

**Molekulare Untersuchungen der *mex-3/pal-1* Interaktion
und genomweiter phylogenetischer Vergleich des
MEX-3 Protein Netzwerks in Nematoden**

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen-Fakultät

der Universität zu Köln

vorgelegt von

Julia Camps

aus Köln

Köln

2013

Berichtersteller:

Prof. Dr. Einhard Schierenberg

PD. Dr. Michael Kroiher

Tag der mündlichen Prüfung: 15. Oktober 2012

„Würdest du mir bitte sagen,
wie ich von hier aus weitergehen soll?“

„Das hängt zum großen Teil davon ab,
wohin du möchtest“ sagte die Katze

Lewis Carroll „Alice im Wunderland“

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|------------|
| Inhaltsverzeichnis | I |
| Abbildungsverzeichnis | V |
| Tabellenverzeichnis..... | VI |
| Abkürzungen..... | VII |
| 1 Einleitung | 1 |
| 1.1 Phylogenie der Nematoden | 1 |
| 1.2 Gemeinsamkeiten und Unterschiede in der Embryonalentwicklung | 3 |
| 1.3 maternale Genprodukte und das Spermium sind entscheidend für die Festlegung der anterior-posterioren Achse in <i>C. elegans</i> | 5 |
| 1.4 Bei parthenogenetischen Nematoden wird die anterior-posteriore Achse ohne Spermium determiniert..... | 7 |
| 1.5 Die korrekte Lokalisation der <i>mex-3</i> und <i>pal-1</i> mRNA spielt eine entscheidende Rolle in der Embryonalentwicklung | 7 |
| 1.6 Die Regulation von <i>mex-3</i> und <i>pal-1</i> in der Gonade..... | 10 |
| 1.7 Die embryonale mRNA Lokalisation von <i>mex-3</i> zeigt innerhalb der Nematoden deutliche Unterschiede | 10 |
| 1.8 Ziele der Arbeit..... | 12 |
| 2 Material und Methoden | 15 |
| 2.1 Nematoden..... | 15 |
| 2.1.1 Verwendete Nematodenstämme..... | 15 |
| 2.1.2 Zucht von Nematoden..... | 15 |
| 2.1.2.1 Minimalmedium Agarplatten..... | 15 |
| 2.1.2.2 NGM Agarplatten | 16 |
| 2.1.2.3 EP Agarplatten | 16 |
| 2.1.2.4 <i>E. coli</i> als Futterquelle | 16 |
| 2.2 Molekularbiologische Methoden | 17 |
| 2.2.1 RNA Isolierung | 17 |
| 2.2.2 cDNA Synthese | 18 |
| 2.2.3 Polymerase Kettenreaktion (PCR) | 19 |
| 2.2.3.1 genspezifische Oligonukleotide | 21 |

| | | |
|---------|--|----|
| 2.2.3.2 | degenerierte Oligonukleotide..... | 23 |
| 2.2.3.3 | Nested PCR | 24 |
| 2.2.3.4 | 3' RACE PCR | 24 |
| 2.2.3.5 | 5' SL1 PCR | 24 |
| 2.2.4 | Agarosegelelektrophorese | 24 |
| 2.2.5 | Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen | 25 |
| 2.2.6 | Ligation..... | 25 |
| 2.2.6.1 | T/A Ligation..... | 25 |
| 2.2.6.2 | Ligation über Restriktionsschnittstellen | 26 |
| 2.2.7 | Plasmide | 26 |
| 2.2.8 | Transformation | 27 |
| 2.2.9 | Plasmid DNA Präparation..... | 28 |
| 2.2.10 | Restriktionsverdau | 29 |
| 2.2.11 | Sequenzierung..... | 29 |
| 2.2.12 | Analyse der Sequenzdaten..... | 30 |
| 2.3 | Proteinbiochemische Methoden | 30 |
| 2.3.1 | Heterologe Expression von rekombinanten Proteinen..... | 30 |
| 2.3.2 | Batch-Aufreinigung von His getagten Proteinen | 31 |
| 2.3.3 | SDS Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE) | 31 |
| 2.3.4 | Western Blot | 31 |
| 2.3.5 | Antikörperherstellung..... | 31 |
| 2.4 | Expressionanalyse..... | 32 |
| 2.4.1 | Präparation von Embryonen für RNA und Proteinfärbungen..... | 32 |
| 2.4.2 | Sondensynthese für RNA <i>in situ</i> Hybridisierung | 32 |
| 2.4.3 | RNA <i>in situ</i> Hybridisierung | 33 |
| 2.4.4 | Antikörperfärbung | 34 |
| 2.5 | Herstellung von Transgenen | 35 |
| 2.5.1 | Kultivierung und Vorbereitung der Würmer zum Bombardment | 35 |
| 2.5.2 | Beladung der Goldpartikel | 35 |
| 2.5.3 | Particle Bombardment | 36 |
| 2.5.4 | Selektion der transgenen Nematoden..... | 37 |
| 2.6 | RNA Interferenz | 37 |
| 2.7 | Mikroskopie | 38 |
| 2.8 | Enzyme..... | 38 |

| | | |
|----------|--|-----------|
| 2.9 | Chemikalien | 38 |
| 2.10 | Sequenzdatenbanken und Genome | 38 |
| 2.10.1 | Öffentlich zugängliche Datenbanken und Genome | 38 |
| 2.10.2 | Interne Sequenzdatenbanken und Genome | 39 |
| 2.11 | Geräte | 39 |
| 3 | Ergebnisse | 43 |
| 3.1 | <i>Diploscapter coronatus</i> zeigt gravierende Unterschiede in der Expression der <i>pal-1</i> und <i>mex-3</i> mRNA im Vergleich zu <i>C. elegans</i> | 43 |
| 3.2 | Expression des <i>Diploscapter coronatus</i> PAL-1 Proteins | 45 |
| 3.3 | <i>A. nanus</i> und <i>Acrobelooides sp.</i> (PS1146) zeigen Unterschiede im <i>mex-3</i> mRNA Expressionsmuster | 49 |
| 3.4 | Die <i>Panagrolaimiden</i> bieten ein attraktives Modell zur vergleichenden Untersuchung der <i>mex-3</i> / <i>pal-1</i> Expression | 52 |
| 3.4.1 | Die PS1159, JU765 und <i>P. superbus</i> <i>mex-3</i> und <i>pal-1</i> Homologe zeigen deutliche Sequenzunterschiede innerhalb der konservierten Domänen | 52 |
| 3.4.2 | mRNA <i>in situ</i> Hybridisierungen zeigen ein ähnliches <i>mex-3</i> und <i>pal-1</i> Expressionsmuster innerhalb der untersuchten <i>Panagrolaimiden</i> | 54 |
| 3.4.3 | In PS1159 unterscheiden sich die <i>mex-3</i> mRNA- und Protein-Expressionsmuster deutlich voneinander | 56 |
| 3.5 | Die Exon / Intron Verteilung der <i>pal-1</i> und <i>mex-3</i> Gene zeigt deutliche Unterschiede | 59 |
| 3.6 | Sequenzanalysen weisen darauf hin, dass die <i>mex-3</i> / <i>pal-1</i> Interaktion in der frühen Embryogenese auf Vertreter der Gattung <i>Caenorhabditis</i> beschränkt ist .. | 61 |
| 3.6.1 | Die KH-Domänen aller analysierten <i>mex-3</i> Homologe können mRNA binden | 62 |
| 3.6.2 | Das MEX-3 Recognition Element in der <i>pal-1</i> 3'UTR wurde nur bei Vertretern der Gattung <i>Caenorhabditis</i> gefunden | 63 |
| 3.7 | <i>in vivo</i> Funktionstest der Interaktion zwischen dem <i>C. elegans</i> MEX-3 Protein und den <i>pal-1</i> 3'UTRs von PS1159, JU765 und <i>P. superbus</i> | 64 |
| 3.7.1 | Selektion der transgenen Tiere | 65 |
| 3.7.2 | Die GFP-Expression der Transgene liegt unter der mikroskopischen Nachweisgrenze .. | 68 |
| 3.7.3 | <i>Mex-3</i> RNAi mit Transgenen soll zu einer verstärkten GFP Expression führen | 70 |
| 3.8 | Das <i>C. elegans</i> <i>mex-3</i> / <i>pal-1</i> Netzwerk ist offenbar auf die Gattung <i>Caenorhabditis</i> beschränkt | 70 |
| 4 | Diskussion | 75 |

| | | |
|----------|---|------------|
| 4.1 | <i>mex-3</i> Homologe zeigen eine starke Konservierung der funktionalen KH-Domäne aber gravierende Unterschiede in Genaufbau und Expression..... | 75 |
| 4.2 | <i>pal-1</i> mRNA kann nur in <i>Caenorhabditis</i> -Vertretern vom MEX-3 Protein erkannt und gebunden werden | 77 |
| 4.3 | Die Expressionsmuster von <i>mex-3</i> und <i>pal-1</i> weisen auf eine zeitliche Transformation der Interaktion von <i>pal-1</i> mRNA und MEX-3 Protein hin..... | 78 |
| 4.4 | Das <i>C. elegans mex-3/pal-1</i> Netzwerk ist in Nematoden evolutionär nicht konserviert..... | 82 |
| 4.5 | Modelle der <i>mex-3</i> Regulation in <i>D. coronatus</i> , <i>A. nanus</i> , PS1159 und JU765 | 84 |
| 4.6 | Zur Überprüfung der Modelle sind weitere Untersuchungen des <i>C. elegans</i> Netzwerks <i>in vivo</i> und <i>in vitro</i> notwendig | 85 |
| 5 | Zusammenfassung | 89 |
| 6 | Abstract | 91 |
| 7 | Literaturverzeichnis | 95 |
| | Danksagung..... | 103 |
| | Erklärung..... | 105 |

Abbildungsverzeichnis

| | |
|--|----|
| Abbildung 1-1: phylogenetische Stammbaum der Nematoden | 2 |
| Abbildung 1-2: Frühe Zellteilungen von <i>C. elegans</i> , <i>D. coronatus</i> und <i>A. nanus</i> :..... | 4 |
| Abbildung 1-3: Verteilung der PAR Protein Komplexe und P-Granula vor der Zygotenbildung:..... | 6 |
| Abbildung 1-4: Lokalisation und Interaktion der maternalen Genprodukte im <i>C. elegans</i> Embryo: | 9 |
| Abbildung 1-5: Lokalisation der <i>mex-3</i> mRNA in <i>C. elegans</i> , <i>D. coronatus</i> und <i>A. nanus</i> : | 11 |
| Abbildung 3-1: <i>mex-3</i> und <i>pal-1</i> mRNA Verteilung in <i>D. coronatus</i> : | 44 |
| Abbildung 3-2: mRNA doppel <i>in situ</i> Hybridisierung von <i>mex-3</i> und <i>pal-1</i> in <i>D. coronatus</i> :..... | 45 |
| Abbildung 3-3: Expression und Reinigung des <i>D. coronatus</i> PAL-1 Fragments: | 46 |
| Abbildung 3-4: Antikörperfärbung gegen das PAL-1 Protein aus <i>D. coronatus</i> :..... | 47 |
| Abbildung 3-5: Expression des 8 kDa MEX-3 Fragments aus <i>D. coronatus</i> : | 48 |
| Abbildung 3-6: Heterologe Expression und Reinigung des <i>D. coronatus</i> MEX-3 Proteins: | 48 |
| Abbildung 3-7: Nukleinsäuresequenzvergleich von <i>A. nanus mex-3</i> und PS1146 <i>mex-3</i> :..... | 49 |
| Abbildung 3-8: <i>mex-3</i> mRNA <i>in situ</i> Hybridisierung in den beiden Cephalobiden <i>A. nanus</i> und PS1146: | 51 |
| Abbildung 3-9: Nukleinsäuresequenzvergleich der <i>mex-3</i> KH-Domäne der <i>Panagrolaimiden</i> :..... | 53 |
| Abbildung 3-10: mRNA <i>in situ</i> Hybridisierung von <i>mex-3</i> und <i>pal-1</i> in <i>Panagrolaimus sp.</i> PS1159:..... | 55 |
| Abbildung 3-11: Heterologe Expression und Aufreinigung von <i>Panagrolaimus sp.</i> PS1159 MEX-3: | 56 |
| Abbildung 3-12: Immunhistochemische Färbung von PS1159 MEX-3: | 59 |
| Abbildung 3-13: Exon / Intron Struktur der <i>pal-1</i> Gene: | 60 |
| Abbildung 3-14: Exon / Intron Struktur der <i>mex-3</i> Gene: | 61 |
| Abbildung 3-15: Aminosäuresequenzanalyse der <i>mex-3</i> KH-Domäne in ausgewählten Nematoden: | 62 |
| Abbildung 3-16: MEX-3 Recognition Element (MRE):..... | 63 |
| Abbildung 3-17: Schematische Darstellung der Lage der MREs: | 64 |
| Abbildung 3-18: Phänotypische Selektion der transgenen Linien: | 66 |
| Abbildung 3-19: Agarosegel der PCR Tests der phänotypisch positiv selektierten transgenen Linien. | 67 |
| Abbildung 3-20: Western Blot der Wurmlysate der stabilen transgenen Linien gegen GFP. | 68 |
| Abbildung 3-21: Mikroskopische Analyse der stabilen transgenen Linien: | 69 |
| Abbildung 3-22: MEX-3 Proteinnetzwer in <i>C. elegans</i> :..... | 71 |
| Abbildung 3-23: MEX-3 Protein Netzwerk in Nematoden verschiedener Claden:..... | 73 |
| Abbildung 4-1: Modelle zur Regulation der <i>mex-3</i> Lokalisation in Nematoden: A: Modell der <i>mex-3</i> Lokalisation bei <i>C. elegans</i> B: | 85 |

Tabellenverzeichnis

| | |
|--|----|
| Tabelle 2-1 Bezeichnung und Codierung der Nematodenstämme: | 15 |
| Tabelle 2-2: Als Futterquelle verwendete <i>E. coli</i> Stämme | 17 |
| Tabelle 2-3: PCR Bedingungen für Standard PCR | 20 |
| Tabelle 2-4: PCR Bedingungen für Phusion PCR..... | 21 |
| Tabelle 2-5: genspezifische Oligonukleotide..... | 21 |
| Tabelle 2-6: degenerierte Oligonukleotide | 23 |
| Tabelle 2-7: Verwendete Plasmide | 26 |
| Tabelle 2-8: Zur Transformation verwendete <i>E. coli</i> Stämme..... | 27 |
| Tabelle 2-9: Oligonukleotide zur Sequenzierung | 30 |
| Tabelle 2-10: Dauer der Hypochloridbehandlung | 32 |
| Tabelle 2-11: Objektive und Okulare..... | 38 |
| Tabelle 2-12: Verwendete Geräte mit Modellbezeichnung und Herstellerangabe | 39 |
| Tabelle 3-1: Verwendete Bombardment Konstrukte | 65 |
| Tabelle 4-1: mRNA Expressionsdomänen von <i>mex-3</i> und <i>pal-1</i> im 4-Zellstadium:..... | 81 |
| Tabelle 4-2: mRNA Expressionsdomänen von <i>mex-3</i> und <i>pal-1</i> zu Beginn der Morphogenese: | 82 |

Abkürzungen

| | |
|-------------------|--|
| AS | Aminosäure |
| Amp | Ampicillin |
| BCIP | 5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat |
| bp | Basenpaare |
| BSA | N,O-Bis(trimethylsilyl)acetamid |
| bzw. | beziehungsweise |
| °C | Grad Celsius |
| CaCl ₂ | Calciumchlorid |
| cDNA | complementary DNA |
| DAPI | 4',6-Diamidino-2-phenylindol |
| DEPC | Diethylpyrocarbonat |
| dest. | destilliert |
| dNTPs | Desoxyribonukleotid-5-triphosphat |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| dsRNA | doppelsträngige RNA |
| E. coli | Escherichia coli |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| EtOH | Ethanol |
| G | gonochoristisch |
| g | Gramm |
| GFP grün | fluoreszierende Protein |
| Hybmix | Hybridisierungsmix |
| H | hermaphrotitisch |
| H ₂ O | Wasser |
| IPTG | Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid |
| KOH | Kaliumhydroxid |
| KPO ⁴⁻ | Kaliumphosphat |
| LB | lysogeny broth |
| LiCl | Lithiumchlorid |
| <i>mex-3</i> | Muscle Excess Gene 3 |
| mg | Milligramm |
| Min | Minute |
| ml | Milliliter |
| M | Molar |
| mM | Millimolar |
| MeOH | Methanol |
| MgCl ₂ | Magnesiumchlorid |
| NaAcetat | Natriumacetat |
| NaCl | Natriumchlorid |
| NaOH | Natriumhydroxid |
| NBT | Nitroblau-Tetrazoliumchlorid |
| ng | Nanogramm |
| nm | Nanometer |
| P | parthenogenetisch |
| <i>pal-1</i> | Posterior Alae in Males Gene 1 |

| | |
|------|--------------------------------------|
| PBS | Phosphate Buffered Saline |
| PBST | Phosphate Buffered Saline with Tween |
| PCR | Polymerase Chain Reaction |
| PVA | Polyvinylalkohol |
| rDNA | ribosomale DNA |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| RNAi | RNA-Interferenz |
| rDNA | ribosomale DNA |
| RT | Raumtemperatur |
| sec | Sekunde |
| SDS | Natriumlaurylsulfat |
| SSC | Standard Saline Citrate |
| SSU | small subunit (kleine Untereinheit) |
| Std. | Stunde |
| TBE | TRIS-Borat-EDTA |
| Tris | Tris(hydroxymethyl)-aminomethan |
| U | Unit |
| µg | Microgramm |
| µl | Microliter |
| ÜN | über Nacht |
| WT | Wildtyp |

IUPAC-Code für Nukleotide:

| | |
|---|----------------|
| A | Adenin |
| B | C, G oder T |
| C | Cytosin |
| D | A, G oder T |
| H | A, C oder T |
| G | Guanin |
| K | G oder T |
| M | A oder C |
| N | G, A, T oder C |
| R | A oder G |
| S | C oder G |
| T | Thymidin |
| V | A, C oder G |
| W | A oder T |
| Y | C oder T |

IUPAC-Code für Aminosäuren:

| | |
|---|----------------|
| A | Alanin |
| C | Cystein |
| D | Asparaginsäure |
| E | Glutaminsäure |
| F | Phenylalanin |
| G | Glycin |
| H | Histidin |
| I | Isoleucin |
| K | Lysin |
| L | Leucin |
| M | Methionin |
| N | Asparagin |
| P | Prolin |
| Q | Glutamin |
| R | Arginin |
| S | Serin |
| T | Threonin |
| V | Valin |
| W | Tryptophan |
| Y | Tyrosin |

1 Einleitung

Der Stamm der Nematoden ist einer der am weitesten verbreiteten und umfangreichsten im gesamten Tierreich. Es existieren unterschiedlichen Schätzungen, denen zufolge zwischen 100.000 und 100.000.000 Arten existieren sollen (Meldal et al., 2007). Die Nematoden haben nahezu alle Habitate besiedelt. Neben terrestrischen, aquatischen und marinen Formen existieren auch diverse tier- und pflanzenparasitäre Arten (Convey & McInnes, 2005; Freckman & Virginia, 1997). Wie die Habitate weisen auch die Nahrungsquellen ein breites Spektrum auf, deswegen finden sich neben bakteriovoren auch fungivore, algivore, parasitäre und omnivore Nematodenarten (Dorris et al., 1999).

Der heute als Modellorganismus bekannte terrestrische Nematode *Caenorhabditis elegans* wurde erstmals von Maupas im Jahre 1899 beschrieben (Maupas, 1899). Ein knappes Jahrhundert später wurde er von Brenner als genetisches Modellsystem etabliert (Brenner, 1974). Aufgrund seines invarianten Zellstammbaumes konnte das Verhalten und Schicksal jeder einzelnen Zelle in einem Zellstammbaum aufgeklärt werden (Kimble & Hirsh, 1979; Sulston & Horvitz, 1977; Sulston et al., 1983). Die Tatsache des invarianten Zellstammbaums (am Ende der Embryonalentwicklung 558 Zellen im Hermaphroditen und 560 Zellen im selten auftretenden Männchen; Sulston et al., 1983) und die hohe Transparenz des Embryos, die einfache mikroskopische Untersuchungen erlaubte, führten dazu, dass *C. elegans* als Modellorganismus für verschiedenste entwicklungsbiologische Studien gewählt wurde. Das daraus resultierende Interesse und sein relativ kleines Genom (8×10^7 bp) führten dazu, dass *C. elegans* als erster tierischer Organismus sequenziert wurde (The *C. elegans* Sequencing Consortium, 1998). Es stellte sich heraus, dass dieser Nematode knapp 20.000 Gene besitzt.

1.1 Phylogenie der Nematoden

Die Nematoden wurden ursprünglich in zwei Klassen unterteilt (Chitwood & Chitwood 1938), die Secernentea und die Adenophorea, doch diese relativ einfache Einteilung ist heute überholt.

Der erste phylogenetische Stammbaum, der auf molekularen Daten der small subunit (SSU) rDNA basierte, unterteilte die Nematoden in 5 Claden (Blaxter et al. 1998). Eine neuere Arbeit zur Phylogenie der Nematoden unterteilt das Phylum basierend auf SSU rDNA Analysen in 12 Claden (Holterman et al., 2006). Die Claden 8-12 dieses phylogenetischen Stammbaums können etwa mit den Secernentea, die basaleren Nematoden der Claden 1-7 grob mit den Adenophorea korreliert werden. In der vorliegenden Arbeit wurde die phylogenetische Einteilung nach Holterman verwendet (s.o.). Die molekular untersuchten Nematoden gehören den Claden 9, 10 und 11 an (Abbildung 1-1). Für *in silico* Studien wurden zusätzlich zwei Vertreter von Clade 2, *Romanomermis culicivorax* und *Trichinella spiralis* in die Betrachtung mit einbezogen.

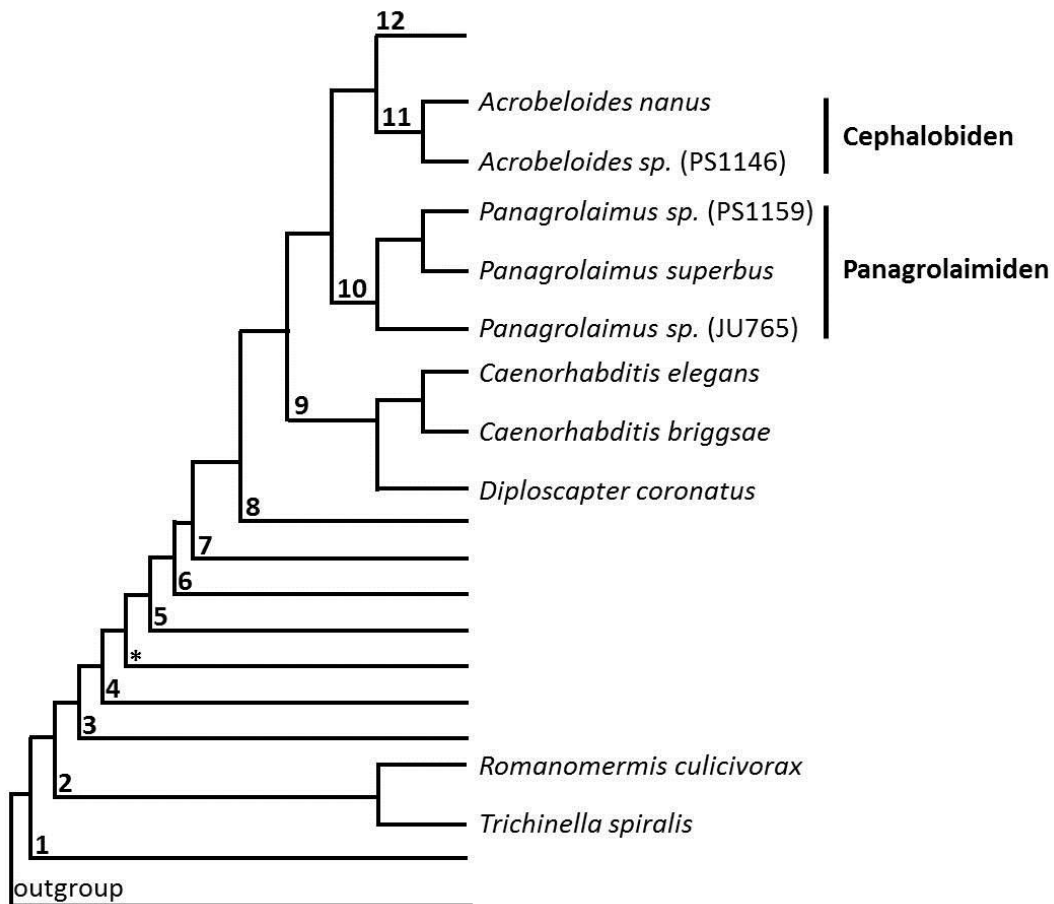


Abbildung 1-1: phylogenetische Stammbaum der Nematoden (verändert nach Holterman et al. 2006): 1-12: Claden nach Holterman et al., * unauflöster Ast. Die Astlängen entsprechen nicht der phylogenetischen Divergenz.

1.2 Gemeinsamkeiten und Unterschiede in der Embryonalentwicklung

Für den ungeübten und sogar für den mit Nematoden vertrauten Betrachter sind verschiedene Arten morphologisch schwer zu unterscheiden. Alle Nematoden besitzen eine fadenartige Körperform, die in Länge und Dicke zwar variabel, sonst aber nahezu identisch ist. Betrachtet man allerdings die Embryonalentwicklung der Nematoden findet man gravierende Unterschiede sowohl in der Abfolge der Zellteilungen, als auch in der räumlichen Lage der Zellen. Bei *C. elegans* folgt die Entwicklung immer demselben invarianten Zellstammbaummuster, demzufolge die Zellen sowohl zeitlich, als auch räumlich immer die gleiche Anordnung aufweisen (Sulston et al., 1983). Auch alle andern im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Nematoden zeigen ein invariantes Muster aus dessen frühen Teilungen die Gründerzellen AB, E, MS, C, D und P4 hervorgehen (Abbildung 1-2). Betrachtet man allerdings die Teilungsabfolge und die räumliche Lage der Zellen werden gravierende Unterschiede zum Modellorganismus *C. elegans* deutlich. In *C. elegans* finden im 4-Zellstadium Induktionen statt, die für eine korrekte Schicksalsfestlegung in den Zellen essentiell sind. Über den Wnt/Frizzled Signalweg (Petersen & Reddien, 2009) wird EMS durch P2 induziert, was in einer späteren asymmetrischen Teilung von EMS in E und MS resultiert. ABp wird von P2 über den Delta/Notch Signalweg induziert, was zu einer unterschiedlichen Schicksalsfestlegung in den beiden Tochterzellen ABp und ABa führt. Betrachtet man im Vergleich den ebenfalls zur Clade 9 zugeordneten *D. coronatus* wird deutlich, dass im 4-Zellstadium, in dem die für *C. elegans* essentiellen Induktionen stattfinden die räumliche Lage der Zellen eine Induktion von ABp durch P2 unmöglich macht (Abbildung 1-2). Bei *A. nanus* (Clade 10) führt die verfrühte Teilung der Keimbahnzellen dazu, dass P2 und EMS nicht gleichzeitig existieren und somit eine Induktion von EMS durch P2 unmöglich ist (Abbildung 1-2).

Auffallend sind die großen Unterschiede im Teilungsrhythmus der Keimbahnzellen. Während die Urkeimzelle P4 in *C. elegans* erst im 16-Zellstadium geboren wird entsteht sie bei *D. coronatus* und *A. nanus* bereits im 6-Zellstadium (Abbildung 1-2).

