C
H05	III,-25f	TAT CAT CGA AAT CCC GGA AA
A06	III,21f	GAC ATT ACG GTA GAG GAG ATG GA
B06	III,12r	AAA AAC GTG ATT TTT CAA TTT TGC
C06	III,4r	TAA ATT CAT TTC AAA CAA TCG AGC
D06	III,-1r	TTT CTT ATC ACT GTG CAG TCT TAC C
E06	III,-7r	TTT CTG CAA ACA TTT TTC TTC G
F06	III,-12r	TGA AAA CTT GGA AAA TCG GTG
G06	III,-19r	TTG AAT TTG GAC CAT TTT GAG G
H06	III,-25r	TTC GGA CGG GAG TAG AAT TG
A07	IV,14f	TCG AAT TGT TGT GTT TCT TTT GA
B07	IV,12f	TGT AAA TAC CCC ACA TTT CAA GC
C07	IV,8f	GAC ACG ACT TTA GAA ACA ACA GC
D07	IV,1f	AAA ATG GGA AGC GTA CCA AA
E07	IV,-5f	TGC TGA AAT ATT GGA AAA TTG AGG
F07	IV,-7f	ACT CGG CAT CCT CAC GC
G07	IV,-16f	CGC ATA AAT CCA ACG TTC TCT G
H07	IV,-24f	TGA TGG TGT GTC TGC GTA CC
A08	IV,14r	TTC CAA TTT TCT CGG TTT GG
B08	IV,12r	AAA TTT CCA ATT GTT CAA AGC C
C08	IV,8r	TGG TAT GGA GTC CCT ATT TTG G
D08	IV,1r	TGC TTG TAG CGT TTC CAA GA
E08	IV,-5r	TTA TAT CGT CGA GGA GGT TAG AGG
F08	IV,-7r	GTT GAA AAT TTT TTC ATA GCT ATC ATC
G08	IV,-16r	AAT CCA TAA GTT TCG TGT TGG G
H08	IV,-24r	AGA GCT GGA GAG CAC GGA TA
A09	V,18f	GAA ATT CAA ATT TTT GAG AAA CCC
B09	V,13f	CAT TCA TTT CAC CTG TTG GTT G
C09	V,10f	TAA AGC CGC TAC GGA AAT ACT C
D09	V,6f	CAA ATT AAA TAT TTC TCA AAG TTT CGG
E09	V,1f	AGA AAT GAT CCG ATG AAA AAG C
F09	V,-5f	GAG ATT CTA GAG AAA TGG ACA CCC
G09	V,-13f	TCA TCT GTT ATT TCG TCT CTT GC
H09	V,-17f	TTT CGG AAA ATT GCG ACT GT

Anhang

C_elegans DFKTTFPPEIEMPEGYHDYDPSKFMFLDAKGYQGNITRPLHYSYSRDYLEKYSYDYG
C_briggsae DFKSTFPFPGVEMPEGYHDYDPSKFMFLDPKGYQGNITRPLHYSYSRDYLEKYSYDYG--
C_japonica DFKTTFPFPVPLPDGYHDYDPSRLVSLDRQDYYSGNITRPLHYTYGRDLLEKYSYDYG
: : :*:*****::: ** :.*.*****:.* ** *****.

C_elegans SRLPSPAPP-KTPEPAYTVLNRSEDLPHPHTLSFSFPDYDHTAQIILSRDPGLEHIPY
C_briggsae SRRQSPVPPVKTPEPEYIVLSKTEDLPKHDTHLTFVFPDYDNATRIILNRTEDLALHDF
C_japonica SRRPSPLPP-PILEPEPVPVPEP-----APVLVLEPEPVEPEPVYLVLQKTEDLLKTD
** ** * * : .. . : * ... :*: . * :

C_elegans KIGPFADYDYNVHRIILSHTKDLDHCKIVIPSPFDYDLSTRYEVLHRVEDILHEPIVIE
C_briggsae IPTKHADYDYSARIVLTYTRDVPHCQIVI-----E
C_japonica ESEKKPDYDDAKRIRLHYTSDIDHDPIIVR-----
.***: ** * :* * : * * ::

