

**Genetische und funktionelle Analyse von  
Vesikelmembranprotein-Mutanten in Maus und  
*Caenorhabditis elegans***

Dissertation  
zur Erlangung des Grades  
Doktor der Naturwissenschaften  
am Fachbereich Biologie  
der Johannes Gutenberg-Universität  
in Mainz

vorgelegt von

**Lin Bai**

geboren in Liaoning, China

Mainz, 2008

Tag der mündlichen Prüfung:

**1. Gutachter:**

**2. Gutachter:**

„Lernen ist wie Rudern gegen den Strom. Hört man damit  
auf, treibt man zurück.“

Laozi

# Inhaltsverzeichnis

<b>1.</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1	Synaptische Vesikel und Vesikelzyklus .....	1
1.2	Fusion von synaptischen Vesikeln und Rezyklierung .....	4
1.3	<i>Tetraspan Vesicle Membrane Proteins (TVPs)</i> .....	8
1.3.1	TVPs in Säugetieren .....	8
1.3.1.1	Synaptophysin-1 und Physine .....	9
1.3.1.1.1	Synaptophysin-1 .....	9
1.3.1.1.2	Physine .....	10
1.3.1.2	Gyrine .....	11
1.3.1.3	SCAMPs .....	13
1.3.2	TVPs in <i>Caenorhabditis elegans</i> .....	13
1.4	Der Nematode <i>C. elegans</i> .....	14
1.5	Affymetrix <i>GeneChip</i> <sup>®</sup> Technologie .....	16
<b>2.</b>	<b>Ziel der Untersuchung .....</b>	<b>18</b>
<b>3.</b>	<b>Materialien .....</b>	<b>19</b>
3.1	Tiere .....	19
3.1.1	Mausstämme .....	19
3.1.2	<i>C. elegans</i> -Stämme .....	19
3.2	Geräte, Computerprogramme und Online-Dienste .....	19
3.2.1	Allgemeine Geräte .....	19
3.2.2.	Mikroskope .....	20

3.2.3	Computerprogramme und Online-Dienste .....	21
<b>3.3</b>	<b>Verbrauchsmaterialien .....</b>	<b>21</b>
<b>3.4</b>	<b>Chemikalien, Enzyme, DNA/RNA-Marker und Kits .....</b>	<b>22</b>
3.4.1	Chemikalien .....	22
3.4.2	Enzyme .....	24
3.4.3	DNA/RNA-Marker .....	24
3.4.4	Reagenzsätze ( <i>Kits</i> ) .....	25
<b>3.5</b>	<b>Oligonukleotide, Plasmide und Restriktionsendonukleasen .....</b>	<b>25</b>
3.5.1	Oligonukleotide .....	25
3.5.2	Plasmide .....	25
3.5.3	Restriktionsendonukleasen .....	26
<b>3.6</b>	<b>Puffer, Lösungen, Kulturmedien und Bakterienstämme .....</b>	<b>26</b>
3.6.1	Puffer und Lösungen .....	26
3.6.2	Kulturmedien .....	27
3.6.2.1	<i>C. elegans</i> -Kulturmedien .....	27
3.6.2.2	Bakterien-Kulturmedien .....	29
3.6.3	Bakterienstämme .....	29
<b>3.7</b>	<b>Materialien für <i>GeneChip</i><sup>®</sup>-Experimente .....</b>	<b>30</b>
3.7.1	<i>GeneChip</i> <sup>®</sup> -Arrays .....	30
3.7.2	Affymetrix- <i>GeneChip</i> <sup>®</sup> System und zusätzliche Geräte .....	30
3.7.3	Puffer, <i>Kits</i> und Verbrauchsmaterialien .....	30
<b>4.</b>	<b>Methoden .....</b>	<b>32</b>
<b>4.1</b>	<b>Allgemeine molekularbiologische Methoden .....</b>	<b>32</b>
4.1.1	DNA-Methoden .....	32
4.1.1.1	DNA-Isolierung .....	32
4.1.1.1.1	Isolierung genomischer DNA aus Mausschwänzen .....	32
4.1.1.1.2	Isolierung genomischer DNA aus <i>C. elegans</i> .....	33
4.1.1.1.3	Isolierung von Plasmid-DNA .....	33

4.1.1.2	Elektrophoretische Auftrennung von DNA im Agarosegel .....	33
4.1.1.3	Bestimmung der DNA-Konzentration .....	33
4.1.1.4	Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen .....	34
4.1.1.5	Restriktionsendonukleaseverdau von DNA .....	34
4.1.1.6	DNA-Klonierung .....	34
4.1.1.6.1	Herstellung kompetenter Bakterien für RNAi-Experimente .....	35
4.1.1.6.2	Dephosphorylierung von DNA .....	35
4.1.1.6.3	Ligation .....	35
4.1.1.6.4	Transformation von Bakterien nach der Hitzeschockmethode .....	36
4.1.1.6.4.1	Transformation von kompetenten XL1-Blue Zellen .....	36
4.1.1.6.4.2	Transformation von kompetenten Bakterien für RNAi .....	36
4.1.1.7	DNA-Sequenzierung .....	37
4.1.2	RNA-Methoden .....	37
4.1.2.1	Isolierung von Gesamt-RNA aus Mausretina mit der <i>Trizol/RNeasy Hybrid-</i> Methode .....	37
4.1.2.2	Isolierung von Gesamt-RNA aus <i>C. elegans</i> mit der <i>Trizol/RNeasy Hybrid-</i> Methode .....	38
4.1.2.3	Denaturierende Agarose-Gelelektrophorese .....	39
4.1.2.4	Konzentrations- und Qualitätsbestimmung der RNA .....	39
4.1.2.5	Reverse Transkription .....	40
4.1.3	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) .....	40
4.1.3.1	RT (Reverse Transkription)-PCR .....	41
4.1.3.2	Quantitative <i>Real-Time</i> RT-PCR .....	41
4.1.3.2.1	Standard <i>Real-Time</i> RT-PCR-Ansatz und verwendetes Programm .....	42
4.1.3.2.2	Herstellung einer Standardkurve .....	43
4.1.4	Affymetrix- <i>GeneChip</i> <sup>®</sup> -Arrays .....	43
4.1.4.1	Eigenschaften der verwendeten <i>GeneChips</i> <sup>®</sup> .....	44
4.1.4.2	<i>GeneChip</i> <sup>®</sup> -Experimente .....	45
<b>4.2</b>	<b>Methoden bei <i>C. elegans</i> .....</b>	<b>47</b>
4.2.1	Kultivierung von Bakterien .....	47
4.2.1.1	Kultivierung von <i>E. coli</i> -Stämmen für <i>C. elegans</i> .....	47
4.2.1.2	Kultivierung von transformierten Bakterien .....	47
4.2.2	Vorbereitung der Wurmplatten .....	47
4.2.3	Stammkonserven und Wiederauftauen von <i>C. elegans</i> .....	47

4.2.4	Generierung von <i>C. elegans</i> -Männchen .....	48
4.2.5	Verpaarung von <i>C. elegans</i> .....	48
4.2.6	Synchronisierung von Wurmpopulationen .....	49
4.2.7	RNA-Interferenz (RNAi) durch Fütterungsexperimente .....	49
4.2.8	Mikroinjektion von <i>C. elegans</i> zur Herstellung transgener Tiere .....	49
4.2.9	Mikroskopie .....	51
4.2.10	Toxikologische und neurobiologische Untersuchungen in <i>C. elegans</i> .....	51
4.2.10.1	Cadmium-Test .....	52
4.2.10.2	Aldicarb-Test .....	52
4.2.10.2.1	Radialer Aldicarb-Test .....	52
4.2.10.2.2	Berührungaldicarb-Test .....	53
4.2.10.3	Pentylentetrazol (PTZ)-Test .....	53
<b>5.</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>54</b>
<b>5.1</b>	<b>Komparative Transkriptomanalysen .....</b>	<b>54</b>
5.1.1	Microarray-Expressionsanalysen der Synaptophysin-1- <i>Knockout</i> -Mäuse .....	54
5.1.1.1	Ergebnisse der Maus-Chip-Analysen .....	54
5.1.1.2	Validierung der Maus-Chip-Analysen .....	56
5.1.1.3	Detektion der Teiltranskripte des Synaptophysin-1-Gens in Mausmutanten ..	57
5.1.2	Komparative Transkriptomanalyse der <i>C. elegans</i> TVP-Mutante .....	59
5.1.2.1	Identifizierung differenziell exprimierter Gene in der <i>C. elegans</i> TVP- Dreifachmutante .....	59
5.1.2.2	Validierung der <i>C. elegans</i> -Chip-Analysen .....	61
5.1.2.3	Detektion der Teiltranskripte von TVP-Genen in TVP-Dreifachmutanten ....	62
5.1.2.4	Expressionsprofil der hochregulierten Gene in TVP-Doppel- und -Einfachmutanten .....	65
5.1.2.5	Expressionsprofil der TVP-Gene in TVP-Doppel- und -Einfachmutanten ....	67
<b>5.2</b>	<b>Analyse der hochregulierten Kandidatengene in <i>C. elegans</i> .....</b>	<b>68</b>
5.2.1	RNA-Interferenz (RNAi) .....	68
5.2.2	Aldicarb-Resistenz nach RNAi-vermittelter Hemmung von Kandidatengenen .....	68
5.2.3	Cadmium-Exposition .....	70

5.2.4	Verteilung der durch <i>Real-Time</i> RT-PCR bestätigten Gene, deren Transkripte in der <i>C. elegans</i> TVP-Mutante erhöht sind .....	71
5.2.4.1	<i>arf-1.1</i> , <i>cdr-2</i> , <i>T16G1.6</i> und <i>ugt-62</i> werden in Intestinalzellen exprimiert ....	72
5.2.5	Kolokalisierung von ARF-1.1 und CDR-2 mit SPH-1 und SCM-1 im Darm .	73
5.2.5.1	Kolokalisierung von ARF-1.1 mit SPH-1 in Darmzellen von <i>C. elegans</i> .....	74
5.2.5.2	Kolokalisierung von CDR-2 mit SPH-1 und SCM-1 im Darm .....	75
<b>5.3</b>	<b>Analysen der Synaptogyrin-1-Mutanten .....</b>	<b>76</b>
5.3.1	Analysen der Synaptogyrin-1-überexprimierenden Würmer .....	76
5.3.1.1	Aldicarb-Resistenz .....	77
5.3.1.2	Pentylentetrazol (PTZ)-Sensitivität .....	79
5.3.2	Genetischer Screen zur Identifizierung synthetischer Mutanten in Kombination mit <i>sng-1(ok234)</i> .....	80
5.3.2.1	Keine synthetische genetische Interaktion von <i>sng-1</i> mit <i>fat-3</i> , <i>unc-1</i> , <i>unc-24</i> , <i>snb-1</i> , <i>unc-64</i> , <i>rem-3</i> oder <i>dyn-1</i> .....	82
5.3.2.2	Synthetische genetische Interaktion von <i>sng-1</i> mit <i>snt-1</i> , <i>unc-57</i> und <i>unc-26</i> .....	82
<b>6.</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>86</b>
<b>6.1</b>	<b>Transkriptom-Analysen von TVP-Mutanten der Maus und <i>C. elegans</i> ..</b>	<b>86</b>
6.1.1	Microarray-Experimente und Validierungsversuche der Synaptophysin-1- <i>Knockout</i> -Maus .....	87
6.1.2	Microarray-Experimente und Validierungsversuche der <i>C. elegans</i> TVP-Dreifachmutante .....	89
6.1.3	Analyse der differenziell exprimierten Gene in <i>C. elegans</i> .....	90
6.1.4	Expressionsstudien .....	94
<b>6.2</b>	<b>Funktionsanalyse der Synaptogyrin-1-Mutanten in <i>C. elegans</i> .....</b>	<b>95</b>
6.2.1	Erhöhte Resistenz der Synaptogyrin-1-Mutante gegenüber Aldicarb .....	96
6.2.2	Erhöhte Sensitivität der Synaptogyrin-1-Mutante gegenüber PTZ .....	97
6.2.3	Synthetische Interaktion von <i>sng-1</i> mit <i>snt-1</i> , <i>unc-57</i> und <i>unc-26</i> .....	99
<b>6.3</b>	<b>Schlussfolgerungen .....</b>	<b>100</b>

7.	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>102</b>
8.	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>103</b>
9.	<b>Anhang .....</b>	<b>119</b>
9.1	<b><i>C. elegans</i>-Stämme .....</b>	<b>119</b>
9.2	<b>Oligonukleotide .....</b>	<b>121</b>
9.3	<b>RNAi-Bakterienstämme .....</b>	<b>124</b>
9.4	<b>Die für <i>GeneChip</i><sup>®</sup>-Analysen verwendeten RNA-Proben.....</b>	<b>124</b>
9.5	<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>126</b>
9.6	<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>128</b>
9.7	<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>129</b>

### **1. Einleitung**

Hauptziel der Neurowissenschaft ist es, die genauen Funktionen des Nervensystems zu verstehen. Neurone stellen die Grundeinheiten des spezifischen Nervensystems dar. Sie wirken aufeinander ein, um ein komplexes Netzwerk zum Signalaustausch zu bilden. Neurone empfangen Signale von anderen Neuronen über Tausende von Synapsen. Man findet zwei Typen von Synapsen: elektrische Synapsen (*gap junctions*) und chemische Synapsen. Im Zentralnervensystem werden die Informationen zwischen Neuronen größtenteils über chemische Synapsen übertragen. Mit Hilfe chemischer Neurotransmitter, die an der Präsynapse freigegeben werden, wird in der postsynaptischen Zielzelle eine molekulare Reaktion hervorgerufen.

#### **1.1 Synaptische Vesikel und Vesikelzyklus**

Eine Synapse stellt eine Spezialisierung der Nervenzellen dar und enthält unter anderem die für die Signalübertragung essenziellen synaptischen Vesikel (Jin, 2005). Diese Neurotransmitter-enthaltenden Organellen besitzen einen einheitlichen Durchmesser von etwa 40 nm (Floor et al., 1988). Sie bestehen aus einer Lipiddoppelschicht und Proteinen, die miteinander in Wechselwirkungen stehen (Benfenati et al., 1989). Die synaptischen Vesikel sind in den präsynaptischen Nervenendigungen der Neurone konzentriert und speichern dort in Abhängigkeit der jeweiligen Neuronenpopulation verschiedene Neurotransmitter in hohen Konzentrationen. Klassische Neurotransmitter sind zum Beispiel Acetylcholin, Glutamat,  $\gamma$ -Aminobuttersäure (GABA), Histamin, Glycin und Dopamin. Neurotransmitter sind in der Lage, nach ihrer Ausschüttung über den synaptischen Spalt zu diffundieren und an einen spezifischen postsynaptischen Rezeptor zu binden und dadurch exzitatorische bzw. inhibitorische Reaktionen hervorzurufen (Lodisch et al., 2003).

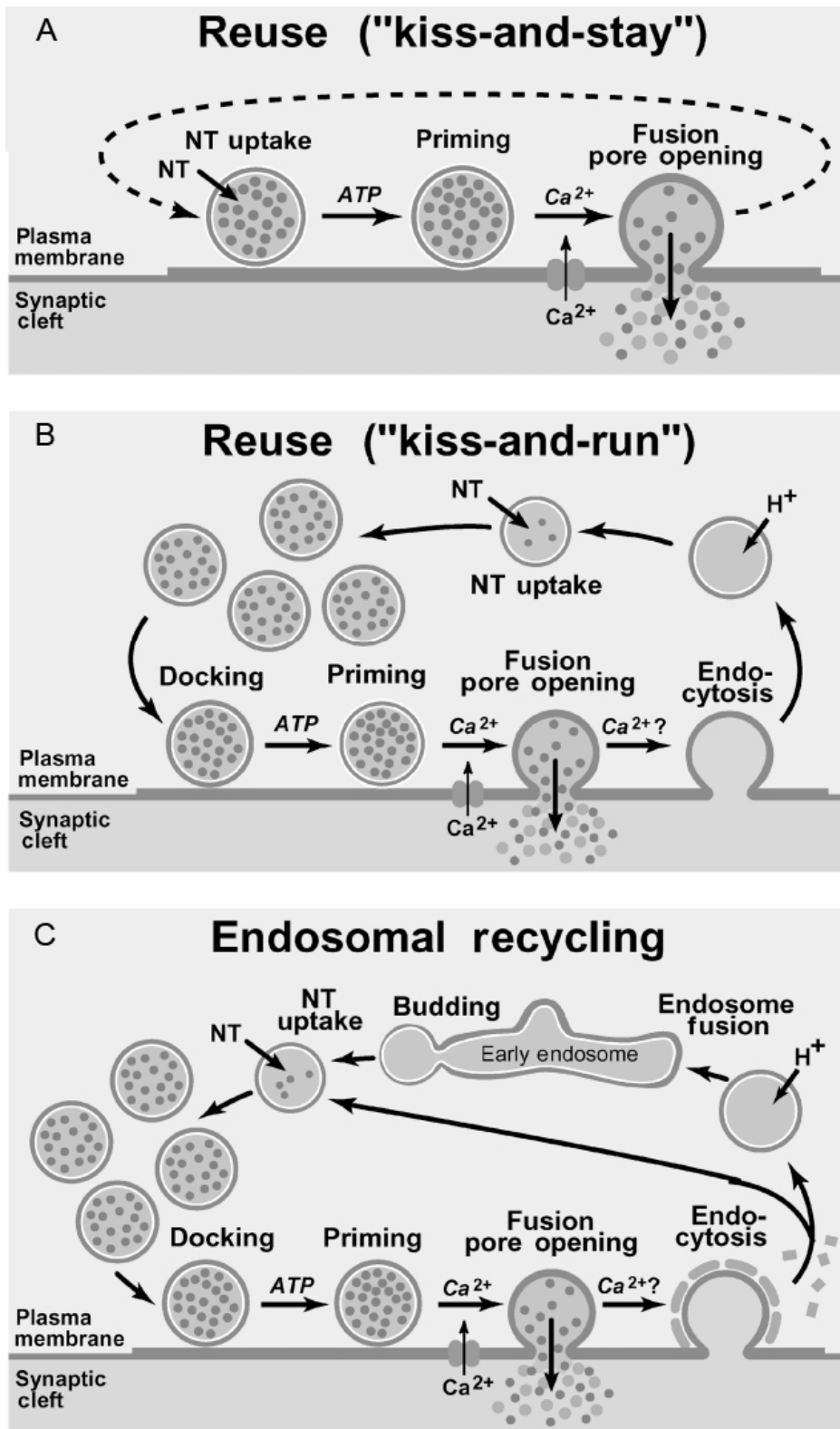
Die Neurotransmitter werden mit Hilfe aktiver Transportsysteme (Protonen/Neurotransmitter-Antiporter) aus dem Zytoplasma der Nervenzelle in das Lumen der Vesikel transportiert und dort angereichert (Concalves et al., 1999; Südhof, 2004). Die auf diese Weise mit Neurotransmitter beladenen synaptischen Vesikel bewegen sich zur „aktiven Zone“, die sich in unmittelbarer Nähe zur Plasmamembran befindet. Dort docken sie an die Plasmamembran an. Erreicht nun ein Aktionspotenzial die präsynaptische Zelle, kommt es im Bereich der Nervenendigungen zur Depolarisierung der Plasmamembran und infolgedessen zu einem Öffnen der spannungsabhängigen Kalziumkanäle (Augustine, 2001; Becherer & Rettig, 2006).

## 1. Einleitung

---

Kalzium-Ionen strömen in die Zellen und induzieren die Exozytose der synaptischen Vesikel. Die gespeicherten Neurotransmitter werden aus den präsynaptischen Vesikeln in den synaptischen Spalt ausgeschüttet, gelangen durch Diffusion an die Plasmamembran der postsynaptischen Zelle, und binden dort an spezifische Rezeptoren (Lodisch et al., 2003). Durch diese Interaktion wird der postsynaptischen Zelle das in der präsynaptischen Zelle in Form eines Aktionspotenzials eingegangene Signal übermittelt (Südhof, 2004; Goda et al., 1997).

Der Mechanismus der Vesikel-Exozytose ist bisher nicht vollständig aufgeklärt. In der Vergangenheit wurden zahlreiche Modelle diskutiert, von denen drei als am wahrscheinlichsten angenommen werden (Abb. 1.1). Das Modell der „vollen Fusion“ beschreibt die Exozytose der Vesikel als ein vollständiges Verschmelzen der Vesikelmembran mit der Plasmamembran der Zelle. Die Vesikel werden anschließend vollständig neu gebildet (Heuser & Reese, 1973; Valtorta et al., 2001). Im Gegensatz hierzu geht das Modell des „*kiss and run*“ von einem partiellen Verschmelzen der Vesikelmembran mit der Plasmamembran aus, wodurch es zur Bildung einer Fusionspore kommt, durch die der Neurotransmitter in den synaptischen Spalt ausgeschieden wird. Im Anschluss an diese Exozytose schließt sich die Fusionspore, das Vesikel kann sich von der Plasmamembran lösen und wird erneut mit Neurotransmitter beladen (Fesce et al., 1994; Wightman & Haynes, 2004). Einen ähnlichen Mechanismus beschreibt das Modell des „*kiss and stay*“ bzw. „*kiss and glide*“. Auch hier kommt es lediglich zur Bildung einer Fusionspore, durch die der Neurotransmitter in den synaptischen Spalt gelangt. Die entleerten Vesikel werden jedoch nicht wieder von der Plasmamembran wegtransportiert, sondern bleiben im Bereich der Synapse gebunden. Sie werden dann an Ort und Stelle mit Neurotransmittern wieder aufgeladen (Südhof, 2004; Wu, 2004).



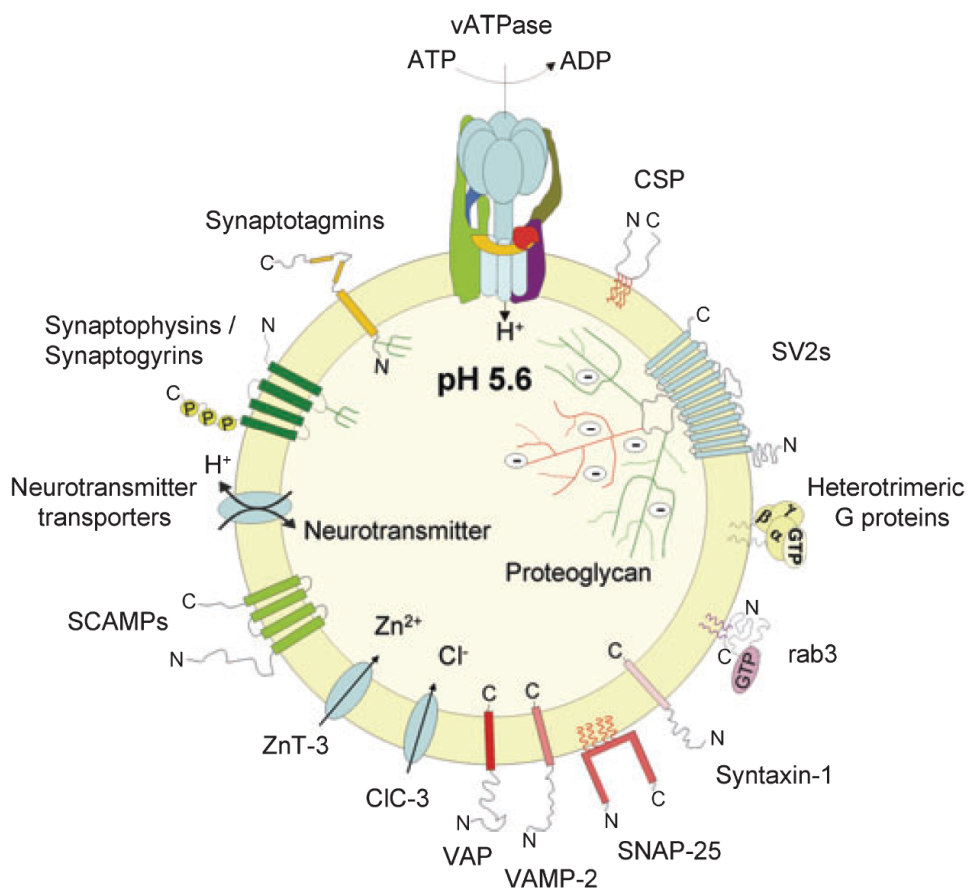
**Abb. 1.1 Modelle der Vesikelexozytose und der Vesikelregeneration.**

Drei unterschiedliche Modelle der Vesikelexozytose und der anschließenden Regeneration der Neurotransmitter-Vesikel: (A) „kiss and stay“: Nach der Exozytose und dem Verschließen der Fusionspore bleiben die Vesikel an der präsynaptischen Plasmamembran und werden vor Ort mit Neurotransmitter beladen. (B) „kiss and run“: Nach der Exozytose des Neurotransmitters wird die Fusionspore geschlossen und das Vesikel löst sich von der Plasmamembran. Im Zytoplasma der Zelle wird es wieder mit Neurotransmitter beladen und dockt anschließend erneut an die Plasmamembran. (C) Nach kompletter Fusion werden die Vesikel über Clathrin-vermittelte Endozytose bzw. durch endosomale Abschnürungen wieder neu hergestellt (Südhof, 2004).

## 1. Einleitung

### 1.2 Fusion von synaptischen Vesikeln und Rezyklierung

Wichtige Aufgaben bei der Exozytose/Endozytose der synaptischen Vesikel erfüllen die zahlreichen monotopisch und polytopisch in der Vesikelmembran integrierten Proteine. Zusammen mit den an der präsynaptischen Membran lokalisierten Proteinen sind sie für die Regulation der Neurotransmitter-Sekretion verantwortlich. Von den mehr als tausend bisher in den präsynaptischen Nervenendigungen nachgewiesenen Proteinen partizipieren nach bisherigen Erkenntnissen mehrere Hundert an der synaptischen Neurotransmitter-Ausschüttung (Jennings, 1989; Südhof, 2004; Burre & Volkandt, 2007). Neben den TVPs (*Tetraspan Vesicle Membrane Proteins*: Synaptophysine, Synaptogyrine und SCAMPs) zeigt die Abb. 1.2 schematisch die wichtigsten Komponenten synaptischer Vesikel, die bisher identifiziert und charakterisiert werden konnten.



**Abb. 1.2 Schematische Darstellung der Hauptproteine synaptischer Vesikel.**

Nur Transmembranproteine oder an der Membran fest assoziierte Proteine sind gezeigt. Die meisten Proteine können Proteinfamilien zugeordnet werden (Burre & Volkandt, 2007).

## 1. Einleitung

---

Wie bereits im Kapitel 1.1 beschrieben, wird die Neurotransmitterfreigabe an der präsynaptischen Membran von einem Aktionspotenzial initiiert. Durch die Depolarisation der Plasmamembran werden die Kalzium-Kanäle geöffnet, die einströmenden Kalzium-Ionen stimulieren dann die Fusion der Vesikelmembran mit der präsynaptischen Plasmamembran. Hierbei spielen die SNARE-Proteine (*soluble NSF attachment protein receptors; NSF, N-ethylmaleimide-sensitive factor*) und das Vesikelmembranprotein Synaptotagmin-1 wahrscheinlich die entscheidende Rolle (Fernandez et al., 2001; Tucker & Chapman, 2002). Synaptobrevin (VAMP: *vesicle-associated protein*), SNAP25 (*synaptosome-associated protein of 25 kD*), und Syntaxin-1 werden als eine stabile Fusionsmaschinerie im SNARE-Komplex zusammengefasst. VAMP ist in der Vesikelmembran verankert und wird auch als vSNARE bezeichnet. Das neuronale vSNARE synaptischer Vesikel ist das Typ-2-Synaptobrevin (VAMP2). SNAP25 und Syntaxin-1 sind in der Zielplasmamembran lokalisiert und werden als tSNAREs bezeichnet (Rothman & Warren, 1994; Deak et al., 2006; Lang, 2007). VAMP2 und Syntaxin-1 besitzen eine C-terminale Transmembrandomäne. Im Gegensatz dazu besitzt das Plasmamembranprotein SNAP25 keine Transmembrandomäne, es assoziiert mit der Plasmamembran durch Palmitoylierung an den Cysteinresten (Lane & Liu, 1997). Der ternäre helikale synaptische SNARE-Komplex besteht aus vier parallelen Helixbündeln (SNARE-Motive, *coiled coil motifs*), die jeweils aus einem einzelnen Synaptobrevin- und Syntaxin-Molekül und zwei SNAP25-Motiven bestehen (Hanson et al., 1997). Man behauptet, dass der SNARE-Komplex die minimale Fusionsmaschinerie für die synaptische Vesikelfusion darstellt (Sutton et al., 1998; Lin & Scheller, 2000).

Der extrem stabile SNARE-Komplex (Hayashi et al., 1995) steuert die Fusion, indem er die beiden gegenüberliegenden Membranen räumlich annähert. Diese Annäherung wird in Neuronen durch Hydrolyse von Rab 3, einem mit synaptischen Vesikeln assoziierten-GTP-Bindungsprotein, reguliert (Schlüter et al., 2002; Südhof, 2004). Rab3-Protein fungiert als ein Regulator bei der Neurotransmitterfreisetzung und moduliert die synaptische Exozytose im ZNS, es ist jedoch nicht an der Andocken- und Fusions-Maschinerie synaptischer Vesikel beteiligt (Schlüter et al., 2004).

Die durch den SNARE-Komplex regulierte Membranfusion ist abhängig von der intrazellulären Kalziumkonzentration. Die mit den Vesikeln assoziierten Transmembranproteine Synaptotagmin-1, -2, und -9 besitzen jeweils zwei Kalzium-Bindedomänen (C2A/B) in ihrer zytosolischen Region (Xu et al., 2007). Sie wurden als Kalziumsensoren der schnellen synaptischen Vesikelexozytose identifiziert und weisen unterschiedliche, Isoform-abhängige Kalzium-Kinetiken auf. Die am besten charakterisierte

## 1. Einleitung

---

und wahrscheinlich am stärksten exprimierte Synaptotagmin-Isoform ist die Isoform 1 (Jahn & Südhof, 1999; Südhof, 2002; Xu et al., 2007; Sullivan, 2007). Durch Untersuchungen von mutanten Mäusen (Geppert et al., 1994), *Caenorhabditis elegans* (Jorgensen et al., 1995) und *Drosophila melanogaster* (Reist et al., 1998) konnte gezeigt werden, dass Synaptotagmin-1 essenziell für die Neurotransmitterfreisetzung und den Vesikelzyklus ist.

Die Bildung des neuronalen *core*-SNARE-Komplexes wird durch seine bekannten Interaktionspartner reguliert (Südhof, 2004). Bisher sind die Funktionen der in der Exozytose bzw. Membranfusion involvierten Proteine und der molekulare Mechanismus der Vesikel-Exozytose nicht aufgeklärt (Südhof, 2004; Bonanomi et al., 2006; Burre & Volkandt, 2007).

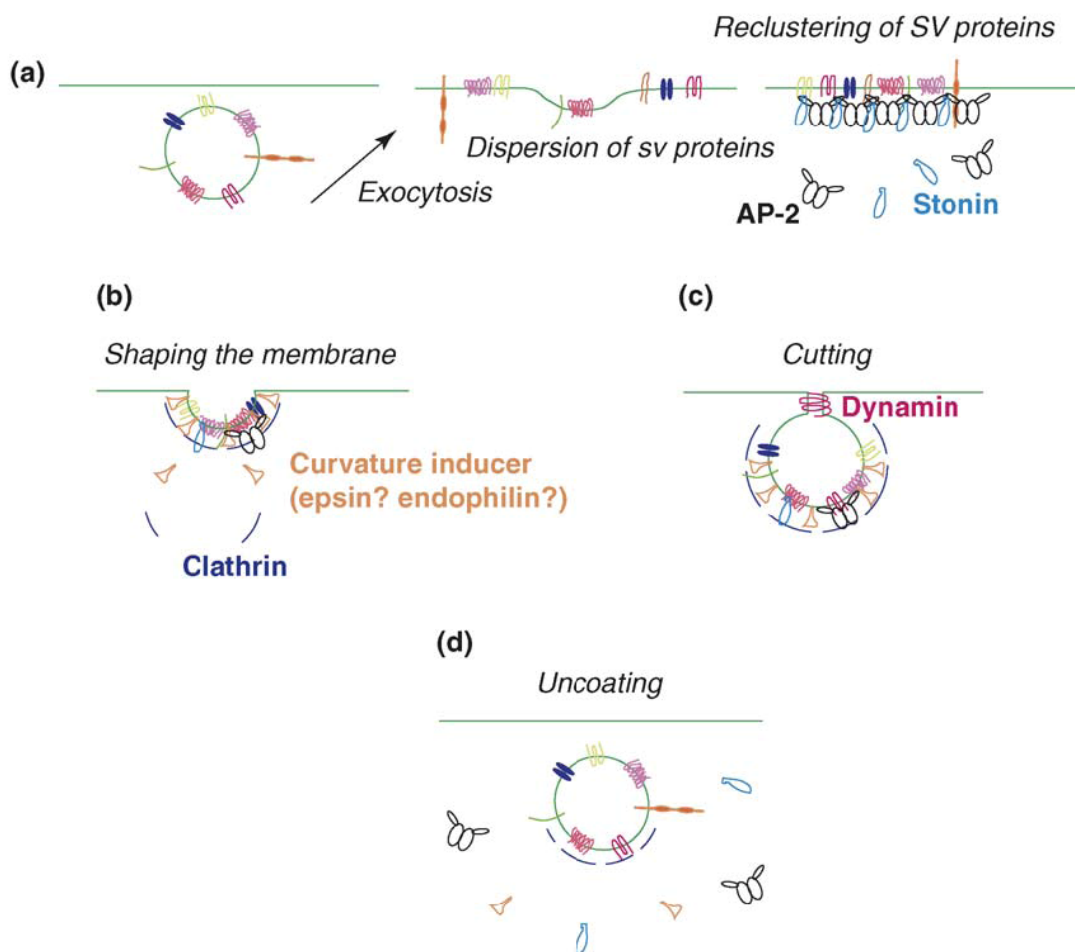
Es wird allgemein angenommen, dass die synaptischen Vesikel im Anschluss an die Exozytose mittels Clathrin-abhängiger bzw. Clathrin-unabhängiger Endozytose rezykliert werden. Innerhalb kürzester Zeit werden sie anschließend vor Ort erneut mit Neurotransmittern befüllt und auf diese Weise regeneriert. Sie stehen dann für eine erneute Exozytose zur Verfügung (Südhof, 2004; Augustine et al., 2006).

Es wird vermutet, dass der Hauptweg des synaptischen Vesikelzyklus über eine Clathrin-vermittelte Endozytose läuft (Conner & Schmid, 2003; Haucke, 2005; Jung & Haucke, 2007). Clathrin-vermittelte Endozytose ist ein in hohem Grade regulierter Prozess (siehe Abb. 1.3). Dieser wird räumlich und zeitlich durch Wechselwirkung mehrerer Proteine reguliert. Viele Moleküle sind als Modulatoren Clathrin-vermittelter Endozytose identifiziert worden (Jung & Haucke, 2007; Ryan, 2006; Slepnev & DeCamilli, 2000).

Je drei schwere und drei leichte Ketten bilden den stabilen oligomeren Clathrin-Komplex (Triskelion) (Smidt & Pearse, 1999). Die Bindung der Clathrin-Moleküle an der Vesikelmembran erfolgt über Adaptorproteine (z.B. AP2, Stonin, AP180, Epsin) (Rappoport et al., 2005; Zhang et al., 1998; Fergestad & Brodie, 2001; De Camilli et al., 2002). Desweiteren sind die Synaptotagmine auch an der Clathrin-vermittelten Endozytose beteiligt. Sie fungieren als Adaptormoleküle für AP2, und ermöglichen es, den Clathrin-Komplex zu bilden (Nicholson-Tomishima & Ryan, 2004; Schwarz, 2004). Damit wird eine stabile Hülle um die Vesikel gebildet. Bei der Ablösung Clathrin-umhüllter Vesikel von der Plasmamembran spielt Dynamin, ein zytosolisches GTP-bindendes Protein, eine entscheidende Rolle (McNiven et al., 2000; Hill et al., 2001). Die Dynaminuntereinheiten polymerisieren um den eingestülpten Vesikelhals und schnürten das Clathrin-umhüllte Vesikel ab. Dynamin interagiert mit mehreren Proteinen, wie Endophilin, welches eine Konformationsänderung durchläuft und somit das Synaptojanin, eine Phosphoinositid-

## 1. Einleitung

Phosphatase, aktiviert, welches wiederum für die Abspaltung der Clathrintriskelien und Adaptorproteine mit anderen katalytischen Proteinen (z.B. Hsc70) vom Vesikel verantwortlich ist (Ringstad et al., 1997; Morgan et al., 2001; Song & Zinsmaier, 2003). An diesem Endozytoseweg sind noch weitere Proteine beteiligt, wie z.B. Eps15, Amphiphysin und Syndapin (Anggono & Robinson, 2007; Morgan et al., 2003; Yoshida & Takei, 2005). Im Gegensatz zu dem Clathrin-vermittelten Endozytoseweg ist über die molekularen Mechanismen der Alternative „*kiss and run*“, auch als Clathrin-unabhängiger Endozytoseweg bezeichnet, wenig bekannt (Wightman & Haynes, 2004; Valtorta et al., 2001).



**Abb. 1.3 Schematische Darstellung des Endozytosewegs synaptischer Vesikel.**

Nach Exozytose (a) werden synaptische Vesikel zur Wiederverwendung rezykliert. Clathrin-Moleküle bilden durch Interaktion von Adaptor-Proteinen (z.B. AP2, AP180, Stonin und Epsin) die Vesikel-Hülle (b, c). Die Interaktion von Clathrin und den Adaptor-Proteinen wird durch die Synthese von  $\text{PIP}_2$  auf der Plasmamembran reguliert. Dynamin und dessen Interaktion mit anderen Proteinen (z.B. Amphiphysin, Endophilin) führt zur Abschnürung der Vesikel. Bei der Loslösung der Vesikel spielt eine Phosphoinositid-Phosphatase, Synaptojanin, eine wichtige Rolle, indem es die Interaktion von Clathrin-Molekülen und der Membran schwächt (d) (Ryan, 2006).

### 1.3 *Tetraspan Vesicle Membrane Proteins (TVPs)*

Aufgrund von Sequenzhomologien und einer ähnlichen Genorganisation werden die Physine, Gyryne und SCAMPs (*secretory carrier-associated membrane proteins*) auch unter der Bezeichnung *tetraspan vesicle membrane proteins* (TVP) zusammengefasst. Strukturell sind sich die TVPs, die aus Säugetieren, wirbellosen Tieren und Pflanzen isoliert wurden, sehr ähnlich (Hübner et al., 2002). Sie werden ubiquitär exprimiert, wohingegen unterschiedliche Isoformen in den verschiedenen Geweben spezifisch gebildet werden. TVPs sind integrale Membranproteine der synaptischen Vesikel. Sie zeichnen sich durch vier hydrophobe,  $\alpha$ -helikale Transmembranregionen aus, deren N- und C-terminale Enden zytoplasmatisch ausgerichtet sind. Die am stärksten konservierten Aminosäuresequenzen innerhalb der TVPs finden sich in den intravesikulären und transmembranen Domänen. Sie kommen besonders abundant in Vesikeln vor (Hübner et al., 2002).

Die TVP-enthaltenen Vesikel werden zwischen verschiedenen Kompartimenten ausgetauscht und sind in biosynthetischen und endozytotischen Wegen lokalisiert. Die Mitglieder der TVPs werden durch separate Gene kodiert. Im Gegensatz zu den Säugetieren konnte in *C. elegans* jeweils nur ein Protein jeder TVP-Familie nachgewiesen werden (Hübner et al., 2002). Die TVPs sind ubiquitär in verschiedenen Zellen und Geweben exprimiert, aber ihre Isoformen zeigen sowohl eine unterschiedliche Gewebeverteilung als auch deutliche Unterschiede in ihrem Vorkommen in den einzelnen Spezies (Hübner et al., 2002; Abraham et al., 2006). TVPs bilden den Hauptteil der synaptischen Vesikelmembranproteine (Hübner et al., 2002; Takamori et al., 2006). Ihre spezifischen Aufgaben für den synaptischen Vesikelzyklus sind jedoch größtenteils unbekannt. Zudem konnten sowohl in Synaptophysin-1-*Knockout*-Mäusen als auch in TVP-defizienten *C. elegans*-Stämmen keine drastischen phänotypischen Veränderungen nachgewiesen werden (Eshkind & Leube, 1995; McMahon et al., 1996; Spiwoкс-Becker et al., 2001; Abraham et al., 2006).

#### 1.3.1 TVPs in Säugetieren

Besonders bei Säugetieren zeigen TVPs ihre biologische Komplexität. Dort konnten bislang 13 TVPs nachgewiesen werden. Davon konnten vier Proteine der Familie der Physine (Synaptophysin-1, Synaptoporin, Pantophysin und Mitsugumin29), vier der Familie der Gyryne (Synaptogyrin 1-4) und fünf der Familie der SCAMPs (SCAMP 1-5) zugeordnet werden (Hübner et al., 2002).

### 1.3.1.1 Synaptophysin-1 und Physine

#### 1.3.1.1.1 Synaptophysin-1

Synaptophysin-1 (Sph-1) gehört zu den ersten identifizierten Membranproteinen synaptischer Vesikel (Leube et al., 1987; Wiedenmann & Franke, 1985). Dieses Glykoprotein ist eines der Hauptmembranproteine und besitzt vier  $\alpha$ -Transmembran-Helices und zwei intravesikuläre Schleifen (L1 und L2) (Johnston & Südhof, 1990). Als ein Haupttyrosinphosphoprotein kann sein Serinrest auch durch die Kalzium-Calmodulin-abhängige Protein-Kinase II, die auch in synaptischen Vesikeln anwesend ist, unter physiologischen Bedingungen phosphoryliert werden (Rubenstein et al., 1993; Evans & Cousin, 2005). Die Phosphorylierung der Tyrosin-/Serin-Reste findet am zytoplasmatischen Carboxyterminus statt (Barnekow et al., 1990; Greengard et al., 1993). Sph-1 wird nicht ausschließlich in neuronalen und neuroendokrinen Zellen sondern auch in nicht-neuroendokrinen Zellen synthetisiert und in unterschiedlichen Mustern exprimiert (Wiedenmann & Franke, 1985; Jahn et al., 1985; Leube et al., 1987; Leube, 1994; Leimer et al., 1996). Eine Besonderheit von Sph-1 ist die Bildung von multimeren Komplexen. In der Membran synaptischer Vesikel bildet Sph-1 vermutlich Dimere, Hexamere oder Oligomere (Thomas et al., 1988). Die Dissoziation der Komplexe läuft parallel zu der kompletten Fusion synaptischer Vesikel mit der Plasmamembran ab (Johnston & Südhof, 1990; Pennuto et al., 2002). Dreidimensionale mikroskopische Untersuchungen von Arthur & Stowell (2007) erbrachten Hinweise, dass Sph-1 einen Fusionsporen-Komplex bildet, durch den die synaptische Exozytose reguliert werden kann. Ähnliche Eigenschaften besitzen die MARVEL-Proteine (*MAL and related proteins for vesicle trafficking and membrane like*)-Proteinfamilie (Sanchez-Pulido et al., 2002).

Alder und Mitarbeiter (1995) lieferten in ihren *Xenopus* Oozyten-Studien überzeugende Beweise dafür, dass eine Überexpression des Sph-1 die Neurotransmitterabgabe an der neuromuskulären Synapse erhöht. Im Gegensatz dazu steht die Beobachtung, dass die Kalzium-abhängige Exozytose in Sph-1- überexprimierenden Zellen stark inhibiert ist (Sugita et al., 1999). Thiele et al. (2000) konnten durch Experimente an neuroendokrinen PC12-Zellen zeigen, dass Sph-1 spezifisch an Cholesterin bindet. Diese Ergebnisse unterstützen die experimentellen Untersuchungen von Leube et al. (1989, 1994), die zeigen, dass Sph-1 an der Formation synaptischer Vesikel partizipiert. Für eine solche Beteiligung von Sph-1 an der Exozytose synaptischer Vesikel spricht zudem die Interaktion mit Synaptobrevin-2 (VAMP2) in den Nervenendigungen (Edelmann et al., 1995; Pennuto et al., 2002; Pennuto et al., 2003).

## 1. Einleitung

---

Bei der Exozytose spielen die Interaktionen zwischen Sph-1 und Synaptobrevin-2 möglicherweise eine essenzielle Rolle (Edelmann et al., 1995; Washbourne et al., 1995; Galli et al., 1996). Die Interaktion zwischen Sph-1 und Dynamin I (Daly et al., 2000; Daly & Ziff, 2002), das essenziell für die Kalzium-abhängige Bildung von Clathrin-umhüllten endozytotischen Vesikeln ist, spricht für eine Bedeutung der TVPs bei der vesikulären Endozytose.

Andere Interaktionsproteine von Sph-1 sind z.B. die vesikuläre Protonenpumpe V-ATPase (Thomas & Betz, 1990; Galli et al., 1996; Carrion-Vazquez et al., 1998), die durch ihre Untereinheit C in den Synaptophysin-1/Synaptobrevin-2 Komplex integriert ist, Myosin-V (Prekeris & Terrian, 1997), das für die Translokation synaptischer Vesikel zu präsynaptischen Andockensstellen wichtig ist, sowie das in der Clathrin-Rekrutierung involvierte Adaptorprotein AP-I (Horikawa et al., 2002).

Obwohl Sph-1 quantitativ eines der Hauptmembranproteine der kleinen synaptischen Vesikel darstellt, existieren überraschend wenige Informationen über seine Rolle im synaptischen Vesikelzyklus und bei der Freisetzung der Neurotransmitter. Zudem weisen die Sph-1 defizienten Mäuse keinen auffälligen Phänotyp gegenüber den Wildtyp (WT)-Tieren auf (Eshkind & Leube, 1995). Lediglich eine verringerte Anzahl an synaptischen Vesikeln, eine erhöhte Anzahl der Clathrin-umhüllten Vesikel und Veränderungen der vesikulären Morphologie in den tonisch-aktiven Photorezeptor-Endigungen der Netzhaut konnten detektiert werden (Spiwoks-Becker et al., 2001). Aufgrund dieser Beobachtungen wurde für Sph-1 eine Funktion im Clathrin-unabhängigen Signalweg postuliert (Spiwoks-Becker et al., 2001). McMahon et al. (1996) konnten zudem eine leicht verringerte Expression von Synaptobrevin-2 in den Sph-1-*Knockout*-Mäusen nachweisen. Obwohl der alleinige Verlust von Sph-1 oder Synaptogyrin-1 keine deutlichen phänotypischen Veränderungen bewirkt, zeigt der doppelte Verlust von Sph-1 und Synaptogyrin-1 in Doppel-*Knockout*-Experimenten deutliche Veränderungen der neuronalen synaptischen Plastizität in Hippocampus-Neuronen (Janz et al., 1999).

### 1.3.1.1.2 Physine

Die Synaptophysine unterscheiden sich durch ihre Länge und die Aminosäurezusammensetzung der zytoplasmatischen N- und C-Termini. Synaptoporin, auch als Synaptophysin-2 bezeichnet, zeigt engste Beziehungen zum Sph-1 aufgrund seiner 58%-igen Sequenzhomologie (Knaus et al., 1990; Hübner et al., 2002). Ähnlich wie Sph-1 wird

## 1. Einleitung

---

Synaptoporin N-glykosyliert und bildet einen multimeren Komplex in der Membran synaptischer Vesikel (Knaus et al., 1990). Die beiden Proteine sind in transfizierten CHO-Zellen in Vesikeln lokalisiert, die an der rezeptorabhängigen Endozytose beteiligt sind (Fykse et al., 1993). Synaptophysin-2 wird spezifisch in einigen Neurongruppen exprimiert, hingegen ist Sph-1 ubiquitär im zentralen Nervensystem nachweisbar (Fykse et al., 1993; Brandstätter et al., 1996; Hübner et al., 2002; Sun et al., 2006). Synaptophysin-2 konnte in synaptischen Vesikeln mit Hilfe von immun-elektronenmikroskopischen Aufnahmen detektiert werden. Weitere Untersuchungen durch Immunpräzipitation und Immunzytochemie im Gehirn der Ratte zeigten eine Kolo-kalisierung der beiden Proteine in Nerven-termini trotz ihrer unterschiedlichen Expressionsmuster (Fyske et al., 1993; Singec et al., 2002). Neben Sph-1 ist Synaptoporin auch ein Interaktionspartner des v-SNARE, Synaptobrevin-2 (Edelmann et al., 1995).

Gegenüber Synaptophysin-2 sind Pantophysin und Mitsugumin29 gleich weit entfernt voneinander und auch von Sph-1/Synaptoporin (Hübner et al., 2002). Mitsugumin29 ist als einziges Physin nicht N-glykosyliert (Takeshima et al., 1998) und besitzt wie auch Pantophysin keinen Tyrosinrest im zytoplasmatischen Carboxyterminus (Hübner et al., 2002). In Adipozyten spielt Pantophysin eine wichtige Rolle beim Vesikeltransport von Insulin-regulierten GLUT4 (Brooks et al., 2000). Pantophysin wird in neuroendokrinen und nicht-neuroendokrinen Zellen exprimiert (Haass et al., 1996; Windoffer et al., 1999). Da Pantophysin-*Knockout*-Mäuse embryonal letal sind (unveröffl. Daten von Eshkind & Leube), besitzt Pantophysin vermutlich eine wichtige Funktion bei der embryonalen Entwicklung. Mitsugumin29 ist ein nicht-neuronales Mitglied der Synaptophysin-Familie und wurde als erstes in der Triade der quergestreiften Muskulatur des Kaninchens identifiziert (Takeshima et al., 1998; Shimuta et al., 1998). *Knockout*-Studien deuten darauf hin, dass es eine wichtige Rolle in der Bildung von Netzwerken im sarkoplasmatischen Retikulum spielt und verantwortlich für den Aufbau der Triade der Muskelzellen ist (Nishi et al., 1999; Komazaki et al., 2001).

### 1.3.1.2 Gyryne

Es sind bisher vier Gyryn-Isoformen in Säugetieren bekannt (Stenius et al., 1995; Hübner et al., 2002). Sie lassen sich durch unterschiedliche Aminosäuresequenzen am N- und C-Terminus unterscheiden (Kedra et al., 1998; Hübner et al., 2002). Die menschlichen Synaptogyryn-Gene liegen auf unterschiedlichen Chromosomen (Kedra et al., 1998; Hübner et al., 2002).