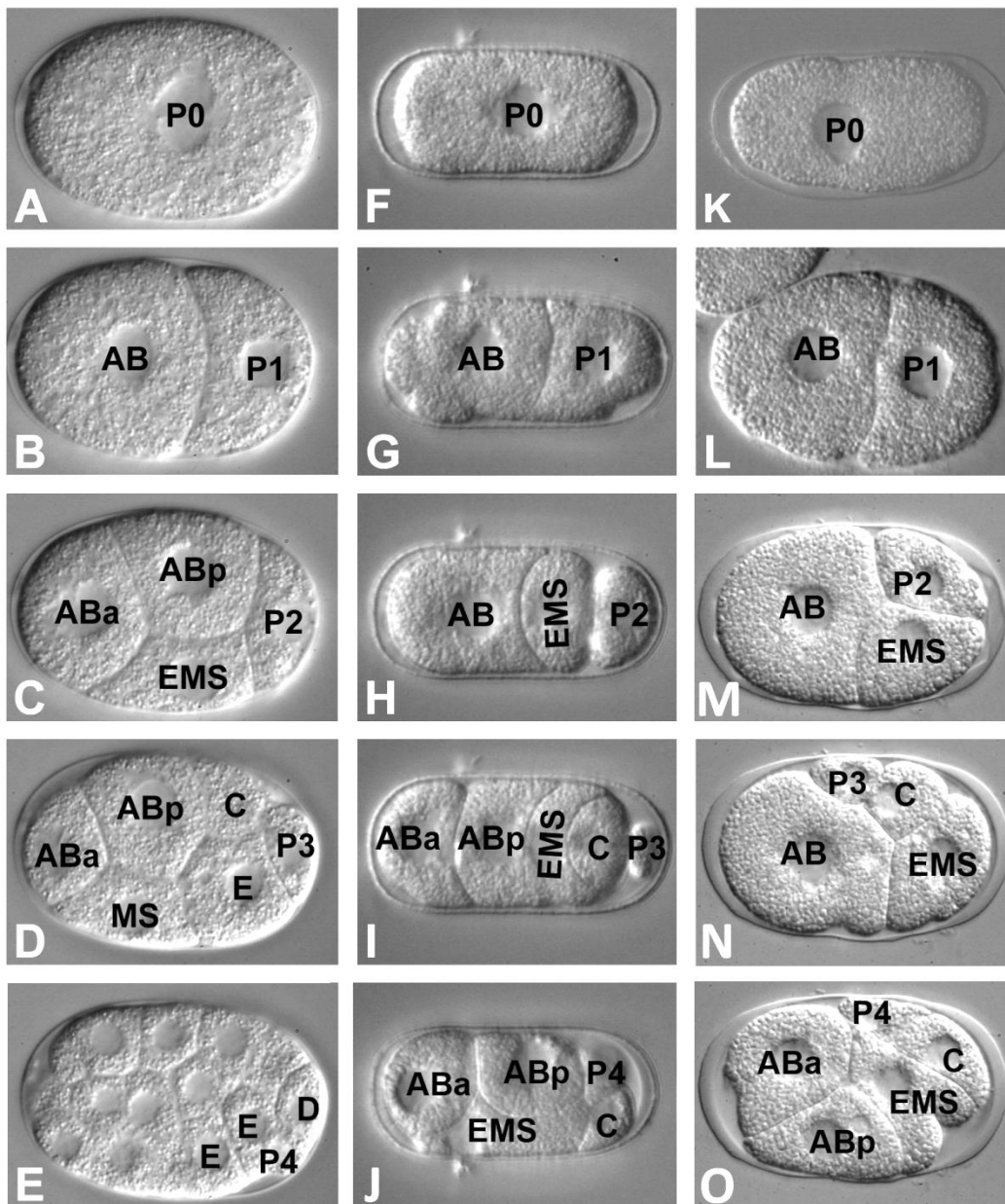


Abbildung 1-2: Frühe Zellteilungen von *C. elegans*, *D. coronatus* und *A. nanus*: Gezeigt sind jeweils die Stadien nach Teilung der P-Zelle. A-E: *C. elegans* F-J: *D. coronatus* K-O: *A. nanus*. Ausrichtung der Embryonen: anterior-links, dorsal-oben. (Die Bilder sind aus Videosequenzen entnommen, die von Jens Schulze erstellt wurden.)

1.3 maternale Genprodukte und das Spermium sind entscheidend für die Festlegung der anterior-posterioren Achse in *C. elegans*

In *C. elegans* ist die zygotische Expression erst ab einem späteren Zeitpunkt der Embryonalentwicklung notwendig. Bis zum 28-Zellstadium entwickelt sich der Embryo auch bei vollständiger Inhibition der embryonalen Transkription normal (Powell-Coffman et al., 1996). Aus diesem Grund spielen während der ersten Zellteilungen maternale Genprodukte eine entscheidende Rolle. Diese maternalen Genprodukte werden während der Oogenese in großer Zahl in der Eizelle eingelagert und werden für eine korrekte frühe Embryonalentwicklung benötigt (Lausch & Schierenberg, 2004). Experimente, bei denen die zygotische Transkription blockiert wurde zeigten, dass die Bildung der Gründerzellen (AB, E, MS, C und D) auch ohne diese abläuft (Edgar & McGhee, 1988).

Bereits vor Beginn der ersten Zellteilung kommt es in *C. elegans* zur Asymmetrie in der Zygote. Durch den Eintritt des Spermiums in die Oozyte wird ein Prozess in Gang gesetzt, der die Symmetrie im Ei bricht und an dessen Ende die Etablierung der anterior-posterioren Körperachse steht. Die Spermieintrittsstelle definiert hierbei den posterioren Pol des Embryos (Goldstein & Hird, 1996), der in 98% der Fälle der der Vulva zugewandt ist (Lahl et al. 2006).

Das Spermium bringt neben einem haploiden Chromosomensatz auch ein Centriol in die Oozyte ein. Das daraus entstehende Centrosom interagiert mit dem Kortex und induziert eine durch Akto-Myosinkontraktionen initiierte gerichtete Zytoplasmaströmung. Hieraus resultiert eine differentielle Verteilung maternaler PAR Proteine und der P-Granula, zytoplasmatischer, RNA-reicher Organellen (Strome 2005), noch vor der ersten Zellteilung (Gönczy and Rose, 2005; Strome and Wood, 1983; Abbildung 1-3).

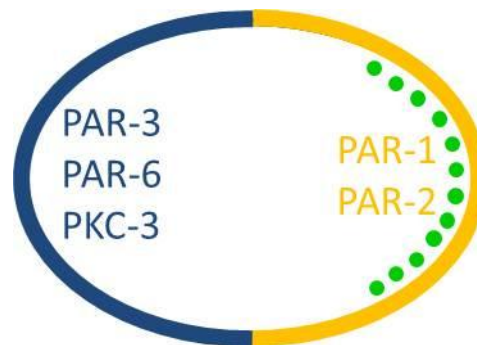


Abbildung 1-3: Verteilung der PAR Protein Komplexe und P-Granula vor der Zygotenbildung: blau & gelb: PAR Protein Komplexe; grün: P-Granula (anterior-links)

Mit der ersten asymmetrischen Zellteilung kommt es bei *C. elegans* zur Trennung von Keimbahn und Soma (Boveri, 1899; Deppe et al., 1978; Weismann, 1889). Aus der Teilung der Zygote P0 gehen die anteriore somatische Gründerzelle AB und die deutlich kleinere posteriore Keimbahnvorläuferzelle P1 (Abbildung 1-2) hervor (Sulston et al., 1983). P1 teilt sich in den folgenden Teilungen immer asymmetrisch in eine Keimbahnzelle (P2-P4) und eine somatische Gründerzelle (EMS, C und D, Abbildung 1-2). Diese Tochterzellen der Teilung von P0 unterscheiden sich nicht nur in der Größe, sondern auch in der asymmetrischen Verteilung verschiedener Genprodukte. Die P-Granula, die vor der ersten Teilung am posterioren Pol der Zygote lokalisiert sind (Abbildung 1-3) werden ausschließlich an die P1 Zelle weitergegeben (Strome & Wood 1983). Auch die PAR Proteinkomplexe werden aufgrund ihrer anterior-posterioren Verteilung (Abbildung 1-3) in der Zygote nur an jeweils eine Tochterzelle weitergegeben (Guo & Kemphues, 1995). Diese frühe asymmetrische Verteilung der PAR Proteine hat entscheidenden Einfluss auf die korrekte Lokalisation entwicklungsrelevanter maternalen Genprodukte in der frühen Embryonalentwicklung.

1.4 Bei parthenogenetischen Nematoden wird die anterior-posteriore Achse ohne Spermium determiniert

In *C. elegans* wird die anterior-posteriore Achse durch den Eintritt des Spermiums am posterioren Pol determiniert (s.o.). Innerhalb der Nematoden sind mehrfach unabhängig voneinander parthenogenetische Spezies entstanden (Denver et al., 2011). Diesen Spezies fehlt ein Spermium, das in *C. elegans* für die Ausbildung der Asymmetrie der Zygote verantwortlich ist. Es wurde gezeigt, dass auch in parthenogenetischen Spezies bereits die erste Zellteilung asymmetrisch verläuft (Lahl et al. 2006), also ein anderer Induktor der anterior-posterioren Achse existieren muss. Bei *C. elegans* sind im Uterus 98% der Eier mit dem posterioren Pol zur Vulva gerichtet, was daraus resultiert, dass dieser zuerst in die Spermatheka gelangt und somit hier das Spermium eintritt. Auch bei dem parthenogenetischen Nematoden *A. nanus* (Clade 11) sind 98% der Eier im Uterus gleich ausgerichtet, wobei hier der anteriore Pol der Vulva zugewandt ist (Lahl et al. 2006). Beobachtungen an hermaphroditischen und gonochoristischen *Acrobelloides* Spezies, die ein Spermium besitzen, weisen darauf hin, dass sogar einige *Cephalobiden* einen von Spermium unabhängigen Mechanismus zur Festlegung der anterior-posterioren Körperachse entwickelt haben (Goldstein et al., 1998). Der parthenogenetische Nematode *D. coronatus* (Clade 9) zeigt im Gegensatz zu *A. nanus* (Clade 11) keine einheitlich ausgerichtete Polarität der anterior-posterioren Achse. Zu gleichen Anteilen sind die Embryonen mit dem anterioren, oder dem posterioren Pol zur Vulva ausgerichtet, was auf eine zufällige Festlegung der Achsenpolarität hindeutet (Lahl et al. 2006). Nichtsdestotrotz verläuft auch bei *D. coronatus* bereits die erste Zellteilung asymmetrisch (Abbildung 1-2).

1.5 Die korrekte Lokalisation der *mex-3* und *pal-1* mRNA spielt eine entscheidende Rolle in der Embryonalentwicklung

Das homöoboxtragende Protein PAL-1 und sein Interaktionspartner, das RNA bindende Protein MEX-3 spielen eine entscheidende Rolle in der frühen Embryonalentwicklung.

MEX-3 ist ein nahezu im gesamten Tierreich konserviertes mRNA bindendes Protein. Es besitzt zwei KH-Domänen vom Typ I, die die Bindung von mRNA ermöglichen (Siomi et al., 1993; Valverde et al., 2008). Die MEX-3 KH-Domänen erkennen ein konserviertes Motiv, das MEX-3 Recognition Element (Pagano et al., 2009).

Das *pal-1* Gen, ein Homolog des *caudal* Gens von *D. melanogaster* (Waring & Kenyon 1991), ist für die Schicksalsfestlegung der posterioren Blastomere C (Abbildung 1-2) essentiell (Hunter & Kenyon 1996; Draper et al. 1996). Die korrekte Verteilung des MEX-3 Proteins und der *pal-1* mRNA ist in *C. elegans* notwendig, um die durch den Spermieeintritt festgelegte anterior-posteriore Körperachse aufrecht zu erhalten und eine korrekte Genexpression entlang dieser Achse zu ermöglichen. Die korrekte Lokalisation der *mex-3* und *pal-1* mRNA erfolgt durch eine Genkaskade, die schon vor Beginn der ersten Teilung, durch den Eintritt des Spermiums, in Gang gesetzt wird (Gönczy & Rose, 2005). Die gezielte Lokalisation des PAR-1/PAR-2 Proteinkomplexes im posterioren Teil der Zygote (Abbildung 1-3) und deren exklusive Existenz in der P1 Zelle des zweizelligen Embryos (Bowerman et al. 1997) ist entscheidend für die korrekte Funktion und Lokalisation essentieller embryonaler Entwicklungsgene. Der PAR-1/PAR-2 Proteinkomplex ist ein negativer Regulator der MEX-5 und MEX-6 Proteine, die als Folge dieser negativen Regulation im 2-Zellstadium ausschließlich in der anterioren Blastomere AB lokalisiert sind (Huang et al., 2002). Die Proteine MEX-5 und MEX-6 wiederum sind positive Regulatoren des RNA bindenden KH-Domänen Proteins MEX-3 (Huang et al., 2002). Durch die Interaktion von MEX-5 und MEX-6 mit dem MEX-3 Protein, wird der Abbau von MEX-3 in den AB Tochterzellen ABa und ABp verhindert (Huang et al., 2002). In den posterioren Blastomeren EMS und P2 wird das MEX-3 Protein durch SPN-4 abgebaut (Huang et al., 2002; Schubert et al., 2000). Die daraus resultierende Lokalisation des MEX-3 Proteins in ABa und ABp ist entscheidend für die korrekte Lokalisation der *pal-1* mRNA (Huang et al., 2002; Schubert et al., 2000). In den anterioren Blastomeren ABa und ABp bindet das MEX-3 Protein an das MEX-3 Recognition Element (Pagano et al., 2009) in der 3'UTR der *pal-1* mRNA und initiiert so deren Abbau (Huang et al., 2002; Pagano et al., 2009). Die anteriore Lokalisation des MEX-3 Proteins und die posteriore der *pal-1* mRNA im 4-Zellstadium von *C. elegans* ist notwendig für eine korrekte Musterbildung entlang der anterior-posterioren Körperachse während der Embryogenese (Abbildung 1-4).

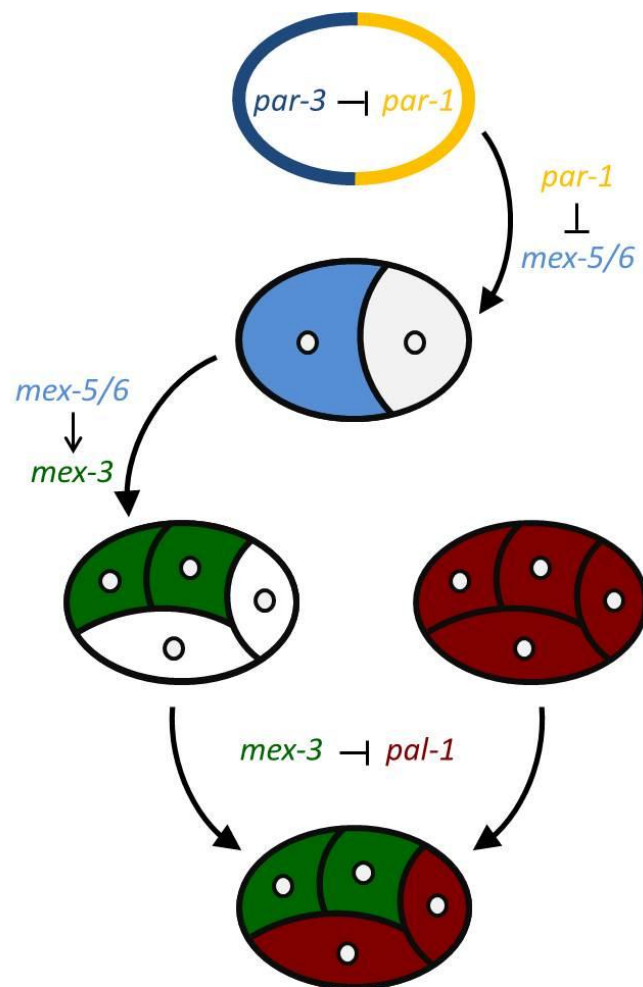


Abbildung 1-4: Lokalisation und Interaktion der maternalen Genprodukte im *C. elegans* Embryo: Verändert nach Huang et al. 2002.

Zur räumlichen und zeitlichen Beschränkung der Aktivität des PAL-1 Proteins spielen zwei weitere Gene eine wichtige Rolle. Der bZIP Transkriptionsfaktor SKN-1 (Blackwell et al., 1994) blockiert die Funktion von PAL-1 in EMS. In P2 und P3 kommt es durch den für die Keimbahn durch das Zinkfingerprotein PIE-1 initiierten transkriptionellen Ruhezustand (Seydoux et al. 1996; Hunter & Kenyon 1996) ebenfalls nicht zu einer PAL-1 Aktivierung. Die zygotische Expression des *pal-1* Gens beginnt erst ab dem 24 Zellstadium und bleibt wie auch die zygotische *pal-1* mRNA Expression auf die C-Zelllinie beschränkt (Edgar et al. 2001; Hunter & Kenyon 1996).

1.6 Die Regulation von *mex-3* und *pal-1* in der Gonade

Neben der essentiellen Rolle in der anterior-posterioren Musterbildung im *C. elegans* Embryo spielen *mex-3* und *pal-1* auch im adulten Tier eine wichtige Rolle. Auch in der Gonade kommt es zur Interaktion zwischen dem MEX-3 Protein und der *pal-1* mRNA. Das im proximalen Bereich der Gonade exprimierte MEX-3 Protein verhindert dort die Translation der *pal-1* mRNA und somit die Translation des PAL-1 Proteins. Im distalen Bereich der Gonade verhindert das mRNA bindende Protein GLD-1 sowohl die Translation der *pal-1*, als auch der *mex-3* mRNA (Mootz et al. 2004). Dies führt zu einer klar getrennten Lokalisation der MEX-3 und PAL-1 Proteine in der Gonade, ähnlich der, in der frühen Embryonalentwicklung (siehe 1.5). Das GLD-1 Protein, das bei *C. elegans* eine wichtige Rolle in der Regulation der *pal-1* und *mex-3* mRNA in der Keimbahn spielt, und dessen Homolog ASD-2, sind vermutlich aus einer Genduplikation hervorgegangen (Carmel et al., 2010) und übernehmen in *C. elegans* unterschiedliche Aufgaben. In Genomanalysen von Nematoden verschiedener Claden (11, 10, 9, 2) konnten wir in allen betrachteten Nematoden immer ein *asd-2* Homolog identifizieren, jedoch nie ein *gld-1* Homolog (T. Vogt, L. Lubowiecki pers. Mitteilung). Das Fehlen von GLD-1 könnte auch ein Hinweis auf eine veränderte Regulation der *mex-3* und *pal-1* mRNA Lokalisation in der Gonade sein.

1.7 Die embryonale mRNA Lokalisation von *mex-3* zeigt innerhalb der Nematoden deutliche Unterschiede

Die für *C. elegans* essentielle, anteriore Lokalisation der *mex3* mRNA während der frühen Embryonalentwicklung ist innerhalb der Nematoden nicht konserviert. Selbst in nahen Verwandten wurde eine stark vom *C. elegans* Muster abweichende Verteilung der *mex-3* mRNA nachgewiesen (M Kroiher, pers. Mitteilung). Sowohl der, wie *C. elegans* aus Clade 9 stammende Nematode *D. coronatus*, als auch der Vertreter der Clade 11, *A. nanus*, zeigen eine posteriore, also gegenüber *C. elegans* entgegengesetzte, Lokalisation der *mex-3* mRNA im frühen Embryo (Abbildung 1-5). Während diese Verteilung bei den genannten Vertretern

normal ist, würde in *C. elegans* eine posteriore ektopische Expression von *mex-3* eine korrekte Musterbildung unmöglich machen und zu einem letalen Phänotyp führen (Baugh et al., 2005; Huang et al., 2002).

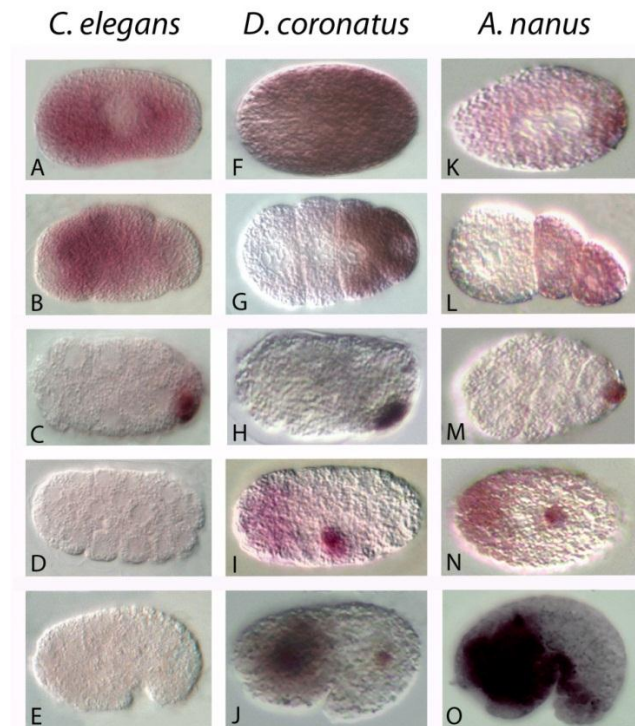


Abbildung 1-5: Lokalisation der *mex-3* mRNA in *C. elegans*, *D. coronatus* und *A. nanus*: A-E: *C. elegans* F-J: *D. coronatus* (Bilder: M. Kroiher) K-O: *A. nanus* (Bilder: M. Kroiher). Anterior = links

Ein weiterer gewaltiger Unterschied zwischen den Expressionsmustern der *mex-3* mRNA von *C. elegans* auf der einen Seite und *D. coronatus* und *A. nanus* auf der anderen Seite ist bei letzteren zum einen die Aufrechterhaltung der *mex-3* mRNA Lokalisation in der Keimbahn und zum anderen das Auftreten einer zweiten, anterioren Expressionsdomäne in der späten Embryonalentwicklung, nach Abschluss der Gastrulation (M. Kroiher, pers. Mitteilung). Zu diesem Zeitpunkt kann in *C. elegans* keine *mex-3* mRNA mehr nachgewiesen werden (Abbildung 1-5). Diese unterschiedlichen *mex-3* mRNA Expressionsmuster weisen darauf hin, dass der aus *C. elegans* bekannte *mex-3/pal-1* Signalweg nicht in allen Nematoden konserviert ist.

1.8 Ziele der Arbeit

Schon frühere Arbeiten zu embryonalen Zellteilungsmustern zeigten Unterschiede, die darauf hinwiesen, dass die molekularen Grundlagen der Entwicklungsprozesse innerhalb der Nematoden nicht konserviert sein können (Skiba & Schierenberg 1992; Lahl et al. 2009; Schulze & Schierenberg 2009).

Um den Einfluss der räumlich und zeitlich veränderten Zellteilungsmuster auf molekulare Prozesse der anterior-posterioren Musterbildung im Nematodenembryo zu untersuchen, sollten die mRNA Expressionsmuster von *mex-3* und *pal-1* in den Nematoden-Taxa der *Cephalobiden* und *Panagrolaimiden* aufgeklärt werden. Hierzu wurden Vertreter mit unterschiedlichem Fortpflanzungsmodus gewählt, um auch dessen möglichen Einfluss berücksichtigen zu können. Des Weiteren sollte auch die Proteinlokalisierung von PAL-1 und MEX-3 untersucht werden, um festzustellen, ob diese von der mRNA Verteilung abweicht. Die Existenz des für die Interaktion zwischen dem MEX-3 Protein und der *pal-1* mRNA essentiellen MEX-3 Recognition Elements (MRE) sollte in den 3'UTRs aller verfügbaren *pal-1* Sequenzen überprüft werden, um festzustellen, ob die notwendigen Randbedingungen gegeben sind, damit eine Bindung des MEX-3 Proteins an die *pal-1* mRNA auch in anderen Nematoden möglich ist. Um die evolutive Veränderung der *pal-1* mRNA zu charakterisieren sollten transgene *C. elegans* Tiere hergestellt werden, die GFP unter der Kontrolle der *pal-1* 3'UTR exprimieren. So sollte gezeigt werden, ob die Möglichkeit einer Interaktion zwischen dem *C. elegans* MEX-3 Protein und der *pal-1* 3'UTR anderer Nematoden besteht.

2 Material und Methoden

2.1 Nematoden

2.1.1 Verwendete Nematodenstämme

Tabelle 2-1 Bezeichnung und Codierung der Nematodenstämme:

Bei der Fortpflanzungsweise wurde zwischen drei Typen unterschieden:

Parthenogenetische Spezies (P): Tiere produzieren ausschließlich Eier, die sich ohne Befruchtung durch ein Spermium entwickeln.

Hermaphroditische Spezies (H): Tiere produzieren sowohl Eier als auch Spermien und können sich selbst befruchten.

Gonochoistische Spezies (G): Zweigeschlechtliche Spezies.

Herkunft bezeichnet jeweils das Labor, das als Bezugsquelle diente.

| Art / Bezeichnung | | Codierung | Herkunft |
|---|---|-----------|-----------------|
| <i>Acrobelloides nanus</i> | P | ES 501 | E. Schierenberg |
| <i>Acrobelloides sp.</i> | H | PS 1146 | P. Sternberg |
| <i>Caenorhabditis elegans</i> | H | N 2 | S. Brenner |
| <i>C. elegans unc-119 (ed4)III</i> | H | BR 584 | T. Hoppe |
| <i>Diploscapter coronatus</i> | P | PDL 0010 | P. De Ley |
| <i>Panagrolaimus sp.</i> | H | JU 765 | M.-A. Felix |
| <i>Panagrolaimus sp.</i> | P | PS 1159 | A. Burnell |
| <i>Panagrolaimus superbus</i> | G | DF 5050 | A. Burnell |
| GFP_ <i>pal-1</i> 3'UTR PS1159 | H | 6CI-III | diese Arbeit |
| GFP_ <i>pal-1</i> 3'UTR JU765 | H | 10A | diese Arbeit |
| GFP_ <i>pal-1</i> 3'UTR <i>C. elegans</i> | H | 1CI-III | diese Arbeit |

2.1.2 Zucht von Nematoden

2.1.2.1 Minimalmedium Agarplatten

Alle Nematoden wurden, wenn nicht anders angegeben, auf salzfreien Agarplatten kultiviert, um Kontaminationen mit Bakterien und Pilzen möglichst gering zu halten (Lahl et al. 2003).

10 g Agar wurden in 500 ml H₂O gelöst und 20 Minuten bei 120°C autoklaviert. Nachdem die Lösung auf 60°C abgekühlt war, wurden 0,5 ml Cholesterollösung (5 mg/ml in EtOH) zugegeben.

2.1.2.2 NGM Agarplatten

- 3 g NaCl
- 2,5 g Baktopepton
- 17 g Agar

ad 1000 ml H₂O

20 min bei 120°C autoklavieren und auf 55°C abkühlen lassen

- 1 ml Cholesterol (5mg/ml in EtOH)
- 10 ml 0,1 M MgSO₄
- 10 ml 0,1 M CaCl₂
- 25 ml 1 M KH₂PO₄ (pH 6)
- 2,5 ml Nystatin (10.000 U/ml DPBS)

2.1.2.3 EP Agarplatten

- 1,2 g NaCl
- 20 g Baktopepton
- 25 g Agar

ad 1000 ml H₂O

20 min bei 120°C autoklavieren und auf 55°C abkühlen lassen

- 1 ml Cholesterol (5mg/ml in EtOH)
- 1 ml 1 M MgSO₄
- 25 ml 1 M KH₂PO₄ (pH 6)
- 2,5 ml Nystatin (10.000 U/ml in DPBS)

2.1.2.4 *E. coli* als Futterquelle

Als Futterquelle für alle verwendeten Nematoden wurden, wenn nicht anders angegeben, *E. coli* OP50 Bakterien verwendet (Brenner, 1974). Hierbei handelt es sich um eine Uracil auxotrophe Mutante, die auf der Agarplatte nur einen dünnen Bakterienrasen ausbildet. Hierdurch wurde, in Kombination mit uracilfreien Minimalmedium verhindert, dass der Bakterienrasen auf der Agarplatte langsam wachsende Nematoden überwuchs.

Für die Bombardment Experimente wurden *E. coli* C600 Bakterien als Futterquelle verwendet. Als Futterquelle für RNAi Experimente dienten *E. coli* HT115.

Tabelle 2-2: Als Futterquelle verwendete *E. coli* Stämme

| Stamm | Genotyp |
|----------------------|--|
| <i>E. coli</i> OP50 | Uracil auxotroph |
| <i>E. coli</i> C600 | F ⁻ tonA21 thi-1 thr-1 leuB6 lacY1 glnV44 rfbC1 fhuA1 λ ⁻ |
| <i>E. coli</i> HT115 | F ⁻ , mcrA, mcrB, IN(rrnD-rrnE)1, rnc14::Tn10 (IPTG-induzierbare T7 Polymerase) (RNase III minus) |

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 RNA Isolierung

Die Isolierung der mRNA aus Nematoden erfolgte mittels TRI Mix (verändert nach Chomczynski, 1987). Das verwendete Gewebe wurde auf zwei unterschiedliche Weisen aufgeschlossen:

- a. Das Gewebe wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend für 30 Min in TRI Mix im Ultra Turrax homogenisiert.
- b. Das Gewebe wurde in TRI Mix mit Hilfe einer Zelmühle (Precellys, Peqlab) homogenisiert (2 x 10 Sekunden bei 6500 x g mit 5 Sek Pause).

Anschließend wurde das Homogenisat folgendermaßen behandelt um, die gesamte mRNA zu isolieren:

- Das Homogenisat wurde gevortext und 5 Min bei RT inkubiert
- 200 µl Chloroform wurden zugegeben, anschließend wurde gevortext und 5 Min bei RT inkubiert
- 10 Min Zentrifugation bei 15.000 x g
- Der Überstand (0,8 µl) wurde in neue Eppendorf Reaktionsgefäße überführt und mit 20 µl 1 M Essigsäure und 0,4 µl eiskaltem EtOH (100%) versetzt.
- Die Präzipitation erfolgte für mindestens 4 Std bei -20°C
- Durch 20 Min Zentrifugation bei 15.000 x g wurde die mRNA pelletiert
- Der Überstand wurde verworfen und das RNA Pellet für 10 Min getrocknet
- Das Pellet wurde in 125 µl Gu-Mix resuspendiert und 3,125 µl 1 M Essigsäure und 70 µl eiskalter EtOH (100%) wurden zugeben

- Die Präzipitation erfolgte für mindestens 4 Std bei -20°C
- Durch 20 Min Zentrifugation bei 15.000 x g wurde die mRNA pelletiert
- Der Überstand wurde verworfen und das Pellet zweimal in 70% EtOH gewaschen
- Die RNA wurde in 20 µl H₂O aufgenommen
- Um die Qualität und Konzentration der isolierten RNA zu untersuchen, wurden 2 µl auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen.

Guanidiniumthiocyanat-Lösung:

- 4 M Guanidiniumthiocyanat (GuSCN)
- 0,5% Sarcosyl
- 25 mM NaCitrat, pH 7

Die Lösung wurde zur besseren Löslichkeit des GuSCN auf 65°C erhitzt

Gu-Mix:

- 360 µl β-Mercaptoethanol
- 50 ml Guanidiniumthiocyanat-Lösung

TRI-Mix:

- 500 µl Gu-Mix
- 500 µl Phenol, pH 4
- 100 µl 2 M NaAcetat, pH 4,2

Um RNase freie Lösungen zu erhalten wurden alle Lösungen mit H₂O_{DEPC} angesetzt.