C_elegans EYPAYCPYEDTKYEVQEKSVTLDDDEH-IYEEVYEPPLPPLPPPAPPPIVHVLYTRDHDH
C_briggsae EYPAYRP-----YETQELVETFDDEEPEYEEIYEP-----VLIELHYNRDPDH
C_japonica EFPPYRR-----YESQELIATFDDEEPEYEEPYEP-----VLHLLYRRDVEL
:.* ** * * :*.***. *** ** * : * :*. * * * :

C_elegans IVFVPLLPYIPPPPPPP-----AEI IHVATPAEVIEEEP
C_briggsae YVFCPTIPYSPPPPPPQP-----VVEEIHVANPVQVIEEPP
C_japonica VVFTPELPYIPPPPPPPPLPAPSPVEEPVYEEVYDVLHLSLEYRRDHDVVFVTPDVIYPP
* * * :.* ***** : ** . . :.* *

C_elegans EP-----VPVPAKRHYDDLIGNDALDVSVS PHFNQSNQKNLGLEKSVTDRVREME
C_briggsae -----VPAERHYDEIYIGREALDVSVSPTFNKSDQKHLGLEKSVHDRVREME
C_japonica TPPTPPPEIPAPVPSERHYDEIYVQDAIDVSLTPTFGQSTDQNNLGLEKSVDRVREME
** :*:***:*. * . :*:***: * * . : * * :*:*** * *****

C_elegans RAMRGEERERLLEEEKRRKYLELQNEIKAAREYEEHAY---EEIQESKNTPCPVSQPIL
C_briggsae ESLRNVDRRLRLEEEKRRQYERQEEIRAARLIEEQHAYNAYEEVEESKNTAPALPQPVH
C_japonica ETMRSDETRKVKEAENRRKFEERQKEIREARWLEEQQAL-----
. :*. : : * * :*: : * :*: * * * :* :

C_elegans IPSVFPVAVPEPIPEKPKRTWQPPPKSEEFLEHIDKPLGPVIFHELIYRNGFLLKMNE
C_briggsae VPDVFV-----IPEKPKRTWQPPPKPELELDEHIDKPLGPVIFHELIYQQGILRQKFQ
C_japonica -----AEEEEKPIGPVVFHELMYQQGILRKKYE
* . :*:***:***:***:***:*** : :

C_elegans ENHILSQTRPVSHPVSRANSRPTTPGLEIKTIDFPRLDDAASPRDHSDSAGNVYVHKHI
C_briggsae EEHRQNKARPVSHPVSRANSRPTTPGLEPKSIDFPRLDNATS PRDHSDSAGNVYVQKHI
C_japonica EEHRAS-ARPVSRPVSRANSRPTTPGPEFRSIDFPRLDEQAIS--HQEAS--VDYVQKRI
. . :*:***:*****:*** * :*:***: : . * :*: * * :* :

C_elegans ERYNAKDASVVQDSHDESRAHSHMLSNVQTHH-----SQLINQNQATHYD
C_briggsae QQYNAYGDSITQDSQLENRSHVHTVNAETHNHPQNHFNHSDSHASHLSEQIHHSHSQTHV
C_japonica ERYNAYG-AEAQDSVYENRAQAHSHHTGGASAHVH-----QHQQQQQQHQ
:*** . : .*** *.*: * . . * : : : :

C_elegans AYATSQHSNAQEYSTVHGSQTHRGSVVYDEPHGQVYDIPHDQEHHHYDTVHVQHSHHHH
C_briggsae SQINHVHSDSHVYDHSVRAQEHRSVVYDEPHGQAVYDIPHDQG-----SKYQFFK
C_japonica EHHHHHHHHHESHQHQHHDQSHRSSVVYDEPGKEIVYDVPDHH-----
* . . :. * * * .***** : ***:***:

C_elegans YHTDGSEHVHHYHQDENAHQHSTAENEHIIHHYHTTSNENAHHHHSVQNEKDIQYQLAQS
C_briggsae TQTDTEIEHHYEEVHNGHET-----HIHHHH-----HHHHHLNEQELQYEVARTN
C_japonica ---DSLSEQEHLEQLK-----LQQQAAELAYQLAQTN
* . * :. : : * :* :* :