## 1. Einleitung

---

Synaptogyrin-1 allein nimmt einen Proteinanteil von 0,5% in der synaptischen Vesikelmembran ein (Takamori et al., 2006). Die Expression von Synaptogyrin-1 ist auf das Nervensystem beschränkt. Es existieren drei alternative Spleißvarianten von Synaptogyrin-1 beim Menschen, deren differenzielle mRNA-Expression durch Northern Blot-Analysen nachgewiesen wurde (Kedra et al., 1998; Janz & Südhof, 1998). Die Sequenzhomologie zwischen den humanen Isoformen der Synaptogyrine beträgt 40-52% (Hübner et al., 2002). Strukturell fehlt Gyrynen die zweite intravesikuläre Schleife (L2) und die N-Glykosylierungsstelle (Hübner et al., 2002; Baumert et al., 1990). Tyrosinphosphorylierung von Synaptogyrin-1 und -2 findet am Carboxyterminus statt (Baumert et al., Janz & Südhof, 1998; Sugita et al., 1999). Ähnlich wie Sph-1 werden die Synaptogyrine-1 und -2 von der Tyrosinkinase PP60<sup>c-src</sup> in cDNA-transfizierten COS-Zellen phosphoryliert (Janz & Südhof, 1998; Janz et al., 1999). Synaptogyrin-2 (Cellugyrin) ist die ubiquitär exprimierte Isoform der Gyryne in Säugetierzellen. In neuronalen Geweben hingegen kann es nur relativ schwach detektiert werden (Hübner et al., 2002). In SLMVs (*synaptic-like-microvesicles*) der PC12-Zellen konnte die Bindungseffizienz von Sph-1 an SLMVs signifikant durch die Überexpression von Synaptogyrin-2 gesteigert werden (Belfort & Kandror, 2003; Belfort et al., 2005). Synaptogyrin-3 wird in der Plazenta, im Gehirn (Hübner et al., 2002) und auch in Sph-1 enthaltenden synaptischen Vesikeln des Nervensystems exprimiert (Belizaier et al., 2004). Die Lokalisierung von Synaptogyrin-4 ist bislang ungeklärt (Hübner et al., 2002). Die Kalzium-abhängige Exozytose des kotransfizierten menschlichen Wachstumshormons wurde in Zellen, in denen Synaptogyrin-1 überexprimiert wurde, stark inhibiert (Sugita et al., 1999; Belfort & Kandror, 2003). In den Synaptogyrin-1-*Knockout*-Mäusen konnte keine neuronale Veränderung beobachtet werden, wohingegen in den Sph-1/Synaptogyrin-1 Doppelmutanten eine deutliche Reduktion der synaptischen Plastizität festgestellt wurde (Janz et al., 1999). Dabei zeigte sich, dass Synaptogyrin-1 und Sph-1 nicht notwendig für neuronale Exozytoseprozesse, aber wichtig für die Regulation der Neurotransmitterfreisetzung sind. Darüber hinaus interagiert Synaptogyrin-1 Kalziumionen-abhängig mit Dynamin I, aber die Assoziierung ist schwächer als die Sph-1/-Dynamin I-Interaktion (Daly & Ziff, 2002). Synaptogyrin-1 spielt möglicherweise bei der Pathogenese von Schizophrenie eine Rolle (Kedra et al., 1998), da eine reduzierte Synaptogyrin-1-Expression bei Schizophrenie-Patienten auftritt (Mirnics et al., 2000).

### 1.3.1.3 SCAMPs

In Säugetieren wurden fünf Mitglieder der SCAMP-Familie (*secretory carrier-associated membrane proteins*) beschrieben (SCAMP 1-5) (Brand et al., 1991; Hubbard et al., 2000; Hübner et al., 2002; Castle & Castle, 2005). SCAMP-1 ist die am häufigsten vorkommende Variante und ist stark in synaptischen Vesikeln angereichert (Brand & Castle, 1993; Singleton et al., 1997). Der Anteil von SCAMP-1 an den synaptischen Vesikelproteinen beträgt 0,5% (Takamori et al., 2006). Das SCAMP-1-Gen ist auf dem Schweinechromosom 2 und dem Menschenchromosom 5 lokalisiert (Hübner et al., 2002). Die humanen SCAMPs haben keine N-Glykosylierungsstelle (Brand et al., 1991). Im Gegensatz zu SCAMP-2 werden SCAMP-1 und -3 an Tyrosinen phosphoryliert (Wu & Castle, 1998). Die SCAMP-1 – 4-Proteine werden ubiquitär exprimiert, SCAMP-5 hingegen nur in reifen Neuronen (Hübner et al., 2002). Eine Punktmutation in SCAMP-2 führte zu einem inhibitorischen Effekt der Exozytose (Liu et al., 2002). In PC12-Zellen interagiert SCAMP-2 mit dem kleinen GTPase-Protein Arf-6 und der Phospholipase-D1 (Liu et al., 2005) sowie mit dem Phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphat (PIP<sub>2</sub>) (Liao et al., 2007). Diese Interaktionen liefern Hinweise darauf, dass SCAMP-2 an dem Exozytoseweg beteiligt sein könnte, da sowohl Arfs als auch PIP<sub>2</sub> die vesikuläre Neurotransmission modulieren können (Cao et al., 2005; Tanabe et al., 2005; Berridge, 1993; Liao et al., 2007).

### 1.3.2 TVPs in *Caenorhabditis elegans*

TVP-Gene gehören zu evolutionär konservierten Genfamilien, sie zeigen ihre biologische Einfachheit in dem Nematoden *C. elegans* gegenüber Säugetier-TVPs (Hübner et al., 2002). In *C. elegans* wurden drei den humanen TVPs orthologe Gene gefunden: *sph-1*, *sng-1*, *scm-1*. Jedes dieser TVP-Gene kodiert in *C. elegans* nur für ein einzelnes Protein: Synaptophysin (SPH-1), Synaptogyrin (SNG-1) und SCAMP (SCM-1) (Hübner et al., 2002; Abraham et al., 2006; Nonet et al., 1999; Zhao & Nonet, 2001). Dem *C. elegans* Physinortholog SPH-1 fehlen die Cysteine in der zweiten intravesikulären Schleife (L2). Die Intron/Exon-Architektur von Synaptophysin-1 und Synaptogyrin-1 in Säugetieren und in *C. elegans* ist fast identisch. Sie unterscheidet sich nur durch jeweils ein zusätzliches Intron in *C. elegans*. Auf der anderen Seite ist die Intron/Exon-Struktur der SCAMPs in Schweinen und *C. elegans* völlig unterschiedlich (Hübner et al., 2002). Phylogenetische Untersuchungen der TVP-Gene in der Maus und *C. elegans* zeigen, dass die SPH-1- und SNG-1-Familien einen gleichen evolutionären Ursprung besitzen. Im Gegensatz hierzu unterscheiden sich SCM-1 und andere

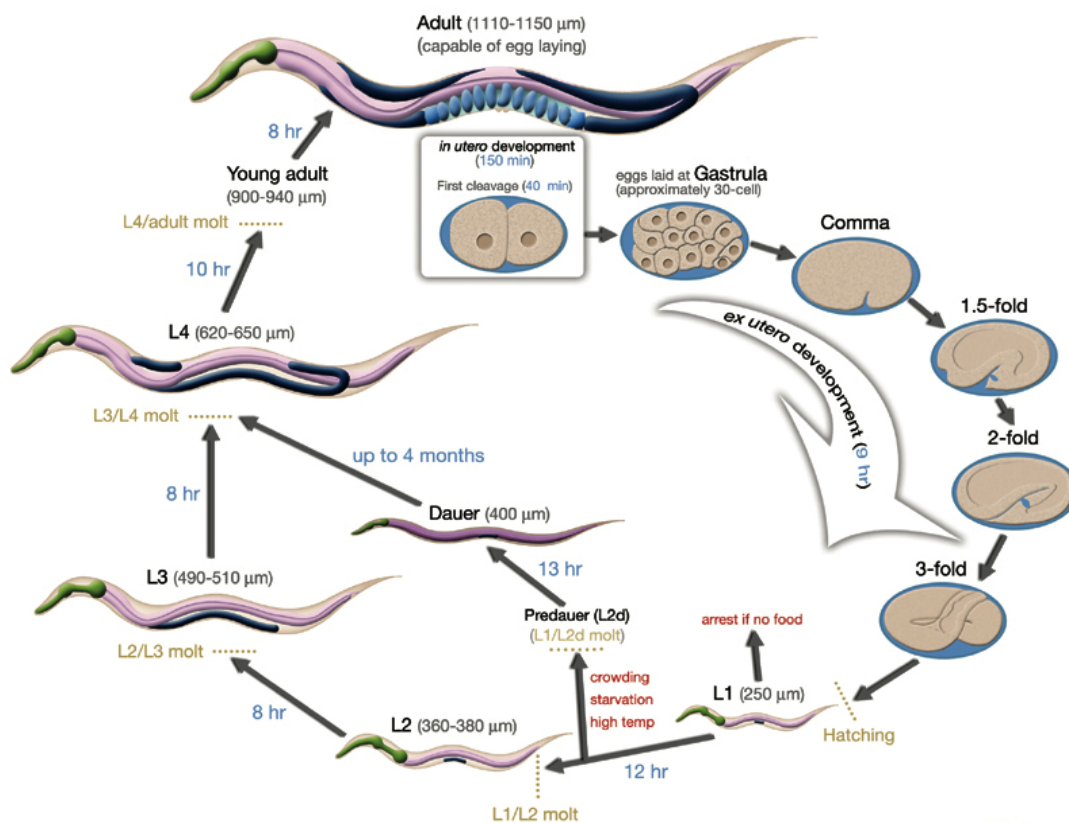
TVP-Typen in ihrer Evolution maßgeblich voneinander (Abraham et al., 2006). Alle drei Fadenwurmpolypeptide sind in den gleichen vesikulären Kompartimenten kolokalisiert, wenn sie ektop in Säugetierzellen exprimiert werden (Abraham et al., 2006). Für alle *C. elegans* TVPs konnten mutierte Allele isoliert werden, die zur Herstellung von TVP-Einzel-, Doppel- und Dreifachmutanten verwendet wurden (Abraham et al., 2006). Erstaunlicherweise verursachte die kombinierte Deletion von allen drei TVPs keinen erheblichen Entwicklungsmangel und keinen neuronalen architektonischen Defekt außer einer signifikanten Erhöhung der Clathrin-ummantelten Vesikel. In den generierten TVP-Dreifachmutanten konnten zudem keine Veränderungen in Chemotaxis-, Thermotaxis- und elektrophysiologischen Parametern festgestellt werden. Die TVP-defizienten Würmer reagierten zudem normal auf den Acetylcholinesterase-Inhibitor Aldicarb (Abraham et al., 2006). Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen von Transkriptionsschimären zeigten, dass die drei in *C. elegans* exprimierten TVPs in vielen Geweben nach einem spezifischen Expressionsmuster verteilt sind (Nonet, 1999; Abraham et al., 2006). SPH-1 kommt in den pharyngealen Epithelzellen, in der intestinalen Übergangsröhre sowie im Darm und im analen Sphinkter vor. SNG-1 ist ausschließlich pan-neuronal exprimiert. SCM-1 wird stark in Neuronen, in den Coelomozyten und in der Muskulatur sowie in der Spermatheka synthetisiert (Abraham et al., 2006; Abraham & Leube, unveröffl. Daten).

### 1.4 Der Nematode *C. elegans*

Der ca. 1 mm große Fadenwurm *C. elegans* wurde in den 1960er Jahren von dem britischen Molekularbiologen Sydney Brenner als ein Modellorganismus in der biologischen Forschung etabliert (Brenner, 1973). Der Nematode eignet sich besonders als Modellsystem für die Entwicklungsbiologie und Genetik aufgrund seines vollständig sequenzierten Genoms (*The C. elegans-Sequencing Consortium, 1998*), der kurzen Generationszeit (ca. 3,5 Tage bei 20°C) und der genetisch identischen Nachkommen (Brenner, 1974). Vorteilhaft ist zudem die Transparenz des Organismus, die während aller Entwicklungsstufen gegeben ist. *C. elegans* kann sowohl auf mit Bakterien beschichteten Agarplatten als auch in Flüssigmedium kultiviert werden (Stiernagle, 2006). Der Lebenszyklus des Wurms teilt sich in vier postembryonale Larvenstadien (L1 - L4) (Ambros, 2000), die dem adulten Tier vorangehen (Abb. 1.4). Sie sind anhand ihrer Körpergröße leicht voneinander zu unterscheiden. Wird *C. elegans* bei einer Temperatur von 20°C inkubiert, beträgt seine Lebensdauer ca. 20 Tage (Altun & Hall, 2006). Die Konservierung der Würmer erfolgt durch Einfrieren der

## 1. Einleitung

Larvenstadien L1 und L2 in Glycerin (-80°C) (Riddle et al., 1997; Hope, 1999). Bei *C. elegans* existieren zwei Geschlechter: Hermaphrodit (XX) und Männchen (XO) (Madl & Herman, 1979). Der Hermaphrodit produziert sowohl Spermien als auch Eizellen (Hodgkin & Barnes, 1991). Einzelne Hermaphroditen vermehren sich ausschließlich durch reine Selbstbefruchtung, dadurch sind homozygote Stämme einfach zu erhalten. Männchen besitzen nur ein X-Chromosom und treten durch spontane *nondisjunction* des X-Chromosoms auf. Sie machen ca. 0,2% der Gesamtpopulation im Bristol WT-Stamm N2 aus (Hodgkin et al., 1979; Hodgkin & Barnes, 1991; Emmons & Sternberg, 1997). Unter Laborbedingungen lassen sich Männchen jedoch leicht generieren. Männchen können sich mit Hermaphroditen auskreuzen, um die gleiche Nachkommenzahl von Männchen und Hermaphroditen zu erhalten. Durch die Fremdbefruchtung mit Männchen ist eine Herstellung neuer Mehrfachmutanten möglich.



**Abb. 1.4 Der Lebenszyklus von *C. elegans*.**

Der natürliche Entwicklungsprozess von *C. elegans* besteht aus dem Embryonalstadium, gefolgt von vier postembryonalen Larvalstadien (L1 - L4) und dem adulten Stadium. Durch Nahrungsmangel oder bei hohen Temperaturen kann der Wurm (L1 - L2) in das langlebige Dauer-Larvenstadium überwechseln. Die Dauerlarven entwickeln sich, sobald wieder Nahrung zugeführt wird, weiter zum L4-Wurm. Der adulte Hermaphrodit ist ca. 1 Millimeter lang und besitzt 959 somatische Zellen (Altun & Hall, 2006).

## 1. Einleitung

Adulte *C. elegans* Hermaphroditen sind eutelisch d.h. sie besitzen immer 959 somatische Zellen, davon sind 302 Nervenzellen, 20 Darmzellen und 95 Muskelzellen. Die Nervenzellen bilden ein einfaches Nervensystem, die Darmzellen einen Gastrointestinaltrakt (White et al., 1986; Jorgensen & Mango, 2002; Hope, 1999; Watts & Strogatz, 1998). Durch solche Eigenschaften ist *C. elegans* ein idealer Organismus für biologische und genetische Untersuchungen. Für zahlreiche der in Säugetieren gefundenen synaptischen Vesikelproteine wurden auch in *C. elegans* orthologe Proteine identifiziert (Tab 1.1).

**Tab. 1.1 Die wichtigsten in den synaptischen Vesikelzyklus einbezogenen *C. elegans* Proteine.**

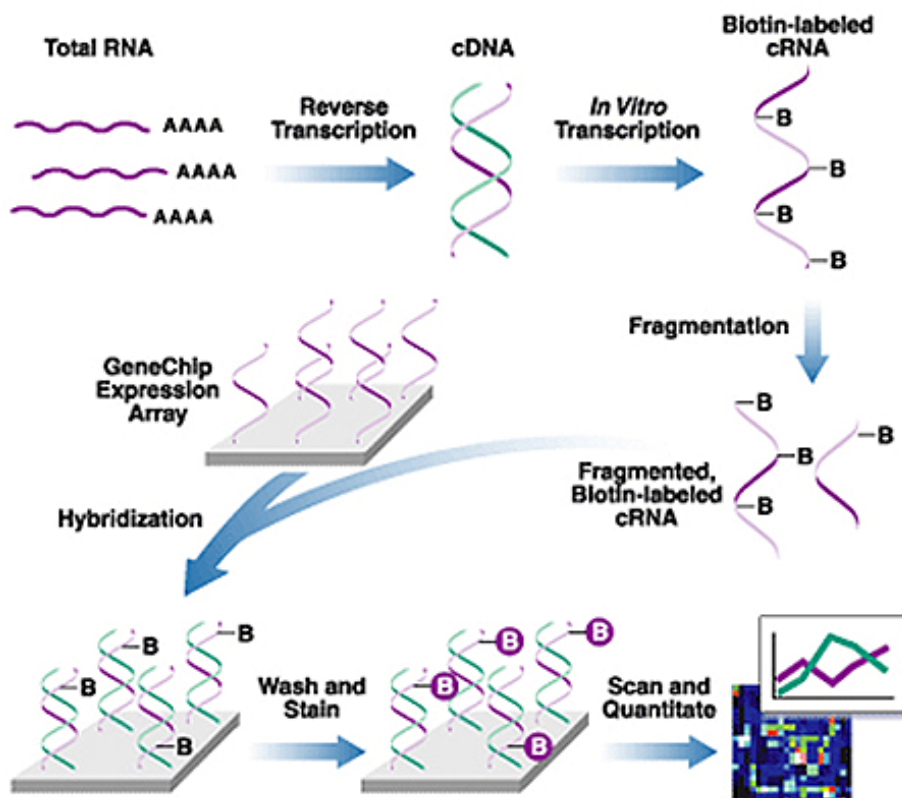
Protein	Gen	Mutanten-Phänotyp	Referenzen
Clathrin, schwere Kette	<i>chc-1</i>	unkoordiniert	Grant & Hirsh, 1999
Clathrin Adaptor			
$\alpha$ -Adaptin	<i>apa-2</i>	RNAi: embryonal lethal	Grant & Hirsh, 1999
$\beta$ -Adaptin	<i>apb-1</i>	RNAi: embryonal lethal	Grant & Hirsh, 1999
AP17	<i>F02E8.3</i>	RNAi: <i>dumpy</i> Morphologie	Grant & Hirsh, 1999
AP50	<i>dpy-23</i>	Morphologie: <i>dumpy</i>	Harris et al., 2000
AP180/CALM	<i>unc-11</i>	unkoordiniert	Nonet et al., 1999
Dynamamin-1	<i>dyn-1</i>	unkoordiniert	Claek et al., 1997
Dynein, leichte Kette	<i>dli-1</i>	defekter retrograder Transport	Koushika et al., 2004
Endophilin	<i>unc-57</i>	defekte Endozytose	Schuske et al., 2003
EPS 15	<i>ehs-1</i>	synthetischer Phänotyp mit <i>dyn-1</i>	Salcini et al., 2001
Fettsäure Desaturase	<i>fat-3</i>	unkoordiniert	Brock et al., 2007
H <sup>+</sup> -ATPase	<i>unc-32</i>	unkoordiniert	Brenner, 1974
Hsc70	<i>hsp-1</i>	RNAi: embryonal lethal	Piano et al., 2000
Kinesin	<i>unc-104</i>	unkoordiniert	Hall & Hedgecock, 1991
Myosin, schwere Kette	<i>hum-2</i>	defekte Endozytose	Kachur et al., 2004
Rab3	<i>Rab3</i>	Aldicarb-Resistenz	Nonet et al., 1997
Stomatin-Homolog	<i>unc-24</i>	unkoordiniert	Brenner, 1974
Synaptobrevin	<i>snb-1</i>	unkoordiniert, Aldicarb-Resistenz	Nonet et al., 1998
Synaptojanin	<i>unc-26</i>	defekte Endozytose	Harris et al., 2000; Schuske et al., 2003
Synatotagmin-1	<i>snt-1</i>	defekte Endozytose	Nonet et al., 1993; Jorgensen et al., 1995
Syntaxin-3	<i>syn-3</i>	RNAi: embryonal lethal	Jantsch-Plunger & Glotzer, 1999
Syntaxin-4	<i>syn-4</i>	RNAi: embryonal lethal	Jantsch-Plunger & Glotzer, 1999
vakuoläre H <sup>+</sup> -ATPase	<i>vha-12</i>	neuronale Defekte	Syntichaki et al., 2005

### 1.5 Affymetrix *GeneChip*<sup>®</sup> Technologie

Die Microarray (Microchip)-Technologie ist ein leistungsfähiges Werkzeug in der modernen Medizin- und Genforschung. Mit ihrer Hilfe sind Genexpressionsanalysen von unterschiedlichen Zelllinien oder Geweben genomweit durchführbar (Lipschutz et al., 1999; Heller, 2002). Das Funktionsprinzip eines Microarrays basiert auf Nukleinsäure-Hybridisierungstechniken, die auch bei anderen Methoden wie Northern-Blot oder Southern-

## 1. Einleitung

Blot Analysen verwendet werden. Es existieren unterschiedliche Formen der Microarray-Analyse. Beim „cDNA-Hybridisierungs-Array“ (Pietu et al., 1996) werden bekannte, genspezifische cDNA-Sonden oder PCR-Fragmente auf einen Glaträger gespottet und dadurch immobilisiert. Bei dem System der amerikanischen Firma Affymetrix (Santa Clara, CA, USA) hingegen, dem sogenannten *high density oligonucleotide array* (Lockhart et al., 1996; Golub et al., 1999; Yeatman, 2003), werden exakt komplementäre Oligonukleotide mit einer Länge von 20 bis 100 Basen in hoher Dichte an definierten Positionen direkt auf den Microchip *in situ* synthetisiert. Eine bei der Herstellung von Computer-Chips eingesetzte Technik, das photolithographische Verfahren, wird bei Affymetrix verwendet, um 1300000 unterschiedliche Oligonukleotide auf einer Chip-Fläche von nur 1,28 cm x 1,28 cm zu lokalisieren. Für die Genom-Expressionsanalysen der vorliegenden Arbeit wurden die Affymetrix *GeneChips*<sup>®</sup> von der Maus (*Mouse-Genome-430-2.0-Array*) und von *C. elegans* (*C. elegans-Genome-Array*) verwendet. Jedes bekannte Transkript der beiden Spezies wird dabei durch elf unterschiedliche, spezifische Oligonukleotide mit einer Länge von jeweils 25 Basen untersucht ([www.Affymetrix.com](http://www.Affymetrix.com)). Die Abb. 1.5 zeigt das Prinzip der Affymetrix-*GeneChip*<sup>®</sup> Technologie.



**Abb. 1.5 Analyse der eukaryotischen Gen-Expression mit Hilfe eines GeneChip.**

Biotin markierte cRNA wird durch *in-vitro* Transkription von cDNAs der isolierten RNA synthetisiert und aufgereinigt. Die fragmentierte cRNA wird dann auf dem Microarray-Chip hybridisiert. Die durch computergestützte Analysen erhaltenen Rohdaten werden normalisiert und analysiert ([www.Affymetrix.com](http://www.Affymetrix.com)).

### **2. Ziel der Untersuchung**

Das erste Ziel dieser Arbeit war, anhand der Affymetrix-Microarray-Methode Gene zu indentifizieren, die in Bezug auf die Funktionen von TVPs von Relevanz sind. Hierzu wurden neue globale Genexpressionsanalysen getestet, um herauszufinden, ob kompensatorische Mechanismen auf transkriptionaler Ebene für den offensichtlichen Mangel der funktionellen Defizite von TVP-Mutanten verantwortlich sind. Dazu sollten die gesamten Komplemente der synthetisierten mRNA in TVP-Mutanten und WT-Tieren verglichen werden. Um Hinweise auf den funktionellen Zusammenhang der Regulation zu erhalten, sollten die aus den *GeneChip*<sup>®</sup>-Analysen resultierenden Ergebnisse weiter systematisch mittels genetischer und biochemischer Untersuchungen sowohl auf Gen- als auch auf Proteinebene überprüft werden.

Das zweite Ziel dieser Arbeit bestand darin, herauszufinden, ob TVPs Funktionen im Exo-/Endozytose-Zyklus synaptischer Vesikel besitzen. Da Synaptogyrin-1 ausschließlich im Nervensystem von *C. elegans* exprimiert ist, sollten hierzu Funktionsanalysen und genetische Screens mit den *sng-1*-Mutanten durchgeführt werden.

### 3. Materialien

#### 3.1 Tiere

##### 3.1.1 Mausstämme

In dieser Studie wurden folgende Mäusestämme verwendet:

1. WT-Mäuse (C57BL/6) wurden von Harlan Winkelmann, Borcheln, bezogen.
2. Sph-1-*Knockout*-Mäuse (Sph-1<sup>-/-</sup>) besitzen ein mutiertes Allel des Synaptophysin-1-Gens auf dem X-Chromosom (Özcelik et al., 1990). Bei diesen Mäusen konnte kein Synaptophysin-1-Protein detektiert werden (Eshkind & Leube, 1995). Für die Experimente wurde das mutierte Allel in den C57BL/6J-Inzuchtstamm über fünf Generationen eingekreuzt.

##### 3.1.2 *C. elegans*-Stämme

Alle in dieser Arbeit verwendeten *C. elegans* Stämme sind in den Tab. 9.1 - 9.3 aufgelistet. Die Stämme mit einem BJ-Namen wurden im Leube-Labor hergestellt, mit einem EG-Namen im Jorgensen-Labor und mit einem VH-Namen im Hutter-Labor. Alle anderen Stämme wurden vom *Caenorhabditis Genetics Center* (CGC) der Universität Minnesota, USA, zur Verfügung gestellt.

#### 3.2 Geräte, Computerprogramme und Online-Dienste

##### 3.2.1 Allgemeine Geräte

Autoklav Varioklav Typ 400	H+P Labortechnik, Oberschleißheim
Bakterien Brutschrank	Memmert, Schwabach
Blockthermostat	Heraeus, Hanau
Brutschränke	Memmert, Schwabach
DNA/RNA-Workstation	VWR, Darmstadt
Digitalkamera XC-ST50CE	Sony, Tokyo, Japan
Elektrophoresekammer	Sigma-Aldrich, München
Electrophoresis Power Supply Consort	IMS GmbH, Magdeburg
Erlenmeyerkolben	Roth, Karlsruhe

### 3. Materialien

---

Homogenisatoren mit Pistill	VWR, Darmstadt
i-Cycler	Bio-Rad, München
Magnetrührer	VWR, Darmstadt
Mikromanipulator	Eppendorf, Hamburg
Micropipette Puller P-87	Sutter, Novato, CA, USA
Mikrowelle	Miele, Gütersloh
Mörser und Pistill	VWR, Darmstadt
Nalgene Cryo 1°C Freezing Container	Nunc, Wiesbaden
Nanodrop ND-1000	Peqlab, Erlangen
Optically Clear Adhesive Seal	Abgene, Hamburg
PH-Elektrode (pH 530)	VWR, Darmstadt
Pipetten	Gilson, Middleton, WI, USA
Scanner Perfection 1670	Epson, Meebusch
Schüttler Ceromat	B. Braun, Meslungen
Sterilbank	Heraeus Hanau
Thermoblock	IDL Biotherm BT
Thermocycler primus 96 advanced	Peqlap, Erlangen
Thermocycler primus 96 Plus	MWG Biothe, Martinsried
Tischzentrifuge	Heraeus Hanau
UV-Tisch NU 72	Faust, Schaffhausen
UV-Spektrophotometer (Ultrospec 2000)	Pharmacia, Freiburg
VDS Film	GE, Uppsala, Sweden
Vortex	Heidolph, Schwabach
Wagge 1475	Sartorius, Göttingen
Wasserbad (Bioblock Scientific)	Fisher Scientific GmbH, Schwerte

#### 3.2.2. Mikroskope

DM IRB	Leica, Wetzlar
MZ16FA	Leica, Wetzlar
SMZ 645	Nikon, Düsseldorf
SMZ 1500	Nikon, Düsseldorf
TCS SP5	Leica, Wetzlar

#### 3.2.3 Computerprogramme und Online-Dienste

CorelDraw 12	Ottawa, Kanada
Chromas 1.45	Technelysium, Australia
Clonemanager 7.01	Scientific& Educational Software, Cary, NC, USA
Fermentas Life Sciences	<a href="http://www.fermentas.com">http://www.fermentas.com</a>
Geneservice	<a href="http://www.geneservice.co.uk">http://www.geneservice.co.uk</a>
Image Pro Plus 5.12	Media Cybernetics, Gleichen
Lasergene DNA Star	Madison, WI, USA
Microarray Suite (MAS 5.0)	Affymetrix, Santa Clara, CA, USA
MWG-Biotech AG.	<a href="http://www.mwg-biotech.com">http://www.mwg-biotech.com</a>
National Center for Biotechnology Information	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/</a>
NetAffx Analysis Center	<a href="https://www.affymetrix.com/index.affx">https://www.affymetrix.com/index.affx</a>
Photoshop CS2	Adobe, München
Sanger Institute	<a href="http://www.sanger.ac.uk/">http://www.sanger.ac.uk/</a>
The <i>C. elegans</i> Gene Knockout Consortium	<a href="http://celeganskoconsortium.omrf.org/">http://celeganskoconsortium.omrf.org/</a>
Wormbase Home Page	<a href="http://www.wormbase.org">http://www.wormbase.org</a>

#### 3.3 Verbrauchsmaterialien

Abgene Superplate 96 Well PCR Plate	ABgene, Hamburg
Alufolie	VWR, Darmstadt
Deckgläser (24 mm x 32 mm)	Roth, Karlsruhe
Deckgläser (18 mm x 18 mm)	Menzel-Glaser, Braunschweig
Einfrierröhrchen Cryo. S	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Einmalspritze	B. Braun, Melsungen
Elektrodenglas (GB 100F-10)	Science Products, Hofheim
Falcon tubes, 15ml, 50 ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Mikroküvetten	Roth, Karlsruhe
Mikroliterspritze	Roth, Karlsruhe
Mikrozentrifugengefäße	Kisker, Steinfurt
Milli-Q	Millipore, Schwalbach
Oberjektträger (76 mm x 26 mm)	Roth, Karlsruhe
Ohrmarken	Hauptner & Herberholz, Solingen

### 3. Materialien

---

Parafilm	Roth, Karlsruhe
Pasteurpipetten	Roth, Karlsruhe
PCR-Tubes	ABgene, Hamburg
Pipettierhilfe	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Plastikpipetten	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Platindraht (0,2 mm)	VWR, Darmstadt
Reaktionsgefäße	Sarstedt, München
Sterile Femtotips	Eppendorf, Hamburg
VDS Film Rolls	GE Healthcare, München
Wurmschalen	Nunc, Wiesbaden
Zahnstocher	Drogerie, Mainz

#### 3.4 Chemikalien, Enzyme, DNA/RNA-Marker und *Kits*

##### 3.4.1 Chemikalien

Agar-Agar	Roth, Karlsruhe
Aldicarb	Supelco, München
Ammoniumchlorid	Fluka, Seelze
Ampicillin	Roth, Karlsruhe
Bacto Agar	Becton Dickinson, Heidelberg
Bacto Peptone	Becton Dickinson, Heidelberg
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
Cadmiumchlorid 2 ½ H <sub>2</sub> O	Sigma-Aldrich, München
Chloroform	Roth, Karlsruhe
Cholesterin	Roth, Karlsruhe
Citronensäure Monohydrat	Roth, Karlsruhe
DEPC	Roth, Karlsruhe
Diethylether	Roth, Karlsruhe
Di-Kaliumhydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe
Di-Natriumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
dNTPs	Fermentas, St. Leon-Rot
EDTA	Roth, Karlsruhe

### 3. Materialien

---

Ethanol 99% (pa)	Roth, Karlsruhe
Ethanol 99% (tech)	VWR, Darmstadt
Ethidiumbromid 1%	Roth, Karlsruhe
Fleischextrakt	Roth, Karlsruhe
Formamide	Fluka, Seelze
Glucose D(+)	Sigma-Aldrich, München
Glycerin	Roth, Karlsruhe
Glycin (pa.)	Roth, Karlsruhe
Halocarbon Oil 700	Sigma-Aldrich, München
Hefeextrakt	Roth, Karlsruhe
HEPES	Roth, Karlsruhe
IPTG	Fermentas, St. Leon-Rot
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Isopropylalkohol	Sigma-Aldrich, München
Kaliumchlorid	Roth, Karlsruhe
Kaliumdihydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe
Kaliumhydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe
Kaliumhydroxid	Roth, Karlsruhe
Kalziumchlorid Dihydrat	Roth, Karlsruhe
Kanamycin	Roth, Karlsruhe
Magnesiumchlorid	Roth, Karlsruhe
Magnesiumsulfat Heptahydrat	Roth, Karlsruhe
Methanol (pa)	Roth, Karlsruhe
MOPS	Biomol, Hamburg
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumazid	Sigma-Aldrich, München
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva, Heidelberg
Natriumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Natronlauge	Roth, Karlsruhe
Natrium-Hypochlorid 5%	Sigma-Aldrich, München
Nonidet <sup>®</sup> P 40	Fluka, Seelze
Oligo dT	MWG, Martinsried
ParaFormaldehyd >37%	Roth, Karlsruhe

### 3. Materialien

---

Pentylentetrazol (PTZ)	Sigma-Aldrich, München
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich, München
Saccharose D(+)	Roth, Karlsruhe
Salzsäure	Roth, Karlsruhe
Seakem <sup>®</sup> LE Agarose	Biozym, Oldendorf
Stickstoff	Linde, Wiesbaden
Wasser steril	Roth, Karlsruhe
Tetracyclin	Sigma-Aldrich, München
Tris-HCl	Sigma-Aldrich, München
Tris Pufferan <sup>®</sup>	Roth, Karlsruhe
Trizma Hydrochlorid	Sigma-Aldrich, München
Trypton/Pepton aus Casein	Roth, Karlsruhe
Tween 20	Merck, Darmstadt
Xylencyanol	Merck, Darmstadt
2-Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt

#### 3.4.2 Enzyme

Alkalische Phosphatase aus Kälberdarm (CIAP)	Fermentas, St. Leon-Rot
Phusion High-Fidelity DNA-Polymerase	Bio Cat, Heidelberg
Proteinkinase K	Sigma-Aldrich, München
T4-DNA-Ligase	Fermentas, St. Leon-Rot
Taq-DNA-Polymerase	Eppendorf, Hamburg

#### 3.4.3 DNA/RNA-Marker

DNA MassRuler	Fermentas, St. Leon-Rot
RNA-Marker (0,24-9,5 kb)	Invitrogen, San Diego, CA, USA
1 kb DNA Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot
100 bp DNA Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot

### 3.4.4 Reagenzsätze (Kits)

<i>Absolute<sup>TM</sup> QPCR SYBR<sup>®</sup> Green Mixes</i>	ABgene, Hamburg
<i>Omniscript RT (200)</i>	Qiagen, Hilden
<i>Protease Inhibitor complete</i>	Roche, Mannheim
<i>Qiaprep Spin Mini-Prep. Kit</i>	Qiagen, Hilden
<i>Qiaquick Gel Extraction Kit</i>	Qiagen, Hilden
<i>Qiaquick PCR-Purification Kit</i>	Qiagen, Hilden
<i>RNeasy Mini Kit</i>	Qiagen, Hilden
<i>Trizol Reagent</i>	Invitrogen, San Diego, CA, USA

### 3.5 Oligonukleotide, Plasmide und Restriktionsendonukleasen

Alle Primer wurden unter Zuhilfenahme der Software Clonemanager 7.01 entworfen und von der Firma MWG mit einer Konzentration von 100 pmol/μl synthetisiert. Sie sind in 5' – 3' Richtung orientiert. Vor der Verwendung wurden alle Oligonukleotide 1:10 mit autoklaviertem bidestilliertem Wasser verdünnt.

#### 3.5.1 Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide sind in Tab. 9.4 - 9.8 aufgeführt.

#### 3.5.2 Plasmide

**Tab. 3.1 Die verwendeten Plasmide.**

Plasmid	Plasmidgröße	Resistenz	Quelle
L4440	2790 bp	Ampicillin	CGC
pVH10.10(CFP)	4551 bp	Ampicillin	Hutter Labor
pVH20.01(YFP)	4550 bp	Ampicillin	Hutter Labor

### 3.5.3 Restriktionsendonukleasen

Tab. 3.2 Restriktionsendonukleasen und ihre Erkennungssequenzen.

Enzym	Erkennungsssequenz (5' zu 3')	Quelle
BamHI	G↓GATCC*	Fermentas, St. Leon-Rot
HindIII	A↓AGCTT	Fermentas, St. Leon-Rot
Sall	G↓TCGAC	Fermentas, St. Leon-Rot
Small	CCC↓GGG	Fermentas, St. Leon-Rot
SphI	GCATG↓C	Biolabs, Frankfurt
XbaI	T↓CTAGA	Fermentas, St. Leon-Rot

\* Kennzeichnung der Schnittstelle durch einen Pfeil

### 3.6 Puffer, Lösungen, Kulturmedien und Bakterienstämme

Für die Herstellung von Puffer, Lösungen und Kulturmedien wurde bidestilliertes Wasser verwendet. Normale Puffer, Lösungen und Medien, falls erforderlich, wurden durch Autoklavieren von 20 min bei 120°C sterilisiert. Hitzeempfindliche Lösungen wurden durch Filtration mit Milli-Q (0,2 µm) sterilfiltriert.

#### 3.6.1 Puffer und Lösungen

Aldicarb-Stammlösung (100 mM)	0,57 g Aldicarb in 30 ml Aceton
Lysepuffer für einen einzelnen Wurm	50 mM KCl 10 mM Tris-HCl (pH 8,3) 2,5 mM MgCl <sub>2</sub> 0,45% Noidet <sup>®</sup> P-40 0,45% Tween-20 60 µg/ml Proteinase K
Lysepuffer für Mouseschwanz-DNA	50 mM Tris-HCl (pH 8,0) 100 mM EDTA NaCl 100mM SDS 1% (w/v) Zugabe vor der Anwendung: 0,5 mg/ml Proteinase K

### 3. Materialien

---

Lysepuffer für synchronisierte Würmer	10 ml 5% Na-Hypochlorid 25 ml 1 N NaOH 15 bidest. Wasser
MOPS (10x)	0,2 M MOPS (pH 7,0) 80 mM Natriumacetat 10 mM (pH 8,0) 1‰ DEPC (v/v)
RNA-Gelladepuffer (10x)	50% (v/v) Glycerin 1 mM EDTA 0,4% (w/v) Bromphenolblau 0,4% (w/v) Xylencyanol
TBE-Puffer	50 mM Tris 5 mM Borsäure 1 mM EDTA (pH 8,0)
Eierpuffer (pH 7,3)	58,4 g/l NaCl 74,6 g/l KCl 147,0 g/l CaCl <sub>2</sub> 203,3 g/l MgCl <sub>2</sub> HEPES 238,1 g/l

#### 3.6.2 Kulturmedien

##### 3.6.2.1 *C. elegans*-Kulturmedien

Bleich-Lösung	1 g NaOH 10 ml 5% Na-Hypochlorid 40 ml bidest. Wasser
<i>Freezing</i> -Medium	200 mM NaCl 100 mM KPO <sub>4</sub> (pH 6,0)

### 3. Materialien

---

	30% Glycerin Zugabe vor der Anwendung: 0,3 mM $\text{MgSO}_4$
<i>High</i> -Pepton-Agar	1,2 g/l NaCl 20 g/l Pepton 25 g/l Agar
1 M $\text{KPO}_4$ Puffer (pH 6,0)	129,5 g/l $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 51,8 g/l $\text{K}_2\text{HPO}_4$
M9-Medium	5,8 g/l $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 3,0 g/l $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 0,5 g/l NaCl 1,0 g/l $\text{NH}_4\text{Cl}$
NGM-Agar	3 g/l NaCl 16 g/l Bacto Agar 2,5 g/l Bacto Pepton Zugabe vor der Anwendung (55°C) 4,0 ml 1 M $\text{MgSO}_4$ 4,0 ml 1 M KCl 100 ml 1 M $\text{KPO}_4$ (pH 6,0) 4,0 ml Cholesterin (5 mg/ml in EtOH)
NGM-Agar für RNAi	3 g/l NaCl 16 g/l Bacto Agar 2,5 g/l Bacto Pepton Zugabe vor der Anwendung (55°C) 25 $\mu\text{g/ml}$ Tetracyclin 1 mM/ IPTG 4,0 ml 1 M $\text{MgSO}_4$ 4,0 ml 1 M KCl 100 ml 1 M $\text{KPO}_4$ (pH 6,0)

### 3. Materialien

---

	4,0 ml Cholesterin (5 mg/ml in EtOH)
S-Basal Puffer	5,8 g/l NaCl 50 ml/l 1 M KPO <sub>4</sub> (pH 6,0) Zugabe vor der Anwendung: 1 ml/l Cholesterin (5 mg/ml in EtOH)

#### 3.6.2.2 Bakterien-Kulturmedien

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 (pH 6,8-7,0)	10 g/l Pepton 1,5 g/l KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 3,5 g/l K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 5,0 g/ NaCl 1,0 g/l Glucose 3 g/l Fleischextrakt
2 x YT-Medium (für NA22 Bakterien) (pH 7,0)	16 g/l Trypton 10 g/l Hefeextrakt 5 g/l NaCl

#### 3.6.3 Bakterienstämme

Die verwendeten RNAi-Bakterienstämme sind in Tab. 9.9 aufgeführt.

**Tab. 3.3 Die verwendeten *E. Coli*-Stämme.**

Name	Quelle	Bemerkung
HB101	DSMZ, Braunschweig	Nahrung der <i>C. elegans</i>
HT115	CGC	für RNAi-Experiment
NA22	CGC	Nahrung der synchronisierten <i>C. elegans</i> -Kulturen
XL1-Blue	Stratagene, La Jolla, USA	zur Klonierung

#### 3.7 Materialien für *GeneChip*<sup>®</sup>-Experimente

Die in dieser Arbeit verwendeten *GeneChip*<sup>®</sup> Arrays wurden von Firma Affymetrix hergestellt.

##### 3.7.1 *GeneChip*<sup>®</sup>-Arrays

<i>C. elegans</i> -Genome-Array	Affymetrix, Santa Clara, CA, USA
<i>Mouse-Genome-430-2.0</i> -Array	Affymetrix, Santa Clara, CA, USA

##### 3.7.2 Affymetrix *GeneChip*<sup>®</sup> System und zusätzliche Geräte

Bioanalyzer 2100	Agilent, Palo Alto, CA, USA
BioPhotometer	Eppendorf, Hamburg
<i>GeneChip</i> <sup>®</sup> Fluidics Station 450	Affymetrix, Santa Clara, CA, USA
<i>GeneChip</i> <sup>®</sup> GCS 3000 Scanner	Affymetrix, Santa Clara, CA, USA
<i>GeneChip</i> <sup>®</sup> Hybridization Oven 640	Affymetrix, Santa Clara, CA, USA
<i>GeneChip</i> <sup>®</sup> Workstation	Affymetrix, Santa Clara, CA, USA
Sterile RNase-free Microcentrifuge	Heraeus Hanau

##### 3.7.3 Puffer, *Kits* und Verbrauchsmaterialien

<i>Biotinylated Nucleotides</i>	Invitrogen, San Diego, CA, USA
Ethanol Absolute	Roth, Karlsruhe
<i>GeneChip</i> <sup>®</sup> Test 3 Array	Affymetrix, Santa Clara, CA, USA
<i>Hybridization Control Kit</i>	Affymetrix, Santa Clara, CA, USA
IVT Labeling Kit	Affymetrix, Santa Clara, CA, USA
Oligo(dT) <sub>24</sub> - T7 Primer	Invitrogen, San Diego, CA, USA
<i>Poly-A Control Kit</i>	Affymetrix, Santa Clara, CA, USA
<i>RNase-free Pipettes Tips</i>	Biozym, Oldendorf
<i>RNeasy Mini Kit</i>	Qiagen, Hilden
R-Phycoerythrin-Streptavidin	Merck, Darmstadt
<i>Sample Cleanup Module</i>	Affymetrix, Santa Clara, CA, USA
<i>Superscript II Double-Stranded cDNA Synthesis</i>	Invitrogen, San Diego, CA, USA

### 3. Materialien

---

T7 RNA-Polymerase	Invitrogen, San Diego, CA, USA
1N Natronlauge	Roth, Karlsruhe
1N Salzsäure	Roth, Karlsruhe
3M Natrium Acetat	Sigma-Aldrich, München
10 x TBE	Cambrex, Rockland, USA

### 4. Methoden

#### 4.1 Allgemeine molekularbiologische Methoden

##### 4.1.1 DNA-Methoden

###### 4.1.1.1 DNA-Isolierung

###### 4.1.1.1.1 Isolierung genomischer DNA aus Mausschwänzen

In den Vorarbeiten von Prof. Dr. Rudolf Leube wurde das mutierte Allel der *Sph-1-Knockout*-Mäuse in den Inzuchtstamm C57BL/6J für fünf Generationen rückgekreuzt. Dazu wurden heterozygote *Sph-1*<sup>-/-</sup>-Weibchen mit C57BL/6J-WT-Männchen verpaart. Da das *Sph-1*-Gen auf dem X-Chromosom lokalisiert ist (Özcelik et al., 1990), waren 50% der männlichen Nachkommen *Knockout*-Tiere.

Zur Genotypisierung wurden bei den drei bis vier Wochen alten Mäusen ca. 0,5 cm des Schwanzes abgeschnitten und über Nacht bei 55°C (Wärmeschrank) in 750 µl Schwanzlysepuffer mit 0,5 mg/ml Proteinase K inkubiert. Am nächsten Tag wurde die verdaute Probe überkopf geschüttelt und zur Proteinfällung mit 250 µl 5 M NaCl-Lösung versetzt, gemischt und schließlich für 10 min bei 13.000 g abzentrifugiert. 750 µl des Überstands wurden in ein frisches Eppendorf-Tube überführt und mit 600 µl Isopropanol für die Extraktion der DNA vermischt. Anschließend wurde die Probe 10 min bei 13.000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 150 µl -20°C-kaltem 70%-igem Ethanol gewaschen und erneut für 5 min bei 13.000 g zentrifugiert. Nach dieser Zentrifugation wurde der Überstand abgenommen und das Pellet in 50 µl bidestilliertem Wasser aufgenommen. Zum Verdampfen des restlichen Ethanols wurde das Reaktionsgefäß mit geöffnetem Deckel bei 60°C für etwa 5 min in den Thermoblock (IDL) gestellt. Zum Auflösen des Pellets wurde das Reaktionsgefäß anschließend bei 4°C einige Tage aufbewahrt.

### 4.1.1.1.2 Isolierung genomischer DNA aus *C. elegans*

Um den Genotyp der *C. elegans*-Stämme zu bestimmen, wurde genomische DNA jeweils aus einem jungen adulten Wurm extrahiert. Jedes adulte Einzeltier wurde zuerst mindestens 15 min bei  $-80^{\circ}\text{C}$  in  $10\ \mu\text{l}$  *C. elegans*-Lysepuffer mit  $60\ \mu\text{g/ml}$  Proteinase K eingefroren, danach wurde die Probe eine Stunde bei  $65^{\circ}\text{C}$  und 15 min bei  $95^{\circ}\text{C}$  mittels Thermocycler (Peqlap oder NWG) inkubiert. Die lysierte DNA wurde direkt für die PCR verwendet oder bei  $4^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### 4.1.1.1.3 Isolierung von Plasmid-DNA

Es wurden 4 ml Übernachtskultur von *E. coli* für die Isolierung von Plasmid-DNA eingesetzt, und die Präparation der gewonnenen Plasmid-DNA erfolgte durch alkalische Lyse mittels des *Qiagen-Mini-Kit* nach den Angaben des Herstellers. Die gewonnene DNA konnte direkt zur Restriktionsverdauung und zur Sequenzierung verwendet werden.

### 4.1.1.2 Elektrophoretische Auftrennung von DNA im Agarosegel

Mittels der Agarose-Gelelektrophorese wurde die DNA nach ihrer Größe gut getrennt. Die Agarose wurde in einer Konzentration von 1%-igem (w/v) TBE-Puffer einmal unter Kochen gelöst. Nach Abkühlen auf ca.  $55^{\circ}\text{C}$  wurde  $0,4\ \mu\text{g/ml}$  Ethidiumbromid hinzugefügt und die Agaroselösung in die entsprechende Gelform mit Kamm gegossen. Die DNA-Probe wurde einmal mit DNA-Ladepuffer versetzt und in die Geltasche pipettiert. Dann wurden 4 ml DNA-Ladder-Marker (Fermentas) als DNA-Größenstandard aufgetragen. Die Auftrennung der DNA-Fragmente wurde unter einer Spannung von 70-130 Volt durchgeführt. Die Dokumentation des Gels erfolgte durch einen UV-Spektrophotometer (Pharmacia).

### 4.1.1.3 Bestimmung der DNA-Konzentration

Die Konzentrationsbestimmung der DNA erfolgt entweder durch die Verwendung eines *DNA-MassRulers* (Fermentas) oder durch Erstellung einer Verdünnungsreihe einer DNA-Probe. Bei der zweiten Methode wurden  $3\ \mu\text{l}$  des zu bestimmenden DNA-Präparats mit destilliertem Wasser in 10er Schritten seriell im Verhältnis 1:2 verdünnt. Anschließend wurde das Volumen mit destilliertem Wasser auf  $10\ \mu\text{l}$  aufgefüllt. Nach Zugabe von  $2\ \mu\text{l}$  6x DNA-Ladepuffer wurde der gesamte Ansatz auf Standard-Agarosegel aufgetragen. Die DNA-

Menge der gerade noch sichtbaren Bande entspricht etwa 10 ng , so dass die Konzentration der DNA nach folgender Formel bestimmt werden konnte:

$$\text{DNA-Konzentration [ng/}\mu\text{l]} = 2^{\text{VF}} \times 10 / \text{eingesetztes Volumen}$$

\* VF (Verdünnungsfaktor) entspricht der Nummer der Verdünnung, bei der noch eine Bande sichtbar ist.

### **4.1.1.4 Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen**

Nach guter Auftrennung auf 1%-igem Agarosegel (4.1.1.2) wurde die erwünschte Bande der DNA mit einem scharfen Skalpell unter UV-Licht vorsichtig ausgeschnitten und in ein sauberes Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt, anschließend wurde die DNA mit Hilfe des *Qiaquick Gel-Extraction-Kits* (Qiagen) gemäß den Herstellerangaben isoliert. Die DNA wurde in 50  $\mu\text{l}$  EB-Puffer eluiert und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### **4.1.1.5 Restriktionsendonukleaseverdauung von DNA**

Zum Linearisieren von Plasmiden für die Überprüfung der Größe von DNA-Fragmenten wurden DNA-Proben mit den entsprechenden Restriktionsenzymen und Reaktionspuffern unter den vom Hersteller empfohlenen Bedingungen verdaut. Anschließend erfolgte die Auftrennung der verdauten DNA im Agarosegel wie im Kapitel 4.1.1.2 beschrieben.

### **4.1.1.6 DNA-Klonierung**

Durch Klonierung können Gen- oder ein DNA-Fragmente in Plasmid-Vektoren eingeschleust und anschließend in *E. coli*-Bakterien vermehrt werden.