2.2.2 cDNA Synthese

Für die cDNA Synthese wurden 5 ng der isolierten mRNA eingesetzt:

- 5 ng cDNA (max. Volumen 11 µl)
- 2 µl 3'CDS Oligonukleotid

5 Min 70°C

- 4 µl 5x Puffer
- 1 µl RNase Inhibitor Ribolock (Fermentas)

2 Min 43°C

- 1 µl Reverse Transkriptase

90 Min 43°C

2.2.3 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Mit Hilfe der PCR Methode konnten gezielt Sequenzen aus einer DNA Matrize amplifiziert werden. Hierzu wurden zwei, die Zielsequenz flankierende Oligonukleotide und eine thermostabile Polymerase, die die Zielsequenz amplifizierte, verwendet. Als Standard wurde eine Mischung aus zwei thermostabilen Polymerasen verwendet: Die *Taq* Polymerase (aus *Thermus aquaticus*), die bis zu 1000 bp pro Minute amplifizieren kann und die *Pwo* Polymerase (aus *Pyrococcus woesei*) die einen Fehlerkorrekturmechanismus besitzt.

Standard PCR Ansatz:

- 5 µl 10x TL Puffer
- 2 µl MgCl₂
- 1 µl dNTPs (10 mM)
- 2 µl genspezifische Oligonukleotide oder 5 µl degenerierte Oligonukleotide (3'-5')
- 2 µl genspezifische Oligonukleotide oder 5 µl degenerierte Oligonukleotide (5'-3')
- 3 µl *Taq/Pwo* Polymerase Mix
- 2 µl DNA Matrize
- ad 50 µl H₂O

Tabelle 2-3: PCR Bedingungen für Standard PCR

| Zeit | Temperatur | Anzahl der Zyklen | |
|------------|------------|-------------------|--|
| 30 Sek | 94°C | 1 | Denaturierung |
| Pause | 75°C | | "hot start" |
| 30 Sek | 94°C | x Zyklen | Denaturierung |
| 30 Sek | x °C | | Anlagerung |
| 700 bp/Min | 68°C | | Elongation |
| 10 Min | 68°C | 1 | Fehlerkorrektur durch die <i>Pwo</i> Polymerase |
| 10 Min | 72°C | 1 | Adenin Überhänge am 3'OH Ende werden von der <i>Taq</i> Polymeraser angefügt |
| ∞ Std | 4°C | | |

Für einige PCR Reaktionen, deren Produkte größer als 1000 bp waren wurde die Phusion Polymerase verwendet (Finnzymes), da diese fehlerfrei und in sehr kurzer Zeit große Sequenzfragmente amplifizieren kann.

Phusion PCR Ansatz:

- 10 µl 5x HF Puffer
- 1 µl dNTPs (10 mM)
- 1,5 µl DMSO
- 1 µl genspezifische Oligonukleotide oder 10 µl degenerierte Oligonukleotide (5'-3')
- 1 µl genspezifische Oligonukleotide oder 10 µl degenerierte Oligonukleotide (3'-5')
- 0,5 µl *Taq/Pwo* Polymerase Mix
- 2 µl DNA Matrize
- ad 50 µl H₂O

Tabelle 2-4: PCR Bedingungen für Phusion PCR

| Zeit | Temperatur | Anzahl der Zyklen | |
|----------------|------------|-------------------|---------------------------------------|
| 30 Sek | 98°C | 1 | Denaturierung |
| 10 Sek | 98°C | x Zyklen | Denaturierung |
| 20 Sek | x °C | | Anlagerung |
| 1000 bp/20 Sek | 72°C | | Elongation |
| 8 Min | 72°C | 1 | Fehlerkorrektur und finale Elongation |
| ∞ Std | 4°C | | |

2.2.3.1 genspezifische Oligonukleotide

Genspezifische Oligonukleotide entsprachen in ihrer Sequenz Abschnitten der zu amplifizierenden DNA Matrize. Sie dienten während der PCR als Ansatzpunkt der Polymerase.

Tabelle 2-5: genspezifische Oligonukleotide

| Bezeichnung | Sequenz (5'-3') |
|------------------------------------|---|
| 3'CDS | AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACTTTTTTTTTTTTTTTT TTTTTTTTTTTTNN |
| 3'UTR C.elegans for KpnI AvrII | TGTAGGTACCCCTAGGCGTTTCTCGTTCAACTTTCTGTGA CA |
| 3'UTR C.elegans rev BsiWI SphI | TCAGCGTACGGCATGCTATAATAAAGTTGGATAGTTAAT CTC |
| 3'UTR DF5050 for KpnI | CTTAGGTACCATCAATGTAAATTCAGCAACGATAC |
| 3'UTR DF5050 rev BsiWI | TGTACGTACGAACATAAATTAAGTTTATTTTCTGG |
| 3'UTR JU765 for KpnI | AGCTGGTACCTTTTCATCCAAAAATTAGTGTGG |
| 3'UTR JU765 rev BsiWI | TGATCGTACGCCAAAAAATTTTTATTGACAG |
| 3'UTR PS1159 for KpnI | AGCTGGTACCAACAATATAAATTCATCCAACAG |
| 3'UTR PS1159 rev BsiWI | GATCCGTACGCATAAATTAAGTTTATTTTCTGG |
| A.nanus pal-1 for1 | GATATCCGTGTCCGTACCATCGAGACC |
| A.nanus pal-1 for2 | GAAGTGTACTCTGATCAACAGCGAGTCG |
| A.nanus pal-1 rev1 | AGCAAAGTTCGGATGAAAGC |
| A.nanus pal-1 rev2 | TCGGCTTTTCTGGCAGC |
| C.elegans pal-1 Promotor for MluI | ACATACGCGTTTCTGAAAACGAGGAAGTAATTATCAG |
| C.elegans pal-1 Promotor rev BgIII | TAGTAGATCTTCTTCTCACGGCGGTATCATAGATGC |
| D.c.pal-1exp_for | TCACGGATCCCACGACGAGCAGCTGCAGAC |
| D.c.pal-1exp_for2 | TCACGGATCCCTGCAGACGCATTCTGCTCAGCTAATCC |
| D.c.pal-1exp_rev | AATTAAGCTTGACATTGTTAGATCCCGGCC |

| | |
|------------------------------------|--|
| D.c.pal-1exp_rev2 | AATTAAGCTTCCCGACTTGGTAGGGGACTTTGGGGA |
| DF 5050 mex-3 for1 | TCGAAGTCCTCCAAGGGGTGAAGAGC |
| DF 5050 mex-3 for2 | GATAACGGGTCGTCCAGAAGACGTTATG |
| DF 5050 mex-3 rev1 | GTTGAATTCGTTTAATTGTTGCC |
| DF 5050 mex-3 rev2 | CCAACAATAATCCAACAACCTCG |
| DF5050 pal-1 3'UTR for1 | ATCAATGTAAATTCAGCAACGATAC |
| DF5050 pal-1 3'UTR rev1 | AACATAAATTAAGTTTATTTTCTGGGA |
| Diplo mex-3 exp pQE for | TCACGGATCCTCATCTGGCCTATCATCCAAC |
| Diplo mex-3 exp pQE30 rev | AATTAAGCTTGGCAGTGAAGTCTGCGCG |
| Diplo pal-1 3'UTR for | ATTTATCTAATTTTCTAATCGACAATTGATG |
| Diplo pal-1 3'UTR for Kpn1 | CTTGGGTACCATTTATCTAATTTTCTAATCGACAATTGATG |
| Diplo pal-1 3'UTR rev | TTCCAGGGGCAAATGTTTATTTATAATTC |
| Diplo pal-1 3'UTR rev BsiW1 | TGACCGTACGTTCCAGGGGCAAATGTTTATTTATAATTC |
| GFP:H2B for BglII | TCATAGATCTCGTTGCAACAAATTGATGAGCAATGC |
| GFP:H2B rev KpnI | TCGTGGTACCATGCCACTTTGTACAAGAAAGCTGG |
| JU 765 mex-3 for1 | GAAGCCCACCACGAGGAGAAGATCC |
| JU 765 mex-3 for2 | ACAGGCCGCCAGAAGACGTAATG |
| JU 765 mex-3 rev1 | CAAGTCCAACAACACGGAGC |
| JU 765 mex-3 rev2 | ATGTCGTCGTGATGCACG |
| JU 765 pal-1 for1 | CTGCACAAGTAAATTCATCACAACCACCAG |
| JU 765 pal-1 for2 | GCTGAACTGGCTGATGAACTCAAATTGACTG |
| JU 765 pal-1 rev1 | GAGTTCATCAGCCAGTTCAGC |
| JU 765 pal-1 rev2 | GCTTTTCTGGTGGTTGTGATG |
| JU7645 pal-1 3'UTR for1 | TTTTCATCCAAAATTAGTGTG |
| JU7645 pal-1 3'UTR rev1 | CCAAAAAATTTTTATTGACAG |
| linker for BsiWI | GTACCGTACGAATAAAGGTTGTATATTTATTCATC |
| linker rev Mrel | TCTGCGCCGGCGCATGATGCGTTGAAGCAGTTTCCCTG |
| M13 | GTAAAACGACGGCCAG |
| M13 Reverse | CAGGAAACAGCTATGAC |
| mCherry:H2B for Mrel | TGTACGCCGGCGCGTTGCAACAAATTGATGAGCAATGC |
| mCherry:H2B rev AvriI | TGTACCTAGGATGCCAAGTTTGTACAAGAAAGCTGG |
| new MCS for pCG 150 part 1 3' -5' | TGGCACGCGTGCATTGAGATCTTGGCATGGTACCATCTGCGCATGCG |
| new MCS for pCG 150 part 1 5' - 3' | GCGCCGCATGCGCAGATGGTACCATGCCAAGATCTCAATGCACGCGT |
| new MCS for pCG 150 part 2 3' - 5' | CATCTGCCGTACGCTAAGCCGCCGGCGTCACCGCCTAGGTACGCAGCATG |
| new MCS for pCG 150 part 2 5' - 3' | CTGCGTACCTAGGCGGTGACGCCGGCGGCTTAGCGTACGGCAGATGGTAC |

| | |
|----------------------------|---|
| NUL | AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT |
| Panagrolaimus pal-1 for1 | GCTGCAAGAAAGGCAGAACTTGCG |
| Panagrolaimus pal-1 for2 | CTTGCGGGTCAATTAGATCTTACAGGACG |
| Panagrolaimus pal-1 rev1 | TTGACCCGCAAGTTCTGC |
| Panagrolaimus pal-1 rev2 | AGTTCTGCCTTTCTTGACGC |
| PS1159 mex-3 exp pQE for | TCACGGATCCGGTCCATTAGATGAGCC |
| PS1159 mex-3 exp pQE30 rev | AATTAAGCTTTGGTGGAGGTGAACCTGATGC |
| PS1159 pal-1 3'UTR for1 | AACAATATAAATTCATCCAACAG |
| PS1159 pal-1 3'UTR rev1 | CATAAATTAAGTTTATTTTCTGG |
| PS1159_mex-3_for1 | GATAACGGGTGCGACCAGAAGACGTTATGG |
| PS1159_mex-3_for2 | GCAAAACGTGAAATTGAACTTGCTGCAG |
| PS1159_mex-3_rev1 | TAATTGTTGCACCCTTTGGTC |
| PS1159_mex-3_rev2 | CACGAACATATGCAGTAACATGC |
| SL1 | GGTTTAATTACCCAAGTTTGAG |
| T3 | ATTAACCCTCACTAAAGGGA |
| T7 | TAATACGACTCACTATAGGG |
| UPMlong | CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTAACAAC GCAGAGT |
| UPMshort | CTAATACGACTCACTATAGGGC |

2.2.3.2 degenerierte Oligonukleotide

Degenerierte Oligonukleotide wurden verwendet, wenn die Sequenz der zu amplifizierenden DNA Matrize nicht bekannt war. Sie wurden auf Basis eines Aminosäurevergleichs von homologen Sequenzen anderer Spezies erstellt. Es war darauf zu achten, dass Aminosäuren verwendet wurden, die durch möglichst wenige Triplets codiert sind, um den Grad der Degeneration möglichst gering zu halten.

Tabelle 2-6: degenerierte Oligonukleotide

| Bezeichnung | Sequenz (5'-3') |
|-------------|--------------------------|
| mex-3 for1 | GARCA YGTNGCNGARATHGTNGG |
| mex-3 for2 | MGNCARGGNTGYAARATHAA |
| mex-3 rev1 | NGGNARNCCNGTNAVYTCAA |
| mex-3 rev2 | NGGNGTDATDATRTANGTRTG |
| pal-1 for1 | GTNGAYAARTAYMGNATGGTNTA |
| pal-1 for2 | MGNYTNGARYTNGARAARG |
| pal-1 rev1 | NCKNCKRTTYTGRAACCADAT |
| pal-1 rev3 | YTGRAACCADATYTTDATYTG |

2.2.3.3 Nested PCR

Die Methode der Nested PCR wurde angewendet, um die Spezifität des PCR Produkts zu steigern. Es wurden 2 Oligonukleotidpaare verwendet, die ineinander verschachtelt sind. Diese Oligonukleotidpaare wurden in zwei aufeinanderfolgenden PCRs verwendet, wobei das zweite Oligonukleotidpaar zwischen dem ersten lag.

2.2.3.4 3' RACE PCR

Die Methode der 3' RACE PCR (Rapid Amplification of cDNA Ends) diente der Amplifikation der 3' Enden von Gensequenzen, ohne dass deren Sequenz bekannt war. Bereits bei der cDNA Synthese wurden am 3'-OH Ende Nukleotidsequenzen angefügt, die hier als Oligonukleotid in 3'-5' Richtung verwendet werden konnten. Als Oligonukleotide in 5'-3' Richtung wurden bekannte Sequenzabschnitte der zu amplifizierenden Matrize verwendet. Die 3' RACE PCR wurde als Nested PCR angewendet.

2.2.3.5 5' SL1 PCR

Bei der 5' SL1 PCR wurde die Tatsache genutzt, dass bei Nematoden die meisten Gene am 5' Ende eine konservierte Sequenz besitzen, den Splice Leader SL1 (Blaxter & Liu, 1996). Diese Sequenz wurde als Oligonukleotid in 5'-3' verwendet und mit sequenzspezifischen Oligonukleotiden in 3'-5' Richtung kombiniert. Die 5' SL1 PCR ist eine Semi Nested PCR, da in beiden PCR Reaktionen der SL1 Primer verwendet und nur der genspezifische Primer ausgetauscht wurde.

2.2.4 Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese ermöglichte es, DNA Fragmente der Größe nach aufzutrennen und ihre Konzentration zu bestimmen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Gele verwendet mit 1% Agarose in 0,5x TBE Puffer und 0,01% Ethidiumbromidlösung [1 µg/ml]. Die Proben wurden mit 6x DNA Ladepuffer versetzt. Alle Gele wurden bei 120 V laufen gelassen. Als Marker zur Bestimmung der Größe und Konzentration der DNA Fragmente wurde mit Pst1 verdaute λ-DNA verwendet.

Ethidiumbromid Stammlösung:

- 1% Ethidiumbromid in H₂O

0,5x TBE Puffer:

- 5,4 g Tris
- 2,75 g Borsäure
- 2 ml 0,5 M EDTA pH8
- ad 1 L H₂O

2.2.5 Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen

Zur Extraktion der DNA aus Agarosegelen wurde das QIAEX II Agarose Gel Extraction Kit (Quiagen GmbH, Hilden) verwendet. Als DNA bindende Matrix wurde eine Kieselgelsuspension verwendet.

2.2.6 Ligation**Ligationsansatz:**

- 35 ng Plasmid
- 1 µl 10x Ligase Puffer
- 10 ng DNA
- 0,5 µl T4 Ligase
- ad 10 µl H₂O
-

10x Ligasepuffer:

- 300 mM Tris-HCl, pH7,5
- 100 mM MgCl₂
- 100 mM DTT
- 10 mM ATP

2.2.6.1 T/A Ligation

Die T/A Ligation macht sich die Tatsache zu Nutze, dass die *Taq*-Polymerase bei der PCR Reaktion an den 3' OH Enden Adenin-Überhänge anfügt (Clark 1988). Als Zielplasmid wurde

der pBluescript II KS +/- Vektor (Stratagene, Santa Clara, USA) verwendet. Dieser wurde mit EcoRV linearisiert und es wurden 3' terminale Thymin-Überhänge angefügt. Die T4 DNA Ligase schließt eine Phosphodiesterbindung zwischen der 5' Phosphat- und der 3' OH-Gruppe der DNA Fragmente.

2.2.6.2 Ligation über Restriktionsschnittstellen

Bei der Ligation mittels Restriktionsschnittstellen wurden zunächst das zu ligierende DNA Fragment und das Zielplasmid mit den entsprechenden Restriktionsendonukleasen verdaut. Anschließend wurden die komplementären Überhänge wie bei der T/A Ligation durch die T4 Ligase verbunden.

2.2.7 Plasmide

Tabelle 2-7: Verwendete Plasmide

| Plasmid | Resistenz | Herkunft |
|---|---------------------------------|-----------------------|
| pBS SKII +/- | Ampicillin | Invitrogen, Darmstadt |
| pL4440 | Ampicillin | Andrew Fire |
| pQE 30 | Ampicillin | Qiagen, Hilden |
| pCG 150 (Addgene Plasmid 17247) | Ampicillin, Chloramphenicol, | G. Seydoux, Addgene |
| pCG 150 new MCS | Ampicillin | diese Arbeit |
| pCM 1.35 (Addgene Plasmid 17248) | Ampicillin | G. Seydoux, Addgene |
| pCM 1.151 (Addgene Plasmid 21386) | Ampicillin | G. Seydoux, Addgene |
| pCM 5.49 (Addgene Plasmid 21391) | Ampicillin | G. Seydoux, Addgene |
| pCG 150 new MCS 1 (pal-1 Prom_GFP::H2B_ <i>C.elegans pal-1</i> 3'UTR) | Ampicillin | diese Arbeit |
| pCG 150 new MCS 4 (pal-1 Prom_GFP::H2B_ <i>P. superbus pal-1</i> 3'UTR) | Ampicillin | diese Arbeit |

| | | |
|---|------------|--------------|
| pCG 150 new MCS 6 (pal-1 Prom_GFP::H2B_ PS1159 pal-1 3'UTR) | Ampicillin | diese Arbeit |
| pCG 150 new MCS 10 (pal-1 Prom-GFP::H2B_ JU765 pal-1 3'UTR) | Ampicillin | diese Arbeit |

2.2.8 Transformation

Für alle Transformationen wurden chemisch kompetente *E. coli* Zellen verwendet (Inoue et al., 1990). Diese konnten bei -80°C gelagert werden. Zur Transformation wurden 100 µl kompetente Zellen auf Eis aufgetaut, mit der zu transformierenden Plasmid-DNA versetzt und für 20 Minuten auf Eis inkubiert. Zur Transformation wurde bei 42°C für 45 Sekunden ein Hitzeschock induziert. Nach dem Hitzeschock wurde der Transformationsansatz mit 900 µl LB Medium versetzt und für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die transformierten Zellen auf LB-Agarplatten ausgestrichen, die zur Selektion Antibiotika enthielten (Sambrook et al., 1989).

Tabelle 2-8: Zur Transformation verwendete *E. coli* Stämme

| Stamm | Genotyp | Herkunft |
|---------------------------|---|---------------------------------|
| <i>E. coli</i> XL1blue | endA1 gyrA96(nal ^R) thi-1 recA1 relA1 lac glnV44 F'[::Tn10 proAB ⁺ lacI ^q Δ(lacZ)M15] hsdR17(r _K ⁻ m _K ⁺) | Stratagene, Santa Clara, USA |
| <i>E. coli</i> M15[pREP4] | Nal ^S , Str ^S , Rif ^S , Thi ⁻ , Lac ⁻ , Ara ⁺ , Gal ⁺ , Mtl ⁻ , F ⁻ , RecA ⁺ , Uvr ⁺ , Lon ⁺ | Qiagen, Hilden |

LB (Luria Broth) Medium (1 L):

- 10 g Trypton
- 5 g Hefeextrakt
- 10 g NaCl

Agarplatten:

- 1 L LB Medium
- 15 g Agar

2.2.9 Plasmid DNA Präparation

Zur Präparation der Plasmid DNA wurden zwei verschiedene Methoden verwendet, die beide auf dem Prinzip der alkalischen Lyse der Bakterienzellen und der Bindung der Plasmid DNA an eine Kieselgelmatrix beruhen.

3 ml LB Medium wurden mit einer Einzelkolonie Bakterien beimpft und über Nacht bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert. Die Zellen wurden pelletiert.

- a. Das Pellet wurde in 200 µl Merlin I resuspendiert. Nach der Zugabe von 200 µl Merlin II wurde das Reaktionsgefäß 10 x invertiert, 200 µl Merlin III wurden zugegeben, der Ansatz 5 mal invertiert und anschließend 5 Minuten bei RT inkubiert. Durch Zentrifugation (10 Min bei 20.000 x g) wurden Zelltrümmer, genomische DNA und RNA pelletiert. Der Überstand wurde mit 1 ml Merlin IV versetzt und 5 Min auf dem Rotator inkubiert. Über eine Säule wurde mit Hilfe einer Vakuumpumpe die an Kieselgel gebundene Plasmid DNA mit Potassium Wash gewaschen und anschließend getrocknet. Die Plasmid DNA wurde in 50 µl 10 mM Tris, pH 8,5 (70°C) eluiert.
- b. Alternativ wurde die Plasmid DNA mit Hilfe des Invisorb Spin Plamid Mini Two Kits (Stratec molecular, Berlin) isoliert.

Merlin I:

- 50 mM TrisCl, pH 7,6
- 10 mM EDTA
- 100 µg/ml RNase A

Merlin II:

- 0,2 M NaOH
- 1% SDS

Merlin III (500 ml):

- 61,35 g Kaliumacetat
- 35,7 ml Eisessig
- ad 500 ml H₂O_{dest}

Merlin IV (100 ml):

- 66,84 g Guanidiniumhydrochlorid
- 33,33 ml Merlin III
- pH 5,5 (mit 10 M NaOH einstellen)
- ad 100 μ l H₂O_{dest}
- 1,5 g Kieselgel 60

Potassium Wash:

- 80 mM Kaliumacetat
- 8,3 mM Tris, pH 7,5
- 40 μ M EDTA
- 55% EtOH (100%)

2.2.10 Restriktionsverdau

Es wurden Restriktionsendonukleasen von MBI Fermentas für alle enzymatischen Verdaue von Plasmid DNA und PCR Produkten verwendet.

In den zugehörigen Puffern wurde die DNA nach mitgeliefertem Protokoll mit 1-5 Units (je nach Enzym) für 2 Std bei konventionellen und für 5-30 Min bei Fast Digest Enzymen verdaut.

2.2.11 Sequenzierung

Die Sequenzierungen wurden von zwei unterschiedlichen Firmen durchgeführt, die jeweils unterschiedliche Ausgangsmaterialien erforderten.

- a. Die Sequenzierreaktion wurde mit dem Big Dye Kit v 3.1 (Applied Biosystems, Carlsbad, USA) mit 100-200 ng Plasmid DNA durchgeführt. Aufreinigung und Sequenzierung des Ansatzes erfolgten am Cologne Center for Genomics (CCG, Köln).
- b. Sequenzierreaktion, Aufreinigung und Sequenzierung wurden von Marcrogen (Amsterdam) durchgeführt. Hierzu wurden 5 μ l Plasmid DNA (100 ng/ μ l) und 5 μ l Oligonukleotid (5 pmol/ μ l) verwendet.

Tabelle 2-9: Oligonukleotide zur Sequenzierung

| Bezeichnung | Sequenz (5'-3') |
|-------------------------------|-------------------------------------|
| linker gpd-2/gpd-3 for seq | AATAAAGGTTGTATATTTATTCATCTTATTGAATC |
| linker gpd-2/gpd-3 rev seq | CATGATGCGTTGAAGCAGTTTC |
| M13 | GTAAAACGACGGCCAG |
| p.CM1.151 mCherry:H2B rev seq | CAACAAATTGATAAGCAATGC |
| pCG150 seq for | GTATAGAAAAGTTGAACGAGAAACG |
| pCG150 seq rev2 | TCTACTTCTTTTACTGAAGCTTATCG |
| pCG150n GFP seq for | TGAGGGAACCAAGGCCGTCAC |
| pCG150n GFP seq rev | TTCTTCTCCTTTACTCATGGAGCC |
| pCG150n mCherry seq for | GTCACCAAGTACACTTCCAGCAAG |
| pCG150n mCherry seq rev | CTTGATGATAGCCATGTTATCCTCC |
| pCG150n seq for2 | ACAACATATCCAGTCACTATGGTCG |
| pCM 5.49 for seq | ATCTAAGTAGTTGATTCATAGTGACTGC |
| pCM 5.49 rev seq | TTGACTGATAGTGACCTGTTTCG |
| pCM1.151 mCherry:H2B for seq | TGATAGTGACCTGTTTCGTTGC |
| pCM1.35 GFP:H2B for seq | TTGACTGATAGTGACCTGTTTCG |
| pCM1.35 GFP:H2B rev seq | TCGTTGCAACAAATTGATAAGC |
| pQE seq for | TGAGCGGATAACAATTTTAC |
| pQE seq rev | CTGAACAAATCCAGATGGAG |
| Reverse | CAGGAAACAGCTATGAC |
| T3 | ATTAACCCTCACTAAAGGGA |
| T7 | TAATACGACTCACTATAGGG |

2.2.12 Analyse der Sequenzdaten

Die Analyse der Sequenzdaten erfolgte mit der Software Geneious Pro 5 (Biomatters, Auckland, New Zealand).

2.3 Proteinbiochemische Methoden

2.3.1 Heterologe Expression von rekombinanten Proteinen

Die heterologe Expression rekombinanter Proteine erfolgte in *E. coli* M15 Zellen, in die das pQE 30 Expressionsplasmid (Qiagen, Hilden), das das zu exprimierende Protein als Insert trägt, transformiert wurde. Es wurden Vorkulturen mit 1/20 Volumen der Expressionskultur

angesetzt. Hierzu wurde LB_{Amp/Kana}-Medium mit Bakterien aus einer Dauerkultur inokuliert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Zur Expression wurde die Expressionskultur im Verhältnis 1/20 mit der Vorkultur inokuliert. Bei einer OD₆₀₀ von 0,8-1,0 wurde die Expression durch die Zugabe von 1mM IPTG induziert. Nach 4 h wurden die Zellen zentrifugiert (4000 x g, 20 min) und das Pellet wurde bei -20°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

2.3.2 Batch-Aufreinigung von His getagten Proteinen

Bei der Aufreinigung der heterolog exprimierten Proteine wurde die Tatsache genutzt, dass bei der Expression des Proteins aus dem pQE30 Plasmid ein N-terminaler 6 His Tag angefügt wurde. Die Zellpellets wurden auf Eis aufgetaut und in 5ml Lysepuffer (A) pro 1 g Zellpellet resuspendiert. Die Reinigung erfolgte nach dem Protokoll des QIAexpressionist (2003) zur Batch Reinigung von Proteinen aus *E. coli* Lysaten unter denaturierten Bedingungen. Zur Lyse der Zellen wurde Puffer A verwendet, der Guanidiniumhydrochlorid enthält. Zur Elution wurde ausschließlich Puffer E verwendet.

2.3.3 SDS Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Um Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufzutrennen wurden SDS-Polyacrylamidgele verwendet (Laemmli, 1970). Es wurden 4%ige Sammelgele und 12%ige Trenngele genutzt.

2.3.4 Western Blot

Blot-Puffer:

- 10mM CAPS pH 11
- 10% MeOH

Zum Blotten wurde eine Blottkammer von Peqlab (Erlangen) verwendet.

- 1h bei 15V

2.3.5 Antikörperherstellung

Die polyklonalen Antikörper wurden von den Firmen Eurogentec (Lüttich, Belgien) und SeqLab (Göttingen) in Kaninchen hergestellt.

2.4 Expressionanalyse

2.4.1 Präparation von Embryonen für RNA und Proteinfärbungen

Um Embryonen von Nematoden für mRNA *in situ* Hybridisierungen und Antikörperfärbungen zu präparieren, war es notwendig Eischale und Vitelinmembran durchlässig zu machen. Hierzu wurden die Embryonen mit einer Natriumhypochlorid Lösung behandelt. Die Dauer der Behandlung war spezifisch für jede Spezies (Tabelle 2-10). Nach der Hypochloridbehandlung wurden die Embryonen gewaschen (3x PBS, 3x H₂O), auf Poly-L-Lysin beschichtete Objektträger aufgeklebt und in N₂(flüssig) schockgefroren. Durch anschließendes Absprennen des Deckglases wurden die durch die Hypochloridbehandlung angegriffene Eischale und Vitelinmembran aufgerissen und der Embryo wurde zugänglich für mRNA Sonden und Antikörper.

Tabelle 2-10: Dauer der Hypochloridbehandlung

| Spezies | Hypochloridbehandlung [sec] |
|-----------------------------------|-----------------------------|
| <i>Acrobelloides nanus</i> | 90 |
| <i>Acrobelloides sp.</i> (1146) | 90 |
| <i>Diploscapter coronatus</i> | 120 |
| <i>Panagrolaimus sp.</i> (PS1159) | 90 |
| <i>Panagrolaimus sp.</i> (JU765) | 120 |
| <i>Panagrolaimus superbus</i> | 105 |

2.4.2 Sondensynthese für RNA *in situ* Hybridisierung

Die Sonden, die bei der RNA *in situ* Hybridisierung zur Detektion der mRNA verwendet wurden, wurden aus Digoxigenin (DIG) markierten Nukleotiden synthetisiert. DIG wurde nach der Hybridisierung vom α -DIG Antikörper erkannt, was eine spezifische Färbung der mRNA ermöglichte. Die RNA Sonden wurden mit T3 bzw. T7 RNA Polymerase und Digoxigenin RNA Label Mix (Roche, Penzberg), im mitgelieferten Puffer laut Protokoll synthetisiert.