Anhang

```
C_elegans  QSIRQMSKTNWDEQNIQSSKRAHIEAHIPVNSPFVKREDSRVSTTSHVSTASTATTTGT
C_briggsae KAIRQMSKTNKWEEHEE---KRPHEAHK-----NEGSRVSSSSQVSTTTTGS---T
C_japonica SAIRQMSKSNKWAETTEH--KHSKIDAHIPPN-----SPFVKASESHRVSTTTTTTA---T
          .:*****:*:* *          *:.:*:*          :.* : :***:* : *

C_elegans  VVQCSNSLNRQNIAPPLKIQNGNSESYHEHNHHQHVFHFDVSENSENIA-HQCKSTTSLDY
C_briggsae VLHHSNSLNRQNI PPPLKIDNENSESYHEQ--HHYVHFD-NENSENVALHSSKSVTSLDY
C_japonica VLHHSNSLNRQNI PPPLAIHHS-----HHNLAHYEHDDTENAI-HTSKSTTSLDY
          *.: *****.** *.:          *: : .          :.:** * .**.***

C_elegans  QPVHVGHVKNLAKLFNKPDEKPLTTEQVIYRVSAAPPGHHLEPEIKPRPRSLPRIPLDEI
C_briggsae QPVNVGHVKS LTKLFNKPDEKPITTEQVIYRTRAAPPGHHFQQEIKPRPRSLPPVPMDEI
C_japonica KPVNVGHVKNLALKFNKVDEKPI TTEQVIYRVRAAPP-----DVQPRPRSIHRIPMDEV
          .**:***.*:   ** **:*****. ****          :.:*****:  :*:**

C_elegans  ELHEHGSKDHMTRHHHEMHQGTVDEHSEHGYSIGGGAQRIDVSARTSSTVMHSPPVQVQH
C_briggsae ELHEHGERDHL SRHQHEIH DHHHTEHHGNSYSIGGG---VALHVNEKTVKSPTSPQNI FH
C_japonica ELHEHGAMDHMTRSHHHIGAG-----VSVSH
          *****  **:* * :*.:          .: *

C_elegans  NSYYHRQSSDEE-SIRVRRVYKALDDTSMLSPVSLSGDGPNF-----
C_briggsae NSHYHHQTMNEEPTIRVRRVYKALEDTSMLSPISLQSDEPMY-----
C_japonica NSQYYIVGDEEPTVKVRKVYKAVEDTSMLSPVSMTHENLYDVPVDAR
          ** *:          **: :*:**:*:*****:*: : :
```

8 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

%	Prozent
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
aa	<i>amino acid(s)</i>
ACT	Aktin
AF	Aktinfilament(e)
Amp	Ampicillin
AS	Aminosäure(n)
bidest.	zweifach destilliert
BLAST	<i>basic local alignment search tool</i>
BJ	Stammkürzel des Leube-Labors
bp	Basenpaar(e)
bzw.	beziehungsweise
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CeAJ	<i>C. elegans apical junction</i>
CFP	<i>cyan fluorescent protein</i>
CIAP	<i>calf intestine alkaline phosphatase</i>
cm	Zentimeter
cM	Zentimorgan
c-Terminus	(COOH)-Carboxyterminus
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DLG	<i>Discs large</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukletidtriphosphat
dsRNA	doppelsträngige RNA
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EMS	Ethylmethansulfonat
<i>et al.</i>	Und andere
Ex	<i>extrachromosomal</i>
F	Filialgeneration
FH	Formin-Homologie
g	Gramm
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
h	Stunde(n)
HI	Hawaii
H ₂ O	Wasser
IF	Intermediärfilament
IFAP	Intermediärfilament-assoziiertes Protein