In dieser Arbeit wurden die DNA-Fragmente in den Vektor L4440 für die RNAi-Experimente eingebaut, für Untersuchungen von Promoter- und Gensequenzen wurden diese in die Expressionsvektoren pVH10.10 (*CFP*) und pVH20.01 (*YFP*) eingesetzt und anschließend in die Gonaden mikroinjiziert.

### 4.1.1.6.1 Herstellung kompetenter Bakterien für RNAi-Experimente

HAT-115(DE3)-Bakterien wurden auf LB-Agar-Platten mit 25 µg/ml Tetracyclin ausgestrichen und über Nacht bei 37°C kultiviert. Anschließend wurden Übernachtskulturen (LB-Medium mit 25 µg/ml Tetracyclin) von Einzelkolonien angelegt. 2,5 ml der Übernachtskulturen wurden jeweils zu 25 ml LB-Medium (25 µg/ml Tetracyclin) gegeben und weiter bei 37°C und 212 UpM bis  $OD_{595} = 0,4$  geschüttelt. Die Bakterien wurden dann 10 min bei 4°C und 4000 g pelletiert und in 12,5 ml eiskaltem 50 mM  $CaCl_2$  resuspendiert. Nach 30-minütigem Lagern auf Eis wurden die Bakterien erneut bei 4°C und 4.000 g abzentrifugiert und in 2,5 ml eiskaltem 50 mM  $CaCl_2$  resuspendiert. Die Bakterien sind bei 4°C Lagerung bis zu drei Tage für eine Transformation verwendbar oder können nach Zugabe von Glycerin (Endkonzentration 10%) jeweils zu 200 µl aliquotiert, in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bei -70°C für unbegrenzte Zeit gelagert werden.

### 4.1.1.6.2 Dephosphorylierung von DNA

Um die Wiederverknüpfung restriktionsverdauter Vektor-DNA ohne Aufnahme von Insert zu verhindern und um die Klonierungseffizienz zu erhöhen, wurden die 5'-Phosphatgruppen des Vektors vor der Ligation durch Verwendung der alkalischen Kälberdarmphosphatase (CIAP) bei 37°C für 30 min dephosphoryliert (Tab. 4.1). Nach Säulenaufreinigung über das *Qiaquick-PCR-Purification Kit* wurde die Vektor-DNA für die Ligation verwendet.

**Tab. 4.1 Standard Ansatz für die Dephosphorylierung von DNA.**

25 µl verdaute Vektor-DNA
3 µl 10x Reaktionspuffer
1 µl CIAP
1 µl dest. H <sub>2</sub> O

### 4.1.1.6.3 Ligation

Das zu klonierende DNA-Fragment wurde mithilfe der T4-DNA-Ligase mit dem von Restriktionsenzymen behandelten Vektor ligiert. Für die Ligation wurde ein Gesamtvolumen von 10 µl (molarer Vektor und Insert-Verhältnis: 3:1) eingesetzt und entweder zwei Stunden bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 15°C inkubiert.

Die Fragmentmenge wurde nach folgender Formel bestimmt:

$$\text{Massen}_{\text{fragment}} [\text{ng}] = 125 [\text{ng}] \times \frac{\text{Länge}_{\text{fragment}} [\text{bp}]}{\text{Länge}_{\text{vektor}} [\text{bp}]}$$

### 4.1.1.6.4 Transformation von Bakterien nach der Hitzeschockmethode

Unter einer Transformation versteht man die Aufnahme von Fremd-DNA durch die permeabilisierte Zellmembran der Bakterien.

#### 4.1.1.6.4.1 Transformation von kompetenten XL1-Blue-Zellen

Zur Transformation wurden 200 µl auf Eis aufgetauter kompetenter Bakterien (XL1-Blue) mit 10 µl Ligationsansatz gut gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Nach dem anschließenden Hitzeschock bei 42°C für 2 min erfolgte ein zehnminütiges Abkühlen auf Eis. Nach der Zugabe von 1 ml LB-Medium wurden die Zellen 30 min lang bei 37°C inkubiert. Nach dem Zentrifugieren für 5 min bei 3.000 g wurde der Überstand dekantiert und das Pellet in 50 µl frischem LB-Medium resuspendiert. 80% bzw. 20% der Suspension wurden auf vorgewärmten LB-Agar-Platten mit Ampicillin (100 µg/ml) oder Kanamycin (50 µg/ml) ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde eine einzelne Kolonie mit einem sterilen Zahnstocher gepickt und zusammen mit 4 ml LB-Medium und einem entsprechendem Antibiotikum eine Mini-Vorkultur angelegt.

#### 4.1.1.6.4.2 Transformation von kompetenten Bakterien für RNAi

RNA-Interferenz (RNAi) ist eine spezifische und schnelle Methode für das Ausschalten der Genfunktion und wird damit für die Genfunktionanalyse eingesetzt (Fire et al., 1998). Diese durch doppelsträngige RNA (dsRNA) verursachte Geninaktivierung wurde in *C. elegans* mit Hilfe der Fütter-Methode erreicht (Timmons et al., 2001). Für die RNAi-Experimente wurden genomische Fragmente in dem zwei T7-RNA-Promoterstellen enthaltenden „Füttern“-Vektor L4440 kloniert und in HT115(DE3) *E. coli*-Bakterien transformiert. Die HT115(DE3) haben

IPTG-induzierbare T7-RNA-Polymeraseaktivität. Damit kann die RNA von den inserierten DNA-Fragmenten des Vektors L4440 transkribiert werden (Timmons & Fire, 1998).

Zur Transformation des *E. coli*-Stammes HT115(DE3) wurden 200 µl hergestellte kompetente Bakterien (4.1.1.6.1) mit 1 µl Plasmid-DNA (1-100 ng) für 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem 60-sekündigen Hitzeschock bei 37°C wurde der Ansatz für 5 min auf Eis abgekühlt. Nach Hinzufügen von 1 ml sterilem SOC wurden die Bakterien eine Stunde bei 37°C und 220 UpM geschüttelt. Anschließend wurde die Suspension 2 min bei 3000 g abzentrifugiert. Nach Abnehmen des Überstands wurde das Pellet vorsichtig resuspendiert. Jeweils 50 µl und 150 µl der Suspension wurden auf vorgewärmte LB-Agar-Platten mit Ampicillin (50 µg/ml) ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

### 4.1.1.7 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung der klonierten Proben wurde mit den jeweils angegebenen Primern durch die Firma *GENterprise Genomics* in Mainz durchgeführt. Die Sequenzierungsergebnisse wurden anhand der PC-Programme Chromas 1.45 und Clonemanager 7.01 ausgewertet.

### 4.1.2 RNA-Methoden

Alle für die RNA-Methoden gebrauchten Lösungen wurden mit 0,1%-igem (v/v) DEPC-Wasser hergestellt. Das 0,1%-DEPC-Wasser wurde über Nacht bei Raumtemperatur gut aufgelöst und zweimal für 20 min bei 120°C autoklaviert. Die zur RNA-Isolierung benötigten Geräte, z. B. Mörser, Pistill, Pinzette und Homogenisatoren, wurden vor der Verwendung ebenfalls autoklaviert und anschließend im Trockenschrank bei 200°C für zwei Stunden getrocknet.

#### 4.1.2.1 Isolierung von Gesamt-RNA aus Mausretina mit der *Trizol/RNeasy Hybrid*

##### **Methode**

Für die Affymetrix-*GeneChip*<sup>®</sup>-Experimente und die Transkriptom-Analysen wurden die Gesamt-RNAs aus Mausretina der sechs Wochen (6W bis 6W + 2T, Tab. 5.1) alten genotypisierten männlichen Sph-1<sup>-/-</sup> und Wild-Typ-Männchen, die aus demselben Wurf stammten, isoliert. Nach Anästhesieren mit Diethylether wurden 2 - 8 Retinae aus mutanten und wildtypischen Mäusen umgehend mithilfe einer spezifischen Pinzette entnommen und

anschließend jeweils mit 1 ml vorgekühlter Trizol-Lösung in einem Homogenisator zerkleinert. Die homogenisierten Proben wurden 5 min bei Raumtemperatur bis zur vollständigen Dissoziation der Nukleoproteinkomplexe inkubiert. Nach Hinzufügen von 200 µl Chloroform wurden die Proben 15 sec überkopf geschüttelt und erneut 2 - 3 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Homogenisate wurden bei 4°C und 11.000 g für 15 min zentrifugiert. Die oberen wässrigen Phasen (ca. 60% des Gesamtvolumens) wurden vorsichtig in ein frisches Eppendorf-Tube transferiert und sofort mit 500 µl Isopropylalkohol durchmischt und erneut 10 min bei 11.000 g bei Raumtemperatur inkubiert.

Nach zehnminütiger Zentrifugation bei 11.000 g wurden die Überstände vorsichtig entfernt, die weißlichen Pellets mit 1 ml 75%-igem Ethanol (in DEPC Wasser) versetzt und für 5 min und 7.500 g bei 4°C zentrifugiert. Nach Abnehmen des Überstands wurden die Pellets ca. 10 min bei Raumtemperatur getrocknet und in 100 µl RNase-freiem Wasser resuspendiert. Die durch Trizol-Lösung isolierten RNA-Proben wurden anschließend mit Hilfe des *RNeasy-Mini-Kit* nach dem *Cleanup*-Protokoll aufgereinigt. Nach Zugabe von 350 µl RLT-Puffer (ohne 2-Mercaptoethanol) und 250 µl 100% Ethanol wurden die RNA-Lösungen mit einer Pipette gut gemischt, auf *RNeasy-Mini*-Säulen übertragen und bei 4°C und 11.000 g für 30 sec zentrifugiert. Danach wurden die Säulen auf neue 2 ml-Tubes aufgesetzt. Nach zweimaligem Waschen mit 500 µl RPE-Puffer (jeweils 15 sec und 2 min bei 4°C und 11.000 g) wurden die Säulen 1 min bei 4°C und 13.000 g zum Trocknen der Membran zentrifugiert. Die RNAs wurden in 50 µl RNase-freiem Wasser eluiert und bis zu Verwendung bei -80°C gelagert.

### **4.1.2.2 Isolierung von Gesamt-RNA aus *C. elegans* mit der *Trizol/RNeasy Hybrid-Methode***

Für Transkriptom-Analysen wurden die Gesamt-RNAs aus synchronisierten und jungen adulten Würmern der zu untersuchenden Stämme isoliert. Dazu wurden die gut gewaschenen Würmer aus 3 - 4 10 cm Wurmschalen für jeden Stamm in M9-Medium in einem 15 ml Falcon-Tube gesammelt und dreimal mit M9 bei Raumtemperatur bei 5.000 g gewaschen. Nach vorsichtigem Entnehmen der Überstände wurde 1 ml Trizol-Lösung zu jedem Wurm-Pellet gegeben. Die Gesamtvolumina wurden sofort in mit Flüssigstickstoff gefüllte Mörser gegossen und mit einem Pistill bei 4°C homogenisiert. Dieser Schlamm wurde für 5 min bei Raumtemperatur bis zum Auftauen stehen lassen und jeweils in ein 1,5 ml großes, unbenutztes Eppendorf-Tube überführt. Im Anschluss wurden die RNAs nach den im Kapitel 4.1.2.1 beschriebenen Schritten isoliert und aufgereinigt.

### 4.1.2.3 Denaturierende Agarose-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung der RNA-Proben wurde die 1,2%-ige denaturierende Agarose-Gelelektrophorese eingesetzt. 1,2 g Agarose wurden in 50 ml bidestilliertem Wasser in einer Mikrowelle (Miele) aufgekocht. Nach Abkühlen auf ca. 55°C wurden 10 ml 10x MOPS und 18 ml 37%-iges (w/v) Formaldehyd hinzugegeben und mit bidestilliertem Wasser auf 100 ml aufgefüllt. Die Agaroselösung wurde in die vorbereitete Gelform mit Kamm gegossen.

10 µl RNA-Lösung wurden mit 20 µl Formamid, 7 µl 37%-igem (w/v) Formaldehyd, 4 µl 10x MOPS und 1 µl Ethidiumbromid versetzt. Der Ansatz wurde für 15 min bei 55°C im Wasserbad (Bioblock Scientific) denaturiert. Nach Abkühlen auf Eis für 25 min wurde die Probe mit 4 µl RNA-Ladepuffer (Fermentas) versetzt und das Gesamtvolumen auf das polymerisierte Gel in 1x POPS-Puffer aufgetragen. Die Auftrennung der RNA-Fragmente erfolgte bei 100 V. Nach ca. dreistündiger Auftrennung erfolgte die Dokumentation durch einen UV-Spektrophotometer. Hohe Schärfe und gut erkennbare 28S- und 18S-RNA-Banden im Verhältnis 2:1 wiesen auf die gute Qualität der RNA-Probe hin.

### 4.1.2.4 Konzentrations- und Qualitätsbestimmung der RNA

Eine erste Qualitätskontrolle der isolierten Gesamt-RNA erfolgte durch die photometrische Bestimmung und die denaturierende Agarose-Gelelektrophorese (4.1.2.3). Proben mit deutlich erkennbaren Degradationsprodukten wurden von der weiteren Bestimmung ausgeschlossen. Anschließend wurden die Konzentrations- und Qualitäts-Bestimmungen der verbliebenen RNA-Proben entweder mittels eines Agilent-2100 Bioanalyser bei der *HDMA Core-Facility* der Universität Mainz oder mit dem Nanodrop ND-1000 (Peqlap) nach Anweisung des Herstellers analysiert. Der Reinheitsgrad der RNA-Lösung wurde durch den Extinktionskoeffizienten ermittelt. Der  $OD_{260}/OD_{280}$ -Wert sollte bei einer reinen RNA-Probe zwischen 1,8 und 2,1 liegen. Der erhebliche Vorteil dieser Messung besteht in dem geringen Probenvolumen (1 µl) und der parallelen Bestimmung der Qualität und Quantität der RNA. Die Messergebnisse mit dem Bioanalyser sind in den Tab. 9.10 - 9.11 gezeigt. Alle eingesetzten RNA-Proben wurden diesen Qualitäts- und Quantitätsbestimmung unterworfen.

#### 4.1.2.5 Reverse Transkription

Die Transkription der Gesamt-RNA in cDNA erfolgte mittels des Qiagen *Ominiscript RT Kit*. Doppelsträngige cDNA wurde aus 1 µg Gesamt-RNA nach folgendem Pipettierschema (Tab. 4.2) bei 37°C für eine Stunde und bei 95°C für 5 min mit Hilfe eines Thermocyclers umgeschrieben. Für jede eingesetzte reverse Transkription wurde parallel ein Kontrollansatz mitgeführt, der alle Bestandteile für die Reaktion mit Ausnahme der RNA-Probe enthielt.

**Tab. 4.2 Standard-Ansatz für reverse Transkription (20 µl in RNase-freiem Wasser).**

Gesamt-RNA	1 µg
10x Puffer	2 µl
dNTPs (10 mM)	2 µl
Oligo dT-Primer	2 µl
RNase Inhibitor	0,5 µl
Omniscript	1 µl

#### 4.1.3 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Zur Genotypisierung der untersuchten Tiere und zur Amplifizierung von Promoter- und Gensequenzen für Klonierungen wurden *Thermocycler primus 96 advanced* (Peqlap, Erlangen) und *Thermocycler primus 96 Plus* (MWG Biotech, Martinsried) mit *Phusion High-Fidelity* DNA-Polymerase (Bio Cat) oder Taq-DNA-Polymerase (Eppendorf) verwendet. In Tab. 4.3 und 4.4 sind der Standard-Ansatz und das Standardprogramm aufgelistet. Je nach Annealingtemperatur und Sequenzlänge wurde das Programm für jede PCR optimal etabliert.

**Tab. 4.3 Standard PCR-Ansatz (25 µl).**

DNA	2 µl
10x Puffer	2,5 µl
dNTPs(10 mM)	0,5 µl
2-3 x Primer	2 µl
Taq oder Phusion DNA Polymerase	0,1 µl
bidest. Wasser	

**Tab. 4.4 Standardprogramm für PCR.**

Schritt	Zyklusphase	Temperatur	Zeit	Anzahl
1	Initiale Denaturierung	94°C*	2 min**	1 Zyklus
2	Denaturierung	94°C	30 sec	35 Zyklen
3	Annealing	55°C	30 sec	
4	Elongation	72°C	1 min	
5	Finale Elongation	72°C	5 min	1 Zyklus

\* Für Phusion-PCR war 98°C \*\* Für Phusion-PCR war 30 sec

#### 4.1.3.1 RT (Reverse Transkription) -PCR

Um mRNA in *C. elegans* oder der Mausretina nachzuweisen, wurde eine RT-PCR mittels eines *Thermocyclers* durchgeführt. Die, wie im Kapitel 4.1.2.5 bereits beschrieben, umgeschriebene cDNA wurde mit RNase-freiem Wasser im Verhältnis 1:10 verdünnt, die verdünnte cDNA diente als Matrize für die RT-PCR und wurde amplifiziert. Die genaue Zusammensetzung der einzelnen Ansätze ist in Tabelle 4.5 dargestellt sowie das verwendete PCR-Programm in Tabelle 4.6.

**Tab. 4.5 Standard RT-PCR-Ansatz (25 µl).**

cDNA	2 µl
10x Puffer	2,5 µl
dNTP(10 mM)	0,25 µl
2 Primer	2 µl
Taq oder Phusion DNA Polymerase	0,1 µl
bidest. Wasser	15,55 µl

**Tab. 4.6 Standardprogramm für RT-PCR.**

Schritt	Zyklusphase	Temperatur	Zeit	Anzahl
1	Initiale Denaturierung	94°C	4 min	1 Zyklus
2	Denaturierung	94°C	15 sec	35 Zyklen
3	Annealing	60°C	30 sec	
4	Elongation	72°C	1 min	
5	Finale Elongation	72°C	5 min	1 Zyklus

#### 4.1.3.2 Quantitative *Real-Time* RT-PCR

Quantitative *Real-Time* RT-PCR stellt eine der leistungsfähigsten und sensitivsten Methoden der Genanalyse in der Molekularbiologie dar (Bustin, 2000). Diese Technik basiert auf einer herkömmlichen PCR-Methode und quantifiziert mittels der Fluoreszenz-Markierung von cDNA die Zielsequenz-Menge einer biologischen Probe. In der vorliegenden Arbeit wurden

## 4. Methoden

der *i-Cycler* (BioRad, München) und der *Absolute<sup>TM</sup> QPCR SYBR<sup>®</sup> Green Mixes-Kit* (ABgene) mit Hilfe einer Schmelzkurvenanalyse und dem  $C_T$ -Wert (Schwellenwertzyklus: *Threshold Cycle*) zur quantitativen Bestimmung der cDNA von der Maus und *C. elegans* verwendet. Der interkalierende Fluoreszenzfarbstoff SYBR-Green I bindet spezifisch an Doppelstrang-DNA (dsDNA). In gelöster Form ist seine Leuchtkraft sehr gering, sie erhöht sich aber drastisch bis zum Hundertfachen in seiner dsDNA-gebundenen Form.

Der Anstieg des Fluoreszenz-Signals entspricht der Zunahme der gebundenen DNA-Menge und wird während der ganzen Reaktion dokumentiert. Der  $C_T$ -Wert entspricht der Zyklusanzahl, bei der das PCR-Produkt exponentiell amplifiziert wird. Bei Schmelztemperatur wird die dsDNA denaturiert, damit das Fluoreszenzsignal schnell untergeht. Schmelzkurvenanalysen dienen der Reinheitsgradkontrolle des PCR-Produkts. Mit der Amplifikat-Schmelzkurve (steile Abnahme der Fluoreszenzintensität) wurde die Qualität der entstandenen PCR-Produkte überprüft, um insbesondere Fehlamplikate auszuschließen. Zur absoluten Quantifizierung wurde eine Standardkurve jedes zu analysierenden Gens hergestellt, mit der die absolute Kopienzahl für die Ausgangskonzentration einer unbekannt Probe bestimmt. Alle daraus resultierenden Werte wurden mit dem Referenzgen GAPDH (Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase, ein *housekeeping gen*) normalisiert.

### 4.1.3.2.1 Standard *Real-Time* RT-PCR-Ansatz und verwendetes Programm

Während der PCR-Reaktion könnten die Primerdimere einen unspezifischen Anstieg des Fluoreszenzsignals verursachen. Um ein solches Störsignal zu verhindern, waren alle in dieser Arbeit resultierenden PCR-Amplikons zwischen 127 - 487 Basenpaare lang (Tab. 9.5 und 9.7). Im Fall der SYBR-Green-PCR sollte das PCR-Produkt eine Länge von 600 Basenpaaren nicht überschreiten.

Die Reagenzien wurden in eine *Abgene Superplate 96 Well PCR-Plate* pipettiert. Die Reaktion fand jeweils in einem Volumen von 25  $\mu$ l statt (Tab. 4.7), wobei die Analysen immer im Duplikat mit dem *i-Cycler* durchgeführt wurden (Tab.4.8).

**Tab. 4.7 Standard *Real-Time* RT-PCR-Ansatz (25  $\mu$ l).**

cDNA	5 $\mu$ l
Absolute QPCR SYBR Green Mixes	12,5 $\mu$ l
Forward Primer	0,75 $\mu$ l
Reverse Primer	0,75 $\mu$ l
steriles Wasser	6 $\mu$ l

**Tab. 4.8 Standardprogramm für quantitative *Real-Time* RT-PCR.**

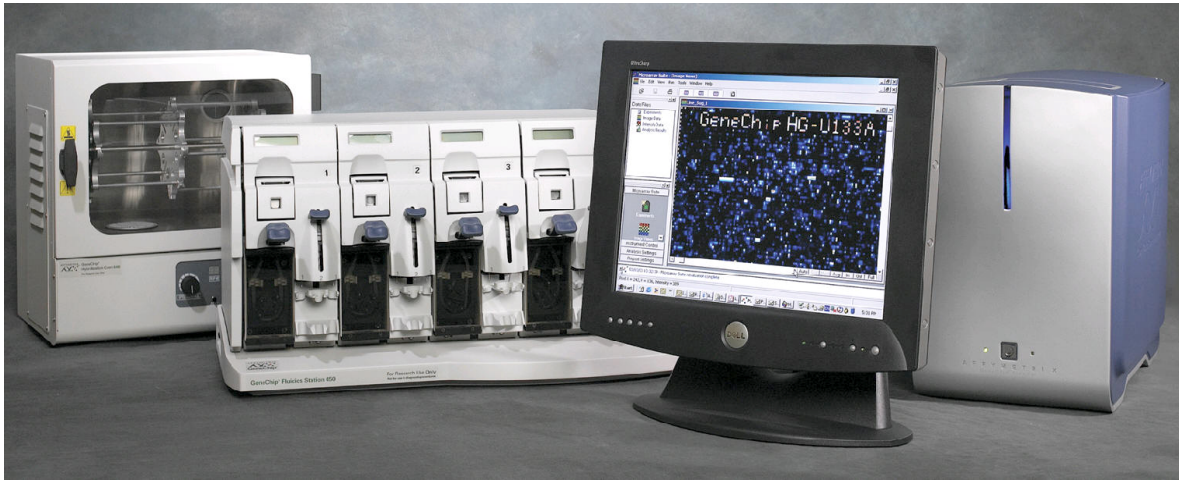
Schritt	Zyklusphase	Temperatur	Zeit	Anzahl
1	Aktivierung der Thermo-Start DNA-Polymerase	95°C	15 min	1 Zyklus
2	Denaturierung	95°C	30 sec	40 Zyklen
3	Annealing	61°C	30 sec	
4	Elongation	72°C	20 sec	
5	Schmelzkurve	60 - 100°C	8 min	

#### 4.1.3.2.2 Herstellung einer Standardkurve

Für die Herstellung einer externen Standardkurve wurde eine Verdünnungsreihe ( $10^9 - 10^2$  Kopien) der Zielsequenz-Menge im Duplikat analysiert. Zuerst wurde die zu quantifizierende Sequenzprobe (1:10-verdünnte cDNA-Probe, siehe Kap. 4.1.3.1) im *i-Cycler* nach dem Standard-Ansatz und -Programm amplifiziert. Nach guter Auftrennung auf 1%-igem Agarosegel (4.1.1.2) wurde die erwünschte Bande mittels *Qiaquick Gel Extraction Kit* isoliert. Die Konzentrationsbestimmung [ $\mu\text{g/ml}$ ] der cDNA erfolgte mit dem Nanodrop ND-1000 (Peqlap). Nach Berechnung der Kopienzahl in der Stammlösung wurde eine Verdünnungsreihe hergestellt. Anschließend wurde die Standard-Verdünnungsreihe im *i-Cycler* eingesetzt.

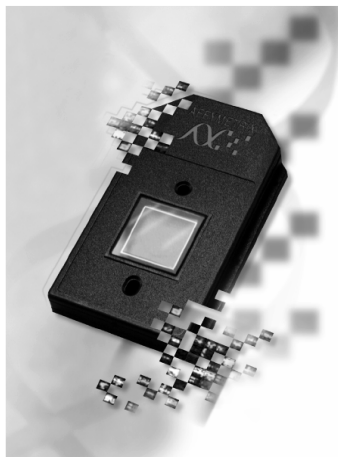
#### 4.1.4 Affymetrix-*GeneChip*<sup>®</sup>-Arrays

Eine Untersuchung der differentiellen Genexpression in wildtypischen und TVP-mutanten Tieren wurde mittels der Affymetrix-*GeneChip*<sup>®</sup>-Technologie durchgeführt. Die *GeneChip*<sup>®</sup>-Experimente mit *Mouse-Genome-430-2.0 Arrays* wurden in Mannheim beim Zentrum für Medizinische Forschung (ZMF) und die *C. elegans-Genome-Microarray*-Untersuchungen bei der HDMA Core Facility der Universität Mainz mit dem Affymetrix *GeneChip*<sup>®</sup> System (Abb. 4.1) realisiert.



**Abb. 4.1** Affymetrix *GeneChip*<sup>®</sup> System. Fluidics Station, Hybridisierungsofen, Scanner und Computer-Workstation (<http://keck.med.yale.edu>).

### 4.1.4.1 Eigenschaften der verwendeten *GeneChips*<sup>®</sup>



**Abb. 4.2**  
*C. elegans*-Genome-Array.

Für die Analyse der differentiellen Genexpression von TVP-Mutanten und WT-Tieren wurden in dieser Arbeit *Mouse-Genome-430-2.0-Arrays* und *C. elegans-Genome-Arrays* verwendet (siehe Abb. 4.2). Es gibt 45.000 Mess-Sonden auf dem Affymetrix-*GeneChip*<sup>®</sup>-*Mouse-Genome-430-2.0-Array*, diese entsprechen mehr als 39.000 Transkripten und Varianten aus über 34.000 bekannten Mausgenen. Der Affymetrix *C. elegans-Genome-Chip* detektiert mehr als 22.500 Transkripte von *C. elegans*. Auf den beiden Chips wurden für jedes Gen elf verschiedene jeweils 25 Nukleotide lange Oligo-Paare *in situ* synthetisiert. Jedes Oligonukleotidpaar enthält eine *Perfect-Match*- (PM) und eine *Mismatch* (MM)-Sequenz, wobei sich die beiden jeweils durch eine einzelne Basensubstitution in der Mitte des Oligos unterscheiden. Die PM-Probe ist eine genau komplementäre Sequenz zum entsprechenden Gen. Die dazugehörige MM-Probe dient der Bestimmung der Hintergrundintensität. Bei der Berechnung des Gesamtsignals eines Probenpaares wird die Hybridisierungsintensität der MM-Probe vom PM-Wert subtrahiert, um einen absoluten spezifischen Signalwert jeder Probe zu erhalten.

### 4.1.4.2 *GeneChip*<sup>®</sup>-Experimente

Affymetrix-*GeneChips*<sup>®</sup> wurden mit RNAs (Kap. 4.1.2.1 und 4.1.2.2) von Sph-1<sup>-/-</sup>- und WT-Männchen bzw. TVP-Dreifachmutanten (BJ21) und WT-Würmern (BJ20) nach Empfehlung des Herstellers hybridisiert. Jeweils 15 µg einer RNA-Probe wurden mit Hilfe des *Poly-A-Control Kits* und eines Oligo(dT)24-T7 Primers (Invitrogen) in cDNA umgeschrieben. Die doppelsträngige cDNA wurde mit dem *Superscript-II Double-Stranded cDNA-Synthesis-Kit* (Invitrogen) synthetisiert. Nach Aufreinigung der cDNA mit dem *GeneChip Sample Cleanup Module* (Affymetrix) erfolgte die in vitro-Transkription und Biotin-Markierung von cRNA mit dem *IVT Labeling Kit* (Affymetrix) und der T7-RNA-Polymerase. Die Biotin-markierte cRNA wurde erneut mit dem *GeneChip Sample Cleanup Module* aufgereinigt. Nach Fragmentierung wurde die Konzentration der cRNA mittels Bioanalyser 2100 (Agilent) bestimmt. 15 µg der Biotin-markierten fragmentierten cRNA wurden auf Affymetrix *Microarrays* hybridisiert. Nach Hybridisierung für 16 Stunden bei 45°C erfolgte die Färbung der auf den *GeneChips*<sup>®</sup> gebundenen cRNA mit Streptavidin-Phycoerythrin (Merck). Die gefärbten *Microarrays* wurden in einer *GeneChip Fluidics Station 450* gewaschen und anschließend mit Affymetrix GCS 3000 Scanner bei 570 nm ausgelesen. Die erhaltenen Rohdaten wurden mittels der *Microarray Suite 5.0* (MAS 5.0, Affymetrix) quantifiziert und unter Verwendung von *Global Normalization* normalisiert. Für die weitere Auswertung wurden nur Gene analysiert, die in allen untersuchten Proben als „*Present*“ eingestuft wurden. Dabei wurden die Datensätze der mutanten Probe mit denen aller anderen WT-Proben abgeglichen. Das Gesamtprotokoll eines *GeneChip*<sup>®</sup>-Experimentes ist in Abb. 4.3 schematisch dargestellt.

### Eukaryotic Target Labeling GeneChip® Probe Arrays

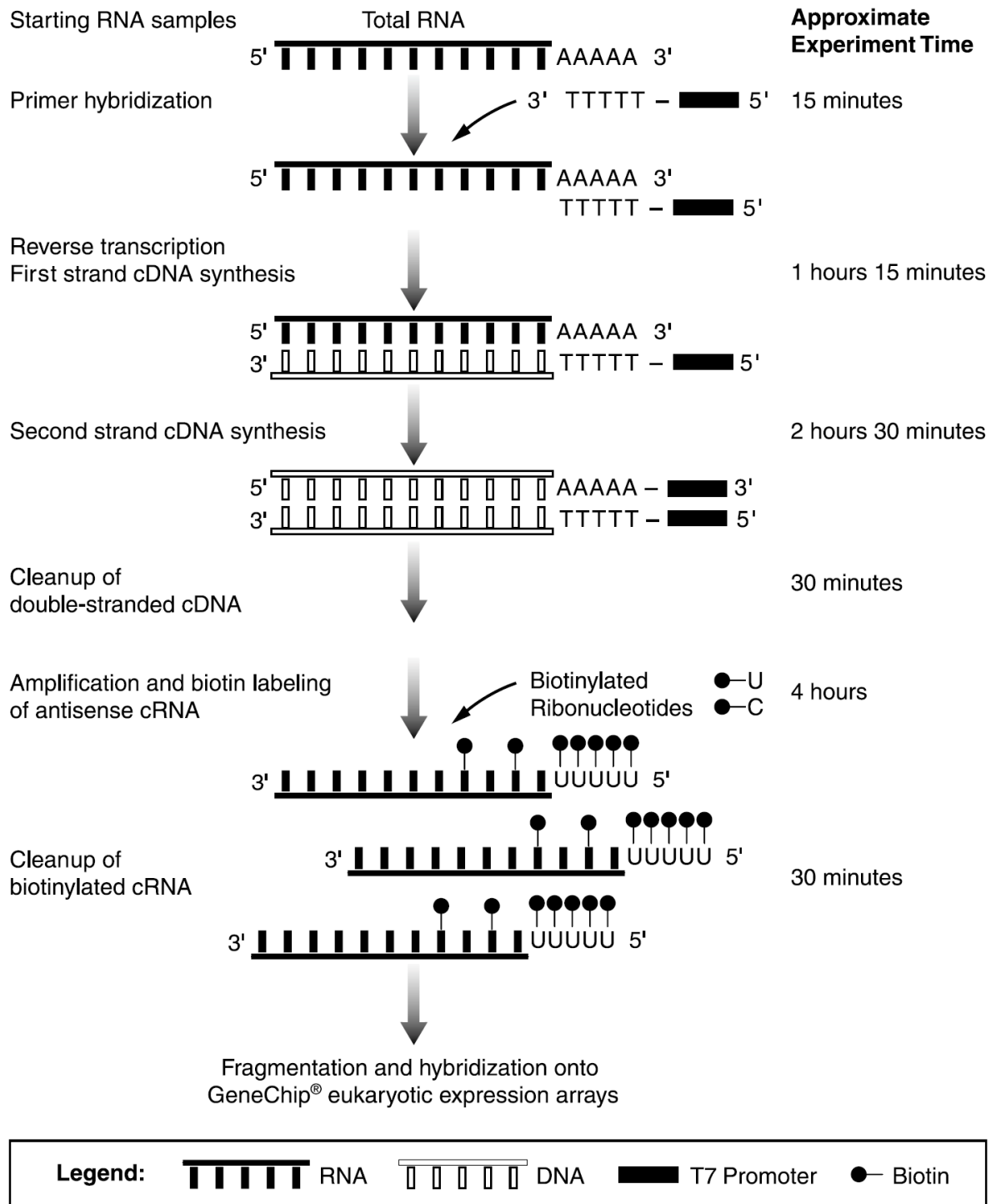


Abb. 4.3 Standard Protokoll der Affymetrix-GeneChip Analyse (www.affymetrix.com).

### 4.2 *C. elegans* Methoden

#### 4.2.1 Kultivierung von Bakterien

##### 4.2.1.1 Kultivierung von *E. coli*-Stämmen für *C. elegans*

Zwei Bakterienstämme, HB101 und NA22, wurden als Nahrung für *C. elegans* verwendet. Die Bakterien wurden in 15%-igem Glycerin bei  $-70^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt. Nach Auftauen wurden HB101- und NA22-Bakterien in 400 ml jeweils in ENB-Medium und 2x YT-Medium bei  $37^{\circ}\text{C}$  und 212 UpM über Nacht schüttelnd inkubiert. Danach konnten die Bakterien bei  $4^{\circ}\text{C}$  für einen Monat gelagert werden.

##### 4.2.1.2 Kultivierung von transformierten Bakterien

Von der tiefgefrorenen HT-115(DE3)-Stamm-Kultur (mit oder ohne Vektor) wurde mit einem sterilen Zahnstocher etwas Material abgekratzt und in 4 ml LB-Medium mit  $50\ \mu\text{g/ml}$  Ampicillin überführt. Die Bakterien wurden bei  $37^{\circ}\text{C}$  für sechs Stunden über Nacht bei  $37^{\circ}\text{C}$  und 212 UpM vor ihrer Verwendung frisch inkubiert. Nach der Inkubation wurden  $200\ \mu\text{l}$  der Bakterienkultur auf RNAi-Agar-Platten gut verteilt und bei Raumtemperatur über Nacht trocknen gelassen. Solche RNAi-Bakterien-Platten sind bei  $4^{\circ}\text{C}$  bis zu drei Tage verwendbar.

#### 4.2.2 Vorbereitung der Wurmplatten

NGM-Agar wurde bei  $55^{\circ}\text{C}$  in der Sterilbank (Heraeus) in Wurmschalen gegossen. Die Platten wurden bei Raumtemperatur über Nacht getrocknet und bei  $4^{\circ}\text{C}$  für einen Monat aufbewahrt. Nach Beimpfung mit  $15\ \mu\text{l}$  flüssiger Bakterienkultur wurden die Platten über Nacht bei  $37^{\circ}\text{C}$  im Brutschrank inkubiert. Dann wurden die *C. elegans*-Individuen mit Hilfe eines Wurmhakens bei  $20^{\circ}\text{C}$  auf die Platten umgesetzt und gehalten.

#### 4.2.3 Stammkonserven und Wiederauftauen von *C. elegans*

*C. elegans* kann in Stammkonserven bei  $-80^{\circ}\text{C}$  bis zu zehn Jahren eingefroren und bei  $-196^{\circ}\text{C}$  in Flüssigstickstoff zeitlich unbegrenzt gelagert werden (Brenner, 1974). Dazu wurden die verhungerten L1- und L2-Larven mit S-Basal-Puffer von den Platten heruntergespült, in ein

1,5 ml Eppendorf-Tube überführt und dreimal bei Raumtemperatur mit M9-Medium gewaschen. Nach der Zugabe von 1 ml S-Basal auf Eis wurden die pelletierten Würmer mit 1 ml Einfriermedium in einer Kryobox im  $-70^{\circ}\text{C}$ -Tiefkühlschrank aliquotiert eingefroren und für eine sichere Lagerung gleichzeitig in Flüssigstickstoff aufbewahrt. Zur Kontrolle wurde nach zwei Tagen ein Aliquot aufgetaut und auf eine NGM-Platte gegeben. Viele überlebende Würmer bedeuteten ein erfolgreiches Einfrieren.

### 4.2.4 Generierung von *C. elegans*-Männchen

*C. elegans* Männchen wurden für Verpaarungen vorbereitet. Zur Generierung der Männchen wurden zwei L4-Würmer auf beimpfte NGM-Platten gepickt. Nach sechs Stunden „Hitzeschock“-Inkubation bei  $30^{\circ}\text{C}$  in einem Wärmeschrank wurden die Würmer wieder bei  $20^{\circ}\text{C}$  gehalten. Nach 3 - 4 Tagen wurden die unter Stressbedingungen gebildeten Männchen in F1 mit L4-Würmern oder jungen adulten Hermaphroditen verpaart. Es wurden mehrere Männchen in F2 generiert, die für die Verpaarungen eingesetzt wurden.

### 4.2.5 Verpaarung von *C. elegans*

Für eine Kreuzung wurden jeweils vier junge Männchen und ein Hermaphrodit (L4-Stadium) auf eine Wurmplatte transferiert. Die Nachkommengenerationen wurden meist mithilfe von PCR genotypisch überprüft. Für die Verpaarung mit Männchen vom Stamm EG3008 wurden die gekreuzten Würmer, die GFP-Marker trugen, fluoreszenzmikroskopisch bestimmt. Alle TVP-mutierten Allele wurden im N2-WT-Stamm zwölfmal zurückgekreuzt. Die neu generierten TVP-Einzelmutanten BJ14 *sng-1(ok234)*, BJ15 *scm-1(hd30)*, BJ16 *sph-1(ox278)*; TVP-Doppelmutanten BJ18 *sph-1(ox278); sng-1(ok234)*, BJ19 *sng-1(ok234); scm-1(hd30)*, BJ30 *sph-1(ox278); scm-1(hd30)*, TVP-Dreifachmutanten BJ21 *sng-1(ok234); scm-1(hd30); sph-1(ox278)* und der durch Verpaarung resultierende WT-Stamm BJ20 wurden für die weiteren Experimente verwendet.

### 4.2.6 Synchronisierung der Wurmpopulationen

Für die Transkriptom-Untersuchungen wurden synchronisierte junge adulte *C. elegans* verwendet. Um Wurmpopulationen im gleichen Wachstumsstadium zu erhalten, wurden die Eier von *C. elegans* zuerst präpariert. Nach Kultivierung auf mit NA22-Bakterien beschichteten *High-Peptone*-Kulturschalen (10 cm) wurden die adulten Würmer dreimal mit 8 ml Milli-Q-Wasser von den Platten gespült und in ein 50 ml Falcon-Gefäß überführt. Die Wurm-Lösung wurde abzentrifugiert, damit ein lockeres Wurm-Pellet gebildet werden konnte. Das Pellet wurde in ein unbenutztes 15 ml-Falcon-Gefäß transferiert, 5 min mit 5 ml Synchronisations-Lyse-Puffer gevortext und aufgelöst. Anschließend wurde die Wurmlösung mit einem Eierpuffer bis zu 10 ml aufgefüllt und dreimal bei Raumtemperatur 2 min bei 3000 g gewaschen. Der Überstand wurde vorsichtig mit einer sterilen Plastikpipette verworfen. Nach Zugabe von 5 ml sterilem Wasser wurden die pelletierten Eier in 30%-iger Saccharose-Lösung resuspendiert. Die Eierlösung wurde 6 min bei 3000 g abzentrifugiert, die jetzt von der Saccharose-Lösung abgetrennten Eier schwebten dadurch an der Oberfläche. Die schwimmenden Eier wurden sorgfältig mit einer sterilen 2 ml-Plastikpipette in einem sauberen Reaktionsgefäß gesammelt und mit sterilem Wasser aufgefüllt. Anschließend wurden einige Tropfen der Eierlösung auf eine mit NA22-Bakterien beschichtete *High-Peptone*-Kulturschale (10 cm) pipettiert und für ca. 64 h bei 20°C bis zum jungen adulten Stadium kultiviert. Da die NA22-Bakterien dicht auf dem *High-Peptone*-Agar (dicke Rasen) wuchsen, waren die Würmer innerhalb von 72 h noch nicht verhungert.

### 4.2.7 RNA-Interferenz (RNAi) durch Fütterungsexperimente

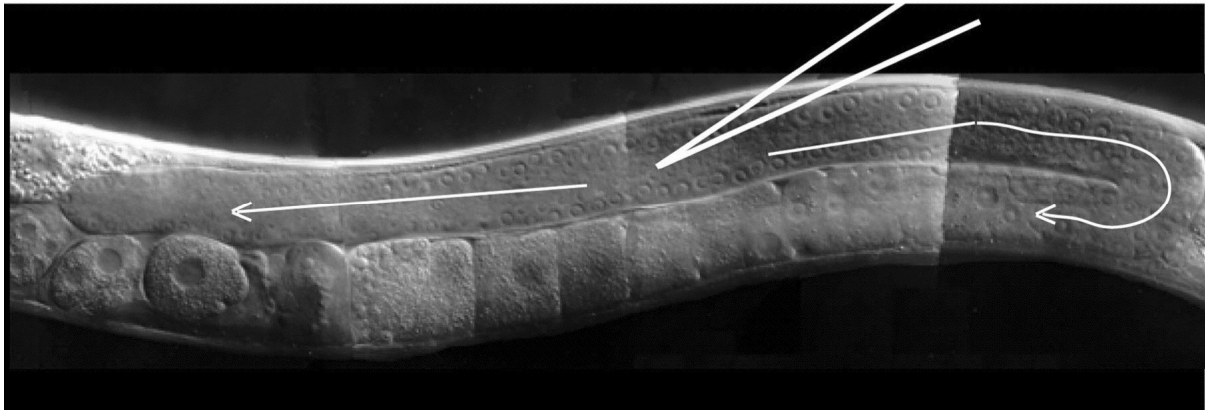
Für die RNAi-Fütterungsexperimente wurden RNAi-Bakterien auf RNAi-NGM-Agar-Platten (3,5 cm) mit 25 µg/ml Tetracyclin und 1 mM IPTG ausgestrichen. Nach Inkubation über Nacht bei Raumtemperatur waren diese Platten direkt für RNAi-Untersuchungen verwendbar oder bei 4°C für einen Monat lagerbar. Jeweils zwei L4-Würmer der untersuchten Stämme wurden auf RNAi-Platten bei 20°C kultiviert. Die Weiterentwicklung der gefütterten Würmer und der F1-Nachkommen wurde beobachtet und dokumentiert.

### 4.2.8 Mikroinjektion von *C. elegans* zur Herstellung transgener Tiere

Um transgene *C. elegans*-Stämme zu generieren, wird die Ziel-DNA in die Gonade von Hermaphroditen mikroinjiziert (Fire, 1986). Die in den Wurm eingebrachte fremde DNA

## 4. Methoden

bildet mosaikartig extrachromosomale Arrays, die an die Nachkommen vererbbar sind. In dieser Arbeit wurden zwei verschiedene Methoden für transgene Stämme verwendet. Zum einen wurden die CFP/YFP-markierten Transkriptions- und Translationskonstrukte mit der Träger-DNA *Bluescript KS* mikroinjiziert (siehe Tab. 5.9 und 5.10), zum anderen wurde das Transkriptionskonstrukt *Pifb-2:yfp* als Koinjektionsmarker für transgene Würmer eingesetzt (Tab. 5.11).



**Abb. 4.4 Die optimale Position der Injektionsnadel in den distalen Arm der synzytischen Gonade.** Die Injektionslösung sollte in beiden Richtungen (Pfeile) über den distalen und den proximalen Arm laufen (Evan, 2006).

Die Mikroinjektionsnadeln wurden mit Hilfe des *Micropipette Puller* (P-87, Sutter) aus Elektrodenglas (GB 100F-10, Science Products) hergestellt und direkt für die Mikroinjektion verwendet. Um das Verstopfen der Injektionsnadel zu vermeiden, wurde die Mikroinjektionsmix-Lösung (siehe Tab. 4.9 und 4.10) bei Raumtemperatur für 5 min bei 13.000 g abzentrifugiert. Nach Beladen der DNA-Lösung wurde die Injektionsnadel in den Transjektor (Eppendorf) eingeschraubt. Für das Einbetten der Würmer wurden 2%-ige Agarosepads auf Deckgläsern angefertigt, diese wurden bei Raumtemperatur über Nacht getrocknet. Ein Tröpfchen Halocarbonöl 700 wurde auf den Agarosepad pipettiert. Mit einem Wurmhaken wurde jeweils ein L4-Wurm oder ein junger adulter Hermaphrodit auf den Agarosepad gelegt und am Boden fixiert. Mittels des Mikroskops DM TRB (Leica) und des Mikromanipulators (Eppendorf) wurde die Mikroinjektionsnadel in die Gonade des Wurms eingestochen und die Mikroinjektionsmix-Lösung eingepumpt (Abb. 4.4). Sie wurde in eine oder beide Gonaden injiziert. Anschließend wurde das Tier mit einem Tropfen M9-Medium rehydriert und mit dem Wurmhaken auf eine frische NGM-Platte (mit HB101 angeimpft)

überführt. Die injizierten Würmer wurden bei 20°C gezüchtet. Erfolgreiche transgene Stämme wurden mikroskopisch oder neurobiologisch analysiert.

**Tab. 4.9 Standard-Mikroinjektionsmix (ohne Koinjektionsmarker).**

Plasmid-DNA	40 ng/μl
Bluescript KS Plasmid-DNA in EB-Puffer	160 ng/μl

**Tab. 4.10 Standard-Mikroinjektionsmix (mit Koinjektionsmarker).**

Plasmid-DNA	30 ng/μl
Plasmid-DNA Pifb-2:yfp in EB-Puffer	70 ng/μl

### 4.2.9 Mikroskopie

Das Umsetzen und die normale Analyse von *C. elegans* erfolgten mit dem Durchlichtmikroskop SMZ 645 (Nikon). Die Selektion fluoreszierender Würmer und lichtmikroskopische Aufnahmen wurden mit einem MZ16FA-Mikroskop (Leica) und einem SMZ 1500-Mikroskop (Nikon) durchgeführt. Für die Mikroinjektion in *C. elegans* wurde ein DM IRB-Mikroskop (Leica) verwendet. Alle Aufnahmen der fluoreszenzmarkierten Würmer wurden mit Hilfe des konfokalen Laser-Scanning Mikroskops TCS SP5 (Leica) gemacht und durch das Programm LAS-AF analysiert.

### 4.2.10 Toxikologische und neurobiologische Untersuchungen in *C. elegans*

Um die Ergebnisse der *Microarray*-Analysen weiter zu verfolgen, und um die Funktionen der TVPs in *C. elegans* besser verstehen zu können, wurden in dieser Arbeit drei chemische Substanzen (Cadmium, Aldicarb und Pentylentetrazol [PTZ]), die unterschiedliche toxikologische oder neurobiologische Wirkungen haben, in den TVP-mutanten *C. elegans* getestet.

### 4.2.10.1 Cadmium-Test

Das giftige Schwermetall Cadmium und seine Verbindungen werden als teratogen, erbgutschädigend und krebserregend eingestuft (Waisberg et al., 2003). Die toxischen Wirkungen einer Cadmium-Exposition umfassen Nierenschädigungen, Krankheiten des Atemtrakts, neurologische Störungen und verschiedene Tumore (Hayes, 1997). Um die Effekte des Cadmiums auf TVP-Mutanten zu überprüfen, wurden Cadmium-Tests durchgeführt. Zwei adulte Hermaphroditen jedes Stammes wurden auf eine beimpfte Wurmplatte (3,5 cm) mit 125 µM CdCl<sub>2</sub> transferiert. Nach 24 h wurden die Hermaphroditen entfernt und die abgelegten Eier weiter kultiviert. Aufgrund der hohen Konzentration des Cadmiums haben sich die Tiere nicht entwickelt und verbleiben im ersten Larvalstadium. In den nächsten sechs Tagen wurden täglich 20 L1-Individuen auf eine Standard-NGM-Platte umgesetzt. Die L1-Würmer, die sich auf der NGM-Platte zu Adulttieren entwickelten, wurden ausgezählt.

### 4.2.10.2 Aldicarb-Test

Das Carbamat Aldicarb ist ein Acetylcholinesterase-Inhibitor. Eine Aldicarb-Behandlung verursacht eine Ansammlung von Acetylcholin an den neuromuskulären Synapsen und führt zu akuter Paralyse und dem Tod von *C. elegans* (Rand & Russel, 1985). Um die Defekte der Neurosekretion zu ermitteln, wurden zwei verschiedene Arten des Aldicarb-Tests auf NGM-Platten durchgeführt. Drei unterschiedliche Aldicarb-Konzentrationen (0,2, 0,5 und 1,0 mM in S-Basal) wurden nach folgender Formel verwendet:

$$\text{Aldicarb [ml]/Platte} = \frac{0,4 \text{ ml Aldicarblösung} \times \text{Agargewicht [g]}}{10\text{g}}$$

#### 4.2.10.2.1 Radialer Aldicarb-Test

Eine bestimmte Menge an Aldicarblösung wurde auf Platten (10 cm), deren Rand einen dünnen Bakterienrasen enthielt, pipettiert und gut verteilt. Danach wurden die Platten für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. 25 junge adulte Tiere jedes Stammes wurden in die

Plattenmitte gelegt. Nach vier Stunden Inkubation bei 20°C wurden die Würmer, die die Bakterien erreichten, ausgezählt.

### **4.2.10.2 Berühungs-Aldicarb-Test**

Für den Berühungs-Aldicarb-Test wurden jeweils 25 junge adulte Würmer auf die Aldicarb-NGM-Platten (3,5 cm) gepickt. Die Individuen wurden zu verschiedenen Zeitpunkten nach dem Start der Aldicarb-Inkubation mittels eines Wimpernhaars an den anterioren und posterioren Seiten berührt. Eine Paralyse wurde als Fehlsteuerung der typischen Körperbewegung definiert.