2.4.3 RNA *in situ* Hybridisierung

Die Methode der mRNA *in situ* Hybridisierung diente dem Nachweis von mRNA im fixierten Embryo. Die Embryonen wurden nach Behandlung mit Natriumhypochlorid in 100% MeOH fixiert (30 Min, -20°C) und anschließend in einer absteigenden MeOH-Reihe rehydriert (90%, 70%, 50%, je 10 Min). Dann erfolgte eine zweite Fixierung (20 Min, RT) mit "Streck Tissue Fixation" (Streck Laboratories, USA). Nach je zweimaligem Waschen mit H₂O_{DEPC} und 2x SSC (je 10 Min) und einer anschließenden Prähybridisierung mit Hybmix (90 Min, 42°C) wurde die Probe über Nacht mit der in Hybmix verdünnten DIG-markierten Sonde bei 42°C zur Hybridisierung inkubiert. Nach der Hybridisierung wurden die Embryonen wie folgt gewaschen: 2x SSC (20 Min, 42°C), Formamidlösung (30 Min, 42°C), 2x SSC (2x 10 Min, RT), TN (10 Min, RT). Zur Absättigung unspezifischer Bindungen des α -DIG Antikörpers erfolgte zunächst eine Behandlung mit Blockmix (30 Min, RT) und anschließend die Inkubation mit dem α -DIG Antikörper (1:2000 verdünnt in Blockmix) (1 Std, 37°C). Die Embryonen wurden 2x mit TN und 2x mit TNM gewaschen (je 10 Min, RT). Abschließend erfolgte die Entwicklung mittels einer NBT/BCIP Reaktion der an den α -DIG Antikörper gekoppelten alkalischen Phosphatase, die bei ausreichender Färbung mit Stoppmix abgestoppt wurde. Eine anschließende DNA-Färbung der Proben mittels DAPI erfolgte für 10 Min (DAPI 1:10000 in Stoppmix).

2x SSC:

- 300 mM NaCl
- 30 mM Na-Citrat
- pH 7

Hybmix:

- 50% Formamid
- 5x SSC
- 1 mg/ml DNA (aus Heringsspermien)
- 0,1 mg/ml Heparin
- 0,1% Tween 20
- 10% Dextransulfat

Formamidlösung:

- 0,2x SSC
- 60% Formamid

TN:

- 100 mM Tris pH 7,5
- 150 mM NaCl

TNM:

- 100 mM Tris pH 9,5
- 150 mM NaCl
- 50 mM MgCl₂

Entwicklungslösung (1 ml):

- 100 µl Tris, pH 9,5
- 30 ml NaCl (5M)
- 25 µl MgCl₂ (
- 500 µl PVA (10%)
- 35 µl BCIP (50 mg/ml in H₂O)
- 4,5 µl NBT (50 mg/ml in 70% DMF)
- 306 µl H₂O

Stopplösung:

- 50 mM EDTA
- 1x PBS

2.4.4 Antikörperfärbung

Die vorbereiteten Präparate wurden zur Fixierung bei -20°C 10 Min in MeOH und 10 Min in Aceton inkubiert.

- 20 Min 1x PBST (0,5% Tween20)
- 30 min 1x PBST (0,5% Tween 20) 2% BSA

- primärer Antikörper in 1x PBST (0,5% Tween 20) 2% BSA über Nacht
- 3x 20 Min in 1x PBS waschen
- sekundärer Antikörper in 1x PBS 4 Std bei RT
- 3x 20 Min in 1x PBS waschen

Die Präparate wurden in Mounting Puffer (50% Glycerin, 1x PBS) mit DABCO als Ausbleichschutz zur mikroskopischen Betrachtung eingedeckelt.

2.5 Herstellung von Transgenen

Zur Herstellung von transgenen Nematoden (Merritt & Seydoux 2010) wurde die *C. elegans* Mutante *unc-119⁻* (ed4) verwendet (Tabelle 2-1).

2.5.1 Kultivierung und Vorbereitung der Würmer zum Bombardment

Es wurden pro Konstrukt 10 NGM Platten (9cm) mit 100 µl *E. coli* OP50 beimpft. Die Platten wurden jeweils mit 10 adulten Würmern beimpft und bei 20°C 5-6 Tage inkubiert. Die Würmer bildeten kleine Haufen, von denen jeweils 2-3 auf mit *E. coli* C600 beimpfte EP Platten (9 cm) umgesetzt wurden. Pro Bombardment wurden 20 Platten verwendet, die bei 25°C 6 Tage inkubiert wurden. Zum Bombardment wurden die Tiere mit M9 Puffer von den Platten gespült, vereinigt und 3 Mal mit M9 Puffer gewaschen, um die Bakterien zu entfernen. Anschließend wurde der Überstand abgenommen und diese Wurm suspension im Folgenden zum Bombardment verwendet.

2.5.2 Beladung der Goldpartikel

Gold Stock Lösung:

Alle Arbeiten mit der Goldlösung müssen in ‚low bind‘ Reaktionsgefäßen durchgeführt werden, da das Gold extrem stark an der Oberfläche der Reaktionsgefäße haftet.

- 30mg Gold Partikel 0,3-3 µm (Chempur, Karlsruhe)
- 1 ml 70% Ethanol
- 5 Min vortexen

- 15 Min bei RT inkubieren zum Absetzen des Goldes und anschließend den Überstand verwerfen
- 3 Mal mit 1 ml H₂O_{steril} waschen. Zentrifugieren vermeiden, da das Gold an der Oberfläche des Reaktionsgefäßes haftet.
- Gold in 500 µl 50% Glycerol (steril) resuspendieren (→ Endkonzentration 60 mg/ml)
- Lagerung bei 4°C für 1-2 Monate

Beladung der Goldpartikel:

- Gold Stock Lösung 5 min vortexen
- 100 µl Gold Lösung
- 10 µl linearisierte Plamid DNA [10 µg]
- 1 Min langsam vortexen
- 300 µl 2,5 M CaCl₂ zugeben und 1 min langsam vortexen
- 112 µl 0,1 M Spermidin zugeben und 3 min auf dem ‚Gene Disruptor‘ vortexen
- Lösung bei RT inkubieren bis sich die Goldpartikel abgesetzt haben
- 800 µl 70% EtOH zugeben, vortexen und bis zum vollständigen Absetzen des Goldes bei RT inkubieren
- 500 µl 100% EtOH zugeben, vortexen und bis zum vollständigen Absetzen des Goldes bei RT inkubieren
- Gold Partikel in 80 µl 100% EtOH resuspendieren

2.5.3 Particle Bombardment

Die beladenen Goldpartikel wurden auf 7 Microcarrier (10 µl pro Microcarrier) verteilt. Anschließend wurden diese 5-10 min getrocknet. Die Wurmsuspension (2.5.1) wurde gleichmäßig auf einer zuvor über Nacht bei 25°C getrocknete NGM Platte (9 cm) verteilt. Nachdem die verbliebene Flüssigkeit von der NGM Platte aufgenommen war, konnte das Bombardment durchgeführt werden.

Bombardment:

- 2000 psi rupture disk (Biorad)
- 27 Hg
- Helium Druck ca. 200 psi höher als rupture disk maximal Druck

Nach dem Bombardment wurden die Würmer bei RT für eine Stunde inkubiert, anschließend mit 4 ml M9 Puffer von der Platte abgewaschen und auf 20 NGM-Platten, die zuvor mit jeweils 500 µl *E. coli* OP50 beimpft worden waren, verteilt. Die bombardierten Würmer wurden so für drei Wochen bei 25°C inkubiert.

2.5.4 Selektion der transgenen Nematoden

Die Transgene wurden über den Phänotyp selektiert, da erfolgreich transformierte Würmer durch die Komplementation der *unc-119* Mutation den wildtypischen Phänotyp zeigen sollten.

2.6 RNA Interferenz

Für die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten RNAi Experimente wurde die Füttermethode verwendet. Hierbei wurde ein Stamm aus der RNAi Fütter-Bibliothek (Fraser et al. 2000; Kamath et al. 2003) verwendet, der zu *mex-3* RNA Interferenz führt. Die HT115 Fütterbakterien tragen ein dsRNA Expressionsplasmid, das eine für *mex-3* RNA codierende Sequenz beinhaltet.

Die Fütterbakterien wurden in LB_{Amp,Tet} Medium über Nacht kultiviert. Zur Expression wurden die Bakterienkulturen 1:20 in LB_{Amp} Medium verdünnt und eine Stunde bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert. Die folgende vierstündige Expression der dsRNA wurde mit 1 mM IPTG induziert. Mit jeweils 500 µl dieser Kulturen wurden NGM Fütterplatten für RNAi Experimente beimpft. Juvenile Würmer im L2-L3 Stadium wurden einzeln auf beimpfte NGM Fütterplatten gesetzt. Die Embryonen der F1 Generation wurden anschließend analysiert.

2.7 Mikroskopie

Die Betrachtung und Fotodokumentation der mikroskopischen Präparate erfolgt an einem Axioscop 2 mot plus und einem Axio Imager Z.2 Mikroskop (beide: Zeiss, Jena).

Tabelle 2-11: Objektive und Okulare

| Mikroskop | Axioscop 2 mot plus | Axio Imager Z.2 |
|-----------|--------------------------------|-----------------------------|
| Okular | PI 10x/23 | PI 10x/23 |
| Objektive | A-Plan 5x/0,12 | Plan-Apochromat 10x/0,45 |
| | A-Plan 10x/0,25 | Plan-Apochromat 20x/0,8 |
| | Plan-Neofluar 40x/0,75 | Plan-Apochromat 63x/1,4 Oil |
| | Plan-Neofluar 100x/1,3-0,7 Oil | |
| Kamera | AxioCam MRc | AxioCam MRm AxioCam ICc1 |

2.8 Enzyme

Alle im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Enzyme wurden von MBI Fermentas (St. Leon-Roth) bezogen und entsprechend des mitgelieferten Protokolls verwendet.

2.9 Chemikalien

Alle im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurde von den Firmen Roth (Karlsruhe), Sigma Aldrich (Steinheim) und VWR (Darmstadt) bezogen

2.10 Sequenzdatenbanken und Genome

2.10.1 Öffentlich zugängliche Datenbanken und Genome

Sequenzanalysen mit Hilfe veröffentlichter Genomdaten wurden über den NCBI Server durchgeführt.

Verwendet wurden die Genomdaten von *C. elegans* (The *C. elegans* Sequencing Consortium, 1998), *C. briggsae* (Stein et al., 2003) und *T. spiralis* (Mitrevva et al., 2011).

2.10.2 Interne Sequenzdatenbanken und Genome

Die Sequenzdatenbanken von *Panagrolaimus sp.* PS1159, *Panagrolaimus sp.* JU765 und *Romanomermis culicivorax* sind noch unveröffentlichte Daten, die aus dem Labor von Einhard Schierenberg (Universität zu Köln) stammen. Die noch unveröffentlichten Genomdaten von *A. nanus* wurden freundlicher Weise von Itai Yanai (Technion, Haifa, Israel), die unveröffentlichten Genomdaten von *D. coronatus* freundlicherweise von Yuji Kohara (NIG, Mishima, Japan) zur Verfügung gestellt.

2.11 Geräte

Tabelle 2-12: Verwendete Geräte mit Modellbezeichnung und Herstellerangabe

| Gerät | Modellbezeichnung | Hersteller |
|--------------------------|------------------------|------------------------------|
| Autoklav | Systemec V-65 | Systemec (Wettenberg, BRD) |
| Binokular | L2 | Leica (BRD) |
| Bunsenbrenner | Fireboy | INTEGRA Biosciences (BRD) |
| Drehrad | Tube Rotator | VWR (USA) |
| Powersupply | EPS200 | Pharmacia Biotech (Schweden) |
| Feinwaage | AC 211 S TE 3102 S | Sartorius (Göttingen, BRD) |
| Inkubator | BD53 | Binder (Tuttlingen, BRD) |
| Inkubations-Schüttler | Innova 40 | Eppendorf (Hamburg, BRD) |
| Kamera | EOS 500D | Canon (Japan) |
| Magnetrührer | VMS-C7 | VWR (USA) |
| Mikrozentrifuge | Galaxy MiniStar | VWR (USA) |
| Particle Delivery System | Biologic® PDS-1000/He | Bio-Rad (USA) |
| PCR Maschine | TPersonal Thermocycler | Biometra (Göttingen, BRD) |
| Pipetten | P2, P20, P200, P1000 | Gilson (USA) |

| | | |
|-------------------|-----------------------|-----------------------------|
| Pipettus | Accu-Jet | Brand (BRD) |
| Spektrophotometer | NanoDrop 1000 | Thermo Scientifc (USA) |
| Trockenschrank | Heraeus function line | Heraeus Kulzer (BRD) |
| UV Lichttisch | 312 nm | Bachofer (BRD) |
| Vakuumpumpe | Membranvakuumpumpe | VACUUMBRAND (BRD) |
| Vortex | Vortex Genie 2 | Scientific Industries (USA) |
| Wasserbad | SUB Aqua 2 | Grant (Cambridge, England) |
| Zentrifuge | Heraeus Pico 21 | Thermo Scientifc (USA) |

3 Ergebnisse

Im Vergleich zum Modellorganismus *C. elegans* wurden in *D. coronatus* und *A. nanus* gravierende Unterschiede in der embryonalen Genexpression aufgedeckt (M. Kroiher, pers. Mitteilung, siehe 1.7).

Bei *C. elegans* findet die essentielle Interaktion zwischen der *pal-1* mRNA und dem MEX-3 Protein im 4-zelligen Embryo statt (Abbildung 1-4). Untersuchungen der *mex-3* mRNA Expression in *D. coronatus* und *A. nanus* haben gezeigt, dass hier die *mex-3* mRNA Expressionsmuster entgegengesetzt zu dem aus *C. elegans* bekannten sind (M. Kroiher pers. Mitteilung, Abbildung 1-5). Während bei *C. elegans* die *mex-3* mRNA in den frühen Stadien der Embryonalentwicklung anterior in den AB Zellen lokalisiert ist, wurde sie in *D. coronatus* und *A. nanus* in den posterioren Zellen EMS und P2 nachgewiesen. Ein weiterer gravierender Unterschied ist die zeitliche Ausdehnung der Expression. Bei *C. elegans* ist die *mex-3* mRNA nur bis zum 4-Zellstadium nachzuweisen und tritt ab dem 28-Zellstadium kurzzeitig in der Keimbahnzelle P4 auf (Abbildung 1-5). Sowohl bei *D. coronatus*, als auch bei *A. nanus* wird die posteriore Expression, die sich mit fortschreitender Embryogenese auf die Keimbahn beschränkt dort bis in die Morphogenesestadien aufrechterhalten. Vor Beginn der Morphogenese tritt eine weitere Expressionsdomäne im anterioren Teil des Embryos auf (Abbildung 1-5). In den entsprechenden Embryonalstadien konnte in *C. elegans* keine anteriore *mex-3* Expression nachgewiesen werden. Da in *C. elegans* eine Kolo-kalisation von *mex-3* und *pal-1* unmöglich ist (siehe 1.5) war es von großem Interesse die *pal-1* mRNA Verteilung in *D. coronatus* zu untersuchen, da dort die *mex-3* mRNA in den Zellen lokalisiert ist, die in *C. elegans* *pal-1* mRNA exprimieren (siehe 1.7).

3.1 *Diploscapter coronatus* zeigt gravierende Unterschiede in der Expression der *pal-1* und *mex-3* mRNA im Vergleich zu *C. elegans*

Es konnte gezeigt werden, dass die *pal-1* mRNA in *D. coronatus* in frühen Stadien in denselben Zellen exprimiert wird wie die *mex-3* mRNA. Auch *pal-1* bildet wie schon zuvor

für die *mex-3* mRNA beschrieben (siehe 1.7) eine späte Expressionsdomäne (Abbildung 3-1). Die späten Expressionsdomänen von *pal-1* und *mex-3* sind entgegengesetzt lokalisiert, wobei die *mex-3* mRNA anterior und die *pal-1* mRNA posterior nachgewiesen wurde. Die Expression von *mex-3* und *pal-1* mRNA in der Keimbahn ist von Beginn der Embryonalentwicklung an kontinuierlich vorhanden (Abbildung 3-1).

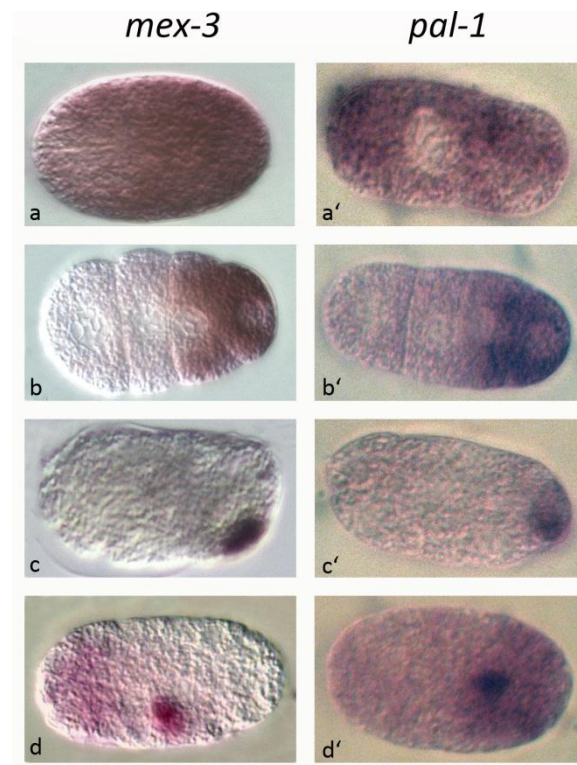


Abbildung 3-1: *mex-3* und *pal-1* mRNA Verteilung in *D. coronatus*: a-d: *mex-3* mRNA Verteilung in *D. coronatus* (Bilder: M. Kroiher). a'-d': *pal-1* mRNA Verteilung in *D. coronatus*

Die mRNA *in situ* Hybridisierungen von *mex-3* und *pal-1* in *D. coronatus* zeigten, dass eine gegensätzlich lokalisierte Expression der beiden Genprodukte, wie sie aus *C. elegans* bekannt ist, bei *D. coronatus* in späteren Stadien der Embryonalentwicklung auftritt (Abbildung 3-1, d+d'). Um die räumliche und zeitliche Ausdehnung der mRNA Expressionsmuster von *mex-3* und *pal-1* in *D. coronatus* genauer zu untersuchen, wurden mRNA *in situ* Hybridisierungen durchgeführt, bei denen beide mRNAs im selben Embryo angefärbt werden.

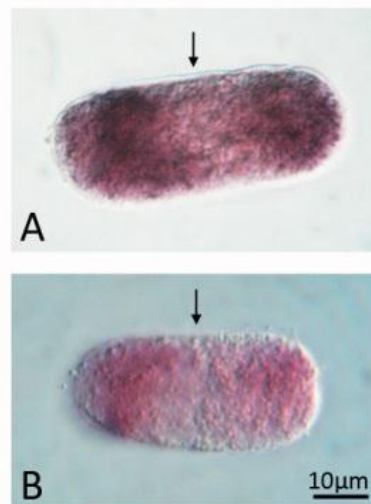


Abbildung 3-2: mRNA doppel *in situ* Hybridisierung von *mex-3* und *pal-1* in *D. coronatus*: Die Expressionsdomänen der *mex-3* mRNA (anterior, links) und *pal-1* mRNA (posterior, rechts) sind räumlich deutlich voneinander getrennt. In der Mitte des Embryos ist keine Färbung erkennbar (schwarzer Pfeil).

Die zweifachen mRNA *in situ* Hybridisierungen zeigen deutlich, dass die späten Expressionsdomänen von *mex-3* und *pal-1* gleichzeitig auftreten, räumlich aber klar voneinander abgegrenzt sind (Abbildung 3-2). Zwischen beiden ist deutlich ein ungefärbter Bereich zu erkennen. Dies deutet darauf hin, dass die Interaktion zwischen *mex-3* und *pal-1*, die bei *C. elegans* für die gegensätzliche Verteilung der beiden Genprodukte im 4-Zellstadium verantwortlich ist, bei *D. coronatus* möglicherweise in der Embryonalentwicklung zeitlich verschoben wurde und erst während der zweiten, später auftretenden Expressionsdomäne von *mex-3* und *pal-1* stattfindet.

3.2 Expression des *Diploscapter coronatus* PAL-1 Proteins

Um diese auffälligen Unterschiede in der Expression von *mex-3* und *pal-1* in *D. coronatus* besser zu verstehen, sollte die Lokalisation des PAL-1 Proteins untersucht werden. Da in *C. elegans* eine Expression von *mex-3* und *pal-1* in denselben Zellen dazu führt, dass die *pal-1* mRNA abgebaut (siehe 1.5) wird, sollte untersucht werden, ob möglicherweise die Koexpression der beiden Gene in EMS und P2 bei *D. coronatus* nur auf die mRNA Ebene beschränkt ist. Um festzustellen, ob sich die Expressionsdomänen von mRNA und Protein

decken, oder ob diese voneinander abweichen, sollten polyklonale Antikörper gegen das MEX-3 und das PAL-1 Protein von *D. coronatus* hergestellt werden.

Da *pal-1* zur großen Klasse der Homöobox Gene gehört war es notwendig einen spezifischen Antikörper zu generieren, der ausschließlich das PAL-1 Protein und keine anderen Homöoboxgene erkennt. Als Antigen, das zur Antikörperherstellung verwendet werden sollte, wurde ein 25 kDa großes N-terminales Fragment des PAL-1 Proteins gewählt, das die Homöobox nicht beinhaltet. So sollte eine spezifische Bindung des Antikörpers an das PAL-1 Gen gewährleistet werden. Dieses Proteinfragment konnte in *E. coli* M15 erfolgreich heterolog exprimiert und anschließend über den angefügten His-tag und Ni-NTA aufgereinigt werden (Abbildung 3-3).

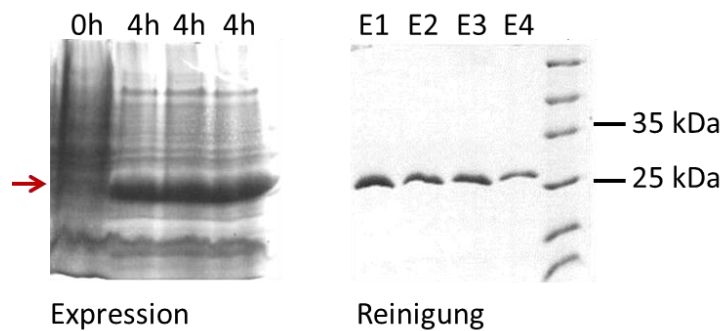


Abbildung 3-3: Expression und Reinigung des *D. coronatus* PAL-1 Fragments: Das zur Expression verwendete Fragment ist 28 kDa groß. Der rote Pfeil zeigt die erfolgreiche Induktion der Expression. Gezeigt sind 0h und 4h nach der Induktion mit 1 mM IPTG. Die Elutionsfraktionen der Reinigung (E1-E4) zeigen, dass erfolgreich über das His-Tag mit Ni NTA Agarose gereinigt werden konnte.

Der *D. coronatus* PAL-1 Antikörper zeigte in immunhistochemischen Färbungen im Embryo kein eindeutiges Bild (Abbildung 3-4). Vielmehr traten schwache, schwer zu interpretierende Färbungen auf. Diese deuten möglicherweise auf eine Lokalisation des PAL-1 Proteins in der Keimbahn hin. Diese wäre aufgrund der mRNA Lokalisation (Abbildung 3-1) und der aus *C. elegans* bekannten Funktion und Lokalisation von *pal-1* auch zu erwarten gewesen. Eine eindeutige Interpretation der PAL-1 Protein Lokalisation ist nicht möglich, was auch auf eine starke Hintergrundfärbung zurückzuführen ist, die möglicherweise mit Problemen bei der Fixierung der Embryonen zusammenhängt.

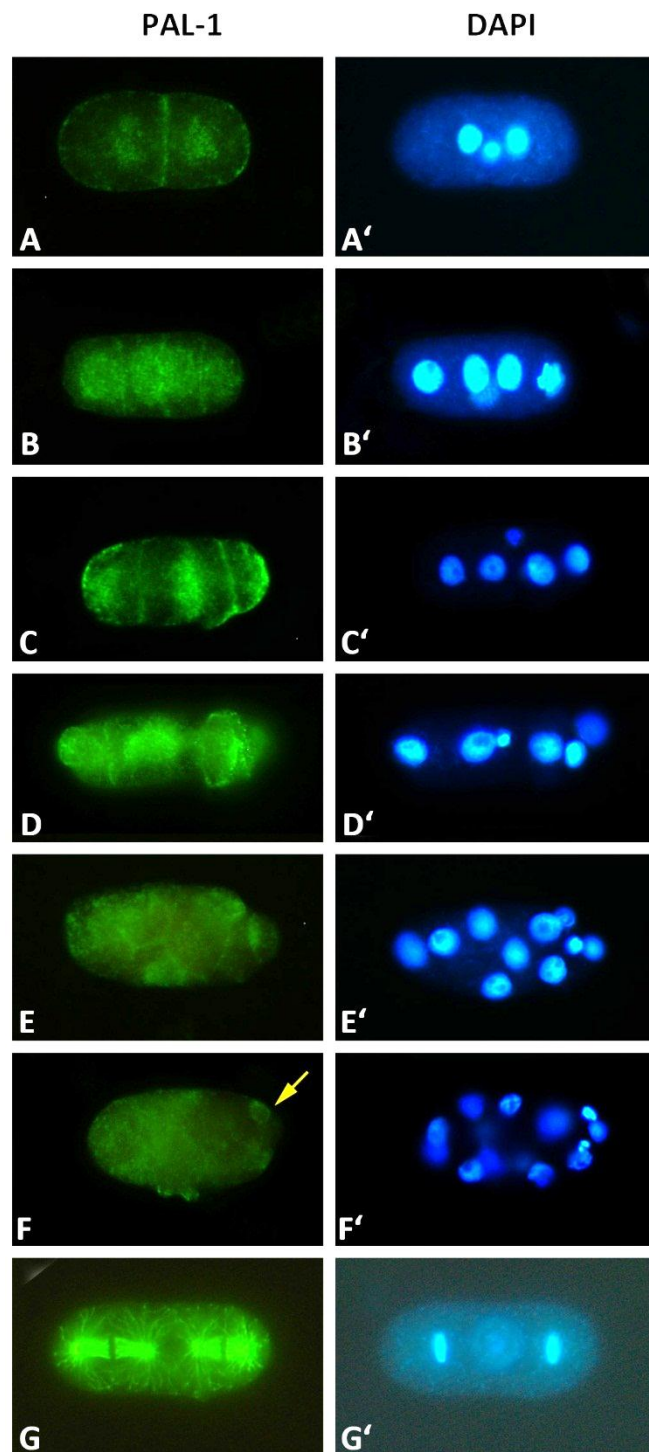


Abbildung 3-4: Antikörperfärbung gegen das PAL-1 Protein aus *D. coronatus*: A-F: Antikörperfärbungen von *D. coronatus* Embryonen gegen das PAL-1 Protein. Die korrespondierenden Kernfärbungen mit DAPI sind in A'-F' gezeigt. Im Zwei- und Vier-Zellstadium ist eine Lokalisation des PAL-1 Proteins in den Kernen zu erkennen. Während im Zweizeller beide Zellkerne (AB und P1) markiert sind scheint diese Markierung verstärkt in den AB Tochterzellen zu finden sein. In späteren Stadien ist möglicherweise die P4 Zelle markiert (gelber Pfeil). G: Als Positivkontrolle wurde ein α -Tubulin Antikörper verwendet (G' zeigt das zugehörige DAPI Bild). Als sekundärer Antikörper wurde ein goat anti rabbit Alexa Fluor 488 verwendet.

Da bei *C. elegans* das MEX-3 Protein entscheidend für die Bindung der *pal-1* mRNA ist, sollte auch hierfür ein spezifischer polyklonaler Antikörper hergestellt werden. Es wurde ein Proteinfragment exprimiert, das die KH Domäne nicht beinhaltet (Abbildung 3-5). Das Fragment mit einer Größe von nur 8 kDa war jedoch zu klein, um als Antigen für die Antikörperherstellung mittels Immunisierung eines Kaninchens verwendet zu werden.

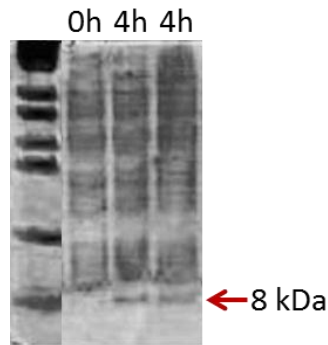


Abbildung 3-5: Expression des 8 kDa MEX-3 Fragments aus *D. coronatus*: Gezeigt sind die Expressionen 0h und 4h nach Induktion mit 1 mM IPTG. Bei 8 kDa ist deutlich die induzierte Expression des MEX-3 Fragments zu erkennen.

Nach Homologiestudien der KH-Domänen Proteine in Nematoden zeigte sich, dass diese nicht in einer ähnlich hoch konservierten Form wie z.B. die Homöobox auftreten. Im Folgenden wurde deshalb das komplette MEX-3 Protein heterolog exprimiert und aufgereinigt (Abbildung 3-6). Da das MEX-3 Protein von den zur Expression gewählten *E. coli* M15 Zellen (Tabelle 2-8) jedoch nur sehr schlecht exprimiert wurde, war es nicht möglich das MEX-3 Protein in ausreichender Menge zu reinigen. Es konnte deshalb kein *D. coronatus* MEX-3 Antikörper hergestellt werden.