Abkürzungsverzeichnis

IFO	Intermediärfilament-Organisator
In	Integriert
IPTG	Isopropyl- β -Dthiogalactopyranosid
kb	Kilobasen
kc	Allelkürzel des Leube-Labors
kDa	Kilodalton
l	Liter
J	Joule
LB	Luria-Bertani
M	Molar
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MT	Mikrotubuli
ml	Milliliter
mM	Millimolar
min	Minute(n)
MV	Mikrovilli
MW	<i>molecular weight</i>
MYO	Myosin
ng	Nanogramm
NGM	<i>Nematode growth medium</i>
nm	Nanometer
N-Terminus	(NH ₂)-Aminoterminus
OD	optische Dichte
OPT	Oligopeptidtransporter
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion)
pH	potentia Hydrogenii
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA Interferenz
RNase	Ribonuklease
sec	Sekunden
SMA	<i>small</i>
SNP	<i>single nucleotide polymorphism</i>
Taq	<i>Thermophilus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA
U	Unit
U/min	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
w/v	<i>weight per volume</i>
YFP	<i>yellow fluorescent protein</i>
z. B.	zum Beispiel

9 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1-1 Schematische Darstellung eines zytosolischen IF-Polypeptids.....	3
Abbildung 1-2 Darstellung des anatomischen Aufbaus eines adulten <i>C. elegans</i> Hermaphrodits.	6
Abbildung 1-3 Schematischer Aufbau des <i>C. elegans</i> Darmrohrs (A) und eines Enterozyten (B) mit elektronenmikroskopischer Detailaufnahme der apikalen Junktion (C).....	10
Abbildung 2-1 Genetische Positionen der 48 SNPs, die zum chromosomalen Kartieren verwendet wurden.	37
Abbildung 2-2 Prozedur der chromosomalen SNP-Kartierung im 96-Loch-Format.	39
Abbildung 2-3 Prozedur der Intervall-Kartierung im 96-Loch-Format.	42
Abbildung 3-1 Pharyngeale Expression von IFA-1a::GFP in Tieren des Stammes EC668.....	43
Abbildung 3-2 Immunfluoreszenz-Mikroskopie zur Darstellung der Intermediärfilamente IFB-2 und IFC-2 und dem junktionalen Protein DLG-1 in verschiedenen Entwicklungsstadien von <i>C. elegans</i>	44
Abbildung 3-3 Fluoreszenz-Mikroskopie von IFB-2::CFP-Tieren, die mit <i>ifc-2</i> (RNAi) und mit IFC-2-Antikörpern behandelt wurden.....	46
Abbildung 3-4 Fluoreszenz-Mikroskopie von IFB-2::CFP-exprimierenden Strukturen des transgenen Stammes BJ52.	47
Abbildung 3-5 3D-Rekonstruktion von konfokalen Fluoreszenzaufnahmen des anterioren (A) und posterioren (B) intestinalen IFB-2::CFP-Musters von BJ52-Tieren.....	49
Abbildung 3-6 Darstellung von zwei Gelen des Kartierungsexperiments eines IFB-2::CFP-Transgens.....	50
Abbildung 3-7 Phänotypische Veränderung des IFB-2::CFP-Musters nach <i>ifc-2</i> (RNAi). ...	52
Abbildung 3-8 Identifizierung des progressiven <i>ifc-2</i> (RNAi)-Phänotyps durch IFB-2::CFP-Detektion in Larvalstadien (A-B') und adulten BJ52-Tieren (C-F).	54
Abbildung 3-9 Interferenzkontrast-mikroskopische Aufnahmen von adulten, mit <i>ifc-2</i> (RNAi)-behandelten N2-Tieren.	55
Abbildung 3-10 Vergleich von Wildtyp- (A,C,E) und <i>ifc-2</i> (RNAi)-behandelten Tieren (B,D,F) mit Hilfe von Interferenzkontrast- und Elektronenmikroskopie.....	56
Abbildung 3-11 Ultrastrukturelle Details von Därmen adulter Wildtyp- (A,C) und <i>ifc-2</i> (RNAi)-(B,D) Würmer.	57
Abbildung 3-12 Immunfluoreszenzmikroskopischer und ultrastruktureller Vergleich intestinaler apikaler Junktionen von Wildtyp (A-B) und <i>ifc-2</i> (RNAi)-behandelten Würmern (C-D).	58