### **4.2.10.3 Pentylentetrazol (PTZ)-Test**

Pentylentetrazol blockiert die GABA-Bindungsstelle des GABA-Rezeptors und wirkt daher als GABA-Rezeptor-Antagonist (Rocha et al., 1996). Um die Sensitivität der Synaptogyrin-1-Mutanten (BJ120, BJ14) gegen PTZ zu studieren, wurde ein PTZ-Test in zwei unterschiedlichen Konzentrationen (4 und 8 mg/ml) durchgeführt. 200 µl PTZ-Lösung wurde auf die für zwei Stunden unter einer Sterilbank (Heraeus) getrockneten NGM-Platten aufgetragen und eine Stunde bei 20°C langsam schüttelnd inkubiert. Vor dem Transferieren auf die vorbereiteten PTZ-Platten wurden die Würmer einmal mit M9-Medium gespült. Nach 30 min Inkubation bei 20°C wurden die verkrampften Würmer ausgezählt und dokumentiert.

## 5. Ergebnisse

### 5.1 Komparative Transkriptomanalysen

Die Affymetrix-*GeneChip*<sup>®</sup>-Technologie ist ein sehr sensitives Verfahren, um das Expressionsniveau der RNA von gesamten Genomen in unterschiedlichen Organismen, Geweben und Zellen zu untersuchen. Mit Hilfe der simultanen Messung ist es möglich, die Unterschiede der Gen-abhängigen RNA-Synthese in verschiedenen physiologischen Zuständen qualitativ und quantitativ zu bestimmen. Dieses Verfahren wurde in dieser Arbeit für die Analyse der differentiellen Genexpression von TVP-Mutanten in Maus und *C. elegans* eingesetzt. Die Herstellung und Hybridisierung der cRNAs sowie die grobe Analyse der Hybridisierungsergebnisse wurden als Dienstleistung von der HDMA *Core Facility* der Universität Mainz und dem Zentrum für Medizinische Forschung (ZMF) der Universität Mannheim durchgeführt. Die globalen, normalisierten Expressionsrohdaten wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit weiter bearbeitet und analysiert.

#### 5.1.1 Microarray-Expressionsanalysen der Synaptophysin-1-*Knockout*-Mäuse

##### 5.1.1.1 Ergebnisse der Maus-Chip-Analysen

Um Veränderungen der Genexpression in Sph-1-*Knockout*-Mäusen (Sph-1<sup>-/-</sup>-Mäusen) zu identifizieren, wurden vergleichende *GeneChip*<sup>®</sup>-Analysen von *Knockout*- und Wildtyp-Mäusen durchgeführt. Um einen möglichst einheitlichen genetischen Hintergrund zu erhalten, wurden die Sph-1<sup>-/-</sup>-Mäuse vor der Transkriptomanalyse fünfmal mit C57BL/6-Mäusen verpaart. Die Analysen sollten an Netzhäuten gemacht werden, da hier die deutlichsten morphologischen Veränderungen beschrieben wurden (Spiwoks-Becker et al., 2001). Gesamt-RNA wurden aus Retinae von 6 Wochen alten Geschwister-Paaren gewonnen (OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> zwischen 1,64 und 2,08 siehe Tab. 9.10 im Anhang) und gepoolt (Tab. 5.1). Drei Sph-1-*Knockout*-RNA-Proben (12, 14, 19) und drei WT-RNA-Proben (13, 15, 20) wurden mit Affymetrix-*Mouse-Genome-430-2.0-Arrays* hybridisiert, pro Probe ein Chip.

## 5. Ergebnisse

**Tab. 5.1 RNA-Isolierung für die Maus-Chip-Analyse (W = Woche, T = Tag).**

Genotyp	Probennummer	Anzahl der Netzhäute	Alter
Sph-1	12	6	6W
Sph-1	14	4	6W+1T
Sph-1	19	4	6W+2T
WT	13	8	6W
WT	15	6	6W+1T
WT	20	6	6W+2T

Mit den insgesamt 45101 Probensonden, die auf dem Affymetrix-*Mouse-Genome-430-2.0-Array* enthalten sind, konnten mit diesem experimentellen Ansatz die RNA-Expression von 26961 Genen (59,8%) in den Sph-1<sup>-/-</sup>-Netzhäuten und von 26897 Genen (59,7%) in C57BL/6J-Netzhäuten als P (*Present*) nachgewiesen werden. Die restlichen Gene zeigten entweder A (*Absent*) oder M (*Marginal*) und werden vermutlich in der Mausretina nicht oder in nur sehr schwachem Ausmaß exprimiert. Die Veränderungswerte (*Fold Change*) nehmen für Gene, die in der mutanten Retina hochreguliert sind, einen positiven Wert an und einen negativen Wert für Gene, die herunterreguliert werden. Die Ergebnisse wurden bei P-Werten < 0,05 als statistisch signifikant bewertet. Beim Vergleich der Expressionsprofile von Sph-1<sup>-/-</sup> und Wildtyp konnten außer dem *Knockout*-Gen Sph-1 als interner Kontrolle nur zwei differenziell exprimierte Gene (blau: Herunterregulation) aus insgesamt mehr als 36.000 Transkripten identifiziert werden (Tab. 5.2).

**Tab. 5.2 Gene mit veränderter RNA-Expression in der Retina von Sph-1<sup>-/-</sup>-Mäusen.**

Gen	x-fache Erhöhung/Erniedrigung			Mittelwert der x-fachen Erhöhung/Erniedrigung	P-Wert
	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3		
Sph-1	-17,27	-11,63	-10,34	-12,74	0,021
BG067686	-2,99	-2,46	-1,97	-2,44	0,003
BG230349	-1,72	-2,19	-2,36	-2,07	0,015

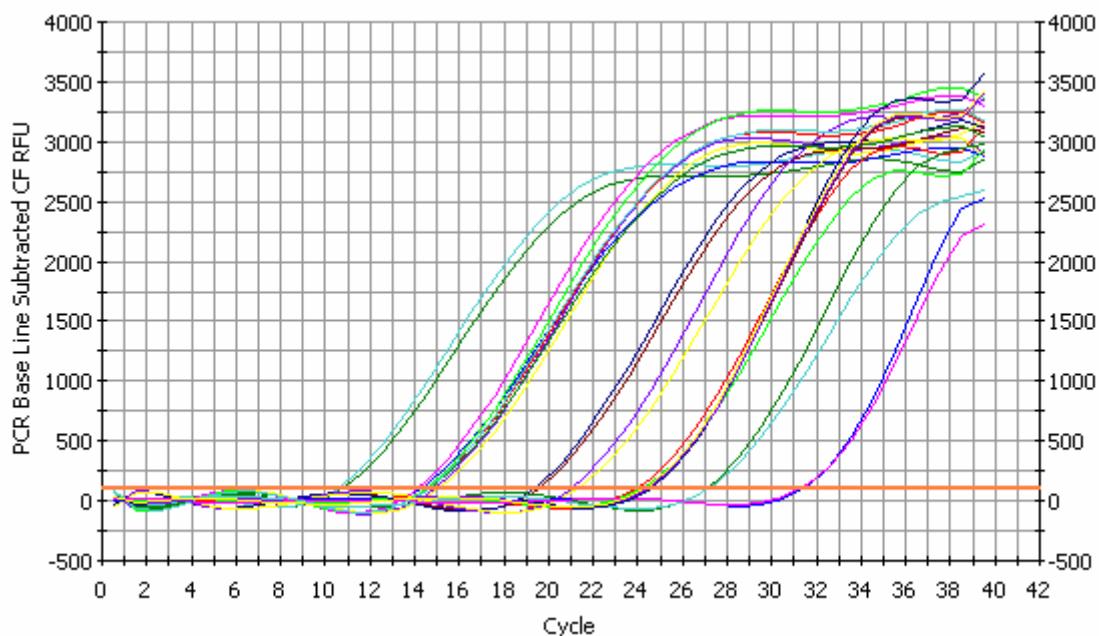
Drei Gesamt-RNA-Pools wurden jeweils aus Netzhäuten von Wildtyp- und Sph-1<sup>-/-</sup>-Mäusen isoliert. Durch Kreuzvergleich der Expressionsprofile der drei unabhängigen Microarray-Experimente wurden drei differenziell exprimierte Gene identifiziert: eines war erwartungsgemäß Sph-1, die anderen beiden BG067686 und BG230349, ESTs mit unbekannter Funktion.

Als signifikant verändert gilt die Expression eines Gens, wenn eine Erhöhung/Erniedrigung von über 2 vorliegt. Die Signale der zwei herunterregulierten Transkripte in der mutanten Mausretina waren sehr schwach und ihre Erniedrigungswerte überschritten nur gering den Schwellenwert -2. Außerdem enthalten die beiden Genfragmente BG067686 und BG230349

kein langes offenes Leseraster und können nicht kompletten Genen trotz ihrer Anwesenheit in den EST (*Expressed Sequence Tag*) Datenbanken zugewiesen werden (Ergebnis aus BLAST-Suche)

### 5.1.1.2 Validierung der Maus-Chip-Analysen

Um die Daten aus den *GeneChip*-Experimenten zu überprüfen, wurde die Synthese der drei differenziell exprimierten Gene mittels quantitativer *Real-Time* RT-PCR bestimmt. Die Expression der zu validierenden Kandidatengene wurde mit der des ubiquitär exprimierten *Housekeeping*-Gens GAPDH (Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase) normalisiert. Als Ausgangsmaterial für die quantitative *Real-Time* RT-PCR wurde zum einen eines der Probenpaare, die auch für Microarray-Analyse eingesetzt wurden, verwendet (Exp. 3), zum anderen wurde ein weiteres unabhängiges Probenpaar untersucht (Exp. 4). Für alle Analysen wurden Doppelbestimmungen erstellt, d.h. für jedes Kandidatengene wurden jeweils zwei quantitative *Real-Time* RT-PCRs durchgeführt. Der Mittelwert von beiden wurde dann für die Auswertungen verwendet (Tab. 5.3). Die Abb. 5.1 zeigt exemplarisch die Amplifikationsprofile zweier Proben (BG230349 und GAPDH).



**Abb. 5.1 Amplifikationsprofile zweier Proben.**

Beispielhafte Darstellung eines *i-Cycler-Real-Time*-PCR-Laufs der BG230349 Genprodukte (rechte Kurven) und der der GAPDH (linke Kurven). Auf der x-Achse ist die Zahl der Zyklen, auf der y-Achse ist die relative Fluoreszenzintensität eingetragen.

## 5. Ergebnisse

Die Tab. 5.3 zeigt, dass das *Knockout*-Gen Sph-1 nicht nur in Wildtieren, sondern auch in Mutanten transkribiert wird, wobei das Signal in den Mutanten signifikant schwächer ist. Diese Beobachtung stimmt mit den Ergebnissen der Chip-Analyse überein, mit der in den mutanten Tiere immer noch ein signifikantes Signal für Synaptophysin nachweisbar war. Dagegen konnte die Ergebnisse für BG067686 und BG230349, die in den *MicroChip*-Analysen in Sph-1<sup>-/-</sup>-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp herunterreguliert waren, in den quantitativen *Real-Time* RT-PCR-Experimenten nicht bestätigt werden (Tab. 5.3). So ist z.B. der Unterschied des Gens BG067686, das laut *GeneChip*<sup>®</sup>-Analyse 2,44-fach herunterreguliert ist, in der quantitativen *Real-Time* RT-PCR sogar 1,61-fach (Exp. 3) bzw. 2,05-fach (Exp. 4) erhöht. Zusammenfassend kann daher festgestellt werden, dass außer dem Sph-1-Gen kein weiteres Gen reproduzierbare Transkriptionsänderungen in den Sph-1<sup>-/-</sup>-Retinae aufweist.

**Tab. 5.3 Validierung der Maus-Chip-Ergebnisse durch quantitative *Real-Time* RT-PCR.**

Gen	x-fache Erhöhung/Erniedrigung (GeneChip)			Mittelwert der x-fachen Erhöhung/Erniedrigung (GeneChip)	x-fache Erhöhung/Erniedrigung (RT-PCR)	
	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3		Exp. 3	Exp.4
Sph-1	-17,27	-11,63	-10,34	-12,74	-11,07	-8,14
BG067686	-2,99	-2,46	-1,97	-2,44	1,61	2,05
BG230349	-1,72	-2,19	-2,36	-2,07	-1,13	1,42

Zusammenfassung der Ergebnisse der vergleichenden Transkriptionsanalysen des Sph-1-Gens und zwei anderer Gene in Retinae von Sph-1<sup>-/-</sup>-*Knockout*- und WT-Mäusen. Es wurden drei unabhängige Microarray-Experimente (Exp. 1-3) und zwei quantitative *Real-Time* RT-PCR-Experimente (Exp. 3, 4) durchgeführt. Farbcode: gelb = hochreguliert (> 2), blau = herunterreguliert (< -2). Die Tabelle zeigt, dass nur die Transkriptionsänderung des Sph-1-Gens mit beiden Methoden reproduzierbar ist. Die in der Microarray-Analyse beobachteten Expressionsänderungen für BG067686 und BG 230349 konnten mit der quantitativen *Real-Time* RT-PCR nicht verifiziert werden.

### 5.1.1.3 Detektion von Teiltranskripten des Synaptophysin-1-Gens in Mausmutanten

In den Sph-1<sup>-/-</sup>-*Knockout*-Mäusen wurde das Sph-1-Gen durch Insertion einer *neo*-Kassette im zweiten Exon ausgeschaltet, so dass kein intaktes Synaptophysin-1-Protein mehr gebildet wird, was durch *Western-Blot*-Analysen gezeigt werden konnte (Eshkind & Leube, 1995). Mit Hilfe der *GeneChip*<sup>®</sup>-Analyse wurden dennoch deutliche (*Present*), wenn auch stark reduzierte Sph-1-Transkripte in *Knockout*-Tieren detektiert (Tab. 5.2 und 5.4). Um diese Transkripte weiter zu charakterisieren und um auszuschließen, dass es sich nicht um DNA-Kontamination handelt, wurden RT-PCRs mit exonspezifischen Primerpaaren, die entweder

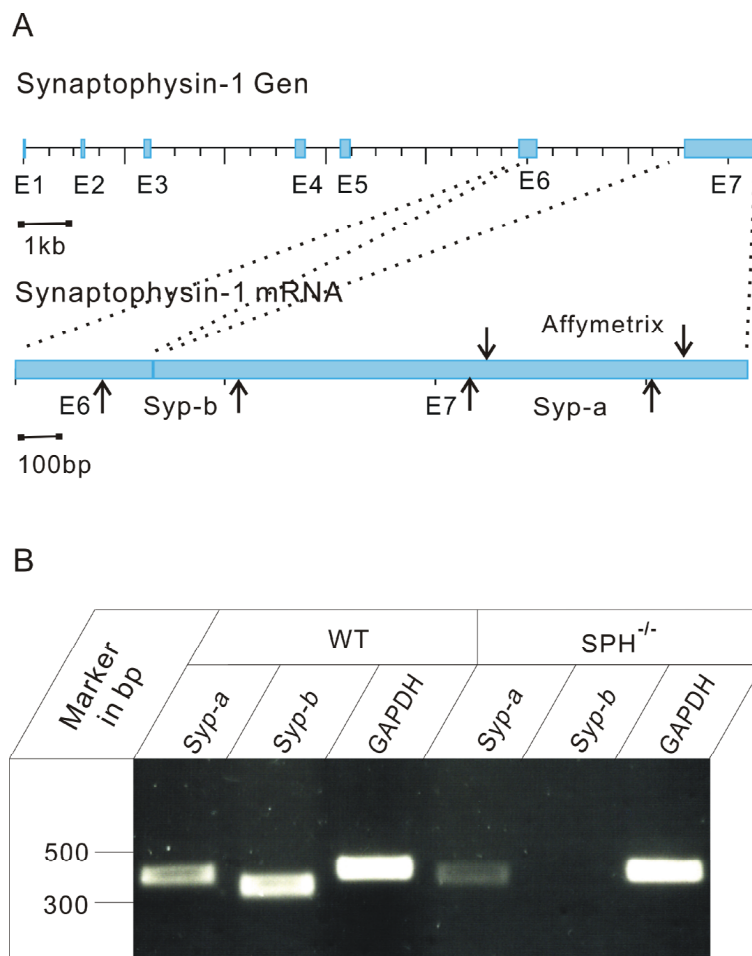
## 5. Ergebnisse

die Exone 6 und 7 überbrücken oder nur an das Exon 7 binden, durchgeführt. Abb. 5.2 zeigt, dass in den mutierten Mäusen im Vergleich zu den WT-Mäusen ein signifikant erniedrigter Sph-1-Transkriptgehalt (*syp-a*: 359 bp; Exon 7) festgestellt wurde. Dieser Expressionsabfall entspricht den Microarray-Analysen, da die auf dem *GeneChip*<sup>®</sup> immobilisierten Oligonukleotide in Exon 7 lokalisiert sind. Die Primer, die im Bereich der Exone 6 und 7 binden, erlauben den Nachweis eines 326 bp-Fragments (*Syp-b*) in WT-Mäusen, das bei den Mutanten jedoch fehlt. Demnach umfasst das „unerwartete“ Transkript, das zum positiven Nachweis der Transkriptionsanalysen geführt hat, nur Exon 7 und vermutlich keine weiteren Sph-1-Exone.

**Tab. 5.4 Vergleich der Transkriptniveaus des Sph-1-Gens in Microarrays von Sph-1<sup>-/-</sup>- und WT-Mäusen.**

Genname	12 (KO1)	14 (KO2)	19 (KO3)	13 (WT1)	15 (WT2)	20 (WT3)
<b>Sph-1</b>	478,1 (P)	570 (P)	723,1 (P)	4916,3 (P)	5063,3 (P)	5369,1 (P)

Die angegebenen Werte beziehen sich auf die Hybridisierungsintensität in *GeneChip*<sup>®</sup> Analysen von cDNAs aus Netzhäuten von Sph-1<sup>-/-</sup>- und WT-Mäusen (WT1 - WT3). Die Signalintensität in den Sph-1<sup>-/-</sup>-Retinae (KO1 - KO3) ist im Vergleich zu WT-Retinae deutlich vermindert, wurde aber in allen Mutanten-RNAs als P (*Present*) nachgewiesen.



### **Abb. 5.2 Analyse der Transkription des Sph-1-Gens in WT- und Sph-1<sup>-/-</sup>-Mäusen mittels RT-PCR.**

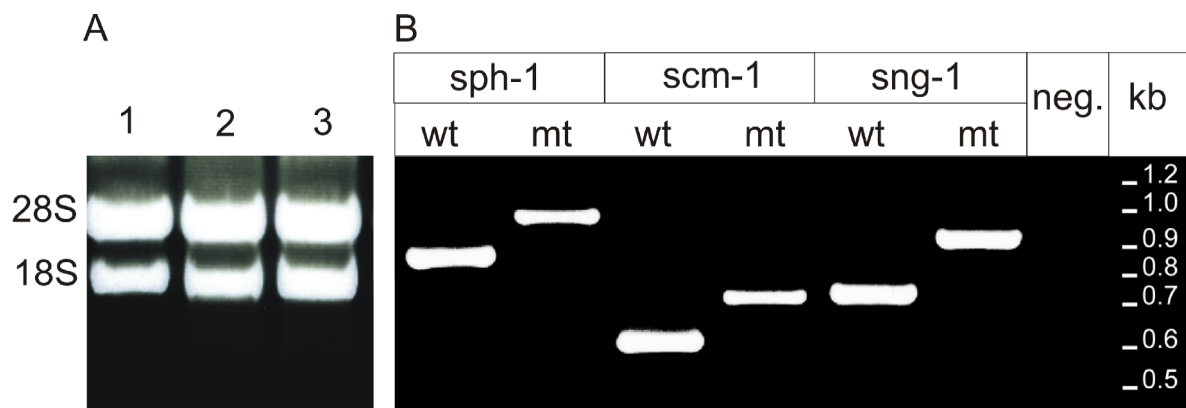
(A) Für die Amplifikation von einem Teil der Exone 6 und 7 wurde das Primerpaar Syp-b, für die des Exons 7 das Primerpaar Syp-a eingesetzt. Die für die Microarray-Analysen verwendeten Oligonukleotid-Paare sind innerhalb des Exons 7 lokalisiert (Affymetrix). (B) Gelelektrophoretischer Nachweis der RT-PCR-Produkte: Zu Bestimmung der PCR-Endproduktmenge wurde als Kontrolle ein 374 bp-Fragment des GAPDH-Gens amplifiziert. Die Zahlen (300 und 500) links geben die Größe der „Marker“-Fragmente in Nukleotiden an. Beachtenswert sind die reduzierte Expression von Syp-a und die komplette Abwesenheit von Syp-b in *Knockout*-Proben.

### **5.1.2 Komparative Transkriptomanalyse der *C. elegans* TVP-Mutante**

#### **5.1.2.1 Identifizierung differenziell exprimierter Gene in der *C. elegans* TVP-**

##### **Dreifachmutante**

Die Affymetrix-*GeneChip*<sup>®</sup>-Technologie wurde ebenfalls für die Analyse der differenziellen Genexpression der TVP-Dreifachmutante BJ21 im Vergleich zum WT-Tier BJ20 eingesetzt. Um einen möglichst einheitlichen genetischen Hintergrund zu erhalten, wurden alle drei TVP-Allele zwölfmal in den WT-Hintergrund eingekreuzt. Die drei TVP-Allele *sph-1(ox278)*, *sng-1(ox234)* und *scm-1(hd30)* sind in Abraham et al. (2006) ausführlich beschrieben und charakterisiert. Die Exone, die für die essentiellen Transmembrandomänen kodieren, wurden entweder komplett *sng-1(ok234)* oder zumindest zum größten Teil *sph-1(ox278)* und *scm-1(hd30)* deletiert. Die *C. elegans GeneChip*<sup>®</sup>s wurden mit cDNAs hybridisiert, die aus RNA von synchronisierten adulten TVP-Dreifachmutanten und WT-Tieren hergestellt wurden (Genotypisierung: siehe Abb. 5.3 B). Insgesamt wurden fünf Chips für die Genexpressionsstudie eingesetzt. Diese wurden mit RNA aus drei Mutanten (52, 55 und 60) und zwei WT-Tieren (54 und 62) hybridisiert. Die Qualität der RNA wurde photometrisch (OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> zwischen 1,87 und 1,97, siehe Tab. 9.11 im Anhang) bestimmt. Außerdem wurden RNA- Aliquots gelelektrophoretisch untersucht (Abb. 5.3 A).



**Abb. 5.3 Überprüfung der für die *GeneChip*<sup>®</sup>-Analysen eingesetzten *C. elegans* Gesamt-RNAs und Genotypbestimmung mittels PCR.**

(A) Auftrennung der Gesamt-RNAs in einem 1,2% Formaldehyd-Agarosegel. 1 WT (BJ20); 2, 3 TVP-Dreifachmutante (BJ21). Das Verhältnis der Banden von 28S und 18S (Verhältnis 2:1) dient als interner Marker für die Intaktheit der isolierten RNA. (B) Duplex-PCR wurde mit genomischer DNA eines WT-Tieres (BJ20) und einer TVP-Dreifachmutante (BJ21) durchgeführt. Die amplifizierten DNA-Fragmente wurden in einem 1%- Agarosegel elektrophoretisch getrennt. Mt zeigt die Reaktionsprodukte, die in den Mutanten generiert wurden (*sph-1* 1011bp; *scm-1* 709bp; *sng-1* 880 bp); wt die DNA-Fragmente, die aus WT-Würmern amplifiziert wurden (*sph-1* 860 bp; *scm-1* 619 bp; *sng-1* 708 bp). Neg. zeigt, dass keine Produkte in der Wasser-Kontrolle entstanden. Die Zahlen rechts (0,5-1,2) geben die Größe der Marker-Fragmente in Kilobasen an. (B stammt aus Abraham et al., 2006).

Die Ergebnisse der vergleichenden Expressionsanalysen zwischen TVP-Dreifachmutanten und WT sind in Tab. 5.5 dargestellt. Von den 22625 Probenansätzen, die auf den *C. elegans*-*Genome-Arrays* immobilisiert sind, konnten 12381 (53,3%) in den TVP-Dreifachmutanten und 12842 (54,6%) in den WT-Tieren detektiert werden. Die nicht nachweisbaren RNAs werden entweder nur sehr schwach oder gar nicht in adulten Würmern exprimiert, oder die Oligonukleotide reagieren nicht spezifisch mit den Zieltranskripten. Beim Vergleich der Expressionsprofile wurden aus ca. 22.500 Transkripten 22 differenziell transkribierte Gene identifiziert. 17 Gene waren in den Mutanten stärker exprimiert als im WT; fünf Gene (einschließlich der beiden TVP-Gene *sph-1* und *scm-1*) zeigten dagegen eine verringerte Signalintensität in den Mutanten. Für *sng-1* wurde kein *Present*-Signal im Microarray nachgewiesen. Die 17 hochregulierten Gene können gemäß ihrer möglichen biologischen Funktion verschiedenen Genfamilien zugeordnet werden. Das kleine GTPase-kodierende *arf-1.1* (ADP-Ribosylierungsfaktor 1.1) ist als ein Austauschfaktor für Guaninnukleotide am Vesikeltransport beteiligt (Lundquist, 2006). Die *cdr-2*, *cdr-4* und *pgp-9* Gene sind bei Cadmium (Schwermetall)-Stressantworten beteiligt (Dong et al., 2005). Die *ugt-19*- und *ugt-62*-Gene kodieren für UDP-Glucuronosyltransferasen (Green & Tephly, 1998). *T07H3.6* kodiert für ein Meprin/TRAF-ähnliches Protein der MATH-Familie, *C37H5.2* für eine

## 5. Ergebnisse

alpha/beta-Hydrolase und ZK228.4 für eine GCN5-verwandete N-Acetyltransferase. Bei den anderen acht Geneprodukten sind putative Funktion noch weitestgehend unklar.

**Tab. 5.5** Differenzielles Expressionsprofil der TVP-Dreifachmutanten und WT-*C. elegans*.

WormBase	Typ/Genname	x-fache Erhöhung/ Erniedrigung (GeneChip)	P-Wert
F45E4.1	ADP-Ribosylierungsfaktor/ <i>arf-1.1</i>	6,4	0,025
C54D10.1	Cadmium-empfindlich/ <i>cdr-2</i>	5,0	0,035
K01D12.11	Cadmium-empfindlich/ <i>cdr-4</i>	5,0	0,016
T16G1.6	unklar	4,9	0,037
B0024.4	sekretorisches oder extrazelluläres Protein	4,5	0,015
C47A10.1	P-Glykoprotein/ <i>pgp-9</i>	3,8	0,030
Y39B6A.24	Aspartatprotease	3,5	0,046
K08B4.3	UDP-Glucuronosyltransferase/ <i>ugt-19</i>	3,1	0,029
M88.1	UDP-Glucuronosyltransferase/ <i>ugt-62</i>	3,0	0,007
Y47H9C.1	unklar	2,9	0,009
C34H4.1	unklar	2,7	0,027
T07H3.6	Meprin/TRAF-ähnlich, MATH-Familie	2,6	0,029
T16G1.4	unklar	2,5	0,021
C37H5.2	alpha/beta-Hydrolase	2,3	0,033
F53A9.8	Kernprotein	2,1	0,030
F17C11.6	Endoplasmatisches Retikulum-Protein	2,1	0,029
ZK228.4	GCN5-verwandte N-Acetyltransferase	2,0	0,024
F42A9.6	unklar	-2,1	0,020
F36D3.1	zytoplasmatisches Protein	-2,2	0,016
C07A9.9	Kernprotein	-2,2	0,008
M01D7.2	Vesikelprotein/ <i>scm-1</i>	-2,4	0,002
F42G8.11	Vesikelprotein/ <i>sph-1</i>	-19,2	0,005
T08A9.3	Vesikelprotein/ <i>sng-1</i>	abwesend	

Die Genexpression der TVP-Dreifachmutante wurde mittels *Affymetrix-C. elegans-Genome-Array* detektiert und mit dem Expressionsprofil von WT-Würmern verglichen. Durch Kreuzvergleich der Expressionsprofile wurden 17 (gelb) hochregulierte und fünf (blau) herunterregulierte Gene in den TVP-Mutanten identifiziert (x-fache Expressionsänderung  $\geq 2$  und  $P < 0,05$ ). Die Expression der beiden mutierten Gene *sph-1* und *scm-1* sind in den Mutanten herunterreguliert. Im Gegensatz dazu konnte die *sng-1*-mRNA weder im WT noch in den Mutanten nachgewiesen werden.

### 5.1.2.2 Validierung der *C. elegans*-Chip-Analysen

Die Ergebnisse der *C. elegans*-Microarray-Analysen sollten mittels quantitativer *Real-Time* RT-PCR verifiziert werden. Dafür wurden lediglich die hochregulierten Gene untersucht. Als Ausgangsmaterial für die quantitative *Real-Time* RT-PCR wurde entweder eines der Probenpaare, die auch für *GeneChip*<sup>®</sup>-Analysen verwendet wurde, oder ein anderes unabhängiges Probenpaar eingesetzt (Tab. 5.6). Die Expressionsunterschiede konnten durch

die quantitative *Real-Time* RT-PCR in den meisten Fällen bestätigt werden. Insgesamt konnten in zwölf Fällen übereinstimmende Ergebnisse festgestellt werden, was einer Quote von 70,1% entspricht. Lediglich in vier Fällen konnten die *GeneChip*<sup>®</sup>-Daten nicht verifiziert werden. Außerdem konnte das Fragment von *F17C11.6*, das für ein Endoplasmatisches Retikulum-Protein kodiert, mit RT-PCR nicht amplifiziert werden und wurde daher von den weiteren Analysen ausgeschlossen. Darüber hinaus zeigte sich eine gute Korrelation der mit beiden Methoden bestimmten Expressionstärken. So waren die elf am stärksten überexprimierten Gene der Microchip-Analysen auch in der quantitativen *Real-Time* RT-PCR nachweisbar. Das in der Microarray-Untersuchung am stärksten differenziell exprimierte Gen *arf-1.1* (6,4-fach hochreguliert) zeigte in der quantitativen *Real-Time* RT-PCR eine 5,7-fach erhöhte Expression in der TVP-Mutante. Von den vier Genen, die nur eine geringe Erhöhung zwischen 2,0 und 2,6 in der Mikrochip-Analyse aufwiesen, ließ sich nur in einem Fall die Genexpressionsänderungen mit Hilfe der RT-PCR verifizieren. Die Validierungsergebnisse sind in Tab. 5.6 im Überblick dargestellt.

### 5.1.2.3 Detektion von Teiltranskripten der TVP-Gene in TVP-Dreifachmutanten

Die Microarray-Untersuchungen der TVP-Genexpression schließen nicht aus, dass die mutierten TVP-Allele weiterhin transkribiert werden, wenn auch auf niedrigem Niveau (s. auch Tab. 5.5). Die Expression der drei TVP-Gene wurde daher mit unterschiedlichen Primerkombinationen, die zur Amplifikation unterschiedlicher kodierender und nicht-kodierender Abschnitte dienen, in RT-PCR-Experimenten analysiert.

## 5. Ergebnisse

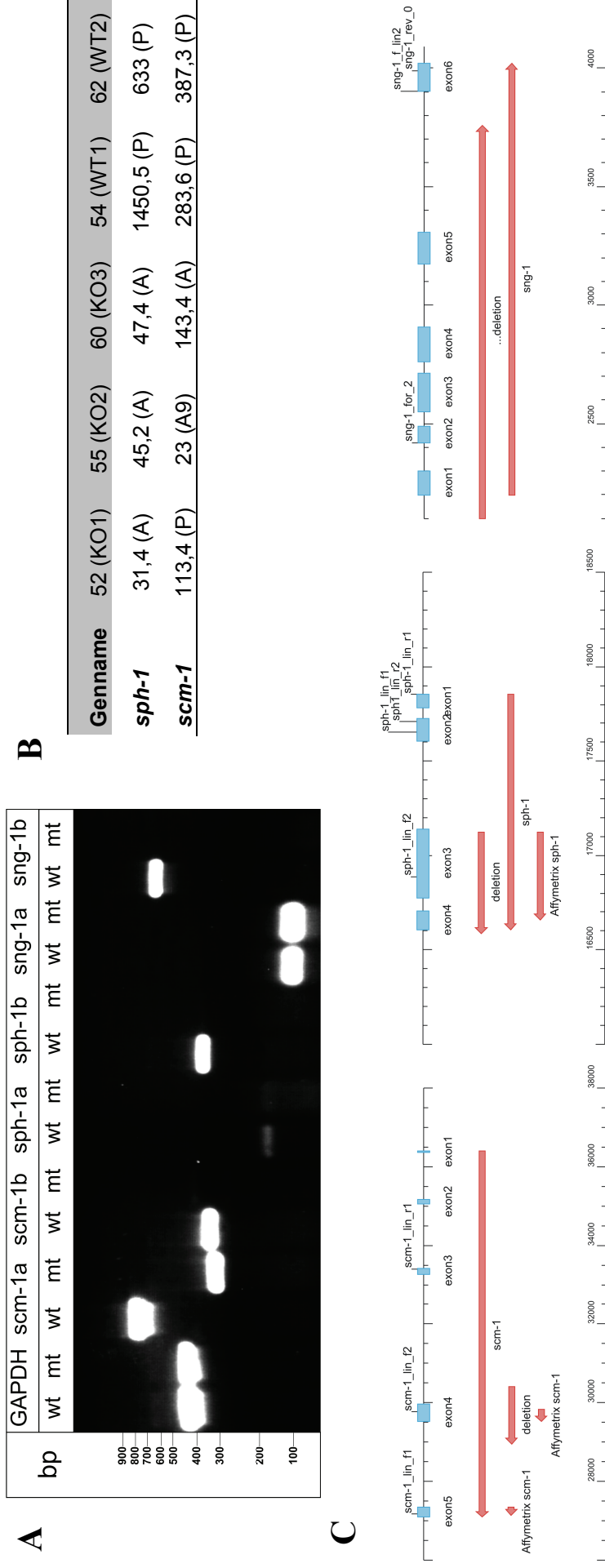
**Tab. 5.6 Validierung der Microchip-Analysen mittels quantitativer *Real-Time* RT-PCR.**

WormBase	Typ/Genname	x-fache Erhöhung/ Erniedrigung (GeneChip)	x-fache Erhöhung/ Erniedrigung RT-PCR (1)	x-fache Erhöhung/ Erniedrigung RT-PCR (2)
F45E4.1	ADP-Ribosylierungsfaktor/ <i>arf-1.1</i>	6,4	4,7	6,6
C54D10.1	Cadmium-empfindlich/ <i>cdr-2</i>	5,0	2,8	3,3
K01D12.11	Cadmium-empfindlich/ <i>cdr-4</i>	5,0	2,6	2,1
T16G1.6	unklar	4,9	2,6	2,1
B0024.4	sekretorisches oder extrazelluläres Protein	4,5	2,4	5,0
C47A10.1	P-Glykoprotein/ <i>pgp-9</i>	3,8	4,7	3,6
Y39B6A.24	Aspartatprotease	3,5	5,2	4,9
K08B4.3	UDP-Glucuronosyltransferase/ <i>ugt-19</i>	3,1	2,1	2,9
M88.1	UDP-Glucuronosyltransferase/ <i>ugt-62</i>	3,0	3,1	2,9
Y47H9C.1	unklar	2,9	1,5	2,7
C34H4.1	unklar	2,7	2,7	1,3
T07H3.6	Meprin/TRAF-ähnlich MATH-Familie	2,6	1,6	1,3
T16G1.4	unklar	2,5	2,3	2,7
C37H5.2	alpha/beta-Hydrolase	2,3	1,4	1,2
F53A9.8	Kernprotein	2,1	1,5	1,8
F17C11.6	Endoplasmatisches Retikulum-Protein	2,1		
ZK228.4	GCN5-verwandte N-Acetyltransferase	2,0	1,3	1,4

Gezeigt ist eine Gegenüberstellung der durch quantitative *Real-Time* RT-PCR und *GeneChip*<sup>®</sup>-Analyse erhaltenen Daten. Die Hochregulierung von zwölf Genen konnte mit beiden Methoden nachgewiesen werden (x-fache Erhöhungswerte der RT-PCR > 2). Probenpaar (1) wurde sowohl mit Microarrays hybridisiert als auch mit quantitativer *Real-Time* RT-PCR untersucht; Probenpaar (2) stammte aus einem separaten Experiment und wurde nur mit quantitativer *Real-Time* RT-PCR analysiert (Farbkode gelb = hochreguliert, rot = nicht nachweisbar).

Wie in Abb. 5.4 A, C gezeigt, wurden mit exonspezifischen Primerpaaren (*scm-1a* und *sng-1a*) die nicht deletierten Regionen von *scm-1(hd30)* und *sng-1(ok234)* amplifiziert, wohingegen kein PCR-Produkt in den deletierten Regionen (mit Primerpaaren *scm-1b*, *sph-1b* und *sng-1b*) zu finden war. Im Fall des *sph-1(ox278)*-Allels wurde kein *sph-1(sph-1a)*-Transkript aus der Mutane amplifiziert.

## 5. Ergebnisse



**Abb. 5.4 Die transkriptionellen Veränderungen der drei TVP-Gene in TVP-defizienten *C. elegans*.**

(A) Gelelektrophoretische Auftrennung der amplifizierten cDNA-Fragmente von wildtypischen und mutierten Allelen in einem 1%-igen Agarosegel. Ein 490 bp-Fragment des GAPDH-Gens wurde als Kontrolle amplifiziert. *Scm-1a* (Primerpaar *scm-1 lin\_f1* und *scm-1 lin\_r1*): ein 755 bp-Fragment aus *scm-1* und ein 308 bp-Fragment aus seinem mutierten Allel *hd30* (Exon 4 deletiert) wurden mit demselben Primerpaar amplifiziert. *Sph-1a* (*sph-1 lin\_f1* und *sph-1 lin\_r1*), *sng-1a* (*sng-1 lin\_for2* und *sng-1 rev0*): die Fragmente aus den nicht deletierten Bereichen von *sph-1* und *sng-1* waren 144 bp bzw. 88 bp (keine Produkte bei homozygoten Mutanten). *Scm-1b* (*scm-1 lin\_f2* und *scm-1 lin\_r1*) (331 bp), *sph-1b* (*sph-1 lin\_f2* und *sph-1 r2*) (356 bp) und *sng-1b* (*sng-1 lin\_f2* und *sng-1 r0*) (602 bp): Komplette Abwesenheit von TVP-Genfragmenten bei *Knockout*-Tieren. Die Zahlen links geben die Größe der Marker-Fragmente in Nukleotiden an. (B) Vergleich der Transkripte der TVP-Gene *sph-1* und *scm-1* im Microarray in der TVP-Mutante (BJ21) und dem WT (BJ20). Beachte, dass die Signalintensität von *sph-1* und *scm-1* in den Mutanten im Vergleich zum WT signifikant vermindert ist. (C) Die Positionen von Primerpaaren und die deletierten Sequenzen von *scm-1*, *sph-1* und *sng-1* sowie die Position der Oligonukleotide, die für die Microarray-Analysen verwendet wurden, sind dargestellt.

#### 5.1.2.4 Expressionsprofil der hochregulierten Gene in TVP-Doppel- und -Einfachmutanten

Der Vergleich zwischen TVP-Dreifachmutanten und WT-Würmern zeigte unterschiedliche Expressionsmuster (siehe Kap. 5.1.2.1 und 5.1.2.2). 17 überexprimierte-Gene wurden in den Mutanten identifiziert, zwölf davon konnten mit quantitativer *Real-Time* RT-PCR bestätigt werden. Um herauszufinden, ob die Expression dieser zwölf Gene im Zusammenhang mit einem einzelnen der TVP-Gene steht oder ob es sich um einen additiven Effekt aller drei Gene handelt, wurden RNA-Expressionsanalysen in den TVP-Einzel- und Doppelmutanten für durchgeführt. Dazu wurden RNAs aus synchronisierten jungen adulten Würmern der BJ18 *sph-1(ox278); sng-1(ok234)*, BJ19 *sng-1(ok234); scm-1(hd30)*, BJ30 *sph-1(ox278); scm-1(hd30)*, BJ14 *sng-1(ok234)*, BJ15 *scm-1(hd30)*, BJ16 *sph-1(ox278)* und BJ20 (WT) isoliert. Nach Konzentrations- und Qualitätsbestimmung wurden die Gesamt-RNAs in cDNAs revers transkribiert (siehe Kap. 4.1.2.5). Diese cDNAs wurden für quantitative *Real-Time* RT-PCRs eingesetzt, normalisiert und ausgewertet. In der folgenden Tab. 5.7 sind für die zwölf hochregulierten Kandidatengene die Ergebnisse der quantitativen *Real-Time* RT-PCR-Versuche in allen TVP-Mutantenstämmen im Vergleich zu den Microarray-Analysen zusammengefasst. Die Gesamtzahl der veränderten Gene unterschied sich deutlich zwischen den verschiedenen TVP-Mutantenstämmen. In BJ19 und BJ30 lagen relativ viel hochregulierte Gene vor (11 bzw. 8), in BJ15 und BJ16 etwas weniger (5 bzw. 3) und in BJ18 und BJ14 am wenigsten (jeweils 1). Interessanterweise wurde das in TVP-Dreifachmutanten am stärksten hochregulierte *arf-1.1* in allen drei *scm-1(hd30)* enthaltenen Mutantenstämmen (BJ19, BJ30 und BJ15) als überexprimiert identifiziert. Im Falle der Cadmium-empfindlichen Gene *cdr-2* und *cdr-4* zeigte sich eine Zunahme der Expressionswerte in der Doppelmutante BJ19 *sng-1(ok234); scm-1(hd30)*. Der größte Expressionsunterschied in BJ16 *sph-1(ox278)* konnte bei dem *T16G1.6*-Gen im Vergleich zum WT gemessen werden. Hier fand sich ein 8,3-facher Unterschied. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass viele Gene sowohl in TVP-Doppelmutanten als auch in Einfachmutanten hochreguliert gefunden wurden.

## 5. Ergebnisse

Tab. 5.7 Übersicht der Expressionsprofile von zwölf Genen, die sich in TVP- Mutanten von WT-Tieren unterscheiden.

WormBase	Typ/Genname	ok234/ hd30/ ox278 (GeneChip)	ok234/ hd30/ ox278 (RT-PCR)	ok234/ ox278 (RT-PCR)	hd30/ ok234 (RT-PCR)	ox278/ hd30 (RT-PCR)	ok234 (RT-PCR)	hd30 (RT-PCR)	ox278 (RT-PCR)
F45E4.1	ADP-Ribosylierungsfaktor/ <i>arf-1.1</i>	6,4	5,7	1,1	4,2	2,2	1,4	3,4	1
C54D10.1	Cadmium-empfindlich/ <i>cdr-2</i>	5	3,1	1,0	3,9	1,8	-1,1	1,5	1,1
K01D12.11	Cadmium-empfindlich/ <i>cdr-4</i>	5	2,4	1,5	2,7	1,2	1	1,3	-1,6
T16G1.6	unklar	4,9	2,4	-1,3	1,9	3,3	1,2	1,1	2,8
B0024.4	sekretorisches oder extrazelluläres Protein	4,5	3,7	2,1	5,8	2,9	-1,6	1,2	-1,2
C47A10.1	P-Glykoprotein/ <i>pgp-9</i>	3,8	4,2	1,9	6,7	2,2	-1,2	1,4	-1,5
Y39B6A.24	Aspartatprotease	3,5	5,1	-1,9	2,3	4,0	2	4,3	1,2
K08B4.3	UDP-Glucuronosyltransferase/ <i>ugt-19</i>	3,1	2,5	1,5	3,1	-1,3	-1,1	1,1	-2
M88.1	UDP-Glucuronosyltransferase/ <i>ugt-62</i>	3	3	1,6	3,8	1,4	-1,3	1,2	-2,3
Y47H9C.1	unklar	2,9	2,1	-1,2	3,7	4,2	1	2,8	3,2
C34H4.1	unklar	2,7	2	1,1	2,8	2,2	1,6	2,8	1
T16G1.4	unklar	2,5	2,5	-1,7	2,3	6,9	1,4	2	8,3

Die Expression der zwölf durch quantitative *Real-Time* RT-PCR bestätigten differenziell exprimierten Kandidatengene der TVP-Dreifachmutante wurde weiter in den TVP-Doppelmutanten BJ18 *sph-1(ox278)*; *sng-1(ok234)*, BJ19 *sng-1(ok234)*; *sng-1(hd30)* und BJ30 *sph-1(ox278)*; *sng-1(hd30)* sowie in den TVP-Einfachmutanten BJ14 *sng-1(ok234)*, BJ15 *sng-1(hd30)* und BJ16 *sph-1(ox278)* quantitativ analysiert. Die Messergebnisse zeigen unterschiedliche Genexpressionsänderungen in den TVP-Mutanten im Vergleich zum WT. In BJ19 *sng-1(ok234)*; *sng-1(hd30)* waren 11 Gene, in BJ30 *sph-1(ox278)*; *sng-1(hd30)* acht Gene und in BJ15 *sng-1(hd30)* fünf Gene überexprimiert. In BJ16 *sph-1(ox278)* wurden sowohl drei hochregulierte als auch zwei herunterregulierte Gene identifiziert. Es wurde jeweils lediglich ein überexprimiertes Gen in BJ18 *sph-1(ox278)*; *sng-1(ok234)* und BJ14 *sng-1(ok234)* gefunden. Bei den hier dargestellten Werten handelt es sich um Expressionsänderungen (x-fache Erhöhung/Erniedrigung; Farbkode: gelb = hochreguliert; blau = herunterreguliert).

### 5.1.2.5 Expressionsprofil der TVP-Gene in TVP-Doppel- und -Einfachmutanten

Um herauszufinden, ob die TVP-Genexpression kompensatorisch in den TVP-Mutanten verändert ist, wurde Expressionsanalysen in den TVP-Einzel- und Doppelmutanten mit Hilfe der quantitativen *Real-Time* RT-PCR durchgeführt. In Tab. 5.8 sind die detaillierten, normalisierten Expressionsergebnisse dargestellt. Es konnten keine signifikanten Expressionsunterschiede der remanenten TVP-Gene nachgewiesen werden. Bei den Untersuchungen konnte weiterhin festgestellt werden, dass das *sng-1*-Gen einen signifikanten Expressionsabfall in der Dreifachmutante im Vergleich zum WT aufweist, obwohl sein Expressionssignal in der Microarray-Analyse nicht detektiert werden konnte (Tab. 5.5).

**Tab. 5.8 Übersicht über die Expressionsniveaus der remanenten TVP-Gene in TVP-Einfach- und Doppelmutanten.**

Gen	ok234/ hd30/ ox278 (GeneChip)	ok234/ hd30/ ox278 (RT-PCR)	ok234/ ox278 (RT-PCR)	hd30/ ok234 (RT-PCR)	ox278/ hd30 (RT-PCR)	ok234 (RT-PCR)	hd30 (RT-PCR)	ox278 (RT-PCR)
sph-1	-19,2	n.u	n.u	1,6	n.u	-1,1	-1,2	n.u
scm-1	-2,4	n.u	1	n.u	n.u	1,7	n.u	-1,3
sng-1	Absent	-2,6	n.u	n.u	1,3	n.u	-1,1	1,1

Identifizierung und Quantifizierung des transkriptionellen Niveaus der TVP-Gene mittels Microarray-Analysen und quantitativer *Real-Time* RT-PCR. Es wurde keine signifikante transkriptionelle Änderung der remanenten TVP-Gene in Einfach- und Doppelmutanten gefunden. Bei den hier dargestellten Werten handelt es sich um Expressionsänderungen (x-fache Erhöhung/Erniedrigung) (blau = Herunterregulierung, n.u = nicht untersucht).

Zusammenfassend zeigten die Expressionsdaten von Microarray-Analysen und quantitativer *Real-Time* RT-PCR, dass die Genexpression von allen drei *Knockout*-Genen, *sph-1*, *scm-1* und *sng-1*, in Mutanten herunterreguliert ist, und kompensatorische Mechanismen auf der Transkriptionsebene innerhalb den TVP-Genen ausgeschlossen werden können.

### 5.2 Analyse der hochregulierten Kandidatengene in *C. elegans*

Die Untersuchung der veränderten Genexpressionsprofile in TVP-Mutanten hatte zum Ziel, Faktoren und Mechanismen zu identifizieren, die den Verlust von TVP-Genen kompensieren. Um dieses Ziel weiter zu verfolgen und die Ergebnisse der *GeneChip*<sup>®</sup>-Analysen besser zu verstehen, wurden RNA-Interferenz (RNAi; 5.2.1) Stressassays (5.2.2-3) sowie weitere Expressionsanalysen mit Reporterkonstrukten (5.2.4) durchgeführt.

#### 5.2.1 RNA-Interferenz (RNAi)

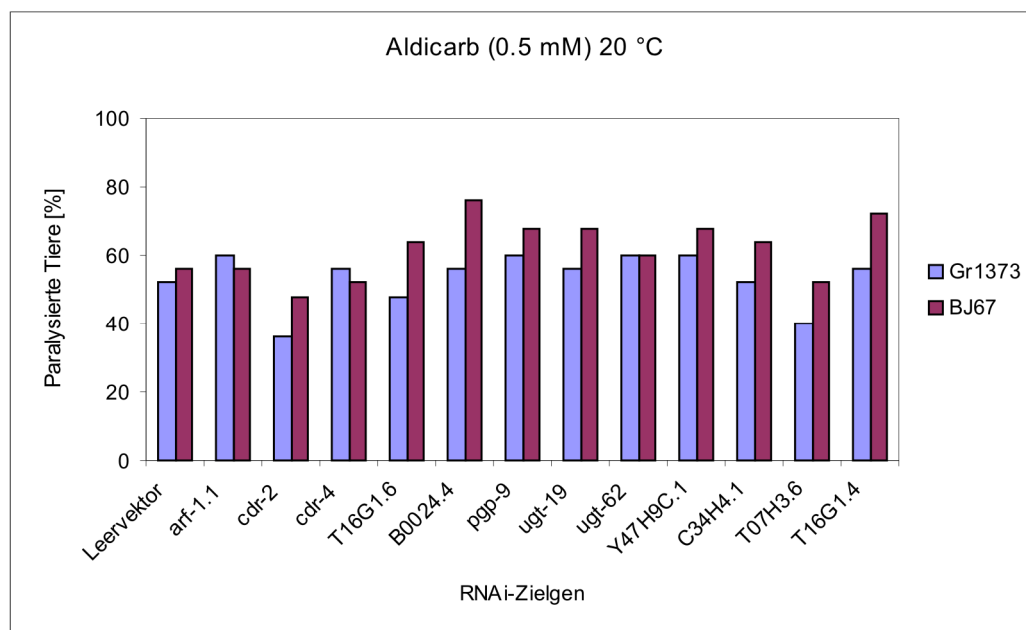
Im Vordergrund dieses Projektabschnittes sollte die Hypothese untersucht werden, dass die erhöhte Expression von RNAs in den TVP-Mutanten phänotypische Defekte verhindert. Es sollten daher die hochregulierten RNAs gezielt in der TVP-Mutante inhibiert werden. Dazu wurden RNAi-Fütterungsexperimente im Mutantenwurm durchgeführt. Adulte Würmer wurden mit dsRNA-bildenden Bakterien vier Tage lang gefüttert. Die F1-Nachkommen wurden bei Raumtemperatur betrachtet und analysiert. Sowohl die Larven- als auch Adultwürmer waren phänotypisch vom WT nicht zu unterscheiden. Für *cdr-4* wurde außerdem der *Knockout*-Stamm RB895 *cdr-4(ok748)* mit der TVP-Dreifachmutante verpaart. Die erzeugte Vierfachmutante BJ34 *cdr-4(ok748); ok234(sng-1); hd30(scm-1); ox278(sph-1)* wurde grob untersucht. Auch sie zeigte keine phänotypischen Auffälligkeiten und wurde daher nicht weiter untersucht.