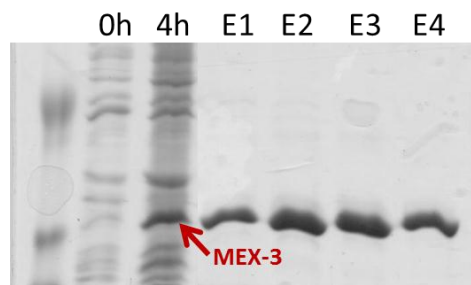


Abbildung 3-6: Heterologe Expression und Reinigung des *D. coronatus* MEX-3 Proteins: Gezeigt sind die Expressionen 0h und 4h nach Induktion mit 1 mM IPTG. Die induzierte Expression des MEX-3 Proteins ist deutlich zu erkennen (roter Pfeil). E1-E4 zeigen die Elutionsfraktionen des gereinigten MEX-3 Proteins.

3.3 *A. nanus* und *Acrobeloides sp.* (PS1146) zeigen Unterschiede im *mex-3* mRNA Expressionsmuster

A. nanus zeigt dasselbe *mex-3* mRNA Expressionsmuster wie *D. coronatus* (Abbildung 1-5). Um innerhalb der *Cephalobiden* mögliche Unterschiede in der *mex-3* Expression aufzudecken, sollte das *mex-3* Gen eines weiteren Vertreters dieser Gruppe isoliert werden. Hier wurde *Acrobeloides sp.* (PS1146) (im Folgenden als PS1146 bezeichnet) ausgewählt, ein naher Verwandter von *A. nanus* (beide Clade 11), der sich von diesem jedoch im Fortpflanzungsmodus unterscheidet. Während sich *A. nanus* parthenogenetisch fortpflanzt ist PS1146 ein Hermaphrodit, wie *C. elegans*. Es ist bekannt, dass innerhalb der *Cephalobiden* die Polarität im Embryo unabhängig von Spermium etabliert wird (Goldstein et al., 1998). Deshalb wurden Vertreter der *Cephalobiden* mit unterschiedlichen Fortpflanzungsmodi gewählt. So sollte untersucht werden ob die *Cephalobiden* ein einheitliches *mex-3* Expressionsmuster zeigten, oder ob mögliche Unterschiede der *mex-3* Expression mit dem Fortpflanzungsmodus zusammenhängen könnten. Da von PS1146 keine Genomdaten existieren, wurde das *mex-3* Gen mittels degenerierter PCR und anschließender 3' RACE und 5' SL1 PCR erfolgreich kloniert und so die vollständige Nukleinsäuresequenz aufgeklärt.

Sequenzvergleiche der beiden *mex-3* Sequenzen zeigten eine hohe Sequenzidentität, was die Vermutung zuließ, dass auch die Expressionsdomänen keine großen Unterschiede zeigen würden (Abbildung 3-7).



Abbildung 3-7: Nukleinsäuresequenzvergleich von *A. nanus mex-3* und PS1146 *mex-3*: Die *mex-3* Nukleinsäuresequenzen von *A. nanus* und PS1146 zeigen eine hohe Identität. (**schwarz**: identische Nukleinsäuren; **weiß**: unterschiedliche Nukleinsäuren; -- : Gaps)

Im Folgenden durchgeführte mRNA *in situ* Hybridisierungen widerlegten jedoch die Annahme, dass die *mex-3* mRNA innerhalb der beiden *Cephalobiden* ein konserviertes Expressionsmuster zeigt. Die Verteilung der *mex-3* mRNA innerhalb der *Cephalobiden* zeigt kein konserviertes Muster (Abbildung 3-8). Die bei *A. nanus* auftretende frühe posteriore Lokalisation der *mex-3* mRNA in EMS und P2 ist bei PS1146 nicht vorhanden. Bei diesem ist eine *mex-3* Expression erst ab dem 8-Zellstadium nachzuweisen. Diese beginnt in den anterior gelegenen AB Zellen und weitet sich mit fortschreitender Embryogenese im anterioren Embryo aus. Im Zuge der weiteren Entwicklung wird dieses Expressionsmuster dann der aus *A. nanus* bekannten späten anterioren Expressionsdomäne vergleichbar (Abbildung 3-8), wobei in den außen liegenden hypodermalen AB Zellen keine *mex-3* mRNA nachgewiesen werden konnte. Die *mex-3* mRNA Expressionsdomäne breitet sich in PS1146, wie in *A. nanus* zusätzlich entlang der ventralen Seite bis hin in den posterioren Bereich des Embryos aus (Abbildung 3-8 E+J). Bei diesen Zellen könnte es sich um den ventralen Nervenstrang und posteriore Ganglienzellen handeln (Sulston and Horvitz, 1977; Sulston et al., 1983). Eine *mex-3* Expression in der Keimbahn, wie sie in *D. coronatus* und *A. nanus* vorkommt (siehe 1.7) ist bei PS1146 nicht nachzuweisen (Abbildung 3-8).

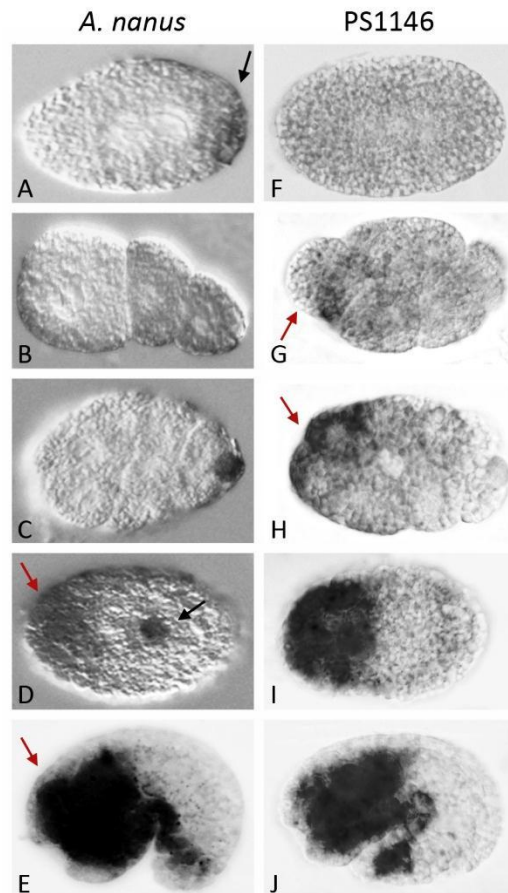


Abbildung 3-8: *mex-3* mRNA *in situ* Hybridisierung in den beiden Cephalobiden *A. nanus* und PS1146: A-E: Die *A. nanus* *mex-3* mRNA ist in frühen Stadien (A-C) posterior lokalisiert (schwarzer Pfeil in A). In späteren Stadien (D+E) existiert eine anteriore Expressionsdomäne (rote Pfeile in D+E). Außerdem findet man die *mex-3* mRNA in der *A. nanus* Keimbahn (schwarzer Pfeil in D). **F-J:** Die *mex-3* mRNA ist erst ab dem 6-Zellstadium nachweisbar. Die Expression beginnt in den anterioren AB Zellen (rote Pfeile in G+H) und breitet sich später im gesamten anterioren Embryo aus, wobei die anterioren hypodermalen AB Zellen nicht markiert sind (I+J). Sowohl in *A. nanus*, also auch in PS1146 sind ventrale Zellen bis in den posterioren Bereich des Embryos markiert (E+J), die den zukünftigen ventralen Nervenstrang und posteriore Ganglien darstellen könnten (Sulston and Horvitz, 1977; Sulston et al., 1983).

Die Erkenntnisse, die aus der *mex-3* Expressionsanalyse der beiden *Cephalobiden* gewonnen wurden, also die Unterschiede im Expressionsmuster der *mex-3* mRNA von *A. nanus* und PS1146 deuten darauf hin, dass der Fortpflanzungsmodus einen Einfluss auf die Lokalisation der *mex-3* mRNA haben könnte.

3.4 Die *Panagrolaimiden* bieten ein attraktives Modell zur vergleichenden Untersuchung der *mex-3* / *pal-1* Expression

Für die weitere Aufklärung der *mex-3* / *pal-1* Expressionsmuster innerhalb der Nematoden wurde im Folgenden die Gattung *Panagrolaimus* ausgewählt. Die *Panagrolaimiden*, die der Clade 10 zugeordnet werden, sind freilebende Nematoden, die sich wie *C. elegans* (Clade 9) kultivieren lassen. Die *Panagrolaimiden* wurden gewählt, da innerhalb der Gattung alle drei Fortpflanzungsmodi auftreten. Außerdem sollten die ausgewählten Spezies parallel zu meiner Arbeit sequenziert werden, was vergleichende Untersuchungen des Genaufbaus in Bezug auf die Intron / Exon Anzahl und Verteilung zulassen würde. Für weitere Untersuchungen wurden der parthenogenetische (P) *Panagrolaimus sp.* (PS1159) (im Folgenden als PS1159 bezeichnet), der hermaphroditische (H) *Panagrolaimus sp.* (JU765) (im Folgenden als JU765 bezeichnet) und der gonochoristische (G) *P. superbus* ausgewählt. Da zu diesem Zeitpunkt noch keine genomischen Sequenzdaten vorlagen, musste zunächst von allen drei Spezies mRNA isoliert werden, um nach einer anschließenden cDNA Synthese die *mex-3* und *pal-1* Homologe über degenerierte PCR, sowie 5' SL1 und 3' RACE PCR klonieren zu können.

Die Sequenzen der *mex-3* und *pal-1* Homologe von PS1159, JU765 und *P. superbus* konnten erfolgreich identifiziert werden. Über Sequenzvergleiche mit Hilfe des Blast x Algorithmus (Altschul et al., 1990) konnte für alle gefundenen Sequenzen gezeigt werden, dass es sich um die jeweiligen *mex-3* und *pal-1* Homologe handelt.

3.4.1 Die PS1159, JU765 und *P. superbus* *mex-3* und *pal-1* Homologe zeigen deutliche Sequenzunterschiede innerhalb der konservierten Domänen

Zur vergleichenden Analyse der *mex-3* Sequenzen aus den drei untersuchten *Panagrolaimiden* wurde mittels der Sequenzanalysesoftware Geneious (Drummond et al. 2011) ein globales Alignment angefertigt, was den direkten Vergleich der Sequenzen untereinander ermöglicht. Die Sequenzvergleiche wurden nur innerhalb der KH-Domäne durchgeführt (Abbildung 3-9), da deren Aufbau für die Interaktion zwischen KH-Domäne und mRNA essentiell ist (Valverde et al., 2008).



Abbildung 3-9: Nukleinsäuresequenzvergleich der *mex-3* KH-Domäne der *Panagrolaimiden*: PS1159 (P) und *P. superbis* (G) weisen untereinander eine deutlich höhere Sequenzidentität auf, als im Vergleich mit JU765 (H). (schwarz: identische Nukleinsäuren; weiß: unterschiedliche Nukleinsäuren; --: Gaps)

Während die Sequenzen der *mex-3* Homologe von PS1159 (P) und *P. superbis* (G) eine Sequenzidentität von 91,1% aufweisen, zeigt die Sequenz von JU765 (H) deutliche Unterschiede und nur eine Identität von 75,9% zu PS1159 und 75,6% zu *P. superbis*.

Dieser Befund könnte ein Hinweis auf Unterschiede sein, die mit dem Fortpflanzungsmechanismus korrelieren. Eine andere Erklärung ist die phylogenetische Einordnung der drei ausgewählten Spezies. Aktuelle Untersuchungen zeigen, dass JU765 vermutlich ein *Propanagrolaimus* ist und somit phylogenetisch entfernter von PS1159 und *P. superbis* einzuordnen wäre (P. Schiffer, pers. Mitteilung).

Die vergleichenden Sequenzanalysen der *Panagrolaimus pal-1* Homologen zeigen, dass sich auch hier die JU765 Sequenz deutlich von den anderen beiden *Panagrolaimiden* PS1159 und *P. superbis* unterscheidet. Die Sequenzen der *pal-1* Homologen von PS1159 und *P. superbis* zeigen eine Sequenzidentität von 86,3%. Die JU765 *pal-1* Sequenz ist nur zu ungefähr 54% identisch mit denen von *P. superbis* und PS1159 (Daten nicht gezeigt).

Um Gemeinsamkeiten oder Unterschiede in den Expressionsmustern von *mex-3* und *pal-1* aufzudecken, wurden mRNA *in situ* Hybridisierungen mit spezifischen Sonden für alle drei *Panagrolaimiden* durchgeführt. So sollte untersucht werden, ob sich die Unterschiede, die die *mex-3* und *pal-1* Sequenzen von JU765 zu PS1159 und *P. superbis* zeigen, auch im Expressionsmuster widerspiegeln.

3.4.2 mRNA *in situ* Hybridisierungen zeigen ein ähnliches *mex-3* und *pal-1* Expressionsmuster innerhalb der untersuchten *Panagrolaimiden*

Zur mRNA Expressionsanalyse wurden für PS1159, JU765 und *P. superbus* spezifische RNA Sonden hergestellt, um die Expressionsmuster von *mex-3* und *pal-1* zu identifizieren. So sollte die Expression innerhalb der *Panagrolaimiden*, aber auch mit *D. coronatus*, *A. nanus* und *C. elegans* verglichen werden. *D. coronatus* zeigt ein *mex-3* und *pal-1* Expressionsmuster, das sich stark von dem in *C. elegans* gefundenen unterscheidet (Kapitel 1.7). Die vergleichenden Expressionsstudien innerhalb der *Panagrolaimiden* sollten helfen, besser zu beurteilen, welches Expressionsmuster von *mex-3* und *pal-1* in den Nematoden ursprünglicher ist. Gleichzeitig sollte ein möglicher Einfluss des Fortpflanzungsmechanismus auf die Expression von *mex-3* und *pal-1* aufgedeckt werden.

Unerwarteter Weise zeigten alle drei *Panagrolaimiden* ein nahezu identisches Expressionsmuster, das von den bei *D. coronatus* und *A. nanus* gefundenen unterschied. Alle *Panagrolaimiden* zeigten bis zum 4-Zellstadium eine gleichmäßige Verteilung der *mex-3* und *pal-1* mRNA im Embryo. Ab diesem Stadium konnte dann die *mex-3* mRNA anterior und die *pal-1* mRNA posterior nachgewiesen werden. Bei PS1159 (P) und *P. superbus* (G) waren die mRNAs beider Gene hufeisenförmig am äußeren Rand des Embryos lokalisiert. Hierbei war die *pal-1* mRNA deutlich auf den posterioren und die *mex-3* mRNA auf den anterioren Embryo beschränkt (Abbildung 3-10). Bei JU765 (H) erstreckten sich beide Expressionsdomänen jeweils auf den gesamten posterioren (*pal-1*), bzw. anterioren (*mex-3*) Bereich des Embryos (Abbildung 3-10; Daten von *P. superbus* und JU765 nicht gezeigt).

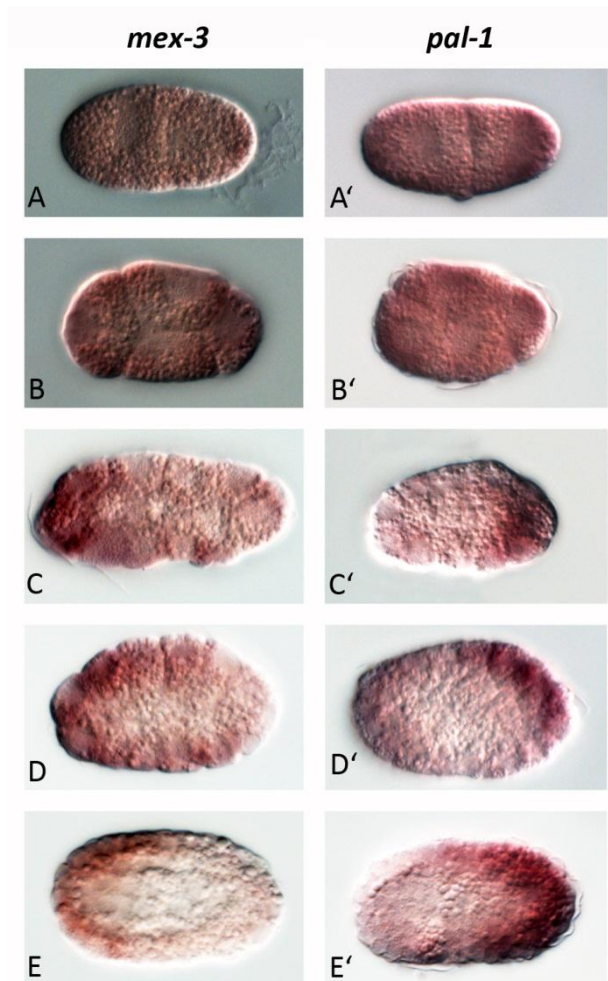


Abbildung 3-10: mRNA *in situ* Hybridisierung von *mex-3* und *pal-1* in *Panagrolaimus sp.* PS1159: A-E: In PS1159 ist die *mex-3* mRNA in den frühen Stadien (A+B) im gesamten Embryo verteilt. Später (C-E) ist sie anterior lokalisiert und bildet eine hufeisenförmige Expressionsdomäne aus. A'-E': Die PS1159 *pal-1* mRNA ist früh im gesamten Embryo nachweisbar (A'+B') und später (C'-E') hufeisenförmig im posterioren Embryo lokalisiert.

Da die mRNA Expressionsmuster aller untersuchten *Panagrolaimiden* gleichartig waren, zeigten sich keine Hinweise, auf Fortpflanzungsmodus abhängige Unterschiede. Alle drei *Panagrolaimiden* zeigen eine nahezu identische *mex-3* und *pal-1* mRNA Verteilung. Die gleichmäßige Verteilung der *mex-3* und *pal-1* mRNA in den frühen Embryonalstadien der drei untersuchten *Panagrolaimiden* weist auf deutliche Unterschiede der molekularen Prozesse in der anterior-posterioren Musterbildung zwischen den *Panagrolaimiden* und *C. elegans* hin. Da auch die in *D. coronatus* gefundenen mRNA Expressionsmuster von *mex-3* und *pal-1* deutliche Unterschiede zu *C. elegans* zeigten (Abbildung 3-1), findet die für *C. elegans* essentielle frühe Interaktion von *mex-3* und *pal-1* (Huang et al., 2002) offenbar

nicht in allen Nematoden statt. Für diese Interaktion ist jedoch die Verteilung des MEX-3 Proteins entscheidend, die im Folgenden beschrieben werden soll.

3.4.3 In PS1159 unterscheiden sich die *mex-3* mRNA- und Protein-Expressionsmuster deutlich voneinander

Für die Aufklärung des Expressionsmusters des MEX-3 Proteins wurde PS1159 ausgewählt, da dieser unter Standardbedingungen am besten in großer Individuenzahl zu kultivieren ist, was für die Herstellung von Präparaten für immunhistochemische Färbungen ein entscheidender Vorteil ist. Als Antigen zur Antikörperherstellung wurde das komplette PS1159 MEX-3 Protein erfolgreich in *E. coli* M15 heterolog exprimiert und anschließend gereinigt (Abbildung 3-11). Da die Immunreaktion von Kaninchen und somit die Antikörperproduktion nach Auskunft des Herstellers (SeqLab, Göttingen) deutlich stärker ausfällt, wenn das als Antigen verwendete Protein in Lösung und nicht als SDS-PAGE Fragment injiziert wird, musste es über eine Sephadex G25 Säule (GE, Frankfurt am Main) in 20mM $\text{NH}_4\text{CH}_3\text{COO}$ (pH5,9) umgepuffert werden, da der zur Elution verwendete 6 M Guanidinium Puffer zur Injektion nicht verwendet werden konnte.

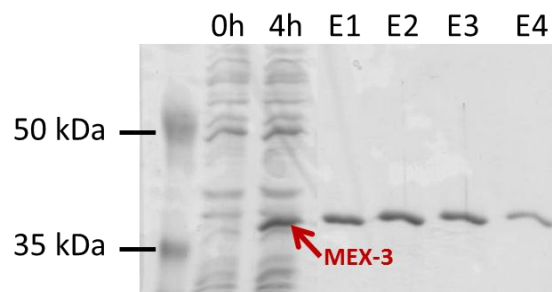


Abbildung 3-11: Heterologe Expression und Aufreinigung von *Panagrolaimus sp.* PS1159 MEX-3: 0h + 4h: Zeitpunkt der Expression 0 Stunden und 4 Stunden nach Induktion mit 1 mM IPTG. Die heterologe Expression von MEX-3 bei ca. 35 kDa ist deutlich zu erkennen. **E1 – E4:** Elutionsfraktionen des MEX-3 Proteins nach der Batch Reinigung mittels His-Tag und NiNTA.

Das MEX-3 Protein diente im Folgenden der Herstellung eines polyklonalen Antikörpers. Aus dem nach drei Injektionen erhaltenen Serum wurde der Antikörper mit Ammoniumsulfat ausgefällt und anschließend für immunhistochemische Färbungen in PS1159 Embryonen verwendet (Abbildung 3-12). Es zeigte sich, dass sich das Expressionsmuster des MEX-3

Proteins deutlich von dem der mRNA unterscheidet. Das MEX-3 Protein ist immer um den Zellkern lokalisiert. Im 1- bis 4-Zellstadium konnte es in allen Blastomeren perinukleär nachgewiesen werden. Die Expression bleibt in der P-Zelllinie und der jeweiligen Schwesterzelle, also P1+AB, P2+EMS und P3+C, erhalten und setzt sich so bis zur Teilung von P3 unverändert fort. Ab der Geburt von P4 ist das MEX-3 Protein ausschließlich auf die P4 Zelle und später auf ihre Nachkommen Z2 und Z3 beschränkt. Da zur Kontrolle P-Granula Färbungen angefertigt wurden, kann ausgeschlossen werden, dass der MEX-3 Antikörper die P-Granula, und nicht das MEX-3 Protein, eine P-Granula Komponente, erkennt. Zwar decken sich die Muster der P-Granula und MEX-3 Färbungen in den Zellen der P-Linie, in den jeweiligen Schwesterzellen, in denen das MEX-3 Protein nachgewiesen werden konnte, sind jedoch keine P-Granula vorhanden (Abbildung 3-12). Die exklusive Expression des MEX-3 Proteins in den posterioren Zellen (Abbildung 3-12) untermauert deutlich die These, dass das für *C. elegans* beschriebene anteriore-posteriore *mex-3* / *pal-1* Expressionsmuster (Huang et al. 2002; Draper et al. 1996; Hunter & Kenyon 1996) nicht in allen Nematoden essentiell für eine korrekte Musterbildung entlang der posterioren Körperachse sein kann.

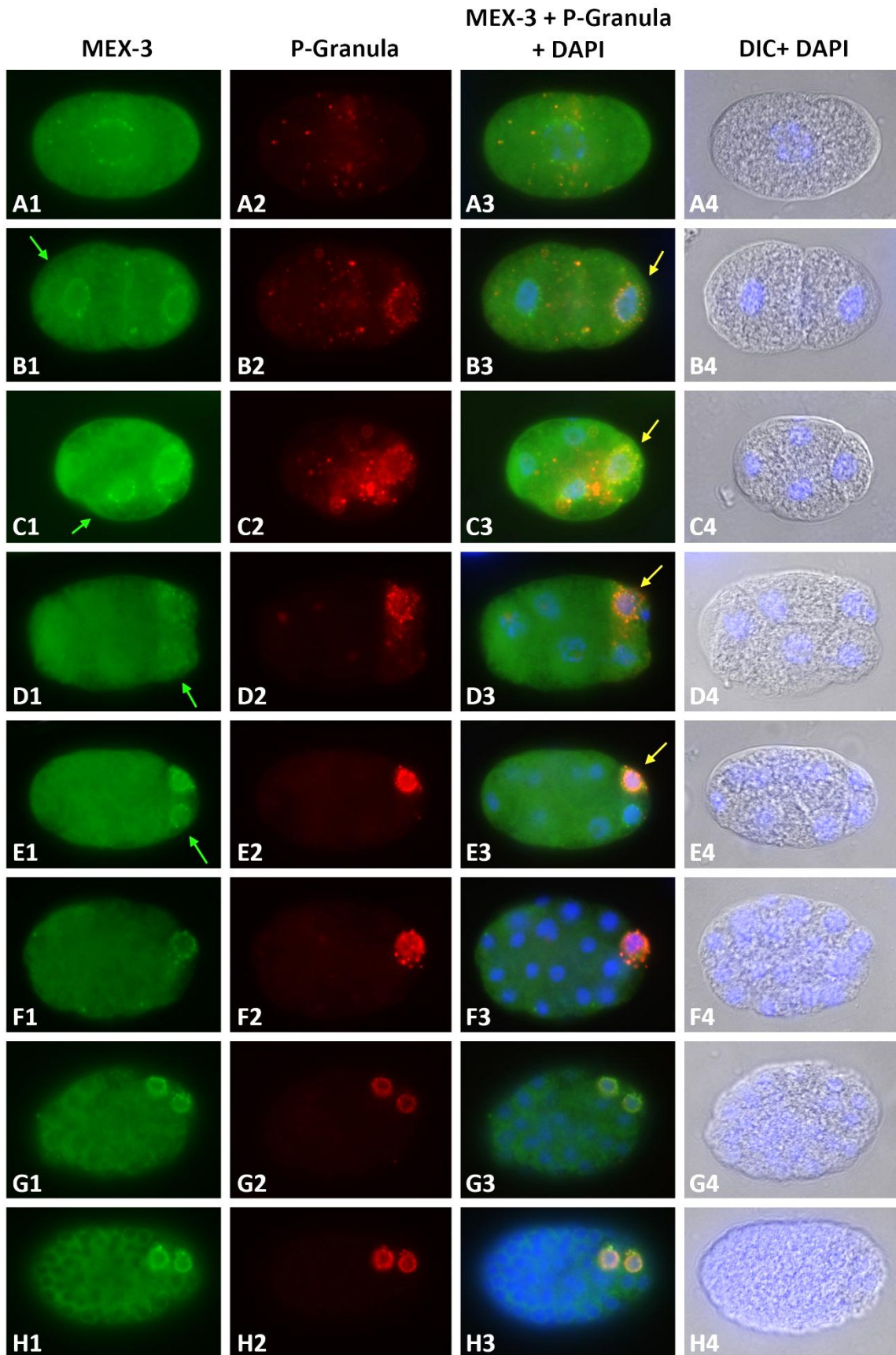


Abbildung 3-12: Immunhistochemische Färbung von PS1159 MEX-3: A1-H1: Markierung des PS1159 MEX-3 Proteins. Das MEX-3 Protein ist von P0 (**A1**) bis zur Teilung von P3 (**E1**) jeweils in den Zellen der P-Linie und deren Schwesterzellen (grüne Pfeile **B1-E1**) exprimiert. Ab der Geburt von P4 ist MEX-3 hier und später in deren Tochterzellen sowie Z2 und Z3 lokalisiert (**F1-H1**). In **G1+H1** ist ein anteriorer Ring von Zellen gefärbt, der mit der Verteilung der *mex-3* mRNA korreliert. **A2-H2:** P-Granula Markierung mit dem Antikörper L416 (Strome & Wood, 1983). **A3-H3:** Überlagerung der korrespondierenden MEX-3, P-Granula und DAPI Aufnahmen. Es ist deutlich zu erkennen, dass das MEX-3 Protein im 2-Zellsradium in der Keimbahn eine Kolo-kalisierung mit den P-Granula zeigt (gelbe Pfeile **B3-E3**). **A4-H4:** Überlagerung der korrespondierenden DIC und DAPI Aufnahmen. (Bilder: L. Lubowiecki)

Um die Evolution von *mex-3* und *pal-1* besser zu verstehen, konnten nun die Strukturen der beiden Gene auf genomischer Ebene untersucht werden. Es sollte festgestellt werden, ob *C. elegans* Besonderheiten zeigt, die auf die spezielle Funktion des *mex-3* Gens in der Regulation von *pal-1* hinweisen.

3.5 Die Exon / Intron Verteilung der *pal-1* und *mex-3* Gene zeigt deutliche Unterschiede

Die aus den Sequenzierprojekten für die *Panagrolaimiden* PS1159 und JU765 gewonnenen Daten (P. Schiffer, pers. Mitteilung) konnten von mir zur Analyse der Exon / Intron Verteilung genutzt werden. Zudem wurden freundlicherweise die Genomdaten von *A. nanus* von Itai Yanai (Technion, Haifa, Israel) und *D. coronatus* von Yuji Kohara (NIG, Mishima, Japan) für diese Studien zur Verfügung gestellt. Zusätzlich zu *C. elegans* (The *C. elegans* Sequencing Consortium, 1998) und den oben genannten Nematoden wurde mit *C. briggsae* (Stein et al., 2003) ein weiterer *Caenorhabditis*-Vertreter in den Vergleich mit einbezogen um mögliche Besonderheiten dieser Gruppe zu finden.

Der Aufbau die *pal-1* Gens zeigt im phylogenetischen Stammbaum der Nematoden mit Blick auf die deutliche Unterschiede (Abbildung 3-13). *A. nanus*, der der Clade 11 zugeordnet ist, besitzt ebenso wie die *Panagrolaimiden* PS1159 und JU765 aus Clade 10 nur vier *pal-1* Exons. Die Exons der *Panagrolaimiden* variieren jedoch klar in der Größe und Anordnung im Vergleich mit *A. nanus*. Innerhalb der *Panagrolaimiden* sind keine deutlichen Unterschiede im Genaufbau auszumachen. Sowohl JU765, als auch PS1159 besitzen 5' gelegen jeweils 3

aufeinanderfolgende Exons, während zwischen dem dritten und vierten Exon ein ca 750 bp (JU765), bzw. 1100 bp (PS1159) großes Intron liegt. Betrachtet man Clade 9, so ist hier sogar innerhalb dieser ein klarer Unterschied zu finden. Während die beiden untersuchten *Caenorhabditis*-Vertreter, zwar dieselbe Anzahl an Exons aufweisen, variiert deren Größe und Verteilung hingegen deutlich. Das *pal-1* Gen von *D. coronatus* hat mit neun die meisten Exons innerhalb der untersuchten Nematoden. Auffällig ist, dass bei fast allen Nematoden das am weitesten 3' gelegene Intron das mit Abstand größte ist. Für *A. nanus* kann keine Aussage über die Größe der Introns gemacht werden, da in der Genomsequenz große unaufgeklärte Bereiche vorkommen, die auch zwischen den einzelnen *pal-1* Exons liegen.