Abbildung 3-13 3D-Rekonstruktion konfokaler Aufnahmen von Wildtyp- und <i>ifc-2</i> (RNAi)-behandelten Tieren zur Darstellung der IFB-2::CFP-Verteilung (A,B) und der Lumenfärbung durch die Aufnahme von TRITC-Dextran (A',B'; überlagert in A",B").	59
Abbildung 3-14 Fluoreszenzaufnahmen von intestinalen apikalen Zellmarkern in unbehandelten (A-A",C,D-D") und mit <i>ifc-2</i> (RNAi)-behandelten Tieren (B-B",C',E-E") zeigen keine Veränderungen der apikobasalen Polarität in Abwesenheit von IFC-2.	60
Abbildung 3-15 Dokumentation der veränderten intestinalen IFB-2::CFP-Muster der mutierten Stämme BJ132 (B), BJ133 (C) und BJ134 (D) im Vergleich zum Wildtyp-Stamm BJ52 (A).	62
Abbildung 3-16 Detailaufnahmen der veränderten intestinalen IFB-2::CFP-Muster der mutierten Stämme BJ132 (A), BJ133 (B) und BJ134 (C).	63
Abbildung 3-17 Gelbilder der Genotypisierung aller 48 SNPs zur chromosomalen Lokalisierung der Mutation von BJ132.	65
Abbildung 3-18 Gelbild zur groben subchromosomalen Lokalisation der Mutation von BJ132.	66
Abbildung 3-19 Gelbild zur chromosomalen Lokalisation der Mutation von BJ133.	66
Abbildung 3-20 Gelbild zur chromosomalen Lokalisierung der Mutation von BJ134.	67
Abbildung 3-21 Schematische Darstellung der Kreuzungen des Komplementierungstests von BJ133 (<i>kc2</i>) und BJ134 (<i>kc3</i>).	68
Abbildung 3-22 Darstellung von DNA-Gelen zur Identifizierung von Rekombinanten des Stammes BJ132.	69
Abbildung 3-23 Darstellung von DNA-Gelen zur Identifizierung von Rekombinanten des Stammes BJ132 nach erster Einschränkung des Intervalls.	70
Abbildung 3-24 Darstellung von DNA-Gelen zur weiteren Charakterisierung rekombinanter Linien von BJ132 im Intervall X: 2 cM – X: 8 cM.	71
Abbildung 3-25 Graphische Zusammenfassung der Rekombinationsereignisse der 51 untersuchten Linien des Intervall-Kartierungsexperiment für die Mutante BJ132.	73
Abbildung 3-26 Graphische Zusammenfassung der Rekombinationsereignisse der 45 untersuchten Linien des Intervall-Kartierungsexperiment für die Mutante BJ134.	75
Abbildung 3-27 Fluoreszenzmikroskopische Dokumentation der IFB-2::CFP-Expression von BJ52-Tieren nach Behandlung mit <i>sma-5</i> (RNAi).	76
Abbildung 3-28 Doppelfluoreszenzaufnahmen von immundetektiertem IFC-2 und IFB-2::CFP an präparierten Därmen des Stammes BJ132 (A-C) und von einem BJ144-Tier, das IFA-1a::GFP und IFB-2::CFP koexprimiert (D).	76
Abbildung 3-29 Fluoreszenzmikroskopische Dokumentation der IFB-2::CFP-Expression von BJ52-Tieren nach Behandlung mit <i>F42C5.10</i> (RNAi).	77
Abbildung 3-30 Schematische Darstellung der genomischen <i>ifo-1</i> -DNA (A) und des IFO-1-Proteins (B).	78
Abbildung 3-31 Aminosäuresequenz von IFO-1.	79