#### 5.2.2 Aldicarb-Resistenz nach RNAi-vermittelter Hemmung von Kandidatengen

Da unter normalen Wachstumsbedingungen keine phänotypische im vorigen Kapitel beobachtet werden konnte (siehe vorheriger Abschnitt), sollten Stressassays durchgeführt werden. Es war bereits bekannt, dass die TVP-Mutanten keine Unterschiede zu WT-Tieren im direktem Aldicarb-Test bei unterschiedlichen Temperaturen zeigten (Abraram et al., 2006). Jetzt wurden die adulten TVP-Dreifachmutanten nach dsRNA-Behandlung im Vergleich zum WT einer Aldicarb-Behandlung unterworfen (0,5 mM, 20°C). Aldicarb hemmt das Enzym Acetylcholinesterase und führt dadurch zu einer Dauererregung der Muskeln, so dass es zu starken Krämpfen und sogar zum Tod der WT-Würmer kommen kann (Nguyen et al., 1995). Unter Aldicarb-Resistenz versteht man ein vermindertes Krampfverhalten bei einer gestörten Ausschüttung von Neurotransmittern. Zunächst zeigte die TVP-Dreifachmutante keine Unterschiede im Verhalten gegenüber Aldicarb nach RNAi-Versuchen im Vergleich zum WT

## 5. Ergebnisse

(nicht gezeigte Daten). Um die Reaktion im RNAi-sensitiven Stamm zu untersuchen, wurde BJ14 mit der RNAi-hypersensitiven *eri-1(mg366)*-Mutante verpaart. Der daraus resultierende Stamm (BJ67) wurden gleichfalls wie oben beschrieben für RNAi und anschließend in Aldicarb-Experimenten eingesetzt. Zusammenfassend konnte für alle RNAi/Aldicarb kombinierten Tests gezeigt werden, dass es keine unterschiedliche Empfindlichkeit gegen diesen Acetylcholinesterase-Inhibitor sowohl bei den TVP-Dreifachmutanten (Daten nicht gezeigt) als auch bei den RNAi-hypersensitiven *sng-1(ok234)*-Mutanten BJ67 nachweisbar ist (Abb. 5.5). Da es sich um Einzelbestimmungen handelt, konnte eine statistische Auswertung dieser Messergebnisse nicht erfolgen.



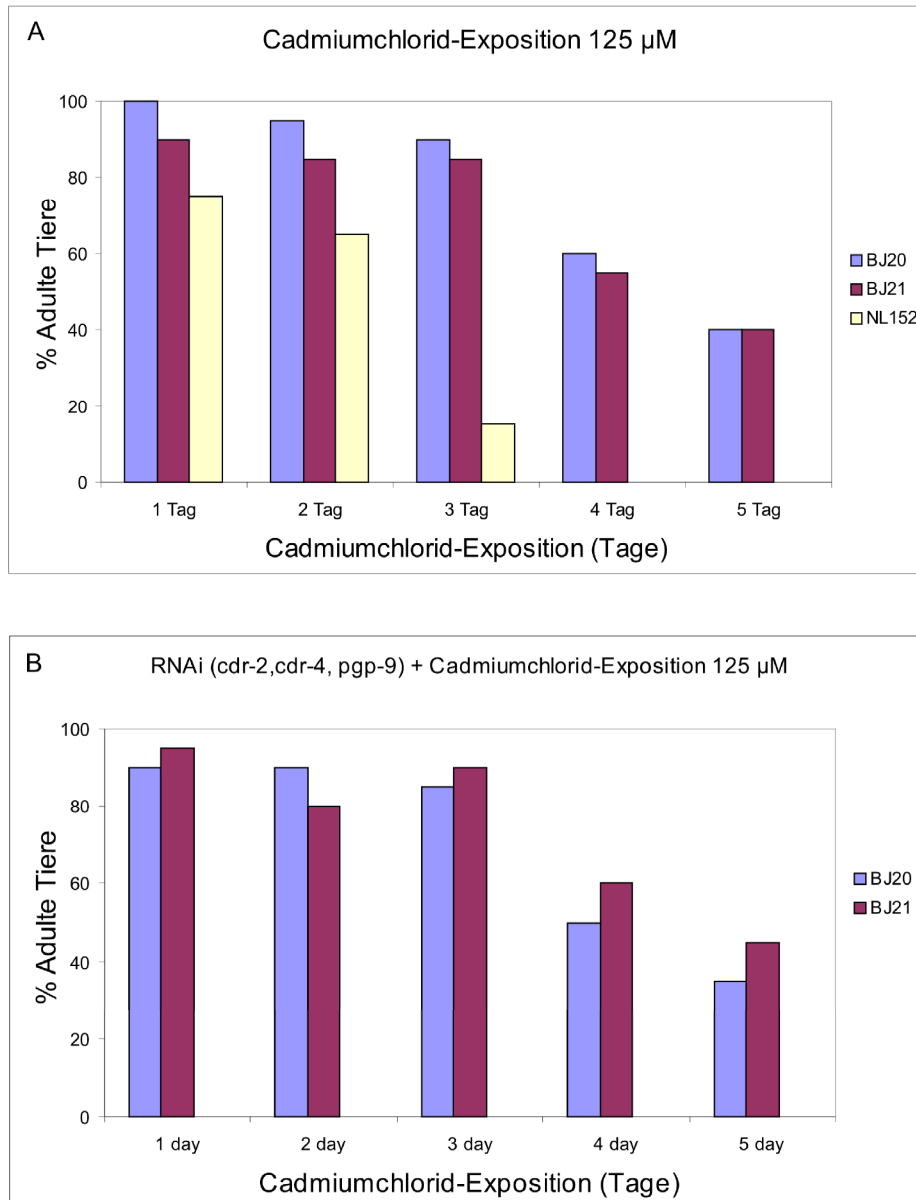
**Abb. 5.5 Aldicarb Resistenz-Assays nach RNA-Interferenz gegen die zwölf durch quantitative *Real-Time* RT-PCR bestätigten, hochregulierten Kandidatengene.**

Nach vier Tagen RNAi-Behandlung wurden 25 junge Adulttiere der RNAi-hypersensitiven Mutante Gr1373 *eri-1(mg366)* und der Doppelmutante BJ67 *sng-1(ok234); eri-1(mg366)* auf eine 0,5 mM Aldicarb-enthaltende Wurmplatte (3,5 cm) transferiert. Nach Inkubation für 100 min bei 20°C wurden die mittels Berührungstest festgelegten paralysierten Würmer ausgezählt. Jeder Berührungsgang begann mit Kopfberührung. Ähnliche Empfindlichkeit zur Hemmung der Acetylcholinesterase wurden in Doppelmutanten des Stamms BJ67 *sng-1(ok234); eri-1(mg366)* und Einfachmutanten Gr1373 *eri-1(mg366)* beobachtet. Bakterien mit L4440-Vektor ohne Insert dienten als negative Kontrolle.

### 5.2.3 Cadmium-Exposition

Bemerkenswerterweise wurden in TVP-Dreifachmutanten erhöhte Transkripte von drei Genen nachgewiesen, die einer Gruppe zugeordnet werden können. Es handelt sich dabei um *cdr-2*, *cdr-4* und *pgp-9*. Die Transkription dieser drei Gene steigt stark nach Cadmium-Exposition an (Liao et al., 2002; Dong et al., 2005; Cui et al., 2007). *cdr-2* und *cdr-4* wurden als Cadmium-empfindliche Gene beschrieben (Dong et al., 2005). Das *pgp-9*-Gen kodiert für das Transmembranprotein P-Glycoprotein (*pgp*), das zu den sog. *multidrug resistance-proteins* (MRP) gehört (Brokes et al., 1996). Diese Proteine können ATP binden und sind vermutlich in der Lage, toxische Substanzen wie z.B. Cadmium durch Membranen zu pumpen. Eine mögliche Erklärung für die erhöhte Transkription dieser Cadmium-empfindlichen Gene in der TVP-Dreifachmutante ist, dass dort ein Trafficking-Defekt vorliegt, der zu einer verminderten Aktivität dieser Proteine führt. Das wiederum könnte zu einer hypersensitiven Steigerung der Gentranskription beitragen. Um herauszufinden, ob damit eine erhöhte Empfindlichkeit der Mutanten verbunden ist, wurden diese mit Cadmium behandelt. Bei kontinuierlicher Exposition mit 125  $\mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$  bildeten Mutanten und WT-Tiere normale Eier. Die Larven verharrten bei beiden im L1-Stadium. Nach unterschiedlichen Behandlungsperioden (1 - 5 Tage) wurden die Tiere auf normale NGM-Platten transferiert. Als positive Kontrolle wurde eine Mutante BJ152 *pgp-1(pk17); pgp-3(pk18); mrp-1(pk89)* (Brokes et al., 1996) verwendet, die nach drei Tagen Cadmium-Exposition sterben (Abb. 5.6 B). Bei Bestimmung der überlebenden Tiere nach fünftägiger Cadmium-Exposition konnten auch hier keine Unterschiede Zwischen WT und TVP-Dreifachmutanten im Überlebensgrad sowohl direkt nach Cadmium-Exposition (Abb. 5.6 A) als auch in dreifach- (gegen *cdr-2*, *cdr-4* und *pgp-9*) RNAi/Cadmium kombinierten Experimenten gefunden werden (Abb. 5.6 B).

## 5. Ergebnisse



**Abb. 5.6 Überlebensraten nach temporärer Cadmiumchlorid-Exposition.**

(A) WT und TVP-Dreifachmutanten wurden direkt mit Cadmiumchlorid behandelt. (B) Cadmiumchlorid-Exposition nach RNA-Interferenz gegen *cdr-2*, *cdr-4* und *pgp-9*. Die Histogramme zeigen den Prozentanteil der nach Cadmiumchlorid-Exposition überlebenden Tiere nach Umsetzung auf normale NGM-Platten. Nach fünf Tagen Cadmiumchlorid-Exposition waren die TVP-Dreifachmutanten (BJ21) ebenso wie die WT-Tiere (BJ20) noch in der Lage, sich bis zum Adultstadium weiter zu entwickeln. Die Dreifachmutante NL152 *pgp-1(pk17); pgp-3(pk18); mrp-1(pk89)* ist hypersensitiv gegenüber Cadmium (Broeks et al., 1996) und diente als positive Kontrolle in diesen Experimenten.

### 5.2.4 Verteilung der durch *Real-Time* RT-PCR bestätigten Gene, deren Transkripte in der *C. elegans* TVP-Mutante erhöht sind

Mittels *GeneChip*<sup>®</sup>-Techniken und quantitativer *Real-Time* RT-PCR können nur die Expressionsunterschiede im Gesamt-Wurm untersucht werden. Um weiterführende

Erkenntnisse über die gewebespezifische und intrazelluläre Lokalisierung zu erhalten, wurden Plasmidkonstrukte für *CFP*-fluoreszierende Transkriptions- und Translationschimären hergestellt. Diese wurden mikroinjiziert, und die transgenen Nachkommen wurden im Fluoreszenzmikroskop bei Raumtemperatur analysiert.

#### 5.2.4.1 *arf-1.1*, *cdr-2*, *T16G1.6* und *ugt-62* werden in Intestinalzellen exprimiert

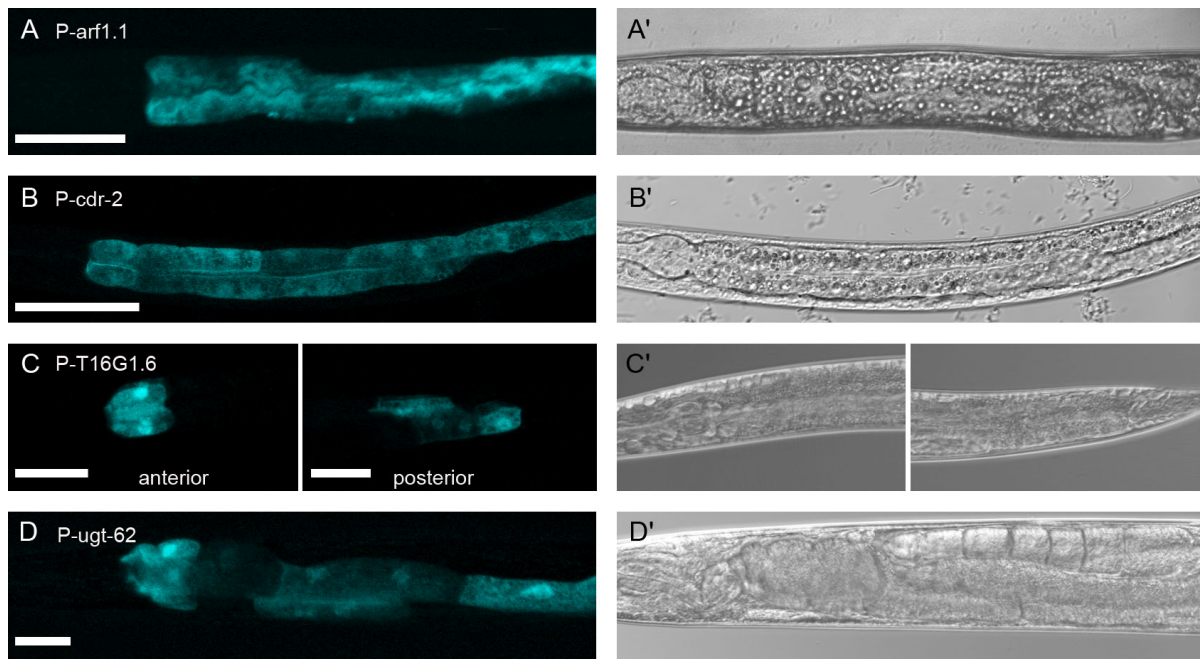
Um die Expressionsmuster der Kandidatengene in *C. elegans* zu charakterisieren, wurden die entsprechenden Promotersequenzen der verschiedenen Kandidaten in den pV10.10 (*CFP*)-Vektor kloniert. Die genauen Angaben zu den *cfp*-Transkriptionskonstrukten sind der Tab. 5.9 zu entnehmen. Die DNA der erfolgreich generierten Transkriptionskonstrukte (40 ng/μl) wurden zusammen mit dem Bluescript KS Plasmid DNA (160 ng/μl) als Träger-DNA in WT (BJ20)-Tiere injiziert. Durch Injektion in die Gonaden der Hermaphroditen entstanden die *cfp*-Reporterstämme: BJ57 *kcEx15* (*Pcdr-2:cfp*), BJ104 *kcEx17* (*Parf-1.1:cfp*), BJ105 *kcEx18* (*PT16G1.6:cfp*) und BJ113 *kcEx10* (*Pugt-62:cfp*). Die *CFP*-fluoreszierenden Nachkommen wurden im Fluoreszenzmikroskop bei Raumtemperatur analysiert. Die transgenen Würmer exprimieren das *cfp*-Reporter-Konstrukt in zahlreichen Kopien auf extrachromosomalen DNA-Elementen. Die *CFP*-Fluoreszenzintensität spiegelt direkt die Promoteraktivität wieder. In den oben genannten vier unabhängigen Stämmen wurde die extrachromosomale DNA ungleichmäßig mit einer Schwankung von ca. 30% bis 60% an die Nachkommen vererbt. Die Abb. 5.7 zeigt die konfokal-mikroskopischen Aufnahmen der intestinalen Lokalisierung der vier Promoter-Gen-Konstrukte. *CFP* wurde im gesamten Darm bei BJ104 *kcEx17* (*Parf-1.1:cfp*), BJ57 *kcEx15* (*Pcdr-2:cfp*) und BJ113 *kcEx10* (*Pugt-62:cfp*) oder in den anterioren und posterioren Darmzellen bei BJ105 *kcEx18* (*PT16G1.6:cfp*) experimentiert.

**Tab. 5.9 Die Transkriptionskonstrukte der vier etablierten transgenen Stämme.**

Name	Promoter*	Primer	Fragmentgröße	Restriktionsschnittstellen
<i>Parf-1.1:cfp</i>	<i>arf-1.1</i>	06-38/06-69	1612 bp	<i>HindIII/BamHI</i>
<i>Pcdr-2:cfp</i>	<i>cdr-2</i>	06-39/06-40	618 bp	<i>HindIII/BamHI</i>
<i>PT16G1.6:cfp</i>	<i>T16G1.6</i>	06-43/06-71	2260 bp	<i>SphI/BamHI</i>
<i>Pugt-62:cfp</i>	<i>ugt-62</i>	06-59/06-60	967 bp	<i>HindIII/BamHI</i>

\* Die amplifizierten Promoterfragmente wurden in den entsprechend geschnittenen Vektor pVH10.10 (*CFP*) kloniert.

## 5. Ergebnisse



**Abb. 5.7 Expressionsanalyse von *Parf-1.1::cfp*, *Pcdr-2::cfp*, *PT16G1.6::cfp* und *Pugt-62::cfp* mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie.**

Die Promoter-gesteuerten Fluoreszenz-Transkriptionskonstrukte wurden in WT-Würmer (BJ120) injiziert. Die transgenen Tiere der vier generierten Stämme zeigen Expression in intestinalen Zellen (Korrespondierende Phasenkontrastaufnahmen rectis). A A': BJ104 *kcEx17* (*Parf-1.1::cfp*); B, B': BJ57 *kxEx15* (*Pcdr-2::cfp*); C, C': BJ105 *kcEx18* (*PT16G1.6::cfp*); D, D': BJ113 *kcEx10* (*Pugt-62::cfp*). Maßstab, 50  $\mu$ m.

### 5.2.5 Kolokalisierung von ARF-1.1 und CDR-2 mit SPH-1 und SCM-1 im Darm

Die Translationschimären SPH-1::YFP und SCM-1::YFP sind im Darm lokalisiert (nicht veröfl. Daten von Abraham & Leube). Um zu untersuchen, ob die Proteine der im Darm identifizierten Gene und SPH-1::YFP bzw. SCM-1::YFP in denselben Zellen vorkommen und, noch viel wichtiger, ob sie eine vergleichbare subzelluläre Verteilung aufweisen, wurden CFP-Translationskonstrukte generiert, die für ARF-1.1::CFP und CDR-2::CFP kodieren (Tab. 5.10). Translationschimären der anderen Gene gelangen in dieser Arbeit leider nicht. Die DNAs der beiden erfolgreich hergestellten Translationskonstrukte wurden entweder zusammen mit SPH-1::YFP bzw. SCM-1::YFP in WT-Hermaphroditen koinjiziert oder in die bereits vorhandenen SPH-1::YFP-prduzierenden Würmer des Stamms EG2976 *lin-15(n765ts)X; oxEx466 [lin-15(+), sph-1::yfp]* mikroinjiziert. Die transgenen Linien wurden fluoreszenzmikroskopisch analysiert.

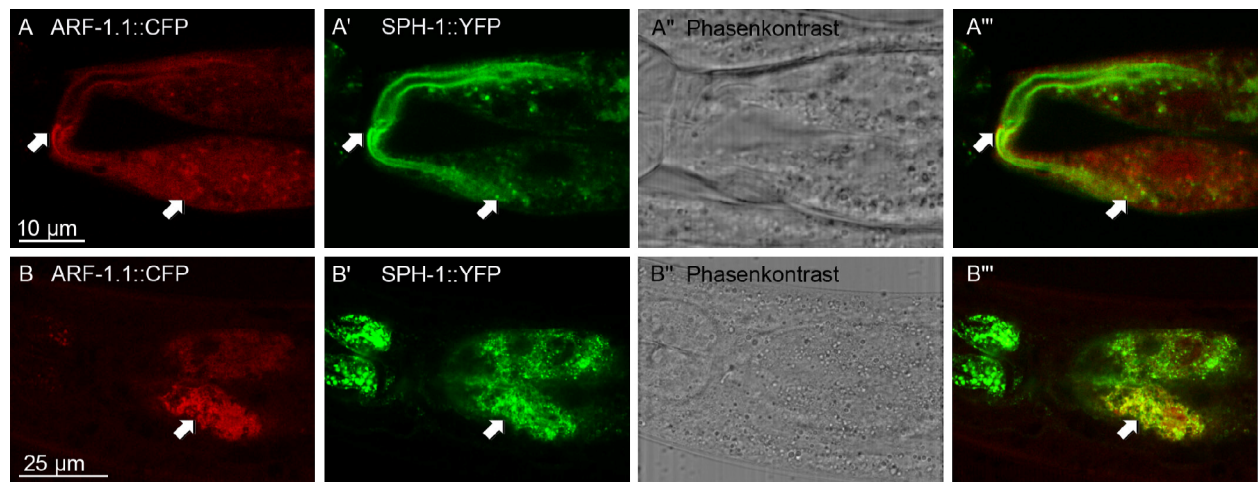
**Tab. 5.10 Die Translationskonstrukte von ARF-1.1 und CDR-2.**

Name	Template*	Primer	Fragmentgröße	Restriktionsschnittstellen
ARF-1.1::CFP	genomische DNA	07-17/07-18	2292 bp	<i>BamHI/SmaI</i>
CDR-2::CFP	genomische DNA	06-39/06-40	785 bp	<i>BamHI/SmaI</i>
	cDNA	06-99/07-09	618 bp	<i>HindIII/BamHI</i>

\* Die amplifizierten Fragmente wurden in den entsprechend geschnittenen Vektor pVH10.10 (CFP) kloniert.

### 5.2.5.1 Kolokalisierung von ARF-1.1 mit SPH-1 in Darmzellen von *C. elegans*

Um eine mögliche subzelluläre Kolokalisierung von ARF-1.1 und SPH-1 nachzuweisen, wurden die mit ARF-1.1::CFP und SPH-1::YFP mikroinjizierten transgenen Tiere BJ128 *kcEx14 (arf-1.1::cfp); lin-15(n765ts)X; oxEx466 [lin-15(+), sph-1::yfp]* etabliert und konfokal fluoreszenzmikroskopisch untersucht (Abb. 5.8). ARF-1.1::CFP konnte wie die entsprechenden Transkriptions-Chimäre nur im Darm nachgewiesen werden (Abb. 5.8 A, B). SPH-1::YFP ist ebenso stark im Darm lokalisiert (Abb. 5.8 A', B'). Um sicherzustellen, dass es sich bei den detektierten Fluoreszenz-Signalen um eine Kolokalisierung im Darm handelt, wurden mittels der Konfokalmikroskopie die Signale von einzelnen fokalen Ebenen der Würmer verglichen. ARF-1.1::CFP und SPH-1::YFP wiesen eine partielle, aber deutliche Kolokalisierung in den intestinalen Zellen auf (Abb. 5.8 A''', B''').

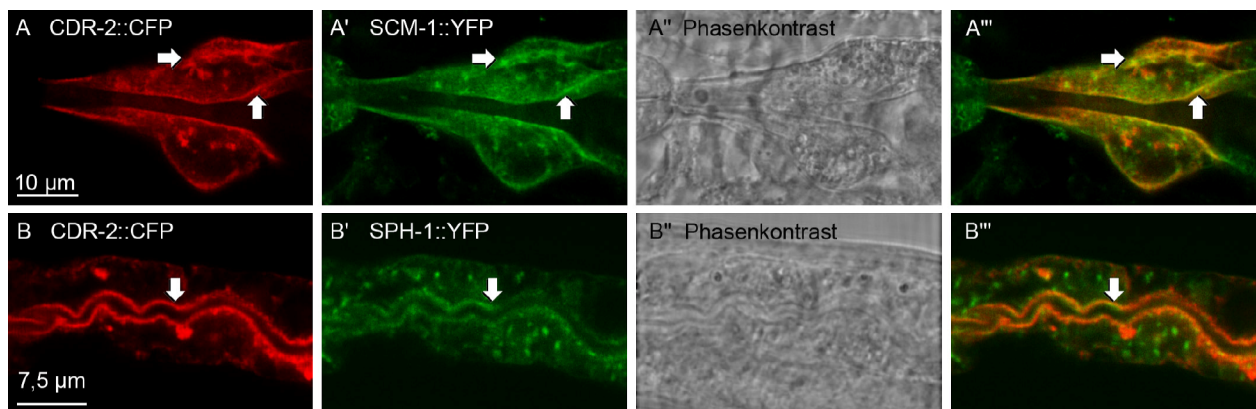


**Abb. 5.8 Partielle intestinale Kolokalisierung von ARF-1.1::CFP mit SPH-1::YFP in der konfokalen Laserfluoreszenzmikroskopie.**

A, B: Subzelluläre Lokalisierung von ARF-1.1::CFP (rot) in intestinalen Zellen. A', B': Subzelluläre Verteilung von SPH-1::YFP (grün) in Darmzellen. A''', B''': zeigen einzelne konfokale Ebenen. Die Überlagerung der Fluoreszenzfarben von ARF-1.1::CFP und SPH-1::YFP weist auf eine partielle punktierte Kolokalisierung (gelb) der beiden Proteine hin. Im Darm ist ARF-1.1 mit SPH-1::YFP auf der apikalen Seite kolokalisiert. Die Pfeile (A''', B''') deuten auf eine Stelle, an der CFP- und YFP-Fluoreszenz kolokalisieren.

### 5.2.5.2 Kolokalisierung von CDR-2 mit SPH-1 und SCM-1 im Darm

Um eine mögliche zellspezifische Kolokalisierung von CDR-2::CFP mit SPH-1::YFP bzw. SCM-1::YFP zu untersuchen, wurde das Translationskonstrukt CDR-2::CFP in SPH-1::YFP-Chimären mikroinjiziert, woraus der Stamm BJ121 *kcEx13 (Pcdr-2::cdr-2::cfp); lin-15(n765ts)X; oxEx466 [lin-15(+), sph-1::yfp]* resultierte. Nur die CFP-leuchtenden Männchen der etablierten transgenen Mutante (BJ121) wurden mit Hermaphoditen (VH369), die das Translationskonstrukt *hdEx153 [pha-1(+), scm-1::yfp]* exprimieren, verpaart. So wurde BJ139 *kcEx13 (Pcdr-2::cdr-2::cfp); hdEx153 [pha-1(+), scm-1::yfp]* erzeugt. Die in beiden Fluoreszenzfarben leuchtenden Nachkommener wurden konfokal fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Um die Kolokalisierung des CDR-2 mit SPH-1 oder SCM-1 in den zwei hergestellten transgenen Stämme zu bestimmen, wurden einzelne fokale Ebenen eines Präparats der beiden Stämme getrennt sichtbar gemacht. Durch Überlagerung beider fluoreszierenden Farben in transgenen Würmern wird durch eine Gelbfärbung eine Kolokalisierung von CFP und YFP verdeutlicht. CDR-2::CFP weist eine ähnliche Verteilung im Darm wie *Pcdr-2::cfp* auf (Abb. 5.9 A, B). SPH-1::YFP und SCM-1::YFP sind in Darmzellen exprimiert (Abb. 5.9 A', B'). Es konnte eine partielle Kolokalisierung von CDR-2::CFP mit SCM-1::YFP (A''') sowie von CDR-2::CFP und SPH-1::YFP (B''') in Darmzellen in einem punktierten Muster eindeutig detektiert werden. Die Expression von SCM-1::YFP und SPH-1::YFP ist durch die Lokalisierung des CDR-2::CFP nicht verändert.



**Abb. 5.9 Partielle intestinale Kolokalisierung von CDR-2::CFP mit SCM-1::YFP und SPH-1::YFP mittels konfokaler Laserfluoreszenzmikroskopie.**

A, B: Subzelluläre Lokalisierung von CDR-2::CFP (rot) in Darmzellen. A' und B': Subzelluläre Expression von SPH-1::YFP und SCM-1::YFP in Darm. Die gelbe Farbe zeigt deutlich eine Koexpression von CDR-2::CFP mit SCM-1::YFP (A''') und eine Kolokalisierung von CDR-2::CFP mit SPH-1::YFP (B'''). Die gelbe Farbe entsteht durch zufällige Überlagerung der roten und grünen Signale.

### 5.3 Analysen der Synaptogyrin-1-Mutanten

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit stand die Funktionsanalyse von Synaptogyrin-1 im Vordergrund, da dieses TVP am stärksten in Neuronen von *C. elegans* exprimiert wird (Nonet, 1999; Abraham et al., 2006).

#### 5.3.1 Analysen der Synaptogyrin-1-überexprimierenden Würmer

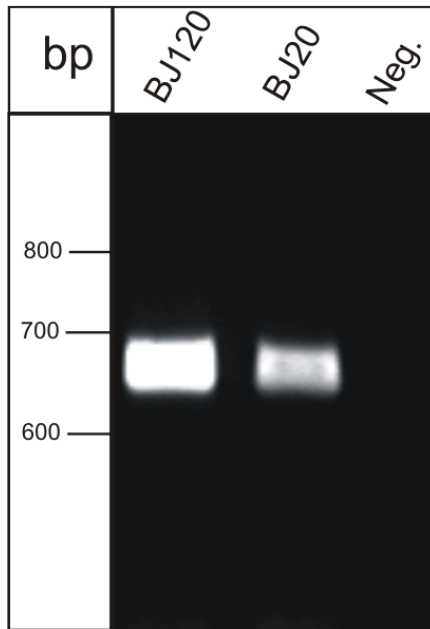
Die TVP- Einzel- und Dreifachmutanten zeigen eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber Pentylentetrazol (PTZ). Dieser PTZ-Phänotyp konnte am stärksten in der Synaptogyrin-Mutante (BJ14) nachgewiesen und durch Mikroinjektion des Translationskonstrukts *Psng-1::sng-1* in die Synaptogyrin-Mutante gerettet werden (Abraham & Leube, unveröffl. Befunde). Es konnte auch gezeigt werden, dass die Anzahl der Clathrin-umhüllten Vesikel in der TVP-Dreifachmutante im Vergleich mit WT signifikant erhöht ist (Abraham et al., 2006). Um die Aktivität der GABAergen und cholinergen Synapsen in Synaptogyrin-1-Mutanten weiter zu untersuchen, wurden PTZ- und Aldicarb-Tests sowohl in den *sng-1(ok234)*-Deletionsmutanten als auch in den SNG-1-überexprimierenden Würmern durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden zuerst 30 ng/μl des Plasmids *Psng-1::sng-1* (Tab. 5.11) mit dem Transkriptionskonstrukt *Pifb-2::yfp* (70 ng/μl) als Koinjektionsmarker in WT-Tiere (BJ20) injiziert und die SNG-1-überexprimierende transgene Linie (BJ120) etabliert. Beim Stamm BJ120 *kcEx12 (Psng-1::sng-1); kcEx5 (Pifb-2::yfp)* liegen das transgene *sng-1* und das Plasmid *Pifb-2::yfp* extrachromosomal im Zellkern der Zellen vor. Bei dieser Mutante wurden ebenfalls wie bei der *sng-1*-Mutante (BJ14) mikroskopisch keine phänotypischen Veränderungen beobachtet.

**Tab. 5.11 Translationskonstrukt von *Psng-1::sng-1*.**

\* *Psng-1::sng-1*

Zur Generierung des Konstrukts *Psng-1::sng-1* wurde ein 560 bp *XmaI/NcoI*-Fragment mit dem Primerpaar 07-117 und 07-118 von genomischer DNA amplifiziert. Das 560 bp *XmaI/NcoI*-Fragment wurde in den *XmaI/NcoI* geschnittenen Vektor SNG-1::YFP (Klon 1702), das Synaptogyrin-1-Gen und Promotersequenzen aus *C. elegans* enthält, subkloniert. Da im neuen entstehenden Klon *Psng-1::sng-1* zwei Nukleotide der *yfp* DNA verschoben wurden, stimmt das Leseraster nicht mehr.

Mittels einer Einzeltier-PCR wurde die Anwesenheit des Mikroinjektionsplasmids *Psng-1:sng-1* in den BJ120-Würmern überprüft (Abb. 5.10). Dabei wurde die in 4.1.3 beschriebene PCR-Methode verwendet.



**Abb. 5.10 DNA-Agarosegel zur Überprüfung des mikroinjizierten Synaptogyrin-1-überexprimierenden Stamms BJ210 mit Hilfe der Einzelwurm-PCR.**

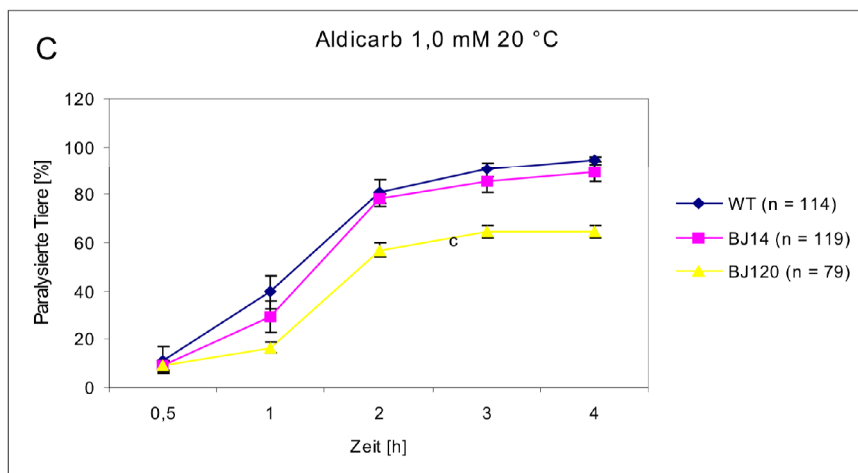
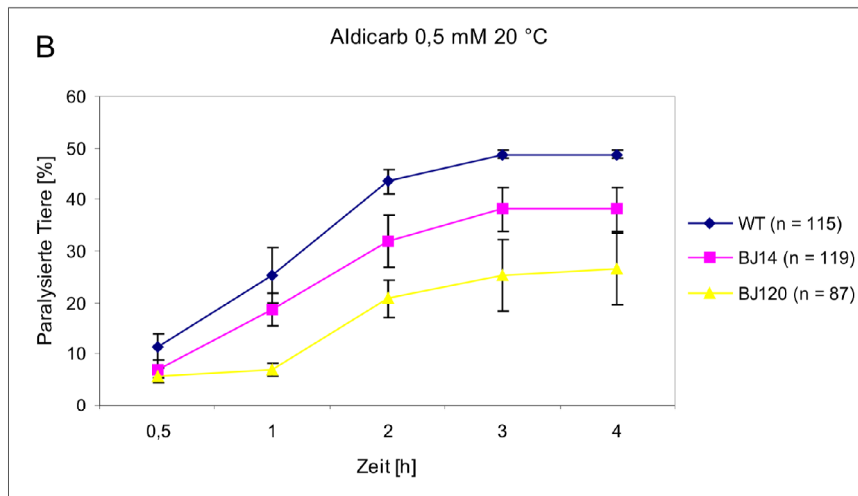
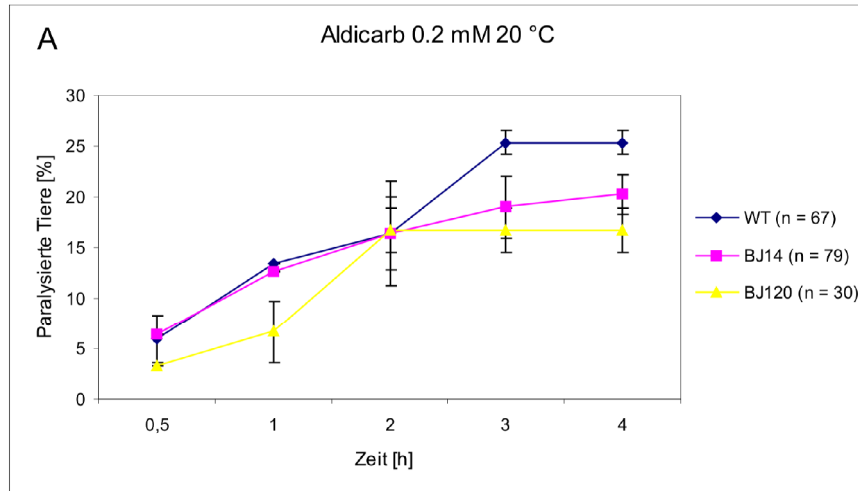
Die DNA-Expression von Synaptogyrin-1 wurde mit spezifischen Oligonukleotiden und PCR untersucht, um zu zeigen, dass der Stamm das mikroinjizierte Plasmid enthält. Es zeigte sich, dass die erwartete Bande (684 bp groß) im Stamm BJ120 deutlich dicker als im WT ist (Neg. = Negativkontrolle).

### 5.3.1.1 Aldicarb-Resistenz

Zur Bestimmung des Einflusses der SNG-1-Überexpression auf die Ausschüttung von Neurotransmittern wurden SNG-1-überexprimierende Mutanten (BJ120), *sng-1*-Mutanten (BJ14) und WT-Tiere (BJ20) im Aldicarb-Test in unterschiedlichen Konzentrationen analysiert. Im Gegensatz zu früheren Experimenten (Abraham et al., 2006) wurde diesmal eine veränderte und etwas empfindlichere Analyseverfahren der Aldicarb-Empfindlichkeit verwendet. Die Abb. 5.11 zeigt den Prozentsatz der durch Aldicarb-Behandlung verursachten paralysierten Tiere bei 20°C über einen Zeitraum von vier Stunden. Signifikante Unterschiede der Aldicarb-Behandlung gegenüber der WT-Kontrolle (BJ20) wurden mittels des t-Tests überprüft. Dabei stellte sich heraus, dass die SNG-1-überexprimierende Mutante eine höhere Resistenz gegenüber niedrigeren Aldicarb-Konzentration (0,2 mM) zeigt als der WT (BJ120,  $P = 0,02$ , Abb. 5.11 A). In steigenden Aldicarb-Konzentrationen (0,5 und 1,0 mM) wurde dieser Resistenzphänotyp der überexprimierenden Mutanten nicht mehr verstärkt dargestellt ( $P = 0,029$ , Abb. 5.11 B, C). Bei einer Aldicarb-Konzentration von 1,0 mM waren 94,79% der WT-Tiere paralysiert, aber 35,46% der SNG-1-überexprimierenden Würmer bewegten sich weiter normal sinusförmig in Berührungstest. Parallel dazu wurde gefunden, dass die *sng-*

## 5. Ergebnisse

*I(ok234)*-Mutante auch einen schwachen ( $P = 0,044$ , Abb. 5.11 A, 0,2 mM Aldicarb) oder intermediären ( $P = 0,029$ , Abb. 5.11 B, 0,5 mM Aldicarb) Resistenzphänotyp zeigte, dieser Phänotyp wurde bei hoher Aldicarb-Konzentration (1,0 mM) nicht mehr nachgewiesen ( $P = 0,12$ ).

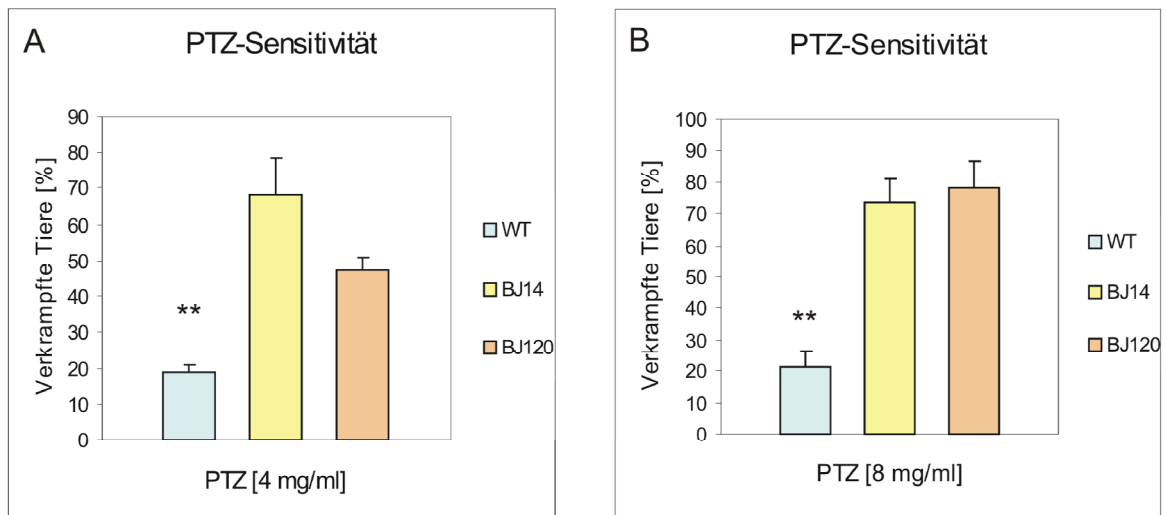


### **Abb. 5.11 Erhöhte Resistenz der Synaptogyrin-1-Mutanten gegenüber Aldicarb in Abhängigkeit von Konzentrationen und Zeit.**

Die adulten WT (BJ20), *sng-1*-Mutanten (BJ14) und SNG-1-überexprimierenden Tiere (BJ120) wurden Wurmplatten (3,5 cm) mit unterschiedlichen Aldicarb-Konzentrationen (0,2, 0,5 und 1,0 mM) transferiert. Während der Inkubation für insgesamt vier Stunden bei 20°C wurden die paralysierten Tiere mit Hilfe des Berührungstests bestimmt. Jeder Berührungsgang begann mit Kopfberührung. Eine Paralyse wurde als Fehlen der typischen Körperbewegung definiert. Die Messungen erfolgten zum Zeitpunkt 0,5 h, 1 h, 2 h, 3 h und 4 h. Die SNG-1-überexprimierende Mutante zeigte schon bei niedriger Konzentration 0,2 mM (A) eine Resistenz gegenüber Aldicarb im Vergleich mit den WT-Tieren (BJ120:  $P = 0,02$ ). Eine gleich starke Resistenz wurde bei einer Aldicarb-Konzentrationen von 0,5 und 1,0 mM (B und C) beobachtet ( $P = 0,029$ ). *Sng-1*-Mutante BJ14 (ok234) zeigte auch einen Resistenzphänotyp gegenüber Aldicarb bei 0,2 mM ( $P = 0,024$ ) und 0,5 mM ( $P = 0,029$ ), dieser Phänotyp ist jedoch bei einer Aldicarb-Konzentration von 1,0 mM nicht mehr detektierbar ( $P = 0,12$ ). Mittelwerte aus drei (0,2 mM) bzw. vier (0,5 und 1,0 mM) unabhängigen Experimenten mit Standardabweichungen sind dargestellt. Die Anzahl der untersuchten Tiere (n) bei den verschiedenen Aldicarb-Konzentrationen ist jeweils angegeben.

### **5.3.1.2 Pentylentetrazol (PTZ)-Sensitivität**

Zur Untersuchung der GABAergen Synapsen in *C. elegans* wurden in Zusammenarbeit mit Christian Abraham an SNG-1-überexprimierenden Mutanten (BJ120), *sng-1*-Mutanten (BJ14) und WT-Tieren (BJ20) PTZ-Sensitivitätstests in zwei unterschiedlichen Konzentrationen (4 und 8 mg/ml) bei 20°C durchgeführt. Die *sng-1(ok234)*-Mutante diente als Positivkontrolle. Wie in Abb. 5.12 zu sehen ist, waren die Überexpressionsmutanten (BJ120) empfindlicher gegenüber PTZ als der WT-Stamm ( $P = 0,002$  und  $0,005$ ). Bei Zugabe von 4 mg/ml PTZ verkrampften 47,4% und bei 8 mg/ml PTZ 78% der SNG-1-überexprimierenden Tiere. In WT-Würmern waren es bei 4 mg/ml 18,6% und bei 8 mg/ml 21,1%. Bei einer PTZ-Konzentration von 4 mg/ml und 8 mg/ml waren jeweils 68,3% und 73,8% der *sng-1(ok234)*-Mutanten verkrampft. Darüber hinaus war beim Vergleich der Mutante BJ120 mit der *sng-1*-Mutante (BJ14) kein Unterschied in der Empfindlichkeit gegenüber 8 mg/ml PTZ zu beobachten. Die vorhandenen Daten deuten darauf hin, dass sich sowohl das Fehlen von Synaptogyrin-1 als auch eine Synaptogyrin-1-Überproduktion in einer erhöhten PTZ-Sensitivität in *C. elegans* bemerkbar macht.



**Abb. 5.12 PTZ-induzierte epilepsieähnliche Konvulsion in den SNG-1-überexprimierenden Würmern und *sng-1(ok234)*-Mutanten.**

Der mutante Stamm BJ120 *kcEx12 (Psng-1::sng-1); kcEx5 (Pifb-2::yfp)* und WT (BJ20) wurden mit 4 mg/ml bzw. 8 mg/ml PTZ behandelt. Nach Inkubation für 30 min bei 20°C wurden die Tiere unter dem Mikroskop analysiert. Als Positivkontrolle wurde die Synaptogyrin-1-Mutante (BJ14) verwendet, die bei der PTZ-Behandlung stark verkrampft. Die Balkendiagramme zeigen den Prozentsatz der verkrampften Würmer in Anwesenheit von entweder 4 mg/ml (A) oder 8 mg/ml PTZ (B). Die SNG-1-überexprimierenden Mutanten waren empfindlicher als die WT Tiere (BJ20) bei beiden Konzentrationen ( $P = 0,002$  bzw.  $0,005$ ). Vergleich der Verkrampfungsraten von BJ120- und BJ14-Stämmen zeigten keine statistischen Unterschiede. Dargestellt sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten mit Standardabweichungen (\*\*  $P < 0,01$ ).

### 5.3.2 Genetischer Screen zur Identifizierung synthetischer Mutanten in Kombination mit *sng-1(ok234)*

Um die Funktion von *sng-1* in Kombination mit anderen essenziellen Komponenten von synaptischen Vesikeln zu erforschen, wurde ein genetischer Interaktions-Screen durchgeführt. Da keine neuronalen Ausfallserscheinungen in den Synaptogyrin-Mutanten beobachtet wurden, sollte ein synthetischer Screen durchgeführt werden. Die Grundidee basiert darauf, dass Mutationen zweier Gene, die an unabhängigen Exozytose- und/oder Endozytosewegen beteiligt sind, additiv, d.h. synthetisch wirken. Bei zwei Mutationen in gemeinsamen Reaktionswegen wäre das kaum zu erwarten. Dazu wurde die Mutante von *sng-1* (EG3008), die das Promoterkonstrukt *Punc47::gfp* exprimiert, als Ausgangsstamm mit anderen synaptischen Vesikelproteinmutanten (siehe Tab. 5.12), deren Phänotyp durch unkoordinierte Bewegung gekennzeichnet ist, verpaart. Die daraus resultierenden Doppelmutanten-Stämme wurden weiter auf ihre pharyngeale Pumpbewegungen und Wachstumsverhalten analysiert. Da wir im Laufe der Untersuchungen herausfanden, dass die Mutante EG3008 hypersensitiv gegenüber Aldicarb ist (Daten nicht gezeigt), wurden die synthetisch wirkenden Allele für weitere Analysen mit BJ14 *sng-1(ok234)* verpaart.

## 5. Ergebnisse

Für die ersten Analysen wurde der Stamm EG3008 *sng-1(ok234)*, *oxls12 [lin15(+), Punc-47:gfp]* verwendet, in den 13 unterschiedliche Allele von 10 verschiedenen Genen eingekreuzt (Tab. 5.12). Abb. 5.13 zeigt das Ergebnis der Analysen von pharyngealen Pumpbewegungen von Stämmen.

**Tab. 5.12 Die für einen genetischen Interaktions-Screen verwandten *C. elegans*-Stämme.**

Stamm	Genotyp	
	<i>sng-1</i>	andere mutante Gene [kordiertes Protein]
BJ20	<i>wt</i>	<i>wt</i>
EG3008*	<i>ok234</i>	<i>wt</i>
BJ14	<i>ok234</i>	<i>wt</i>
BX30	<i>wt</i>	<i>fat-3(wa22)IV</i> [Fettsäure Desaturase]
BJ109*	<i>ok234</i>	"
CB538	<i>wt</i>	<i>unc**-1(e538)X</i> [Stomatin-ähnlich]
BJ116*	<i>ok234</i>	"
CB138	<i>wt</i>	<i>unc-24(e138)IV</i> [Stomatin-ähnlich]
BJ110*	<i>ok234</i>	"
NM467	<i>wt</i>	<i>snb-1(md247)V</i> [Synaptobrevin-1]
BJ100*	<i>ok234</i>	"
EG1055	<i>wt</i>	<i>unc-64(e246)III</i> [Syntaxin-1]
BJ98*	<i>ok234</i>	"
DA596	<i>wt</i>	<i>snt-1(ad596)II</i> [Synaptotagmin-1]
BJ93*	<i>ok234</i>	"
BJ122*	<i>ok234</i>	"
MT6977	<i>wt</i>	<i>snt-1(n2665)II</i> [Synaptotagmin-1]
BJ119*	<i>ok234</i>	"
BJ123	<i>ok234</i>	"
NM204	<i>wt</i>	<i>snt-1(md290)II</i> [Synaptotagmin-1]
BJ118*	<i>ok234</i>	"
BJ124	<i>ok234</i>	"
DH1230	<i>wt</i>	<i>rme-3(b1025ts)</i> [Clathrin-schwere Kette]
BJ99*	<i>ok234</i>	"
EG2710	<i>wt</i>	<i>unc-57(ok310)I</i> [Endophilin A]
BJ101*	<i>ok234</i>	"
BJ125	<i>ok234</i>	"
CB406	<i>wt</i>	<i>unc-57(e406)I</i> [Endophilin A]
BJ115*	<i>ok234</i>	"
BJ126	<i>ok234</i>	"
DR2	<i>wt</i>	<i>unc-26(m2)IV</i> [Synaptojanin]
BJ99*	<i>ok234</i>	"
BJ127	<i>ok234</i>	"
CX51	<i>wt</i>	<i>dyn-1(ky51ts)X</i> [Dynamamin-1]
BJ117*	<i>ok234</i>	"

Die römische Ziffer in Klammern bezeichnet das Chromosom, auf dem das Gen liegt. Die Doppelmutanten resultierten aus Verpaarungen mit entweder EG3008 *sng-1(ok234)*, *oxls12 [lin15(+), Punc-47:gfp]* oder BJ14 *sng-1(ok234)*.