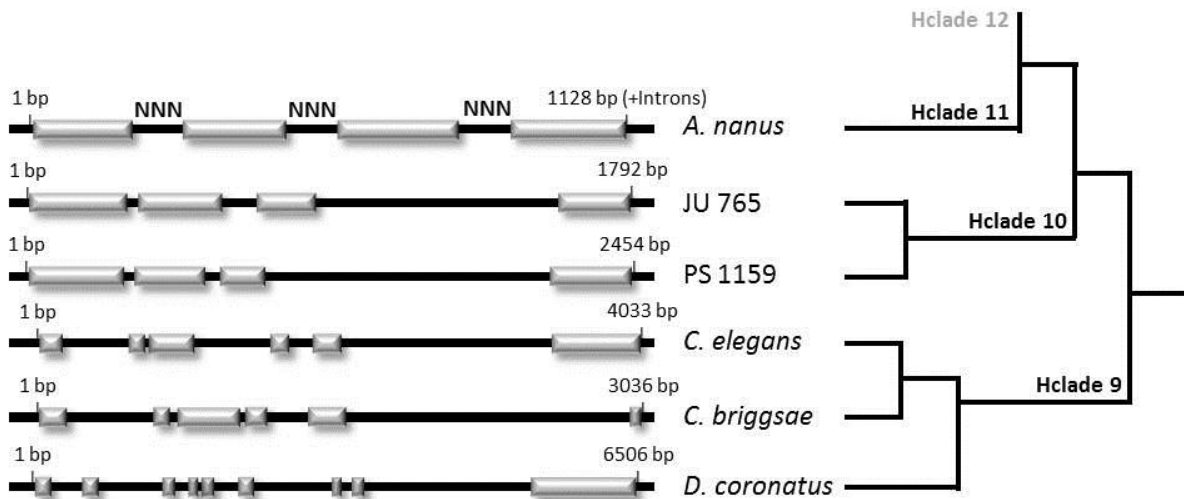


Abbildung 3-13: Exon / Intron Struktur der *pal-1* Gene: Grau: Exons; schwarz: nicht kodierende Bereiche; NNN: unbekannte Sequenz; Der Stammbaum zeigt die phylogenetische Einordnung der Nematoden, basierend auf SSU rDNA Sequenzen (Holterman et al., 2006). NNN = unaufgeklärte Sequenzbereiche.

Da bei der Struktur der *pal-1* Gene deutliche Unterschiede innerhalb der Nematoden gefunden werden konnten, wurde auch der Aufbau der *mex-3* Gene untersucht. Hier konnten ebenfalls deutliche Unterschiede im Aufbau festgestellt werden. Sowohl die Exonzahl, als auch die Größe der Exons und Introns variiert stark. Die Exonzahl variiert zwischen vier bei PS1159 und neun bei *A. nanus* und *C. briggsae*. Unterschiedliche Exonzahlen sind sogar zwischen den beiden *Caenorhabditis*-Spezies zu finden (Abbildung 3-14).

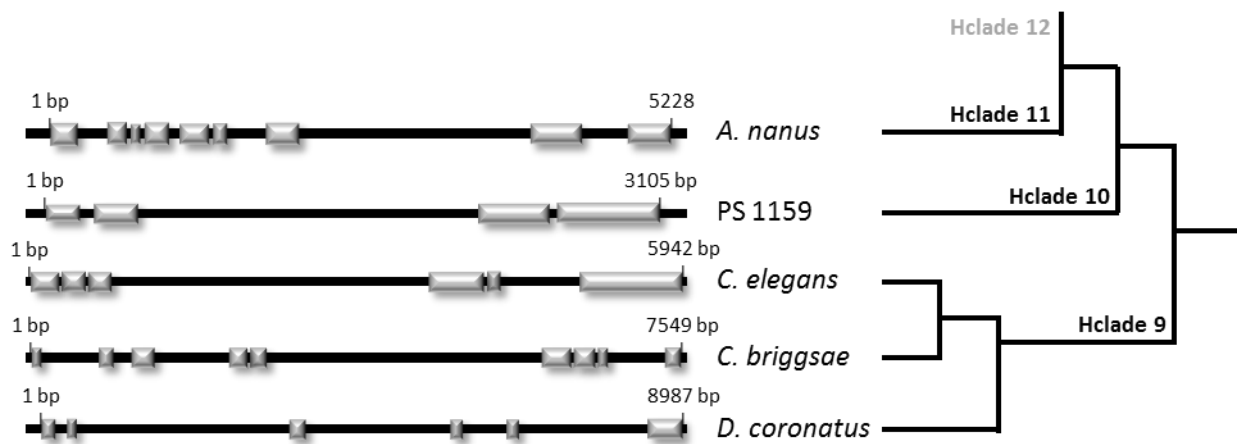


Abbildung 3-14: Exon / Intron Struktur der *mex-3* Gene: Grau: Exons; schwarz: nicht kodierende Bereiche; Der Stammbaum zeigt die phylogenetische Einordnung der Nematoden, basierend auf SSU rDNA Sequenzen (Holterman et al., 2006).

Zur Analyse der möglichen Funktion der *mex-3* und *pal-1* Gene wurden im Folgenden hierfür essentielle Motive untersucht. Für die Bindung von mRNA muss *mex-3* eine intakte KH-Domäne besitzen. Die *pal-1* mRNA hingegen muss in der 3'UTR das MRE, also die korrekte Erkennungssequenz für das MEX-3 Protein besitzen.

3.6 Sequenzanalysen weisen darauf hin, dass die *mex-3* / *pal-1* Interaktion in der frühen Embryogenese auf Vertreter der Gattung *Caenorhabditis* beschränkt ist

Genauere Betrachtungen der *mex-3* und *pal-1* homologen Sequenzen zeigten sowohl gravierende Unterschiede, als auch Gemeinsamkeiten in Bezug auf die für die Interaktion essentiellen Sequenzmotive. Bei *C. elegans* binden die KH Domänen des MEX-3 Proteins an ein konserviertes Sequenzmotiv, das MRE (MEX-3 Recognition-Element), das in der 3'UTR der *pal-1* mRNA liegt (Pagano et al., 2009). Um diese für die Bindung essentiellen Motive zu untersuchen wurden sowohl die KH-Domänen der *mex-3* homologen, als auch die 3'UTRs der *pal-1* homologen Sequenzen gezielt auf diese Motive untersucht.

3.6.1 Die KH-Domänen aller analysierten *mex-3* Homologe können mRNA binden

Die Bindung der KH-Domäne an mRNA erfolgt über das konservierte GXXG Motiv (Valverde et al., 2008). Um festzustellen, ob die KH-Domäne der aufgeklärten *mex-3* Gene intakt ist, wurde in den Sequenzen nach dem GXXG Motiv gesucht. Da die Existenz einer Interaktion, wie sie aus *C. elegans* bekannt ist, im Blick auf die bisher beschriebenen Ergebnisse eher unwahrscheinlich ist, war zu erwarten, dass auch die *mex-3* KH-Domäne einem weniger hohen Selektionsdruck unterliegt und sich somit hier Mutationen durchsetzen könnten, die eine mRNA Bindung verhindern.

Diese Vermutung konnte nicht bestätigt werden. Sequenzvergleiche und Analysen der KH-Domänen zeigten, dass alle bekannten *mex-3* Gene ein intaktes GXXG Motiv besitzen, das innerhalb der Nematoden vollständig konserviert ist. Alle bekannten MEX-3 Proteine sollten also die Fähigkeit zur mRNA Bindung besitzen (Abbildung 3-15).

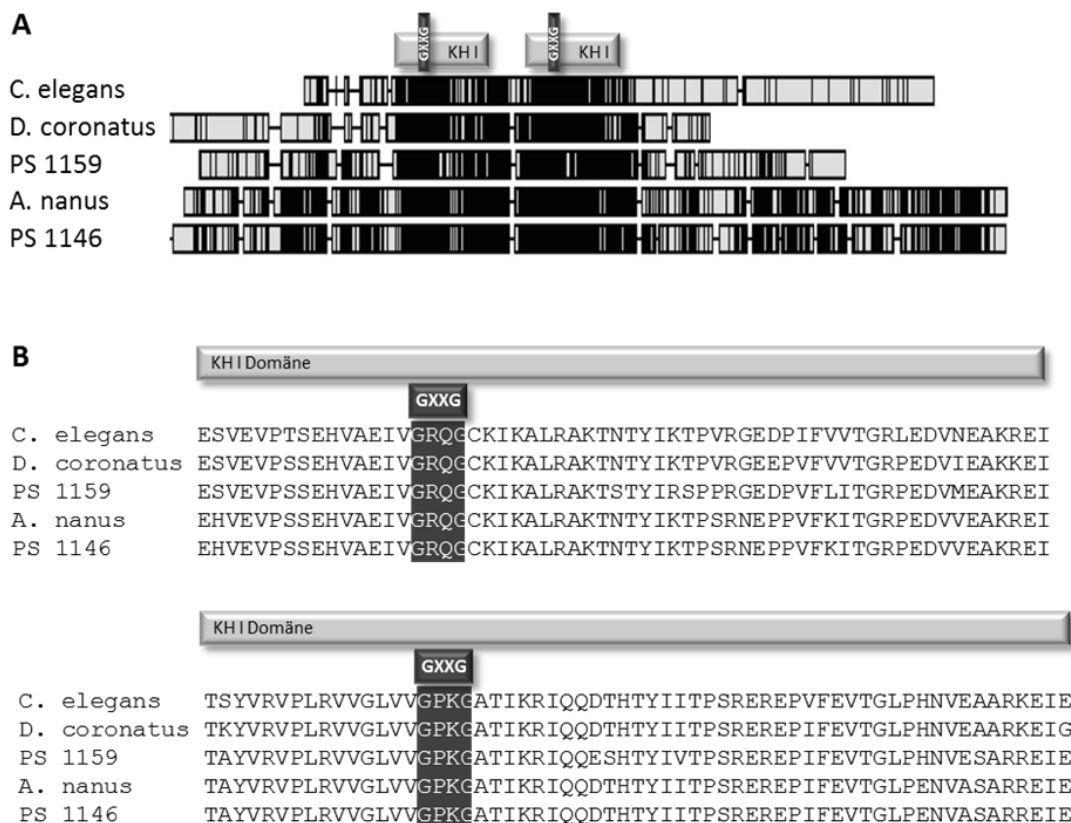


Abbildung 3-15: Aminosäuresequenzanalyse der *mex-3* KH-Domäne in ausgewählten Nematoden: **A:** Der Aminosäuresequenzvergleich der MEX-3 Proteinsequenzen ausgewählter Nematoden zeigt, dass in der KH-Domäne nur sehr wenige Aminosäureaustausche auftreten, während diese im restlichen Protein zahlreicher sind. (schwarz: identische Nucleinsäuren; weiß: unterschiedliche Nucleinsäuren; -: Gaps). **B:** Aminosäuresequenzvergleich der *mex-3* KH-Domänen. Beide KH-Domänen besitzen durch die Konservierung des GXXG Motivs die Fähigkeit zur RNA Bindung.

Die *mex-3* Sequenzanalysen haben gezeigt, dass alle bekannten *mex-3* Homologe der Nematoden zur mRNA Bindung befähigt sind. Um die potentielle Bindung des MEX-3 Proteins an die *pal-1* mRNA zu ermöglichen muss diese in der *pal-1* 3'UTR die konservierte Erkennungssequenz MRE besitzen. Im Folgenden wurden die bekannten *pal-1* Gene auf die Existenz des MREs untersucht.

3.6.2 Das MEX-3 Recognition Element in der *pal-1* 3'UTR wurde nur bei Vertretern der Gattung *Caenorhabditis* gefunden

Die Sequenz des MREs (Pagano et al., 2009) besteht aus 2 mal 4 konservierten Nukleinsäuren, zwischen denen 0-8 variable Nukleinsäuren liegen (Abbildung 3-16).

D K A G N₀₋₈ T H T A

Abbildung 3-16: MEX-3 Recognition Element (MRE): Das MRE besteht aus zwei mal vier Aminosäuren langen Motiven, die durch 0-8 variable Nukleinsäuren unterbrochen sind. Auch die vier Aminosäuren der Motive tolerieren eine geringe Variabilität.

Da dieses Sequenzmotiv in sich eine gewisse Variabilität erlaubt und es zudem im 3'UTR des *pal-1* Gens liegt, der keine konservierten Regionen besitzt und auch in der Größe eine sehr variabel ist, war es nicht möglich die Existenz des MREs in einem Alignment zu untersuchen. Es wurden alle bekannten *pal-1* UTR Sequenzen der Nematoden und zusätzlich die von *Drosophila melanogaster* und *Tribolium castaneum* untersucht. Diese beiden Außengruppen wurden hinzugezogen, da bekannt ist, dass *mex-3* auch bei *T. castaneum* eine entscheidende Rolle in der Regulation des *pal-1* Homologs *caudal* spielt.

Innerhalb der Nematoden konnte das MRE nur innerhalb der Gattung *Caenorhabditis* identifiziert werden. Keine andere bekannte *pal-1* mRNA besitzt diese Erkennungssequenz im *pal-1* 3'UTR. Bei den beiden untersuchten Außengruppen konnten MREs identifiziert werden. In Abbildung 3-17 sind stellvertretend für Nematoden und Außengruppen die *pal-1* mRNAs mit Lage der MREs gezeigt.

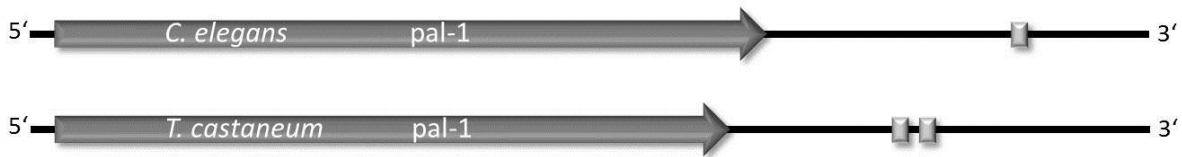


Abbildung 3-17: Schematische Darstellung der Lage der MREs: in *C. elegans* und *T. castaneum* sind in der *pal-1* 3'UTR MREs vorhanden, die eine Interaktion mit dem MEX-3 Protein erlauben würden.

Wenn die Interaktion zwischen dem MEX-3 Protein und der *pal-1* mRNA also, wie bei *C. elegans*, ausschließlich über eine Bindung der KH-Domäne an das MRE stattfinden kann, wäre zu erwarten, dass ein *pal-1* Gen ohne ein MRE in der 3'UTR vom MEX-3 Protein nicht gebunden wird und somit auch keine posttranskriptionale Regulation stattfinden kann. Um dieses zu belegen sollte die Interaktion zwischen den MRE-freien 3'UTRs der *Panagrolaimiden* und dem *C. elegans* MEX-3 Protein untersucht werden. Um möglichst ideale Bedingungen für die Bindung zu gewährleisten und auch die Existenz möglicherweise unbekannter Interaktionspartner sicherzustellen, sollten diese Versuche *in vivo* durchgeführt werden. Für diese Untersuchungen wurden die die *pal-1* 3'UTRs der drei *Panagrolaimiden* PS1159, JU765 und *P. superbus* ausgewählt, da so auch mögliche Unterschiede, die auf den Fortpflanzungsmodus zurückzuführen sein könnten, untersucht werden konnten.

3.7 *in vivo* Funktionstest der Interaktion zwischen dem *C. elegans* MEX-3 Protein und den *pal-1* 3'UTRs von PS1159, JU765 und *P. superbus*

Alle bisher im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen weisen darauf hin, dass die für *C. elegans* beschriebene Interaktion zwischen dem MEX-3 Protein und der *pal-1* mRNA nur innerhalb der Gattung *Caenorhabditis* existiert. Bei allen anderen untersuchten Nematoden führten Expression- und Sequenzanalysen zu gravierenden Unterschieden im Vergleich zu *C. elegans*. Diese Ergebnisse sollten *in vivo* verifiziert werden. Die *Panagrolaimiden* wurden ausgewählt, da hier die *pal-1* Sequenzen von drei Vertretern mit

unterschiedlichen Fortpflanzungsmodi im Rahmen dieser Arbeit aufgeklärt wurden und somit auch mögliche darauf beruhende Unterschiede betrachtet werden konnten. Zudem besitzt weder PS1159, JU765, noch *P. superbis* ein MRE, was eine Interaktion mit MEX-3 nach den bisherigen Erkenntnissen (Pagano et al., 2009) unmöglich machen sollte.

Um dies *in vivo* zu zeigen wurden transgene *C. elegans* hergestellt, die unter Kontrolle des *C. elegans pal-1* Promotors ein GFP::Histon 2B Fusionsprotein exprimieren, an das zur Regulation der Translation jeweils ein *pal-1* 3'UTR der drei Panagrolaimiden kloniert wurde. Zur Kontrolle wurde der *pal-1* 3'UTR von *C. elegans* verwendet. Als Zielplasmid für die Klonierung diente pCG 150, das die *unc-119* Sequenz trägt und somit bei einer erfolgreichen Transformation die verwendeten *unc-119*⁻ Tiere retten kann. In dieses Plasmid wurde zunächst eine für die geplanten Klonierungen konstruierte ‚Multiple Cloning Side‘ eingefügt. Diese wurde so gewählt, dass in hierüber alle zur Insertion geplanten Fragmente in das Plasmid integriert werden konnten. Im Folgenden wurden über Restriktionsschnittstellen die jeweiligen Fragmente über Einzelfragmentligationen in das Plasmid eingebracht. In Tabelle 3-1 sind die zum Bombardment verwendeten Konstrukte aufgeführt.

Tabelle 3-1: Verwendete Bombardment Konstrukte

| Bezeichnung | Insert |
|----------------|---|
| pCG new MCS 1 | <i>pal-1</i> Promotor _ GFP::H2B _ <i>C. elegans pal-1</i> 3'UTR_ <i>unc-119</i> |
| pCG new MCS 4 | <i>pal-1</i> Promotor _ GFP::H2B _ <i>P. superbis pal-1</i> 3'UTR_ <i>unc-119</i> |
| pCG new MCS 6 | <i>pal-1</i> Promotor _ GFP::H2B _ PS1159 <i>pal-1</i> 3'UTR_ <i>unc-119</i> |
| pCG new MCS 10 | <i>pal-1</i> Promotor _ GFP::H2B _ JU765 <i>pal-1</i> 3'UTR_ <i>unc-119</i> |

Diese Konstrukte wurden mittels Particle Bombardment in *C. elegans unc-119* Mutanten gebracht.

3.7.1 Selektion der transgenen Tiere

Da die hergestellten Konstrukte zusätzlich ein *unc-119* Fragment zu Rettung der Mutation beinhalten, konnten anschließend die Transgenen über den Phänotyp selektiert werden, da nur die Nematoden, die einen wildtypischen Phänotyp zeigten, das Konstrukt aufgenommen hatten.

Über eine phänotypische Selektion konnten von drei der vier Konstrukte jeweils mehrere transgene Linien vereinzelt werden. Nach mehreren Generationen zeigte sich, dass stabile transgene Linien mit den *pal-1* 3'UTRs von PS1159 und JU765, sowie stabile transgene Linien der *C. elegans pal-1* 3'UTR Kontrolltiere hergestellt werden konnten (Abbildung 3-18). Die Konstrukte, die die *pal-1* 3'UTRs von PS1159, JU765 und *C. elegans* tragen konnten erfolgreich integriert werden. Das Konstrukt, das die *pal-1* 3'UTR von *P. superbis* trug konnte hingegen nicht erfolgreich integriert werden.

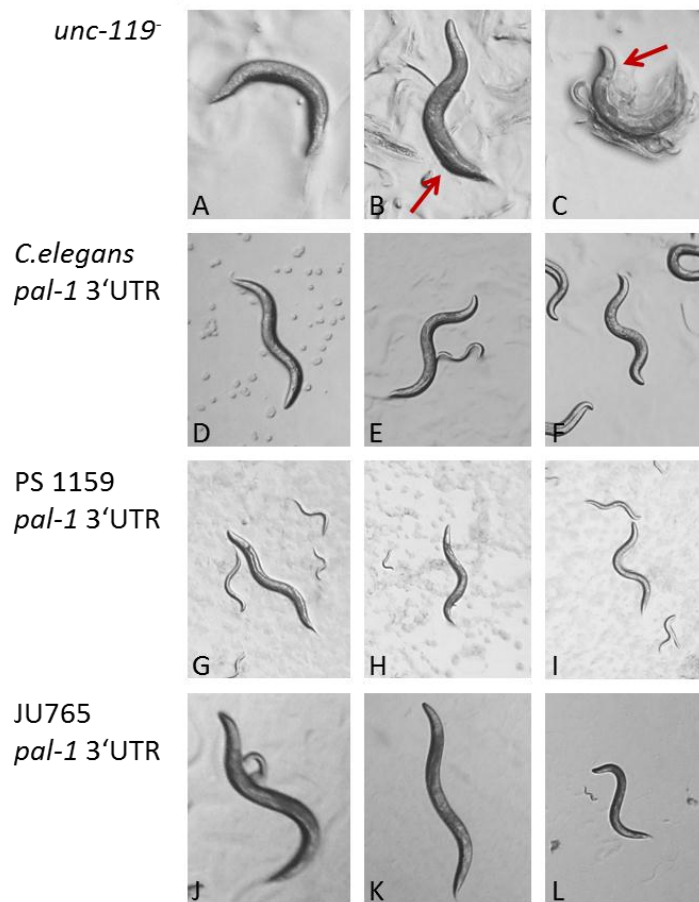


Abbildung 3-18: Phänotypische Selektion der transgenen Linien: Gezeigt sind *unc-119*- Tiere und die positiv auf den wildtypischen Phänotyp selektierten Tiere. **A-C:** *unc-119*- Mutante. Die Adulten Tiere zeigen keine wildtypische Fortbewegung. Die roten Pfeile zeigen unterschiedlich starke Ausprägungen des *unc-119*-Phänotyps an. In **B** zeigt der Nematode in der vorderen Körperhälfte eine nahezu normale Bewegung, während der hintere Körperteil untypisch abgeknickt und starr ist. Der stärker ausgeprägte Phänotyp in **C** zeigt einen Nematoden, der nur den Bereich des Pharynx bewegen kann. **D-E:** Transgene Tiere die das Konstrukt *pal-1* Promotor_GFP::*H2B_C. elegans pal-1* 3'UTR tragen. Alle Tiere zeigen den wildtypischen Phänotyp. **G-I:** Transgene Tiere die das Konstrukt *pal-1* Promotor_GFP::*H2B_Panagrolaimus sp. PS1159 pal-1* 3'UTR tragen. Alle Tiere zeigen den wildtypischen Phänotyp. **J-L:** Transgene Tiere die das Konstrukt *pal-1* Promotor_GFP::*H2B_Panagrolaimus sp. JU765 pal-1* 3'UTR tragen. Alle Tiere zeigen den wildtypischen Phänotyp.

Im Folgenden wurden die über den Phänotyp selektierten Tiere zusätzlich über Einzelwurm PCR auf eine Integration des Konstrukts getestet. Hierzu wurden auf dem Konstrukt liegende Oligonukleotide gewählt, die die Region flankieren, die für das GFP:H2B Fusionsprotein codiert (Abbildung 3-19).

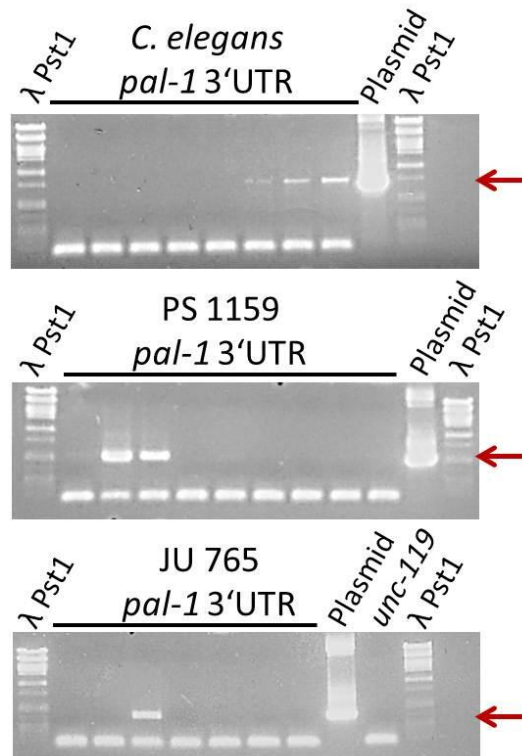


Abbildung 3-19: Agarosegel der PCR Tests der phänotypisch positiv selektierten transgenen Linien. Die roten Pfeile zeigen die, über PCR positiv getesteten Linien. In den Plasmid-Spuren wurden die verwendeten Bombardment Plasmide als PCR Matrize verwendet. Sie dienen als Positivkontrolle. In der Spur unc-119 wurde als Negativkontrolle ein unc-119 Tier verwendet.

Die über Phänotypkontrolle und PCR positiv getesteten Tiere wurden zusätzlich mittels Westernblot auf GFP Expression untersucht. Hierzu wurden die Proteine aus Wurmlysaten über SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend geblottet. Zur Markierung wurde ein anti-GFP Antikörper (Santa Cruz Biolabs, Santa Cruz, California, USA) und zur Detektion ein anti-rabbit Alkalische Phosphatase Antikörper (Sigma Aldrich, Steinheim) verwendet (Abbildung 3-20).

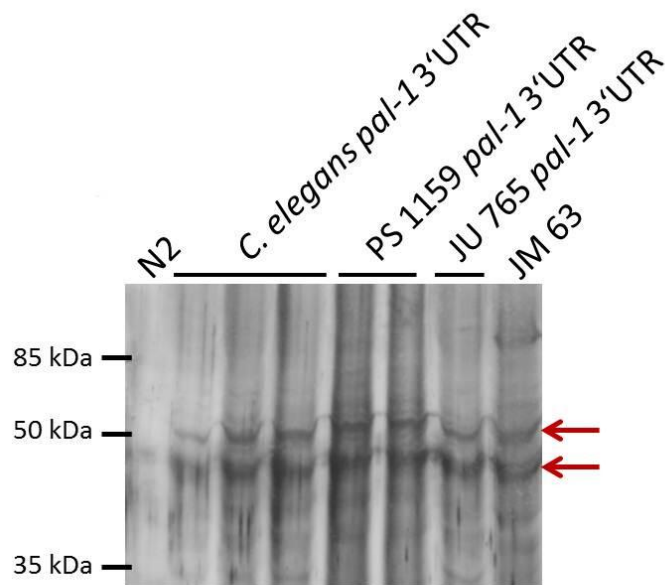


Abbildung 3-20: Western Blot der Wurmlysate der stabilen transgenen Linien gegen GFP. Das GFP:H2B Fusionsprotein ist deutlich bei 50 kDa zu erkennen. Die Doppelbande tritt auf, da GFP sich auch in denaturierenden Gelen zurückfalten kann (Geertsma et al., 2008)

In der Westernblot Analyse war deutlich zu erkennen, dass das GFP::H2B Fusionsprotein exprimiert wird. Die auftretende Doppelbande ist dadurch zu erklären, dass sich das GFP Protein auch in denaturierenden SDS-PAGE Gelen teilweise zurückfaltet.

3.7.2 Die GFP-Expression der Transgene liegt unter der mikroskopischen Nachweisgrenze

Eine im Folgenden durchgeführte mikroskopische Betrachtung der Embryonen dieser Linien zeigte keine GFP Expression. Fluoreszenz war ausschließlich im Darm zu erkennen, die auf Autofluoreszenz der Darmgranula zurückzuführen war. Da jedoch vorher sowohl über PCR die Aufnahme des Plasmids und über Westernblot die Expression von GFP nachgewiesen wurde, muss die GFP Expression zu schwach gewesen sein, um sie mikroskopisch zu detektieren (Abbildung 3-21).