Abbildung 3-32 Interferenzphasenkontrast-Dokumentation von <i>ifo-1</i> -mutanten Tieren.	81
Abbildung 3-33 Elektronenmikroskopische Dokumentation von Därmen quer- geschnittener Tiere der Stämme BJ142 (<i>kc2</i>) (A) und BJ143 (<i>kc3</i>) (B).	82
Abbildung 3-34 Mikroskopische Expressionsanalysen von <i>Pifo-1::YFP</i> - (A-A') und IFO-1::CFP- (B-C') exprimierenden adulten Tieren.	83
Abbildung 3-35 Doppelfluoreszenz-Mikroskopie von IFB-2::CFP-exprimierenden BJ156 Tieren (A,B), deren phantypische Veränderungen fast vollständig durch IFO-1::YFP (A',B') geheilt sind.	84
Abbildung 3-36 Fluoreszenzmikroskopische Detailaufnahmen eines Tiers des Stammes BJ156, das die Hybridproteine IFB-2::CFP (A) und IFO-1::YFP (B) koexprimiert.	85
Abbildung 3-37 Doppelfluoreszenz-Aufnahme des anterioren Abschnitts eines isolierten BJ133-Darms zur Darstellung der Verteilung von IFB-2::CFP (A) und von IFC-2 durch Immundetektion (B).	86
Abbildung 3-38 Doppelfluoreszenzmikroskopie von IFB-2::CFP- (A,B) exprimierenden <i>ifo-1</i> -mutanten Tieren, die zur Lumen-Färbung TRITC-Dextran (A',B') aufgenommen haben.	87
Abbildung 3-39 Fluoreszenzmikroskopie der intestinalen ACT-5::GFP-Verteilung im Wildtyp (A,A') und in <i>ifo-1(kc2)</i> -Mutanten (B-C').....	88
Abbildung 4-1 Modell zur IFO-1-Verteilung und -Funktion in Wildtyp- (A) und <i>ifo-1</i> - defizienten (B) Enterozyten	98

10 TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1-1 Proteinfamilie der Intermediärfilamente (modifiziert nach Kim and Coulombe, 2007)	2
Tabelle 1-2 Zusammenfassung der bisher durchgeführten Expressions- und Funktionsanalysen der zytoplasmatischen IFs von <i>C. elegans</i>	8
Tabelle 2-1 Materialien, Geräte, Software, Chemikalien, Enzyme und Kits	12
Tabelle 2-2 Puffer, Lösungen und Nährmedien	15
Tabelle 2-3 Amplimere für Klonierungsexperimente	17
Tabelle 2-4 Amplimere mit entsprechenden Enzymen und resultierenden Fragmentgrößen zur Genotypisierung von SNPs	18
Tabelle 2-5 Rohvektoren und Koinjektionsmarker	18
Tabelle 2-6 Restriktionsenzyme	19
Tabelle 2-7 Primärantikörper	19
Tabelle 2-8 Sekundärantikörper	19
Tabelle 2-9 Bakterienstämme	20
Tabelle 2-10 Pipettierschema für eine PCR mit Taq-DNA-Polymerase	22
Tabelle 2-11 PCR-Programm für eine PCR mit Taq-DNA-Polymerase	22
Tabelle 2-12 Pipettierschema für eine PCR mit Phusion-DNA-Polymerase	23
Tabelle 2-13 PCR-Programm für eine PCR mit Phusion-DNA-Polymerase	23
Tabelle 2-14 Pipettierschema für einen Restriktionsverdau	23
Tabelle 2-15 Pipettierschema für eine Vektor-Dephosphorylierung	24
Tabelle 2-16 Pipettierschema eines PCR-Mastermix für eine 96-Loch-PCR-Platte im chromosomalen SNP-Kartierungsexperiment	38
Tabelle 2-17 PCR-Programm zur chromosomalen SNP-Kartierung	38
Tabelle 2-18 Mastermix für den <i>DraI</i> -Restriktionsverdau im 96-Loch-Format zur SNP-Kartierung	38
Tabelle 2-19 Pipettierschema eines PCR-Mastermixes für eine 96-Loch-PCR-Platte im Intervall-Kartierungsexperiment	41
Tabelle 3-1 Chromosomale Lokalisierungen der <i>ifb-2::cfp</i> -Integrationen	51
Tabelle 3-2 Tabellarische Zusammenfassung der Ergebnisse der subchromosomalen Intervall-Kartierung auf dem X Chromosoms für BJ132	72