\* Diese Stämme enthalten auch *oxls12 [lin15(+), Punc-47:gfp]*

\*\* Unc- (*Unc, uncoordinated*)

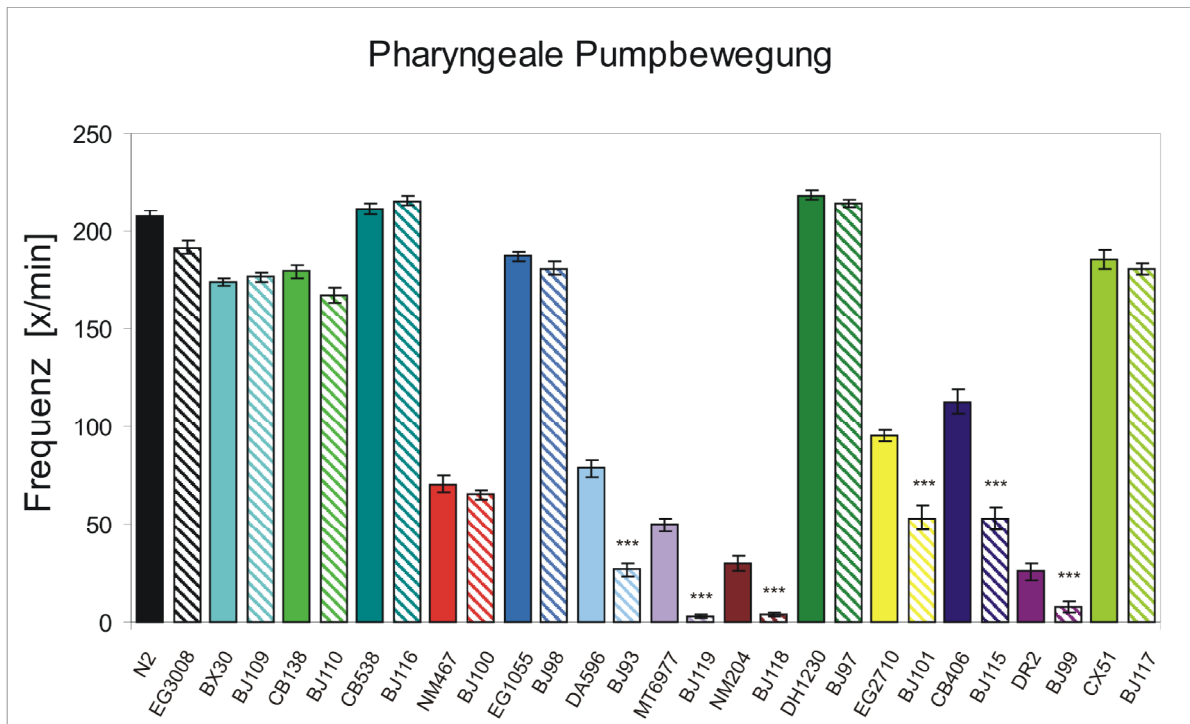
### 5.3.2.1 Keine synthetische genetische Interaktion von *sng-1* mit *fat-3*, *unc-1*, *unc-24*, *snb-1*, *unc-64*, *rem-3* oder *dyn-1*

Die Doppelmutanten von *sng-1(ok234)* mit *fat-37(wa22)*, *unc-1(e538)*, *unc-24(e138)*, *snb-1(md247)*, *unc-64(e246)*, *rem-3(b1025ts)* oder *dyn-1(ky51ts)* sind unter den getesteten Bedingungen lebensfähig. Die Doppelmutanten besitzen einen unkoordinierten Phänotyp, weisen aber bei normalen Kulturbedingungen ein ähnliches Wachstumsverhalten auf wie die entsprechenden Einfachmutanten. Es wurden auch keine signifikanten Unterschiede der rhythmischen Pharynxmuskulaturkontraktionen zwischen den Doppel- und den entsprechenden Einfachmutanten festgestellt (Abb. 5.13).

### 5.3.2.2 Synthetische genetische Interaktion von *sng-1* mit *snt-1*, *unc-57* und *unc-26*

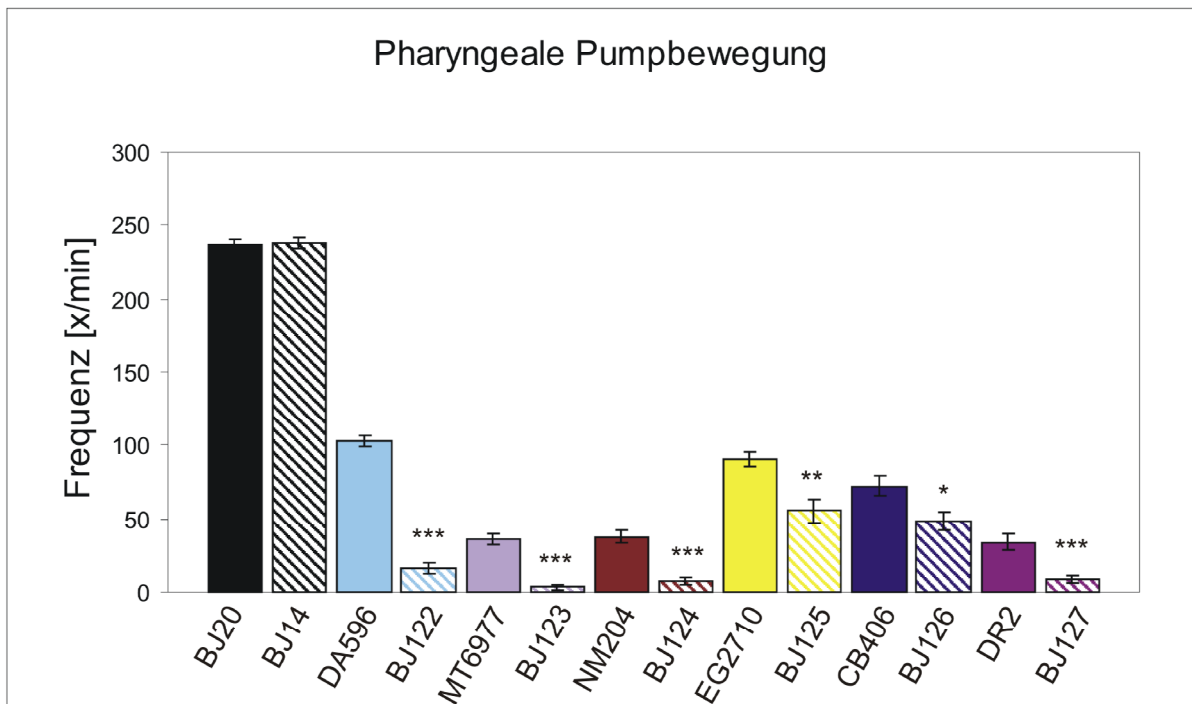
Der synthetische Wachstumsdefekt konnte zwischen Synaptogyrin-1 und Synaptotagmin-1, Endophilin A- oder Synaptojanin-Mutanten weitergehend bestätigt werden, da die Pumpfrequenz des Pharynx von den Doppelmutanten BJ93 *sng-1(ok234); snt-1(ad596)*, BJ119 *sng-1(ok234); snt-1(n2665)*, BJ118 *sng-1(ok234); snt-1(m290)*, BJ101 *sng-1(ok234); unc-57(ok310)*, BJ115 *sng-1(ok234); unc-57(e406)* und BJ99 *sng-1(ok234); unc-26(m2)* deutlich geringer war als im WT und in den Einfachmutanten DA596 *snt-1(ad596)*, MT6977 *snt-1(n2665)*, NM204 *snt-1(md290)*, EG2710 *unc-57(ok310)*, CB406 *unc-57(e406)* und DR2 *unc-26(m2)* (Abb. 5.13). Die Doppelmutanten waren lebensfähig, allerdings zeigten sie gegenüber den entsprechenden Einfachmutanten signifikant verschlechterte Entwicklungsraten, verlangsamtes Wachstum und eine verringerte Brutgröße (Abb. 5.15). Diese synthetische Beziehung konnte in den Kombinationen vom *sng-1(ok234)*-Allel mit allen drei *snt-1*-mutierten-Allelen bzw. den beiden *unc-57*-Allelen bestätigt werden. Für Synaptojanin wurde nur ein Allel *unc-26(m2)* mit EG3008 verpaart.

Ähnliche Phänotypen wurden auch bei den Doppelmutanten ohne das *Punc-47:gfp* Indikatorgen beobachtet (Abb. 5.14 und 5.15). In allen sechs Synaptogyrin-1/Synaptotagmin-1-Doppelmutanten (BJ93/BJ122, BJ119/BJ123 und BJ118/BJ124) und den beiden Synaptogyrin-1/Synaptojanin-Doppelmutanten BJ99 und BJ127 wurde eine fast vollständige Bewegungslosigkeit des Pharynx mit langen Phasen kompletter Inaktivität beobachtet. Zusammen mit den oben erwähnten Ergebnissen machen diese Daten deutlich, dass der neuronale *unc*-Phänotyp von Synaptotagmin-1-, Endophilin A- oder Synaptojanin-Mutanten durch die zusätzliche Deletion von Synaptogyrin-1 deutlich verstärkt wird.



**Abb. 5.13 Synthetische genetische Interaktionen zwischen *sng-1(ok234)*- und Synaptotagmin-1-, Endophilin A- und Synaptojanin-Genen.**

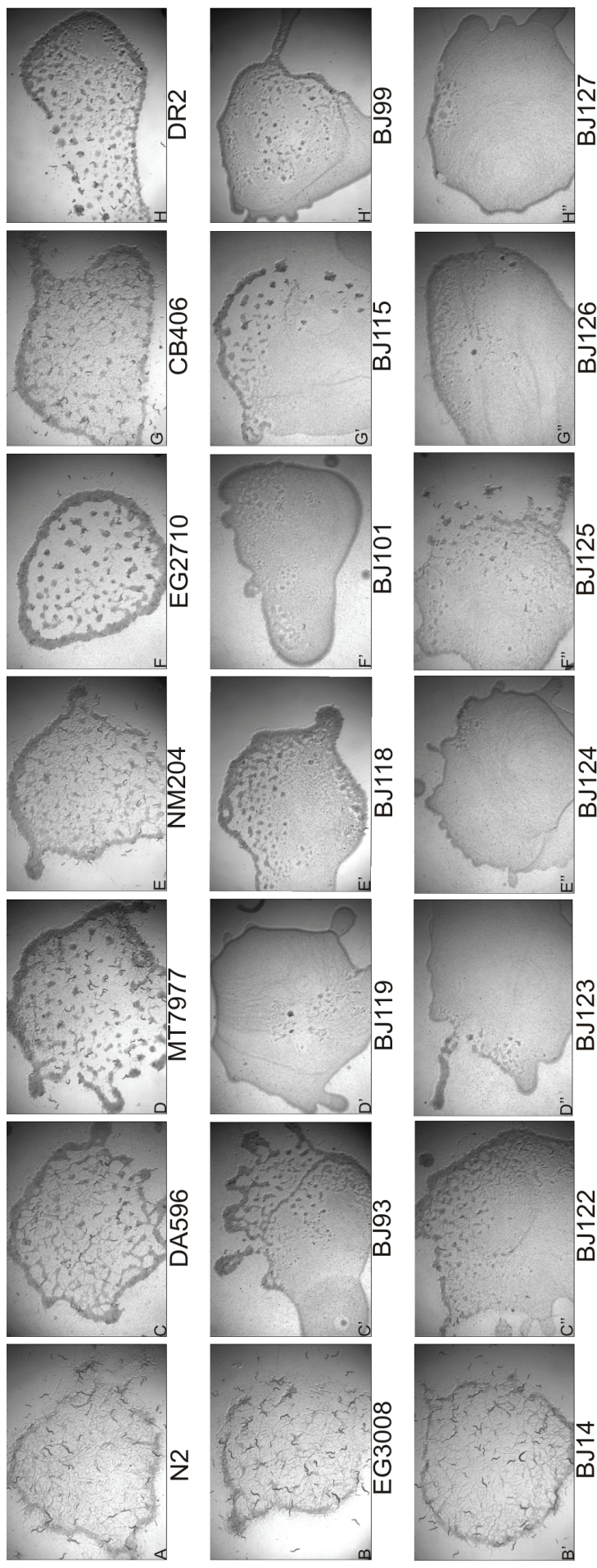
Die Abbildung zeigt die pharyngeale Pumpbewegung in WT (N2), EG3008 *sng-1(ok234)*, *oxls12 [lin15(+), Punc-47:gfp]* und in durch Verpaarung mit EG3008 generierten Doppelmutanten. Die *sng-1*-Einfachmutante (EG3008) weist ähnlich häufige pharyngeale Pumpbewegungen wie das WT-Tier (N2) auf. Signifikant niedrigere Pump-Frequenz gegenüber den entsprechenden Einfachmutanten weisen die Doppelmutanten BJ93 *sng-1(ok234); snt-1(ad596)*, BJ119 *sng-1(ok234); snt-1(n2665)*, BJ118 *sng-1(ok234); snt-1(md290)*, BJ101 *sng-1(ok234); unc-57(ok301)*, BJ115 *sng-1(ok234); unc-57(e-406)* und BJ99 *sng-1(ok234); unc-26(m2)* auf. Es konnte kein signifikanter Unterschied in den Doppelmutanten von *sng-1* kombiniert mit *fat-37(wa22)*, *unc-1(e538)*, *unc-24(e138)*, *snb-1(md247)*, *unc-64(e246)*, *rem-3(b1025ts)* oder *dyn-1(ky51ts)* festgestellt werden. Mittelwerte aus jeweils 20 individuellen Messungen für jeden Stamm sind im Balkendiagramm mit den jeweiligen Standardabweichungen dargestellt. Signifikante Unterschiede der pharyngealen Pumpbewegungen gegenüber der entsprechenden Einfachmutante wurden mit Hilfe des Student' t-Tests bestimmt (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ ) [WT-Tiere (schwarzer Balken), EG3008 (schwarz schraffierter Balken), Einfachmutante (einfarbige Balken), Zweifachmutante (schraffierte Balken)].



**Abb. 5.14 Pharyngeale Pumpbewegung in WT, BJ14 und durch Verpaarung mit BJ14 generierten Doppelmутanten.**

Die *sng-1*-Einfachmutante (BJ14) hat eine ähnliche Häufigkeit der pharyngealen Pumpbewegungen wie die WT-Tiere (BJ20). Die Doppelmутanten BJ122 *sng-1(ok234); snt-1(ad596)*, BJ123 *sng-1(ok234); snt-1(n2665)*, BJ124 *sng-1(ok234); snt-1(md290)*, BJ125 *sng-1(ok234); unc-57(ok301)*, BJ126 *sng-1(ok234); unc-57(e-406)* und BJ127 *sng-1(ok234); unc-26(m2)* zeigen im Vergleich zum WT (BJ20) und den entsprechenden Einfachmutanten eine stark erniedrigte pharyngeale Pumpbewegung auf (vgl. Abb. 5.13). Mittelwerte aus den jeweils 20 individuellen Messungen für jeden Stamm sind im Balkendiagramm mit den jeweiligen Standardabweichungen dargestellt. Unterschiede der pharyngealen Pumpbewegung gegenüber der entsprechenden Einfachmutante wurden mit Hilfe des Student' t-Tests bestimmt (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ ) [WT-Tiere (schwarzer Balken), BJ14 (schwarz-schraffierter Balken), Einfachmutante (einfarbiger Balken), Zweifachmutante (schraffierter Balken)].

## 5. Ergebnisse



**Abb. 5.15 Synthetische genetische Interaktionen zwischen *sng-1(ok234)* und Synaptotagmin-1-, Endophilin A -und Synaptojanin-Genen.**

Wurmplattens wurden mit gleicher Menge (15 µl) flüssiger Bakterienkultur (HB101) beimpft und über Nacht bei 37°C inkubiert. Für jeden Stamm wurde nur eine L4 auf die vorbereitete Platte gepickt. Das Wachstum der Doppelmutanten wurde im Vergleich zu den entsprechenden Einzelmutanten über 4 Tage bei 20°C verfolgt. Ganz links sind WT (A, N2) und Synaptogyrin-1-Einfachmutanten (B, EG3008 und B', BJ14) gezeigt; sie wuchsen fast gleich schnell. Es wurde kein Unterschied der Mutanten zum WT festgestellt. Die Doppelmutanten BJ93, BJ122 *sng-1(ok234); snt-1(ad596)*, BJ119, BJ123 *sng-1(ok234); snt-1(n2665)*, BJ118, BJ124 *sng-1(ok234); snt-1(ok234); unc-57(ok301)*, BJ115, BJ126 *sng-1(ok234); unc-57(e-406)*, BJ99, BJ127 *sng-1(ok234); unc-26(m2)* waren lebensfähig, aber ihre Entwicklungsraten waren signifikant verschlechtert: die Zweifachmutanten wuchsen stärker eingeschränkt, legten weniger Eier ab und hatten ein schlechteres Bewegungsverhalten verglichen mit den Einfachmutanten. Nach 4 Tagen konnten nur lokal "verklumpte" Wurmsammlungen (BJ119, BJ123, BJ124, BJ101 und BJ127) gesehen werden. Es wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den Doppelmutanten mit oder ohne *oxIs12[lin15(+), Punc-47:gfp]* beobachtet.

## 6. Diskussion

Die TVPs (*tetraspan vesicle membrane proteins*) bilden einen Hauptbestandteil synaptischer Vesikelproteine und kommen praktisch in allen Schritten des Vesikelzyklus vor. Mitglieder der TVPs zeigen, angefangen von dem Fadenwurm *C. elegans* bis hin zu Säugetieren, eine erstaunliche Konservierung. Worauf die für die Exo- und Endozytose sowie den Vesikelzyklus essenzielle Natur der TVPs beruht, bleibt jedoch weiterhin unklar (Hübner et al., 2002; Abraham et al., 2006). Die vorliegende Arbeit beschreibt die Analyse der TVP-Mutanten in der Maus und *C. elegans*. Dazu wurden Untersuchungen des Transkriptom der Sph-1-*Knockout*-Mäuse und von TVP-Dreifachmutanten des Wurms mittels Affymetrix-*GeneChips*<sup>®</sup> sowie durch die Funktionsstudien der Synaptogyrin-1-Mutanten durchgeführt.

### 6.1 Transkriptom-Analysen von TVP-Mutanten der Maus und *C. elegans*

Ein Hauptziel der vorliegenden Doktorarbeit war die Analyse der differentiellen Genexpression von WT-Tieren und TVP-Mutanten in der Maus und *C. elegans*. Differentielle Genexpression, d.h. die Synthese von unterschiedlichen mRNAs, ist die Hauptursache der Zelldiversität. Die Transkription der DNA in RNA und die anschließende Translation der *Messenger*-RNA (mRNA) in Proteine sind die grundlegenden Mechanismen, durch die Zellen ihr Wachstum, ihre Funktionen und ihren Metabolismus steuern. Mit Affymetrix-*GeneChips*<sup>®</sup> lassen sich diese Unterschiede der Gen-abhängigen RNA-Synthese qualitativ und quantitativ in ihrer Gesamtheit, also für das Transkriptom, bestimmen. Eine Veränderung in der Expression bestimmter Gene in TVP-defizienten Mäusen oder *C. elegans* könnte daher Hinweise auf Kompensations-Mechanismen geben, die phänotypische und klinische Defekte verhindern. Die vollständige Sequenzierung der Genome von Maus und *C. elegans* (*The C. elegans-Sequencing Consortium, 1998; Mouse-Genome-Sequencing Consortium, 2002*) hat dazu geführt, dass Microchip-Arrays kommerziell verfügbar sind, mit denen das vollständige Transkriptom erforscht werden kann.

Die Genexpressionsanalysen wurden zunächst mit der gesamten Retina-RNA jeweils aus jungen adulten Sph-1<sup>-/-</sup>-Mäusen und ihren Geschwistern (WT) sowie bei *C. elegans* aus jungen adulten TVP-Dreifachmutanten und WT-Würmern durchgeführt. Die Ergebnisse der Affymetrix-*GeneChip*<sup>®</sup>-Experimente können von äußeren Faktoren wie beispielsweise RNA-Qualität, unspezifischen Oligonukleotiden oder Fehlhybridisierungen beeinflusst werden (Drobyshev et al., 2003). Die Vergleichbarkeit der einzelnen *GeneChips*<sup>®</sup> wurde durch die

globale Normalisierung der Expressionsdaten gewährleistet, so dass die durchschnittliche Signalintensität aller Chips auf ein Niveau angeglichen wurde. Die Expression der meisten Transkripte des tierischen Genoms ist gewebespezifisch (Song et al., 2005). Eine Ausnahme sind die „*Housekeeping-Gene*“, die im normalen Fall gleichmäßig in allen Geweben und Zellen exprimiert sein sollten und deshalb zur Normalisierung der quantitativen *Real-Time* RT-PCR verwendet werden (Bustin et al., 2005).

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde diese Validierungsmethode für die Beurteilung der Zuverlässigkeit der Microarray-Ergebnisse unter Verwendung des internen Kontrollgens GAPDH eingesetzt. Daneben wurde die differenzielle Expression einzelner Gene untersucht. Aufgrund der Präzision und Genauigkeit der verwendeten *GeneChips*<sup>®</sup> wird ein zweifacher Genexpressionsunterschied von der Firma Affymetrix als signifikant (P-Wert < 0,05) angesehen und ist auch in Anwendungsstudien so beschrieben worden (Armstrong et al., 2002; Barz et al., 2003). Der große Vorteil der Microchip-Analyse liegt darin, tausende Ergebnisse in einem einzigen Experiment zu erhalten, da die verwendeten *GeneChips*<sup>®</sup> die Möglichkeit der gleichzeitigen Quantifizierung von mehr als 34.000 bekannten Mausgenen bzw. mehr als 22.500 *C. elegans* Transkripten in einer RNA-Probe erlauben (www.affymetrix.com).

### 6.1.1 Microarray-Experimente und Validierungsversuche der *Sph-1-Knockout-Maus*

Die *Sph-1*<sup>-/-</sup>-Mäuse erwiesen sich als äußerlich unauffällig und ihre Entwicklung war normal (Eshkind & Leube, 1995; McMahon et al., 1996). Es stellte sich die Frage, ob kompensatorische Mechanismen, z.B. aufgrund der Redundanz verwandter Proteine oder anderer, unentdeckter Proteine, die durch den *Knockout* des *Sph-1*-Gens verursachten Funktionsstörungen erfolgreich verhindern (Eshkind & Leube, 1995; McMahon et al., 1996; Spiwox-Becker et al., 2001). Sowohl Eshkind & Leube als auch McMahon und seine Kollegen beobachteten jedoch in immunologischen Nachweisverfahren im Nervensystem von *Sph-1*-defizienten Mäusen keine verstärkte Expression von wichtigen synaptischen Proteinen wie Synaptotagmin, Synaptogyrin, SNAP-25, Synapsin I, II, Rab3A und Rabphilin. Sogar für Synaptoporin (Synaptophysin-2), das ebenso wie *Sph-1* im Gehirn vorkommt, ließ sich keine kompensatorischen Änderungen in *Sph-1*<sup>-/-</sup>-Mäusen erkennen. Es wurde lediglich eine leicht verminderte Proteinmenge von Synaptobrevin-2 beobachtet (McMahon et al., 1996).

Zur umfassenden Beantwortung derselben Frage wurden in dieser Arbeit die *GeneChip*<sup>®</sup>-Experimente von *Sph-1*<sup>-/-</sup>- und WT-Mäusen durchgeführt. Zur Reduktion der Proben-Variabilität wurden die gleichen, sechs Wochen alten Tiere verwendet, da zu diesem

Entwicklungszeitpunkt neuronale Strukturen vollständig ausgereift sind und degenerative Veränderungen noch nicht eingesetzt haben. Bei der Retina handelt es sich um ein ausgesprochen homogenes Gewebe, das extrem reich an Nerven-Zellkörpern ist. Außerdem sind Kompensationsmechanismen in den Photorezeptoren maximal induziert, da hier in Abwesenheit von Synaptoporin (Synaptophysin-2), deutliche Defekte beobachtet wurden (Spiwox-Becker et al., 2001). Aufgrund der verschiedenen, alternativen Interaktionspartner von Sph-1 (Thomas & Betz, 1990; Prekeris & Terrian, 1997; Daly & Ziff, 2002; Horikawa et al., 2002), seiner Integration in das komplizierte Funktionsnetz des synaptischen Vesikelzyklus und der prominenten morphologischen Veränderungen der Photorezeptoren von Sph-1<sup>-/-</sup>-Mäusen wurden deutliche Veränderungen der Transkription von multiplen Genen erwartet.

Erstaunlicherweise konnte aber durch vergleichende *GeneChip*<sup>®</sup>-Analyse der RNAs aus Maus-Retina gezeigt werden, dass bei den Sph-1<sup>-/-</sup>-Mäusen nur zwei Gene (BG067686 und BG230349) signifikant im Vergleich zu den WT-Mäusen herunterreguliert waren. Da beide Gene kein langes offenes Leseraster enthalten, und für die beiden ESTs keine Referenzdaten vorliegen, bieten sie an sich keine Erklärung für Kompensationsmechanismen. Mittels der Validierungsmethode konnte darüber hinaus die Expressionsänderung der zwei Gene nicht bestätigt werden.

In Sph-1<sup>-/-</sup>-Mäusen wurde überraschenderweise immer noch eine sehr geringe Expression des Sph-1-Gens mit RT-PCR nachgewiesen. Dies unterstützt die Ergebnisse der Microarray-Analyse, die zeigten, dass das mutierte Sph-1-Transkript in der Sph-1-defizienten Maus stark herunterreguliert, aber noch vorhanden ist. Das Fehlen eines Sph-1-Proteins in Sph-1<sup>-/-</sup>-Mäusen konnte durch *Western-Blot*-Untersuchungen auf Proteinebene gezeigt werden (Eshkind & Leube, 1995).

Da kein Gen in den Sph-1<sup>-/-</sup>-Mäusen fundamental unterschiedlich reguliert wird, kann man vermuten, dass entweder alle Kompensationsmechanismen posttranskriptioneller Natur sind und/oder, dass die endogene Redundanz sicherstellt, dass Sph-1 entbehrlich ist. Posttranskriptionale Modifikationen und/oder veränderte Proteinstabilität könnten die erste Alternative erklären. Die Untersuchung von Daly & Ziff (1997) zeigte auf, dass posttranskriptionelle Mechanismen eine wichtige Rolle für die Synthese von Sph-1 spielen könnten. Die Forscher stellten dar, dass eine Zunahme von Sph-1 in embryonalen hippocampalen Neuronen nicht von der mRNA-Menge, sondern vom Anstieg der translationellen Initiationsrate abhängig ist. Weiterhin könnten Kompensationsmechanismen auf posttranskriptionellen Modifikationen wie RNA-Spleißen oder Veränderungen auf der

Proteinebene beruhen, die durch *Affymetrix-Mouse-Genome-430-2.0-Arrays* nicht erfasst werden. Die beobachtete geringfügige Abnahme an Synaptobrevin-2 in Sph-1<sup>-/-</sup>-Mäusen ist bis jetzt das einzige dokumentierte Beispiel der geänderten Synthese eines nachgewiesenen Sph-1 Interaktionspartners (McMahon et al., 1996).

Wir bevorzugen folglich die zweite Alternative, besonders angesichts der vorliegenden Beweise für alternative Wege der synaptischen Vesikelrezyklierung (Rizzoli & Betz, 2005; Südhof, 2004), die auf Grund ihrer Redundanz auch alleine ausreichen, um die grundlegende Maschinerie der Vesikel-vermittelten Informationsübertragung aufrecht zu erhalten. Wenn z.B. mehrere Proteine dieselbe Funktion wie Sph-1 in der Maus haben, wie würde sich dann das Fehlen des Sph-1-Proteins mit dieser Funktion auswirken? Wäre das Synaptophysin-1 funktionslos? Dagegen spricht das ubiquitäre Vorkommen von Sph-1 in neuronalen und auch in neuroendokrinen Geweben (Wiedenmann & Frankem 1985; Leube et al., 1987; Leube, 1995). Die spezifische Lokalisierung in synaptischen Vesikeln lässt eine funktionelle Beteiligung an Prozessen der Exo- und/oder Endozytose vermuten. Einen zweiten Hinweis darauf fanden Janz und Mitarbeiter (1999): Der Verlust von Sph-1 oder Sng-1 allein bewirkt keine phänotypischen Veränderungen, in Sph-1/Sng-1-Doppel-*Knockout*-Mäusen sind aber deutliche Defekten der synaptischen Plastizität nachweisbar. Weiterhin wurden in der Vergangenheit wiederholt Daten präsentiert, die darauf hingewiesen, dass Sph-1 einen Fusionsporen-Komplexe ausbilden kann (Thomas et al., 1988; Arthur & Stowell, 2007). Ähnliche Funktionen werden auch den TVPs vom SCAMP-Typ zugesprochen (Liu et al., 2005; Liao et al., 2007). Dies deutet darauf hin, dass Sph-1 bei der Regulation des Exozytosewegs eine Rolle spielen könnte.

### **6.1.2 Microarray-Experimente und Validierungsversuche der *C. elegans* TVP-Dreifachmutante**

Die Untersuchung der Genexpression zeigte signifikante Expressionsunterschiede verschiedener Gene zwischen WT-Wurm und TVP-Dreifachmutante. Zur Reduktion der biologischen Variabilität wurden synchronisierte junge adulte Würmer für die Analysen verwendet. In diesem Stadium ist außerdem das Nervensystem vollständig ausgebildet. Um den Abbau von RNA so gering wie möglich zu halten, wurden die Würmer nach dem Waschen sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und anschließend die RNA isoliert. Mit Hilfe der Microarray-Analysen konnten 20 differenziell transkribierte *C. elegans* Gene, ein sehr kleiner Anteil von den auf den Arrays gespotteten 22.626 Probenansätzen, identifiziert

werden. In TVP-Dreifachmutanten waren diese im Vergleich zur Kontrolle entweder signifikant hoch- (17) oder herunterreguliert (3). Mit Hilfe der quantitativen *Real-Time* RT-PCR konnten die Ergebnisse für 12 der 17 Gene bestätigt werden. Die RNA des Gens (*F17C11.6*) konnte mit RT-PCR nicht amplifiziert werden, die anderen vier zeigten zwar eine Erhöhung, die jedoch nicht signifikant war. Berücksichtigt man nur die Gene, die in der Microchip-Analyse eine mindestens 2,7-fache Erhöhung aufwiesen, so konnte in 11 Fällen die Erhöhung bestätigt werden. In vielen Fällen stimmt auch die Quantifizierung der Expressionsunterschiede mit beiden Methoden überein (Tab. 5.4).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die mRNA-Expressionsmuster der TVP-Gene erstmals in *C. elegans* TVP-Mutanten untersucht. Überraschenderweise war die *sph-1*- und *scm-1*-RNA in der TVP-Dreifachmutante lediglich reduziert, aber immer noch deutlich nachweisbar. Durch RT-PCR konnte die Deletion der drei TVP-Gene zweifelsfrei nachgewiesen werden, da kein Transkript in den deletierten Bereichen zu detektieren war (Abb. 5.4). Es ist unwahrscheinlich, dass die mutierten Allele noch für intakte Proteine kodieren. Bemerkenswerterweise konnten in TVP-Einfach- und Doppelmantanten keine signifikanten Expressionsänderungen der remanenten TVP-Gene nachgewiesen werden (Tab. 5.8). Dies schließt somit einen kompensatorischen Mechanismus aus, der die Transkription der TVP-Gene betrifft und spricht gegen eine kompensatorische Austauschbarkeit verschiedener TVPs.

### 6.1.3 Analyse der differenziell exprimierten Gene in *C. elegans*

Die komparativen Transkriptomanalysen in der TVP-Dreifachmutante zeigen, dass sich die TVP-Dreifachmutante auf transkriptioneller Ebene deutlich vom Wildtyp tier unterscheidet. Die zwölf Gene, die mit einem Erhöhungswert von mindestens 2,0 bei einem Signifikanzniveau von  $P < 0,05$  identifiziert wurden, können möglicherweise Aufschluss über die Funktion der TVPs und ihre unterschiedlichen Wechselwirkungen geben. Acht Gene können vier Funktionsgruppen zugeordnet werden, die nachfolgend näher beschrieben werden.

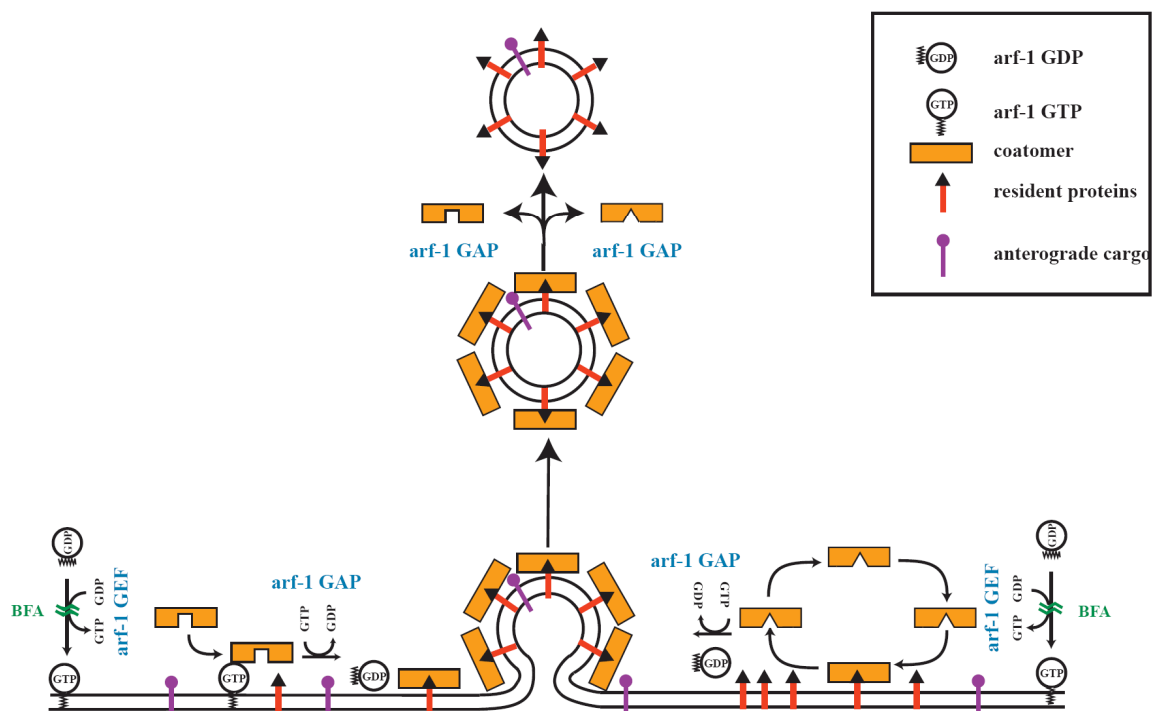
#### ***Arf-1.1*-Gen**

*Arf-1.1* (ADP-Ribosylierungsfaktor-1.1) weist in der TVP-Dreifachmutante mit dem Faktor 5 die höchste Transkriptionserhöhung auf. Da Arfs mit Vesikeltransportprozessen im Zusammenhang stehen, sind sie für TVPs von großem Interesse, da diese an Exozytosevorgängen (z.B. Alder et al, 1995; Becher et al., 1999) und Endozytoseprozessen

(z.B. Daly et al., 2000; Thiele et al., 2000) sowie an der Bildung zellulärer Transportvesikel (Balch et al., 2002; Chardin et al., 1996) beteiligt sind. Die ARF- und ARL (*Arf-like*)-Proteine, gehören zur Superfamilie von kleinen GTPasen (Takai et al., 2001). Sie sind sowohl untereinander als auch zwischen verschiedenen Spezies hoch konserviert und gelten als Modulatoren des endosomalen Vesikelzyklus und der Aktinassemblierung (Takai et al., 2001; Moss & Vaughan, 1995; Kahn et al., 2005; Lundquist, 2005).

ARF-Proteine wechseln zwischen einer aktiven GTP-gebundenen und einer inaktiven GDP-gebundenen Form und dienen als molekulare Schalter bei der Signaltransduktion an der Zellmembran (Lanoix et al., 1999). Die Bindung von ARF-1 mit GAP (*GTPase-activating protein*) ist ein essenzieller Schritt für die Bildung des COP-I-Mantels und spielt eine wichtige Rolle bei der Inkorporierung der v-SNAREs in COP-I-Vesikel. In Zellen mit rekombinantem ARF-1 war die Knospung sekretorischer Vesikel um das Zweifache erhöht (Lanoix et al., 1999; Rein et al., 2002). Cao und seine Mitarbeiter (2005) fanden heraus, dass aktiviertes ARF-1 den Aktin- und Dynamin-2-abhängigen Transportweg reguliert. Es ist anzunehmen, dass ARF-6 mit Clathrin interagiert und die Clathrin-abhängige Endozytose reguliert (Tanabe et al., 2005). COP-I-Vesikel werden für den Transport zwischen ER und dem cis-Golgi-Apparat sowie dem Transport innerhalb der Golgi-Zisternen eingesetzt (Orci et al., 1997). Darüber hinaus hat ARF-1 regulatorische Funktion bei der Synthese von wichtigen Membranphospholipiden (De Matteis et al., 2002). Die genauen Mechanismen der biochemischen Regulation der ARFs in COP-I- und Clathrin-vermitteltem Vesikel-Transport sind noch nicht bekannt. Der momentan angenommene Regulationsprozess von ARF ist in Abb. 6.1 dargestellt. Bei der in der Abbildung links vorgeschlagenen Möglichkeit beginnt die Vesikelknospung parallel mit dem Austausch von gebundenem GDP gegen GTP an den ARF-1-Molekülen. Diese Hydrolyse führt zu einer Konformationsänderung im *Coatomer* und ermöglicht die Verbindung zwischen *Coatomer* und Residenzproteinen. In einem zweiten Modell wurde postuliert, dass die Bindung von *Coatomer* an die zytoplasmatische Domäne eines Residenzproteins die GTP-Hydrolyse durch ARF-1 führt und somit zum Abtrennen von *Coatomer* und Residenzprotein. Diese Hydrolyse der an ARF gebundenen GTP-Moleküle führt dann zur Depolymerisation der Hülle, wobei das *Coatomer* und ARF-GDP freigesetzt werden (Lanoix et al., 1999; Sonnichsen et al., 1996). In der Literatur wird beschrieben, dass eine Mutation im *arl-6*-Gen für das Bardet-Biedl Syndrom (BBS) verantwortlich ist. BBS ist eine seltene unheilbare multisystemische Entwicklungsstörung, die einige Kardinalsymptome wie z.B. Retinopathie, Nephropathien, Adipositas und Polydaktylie aufweist (Katsanis, 2004; Fan et al., 2004). Poteryev et al. (2005) konnten nachweisen, dass ARF-1 eine essenzielle

Rolle im endoplasmatischen Retikulum (ER) in *C. elegans* spielt, obwohl diese Funktion scheinbar ohne Bezug zu seiner Aufgabe im Vesikelverkehr ist. Eine embryonale Letalität wurde von Li et al. (2004) in *C. elegans* im RNAi-Experiment des *arf-1.2-Gens*, das ein Homolog zu dem in dieser Arbeit identifizierten *arf-1.1-Gens* ist, beschrieben. Für *arf-1.1* gibt es in *C. elegans* keine funktionellen Untersuchungen ([www.wormbase.org](http://www.wormbase.org)). Es ist jedoch anzunehmen, dass das ARF-1.1 Protein bei der Vesikelbildung von Bedeutung ist. Die beobachtete Überexpression in den TVP-Mutanten könnte man demnach als Kompensation für die fehlenden TVPs im Rahmen des Vesikelzyklus interpretieren. Inwieweit ARF-1.1 und TVPs miteinander interagieren oder ob beide unterschiedliche Wege des Vesikel-Trafficking medieren, ist jedoch unklar. Möglicherweise steht die beobachtete Erhöhung Clathrinummantelter Vesikel in TVP-Mutanten (Abraham et al., 2006) im Zusammenhang mit der stark erhöhten Expression des *arf-1.1-Gens* in TVP-Mutanten und weist somit auf eine Rolle von Synaptophysin-1 beim Endozytoseprozess hin (Daly et al., 2000; Daly & Ziff, 2002; Thiele et al., 2000). Außerdem ist die Interaktion von SCAMP-2 mit ARF-6 bemerkenswert, die im Rahmen der Exozytose beobachtet wurde (Liu et al., 2005; Liao et al., 2007).



**Abb. 6.1 Schematische Darstellung der Regulation der kleinen GTPase *arf-1*.**

*arf-1*-GEF: *arf-1* Guanine-Nucleotide-Exchange-Factor; GAP: GTPase-Activating Protein; BFA: Brefeldin A ([www.embl-heidelberg.de/ExternalInfo/nilsson/COPI/budding/budding.html](http://www.embl-heidelberg.de/ExternalInfo/nilsson/COPI/budding/budding.html)).

### **Cadmium-empfindliche Gene**

*Cdr-2*, *cdr-4* und *pgp-9* zeigten in den Microarray- und *Real-Time* RT-PCR-Analysen eine deutliche Expressionserhöhung in der TVP-Dreifachmutante. *cdr-2*- und *cdr-4*-mRNA-Transkripte sind in *C. elegans* nach Cadmium-Stimulation erhöht sind (Liao et al., 2002; Dong et al., 2005). Das *pgp-9*-Gen, das für ein ATP-bindendes Transmembranprotein der P-Glykoprotein-Familie kodiert (Zhao et al., 2004), ist ebenfalls durch Cadmium induzierbar (Cui et al., 2007). Die P-Glykoproteine gehören zur ABC-(*ATP-binding cassette*-) Transporter Superfamilie (Broeks et al., 1996). Diese ABC-Transporter Superfamilie wird gemeinsam mit dem *Multidrug-resistance protein* (MRP) der *Multidrug-resistance* (MDR) Familie zugeordnet (Sheps et al., 2004; Yabe et al., 2005).

Im Zusammenhang mit den Literaturdaten konnte daher vermutet werden, dass die drei in der TVP-Dreifachmutante hochregulierten Gene auf regulatorischer Ebene miteinander verknüpft sind, da sie alle mit einer Stressantwort auf Cadmium-Exposition in *C. elegans* in Verbindung gebracht werden können. Bei der Analyse der Cadmium-Empfindlichkeit konnte jedoch kein signifikanter Unterschied im Überlebensgrad der TVP-Dreifachmutante gegenüber dem WT nach direkter Cadmium-Exposition beobachtet werden. Selbst in TVP-Mutanten, die mit RNAi gegen die drei Gene behandelt wurden, konnte in der vorliegenden Arbeit keine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber Cadmium nachgewiesen werden. Ebenso zeigte die Vierfachmutante BJ34 *cdr-4(ok748)*; *ok234(sng-1)*; *hd30(scm-1)*; *ox278(sph-1)* keine phänotypischen Veränderungen. Es ist hierbei zu berücksichtigen, dass Cadmium nicht *per se* zur Expressionserhöhung der *cdr-2*-, *cdr-4*-, *pgp-9*-Gene führt, sondern vermutlich als allgemeiner Stressor die Expressionserhöhung verursacht. Interessanterweise wurde eine Überexpression von *cdr-4*- und *arf-1.1* nach Behandlung mit Tunicamycin für die sog. „*unfolded protein response*“ beschrieben (Urano et al., 2002). Es könnte also sein, dass die mutierten TVP-Gene *unfolded protein response* verursachen. Die mutierten Transkripte der TVP-Gene, die in Mutanten detektierbar waren, kodieren möglicherweise für falsche, instabile und/oder funktionell eingeschränkte Proteine, die im ER degradiert werden und diese Stressantwort bewirken.

### ***T16G1.4* und *T16G1.4***

In der TVP-Mutante waren *T16G1.4* und *T16G1.6* gegenüber dem WT erhöht exprimiert, die beide für kleine Kinase kodieren. Durch eine Computer-gestützte bioinformatische Analyse konnte eine *coiled-coil*-Domäne in den Genprodukten von *T16G1.4* und *T16G1.6* identifiziert

werden. Solche Domänen bestehen aus zwei oder mehr miteinander verwundenen  $\alpha$ -Helices, die sich am häufigsten mit Proteininteraktion in Verbindung bringen lassen (Gillingham & Munro, 2003; Su et al., 2006). Der *coiled-coil*-Struktur konnte bisher noch keine Funktion in *T16G1.6* und *T16G1.4* zugeordnet werden. Interessanterweise existieren solche *coiled-coil*-Domänen auch Synaptobrevin, das als Interaktionspartner von Synaptophysin eingehend charakterisiert wurde und dessen Eintritt in den ternären SNARE-Fusionskomplex durch Synaptophysin reguliert wird (Edelmann et al., 1995). Ob TVPs eine ähnliche Bedeutung für *T16G1.4* und *T16G1.6* haben, ist eine spannende Frage.

### ***Ugt-62* und *ugt-19***

Über die Microarray-Analyse und die Validierungsmethode wurden auch die beiden UDP-Glucuronosyltransferasen *ugt-62* und *ugt-19* identifiziert. Die UDP-Glucuronosyltransferasen sind arzneimittelabbauende Enzyme. Sie katalysieren z.B. die Glucuronidierung von Morphin und sind am intestinalen Phase-II-Metabolismus von Arzneistoffen beteiligt (Green & Tephly, 1998; Kong & Rushmore, 2002). Bisher sind einige im Darm und/oder Leber des Menschen exprimierte Isoformen identifiziert worden (Cheng et al., 1999; Innocenti et al., 2002). Die Funktion dieser UGT-Familie, besonders der in dieser Arbeit aufgedeckten beiden Gene *ugt-62* und *ugt-19* in *C. elegans*, ist bisher kaum untersucht.

Als eine Erklärung für die Überexpression von *ugt-62*- und *ugt-19*-Genen in TVP-Mutanten könnte das defekte Trafficking in Betracht kommen. Es gibt zumindestens Hinweise aus Studien dafür, dass die im Zytosol synthetisierte UDP-Glucuronsäure, das Substrat der Glucuronidierung, durch aktive Transportprozesse ins Lumen des endoplasmatischen Retikulums transportiert wird (Banhegyi et al., 1996; Fujiwara et al., 2007). In der Leber der Ratte konnte gezeigt werden, dass die Hinzufügung von UDP-Glucuronsäure zu mikrosomalen Vesikel eine gesteigerte Freisetzung von Lumeninhalt induziert (Banhegyi et al., 1996).

### **6.1.4 Expressionsstudien**

Untersuchungen der *cfp*-Expression unter der Kontrolle des Promoters von *arf-1.1*, *cdr-2*, *T16G1.6* und *ugt-62* (*Parf-1.1:cfp*, *Pcdr-2:cfp*, *PT16G1.6:cfp* und *Pugt-62:cfp*) haben gezeigt, dass diese ausschließlich in den Darmzellen von *C. elegans* exprimiert werden. Ähnliche intestinale Expression war bei SPH-1 und SCM-1 nachweisbar (Abraham et al., 2006). In der

vorliegenden Arbeit konnte eine partielle apikale Kolokalisierung von ARF-1.1 und SPH-1 sowie die Koexpression von CDR-2 mit SPH-1 und SCM-1 in Darmzellen unterhalb des *Terminal webs* nachgewiesen werden. Es ist nicht auszuschließen, dass eine Kolokalisierung von SCM-1 mit ARF-1.1 besteht, da keine ARF-1.1/SCM-1-Translationschimäre erfolgreich generiert werden konnte. Weiterhin hatte die Überexpression von ARF-1.1 und CDR-2 keinen Einfluss auf die intrazelluläre Lokalisation von SPH-1 und SCM-1.

Der Darm ist das lebenswichtige Organ von *C. elegans* (Bossinger et al., 2004). Der Endozytoseprozess ist aktiv ab dem 8E-Stadium (E: Darmvorläufer) in seinen Darmzellen, wenn die Übertragung des Dotters vom Rest des Embryos in das Darm-Primordium beginnt (Bossinger & Schierenberg, 1996; Yu et al., 2006). SPH-1 und SCM-1 sind im gleichen Zellkompartiment in *C. elegans* kolokalisiert, das spricht für die enge Verwandtschaft der zwei TVPs (Hübner et al., 2002; Abraham et al., 2006).

ARF-1.1 und CDR-2 sind in der Literatur bislang nicht beschrieben, es lagen keine Daten bezüglich der subzellulären Lokalisierung vor. Ob es für die Kolokalisierung mit SPH-1 und SCM-1 einen physiologischen Grund gibt, bedarf weiterführender Untersuchungen.

Zusammenfassend kann vermutet werden, dass die differenziell exprimierten Gene für TVP-Interaktionspartner kodieren und/oder in einem biologischen Zusammenhang mit der Deletion der TVP-Gene stehen. Alle Kandidatengene sind bislang nicht mit TVP-Genen assoziiert worden.

### **6.2 Funktionsanalyse der Synaptogyrin-1-Mutanten in *C. elegans***

*C. elegans* liefert ein einfaches und zugängliches Modell, um die Funktionen von Synapsen zu untersuchen (Jorgensen & Nonet, 1995). Die Analyse von *C. elegans* Mutanten zusammen mit Studien der neuronalen Konnektivität zeigt an, dass die Muskeln von *C. elegans* sowohl durch GABA- ( $\gamma$ -Aminobuttersäure) als auch Acetylcholin-Motorneuronen innerviert werden (Richmond & Jorgensen, 1999). Es konnte einerseits beobachtet werden, dass die Anzahl der Clathrin-ummantelten Vesikel in TVP-mutierten *C. elegans* (Abraham et al., 2006) im Vergleich mit WT-Tieren signifikant erhöht ist. Zum anderen zeigten die *sng-1*-mutierten *C. elegans* eine stark erhöhte Sensitivität gegenüber PTZ (Abraham & Leube, unveröffl. Daten). Daraus ergab sich die Hypothese, dass TVPs eine wichtige Rolle im Exo-/Endozytose-Zyklus oder der Übertragung von synaptischen Antworten haben könnte. Da mit Antikörper- und GFP-Fusionskonstrukten gezeigt werden konnte, dass *sng-1* in *C. elegans*

ausschließlich und größtenteils als einziges TVP neuronal exprimiert wird (Nonet, 1999; Abraham et al., 2006; Abraham, unveröffl.; Ruvinsky et al., 2007), wurden Synaptogyrin-1-Mutanten für die weiteren Funktionsanalysen gewählt.