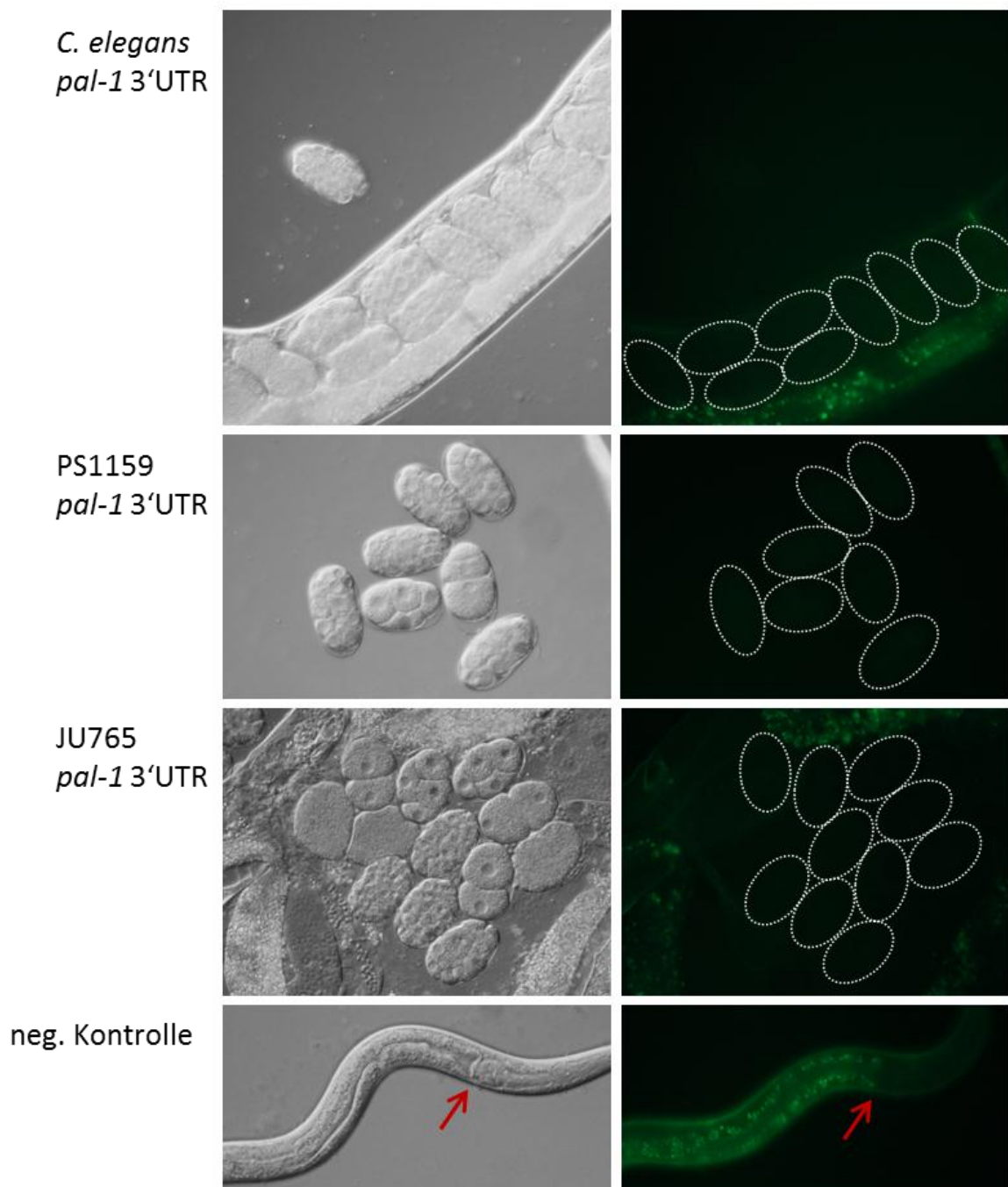


Abbildung 3-21: Mikroskopische Analyse der stabilen transgenen Linien: Keines der drei erfolgreich integrierten Konstrukte (*C. elegans pal-1* 3'UTR, PS1159 *pal-1* 3'UTR, JU765 *pal-1* 3'UTR) zeigte eine GFP- Expression. Als Negativkontrolle ist ein N2 Wildtyp gezeigt. Der rote Pfeil zeigt auf den Übergang zwischen Pharynx und Darm. Im Darm ist deutlich die Autofluoreszenz der Darmgranula erkennbar.

Um die GFP-Expression zu verstärken und so sichtbar zu machen wurden im Folgenden RNAi Experimente mit den Transgenen durchgeführt.

3.7.3 *Mex-3* RNAi mit Transgenen soll zu einer verstärkten GFP Expression führen

Die Transgenen wurden mit *E. coli* HT115 RNAi Fütterbakterien (Klon I-1A23), aus der RNAi Fütterbibliothek (Kamath et al. 2003; Fraser et al. 2000), gefüttert um einen *mex-3*^(RNAi) Phänotyp zu erhalten. Dies führt bei *C. elegans* dazu, dass PAL-1 in einem großen Teil des posterioren Embryos exprimiert wird und die Expression nicht ausschließlich auf die C- und D-Zelllinie beschränkt ist. Da GFP in den Transgenen unter der Kontrolle des *pal-1* Promotors und des *pal-1* 3'UTRs exprimiert wird, war zu erwarten, dass es dasselbe Expressionsmuster zeigt wie das PAL-1 Protein.

Es wurden *mex-3* RNAi Kulturen von allen stabilen transgenen Linien angesetzt. 90% der Embryonen der F1 Generation zeigten den erwarteten *mex-3*^(RNAi) Phänotyp (Daten nicht gezeigt). Eine GFP Expression konnte in der anschließenden mikroskopischen Analyse dennoch nicht nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

3.8 Das *C. elegans mex-3 / pal-1* Netzwerk ist offenbar auf die Gattung *Caenorhabditis* beschränkt

Die im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen mRNA und Protein Expressionsmuster von *mex-3 / pal-1* weisen stark darauf hin, dass die bei *C. elegans* essentielle Interaktion zwischen dem MEX-3 Protein und der *pal-1* mRNA eine evolutionäre Errungenschaft von *C. elegans*, oder möglicherweise der Gattung *Caenorhabditis* ist. Um diese Frage nach der Rolle von *mex-3* und *pal-1* in der frühen Embryonalentwicklung weiter aufzuklären, wurde die Existenz von Genen die bei *C. elegans* mit *mex-3* und/oder *pal-1* interagieren (Abbildung 3-22) in ausgewählten Spezies der Nematoda, deren Genomdaten verfügbar waren, untersucht. Ausgewählt wurden die im Rahmen der Arbeit bearbeiteten Nematoden PS1159, JU765, (Genomdaten von Philipp Schiffer, Universität zu Köln) *A. nanus* (Genomdaten von Itai Yanai, Technion Haifa, Israel), und *D. coronatus* (Genomdaten von Yuji Kohara, NIG, Mishima, Japan), sowie *C. elegans* (The *C. elegans* Sequencing Consortium, 1998), *T. spiralis* (Mitreva et al., 2011), deren Genomsequenzen über die NCBI Datenbank zugänglich sind

und *R. culicivorax* (Genomdaten AG Schierenberg, Universität zu Köln). Hierbei wurden neben den bisher bearbeiteten Nematoden PS1159, JU765, *D. coronatus*, *A. nanus* und *C. elegans*, auch *T. spiralis* und *R. culicivorax* als basalere Vertreter betrachtet.

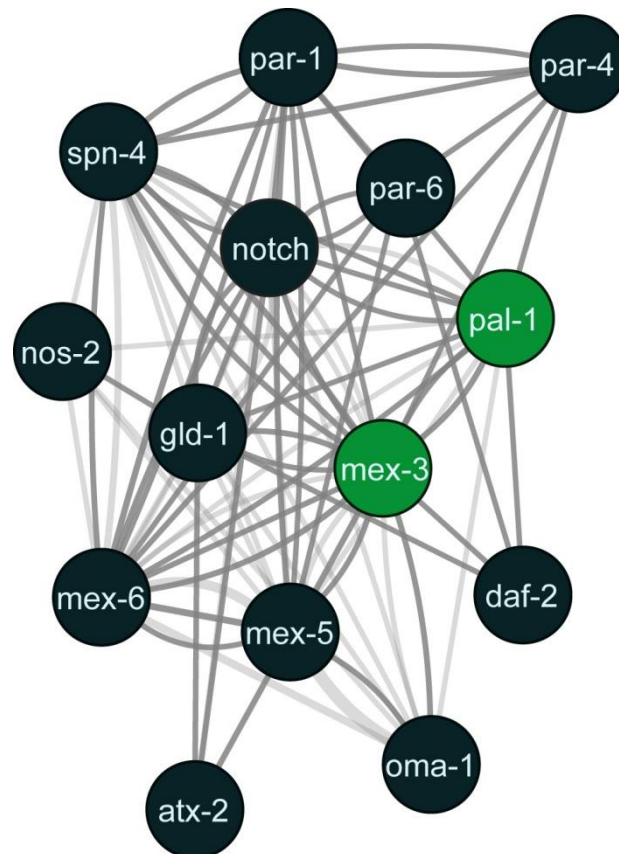


Abbildung 3-22: MEX-3 Proteinnetzwer in *C. elegans*: MEX-3 Interaktionen in *C. elegans*. mex-3 und pal-1 sind grün eingefärbt. Die Linien verbinden die Interaktionspartner. (verändert nach: http://www.wormbase.org/species/c_elegans/gene/WBGene00003229?query=mex-3#04-9e8-10)

Über Sequenzvergleiche mit Hilfe des Blast x Algorithmus wurde getestet, ob die untersuchten Nematoden Homologe der für den Screen ausgewählten Gene besitzen. Die Ergebnisse zeigten deutlich, dass das aus *C. elegans* bekannte Netzwerk unmöglich universell für alle Nematoden gelten kann, da auch bei phylogenetisch sehr nah verwandten Arten, wie z.B. *D. coronatus* Homologe entscheidender *C. elegans* Interaktionspartner von *mex-3* und *pal-1* fehlen. So konnte in keinem der untersuchten Nematoden ein Homolog des *mex-5* oder *mex-6* Gens nachgewiesen werden, das bei *C. elegans* für die korrekte

Lokalisation des *mex-3* Gens zwingend notwendig ist (siehe 1.5). Bei PS1159 und JU765 konnte neben *mex-5* und *mex-6* konnte auch kein Homolog von *spn-4* gefunden werden, was bei *C. elegans* eine korrekte *mex-3* Expression gänzlich unmöglich machen würde. *R. culicivorax*, einem Vertreter von Clade 2, fehlt überhaupt ein Großteil der interagierenden Gene. Besonders auffällig ist zudem das Fehlen des *mex-3* Gens bei *T. spiralis* (Clade 2). Hier muss die Regulation der *pal-1* Expression von anderen Regulatoren übernommen worden sein, da sogar der bei *C. elegans* essentielle direkte Interaktionspartner *mex-3* fehlt (Abbildung 3-23).

Insgesamt zeigt die Analyse des *C. elegans mex-3/pal-1* Netzwerks ein zu erwartendes Ergebnis. Aufgrund der gezeigten gravierenden Unterschiede in der *mex-3* und *pal-1* mRNA und Protein Lokalisation innerhalb der Nematoden (Abbildung 1-5,Abbildung 3-1, Abbildung 3-8, Abbildung 3-10) müssen andere molekulare Prozesse der frühen embryonalen Musterbildung entlang der anterior-posterioren Achse zu Grunde liegen.

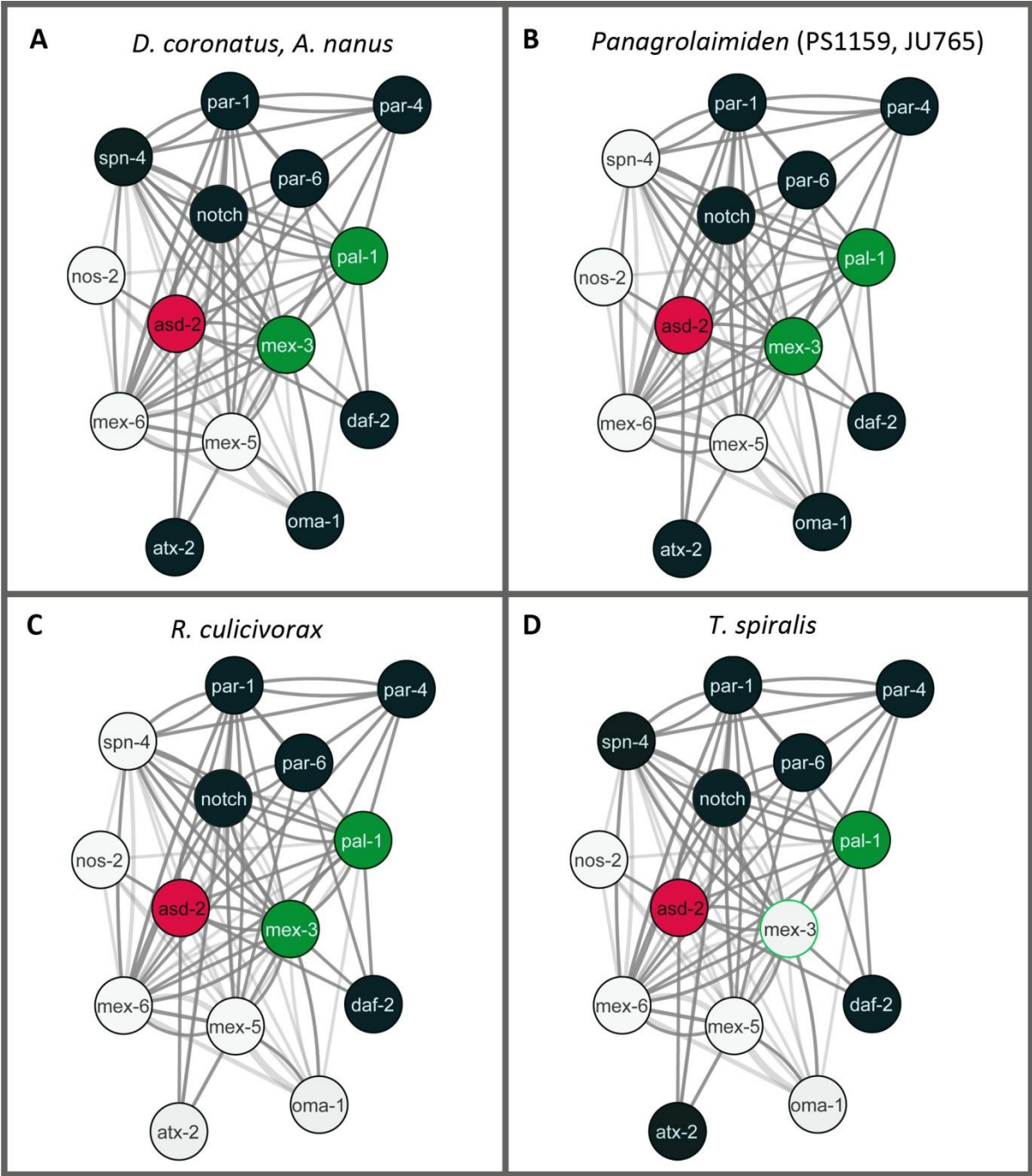


Abbildung 3-23: MEX-3 Protein Netzwerk in Nematoden verschiedener Claden: Gezeigt sind die existierenden Homologen verschiedener basaler und abgeleiteter Nematoden. In den untersuchten Nematoden existierende MEX-3 Interaktionspartner sind dunkel, bzw. grün (*pal-1* und *mex-3*) eingefärbt. Interaktionspartner, für die keine Homologe gefunden werden konnten sind weiß eingefärbt. In *C. elegans* existieren *gld-1* und sein Homolog *asd-2*. In allen hier untersuchten Nematoden konnte aber nur ein *asd-2* Homolog gefunden werden (A-D, rot). *T. spiralis* besitzt kein *mex-3* Homolog (D). (verändert nach: http://www.wormbase.org/species/c_elegans/gene/WBGene00003229?query=mex-3#04-9e8-10)

4 Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit konnten grundlegende Unterschiede in der embryonalen Expression und Lokalisation der entwicklungsrelevanten Gene *mex-3* und *pal-1*, aufgedeckt werden. Sowohl für die mRNA, als auch die Protein Expressionsdomänen unterschieden sich innerhalb der Nematoden deutlich voneinander. Es wurde, wie auch in früheren Arbeiten (Schulze & Schierenberg 2011) deutlich, dass der Modellorganismus *C. elegans* nicht als phylumweites Modell für die Entwicklung von Nematoden gesehen werden kann. Wichtige molekulare Interaktionen zwischen *mex-3* und *pal-1*, die in *C. elegans* für eine korrekte anterior-posteriore Musterbildung essentiell sind (Huang et al., 2002), zeigen sogar bei phylogenetisch sehr nahen Verwandten, wie *D. coronatus*, deutliche Unterschiede. Diese Abweichungen vom *C. elegans*-Muster beziehen sich zum einen auf die räumliche und zeitliche Expression der Gene, sowie teilweise auch auf deren Existenz. Die gefundenen deutlich Unterschiede sowohl auf zellulärer, als auch auf molekularer Ebene führen zum selben Ergebnis, einem fadenförmigen Wurm, der selbst für den mit Nematoden vertrauten Betrachter keine starken morphologischen Unterschiede zeigt. Diese Gleichartigkeit steht im überraschenden Kontrast zu der zugrunde liegenden molekularen Maschinerie

4.1 *mex-3* Homologe zeigen eine starke Konservierung der funktionalen KH-Domäne aber gravierende Unterschiede in Genaufbau und Expression

Die von mir durchgeführten Sequenzvergleiche der *mex-3* Homologe bei verschiedenen Nematoden zeigten, dass bei allen untersuchten Spezies die KH-Domänen hoch konserviert sind. Die hier annähernd 100%ige Identität der Aminosäuresequenz legt den Schluss nahe, dass auch die Funktion der *mex-3* Homologe, also die Bindung von RNA, innerhalb der Nematoden konserviert sein sollte. Das für die Bindung entscheidende GXXG Motiv konnte

in allen Nematoden in beiden KH-Domänen nachgewiesen werden, was diese These zunächst verstärkt (Abbildung 3-15).

Die Analyse des Genaufbaus, also die Exon/Intron Verteilung in der genomischen Sequenz der *mex-3* Gene gab einen ersten Hinweis auf bestehende Unterschiede, die sich auch auf die Funktion auswirken könnten. Die Exonzahl zeigt in den untersuchten Nematoden keinerlei Gemeinsamkeiten. Weder innerhalb einer Clade, noch innerhalb der *Caenorhabditis*-Vertreter konnten deutliche Übereinstimmungen in der Struktur des Genaufbaus gefunden werden. Länge und Anzahl der Exons und Introns sind hoch variabel (Abbildung 3-14).

Die Analyse der Expressionsdomänen des *mex-3* Gens sowohl auf mRNA-, als auch auf Proteinebene verstärkten diese Hinweise auf eine evolutionär veränderte Funktion des *mex-3* Gens innerhalb der Nematoden. Erkenntnisse aus früheren Arbeiten hatten bereits gezeigt, dass die *mex-3* mRNA Expression in *A. nanus* und *D. coronatus* stark von der der aus *C. elegans* bekannten abweicht (M. Kroiher, pers. Mitteilung). Die mRNA Expressionsanalysen im *Cephalobiden* PS1146 und den *Panagrolaimiden* PS1159, JU765 und *P. superbus* zeigten, dass die Expressionsmuster der *mex-3* mRNA in Nematoden deutlich variabler sind als erwartet. Die drei *Panagrolaimiden* zeigen zwar ein einheitliches Expressionsmuster, das sich jedoch deutlich von den bisher bekannten unterscheidet (Abbildung 3-10). Innerhalb der *Cephalobiden* hingegen war kein einheitliches Expressionsmuster zu finden (Abbildung 3-8). Diese innerhalb der Nematoden hoch variablen Expressionsmuster weisen stark darauf hin, dass sich die Funktion des *mex-3* Gens im Zuge der Evolution verändert haben muss. Eine frühe posteriore *mex-3* Expression, wie z. B. bei *D. coronatus* gefunden (Abbildung 3-1) macht die aus *C. elegans* bekannte Funktion des *mex-3* Gens, nämlich die anteriore *pal-1* Inhibition (Huang et al., 2002) unmöglich.

Diese konnten durch die Aufklärung der Verteilung des MEX-3 Proteins in PS1159 noch stärker verdeutlicht werden. Hier ist dieses ausschließlich in den posterioren Zellen lokalisiert (Abbildung 3-12), in denen es in *C. elegans* in der frühen Embryogenese nie zu finden ist. Diese Erkenntnisse deuten darauf hin, dass die frühe Interaktion von *mex-3* und *pal-1* eine evolutionäre Errungenschaft ist, die sich bei den hier untersuchten Spezies nur

bei *C. elegans* findet. Inwieweit auch in anderen *Caenorhabditis* Vertretern zu finden ist, muss in weiteren Studien an anderen Vertretern dieser Gattung geklärt werden.

4.2 *pal-1* mRNA kann nur in *Caenorhabditis*-Vertretern vom MEX-3 Protein erkannt und gebunden werden

Die in der Analyse des *mex-3* Gens auf Sequenz- und Expressionsebene gefundenen Unterschiede innerhalb der Nematoden spiegeln sich auch in der Analyse des *pal-1* Gens wieder. Die hier vorhandenen prominenten Unterschiede in der Sequenz der 3'UTR lassen die Aussage zu, dass eine *mex-3/pal-1* Interaktion, wie sie aus *C. elegans* bekannt ist, in allen anderen untersuchten Nematoden nicht stattfinden kann, denn diesen fehlt das, für die Bindung des MEX-3 Proteins essentielle (Pagano et al., 2009), MEX-3 Recognition Element (MRE) in der 3'UTR der *pal-1* mRNA (Abbildung 3-17). Aus der Literatur ist bekannt, dass die Bindung des MEX-3 Proteins an die *pal-1* mRNA nur dann stattfindet, wenn in der 3'UTR das MRE vorhanden ist (Pagano et al., 2009). Demnach ist eine Interaktion der beiden Gene ohne das MRE nicht möglich und die korrekte Lokalisierung der *pal-1* mRNA muss anders bewerkstelligt werden. Hier könnte ein anderes Mitglied aus der Familie der mRNA bindenden KH-Domänen Proteine (Siomi et al., 1993) die Rolle von *mex-3* übernommen haben. Für *C. elegans* wurde beschrieben, dass *gld-1* im distalen Bereich der Gonade für die Regulation von *pal-1* verantwortlich ist (Mootz et al., 2004). *gld-1* gehört wie *mex-3* zu den KH-Domänen Proteinen und besitzt somit die Fähigkeit zur RNA Bindung (Vernet & Karen, 1997). Das GLD-1 Protein bindet in der distalen Keimbahn an die 3'UTR der *pal-1* mRNA und verhindert so die Expression des PAL-1 Proteins in den Keimzellen der distalen Gonade (Mootz et al. 2004). In *C. elegans* existiert neben GLD-1 ein weiterer Vertreter der Familie der KH-Domänen Proteine, ASD-2. Die beiden Gene sind Homologe, die wahrscheinlich aus einer Duplikation hervorgegangen sind (Carmel et al., 2010). Bei allen von mir hier untersuchten Nematoden konnte nur *asd-2*, aber nicht *gld-1*, nachgewiesen werden. Möglicherweise übernimmt *asd-2* hier zum einen die Funktion von *C. elegans gld-1* und zusätzlich die von *mex-3* in Bezug auf die Bindung und daraus resultierende Regulation von

pal-1. Um dieses zu zeigen müssten *in vitro* Bindungsassays durchgeführt werden mit dem Ziel eine mögliche Bindung des ASD-2 Proteins an die *pal-1* mRNA zu überprüfen.

Unerwartet ist die Existenz des MEX-3 Recognition Elements im *caudal (cad)* Gen (*pal-1* Homolog) der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster*. Für den Reismehlkäfer *Tribolium castaneum* wurde gezeigt, dass ähnlich wie in *C. elegans* das MEX-3 Protein die *cad* mRNA bindet und diese negativ reguliert (Schoppmeier et al., 2009). Die Existenz des MREs in *T. castaneum* weist darauf hin, dass diese Interaktion Ähnlichkeiten mit der aus *C. elegans* bekannten zeigt. Die Aufgabe des MREs in *D. melanogaster* ist hingegen unklar, da hier weder in der Datenbank (NCBI), noch über Genomanalysen ein *mex-3* Homolog gefunden werden konnte. In *D. melanogaster* wird die *cad* Regulation in der Embryonalentwicklung vollständig von *bicoid* übernommen (Niessing et al., 2002). Die regulatorische Interaktion zwischen *cad* und *bicoid* in *D. melanogaster* zeigt, dass im Tierreich auch andere Mechanismen zur Regulation *pal-1* homologer Gene entstanden sind. Dies ist ein Hinweis auf eine möglicherweise ähnlich massive Veränderung der *pal-1* Regulation in Nematoden, die nicht der Gattung *Caenorhabditis* angehören.

4.3 Die Expressionsmuster von *mex-3* und *pal-1* weisen auf eine zeitliche Transformation der Interaktion von *pal-1* mRNA und MEX-3 Protein hin

Die von mir durchgeführten mRNA Expressionsanalysen, sowohl von *mex-3* als auch von *pal-1*, zeigten massive Unterschiede im Vergleich zu *C. elegans* (Abbildung 1-4, Abbildung 3-1, Abbildung 3-8, Abbildung 3-10). Um die Betrachtung der Expressionsmuster zu vereinfachen werden diese im Folgenden getrennt diskutiert. Phase 1 umfasst die Expressionsdomäne, die zeitlich mit der in *C. elegans* gefundenen zusammenfällt. Phase 2 beinhaltet die deutlich später in der Embryonalentwicklung auftretenden Expressionsdomänen, die in *C. elegans* nicht existieren (Abbildung 1-4, Abbildung 3-1, Abbildung 3-8, Abbildung 3-10).

- Phase 1 (frühe Expressionsdomänen bis zum 4-Zellstadium)

Während der ersten Zellteilungen bis zum 4-Zellstadium ist bei *C. elegans* die korrekte Lokalisation der *mex-3* und *pal-1* Genprodukte unbedingt notwendig. Fehlerhafte, oder fehlende Expressionen führen hier zu letalen Phänotypen (Baugh et al., 2005; Edgar et al., 2001). In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass diese, aus *C. elegans* bekannten Expressionsmuster (Abbildung 1-4) nicht auf alle Nematoden übertragen werden können. Innerhalb der *Panagrolaimiden* sind deutliche Unterschiede der *pal-1* Expression im Vergleich zu *C. elegans* zu finden. Bei PS1159, JU765 und *P. superbus* ist die *pal-1* mRNA in frühen Stadien gleichmäßig im Embryo verteilt (Abbildung 3-10). Dies lässt den Schluss zu, dass eine frühe Regulation der *pal-1* mRNA bei den *Panagrolaimiden* fehlt. Ob die Regulation von *pal-1* über Translationskontrolle erfolgt, das PAL-1 Protein also möglicherweise im Embryo eine ungleichmäßige Verteilung zeigt, könnte zukünftig mit Hilfe von spezifischen Antikörpern geprüft werden.

Das *mex-3* mRNA Expressionsmuster der *Panagrolaimiden* gleicht in frühen Stadien dem der *pal-1* mRNA. Beide sind im gesamten Embryo nachzuweisen. Die Analyse der MEX-3 Proteinverteilung in PS1159 zeigte eine zur mRNA Lokalisation identische Proteinverteilung bis zum 4-Zellstadium (Abbildung 3-12). Dies untermauert die These einer veränderten *pal-1* Regulation in PS1159, da in der frühen Expressionsdomäne (bis zum 4-Zellstadium) die *pal-1* mRNA in den identischen Zellen wie das MEX-3 Protein lokalisiert ist (Abbildung 3-10, Abbildung 3-12).

Die frühe *pal-1* Expression in *D. coronatus* unterscheidet sich räumlich und zeitlich nicht von der in *C. elegans*. In beiden Nematoden ist die *pal-1* mRNA in P2 und EMS lokalisiert (Abbildung 1-4, Abbildung 3-1). Hier waren also keine Unterschiede festzustellen. Erstaunlicherweise zeigte sich jedoch ein gravierender Unterschied in der Verteilung der *mex-3* mRNA. Diese ist in *D. coronatus* in den frühen Stadien in exakt denselben Zellen zu finden wie die *pal-1* mRNA. In *C. elegans* wäre eine solche Kolo-kalisation letal, da das MEX-3 Protein an die *pal-1* mRNA bindet und deren Abbau initiiert. Die deckungsgleichen Expressionsdomänen bei *D. coronatus* zeigen deutlich, dass zum einen eine Interaktion zwischen *mex-3* und *pal-1* nicht wie in *C. elegans* stattfinden kann und zum anderen *pal-1* einen anderen Regulator als das MEX-3 Protein besitzen muss, durch den die *pal-1* mRNA gezielt im Embryo lokalisiert wird.

- Phase 2 (späte Expressionsdomänen)

Alle untersuchten Nematoden, die nicht zur Gattung *Caenorhabditis* zählen, zeigten sowohl zeitlich, als auch räumlich ein deutlich ausgedehntes Expressionsmuster. Die *mex-3* Expression bleibt bei allen Spezies außer bei *C. elegans* durchgehend in der Keimbahn nachweisbar (Abbildung 1-5, Abbildung 3-8, Abbildung 3-10). Bei *D. coronatus* ist die *mex-3* mRNA auf die P-Zelllinie und schwach auf die jeweiligen Schwesterzellen beschränkt. Zu Beginn der Morphogenese tritt neben der aufrechterhaltenen Expression in der Keimbahn eine weitere *mex-3* Expressionsdomäne im anterioren Embryo auf die bei *C. elegans* völlig fehlt (Abbildung 1-5). Ein zu *D. coronatus* identisches *mex-3* Expressionsmuster ist auch in *A. nanus* zu finden (Abbildung 3-8), was ein weiteres Indiz für die *C. elegans* Besonderheit des *C. elegans mex-3 / pal-1* Netzwerks ist. Auch das *pal-1* Gen zeigt in *D. coronatus* eine ähnlich veränderte Expressionsdomäne wie zuvor schon für *mex-3* beschrieben. Hier kommt es zu Beginn der Morphogenese zur Ausbildung einer *pal-1* Expressionsdomäne im posterioren Embryo (Abbildung 3-1). Diese späten Expressionsdomänen von *mex-3* (anterior) und *pal-1* (posterior) schließen sich gegenseitig aus (Abbildung 3-2), was ein Hinweis darauf sein könnte, dass die frühen Expressionsdomänen, die in *C. elegans* für die posteriore *pal-1* Lokalisation, durch Interaktion mit *mex-3*, verantwortlich sind, in *D. coronatus* zeitlich nach hinten geschoben wurden. Dies könnte ein Indiz für eine spätere, ortsabhängige Schicksalsfestlegung der AB Zellen sein, wie sie auch für den Nematoden *Plectus sambesii* beschrieben wurde (Schulze et al. 2012). Diese These wird auch durch die in den *Panagrolaimiden* gefundenen mRNA-Expressionsmuster gestärkt. Auch hier findet man in allen drei untersuchten Spezies späte anteriore *mex-3* und posteriore *pal-1* Expressionsdomänen. Diese zeigen zwar Unterschiede in der Ausdehnung, die sich bei PS1159 und *P. superbus* jeweils auf einen hufeisenförmigen Bereich am äußeren Rand des Embryos beschränkt (Abbildung 3-10), sonst aber räumlich und auch zeitlich mit denen von *D. coronatus* vergleichbar sind. Ein auffälliger Unterschied zwischen den *Panagrolaimiden* und *D. coronatus* ist jedoch die nicht vorhandene Expression von *mex-3* und *pal-1* in der Keimbahn der untersuchten *Panagrolaimiden*. Diese könnte allerdings sehr schwach, und dadurch nicht detektierbar, vorhanden sein, da in immunhistochemischen Färbungen gezeigt wurde, dass das MEX-3 Protein in PS1159 auch in der Keimbahn lokalisiert ist.