Tabelle 3-3 Tabellarische Zusammenfassung der Ergebnisse des subchromosomalen Intervall-Kartierung auf Chromosom IV für BJ134	74
Tabelle 7-1 Verwendete <i>C. elegans</i> Stämme	110
Tabelle 7-2 Liste der Gene, die im RNAi-Pilot-Screen herunterreguliert wurden.....	111
Tabelle 7-3 <i>Primer</i> -Bezeichnungen und -Sequenzen mit Angabe der Lokalisierung auf der Original-96-Loch-Platte des Herstellers MWG	112

PUBLIKATIONEN:

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

Hübinger C, Hüsken K, Vogt A, Rudolf A, Sudhop S, Hasse C, Önel S, Renkawitz-Pohl R, Hassel M. The *Hydra* FGFR Kringelchen functionally corresponds to the *Drosophila* FGFR Heartless. *Manuscript in revision*.

KONGRESSBEITRÄGE:

A) Posterpräsentationen:

- 29/03-02/04/2008 Wiesenfahrt T, Hüsken K, Überbach D, Windoffer R, Leube RE, Bossinger O

Characterization of mutants with acquired and innate and defects of the intestinal endotube

European Worm Meeting 2008, Carmona, Spain
- 12/03-15/03/2008 Hüsken K, Wiesenfahrt T, Ueberbach D, Davis MW, Jorgensen EM, Windoffer R, Bossinger O, Leube RE

Identification of Genes Determining Intestinal Intermediate Filament Organization in *Caenorhabditis elegans*

31st Annual Meeting of the German Society for Cell Biology, Marburg, Germany
- 01/12-05/12/2007 Hüsken K, Wiesenfahrt T, Abraham C, Windoffer R, Bossinger O, Leube RE

Maintenance of the intestinal lumen in *Caenorhabditis elegans*: The role of the intermediate filament protein IFC-2

47th Annual Meeting of the ASCB, Washington, DC, USA
- 27/06-01/07/2007 **Second Prize C. elegans Meeting Student Poster Awards:**
Hüsken K, Wiesenfahrt T, Abraham C, Windoffer R, Bossinger O, Leube RE

Shaping epithelial tubes in *C. elegans*: The role of the intermediate filament protein IFC-2

16th International *C.elegans* Meeting, Los Angeles, CA, USA

- 14/03-17/03/2007 Hüsken K, Wiesenfahrt T, Windoffer R, Bossinger O, Leube RE
The Intermediate Filament IFC-2 is Essential for Maintaining the Shape of the Intestinal Tube in *Caenorhabditis elegans*
30th Annual Meeting of the German Society for Cell Biology, Frankfurt, Germany
- 29/04/-03/05/2006 Hüsken K and Leube RE
Identification of Intermediate Filament Organizers in *Caenorhabditis elegans*
European Worm Meeting 2006, Crete, Greece
- 06/10/-09/10/2005 Hüsken K and Leube RE
Design of a Screening Assay for Intermediate Filament Organizers in *Caenorhabditis elegans*
4th European Workshop on Intermediate Filaments 2005, Bonn, Germany

B) Vorträge:

- 29/03-02/04/2008 Hüsken K, Wiesenfahrt T, Überbach D, Davis MW, Jorgensen E, Windoffer R, Bossinger O, Leube RE
Identification of an essential component of the subapical intermediate filament anchorage machinery in the intestinal endotube
European Worm Meeting 2008, Carmona, Spain
- 23/09-26/09/2007 Hüsken K, Wiesenfahrt T, Windoffer R, Bossinger O, Leube RE
Intestinal lumen formation and maintenance in *Caenorhabditis elegans*: The role of the intermediate filamentprotein IFC-2
5th Meeting of the Intermediate Filament Network, Durham, UK
- 23/09-25/09/2005 Hüsken K and Leube RE
Design of a Screening Assay for IF Organizers in *C. elegans*
2nd Annual Meeting of the Graduate School "Neurobiology", Prüm, Germany
- 19/11/-21/11/2004 Hüsken K and Leube RE
C. elegans as an *in vivo* System to Study Pathomechanisms of Neurodegenerative Diseases
1st Annual Meeting of the Graduate School "Neurobiology", Bacharach, Germany

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich meine Dissertation selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Ich habe keinen anderen Promotionsversuch unternommen.

Mainz, den 18.07.2008

Katrin Hüsken