### 6.2.1 Erhöhte Resistenz der Synaptogyrin-1-Mutante gegenüber Aldicarb

Durch den Acetylcholinesterase-Inhibitor Aldicarb kann die Aktivität der cholinergen Synapsen in *C. elegans* untersucht werden (Nguyen et al., 1995). Als ein Inhibitor hemmt Aldicarb das Enzym Acetylcholinesterase und verursacht eine Dauererregung der Muskeln. Unter Aldicarb-Resistenz versteht man eine verminderte Ausschüttung von Neurotransmittern in Gegenwart dieses Stoffes. Dieser Phänotyp konnte bereits in Untersuchung mit einer Vielzahl von Mutanten mit unkoordinierten Verhaltensmustern (*unc*-Mutanten), z.B. den *snb-1*, *snt-1*-Mutanten in *C. elegans*, beobachtet werden (Jorgensen et al., 1995; Nonet et al., 1998). In der vorliegenden Arbeit wurde in Gegenwart von geringen Aldicarb-Konzentrationen ( $\geq 0,2$  mM) eine erhöhte Aldicarb-Resistenz sowohl in den *sng-1(ok234)* Deletionsmutanten als auch in den SNG-1-überexprimierenden Würmern beobachtet (Abb. 5.10). Der Phänotyp der *sng-1(ok234)*-Mutante war geringer als in den *sng-1*-Überexpressionsmutanten, da dieser Effekt bei hoher Konzentration (1,0 mM) nicht nachweisbar war. Diese Ergebnisse stimmten mit den von Abraham et al. (2006) veröffentlichten Daten, in denen die TVP-Mutante keine Resistenz gegenüber Aldicarb im Vergleich mit WT hatte, nicht überein. Ein möglicher Grund für diesen Widerspruch könnte darin liegen, dass diese Autoren eine andere Methode (radialer Aldicarb-Test) verwendeten. In dieser Arbeit wurde eine noch spezifischere und empfindlichere Methode, der sog. Berührungs-Aldicarb-Test, zur Bestimmung der durch Aldicarb verursachten Paralyse verwendet.

Basierend auf den Ergebnissen ist davon auszugehen, dass sowohl die Deletion als auch die Überexpression von SNG-1 zu einer verminderten Acetylcholinausschüttung in den neuromuskulären Synapsen führt. Da SNG-1 als ein synaptisches Vesikelmembranprotein identifiziert wurde (Zhao & Nonet, 1999; Hübner et al., 2002; Abraham et al., 2006), weisen die Ergebnisse auf eine Rolle von SNG-1 bei der Neurotransmitterausschüttung der synaptischen Vesikel von *C. elegans* hin. Es ist zu vermuten, dass SNG-1 bei der Exozytose eine Funktion hat, da *Knockout* und Überexpression zu einer Verringerung der Exozytoserate führen. Eine inhibitorische Rolle von SPH-1 und SNG-1 wurde auch bei der Kalzium-abhängigen Exozytose in neuroendokrinen PC12-Zellen vermutet (Sugita et al., 1999). Das

wurde indirekt durch die Beobachtungen von Janz et al. (1999) unterstützt, die eine veränderte synaptische Plastizität in Synaptophysin-1/Synaptogyrin-1-*Knockout*-Mäusen beschrieben. Widersprüchlich dazu ist eine von Belford & Kandror (2003) veröffentlichte Arbeit, in der die Überexpression von Cellugyrin (Synaptogyrin-2) zu einer starken Zunahme des Targeting von Synaptophysin-1 in P12-Zellen führte.

Der Nachweis einer bei SNG-1-Mutanten entstandenen Aldicarb-Resistenz unterstützt auch die Hypothese, dass Synaptogyrin-1 an der Endozytose beteiligt sein könnte. Die reduzierte Acetylcholinfreigabe könnte in SNG-1-Mutanten durch Blockierung der Regeneration synaptischer Vesikel verursacht werden. Als eine indirekte Unterstützung gilt die Interaktion von Synaptophysin-1 mit AP1 (Adaptoproteinen) (Horikawa et al., 2002), obwohl durch elektronenmikroskopische und elektrophysiologische Untersuchungen keine veränderte Vesikelanzahl sowie Antworten der cholinergen Synapsen in der TVP-Dreifachmutante im Vergleich zum WT nachgewiesen wurden (Abraham et al., 2006; Abraham & Leube, unveröffl.). Zusammengefasst deuten diese Befunde darauf hin, dass SNG-1 im Rahmen der Vesikel-Exo-/Endozytose eine spezifische Rolle bei der Freisetzung von Acetylcholin hat.

### **6.2.2 Erhöhte Sensitivität der Synaptogyrin-1-Mutante gegenüber PTZ**

GABA dient sowohl als inhibitorischer als auch als exzitatorischer Neurotransmitter in *C. elegans* (McIntire et al., 1993). Mit PTZ (Pentylentetrazol), einem GABA-Antagonisten, ist die Induktion von Epilepsien oder Konvulsionen in Säugetieren leicht erreichbar (Rocha et al., 1996). Die PTZ-induzierte Verkrampfung wurde als Unbeweglichkeit der hinteren Hälfte des Tieres definiert, während die anterioren Muskelkontraktionen regelmäßig wiederholt auftraten. Dies konnte in Untersuchungen mit der SNB-1-Mutante in *C. elegans* nachgewiesen werden (Williams et al., 2004). Es wird allgemein angenommen, dass eine PTZ-Behandlung zu einer Inhibierung des GABA-Rezeptors und somit zu einer gestörten postsynaptischen Vermittlung des GABA-Signals führt (Locke et al., 2006). Diese epilepsieähnlichen Konvulsionen können durch unterschiedliche Faktoren verursacht werden, z.B. Neurotransmitterfreigabe, Rezeptorspiegel, Synapsen, Membranpotenzial oder neuronaler Differenzierung (Ross, 2002). Bei der SNB-1-Mutante handelt es sich um eine verminderte synaptische Transmission (Williams et al., 2004; Nonet et al., 1998). Doch die Mutation des *sng-1(ok234)*-Allels führte bereits in *C. elegans* zu einer signifikant erhöhten Empfindlichkeit gegenüber PTZ im Vergleich zu Wildtyptieren, und alle GABAergen Neurone waren in der *sng-1*-Mutante detektierbar (Abraham & Leube, nicht veröffl. Befunde).

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass es bei Mutanten mit einer SNG-1-Überexpression ebenfalls zur erhöhten Sensitivität gegenüber PTZ kommt. Jedoch konnte dieser PTZ-Phänotyp durch die zusätzliche Einwirkung von SNG-1 nicht verstärkt werden (Abb. 5.11). Sowohl die von Abraham & Leube bereits gewonnenen Ergebnisse als auch die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zeigen, dass *sng-1* in *C. elegans* bei der Übertragung von synaptischen Antworten eine Rolle spielt. In den SNG-1-Mutanten könnte die vesikuläre GABA-Freisetzung (exozytotisch), die Wiederbeladung von Vesikeln mit GABA (endozytotisch) oder die Vesikelbildung beeinträchtigt sein. Da SNG-1 als Vesikelmembranprotein identifiziert wurde (Zhao & Nonet, 1999; Hübner et al., 2002; Abraham et al., 2006), können postsynaptische Störungen ausgeschlossen werden.

Durch Deletion und Überexpression von SNG-1 in *C. elegans* werden sowohl cholinerge als auch GABAerge Synapsen beeinträchtigt. Das weist auf grundlegende neuronale Funktionen von SNG-1 in *C. elegans* hin. Dazu lässt sich folgende Hypothese formulieren:

In Säugetieren interagiert Synaptophysin-1 mit Synaptobrevin-2 (VAMP2) bei der Vesikelfusion (Edelmann et al., 1995; Washbourne et al., 1995; Pennuto et al., 2002) und mit Dynamin I (Daly et al., 2000; Daly & Ziff, 2002) bei der Vesikelabschnürung. Im Wildtyp sind Dynaminmoleküle vor allem für die Abschnürstelle (Ryan, 2006; McNiven et al., 2000) und VAMP2 für die Fusion der Vesikel verantwortlich (Deak et al., 2006; Lang, 2007). Fehlt Sph-1, kann nicht ausreichend Dynamin I und VAMP2 für Fusion bzw. Fission rekrutiert werden. Bei Überexpression kompetiert Sph-1 mit den Faktoren, die Fusion und Fission bewirken und verhindert ihre lokale Konzentrierung an den Abschnür-/Fusionsstellen.

SNG-1 wird in *C. elegans* neuronal exprimiert (Nonet, 1999; Abraham et al., 2006; Ruvinsky et al., 2007), wohingegen in Säugetieren Sph-1 die neuronale TVP-Form ist (Leube et al., 1987; Leube, 1994; Wiedenmann & Franke, 1985; Jahn et al., 1985). Es wird vermutet, dass SNG-1 in *C. elegans* die gleiche Aufgabe wie Sph-1 in Säugetieren erfüllt. Es wird deshalb angenommen, dass der oben geschilderte Vorgang bei *Knockout*- und überexprimierenden Tieren mit Sph-1 auf die Exo-/Endozytose bei *C. elegans*, bei der SNG-1 beteiligt ist, übertragen werden kann. Weitere Untersuchungen sind jedoch zur Bestätigung dieser Hypothese notwendig.

### 6.2.3 Synthetische Interaktion von *sng-1* mit *snt-1*, *unc-57* und *unc-26*

*C. elegans* ist hervorragend dazu geeignet, Reaktionswege auszuarbeiten (Jorgensen & Mango, 2002). Die Stärke des Systems liegt darin, dass der Zusammenhang von Faktoren innerhalb von Reaktionswegen direkt am lebenden Tier nachgewiesen werden kann und damit von Relevanz für den Gesamtorganismus ist (Byrne et al., 2007; Yook et al., 2001). Ausgehend von einem genetischen Screen war es möglich, aus den verfügbaren Gendelektionen solche zu identifizieren, die synthetisch mit der *sng-1(ok234)*-Mutante wirken. Eine Kombination von *sng-1(ok234)* mit Mutationen von Genen, die für am synaptischen Vesikelzyklus beteiligte Proteine kodieren, wurde im Fall von Synaptotagmin-1 (SNT-1), Endophilin A (UNC-57) und Synaptojanin (UNC-26) beobachtet.

Die SNG-1-Überexpression konnte den funktionellen Defekt der *snt-1*-, *unc-57*- und *unc-26*-Mutanten nicht retten (nicht gezeigte Daten). Die genetische Interaktion von *sng-1* mit *snt-1*, *unc-57* und *unc-26* lässt unterschiedliche Interpretationen zu. Die Basis für die synthetischen Interaktionen ist eine gemeinsame Funktion der Paare Synaptogyrin-1/Synaptotagmin-1, Synaptogyrin-1/Endophilin A und Synaptogyrin-1/Synaptojanin im synaptischen Vesikelzyklus. Dies könnte ein direkter oder indirekter Effekt sein, da z.B. bisher noch nicht identifizierte Faktoren am Vesikeltransport oder deren Regulation beteiligt sein könnten.

Aus der Annahme, dass einerseits alle drei neuronalen Proteine (Synaptotagmin-1, Endophilin A und Synaptojanin) am synaptischen Endozytoseweg in *C. elegans* beteiligt sind (Jorgensen et al., 1995; Harris et al., 2002, Chen et al., 2003; Harris et al., 2000) und andererseits eine erhöhte Anzahl der Clathrin-umhüllten Vesikel in TVP-mutierten Tieren gefunden wurde (Spiwox-Becker et al., 2001; Abraham et al., 2006), lässt sich ableiten, dass auch SNG-1 überwiegend in einem Endozytoseprozess, aber wahrscheinlich Clathrin-unabhängig assoziiert ist. Die Ergebnisse von Daly et al. (2000) und Spiwox-Becker et al. (2001) bestätigen indirekt unsere Hypothese, dass auch Synaptophysin-1 möglicherweise an einem Clathrin-unabhängigen schnellen Endozytoseweg beteiligt ist.

Genetische Studien an *Drosophila melanogaster* und *C. elegans* bewiesen, dass Synaptojanin und Endophilin funktionelle Partner beim Clathrin-abhängigen Weg sind: sie binden miteinander in synaptischen Vesikeln und spielen mit Dynamin zusammen essenzielle Rollen im Endozytoseprozess (Vesikelabschnürung und -ablösung) (Verstreken et al., 2003; Schuske et al., 2003; Harris et al., 2002). Dementsprechend zeigen Endophilin A- und Synaptojanin-Doppelmutanten den gleichen elektrophysiologischen Phänotyp wie Einfachmutanten (Schuske et al., 2003). Endophilin A und Synaptojanin spielen danach eine Rolle im selben Signalweg. Auch Synaptotagmin-1, das an das Adaptorprotein AP2 bindet und damit die

Bildung des Clathrin-Komplexes erst ermöglicht, spielt eine Rolle im Clathrin-abhängigen Weg (Nicholson-Tomishima & Ruan, 2004; Zhang, 2004).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lassen vermuten, dass auch SNG-1 an der Vesikel-Rezyklierung im Clathrin-abhängigen Weg unabhängig von Synaptojanin, Endophilin A und Synaptotagmin-1 eine Rolle spielt. Es wird daher vermutet, dass der besprochene Exo-/Endozytoseprozess in *C. elegans* durch mehrere Signalwege (z.B. „*kiss and run*“) initiiert werden kann. Bei allen drei Varianten (Synaptojanin-, Endophilin A- und Synaptotagmin-1-*Knockout*-Würmern) wurden phänotypische stark unkoordinierte Bewegungen und eine stark reduzierte Vesikelanzahl gefunden, die Mutanten waren aber eingeschränkt lebensfähig (Jorgensen et al., 1995; Schuske et al., 2003).

Außerdem kann eine Beteiligung von SNG-1 an dem Exozytoseweg nicht ausgeschlossen werden. Auch Synaptotagmin-1 ist an der Regulation der Exozytose beteiligt (Südhof, 2004; Yoshihara & Littleton, 2004), aber SNG-1 agiert nach den vorliegenden Ergebnissen wahrscheinlich unabhängig davon, genauso wie bei der Vesikelrezyklierung. Für andere Kombinationen von *sng-1* mit Genen, die für die exozytotischen SNARE-Proteine Synaptobrevin und Syntaxin kodieren (*snb-1* und *unc-64*), konnten keine synthetischen Effekte nachgewiesen werden.

SNG-1 steht also über seine genetischen Interaktionen sowohl mit endo- als auch exozytotischen Proteinen in Verbindung. Dieser noch unbekannt Kompartiment-spezifische Signalweg ist mit den Wegen von SNT-1, UNC-57 und UNC-26 verbunden bzw. läuft parallel dazu ab. In wie weit die identifizierten Deletionen diese Prozesse beeinflussen, erfordert weitergehender Untersuchungen. Um die Phänotypen der Doppelmутanten im Rahmen der Vesikelfreisetzung weiter zu überprüfen, wären elektrophysiologische Untersuchungen sinnvoll (Richmond & Jorgensen, 1999; Bamber et al., 2003).

### 6.3 Schlussfolgerungen

In den zuerst durchgeführten *GeneChip*<sup>®</sup>-Analysen in *Sph-1*<sup>-/-</sup>-Mäusen wurde außer dem *Knockout*-Gen *sph-1* kein differenzielles Gen identifiziert. Die nachfolgenden komparativen Transkriptom-Analysen in den TVP-Dreifachmutanten zeigten experimentell signifikant erhöhte Transkriptmengen von zwölf Genen, die bisher noch nicht mit TVPs in Zusammenhang gebracht worden sind. Diese Kandidatengene liefern neue Ansätze für die Aufklärung der Kompensations-Mechanismen in den TVP-Dreifachmutanten. Die verstärkt exprimierten Gene sind nicht zwangsläufig mit den TVP-Genen verknüpft, könnten aber als

Hinweis auf Kompensations-Mechanismen gelten, die TVP-verursachte Defekte ausgleichen. Die oben beschriebenen hochregulierten Gene, besonders die beiden mit TVPs koexprimierten Gene *arf-1.1*- und *cdr-2*- könnten als TVP-Zielgene eine Rolle spielen. Die Implikation dieser Gene für die Funktionen von TVP-Genen könnte durch Assoziationsstudien weiter untermauert werden.

Die zwischen *sng-1* und *snt-1*, *unc-57* oder *unc-26* beobachtete genetische Beziehung kann auf die durch Aldicarb und PTZ verursachten Phänotypen zurückgeführt werden, weil anhand der vorgelegten Daten viel dafür spricht, dass SNG-1 höchstwahrscheinlich am Endozytoseweg beteiligt ist.

### 7. Zusammenfassung

*Tetraspan vesicle membrane proteins* (TVPs) sind konservierte, ubiquitär vorkommende Membranproteine synaptischer Vesikel und zytoplasmatischer Transportvesikel. Bei Säugetieren lassen sie sich in die Physine, Gyryne und SCAMPs (*secretory carrier-associated membrane proteins*) unterteilen, die im Nematoden *C. elegans* jeweils nur durch ein einzelnes Polypeptid vertreten sind (Synaptophysin-1 [SPH-1], Synaptogyryn-1 [SNG-1] und SCAMP-1 [SCM-1]). Obwohl den TVPs eine Beteiligung bei der Regulation des Vesikelzyklus zugesprochen wurde, sind Synaptophysin-1-*Knockout*-Mäuse und vollständig TVP-defiziente Würmer gesund und weisen nur geringgradige Veränderungen auf. In dieser Arbeit sollten daher zum einen genomweite komparative Transkriptomanalysen durchgeführt werden, um mögliche Kompensationsmechanismen in der Maus und *C. elegans* zu finden, zum anderen sollten mit Hilfe pharmakologischer Stressassays und genetischer Verfahren Schwachstellen und Redundanzen identifiziert werden.

Erstaunlicherweise konnten durch Affymetrix *GeneChip*-Analysen der RNA in der Retina von Synaptophysin-1<sup>-/-</sup>-Mäusen keine differenziell exprimierten Gene gefunden werden. Bei der Untersuchung der *C. elegans*-TVP-Dreifachmutante wurden hingegen 17 Gene mit erhöhter und 3 mit erniedrigter Transkription identifiziert. Die Befunde für 12 hochregulierte Gene wurden durch quantitative *Real-Time* RT-PCR bestätigt. Das am stärksten hochregulierte Gen *arf-1.1* kodiert für eine GTPase, die vermutlich an der Regulation der Vesikelbildung beteiligt ist. Von den ebenso identifizierten Genen *cdr-2*, *cdr-4* und *pgp-9* ist bekannt, dass sie in Stresssituationen, z. B. in Gegenwart von Cadmium, verstärkt transkribiert werden. *ugt-62* und *ugt-19* kodieren für Glucuronosyltransferasen. Für *arf-1.1*, *cdr-2*, *ugt-62* sowie für das Gen *T16G1.6*, das für eine *coiled-coil*-Domäne kodiert, wurden im Folgenden fluoreszierende Promoterkonstrukte hergestellt, um Koexpressionsmuster mit TVPs zu bestimmen. Es stellte sich heraus, dass alle vier Promoterkonstrukte im Darm zusammen mit SPH-1 und SCM-1 im Darm transkribiert werden. Mit fluoreszierenden Translationschimären konnte weiterhin gezeigt werden, dass ARF-1.1 und CDR-2 mit den Darm-spezifischen TVPs im apikalen Bereich der Darmzellen kolokalisieren.

Um mehr über die Funktion von TVPs im Vesikelzyklus zu erfahren, wurden pharmakologische und genetische Analysen von Würmern durchgeführt, in denen die Expression des Neuronen-spezifischen SNG-1 verändert ist. Deletion oder Überexpression führte zu einer Resistenz gegenüber dem Acetylcholinesterase-Inhibitor Aldicarb und zu erhöhter Empfindlichkeit gegenüber dem GABA-Rezeptor-Antagonisten Pentylentetrazol. Auf genetischer Ebene zeigte sich, dass *sng-1* synthetisch mit den Genen für Synaptotagmin-1, Endophilin A sowie Synaptojanin wirkt. Die beobachteten Effekte weisen auf alternative Funktionen in der synaptischen Übertragung hin und unterstützen zugleich die Hypothese, dass SNG-1 im synaptischen Vesikelzyklus eine wichtige Funktion erfüllt, die möglicherweise einem noch unbekanntem redundanten Kompartiment-spezifischen Signalweg der synaptischen Transmission zuzuordnen ist.

## 8. Literaturverzeichnis

Abraham C, Hutter H, Palfreyman MT, Spatkowski G, Weimer R, Windoffer, Jorgensen E, and Leube RE. (2006) Synaptic tetraspan vesicle membrane proteins are conserved but not needed for synaptogenesis and neuronal function in *C. elegans*. *PNAS*. **103**: 8227-8232

Alder J, Kanki H, Valtorta F, Greengard P, and Poo MM. (1995) Overexpression of synaptophysin enhances neurotransmitter secretion at *Xenopus* neuromuscular synapses. *J. Neurosci.* **15**:511-519

Altun ZF, & Hall DH. Handbook of *C. elegans* anatomy. In WormAtlas (2006)

Ambros V. (2000) Control of developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Curr. Opin Genet. Dev.* **10**:428-433

Anngono V, Robinson PJ. (2007) Syndapin I and endophilin I bind overlapping protein-rich regions of dynamin I: role in synaptic vesicle endocytosis. *J. Neurosci.* **102**:931-943

Armstrong SA, Staunton JE, Silverman LB, Pieters R, den Boer ML, Minden MD, Sallan SE, Lander ES, Golub TR, Korsmeyer SJ. (2002) MLL translocations specify a distinct gene expression profile that distinguishes a unique leukemia. *Nat. Genet.* **30**:41-47

Arthur CP, and Stowell MH. (2007) Structure of synaptophysin: A hexameric MARVEL domain channel protein. *Structure* **15**:707-714

Augustine GJ. (2001) How does calcium trigger neurotransmitter release? *Curr. Opin. Neurobiol.* **11**:320-326

Augustine GJ, Morgan JR, Villaba-Galea CA, Jin S, Prasad K, Lafer EM. (2006) Clathrin and synaptic endocytosis: studies at the squid giant synapse. *Biochem. Soc. Trans.* **34**:68-72

Balch WE, Kahn RA, Schwaninger R. (2002) ADP-ribosylation factor is required for vesicular trafficking between the endoplasmic reticulum and the cis-Golgi compartment. *J. Biol. Chem.* **267**:13053-13061

Bamber BA, Twyman RE, Jorgensen EM. (2003) Pharmacological characterization of the homomeric and heteromeric UNC-49 GABA receptors in *C. elegans*. *Br. J. Pharmacol.* **138**:883-893

Banhegyi G, Braun L, Marcolongo P, Csala M, Fulceri R, Mandel J, and Benedtti A. (1996) Evidence for an UDP-glucuronic acid/phenol glucuroide antipod in rat liver microsomal vesicles. *J. Biochem.* **315**:171-176

Barnekow A, Jahn R, and Scharlt M. (1990) Synaptophysin. A substrate for the protein tyrosine kinase pp60<sup>c-src</sup> in intact synaptic vesicles. *Oncogene* **5**:1019-1024

Barz T, Acermann K, Dubois G, Eils R, Pyerin W. (2003) Genom-wide expression screens indicate a global role for protein kinase CK2 in chromatin remodeling. *J. Cell Sci.* **116**:1563-1577

- Baumert M, Takei K, Hartinger J, Burger PM, Fischer von Mollard G, Maycox PR, De Camilli P, and Jahn R. (1990) P29: A novel tyrosine-phosphorylated membrane protein present in small clear vesicles of neurons and endocrine cells. *J. Cell Biol.* **110**:1285-1294
- Becher A, Drenckhahn A, Pahner I, Margittai M, Jahn R, Ahnert-Hilger G. (1999) The synaptophysin-synaptobrevin complex: a hallmark of synaptic vesicle maturation. *J. Neurosci.* **19**:1922-1931
- Becherer U, and Rettig J. (2006) Vesicle pools, docking, priming, and release. *Cell Tissue Res.* **326**:393-407
- Belfort GM, Bakirtzi K, Kandror KV. (2005) Cellugyrin induces biogenesis of synaptic-like microvesicles in PC12 cells. *J. Biol. Chem.* **280**:7262-7272
- Belfort GM, and Kandror KV. (2003) Cellugyrin and synaptogyrin facilitate targeting of synaptophysin to a ubiquitous synaptic vesicle-sized compartment in PC12 cells. *J. Biol. Chem.* **278**:47971-47978
- Belizaier R, Komanduri C, Wooten K, Chen M, Thaller C, and Janz R. (2004) Characterization of synaptogyrin 3 as new synaptic vesicle protein. *J. Compara. Neurol.* **470**:266-281
- Benfenati F, Greengard P, Brunner J, Bahler M. (1989) Electrostatic and hydrophobic interactions of synapsin I and synapsin I fragments with phospholipid bilayers. *J. Cell Biol.* **108**:1851-1862
- Berridge MJ. (1993) Inositol triphosphate and calcium signalling. *Nature* **361**: 315-325
- Bonanomi D, Benfenati F, Valtorta F. (2006) Protein sorting in the synaptic vesicle life cycle. *Neurobiology* **80**:177-217
- Bonanomi D, Rusconi C, Colombo CA, Benfenati F, Valtorta F. (2007) Synaptophysin1 selectively specifies the exocytic pathway of synaptobrevin 2/VAMP2. *J Biochem.* **404**:525-534
- Bossinger O, Fukushige T, Claeys M, Borgonie G, and McGhee JD. (2004) The apical disposition of the *Caenorhabditis elegans* intestinal terminal web is maintained by LET-413. *Dev. Biol.* **268**:448-456
- Bossinger O, and Schierenberg E. (1996) The use of fluorescent marker dyes for studying intercellular communication in nematode embryos. *Int. J. Dev. Biol.* **40**:431-439
- Brand SH, Laurie SM, Mixon MB, and Castle JD. (1991) Secretory carrier membrane proteins 31-35 define a common protein composition among secretory carrier membranes. *J. Biol. Chem.* **266**:18949-18957
- Brand SH, Castle JD. (1993) SCAMP 37, a new marker within the general cell surface recycling system. *EMBO J.* **12**:3753-3761
- Brenner S. (1973) The genetics of behaviour. *Br. Med. Bull* **29**:329-371

- Brenner S. (1974) The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* **77**:71-94
- Brock TJ, Browse J, Watt JL. (2007) Fatty acid desaturation and the regulation of adiposity in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* **176**:865-875
- Brokes A, Gerrad B, Allikmets R, Dean M and Plasterk R. (1996) Homologous of the human multidrug resistance genes MRP and MDR contribute to heavy metal resistance in the soil nematode *Caenorhabditis elegans*. *EMBO J.* **15**: 6132-6143
- Brooks CC, Scherer PE, Cleveland K, Whittemore JL, Lodish HF, and Cheatham B. (2000) Pantophysin is a phosphoprotein component of adipocyte transport vesicle and associates with GLUT4-containing vesicles. *J. Biol. Chem.* **275**:2029-2036
- Brandstätter JH, Löhrke S, Morgans CW, Wässle H. (1996) Distributions of two homologous synaptic vesicle proteins, synaptoporin and synaptophysin, in mammalian retina. *J. Comp. Neurol.* **370**:1-10
- Burre J, and Volkandt W. (2007) The synaptic vesicle proteome. *J. Neurochem.* **101**:1448-1462
- Bustin SA. (2000) Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assay. *J. Mol. Endocri.* **25**:169-193
- Bustin SA, Benes V, Nolan T, and Pfaffl MW. (2005) Quantitative real-time RT-PCR - a perspective. *J. Mole. Endocrino.* **34**:597-601
- Byrne AB, Weirauch MT, Wong V, Koeva M, Dixon SJ, Stuart JM, and Roy PJ. (2007) A global analysis of genetic interactions in *Caenorhabditis elegans*. *J. Biol.* **6**:8
- Cao H, Weller S, Orth JD, Chen J, Huang B, Chen JL, Stamnes M, and McNiven MA. (2005) Actin and Arf1-dependent recruitment of a cortacin-dynamin complex to the Golgi regulates post-Golgi transport. *Nat. Cell Biol.* **7**:483-492
- Carrion-Vazquez M, Fernandez AM, Chowen J, Nieto-Sampedro M. (1998) Brain Ac/physophilin: cloning, coexpression and colocalization with synaptophysin. *Eur. J. Neurosci.* **10**:1153-1166
- Castle A, and Castle D. (2005) Ubiquitously expressed secretory carrier membrane proteins (SCAMPs) 1-4 mark different pathways and exhibit limited constitutive trafficking to and from the cell surface. *J. Cell Sci.* **118**:3769-3780
- Chardin P, Paris S, Antony B, Robineau S, Beraud-Dufour S, Jackson CL, Chabre M. (1996) A human exchange factor for ARF contains Sec7- und pleckstrin-homology domains. *Nature* **384**:481-484
- Chen Y, Deng LB, Maeno-Hikichi Y, Lai MZ, Chang SH, Chen G, and Zhang JF. (2003) Formation of an endophilin-Ca<sup>2+</sup> channel complex is critical for clathrin-mediated synaptic vesicle endocytosis. *Cell* **115**:37-48

- Cheng Z, Radominska-Pandya A, Tephly TR. (1999) Studies on the substrates specificity of human intestinal UDP-glucuronosyltransferases 1A8 and 1A10. *Drug. Metab. Dispos.* **27**:1165-1170
- Clark SG, Shurland DL, Meyerowitz, EM, Bargmann CI, van der Blik AM. (1997) A dynamin GTPase mutation causes a rapid and reversible temperature-induced locomotion defect in *C. elegans*. *PNAS.* **94**:10438-10443
- Concalves PP, Meireles SM, Neves P, Vale MG. (1999) Synaptic vesicle Ca<sup>2+</sup>/H<sup>+</sup> antiport: dependence on the proton electrochemical gradient. *Mol. Brain Res.* **71**:178-184
- Conner SD, and Schmidt SL. (2003) Regulated portals of entry into the cell. *Nature* **442**:37-44
- Cui YX, McBride SJ, Boyd WA, Alper S, and Freedman JH. (2007) Toxicogenomic analysis of *Caenorhabditis elegans* reveals novel genes and pathway involved in the resistance to cadmium toxicity. *Genome Biology* **8**:R122
- Daly C, Sugimori M, Moreira JE, Ziff EB, and Llinas R. (2000) Synaptophysin regulates clathrin-independent endocytosis of synaptic vesicles. *PNAS.* **97**:6120-6125
- Daly C, Ziff EB. (1997) Post-transcriptional regulation of synaptic vesicle protein expression and the developmental control of synaptic vesicle formation. *J. Neurosci.* **17**:2365-2375
- Daly C, and Ziff EB. (2002) Ca<sup>2+</sup>-dependent formation of a dynamin-synaptophysin complex: potential role in synaptic vesicle endocytosis. *J. Biol. Chem.* **277**:9010-9015
- Deak F, Shin OH, Kavalali ET, and Südhof TC. (2006) Structural determinants of synaptobrevin 2 function in synaptic vesicle fusion. *J. Neurosci.* **26**:6668-6676
- De Camilli, Chen H, Hyman J, Panepucci E, Bateman A, Brunger AT. (2002) The ENTH domain. *FEBS Lett.* **513**:11-18
- De Matteis M, Godi A, Corda D. (2002) Phosphoinositides and the golgi complex. *Curr. Opin. Cell Biol.* **14**: 434-447
- Dong J, Song MO, Freedman JH. (2005) Identification and characterization of a family of *Caenorhabditis elegans* genes that is homologous to cadmium-responsive gene *cdr-1*. *Biochim. Biophys. Acta.* **1721**:16-26
- Drobyshev AL, Machka CH, Horsch M, Seltmann M, Liebscher V, Habe de Angelis M, Beckers J. (2003) Specificity assessment from fractionation experiments (SAFE): A novel method to evaluate microarray probe specificity based on hybridization stringencies. *Nucleic Acids Res.* **31**:1-10
- Edelmann L, Hanson PL, Chapman ER, Jahn R. (1995) Synaptobrevin binding to synaptophysin: a potential mechanism for controlling the exocytotic fusion machine. *EMBO J.* **14**:224-231
- Emmons SW, Sternberg PW. (1997) Cold Harbor Lab. Press 295-334

- Eshkind LG, and Leube RE. (1995) Mice lacking synaptophysin reproduce and form typical synaptic vesicles. *Cell Tissue Res.* **282**:423-433.
- Evan TC. Handbook of *C. elegans* anatomy. In WormAtlas (2006)
- Evans GJ, and Cousin MA. (2005) Tyrosine phosphorylation of synaptophysin in synaptic vesicle recycling. *Biochem. Soc. Trans.* **33**:1350-1353
- Fan Y, Esmail MA, Ansley AJ, Blacque OE, Boroevich K, Ross AJ, Moore SJ, Badano JL, May-Simera H, Compton DS. et al., (2004) Mutation in a member of Ras superfamily of small GTP-binding proteins causes Bardet-Biedl syndrome. *Nat. Genet.* **36**:989-993
- Fergestad T, Broadie K. (2001) Interaktion of stoned and synaptotagmin in synaptic vesicle endocytosis. *J. Neurosci.* **21**:1218-1227
- Fernandez I, Arac D, Ubach J, Gerber SH, Shin O, Gao Y, Anderson RG, Südhof TC, Rizo J. (2000) Three-dimensional structure of the synaptotagmin 1 C2B-domain: synaptotagmin 1 as a phospholipid binding machine. *Neuron* **32**:1057-1069
- Fernandez-Chacon R, and Südhof TC. (2000) Novel SCAMPs lacking NPF repeats: Ubiquitous and synaptic vesicle-specific forms implicate SCAMPs in multiple membrane-trafficking function. *J. Neurosci.* **20**:7941-7950
- Fesce R, Grohovaz F, Valtorta F, and Albanesi J. (1994) Neurotransmitter release: fusion or “kiss and run”? *Trends Cell Biol.* **4**:1-4
- Fire A. (1986) Integrative transformation of *Caenorhabditis elegans*. *EMBO J.* **5**:2673-2680
- Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **391**:806-811
- Floor E, Schaeffer SF, Feist BE, Leeman SE. (1988) Synaptic vesicles from mammalian brain: large-scale purification and physical and immunochemical characterization. *J. Neurochem.* **50**:1588-1596
- Fujiwara R, Nakajima M, Yamanaka H, Katoh M, Yokoi T. (2007) Product inhibition of UDP-glucuronosyltransferase (UGT) enzymes by UDP obfuscates the inhibitory of UGT substrates. *Drug Metab. Dispos.* (Epub ahead of print)
- Fykse EM, Takei K, Walch-Solimena C, Geppert MJ, Jahn R, De Camilli P, and Südhof TC. (1993) Relative properties and localizations of synaptic vesicle protein isoforms: The case of the synaptophysins. *J. Neurosci.* **13**:4997-5007
- Galli T, McPherson PS, De Camilli P. (1996) The V0 sector of the V-ATPase, synaptobrevin, and synaptophysin are associated on synaptic vesicles in a Triton X-100-resistant, freeze-thawing sensitive, complex. *J. Biol. Chem.* **271**:2193-2198
- Geppert M, Goda Y, Hammer RE, Li C, Rosahl TW, Stevens CF, and Südhof TC. (1994) Synaptotagmin I: a major Ca<sup>2+</sup> sensor for transmitter release at a central synapse. *Cell* **79**:717-727

Gillingham AK, Munro S. (2003) Long coiled-coil proteins and membrane traffic. *Biophys. Acta* **1641**:71-85

Goda Y, Südhof TC. (1997) Calcium regulation of neurotransmitter release: reliably unreliable. *Curr. Opin. Cell Biol.* **9**:513-518

Golub TR, Slonim DK, Tamayo P, Huard C, Gaasenbeek M, Mesirov JP, Coller H, Loh ML, Downing JR, Caligiuri MA, Bloomfield CD, Cander ES. (1999) Molecular classification of cancer: class discovery and class predication by gene expression monitoring. *Science* **286**:530-537

Grant B, Hirsh D. (1999) Receptor-mediated endocytosis in the *Caenorhabditis elegans* oocyte. *Mol. Biol. Cell.* **10**:4311-4326

Green MD, Tephly TR. (1998) Glucuronidation of amine substrates by purified and expressed UDP-glucuronosyltransferase proteins. *Drug. Metab. Dispos.* **26**:860-867

Greengard P, Valtorta F, Czernik, AJ, and Benfenati F. (1993) Synaptic vesicle phosphoproteins and regulation of synaptic function. *Science* **259**:780-785

Haass NK, Kartenbeck J, and Leube RE. (1996) Pantophysin is ubiquitously expressed synaptophysin homologue and defines constitutive transport vesicles. *J. Cell Biol.* **134**:731-746

Hall DH, Hedgecock EM. (1991) Kinesin-related gene *unc-104* is required for axonal transport of synaptic vesicles in *C. elegans*. *Cell* **65**:837-847

Hang B, Koh YH, Beckstead RB, Budnik V, Ganetzky B, Bellen HJ. (1998) Synaptic vesikel size and number are regulated by a clathrin adaptor protein required for endocytosis. *Neuron* **21**:1465-1475

Hanson PI, Roth R, Morisaki H, Jahn R, Heuser JE. (1997) Structure and conformational changes in NSF and its membrane receptor complexes visualized by quick-freeze/deep-etch electron microscopy. *Cell* **90**:523-535

Harris TW, Hartweg E, Horvitz HR, Jorgensen EM. (2000) Mutations in synaptojanin disrupt synaptic vesicle recycling. *J. Cell Biol.* **150**:589-600

Haucke V. (2005) Phosphoinositide regulation of clathrin-mediated endocytosis. *Biochem. Soc. Trans.* **33**:1285-1289

Hayes SB. (1997) The carcinogenicity of metals in humans. *Cancer Causes Control.* **8**:371-385

Hayashi T, Yamasaki S, Nauenburg S, Binz T, and Niemann H. (1995) Disassembly of the reconstituted synaptic vesicle membrane fusion complex in vitro. *EMBO J.* **14**:2317-2325

Heller MJ. (2002) DNA microarray technology: devices, systems, and applications. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **4**:129-153

## 8. Literaturverzeichnis

---

- Heuser JE, Reese TS. (1973) Evidence for recycling of synaptic vesicle membrane during transmitter release at the frog neuromuscular junction. *J. Cell Biol.* **57**:315-344
- Hill E, van der Kaay J, Downes CP, and Smythe E. (2002) The role of dynamin and its binding partners in coated pit invagination and scission. *J. Cell Biol.* **152**:309-323
- Hodgin JA, Horvitz HR, and Brenner S. (1979) Nondisjunction mutants of the nematode *C. elegans*. *Genetics* **91**:67-94
- Hodgkin J, Barnes TM. (1991) More is not better: brood size and population growth in a self-fertilizing nematode. *Pro. Biol. Sci.* **246**:19-24
- Horikawa HP, Kneussel M, El Far O, Betz H. (2002) Interaction of synaptophysin with the AP1 adaptor protein gamma-adaptin. *Mol. Cell Neurosci.* **21**:454-462
- Hope IA. (1999) *C. elegans*. Oxford University Press Inc., New York 1-13
- Hubbard C, Singleton D, Rauch M, Jayasinghe S, Cafiso D, and Castle D. (2000) The secretory carrier membrane protein family: Structure and membrane topology. *Mol. Bio. Cell* **11**:2933-2947
- Hübner K, Windoffer R, Hutter H, and Leube RE. (2002) Tetraspan vesicle membrane proteins: synthesis, subcellular localization, and functional properties. *Int. Rev. Cytol.* **214**:103-159
- Innocenti F, Grimsley C, Das S, Ramirez J, Cheng C, Kuttab-Boulos H, Ratain MJ, Di Rienzo A. (2002) Haplotype structure of the UDP-glucuronosyltransferase 1A1 promoter in different ethnic groups. *Pharmacogenetics* **12**:725-733
- Jahn R, Schiebler W, Ouimet C, Greengard P. (1985) A 38.000-dalton membrane protein (p38) present in synaptic vesicles. *PNAS.* **82**:4137-4141
- Jahn R, and Südhof TC (1994) Synaptic vesicles and exocytosis. *Annu. Rev. Neurosci.* **17**:219-246
- Jahn R, Südhof TC. (1999): Membrane fusion and exocytosis. *Ann Rev. Biochem.* **68**:219-246
- Jantsch-Plunger V, Glotzer M. (1999) Depletion of synaptotagmin in the early *Caenorhabditis elegans* embryo reveals a role for membrane fusion events in cytokinesis. *Curr. Biol.* **9**:738-745
- Janz R, and Südhof TC. (1998) Cellugyrin, a novel ubiquitous form of synaptotagmin that is phosphorylated by pp<sup>c-src</sup>. *J. Biol. Chem.* **273**:2851-2857
- Janz R, Südhof TC, Hammer RE, Unni V, Siegelbaum SA, Bolshakov VY. (1999) Essential roles in synaptic plasticity for synaptotagmin I and synaptophysin I. *Neuron* **24**:787-700
- Jennings ML, (1989) Topography of membrane proteins. *Annu. Rev. Biochem.* **58**:999-1027
- Jin Y. (2005) Synaptogenesis. *WormBook.* 16-12-2005:1-11

- Johnston PA, Südhof TC. (1990) The multisubunit structure of synaptophysin. Relationship between disulfide bonding and homooligomerization. *J. Biol. Chem.* **265**:8869-8873
- Jorgensen EM, Hartweg E, Schuske K, Nonet ML, Jin Y, and Horvitz HR. (1995) Defective recycling of synaptic vesicles in synaptotagmin mutants of *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **378**:196-199
- Jorgensen EM, and Mango SE. (2002) The art and design of genetic screens: *Caenorhabditis elegans*. *Nat. Rev. Genet.* **3**:356-369
- Jorgensen EM, and Nonet ML. (1995) Neuromuscular junctions in the nematode *C. elegans*. *Dev. Biol.* **6**:207-220
- Jung N, and Haucke V. (2007) Clathrin-mediated endocytosis at synapses. *Traffic* **8**:1129-1136
- Kachur T, Ao W, Berger J, Pilgrim D. (2004) Maternal UNC-45 is involved in cytokinesis and early *Caenorhabditis elegans* embryo. *J. Cell Sci.* **117**:5313-5321
- Kahn RA, Volpicelli-Daley L, Bowzard B, Shrivastava-Ranjan P, Li Y, Zhou C, and Cunningham L. (2005) Arf family GTPases: roles in membrane traffic and microtubule dynamics. *Biochem. Soc. Trans.* **33**:1269-1272
- Katsanis N. (2004) The oligogenic properties of Bardet-Biedl syndrome. *Hum. Mol. Genet.* **13**:R65-71
- Kedra D, Pan HQ, Seroussi E, Fransson I, Guilbaud C, Collins JE, Dunham I, Blennow E, Roe BA, Piehl F, and Dumanski JP. (1998) Characterization of the human synaptogyrin gene family. *Hum. Genet.* **103**:131-141
- Knaus P, Marqueze-Pouey B, Scherer H, Betz H. (1990) Synaptoporin, a novel putative channel protein of synaptic vesicles. *Neuron* **5**:453-462
- Komazaki S, Nishi M, Takeshima H, and Nakamura H. (2001) Abnormal formation of sarcoplasmic reticulum networks and triads during early development of skeletal muscle cells in Mitsugumin29-deficient mice. *Develop. Growth Differ.* **43**:717-723
- Kong AN, Rushmore TH. (2002) Pharmacogenomics, regulation and signalling pathways of phase I and II drug metabolizing enzymes. *Curr. Drug. Metab.* **3**:481-490
- Koushika SP, Schaefer AM, Vincent R, Willis JH, Bowerman B, Nonet ML. (2004) Mutations in *Caenorhabditis elegans* cytoplasmic dynein components reveal specificity of neuronal retrograde cargo. *J. Neurosci.* **24**:3907-3916
- Lane SR, Liu Y. (1997) Characterization of the palmitoylation domain of SNAP25. *J. Neurochem.* **69**:1864-1869
- Lang T. (2007) SNARE proteins and membrane rafts. *J. Physiol.* **10**:1343-1346

- Lanoix J, Ouwendijk J, Lin CC, Stark A, Love HD, Ostermann J, and Nilsson T. (1999) GTP hydrolysis by arf-1 mediates sorting and concentration of Golgi resident enzymes into functional COP I vesicles. *EMBO J.* **18**:4935-4948
- Leimer U, Franke WW, Leube RE. (1996) Synthesis of the mammalian synaptic vesicle protein synaptophysin in insect cells: a model for vesicle biogenesis. *Exp. Cell. Res.* **224**:88-95
- Leube RE. (1994) Expression of the synaptophysin gene family is not restricted to neuronal and neuroendocrine differentiation in rat and human. *Differentiation* **56**:163-171
- Leube RE, Wiedenmann B, Franke WW. (1989) Topogenesis and sorting of synaptophysin: synthesis of a synaptic vesicle protein from a gene transfected into nonneuroendocrine cell. *Cell* **59**:433-446
- Leube RE, Kaiser P, Seiter A, Zimbelmann R, Franke WW, Rehm H, Knaus P, Prior P, Betz H, Reinke H, Beyreuther K, Wiedenmann B. (1987) Synaptophysin: molecular organization and mRNA expression as determined from cloned cDNA. *EMBO J.* **6**:3261-3268
- Li YW, Kelly W, JR Logsdon JM, Schurko AM, Harfe BD, Hill-Harfe KL, and Kahn RA. (2004) Functional genomic analysis of the ADP-ribosylation factor family of GTPase: phylogeny among diverse eukaryotes and function in *C. elegans*. *FASEB J.* **18**:1834-1850
- Liao H, Ellena J, Liu L, Szabo G, Cafiso D, and Castle D. (2007) Secretory carrier membrane protein SCAMP2 and phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate interactions in the regulation of dense core vesicle exocytosis. *Biochem.* **46**:10909-10920
- Liao VH, Dong J, Freedman JH. (2002) Molecular characterization of a novel, cadmium-inducible gene from the nematode *Caenorhabditis elegans*. *J. Biol. Chem.* **277**: 42049-42059
- Lipshutz RJ, Fodor SPA, Gingeras TR, and Lockhart DJ. (1999) High density synthetic oligonucleotide arrays. *Nature* **21**:20-24
- Lin RC, Scheller RH. (2000) Mechanism of synaptic vesicle exocytosis. *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.* **16**:19-46
- Liu L, Guo Z, Tieu Q, Castle A, and Castle D. (2002) Role of secretory carrier membrane protein SCAMP2 in granule exocytosis. *Mol. Biol. Cell* **13**:4266-4278
- Liu L, Liao H, Castle A, Zhang J, Casanova J, Szabo G, and Castle D. (2005) SCAMP2 interacts with Arf6 and phospholipase D1 and links their function to exocytotic fusion pore formation in PC12 cell. *Mol. Biol. Cell* **16**:4463-4472
- Locke CJ, Williams SN, Schwarz EM, Caldwell GA, Caldwell KA. (2006) Genetic interaction among cortical malformation genes that influence susceptibility to convulsions in *C. elegans*. *Brain Res.* **1120**:23-34
- Lockhart DJ, Dong H, Byrne MC, Folttie MT, Gallo MV, Chee MS, Mittmann M, Wang C, Kobayashi M, Horton H and Brown EC. (1996) Expression monitoring by hybridization to high-density oligonucleotide array. *Nat. Biotechnol.* **14**:1675-1680

## 8. Literaturverzeichnis

---

- Lodish H, Berk A, Matsudaira SL, Kaiser CA, Krieger M, Scott MP, Zipursky SL, Darnell J. (2003) *Molecular Cell Biology*, 5th Edition W.H. Freeman and Company, New York: pp. 287-295
- Lundquist EA. (2006) Small GTPases. *Worm Book*
- Madl JE, Herman RK. (1979) Polyploids and sex determination in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*. **93**:393-402
- McIntire SL, Jorgensen E, and Horvitz HR. (1993) Genes required for GABA function in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **364**:337-341
- McMahon HT, Bolshakov VY, Janz R, Hammer RE, Siegelbaum SA, and Sudhof TC (1996) Synaptophysin, a major synaptic vesicle protein, is not essential for neurotransmitter release. *PNAS*. **93**:4760-4764
- McNiven MA, Cao H, Pitts KR, Yoon Y. (2000) The dynamin family of mechanoenzymes: pinching in new places. *Trends. Biochem. Sci.* **25**:115-120
- Mello C, and Fire A. (1995) DNA transformation. *Methods Cell Biol.* **48**:451-482
- Mirnic K, Middleton FA, Marquez A, Lewis DA, Levitt P. (2000) Molecular characterization of schizophrenia viewed by microarray analysis of gene expression in prefrontal cortex. *Neuron* **28**:53-67
- Morgan JR, Prasad K, Jin S, Augustine GJ, Lafer EM. (2003) Eps15 homology domain-NPF motif interactions regulate clathrin coat assembly during synaptic recycling. *J. Biol. Chem.* **278**:33583-33592
- Moss J, and Vaughan M. (1995) Structure and function of ARF proteins: activators of Cholera Toxin and critical components of intracellular vesicular transport processes. *J. Biol. Chem.* **270**:12327-12330
- Nguyen M, Alfonso A, Johnson CD, and Rand JB. (1995) *Caenorhabditis elegans* mutants resistant to inhibitors of acetylcholinesterase. *Genet.* **140**:527-535
- Nicholson-Tomishima K, and Ryan TA. (2004) Kinetic efficiency of endocytosis at mammalian CNS synapses requires synaptotagmin I. *PNAS*. **101**:16648-16652
- Nishi M, Komazaki S, Kurebashi N, Ogawa Y, Noda T, Iino M, and Takeshima H. (1999) Abnormal features in skeletal muscle from mice lacking mitsugumin29. *J. Cell Biol.* **147**:1473-1480
- Nonet ML. (1999) Visualization of synaptic specialization in live *C. elegans* with synaptic vesicle protein-GFP fusions. *J. Neurosci. Methods* **89**:33-40
- Nonet ML, Grundahl K, Meyer BJ, Rand JB. (1993) Synaptic function is impaired but not eliminated in *C. elegans* mutants lacking synaptotagmin. *Cell* **73**:1291-1305

## 8. Literaturverzeichnis

---

- Nonet ML, Holgado AM, Brewer F, Serpe CJ, Norbeck BA, Holleran J, Wei L, Hartwig E, Jorgensen EM, Alfonso A. (1999) UNC-11, a *Caenorhabditis elegans* AP180 homologue, regulates the size and protein composition of synaptic vesicles. *Mol. Biol. Cell.* **10**:2343-2360
- Nonet ML, Saifee O, Zhao H, Rand JB, Wei L. (1998) Synaptic transmission deficits in *Caenorhabditis elegans* synaptobrevin mutants. *J. Neurosci.* **18**:70-80
- Nonet ML, Staunton JE, Fergestad T, Hartwig E, Horvitz HR, Jorgensen EM, Meyer BJ. (1997) *Caenorhabditis elegans* rab-3 mutant synapses exhibit impaired function and are partially depleted of vesicles. *J. Neurosci.* **17**:8061-8073
- Orci L, Stames M, Ravazzola M, Amherdt M, Perrelet A, Söllner TH, Rothman JE. (1997). Bidirectional transport by distinct populations of COPI-coated vesicles. *Cell* **90**:335-349
- Özcelik T, Lafrenieren RG, Archer BT, Johnston RA, Willard HF, Francke U, and Südhof TC. (1990) Synaptophysin: Structure of the human gene and assignment to the X chromosome in man and mouse. *Am. J. Hum. Genet.* **47**:551-561
- Pennuto M, Bonanomi D, Benfenati F, and Valtorta F. (2003) Synaptophysin I controls the targeting of VAMP2 synaptobrevin II to synaptic vesicles. *Mol. Biol. Cell* **14**:4909-4919
- Pennuto M, Dunlap D, Contestabile A, Benfenati F, Valtorta F. (2002) Fluorescence resonance energy transfer detection of synaptophysin I and vesicle-associated membrane protein 2 interactions during exocytosis from single live synapses. *Mol. Biol Cell* **13**:2706-2717
- Piano F, Schetterdagger AJ, Mangone M, Stein L, Kempfues KJ. (2000) RNAi analysis of genes expression in the ovary of *Caenorhabditis elegans*. *Curr. Biol.* **10**:1619-1622
- Pietu G, Alibert O, Guichard V, Lamy B, Bois F, Leroy E, marriage-Sampson R, Houlgatte R, Soularue P, Auffray C. (1996) Novel gene transcripts preferentially expressed in human muscles revealed by quantitative hybridization of a high density cDNA array. *Genom. Res.* **6**:492-503
- Poteryaev D, Squirrell JM, Campbell JM, White JG, and Spang A. (2005) Involvement of the actin cytoskeleton and homotypic membrane fusion in ER dynamics in *Caenorhabditis elegans*. *Mol. Biol. Cell* **16**:2139-2153
- Prekeris R, Terrian DM. (1997) Brain myosin V is a synaptic vesicle-associated motor protein: evidence for a Ca<sup>2+</sup>-dependent interaction with the synaptobrevin-synaptophysin complex. *J. Cell Biol.* **137**:1589-1601
- Rand JB, and Russel RL. (1985) Properties and partial purification of choline acetyltransferase from the nematode *C. elegans*. *J. Neurochem.* **44**:189-200
- Rappoport JZ, Benmerah A, Simon SM. (2005) Analysis of the adaptor complex and cargo during clathrin-mediated endocytosis. *Traffic.* **6**:539-547
- Rein U, Andag U, Duden R, Schmitt HD, and Spang A. (2002) ARF-GAP-mediated interaction between the ER-Golgi v-SNAREs and the COP I coat. *J. Cell Biol.* **157**:395-404

## 8. Literaturverzeichnis

---

- Reist NE, Buchanan J, Li J, DiAntonio A, Buxton EM, and Schwarz TL. (1998) Morphologically docked synaptic vesicles are reduced in synaptotagmin mutants of *Drosophila*. *J. Neurosci.* **18**:7662-7673
- Richmond JE and Jorgensen EM. (1999) One GABA and two acetylcholine receptors function at the *C. elegans* neuromuscular junction. *Natur Neurosci.* **2**:791-797
- Riddle DL, Blumenthal T, Meyer BJ, Priess JQ. (1997) Cold Harbor Lab. Press 1-22
- Ringstad N, Nemoto Y, and DeCamilli P. (1997) The SH3p4/Sh3p8/SH3p13 protein family: binding partners for synaptojanin and dynamin via a Grb2-like Src homology 3 domain. *PNAS.* **94**:8569-8574
- Rizzoli SO, and Betz WJ. (2005) The structural organization of the readily releasable pool of synaptic vesicles. *Science* **303**:2037-2039
- Rocha L, Briones M, Ackermann RF, Anton B, Maidment NT, Evans CJ, and Engel JJ. (1996) Pentylentetrazol-induced kindling: early involvement of excitatory and inhibitory systems. *Epilepsy Res.* **26**:105-113
- Ross ME. (2002) Brain malformations, epilepsy and infantile spasms. *Int. Rev. Neurobiol.* **49**:333-352
- Rothman JE, and Warren G. (1994) Implications of the SNARE hypothesis for intracellular membrane topology and dynamics. *Curr. Biol.* **4**: 220-233
- Ruan TA. (2006) A pre-synaptic to do list for coupling exocytosis to do endocytosis. *Curr. Opin in Cell Biol.* **18**:416-421
- Rubenstein JL, Greengard P, Czernik AJ. (1993) Calcium-dependent serine phosphorylation of synaptophysin. *Synapse* **13**:161-172
- Ruvinsky I, Ohler U, Burge CB, Ruvkun G. (2007) Detection of broadly expressed neuronal genes in *C. elegans*. *Dev. Biol.* **302**:617-626
- Salcini AE, Hilliard MA, Croce A, Arbucci S, Luzzi P, Tacchetti C, Daiell L, De Camilli P, Pelicci PG, Di Fiore PP, Bazzicalupo P. (2001) The Eps 15 *C. elegans* homologue EHS-1 is implicated in synaptic vesicle recycling. *Nat. Cell Biol.* **3**:755-760
- Sanchez-Pulido L, Martin-Belmonte F, Valencia A, and Alonso MA. (2002) MARVEL: a conserved domain involved in membrane apposition events. *Trends. Biochem. Sci.* **27**:599-601
- Schlüter OM, Khvotchev M, Jahn R, Südhof TC (2002) Localization versus function of Rab3 proteins: evidence for a common regulatory role in controlling fusion. *J. Biol. Chem.* **277**:40919-40929
- Schlüter OM, Schmitz F, Jahn R, Rosenmund C, and Südhof TC. (2004) A complete genetic analysis of neuronal Rab3 function. *J. Neurosci.* **24**:6629-6637

- Schuske KR, Richmond JE, Matthies DS, Davis WS, Runz S, Rube DA, van der Blik AM, and Jorgensen EM. (2003) Endophilin is required for synaptic vesicle endocytosis by localizing synaptojanin. *Neuron* **40**:749-762
- Schwarz TL. (2004) Synaptotagmin promotes both vesicle fusion and recycling. *PNAS*. **101**:16401-16402
- Sheps JA, Ralph S, Zhao Z, Baillie DL, Ling V. (2004) The ABC-transporter gene family of *Caenorhabditis elegans* has implications for the evolutionary dynamics of multidrug resistance in eukaryotes. *Genome Biol.* **5**:R15
- Shimuta M, Komazaki S, Nishi M, Iino M, Nakagawara K, and Takeshima H. (1998) Structure and expression of Mitsugumin29 gene. *FEBS Lett.* **431**:263-267
- Singec I, Knoth R, Ditter M, Hagemeyer CE, Rosenbrock H, Frotscher M, and Volk B. (2002) Synaptic vesicle protein synaptoporin is differently expressed by subpopulations of mouse hippocampal neurons. *J. Comp. Neurol.* **452**:139-152
- Singleton DR, Wu TT, Castle JD. (1997) Three mammalian SCAMPs (secretory carrier membrane proteins) are highly related products of distinct genes having similar subcellular distributions. *J. Cell Sci.* **110**:2099-2107
- Slepnev VI, and De Camilli P. (2000) Accessory factors in clathrin-dependent synaptic vesicle endocytosis. *Neurosci.* **1**:161-172
- Smith CJ, and Pearse BMF. (1999) Clathrin: anatomy of a coat protein. *Trends Cell Biol.* **9**:335-338
- Song F, Smith JF, Kimura MT, Morrow AD, Matsnyama T, Nagase H, and Held WA. (2005) Association of tissue - specific differentially methylated regions (TDMS) with differential gene expression. *PNAS*. **102**:3336-3341
- Song W, Zinsmaier KE. (2003) Endophilin and synaptojanin hook up to promote synaptic vesicle endocytosis. *Neuron*. **40**:665-667
- Sonnichsen B, Watson B, Clausen H, Misteli T, and Warren G. (1996) Sorting by COP I – coated vesicles under interphase and mitotic conditions. *J. Cell Biol.* **134**:1411-1425
- Spiwoks-Becker I, Vollrath L, Seeliger MW, Jaissle G, Eshkind LG, and Leube RE. (2001) Synaptic vesicle alterations in rod photoreceptors of synaptophysin-deficient mice. *Neuroscience* **107**:127-142.
- Stenius K, Janz R, Südhof TC, and Jahn R. (1995) Structure of synaptogyrin (p29) defines novel synaptic vesicle protein. *J. Cell Biol.* **131**:1801-1809
- Stiernagle T. (2006) Maintenance of *C. elegans*. *WormBook*
- Su CW, Tharin S, Jin Y, Wightman B, Spector M, Meili D, Tsung N, Rhiner C, Bourikas D, Stoeckli E, Garriga G, Horvitz HR, Hengartner MO. (2006) The short coiled-coil domain-containing protein UNC-69 cooperates with UNC-76 to regulate axonal outgrowth and normal presynaptic organization in *Caenorhabditis elegans*. *J. Biol.* **5**:9

- Südhof TC. (2002) Synaptotagmins: why so many? *J. Biol. Chem.* **277**:7629-7632
- Südhof TC. (2004) The synaptic vesicle cycle. *Annu. Rev. Neurosci.* **27**:509-547
- Südhof TC, and Jahn R. (1991) Proteins of synaptic vesicles involved in exocytosis and membrane recycling. *Neuron* **6**:665-677
- Sugita S, Janz R, and Südhof TC. (1999) Synaptogyrins regulate Ca<sup>2+</sup>-dependent exocytosis in PC12. *J. Biol. Chem.* **274**:18893-18901
- Sullivan J. (2007) Please release me. *Neuron* **54**:493-494
- Sun T, Xiao HS, Zhou PB, Lu YJ, Bao L, and Zhang X. (2006) Differential expression of synaptoporin and synaptophysin in primary sensory neurons and up-regulation of synaptoporin after peripheral nerve injury. *Neurosci.* **141**:1233-1245
- Sutton RB, Fasshauer D, Jahn R, & Brunger AT. (1998) Crystal structure of a SNARE complex involved in synaptic exocytosis at 2.4 Å resolution. *Nature* **395**:347-353
- Syntichaki P, Samara C, Tavernarakis N. (2005) The vaskular H<sup>+</sup>-Atpase mediates intracellular acidification required for neurodegeneration in *C. elegans*. *Curr. Biol.* **15**:1249-1254
- Takeshima H, Shimuta M, Komazaki S, Ohmi K, Nishi M, Iino M, Miyata A, and Kangawa K. (1998) Mitsugumin 29, a novel synaptophysin family member from the triad junction in skeletal muscle. *Biochem. J.* **331**:317-322
- Takai Y, Sasaki T, Matozaki T. (2001) Small GTP-binding proteins. *Physiol. Rev.* **81**:153-208
- Tang J, Maximov A, Shin OH, Dai H, Rizo J, and Südhof TC. (2006) A complexin/Synaptotagmin 1 switch controls fast synaptic vesicle exocytosis. *Cell* **126**:1175-1187
- Tanabe K, Torii T, Natsume W, Braesch-Andersen S, Watanabe T, Satake M. (2005) A novel GTPase-activating protein for ARF6 directly interacts with clathrin and regulates clathrin-dependent endocytosis. *Mol. Biol. Cell* **16**:1617-1628
- Thiele C, Hannah MJ, Fahrenholz F, and Huttner WB. (2000) Cholesterol binds to synaptophysin and is required for biogenesis of synaptic vesicles. *Nature Cell Biol.* **2**:42-49
- Thomas L, Betz H. (1990) Synaptophysin binds to physophilin, a putative synaptic plasma membrane protein. *J. Cell Biol.* **111**:2041-2052
- Thomas L, Hartung K, Langosch D, Rehm H, Bamberg E, Franke WW, Betz H. (1988) Identification of synaptophysin as a hexameric channel protein of the synaptic vesicle membrane. *Science* **242**:1050-1053
- Timmons L, and Fire A. (1998) Specific interference by ingested dsRNA. *Nature* **395**:854

## 8. Literaturverzeichnis

---

- Timmon L, Court DL, and Fire A. (2001) Ingestion of bacterially expressed dsRNA can produce specific and potent genetic interference in *Caenorhabditis elegans*. *Gene* **263**:103-112
- Tucker WC, Chapman ER. (2002) Role of synaptotagmin in Ca<sup>2+</sup>-triggered exocytosis. *Biochem. J.* **366**:1-13
- Urano F, Calfon M, Yoneda T, Yun C, Kiraly M, Clark SG, and Ron D. (2002) A survival pathway for *Caenorhabditis elegans* with a blocked unfolded protein response. *J. Cell Biol.* **158**:639-646
- Valtorta F, Meldolesi J, and Fesce R. (2001) Synaptic vesicles: is kissing a matter of competence? *Trends Cell Biol.* **11**:324–328.
- Verstreken P, Koh TW, Schulze KL, Zhai RG, Hiesinger PR, Zhou Y, Mehta SQ, Cao Y, Roos J, and Bellen HJ. (2003) Synaptojanin is required by endophilin to promote synaptic vesicle uncoating. *Neuron* **40**:733-748
- Voglmaier SM, and Edwards RH. (2007) Do different endocytic pathways make different synaptic vesicles? *Curr. Opin. Neurobiol.* **17**:1-7
- Waisberg M, Joseph P, Hale B, Beyersmann D. (2003) Molecular and cellular mechanisms of cadmium carcinogenesis. *Toxicology* **192**:95-117
- Washbourne P, Shiavo G, and Montecucco C. (1995) Vesicle-associated membrane protein-2 (synaptobrevin-2) forms a complex with synaptophysin. *Biochem. J.* **305**:721-724
- Watts DJ, and Strogatz SH. (1998) Collective dynamics of “small-world” networks. *Nature* **393**:440-442
- White JG, Southgate E, Thomson JN and Brenner S. (1986) The structure of the nervous system of the nematode *C. elegans*. *Philos. Trans. R. Soc. Lond B Biol. Sci.* **314**:1-340
- Wiedenmann B, Frank WW. (1985) Identification and localization of synaptophysin, an integral membrane glycoprotein of M<sub>f</sub> 38.000 characteristic of presynaptic vesicles. *Cell* **41**:1017-1028
- Wightman RM, & Haynes CL. (2004) Synaptic vesicles really do kiss and run. *Nature Neurosci.* **7**:321-322
- Williams SN, Locke CJ, Braden AL, Caldwell KA and Caldwell GA. (2004) Epileptic-like convulsions associated with LIS-1 in the cytoskeletal control of neurotransmitter signalling in *Caenorhabditis elegans*. *Hum. Mol. Genet.* **13**:2043-2059
- Windoffer R, Borchert-Stuhlträger M, Haass NK, Thomas S, Hergt M, Bulitta CJ, and Leube RE. (1999) Tissue expression of the vesicle protein synaptophysin. *Cell Tissue Res.* **296**:499-510
- Wood WB. (1988) The nematode *Caenorhabditis elegans*. Cold Spring Harbor Lab. Press 1-16

- Wu LG. (2004). Kinetic regulation of vesicle endocytosis at synapses. *Trends Neurosci.* **27**:548–554.
- Wu TT, and Castle JD. (1998) Tyrosin phosphorylation of selected secretory carrier membrane proteins, SCAMP1 and SCAMP3, and association with the EGF receptor. *Mol. Biol. Cell* **6**:1661-1674.
- Xu J, Mashimo T, and Südhof TC. (2007) Synaptotagmin-1, -2, -9: Ca<sup>2+</sup> sensors for fast release that specify distinct presynaptic properties in subsets of neurons. *Neurons* **54**:567-581
- Yabe T, Suzuki N, Furukawa T, Ishihara T, Katsura I. (2005) Multidrug resistance-associated protein MRP-1 regulates dauer diapause by its export activity in *Caenorhabditis elegans*. *Development* **132**:3197-3207
- Yeaman TJ. (2003) The future of clinical cancer management: One tumor, one chip. *Am. Surg.* **69**:41-44
- Yook KJ, Prox SR, Jorgensen EM. (2001) Rules of nonallelic noncomplementation at the synapse in *Caenorhabditis elegans*. *Genet.* **158**:209-220
- Yoshida Y, Takei K. (2005) Stimulation of dynamin GTPase activity by amphiphysin. *Methods Enzymol.* **404**:528-537
- Yoshihara M, and Littleton JT. (2004) Synaptotagmin I functions as a calcium sensor to synchronize neurotransmitter release. *Neuron* **36**:897-908
- Yu X, Odera S, Chuang CH, Lu N, and Zhou Z. (2006) *C. elegans* dynamin mediates the signalling of phagocytic receptor CED-1 for the engulfment and degradation of apoptotic cells. *Dev. Cell* **10**:734-757
- Zhang B, Koh YH, Beckstead RB, Budnik V, Ganetzky B, Bellen HJ. (1998) Synaptic vesicle size and number are regulated by a clathrin adaptor protein required for endocytosis. *Neuron* **21**:1465-1475
- Zhao H, Nonet ML. (2001) A conserved mechanism of synaptogyrin localization. *Mol. Biol. Cell* **12**:2275-2289
- Zhao Z, Sheps JA, Ling V, Fang LL, Baillie DL. (2004) Expression analysis of ABC transporters reveals differential functions of tandemly duplicated genes in *Caenorhabditis elegans*. *J. Mol. Biol.* **344**:409-417

## 9. Anhang

### 9.1 *C. elegans*-Stämme

Tab. 9.1 Allgemeine *C. elegans*-Stämme.

Stamm	Genotype
BJ23	<i>kcEx2 (Psng-1:yfp)</i>
BX30	<i>fat-3(wa22) IV*</i>
CB138	<i>unc-24(e138) IV</i>
CB406	<i>unc-57(e406) I</i>
CB538	<i>unc-1(e538) X</i>
CX51	<i>dyn-1(ky51ts) X</i>
DA596	<i>snt-1(ad596) II</i>
DH1230	<i>rme-3(b1025ts)</i>
DR2	<i>unc-26(m2) IV</i>
EG1055	<i>unc-64(e246) III</i>
EG1285	<i>oxIs12 [lin-15(+), Punc-47:gfp] X; lin-15(n765ts) X</i>
EG2947	<i>scm-1(hd30) I</i>
EG2710	<i>unc-57(ok310) I</i>
EG2948	<i>sph-1(ox278) IV</i>
EG2976	<i>lin-15(n765ts) X; oxEx466 [lin-15(+), sph-1::yfp]</i>
EG2978	<i>lin-15(n765ts) X; oxEx468 [lin-15(+), Pscm-1:yfp]</i>
EG3008	<i>sng-1(ok234) X; oxIs12 [lin-15(+); Punc-47:gfp]</i>
GR1373	<i>eri-1(mg366) IV</i>
N2	<i>WT (CGC)</i>
NL152	<i>pgp-1(pk17) IV; pgp-3(pk18) X; mrp-1(pk89) X</i>
NM204	<i>snt-1(md290) II</i>
MT6977	<i>snt-1(n2665) II</i>
NM467	<i>snb-1(md247) V</i>
RB895	<i>cdr-4(ok748) V</i>
VH369	<i>pha-1(e2123ts); hdEx153 [pha-1(+), scm-1::yfp]</i>
VH619	<i>sng-1(ok234) X</i>

\* Die römische Ziffer in Klammern bezeichnet das Chromosom, auf dem das Gen liegt.

Tab. 9.2 Durch Verpaarung hergestellte Stämme.

Stamm	Genotype	eingekreuzt in N2
BJ14	<i>sng-1(ok234) X</i>	12x
BJ15	<i>scm-1(hd30) I</i>	12x
BJ16	<i>sph-1(ox278) IV</i>	12x
BJ18	<i>sng-1(ok234) X; sph-1(ox278) IV</i>	12x
BJ19	<i>sng-1(ok234) X; scm-1(hd30) I</i>	12x
BJ20	<i>WT</i>	12x
BJ21	<i>sng-1(ok234) X; sph-1(ox278) IV; scm-1(hd30)</i>	12x
BJ30	<i>sph-1(ox278) IV; scm-1(hd30) I</i>	12x
BJ34	<i>sng-1(ok234) X; sph-1(ox278) IV; scm-1(hd30); cdr-4 (ok748)</i>	
BJ67	<i>sng-1(ok234) X; eri-1(mg366) IV</i>	
BJ93	<i>sng-1(ok234) X; oxls12 [lin-15(+); Punc-47:gfp]; snt-1(ad596) II</i>	
BJ97	<i>sng-1(ok234) X; oxls12 [lin-15(+); Punc-47:gfp]; rme-3(b1025ts)</i>	
BJ99	<i>sng-1(ok234) X; oxls12 [lin-15(+); Punc-47:gfp]; unc-26(m2) IV</i>	
BJ100	<i>sng-1(ok234) X; oxls12 [lin-15(+); Punc-47:gfp]; snb-1(md247) V</i>	
BJ101	<i>sng-1(ok234) X; oxls12 [lin-15(+); Punc-47:gfp]; unc-57(ok310) I</i>	
BJ109	<i>sng-1(ok234) X; oxls12 [lin-15(+); Punc-47:gfp]; fat-3(wa22) IV</i>	
BJ110	<i>sng-1(ok234) X; oxls12 [lin-15(+); Punc-47:gfp]; unc-24(e138) IV</i>	
BJ115	<i>sng-1(ok234) X; oxls12 [lin-15(+); Punc-47:gfp]; unc-57(406) I</i>	
BJ116	<i>sng-1(ok234) X; oxls12 [lin-15(+); Punc-47:gfp]; unc-1(e538) X</i>	
BJ117	<i>sng-1(ok234) X; oxls12 [lin-15(+); Punc-47:gfp]; dyn-1(ky51ts) X</i>	
BJ118	<i>sng-1(ok234) X; oxls12 [lin-15(+); Punc-47:gfp]; snt-1(md290) II</i>	
BJ119	<i>sng-1(ok234) X; oxls12 [lin-15(+); Punc-47:gfp]; snt-1(n2665) II</i>	
BJ122	<i>sng-1(ok234) X; snt-1(ad596) II</i>	
BJ123	<i>sng-1(ok234) X; snt-1(n2665) II</i>	
BJ124	<i>sng-1(ok234) X; snt-1(md290) II</i>	
BJ125	<i>sng-1(ok234) X; unc-57(ok310) I</i>	
BJ126	<i>sng-1(ok234) X; unc-57(e406) I</i>	
BJ127	<i>sng-1(ok234) X; unc-26(m2) IV</i>	

Tab. 9.3 Durch Mikroinjektion hergestellte Stämme.

Stamm	Genotype
BJ57	<i>kcEx15 (Pcdr-2:cfp)</i>
BJ66	<i>kcEx16 (Parf-1.1:cfp)</i>
BJ103	<i>sng-1(ok234) X; kcEx12 (Psng-1:sng-1); kcEx5 (Pifb-2:yfp)</i>
BJ104	<i>kcEx17 (Parf-1.1:cfp)</i>
BJ105	<i>kc[Ex18 (PT16G1.6:cfp)</i>
BJ113	<i>kcEx10 (Pugt-62:cfp)</i>
BJ120	<i>kcEx12 (Psng-1:sng-1); kcEx5 (Pifb-2:yfp)</i>
BJ121	<i>kcEx13 (Pcdr-2:cdr-2:cfp); lin-15(n765ts) X; oxEx466 [lin-15(+); sph-1::yfp]</i>
BJ128	<i>kcEx14 (arf-1.1:cfp); lin-15(n765ts) X; oxEx466 [lin-15(+); sph-1::yfp]</i>
BJ139	<i>kcEx13 (Pcdr-2:cdr-2:cfp); pha-1(e2123ts); hdEx153 [pha-1(+), scm-1::yfp]</i>

## 9.2 Oligonukleotide

Tab. 9.4 Maus DNA-Primer.

Oligo. Nr.	Bezeichnung	Sequenz (5' zu 3')
03-51	sph-1_f*	ACTTCCATCCCTATTTCCCACACC
03-52	sph-1_r**_1	TTCCACCCACCAGTTCAGTAGGA
03-53	sph-1_r_2	TCGCCTTCTTGACGAGTTCTTCTG

\* f = forward, \*\* r = reverse

Tab. 9.5 Maus cDNA Primer für quantitative *Real-Time* RT-PCR.

Oligo. Nr.	Bezeichnung	Sequenz (5' zu 3')
05-31	dapdh_f	ATGAGCCCTTCCACAATG
05-32	gapdh_r	TCCACTCACGGCAAATTC
05-33	BG230349_f	CAGAAGAGGGCATCAGAC
05-34	BG230349_r	GAGACACTCCCTGTTTTCC
05-35	BG067686_f	CATGCAACAGCACCGCTAAGAC
05-36	BG067686-r	TGATGCCTGCTGGCTGTTAGAG
05-45	sph-1_a_f	GCAGACAGGCAGGTGAAGAG
05-46	sph-1_a_r	GAGGGAGAGGGCAGAGAAAG
05-47	sph-1_b_f	TACGGGCCTCAGGGTGGTTATC
05-48	sph-1_b_r	TGGGTGAAGGTAGGGCTCAGAC

Tab. 9.6 *C. elegans* DNA Primer.

Oligo. Nr.	Bezeichnung	Sequenz (5' zu 3')
04-63	sng-1_f_4	GTTATGGATACGGAGGAGAC
04-64	sng-1_f_1	TCGTTCCATAGTCGGTTTTCC
04-65	sng-1_r_0	GGGTTTGATGGTGGTTGTTG
04-66	sph-1_el1_f	GGTGCTCATGACAAGGTATCAA
04-67	sph-1_sp2_r	GACACGACAATGCTGTGTCAC
04-68	sph-1_pr1_r	CTGAATTATTTGGACAGGGGTC
04-69	scm-1_dx4_f	TTCTTCGACAAAATGAATGAAAA
04-70	scm-1_dP4_f	AATTGAATGACGAATCATTTCTGA
04-71	scm-1_dx3_r	TGAAAATGTTTCGAAACCACTAGAA
05-194	cdr-4_f1	GTGATCTTGTCTCCGAACAG
05-195	cdr-4_r1	TTGTCACTGGGCAACAAC
05-196	cdr-4_r2	CAGCCTATTACCCGTTCC
07-93	eri-1_f	GATAAACTTCGGAACATATGGGGC
07-94	eri-1_r	ACTGATGGGTAAGGAATCGAAGACG

Tab. 9.7 *C. elegans* cDNA Primer für quantitative *Real-Time* RT-PCR.

Oligo. Nr.	Bezeichnung	Sequenz (5' zu 3')
05-49	gapdh_c*_f	CTGTAACCGCAACCCAGAAG
05-50	gapdh_c_r	GTGGCGATGTATCCGATGAG
05-51	sph-1_l**_f1	TTCCATCAACACAGTGG
05-52	sph-1_l_r1	TGCCTTCGATTCCTGCAC
05-53	sph-1_l_f2	CCCACCAAATCGAACTAC
05-54	sph-1_l_r2	GCGATAGCCGCTATTAAC
05-55	scm-1_l_f1	CAGCATCCGACATAACAC
05-56	scm-1_l_r1	CTCACTGGGCAACAAATC
05-57	scm-1_l_f2	GAGGCCAACACGTTGACAACC
05-58	sng-1_l_f1	GAATCGGACATGTTGGCGCACCT
05-59	sng-1_l_r1	TCGGAAGGATATGGTTATTAG
05-61	sng-1_l_f2	GAATCGGACATGTTGGCGCACCT
05-62	arf-1.1_f	ACGTGGAGACTGTTACCTTC
05-63	arf-1.1_r	TCTGCTTCTTGACCCACATC
05-64	cdr-2_f	GCACATTCTGTAGCCTTGAC
05-65	cdr-2_r	GCCGCTGTAACCTTATCTCC
05-66	cdr-4_f	GTTTGTGTTGCCAGTGAC
05-67	cdr-4_r	GCTCTTGTAGCGGATGAGAATG
05-68	T16G1.6_f	GTTGTTGGAGACGGAAATGG
05-69	T16G1.6_r	GTGCAACTGCCTTTAGAACC
05-70	b0024.4_f	CAACAACATTGAGCGCAGAG
05-71	B0024.4_r	GATCATAACGGCAGGATTTCGAG
05-72	pgp-9_f	CCGAATCCGAGAGTATTGTG
05-73	pgp-9_r	GGCGAAGAAGATGTAGATCC
05-74	Y39B6A.24_f	CCAACTACACCCGACAGAAG
05-75	Y39B6A.24_r	AAGTCCCAACCGCAAACC
05-76	ugt-19_f	CGGACTTATGTCCACCAACAG
05-77	ugt-19_r	GCCAAGACCTCCATGAGTTAC
05-78	ugt-62_f	TATGTCGAGGGACTTACC
05-79	ugt-62_r	TCATCATCGGACTCCATC
05-80	Y47H9C.1_f	CATTGAGTCTGGCGGCATTC
05-81	Y47H9C.1_r	GGTGGCGTTGTTTGTCTTGG
05-82	C34H4.1_f	TAGATCGCTCGACGAATG
05-83	C34H4.1_r	GCCGCTGTTGTTTGATAC
05-84	T07H3.6_f	TCGGACAGTGGTGATTTG
05-85	T07H3.6_r	GGAAGAACGGCTTGAATG
05-86	T16G1.6_f	TTTGGTTGAGCCTGAGTG
05-87	T16G1.6_r	TTTCCGCTTGAAGTCTGG
05-88	C37H5.2_f	CACTTGCTGCTCTAAGACTC
05-89	C37H5.2_r	CCGGCTCCTTCTATGATATG
05-90	F53A9.8_f	CACGACCACCACGATGAAC
05-91	F53A9.8_r	AGTGCTCTCCAGCCTGATG
05-92	F17C11.6_f	TGGAGTGTGAGTCGGTCTTG
05-93	F17C11.6_r	AACGCCATTGCCTCCTTC
05-94	ZK228.4_f	AGAAGCCTATGACCTGAC
05-95	ZK228.4_r	GCAAGACACGGAATACAC
05-96	F42A9.6_f	TTTCGATGGGTGGCCGAAG
05-97	F42A9.6_r	TTCGATTGCGTGGCGAGGAG
05-98	F36D3.1_f	ACGGTCAAGGTGGTAAAG
05-99	F36D3.1_r	CCGCCATTCAAATAGCAG
05-100	C07A9.9_f	GTGACGATTGCTCGGATCATTC
05-101	C07A9.9_r	ACCCATCATGGATGTCGTGTAG

\* c = *C. elegans*, \*\* l = *Lin*

Tab. 9.8 *C. elegans* Klonierungsprimer.

Oligo. Nr.	Bezeichnung	Sequenz (5' zu 3')
05-205	arf-1.1_p*_f1	GCCGAAGCTTGATCTACAAGTTTTCTCTGC
06-38	arf-1.1_p_r	CACGGATCCGCGATATTTGGAAACATGAAGG
06-39	cdr-2_p_f	ACCGGATCCTCAACGGCTCCAACATCAAG
06-40	cdr-2_p_r	TACAAGCTTGAAGTTCCAATAATGGCTGG
06-41	cdr-4_p_f	ACAGTCGACATAGCACCAACCACTAGTG
06-43	T16G1.6_p_f	AGCCGGATCCACTCCATTATCGAGAATCG
06-51	B0024.4_p_f	TACGTCGACTTCCACCGCATGATTTCC
06-52	B0024.4_p_r	AGCGGATCCTGTTGTGCATTGCAGACAG
06-53	pgp-9_p_f	ACCAAGCTTCTTGTGATTGGGAGGAAAGTC
06-54	pgp-9_p_r	ATCGGATCCAATTAGGTGCGGTTCCCTCAG
06-55	KY39B6A.24_p_f	ACCGGATCCCTGGAAGAAAGATAATCGATGC
06-56	KY39B6A.24_p_r	ATCAAGCTTCTTGGGCACGTGTTTCATTCCG
06-57	K08B4.3_p_f	AGTCGGATCCAATTTGACGTGACTGTGACC
06-58	K08B4.3_p_r	ACCGAAGCTTGTGATCTCATCATTGTTGTG
06-59	M88.1_p_f	ACCGGATCCCTTTGTCCATACATCGTTG
06-60	M88.1_p_r	ACCAAGCTTTGCAGGACCAGCAATGTTTC
06-61	Y47H9C.1_p_f	ACAGTCGACAGTTGAGCGGAGCCATACAG
06-62	Y47H9C.1_p_r	ACAGCATGCATTGGAACCAGGGCTGTACG
06-63	C34H4.1_p_f	ACAGCATGCGTTGCTTCCGATGATGATCC
06-64	C34H4.1_p_r	TCAGTCGACATCGTCGCAGAGCACAATAC
06-65	T07H3.6_p_f	ATAGTCGACGAAGGAGGATCTGGCATGG
06-66	T07H3.6_p_r	ACAGCATGCGTCGAAATTCGCGAGTTTGG
06-67	T16G1.4_p_f	ACTGGATCCGACAGCTGAACATGGGTTTG
06-68	T16G1.4_p_r	ACGCAAGCTTCGCTGAAATGTCAGATCC
06-69	arf-1.1_p_f2	GCTCAAGCTTGCAGACCAGTTGGTTCAAG
06-70	cdr-4_p_r	ACAGCATGCATGCTCTTCTGCGAGAC
06-71	T16G1.6_p_r	TCAGCATGCGCTGCTCGCCGGTATTA AATTG
06-99	cdr-2_cDNA_f	ATAGGATCCAATGGTGTGCTCGTGAC
06-102	T16G1.6_cDNA_r	ACACCCGGGACGTACAGAATCTTTTTCTTGG
06-103	M88.1_cDNA_f	ACGCCCGGGATGAAATTGATTGCTCTTTTTTC
06-104	M88.1_cDNA_r	ACTCCCGGGCACAGAAACAACACCTGATTAC
07-09	cdr-2_cDNA_r	ATAGGATCCGGGGTTTTTCATCTACCGG
07-10	T16G1.6_cDNA_f	AGCGGATCCC GAAGTTTTATTTCAAACACACG
07-17	arf-1.1_p_f3	ACAGGATCCGCAGACCAGTTGGTTCAAG
07-18	arf-1.1_cDNA_r	ATACCCGGGATGTCTTCATCTGCTTCTTGAC

\*p = Promoter

### 9.3 RNAi-Bakterienstämme

Tab. 9.9 Die verwendeten RNAi-Bakterienstämme.

RNAi-Stamm	Zielgen	Quelle
arf-1.1 (1732)	F45E4.1/arf-1.1	diese Arbeit
V-8G06	C54D10.1/cdr-2	Hutter Labor
V-8E20	K01D12.11/cdr-4	Hutter Labor
V-8J21	T16G1.6	Hutter Labor
V-7K17	B0024.4	Hutter Labor
V-11J04	C47A10.1/pgp-9	Hutter Labor
IV-3G23	K08B4.3/ugt-19	Geneservice
III-2C16	M88.1/ugt-62	Hutter Labor
I-5N16	Y47H9C.1	Hutter Labor
IV-1F03	C34H4.1	Geneservice
II-1N02	T07H3.6	Geneservice
V-8J17	T16G1.4	Hutter Labor
V-3J10	C37H5.2	Hutter Labor
X-4M20	F53A9.8	Geneservice
V-12I13	ZK228.4	Hutter Labor
V-11E11	F36D3.1	Hutter Labor
III-5O01	C07A9.9	Hutter Labor
IV-5E18	C04G6.3/pld-1	Geneservice
sph-1 (1733)	sph-1	diese Arbeit
sng-1 (1734)	sng-1	diese Arbeit
scm-1 (1735)	scm-1	diese Arbeit

### 9.4 Die für GeneChip<sup>®</sup>-Analysen verwendeten RNA-Proben

Tab. 9.10 Konzentration und Reihheit der RNA von *Mausretinae*.

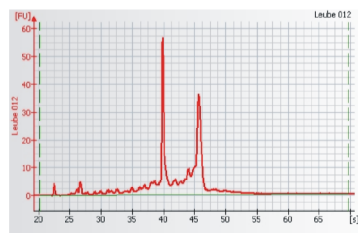
Probe	OD260	OD280	OD260/280 Quotient	Konzentration ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )
12	0,39	0,24	1,64	1,26
13	0,65	0,35	1,84	2,06
14	0,34	0,19	1,75	1,08
15	0,56	0,28	2,04	1,8
19	0,25	0,12	2,08	0,79
20	0,47	0,26	1,8	1,5

Tab. 9.11 Konzentration und Reihheit der RNA von *C. elegans*.

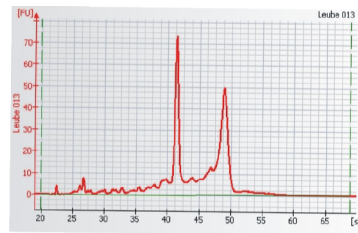
Probe	OD260	OD280	OD260/280 Quotient	Konzentration ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )
52	2,95	1,58	1,87	9,43
54	2,72	1,42	1,92	8,7
55	2,99	1,57	1,91	9,58
60	1,97	1,01	1,96	6,29
62	2,03	1,03	1,97	6,5

## 9. Anhang

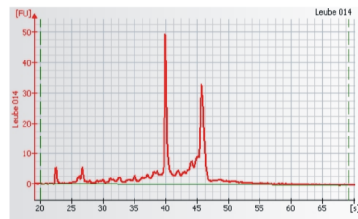
Abb. 9.1 Ergebnisse der RNA-Messung mit dem Agilent Bioanalyzer 2100.



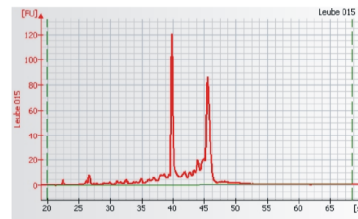
12



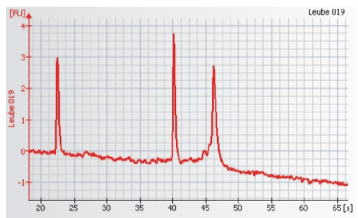
13



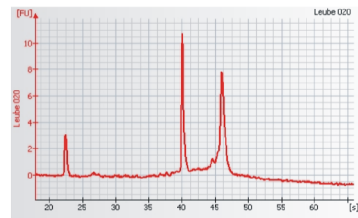
14



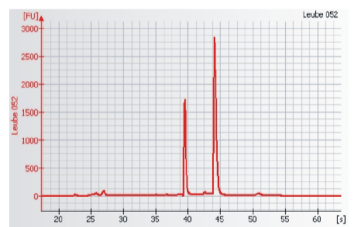
15



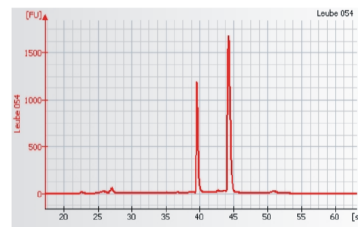
19



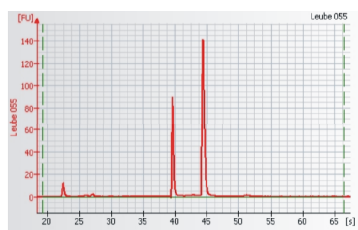
20



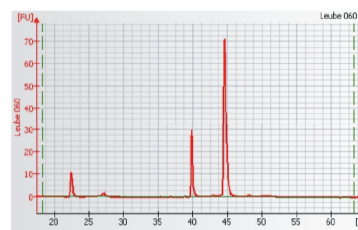
52



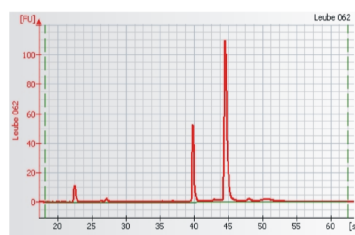
54



55



60



62

## 9.5 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ABC	ATP <i>binding cassette</i>
ADP	Adenosindiphosphat
Amp	Ampicillin
AP	Adaptorprotein
ARF	ADP-Ribosylierungsfaktor
ATP	Adenosintriphosphat
bidest	zweifach destilliert
BLAST	<i>basic local alignment search tool</i>
bp	Basenpaar
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
Ca <sup>2+</sup>	Kalzium-Ionen
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
cdr	Cadmium-empfindlich ( <i>Cadmium Responsive</i> )
CFP	<i>cyane fluorescent protein</i>
chc	<i>clathrin heavy chain</i>
cm	Zentimeter
cRNA	komplementäre RNA
C <sub>T</sub>	Fluoreszenz-Schwellenwert ( <i>threshold cycle</i> )
c-Terminus	(COOH)-Carboxyterminus
d	Tag(e)
DEPC	Diethylpyrocarbonat
d.h.	das heißt
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxyguanosin-5'-Triphosphat
dpy	<i>dumpy</i>
dsDNA	doppelsträngige DANN
dyn	Dynamamin
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ESTs	kurze transkribierte DNA-Sequenz ( <i>expressed sequence tag</i> )
<i>et al.</i>	Und andere
Ex	<i>extrachromosomal</i>
Exp.	Experiment
Fat	<i>FATty acid desaturase</i>
FC	<i>fold change</i>
g	Gramm
g	Erdbeschleunigung
GABA	γ-Aminobuttersäure
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
GTP	Guanosintriphosphat
µg	Mikrogramm
h	Stunde(n)
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure
H <sub>2</sub> O	Wasser
IPTG	Isopropyl-β-Dthiogalactopyranosid

## Anhang

---

kb	Kilobasen
KO	<i>Knockout</i>
l	Liter
LB	Luria-Bertani
µl	Mikroliter
M	Molar
mRNA	<i>messenger RNA</i>
ml	Millimeter
mM	Millimolar
min	Minute(n)
MOPS	3-Morpholonpropansulfonsäure
NGM	nematode growth medium
N-Terminus	(NH <sub>2</sub> )-Aminoternimus
OD	<i>optische Dichte</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )
PIP <sub>2</sub>	Phosphatitylinositol-(4,5)-Bisphosphat
pH	potentia Hydrogenii
PLC	<i>primary liver cancer</i>
PTZ	Pentylentetrazol
RNA	ribonucleotide molecule
RNAi	RNA Interferenz
RNase	Ribonuklease
RT	Reversetranskriptase
RT-PCR	Reversetranskriptase PCR
SCM-1	SCAMP-1 ( <i>c. elegans</i> )
SCAMP	secretory carrier-associated membrane protein
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunden
SNAP	soluble NSF attachment protein receptor
SNB-1	Synaptobrevin-1 ( <i>c. elegans</i> )
SNG-1	Synaptogyrin-1 ( <i>c. elegans</i> )
SNT-1	Synaptotagmin-1 ( <i>c. elegans</i> )
sog.	sogenannt
Sph-1	Synaptophysin-1 (Maus)
SPH-1	Synaptophysin-1 ( <i>c. elegans</i> )
syn	Syntaxin ( <i>c. elegans</i> )
Tab.	Tabelle
Taq	<i>Thermophilus aquaticus</i>
TBE	Tris/Borat/EDTA
TBS	<i>tris-buffered saline</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
tSNARE	target-SNARE
TVP	<i>tetraspan vesicle membrane protein</i>
UDP	Uridindiphosphat
ugt	UDP-glucuronosyltransferase
unc	<i>uncoordinated</i>
UNC-26	Synaptojanin ( <i>c. elegans</i> )
UNC-57	Endophilin A ( <i>c. elegans</i> )
UNC-64	Syntaxin ( <i>c. elegans</i> )
unveröffl.	unöffentlich

UpM	Umdrehung pro Minute
UV	Ultraviolett
VAMP	<i>vesicle-associated membrane protein</i>
V-ATPase	im Tonoplasten (Vakuole) lokalisierte H <sup>+</sup> -ATPase
v-SNARE	<i>vesicle SNARE</i>
WT	Wildtyp
w/v	<i>weight per volume</i>
YFP	<i>yellow fluorescent protein</i>
z. B.	zum Beispiel
ZNB	Zentralnervensystem

## 9.6 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1	Modelle der Vesikelexozytose und der Vesikelregeneration. ....	3
Abb. 1.2	Schematische Darstellung der Hauptproteine synaptischer Vesikel. ....	4
Abb. 1.3	Schematische Darstellung des Endozytosewegs synaptischer Vesikel. ....	7
Abb. 1.4	Der Lebenszyklus von <i>C. elegans</i> . ....	15
Abb. 1.5	Analyse der eukaryotischen Gene Expression mit Hilfe eines <i>GeneChip</i> . ....	17
Abb. 4.1	Affymetrix <i>GeneChip</i> <sup>®</sup> System. ....	44
Abb. 4.2	<i>C. elegans</i> -Genome-Array. ....	44
Abb. 4.3	Standard Protokoll der Affymetrix- <i>GeneChip</i> Analyse. ....	46
Abb. 4.4	Die optimale Position der Injektionsnadel in den distalen Arm der synzytischen Gonade. ....	50
Abb. 5.1	Amplifikationsprofile zweier Proben. ....	56
Abb. 5.2	Analyse der Transkription des Sph-1-Gens in WT- und Sph-1 <sup>-/-</sup> -Mäusen mittels RT-PCR. ....	58
Abb. 5.3	Überprüfung der für die <i>GeneChip</i> <sup>®</sup> -Analyse eingesetzten <i>C. elegans</i> Gesamt-RNAs und Genomtypbestimmung mittels PCR. ....	60
Abb. 5.4	Die transkriptionellen Veränderungen der drei TVP-Gene in TVP-defizienten <i>C. elegans</i> . ....	64
Abb. 5.5	Aldicarb Resistenz-Assays nach RNA-Interferenz gegen die zwölf durch quantitative <i>Real-Time</i> RT-PCR bestätigten, hochregulierten Kandidatengene. ....	69
Abb. 5.6	Überlebensraten nach temporärer Cadmiumchlorid-Exposition. ....	71
Abb. 5.7	Expressionsanalyse von <i>Parf-1.1::cfp</i> , <i>Pcdr-2::cfp</i> , <i>PT16G1.6::cfp</i> und <i>Pugt-6::cfp</i> mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie. ....	73
Abb. 5.8	Partielle intestinale Kolokalisierung von ARF-1.1::CFP mit SPH-1::YFP in konfokaler Laserfluoreszenzmikroskopie. ....	74
Abb. 5.9	Partielle intestinale Kolokalisierung von CDR-2::CFP mit SCM-1::YFP und SPH-1::YFP mittels konfokaler Laserfluoreszenzmikroskopie. ....	75

## Anhang

---

Abb. 5.10	DNA-Agarosegel zur Überprüfung des mikroinjizierten Synaptogyrin-1-überexprimierenden Stamms BJ210 mit Hilfe der Einzelwurm-PCR. ....	77
Abb. 5.11	Erhöhte Resistenz der Synaptogyrin-1-Mutanten gegenüber Aldicarb in Abhängigkeit von Konzentrationen und Zeit. ....	78
Abb. 5.12	PTZ-induzierte epilepsieähnliche Konvulsion in den SNG-1-überexprimierenden und <i>sng-1(ok234)</i> -Mutanten. ....	80
Abb. 5.13	Synthetische genetische Interaktionen zwischen <i>sng-1(ok234)</i> - und Synaptotagmin-1-, Endophilin A- und Synaptojanin-Genen. ....	83
Abb. 5.14	Pharyngeale Pumpbewegung in WT, BJ14 und durch Verpaarung mit BJ14 generierten Doppelmutanten. ....	84
Abb. 5.15	Synthetische genetische Interaktionen zwischen <i>sng-1(ok234)</i> und Synaptotagmin-1-, Endophilin A- und Synaptojanin Genen. ....	85
Abb. 6.1	Schematische Darstellung der Regulation der kleinen GTPase <i>arf-1</i> . ....	92
Abb. 9.1	Ergebnisse der RNA-Messung mit dem Agilent Bioanalyzer 2100. ....	125

### 9.7 Tabellenverzeichnis

Tab. 1.1	Die wichtigsten in den synaptischen Vesikelzyklus einbezogenen <i>C. elegans</i> Proteine. ....	16
Tab. 3.1	Die verwendeten Plasmide. ....	25
Tab. 3.2	Restriktionsendonukleasen und ihre Erkennungssequenzen. ....	26
Tab. 3.3	Die verwendeten <i>E. Coli</i> -Stämme. ....	29
Tab. 4.1	Standard Ansatz für die Dephosphorylierung von DNA. ....	35
Tab. 4.2	Standard-Ansatz für reverse Transkription (20 µl in RNase-freiem Wasser). ....	40
Tab. 4.3	Standard PCR-Ansatz. ....	40
Tab. 4.4	Standardprogramm für PCR. ....	41
Tab. 4.5	Standard RT-PCR-Ansatz (25 µl). ....	41
Tab. 4.6	Standardprogramm für RT-PCR. ....	41
Tab. 4.7	Standard <i>Real-Time</i> RT-PCR-Ansatz (25 µl). ....	42
Tab. 4.8	Standardprogramm für quantitative <i>Real-Time</i> RT-PCR. ....	43
Tab. 4.9	Standard-Mikroinjektionsmix (ohne Koinjektionsmarker). ....	51
Tab. 4.10	Standard-Mikroinjektionsmix (mit Koinjektionsmarker). ....	51
Tab. 5.1	RNA-Isolierung für die Maus-Chip-Analyse (W = Woche, T = Tag). ....	55
Tab. 5.2	Gene mit veränderter RNA-Expression in der Retina von <i>Sph-1<sup>-/-</sup></i> -Mäusen. ....	55
Tab. 5.3	Validierung der Maus-Chip-Ergebnisse durch quantitative <i>Real-Time</i> RT-PCR. ....	57
Tab. 5.4	Vergleich der Transkriptsniveaus des <i>Sph-1</i> -Gens im Microarray von <i>Sph-1<sup>-/-</sup></i> und WT-Mäusen. ....	58

## Anhang

---

Tab. 5.5	Differenzielles Expressionsprofil der TVP-Dreifachmutanten und WT- <i>C. elegans</i> . .....	61
Tab. 5.6	Validierung der Microchip-Analysen mittels quantitativer <i>Real-Time</i> RT-PCR. ....	63
Tab. 5.7	Übersicht der Expressionsprofile von zwölf Genen, die sich in TVP- Mutanten von WT-Tieren unterscheiden. ....	66
Tab. 5.8	Übersicht des Expressionsniveaus der remanenten TVP-Gene in TVP-Einfach- und Doppelmutanten. ....	67
Tab. 5.9	Die Transkriptionskonstrukte der vier etablierten transgenen Stämme. ....	72
Tab. 5.10	Die Translationskonstrukte von ARF-1.1 und CDR-2. ....	74
Tab. 5.11	Translationskonstrukt von <i>Psng-1:sng-1</i> . ....	76
Tab. 5.12	Die für einen genetischen Interaktions-Screen verwandten <i>C. elegans</i> -Stämme.....	81
Tab. 9.1	Allgemeine <i>C. elegans</i> -Stämme. ....	119
Tab. 9.2	Durch Verpaarung hergestellte Stämme. ....	120
Tab. 9.3	Durch Mikroinjektion hergestellte Stämme. ....	120
Tab. 9.4	Maus DNA-Primer. ....	121
Tab. 9.5	Maus cDNA Primer für quantitative <i>Real-Time</i> RT-PCR. ....	121
Tab. 9.6	<i>C. elegans</i> DNA Primer. ....	121
Tab. 9.7	<i>C. elegans</i> cDNA Primer für quantitative <i>Real-Time</i> RT-PCR. ....	122
Tab. 9.8	<i>C. elegans</i> Klonierungsprimer. ....	123
Tab. 9.9	Die verwendeten RNAi-Bakterienstämme. ....	124
Tab. 9.10	Konzentration und Reihheit der RNA von Mausretinae. ....	124
Tab. 9.11	Konzentration und Reihheit der RNA von <i>C. elegans</i> . ....	124

## **Eidstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, Lin Bai, geboren am 10.04.1972 in Liaoning, China, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen verwendet habe. Wörtlich oder inhaltlich zitierte Stellen wurden als solche kenntlich gemacht.

Mainz

Lin Bai