Die Unterschiede zwischen der *mex-3* mRNA- und Proteinverteilung in PS1159 während der Embryonalentwicklung geben einen sicheren Hinweis darauf, dass dessen Expression in PS1159 über Translationskontrolle erfolgt. Dies ist ein weiterer entscheidender Unterschied im Vergleich der frühen Genregulation in Nematoden. Bei *C. elegans* findet die Lokalisation vom MEX-3 Protein in AB und deren Tochterzellen ABa und ABp schon deutlich früh statt, da in den AB Zellen durch die Bindung von MEX-5 und MEX-6 der in der P1 Zelle stattfindende Abbau durch SPN-4 verhindert wird. Die Unterschiede, die in PS1159 gefunden wurden, könnten auch auf dem Fehlen der beiden *mex-3* Regulatoren *mex-5* und *mex-6* (Abbildung 3-23) begründet sein. Hierauf wird in Abschnitt 4.4 genauer eingegangen. Alle Expressionsstudien der Genprodukte von *mex-3* und *pal-1* weisen darauf hin, dass die frühe gegensätzliche *mex-3/pal-1* mRNA Lokalisation eine evolutionäre Errungenschaft von *C. elegans* und möglicherweise anderer *Caenorhabditis* Vertreter ist (Tabelle 4-1). Die späte Expressionsdomäne von *pal-1* (posterior) und *mex-3* mRNA (anterior) hingegen scheint die in anderen Nematoden verbreitete und deshalb möglicherweise ursprünglichere Verteilung zu zeigen (Tabelle 4-2).

Tabelle 4-1: mRNA Expressionsdomänen von *mex-3* und *pal-1* im 4-Zellstadium: Bei *C. elegans* ist eindeutig die sich gegenseitig ausschließende Expression der *mex-3* und *pal-1* mRNA im 4-Zellstadium zu erkennen. Bei *D. coronatus* sind beide mRNAs in EMS und P2 lokalisiert. Alle drei untersuchten Panagrolaimiden zeigen im 4-Zellstadium eine gleichmäßige Verteilung der *mex-3* und *pal-1* mRNA. (Die Lokalisation der *pal-1* mRNA wurde in den Cephalobiden noch nicht untersucht)


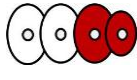
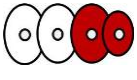
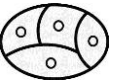
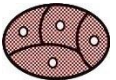
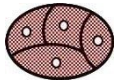
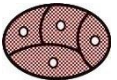

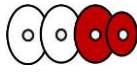
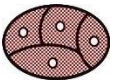
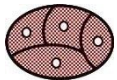
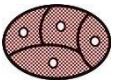

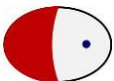
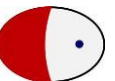
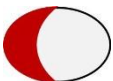








| | <i>C. elegans</i> | <i>D. coronatus</i> | <i>A. nanus</i> | PS1146 | PS1159 | JU765 | <i>P. superbus</i> |
|--------------|---|---|---|---|---|---|---|
| <i>mex-3</i> |  |  |  |  |  |  |  |
| <i>pal-1</i> |  |  | — | — |  |  |  |

Tabelle 4-2: mRNA Expressionsdomänen von *mex-3* und *pal-1* zu Beginn der Morphogenese: Eine späte Expressionsdomäne zu Beginn der Morphogenese fehlt in *C. elegans*. In allen anderen untersuchten Nematoden ist zu diesem Zeitpunkt eine anteriore Lokalisationsdomäne der *mex-3* mRNA nachweisbar (rot). Die Größe dieser Expressionsdomäne variiert zwischen einer hufeisenförmigen Lokalisation am Rand des Embryos bei den Panagrolaimiden, bis zu einer nahezu kompletten Ausdehnung über die anteriore (*mex-3*), bzw. posteriore (*pal-1*) Hälfte des Embryos bei *D. coronatus* und *A. nanus*. (Die Lokalisation der *pal-1* mRNA wurde in den Cephalobiden noch nicht untersucht)

| | <i>C. elegans</i> | <i>D. coronatus</i> | <i>A. nanus</i> | PS1146 | PS1159 | JU765 | <i>P. superbus</i> |
|--------------|---|---|---|---|--|---|---|
| <i>mex-3</i> |  |  |  |  |  |  |  |
| <i>pal-1</i> |  |  | — | — |  |  |  |

4.4 Das *C. elegans mex-3/pal-1* Netzwerk ist in Nematoden evolutionär nicht konserviert

Die in Bezug auf das *C. elegans mex-3/pal-1* Netzwerk durchgeführte Genomanalyse zeigte deutlich gravierende Unterschiede zwischen den untersuchten Spezies. Einige der für *C. elegans* entscheidenden Interaktionspartner konnten sowohl in phylogenetisch nah verwandten, als auch in basaleren Nematoden, wie *R. culicivorax* und *T. spiralis*, nicht gefunden werden (Abbildung 3-22, Abbildung 3-23).

Besonders auffällig ist hierbei die völlige Abwesenheit von *mex-5* und *mex-6*, die auf *D. coronatus* und *A. nanus* beschränkte Existenz von *spn-4*. Diese Unterschiede innerhalb der Nematoden in Bezug auf das Vorhandensein oder Fehlen von Genen des bei *C. elegans* essentiellen *mex-3/pal-1* Netzwerks weist stark darauf hin, dass dies eine späte evolutive Errungenschaft von *C. elegans* und möglicherweise auch seiner nächsten Verwandten ist.

mex-5 und *mex-6* spielen bei *C. elegans* eine essentielle Rolle in der Lokalisation von *mex-3* im frühen Embryo. Beide Gene werden in der AB Zelle exprimiert und verhindern dort den Abbau von *mex-3* durch *par-4* und *spn-4* (Huang et al., 2002).

In *D. coronatus* und *A. nanus* konnten Homologe des *spn-4* und *par-4* Gens gefunden werden, was die posteriore Lokalisation von *mex-3* erklären könnte. Die in *C. elegans* entscheidenden positiven Regulatoren für eine anteriore *mex-3* Lokalisation *mex-5* und *mex-6* fehlen bei beiden Nematoden. Somit kann *mex-3* hier im anterioren Embryo nicht vor dem, für *C. elegans* beschriebenen, *par-4* und *spn-4* abhängigen Abbau geschützt werden (Huang et al., 2002) und wird so posterior lokalisiert.

In den *Panagrolaimiden* JU765 und PS1159 fehlt neben *mex-5* und *mex-6* auch ein *spn-4* Homolog. Somit ist ein Abbau von *mex-3* in den anterioren Zellen wie er bei *D. coronatus* und *A. nanus* stattfinden könnte, hier nicht möglich. Dies könnte die dort gefundene gleichmäßige Verteilung der *mex-3* mRNA bewirken.

Ein weiterer bedeutender Unterschied ist das Fehlen von *gld-1*, das in *C. elegans* ebenfalls mit der *pal-1* mRNA interagiert (Mootz et al. 2004). Dessen mögliche Funktion, bzw. die Funktion seines Homologs *asd-2* in der Embryonalentwicklung von Nematoden, die nicht zur Gattung *Caenorhabditis* zählen, soll im Folgenden genauer betrachtet werden.

Es konnte gezeigt werden, dass eine Interaktion zwischen der *pal-1* mRNA und dem MEX-3 Protein aufgrund des fehlenden MREs in allen untersuchten Nematoden, außer *C. elegans*, nicht stattfinden kann. Daher stellt sich die entscheidende Frage, wie die gezielte posteriore Lokalisierung der *pal-1* mRNA bewerkstelligt werden kann. Diese posteriore *pal-1* Lokalisation wurde sowohl, vergleichbar zu *C. elegans* in der frühen Embryogenese (*D. coronatus*), als auch in der bei allen untersuchten Nematoden (außer *C. elegans*) auftretenden späteren posterioren Expressionsdomäne (*D. coronatus*, *A. nanus*, JU765, PS1159 und *P. superbus*) nachgewiesen. Von *C. elegans* ist bekannt, dass in der Gonade das GLD-1 Protein die *pal-1* mRNA negativ reguliert und für deren korrekte Lokalisation sorgt. Diese Interaktion erfolgt ähnlich wie die *mex-3* / *pal-1* Interaktion über eine Bindung des GLD-1 Proteins an die 3'UTR der *pal-1* mRNA. Das GLD-1 Protein gehört zu den KH-Domänen Proteinen und besitzt in *C. elegans* ein Homolog, ASD-2. Aus der Literatur ist bekannt, dass ASD-2 und GLD-1 in *C. elegans* dieselbe mRNA Sequenz binden (Carmel et al., 2010). Dies

resultiert wahrscheinlich aus deren Entstehung durch eine Duplikation von GLD-1 (Carmel et al., 2010).

Da in den Genomanalysen der in dieser Arbeit untersuchten Nematoden immer nur ein *asd-2*, jedoch nie ein *gld-1* Homolog gefunden wurde, weist dies möglicherweise darauf hin, dass *asd-2* das ursprünglichere Gen ist, aus dessen Duplikation in *C. elegans* *gld-1* entstanden ist.

ASD-2 könnte in den untersuchten Nematoden, sowohl die Rolle von GLD-1 als *pal-1* mRNA Regulator in der Keimbahn übernehmen, und diese Aufgabe auch im Embryo fortführen. Hier könnte es dann MEX-3 als Regulator der *pal-1* mRNA während der Embryonalentwicklung ersetzen. Eine Interaktion des ASD-2 Proteins mit der *pal-1* mRNA wäre möglich, da gezeigt wurde, dass ASD-2 und GLD-1 eine identische hexamere Sequenz binden können (Carmel et al., 2010) und die Interaktion von GLD-1 mit der *pal-1* mRNA in *C. elegans* beschrieben wurde (Mootz et al. 2004).

4.5 Modelle der *mex-3* Regulation in *D. coronatus*, *A. nanus*, PS1159 und JU765

Im Folgenden werden für die oben beschriebenen möglicherweise veränderten Interaktionen zwei potentielle Regulationsmodelle nebeneinander gestellt, die die gefundenen *mex-3* Expressionsmuster (Abbildung 3-1, Abbildung 3-8, Abbildung 3-10) erklären könnten. Hierbei muss die mögliche Regulation bei den Panagrolaimiden getrennt von der in *D. coronatus* und *A. nanus* betrachtet werden. Das in *C. elegans* für den Abbau von *mex-3* in EMS und P2 verantwortliche *spn-4* konnte in den Panagrolaimiden nicht nachgewiesen werden. *D. coronatus* und *A. nanus* besitzen jeweils ein *spn-4* Homolog (Abbildung 3-23).

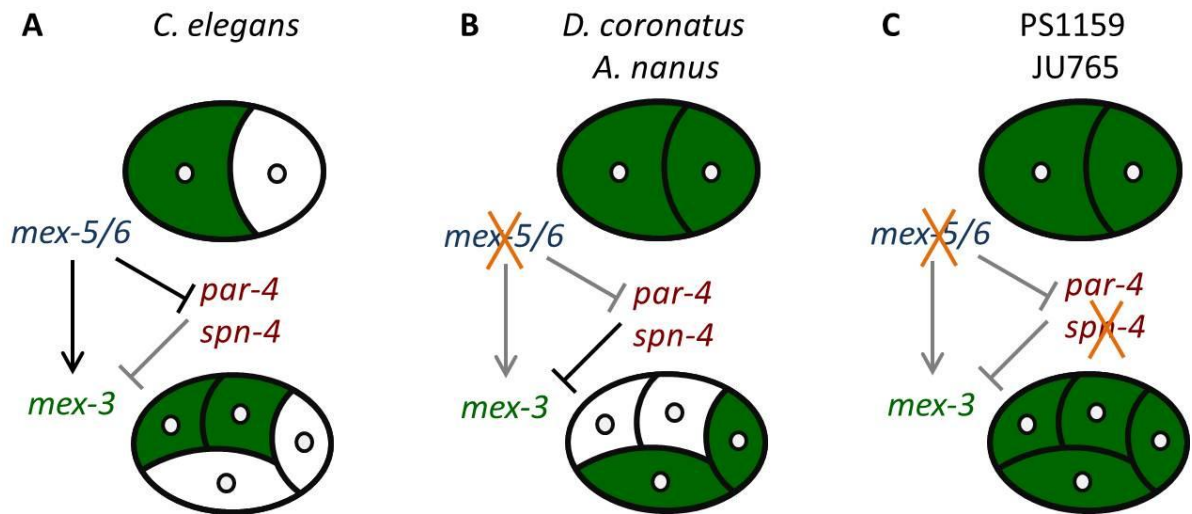


Abbildung 4-1: Modelle zur Regulation der *mex-3* Lokalisation in Nematoden: A: Modell der *mex-3* Lokalisation bei *C. elegans* B: Modell *mex-3* Regulation in *D. coronatus* und *A. nanus*. *mex-5* und *mex-6* konnten in diesen Spezies nicht nachgewiesen werden. C: Modell der *mex-3* Regulation in den Panagrolaimiden. Hier fehlt neben *mex-5* und *mex-6* auch der negative Regulator *spn-4*.

Ein Modell der Regulation von *pal-1* kann nicht erstellt werden, da die durch *mex-3* Initiierte *pal-1* Regulation eine evolutive Neuerung von *C. elegans* und möglicherweise seinen nächsten Verwandten zu sein scheint. Weiterführende Untersuchungen des mRNA bindenden ASD-2 Proteins könnten möglicherweise ein erstes Indiz zur Regulation von *pal-1* in Nematoden, die nicht zur Gattung *Caenorhabditis* gehören, liefern (Kapitel 4.4).

4.6 Zur Überprüfung der Modelle sind weitere Untersuchungen des *C. elegans* Netzwerks *in vivo* und *in vitro* notwendig

Um die möglichen Interaktionen besser zu verstehen müssen weitere Experimente durchgeführt werden. Es ist unerlässlich die Expressionsmuster weiterer Gene des *C. elegans mex-3/pal-1* Netzwerks und möglichen Interaktionen zwischen diesen Genen des

bei anderen Nematoden aufzuklären um die Funktion von *mex-3* und *pal-1* in diesen Spezies zu verstehen.

Erste weiterführende Untersuchungen wurden im Rahmen dieser Arbeit begonnen. Um die Bedeutung des MREs in der *pal-1* 3'UTR zu überprüfen wurde eine Interaktion zwischen den 3'UTRs der *Panagrolaimiden*, die kein MRE besitzen und dem *C. elegans* MEX-3 Protein *in vivo* in *C. elegans* untersucht (Kapitel 3.7). Die hierzu hergestellten transgenen Tiere sollten das GFP Protein als Reporter unter der Kontrolle von *C. elegans pal-1* Promotor und *Panagrolaimus pal-1* 3'UTR exprimieren. Die Lokalisation des Reportergens GFP im 4-Zellstadium sollte Aufschluss darüber geben, ob das *C. elegans* MEX-3 Protein in der Lage ist die *Panagrolaimus pal-1* 3'UTR trotz fehlendem MRE zu erkennen und zu binden und somit deren Abbau zu initiieren. Da das MEX-3 Protein nur in den anterioren Zellen vorhanden ist, sollte, im Falle einer erfolgreichen Bindung und einem daraus resultierenden Abbau der mRNA, in diesen keine GFP-Fluoreszenz nachzuweisen sein. Unter Berücksichtigung der bisherigen Ergebnisse der Sequenz- und Expressionsanalysen wäre jedoch keine Bindung zu erwarten, was eine GFP-Fluoreszenz in allen Zellen des 4-Zellstadiums zur Folge hätte.

Trotz erfolgreicher Herstellung stabiler transgener Linien und existierender GFP-Expression (Kapitel 3.7.1) konnte in der mikroskopischen Betrachtung keine GFP induzierte Fluoreszenz nachgewiesen werden. Da das GFP-Protein jedoch nachweislich exprimiert wurde (Abbildung 3-20) soll in folgenden zukünftigen Untersuchungen das Signal über einen anti-GFP Antikörper verstärkt werden.

Zum Verständnis der *mex-3/pal-1* Interaktion innerhalb der Nematoden ist es wichtig weitere, in *C. elegans* essentielle, Komponenten des Netzwerks zu untersuchen. Zunächst ist die Aufklärung der *pal-1* Expression in den *Cephalobiden* von großem Interesse. Da die Sequenz des *A. nanus pal-1* Homologs aufgeklärt wurde (Kapitel 3.3) kann über *in situ* Hybridisierungen dessen Expressionsmuster untersucht werden.

Des Weiteren sind die Expressionsmuster der Gene *spn-4* und *par-4* von großem Interesse. Diese spielen gemeinsam mit *mex-5* und *mex-6* eine entscheidende Rolle bei der korrekten

mex-3 Lokalisation in *C. elegans* und sind offenbar die einzigen *mex-3* Regulatoren, die in allen (*par-4*), oder zumindest einigen Nematodenspezies (*spn-4*), konserviert sind.

Auch die Rolle von *asd-2* muss genauer untersucht werden. Hierbei muss aufgrund der aus *C. elegans* bekannten Interaktion von *gld-1* und *pal-1* in der Gonade (Mootz et al. 2004), neben der frühen Embryonalentwicklung auch die *asd-2* Expression in der Gonade des adulten Tieres betrachtet werden. Sollte in den Nematoden, außerhalb der Gattung *Caenorhabditis*, *asd-2* die Aufgabe von *gld-1* ausüben ist eine Lokalisation in der Gonade sehr wahrscheinlich und würde gleichzeitig auf eine existierende Interaktion mit *pal-1* hindeuten (siehe Kapitel 4.4.)

Mit Hilfe des hergestellten polyklonalen Antikörpers gegen das PS1159 MEX-3 Protein könnte die Interaktion zwischen der *pal-1* mRNA und dem MEX-3 Protein in PS1159 genauer betrachtet werden. Über immobilisierte mRNA könnte das PS1159 MEX-3 Protein aus Wurmlysat gebunden werden und anschließend über SDS-PAGE und Westernblot nachgewiesen werden.

Insgesamt betrachtet haben meine Untersuchungen zur Erkenntnis geführt, dass die molekularen Prozesse der embryonalen Musterbildung entlang der anterior-posterioren Körperachse, die für den Modellorganismus *C. elegans* beschrieben wurden nicht auf alle Nematoden übertragbar sind. Für Nematoden der Claden 9, 10 und 11 konnten gravierende Unterschiede in den Expressionsmustern der für eine korrekte Entwicklung von *C. elegans* essentiellen Gene *mex-3* und *pal-1* gefunden werden (Tabelle 4-1, Tabelle 4-2). Auch die Genomanalysen mit Bezug auf die homologen Gene des *C. elegans mex-3/pal-1* Netzwerks zeigten deutliche Unterschiede zwischen verschiedenen Nematodenspezies (Abbildung 3-22, Abbildung 3-23). Diese Ergebnisse weisen auf große Unterschiede in der embryonalen Genexpression der Nematoden hin und zeigen, dass auch nahe Verwandte von *C. elegans* wie *D. coronatus* andere Mechanismen entwickelt haben müssen, um frühe embryonale Entwicklungsprozesse zu steuern.

5 Zusammenfassung

Die korrekte Lokalisation bestimmter maternaler Genprodukte ist essentiell für die Embryonalentwicklung des Modellorganismus *C. elegans*. Durch den Eintritt des Spermiums am posterioren Pol kommt es schon vor der ersten Teilung zum Bruch der Symmetrie und zur Etablierung der anterior-posterioren Körperachse. Der anterior-posterioren Verteilung der PAR-Protein Komplexe folgt eine asymmetrische Teilung der Zygote in eine Soma- (AB) und eine Keimbahnzelle (P1). Letztere teilt sich im Folgenden asymmetrisch in die Keimbahnzelle P2 und die endo-mesodermale Gründerzelle EMS, während sich AB symmetrisch in ABa und ABp teilt.

Für die Musterbildung entlang der anterior-posterioren Achse im 4-Zellstadium von *C. elegans* ist die Lokalisation des MEX-3 Proteins in den anterioren Blastomeren ABa und ABp, sowie die der *pal-1* mRNA in den posterioren Zellen EMS und P2 notwendig. Hierbei wirkt das mRNA bindende KH-Domänen Protein MEX-3 als negativer Regulator der *pal-1* mRNA, indem es an das MEX-3 Recognition Element (MRE), eine konservierte Sequenz in der 3'UTR bindet (Pagano et al., 2009) und so deren Abbau initiiert.

Da prominente Unterschiede auf zellulärer Ebene gefunden worden waren, die für eine korrekte Frühentwicklung von *C. elegans* essentiell sind, habe ich in meiner Arbeit 9 Nematodenspezies auf zelluläre und molekulare Unterschiede zu *C. elegans* untersucht.

In keinem von diesen konnte ein zu *C. elegans* vergleichbares *mex-3/pal-1* mRNA Expressionsmuster gefunden werden. Alle von mir untersuchten Nematoden besitzen im Gegensatz zu *C. elegans* sowohl für *mex-3*, als auch für *pal-1* eine späte mRNA Expressionsdomäne. Für diese Arbeit von besonderer Bedeutung ist aber die frühe Lokalisation von *mex-3* und *pal-1* mRNA, die bei *C. elegans* anterior bzw. posterior zu finden ist. Diese konnte ebenfalls bei keinem untersuchten Nematoden gefunden werden. Es treten vielmehr gravierende Unterschiede im Expressionsmuster im Vergleich zu *C. elegans* auf. Sogar in einem nahen Verwandten von *C. elegans* sind sowohl die *mex-3*, als auch die *pal-1* mRNA in den posterioren Blastomeren (EMS und P2) lokalisiert.

In dieser Arbeit durchgeführte Genomsequenzanalysen zeigen, dass der, von *C. elegans* bekannte Mechanismus der Lokalisation von *mex-3* und *pal-1* mRNA innerhalb der Nematoden nicht konserviert sein kann. Das für die Bindung des MEX-3 Proteins an die

pal-1 mRNA entscheidende MRE (Pagano et al., 2009) konnte von mir nur innerhalb der Gattung *Caenorhabditis* und in keiner der übrigen untersuchten *pal-1* 3'UTR Sequenzen gefunden werden. Dies lässt darauf schließen, dass bei den übrigen Nematoden keine negative Regulation der *pal-1* mRNA durch das MEX-3 Protein stattfindet.

Auch die für *C. elegans* essentielle Lokalisation des MEX-3 Proteins muss in den untersuchten Nematoden anders erfolgen. Homologe der MEX-5 und MEX-6 Proteine, die positive Regulatoren des MEX-3 Proteins sind und für dessen korrekte Lokalisierung in den anterioren Blastomeren ABA und ABp notwendig sind, konnten in keinem der untersuchten Nematoden gefunden werden.

Das in der *C. elegans* Gonade zur Lokalisation der *mex-3* und *pal-1* mRNA essentielle GLD-1 Protein fehlt ebenfalls bei allen analysierten Spezies. Sein Homolog ASD-2, das bei *C. elegans* eine ganz andere Funktion erfüllt, konnte jedoch identifiziert werden. Möglicherweise übernimmt ASD-2 eine entscheidende Rolle in der Lokalisation der *mex-3* und *pal-1* mRNA nicht nur in der Gonade sondern auch während der frühen Embryonalentwicklung

Um die Notwendigkeit des MRE für die *mex-3/pal-1* Interaktion zu untersuchen, wurden transgene *C. elegans* hergestellt, die ein GFP::*pal-1* 3'UTR Fusionskonstrukt trugen.

6 Abstract

Localisation of certain maternal gene products is essential for proper embryonic development in *C. elegans*. The sperm-entry at the posterior pole of the zygote represents a symmetry breaking event leading to the establishment of the anterior-posterior body axis. An asymmetric division of the zygote produces the anterior somatic founder cell AB and its posterior sister, the germline cell P1. AB divides symmetrically into ABa and ABp, while P1 produces the endo-mesodermal founder cell EMS and the germline cell P2.

Correct pattern formation along the anterior-posterior body axis in the *C. elegans* 4 cell-stage requires anterior localisation of the MEX-3 Protein in ABa and ABp and the localisation of *pal-1* mRNA in the posterior blastomeres P2 and EMS. Here, the mRNA binding Protein MEX-3, regulates negatively the *pal-1* mRNA by binding the MEX-3 Recognition Element (MRE), located in the 3'UTR (Pagano et al., 2009) which initiates its degradation.

As prominent differences in cellular processes essential for proper early embryonic development of *C. elegans* had been found in other nematodes I studied 9 different species for cellular and molecular differences compared to *C. elegans*.

None of the analysed nematodes shows an expression pattern comparable to *C. elegans*. In all of them late expression domains of *mex-3* as well as *pal-1* were detected, which are absent in *C. elegans*. In my work I focused particular on the early expression patterns of *mex-3* (anterior) and *pal-1* (posterior) mRNA which are characteristic and essential for normal development in *C. elegans*. The pattern as found in *C. elegans* was not detected in any of the analysed nematodes. Instead, rather strong differences were observed. Even in close relatives of *C. elegans*, both, *mex-3* and *pal-1* mRNA are co-localised in the posterior EMS and P2 blastomeres.

Genome analysis performed in this work revealed, that the *mex-3/pal-1* mRNA localization mechanism known from *C. elegans*, is not conserved among nematodes. The MRE, which is essential for the interaction between the MEX-3 Protein and the *pal-1* mRNA could not be found in the *pal-1* 3'UTR in all the nematodes analysed except *C. elegans*. This suggests, that in the other studied nematodes the MEX-3 protein does not act as a negative regulator of

pal-1 mRNA. The mechanism for the specific localisation of the *C. elegans* MEX-3 Protein must have changed, too. MEX-5 and MEX-6 which positively regulate MEX-3 in ABa and ABp in *C. elegans* are absent in the other studied nematodes. In addition to their embryonic function *mex-3* and *pal-1* play a role during postembryonic germ cell development. In the *C. elegans* gonad it is GLD-1 which localises *mex-3* and *pal-1* mRNA. GLD-1 was found to be missing in all other studied species. However, the GLD-homolog ASD-2, which has a completely different function in *C. elegans* could be identified there. It is suggested that ASD-2 may take over the GLD-1 function of *mex-3* and *pal-1* mRNA localisation not only in the gonad of non—*C. elegans* species but also during early embryogenesis. In order to test the necessity of the MRE for the *mex-3/pal-1* interaction transgenic *C. elegans* were generated expressing GFP::*pal-1* 3'UTR fusion constructs.

7 Literaturverzeichnis

- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. and Lipman, D. J.** (1990). Basic Local Alignment Search Tool. *J. Mol. Biol.* **215**, 403–410.
- Baugh, L. R., Hill, A. a, Claggett, J. M., Hill-Harfe, K., Wen, J. C., Slonim, D. K., Brown, E. L. and Hunter, C. P.** (2005). The homeodomain protein PAL-1 specifies a lineage-specific regulatory network in the *C. elegans* embryo. *Development* **132**, 1843–54.
- Blackwell, T. K., Bowerman, B., Priess, J. R. and Weintraub, H.** (1994). Formation of a monomeric DNA binding domain by Skn-1 bZIP and homeodomain elements. *Science* **266**, 621–8.
- Blaxter, M. and Liu, L.** (1996). Nematode spliced leaders - ubiquity, evolution and utility. *Int. J. for parasitology* **26**, 1025–33.
- Blaxter, M. L., De Ley, P., Garey, J. R., Liu, L. X., Scheldeman, P., Vierstraete, a, Vanfleteren, J. R., Mackey, L. Y., Dorris, M., Frisse, L. M., et al.** (1998). A molecular evolutionary framework for the phylum Nematoda. *Nature* **392**, 71–5.
- Boveri, T.** (1899). Die Entwicklung von *Ascaris megalocephala* mit besonderer Rücksicht auf die Kernverhältnisse. (*Festschrift für Carl von Kuppfer*) Gustav Fischer Verlag, Jena 383–430.
- Bowerman, B., Ingram, M. K. and Hunter, C. P.** (1997). The maternal par genes and the segregation of cell fate specification activities in early *Caenorhabditis elegans* embryos. *Development* **124**, 3815–3826.
- Brenner, S.** (1974). The Genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* **77**, 71–94.
- Carmel, A. B., Wu, J., Lehmann-Blount, K. a and Williamson, J. R.** (2010). High-affinity consensus binding of target RNAs by the STAR/GSG proteins GLD-1, STAR-2 and Quaking. *BMC Mol. Biol.* **11**, 48.

- Chitwood, B. G. and Chitwood, M. B.** (1938). An Introduction to Nematology. *Babylon Verlag*, New York
- Chomczynski, P.** (1987). Single-Step Method of RNA Isolation by Acid Guanidinium Extraction. *Analyt. Biochem.* **162**, 156–159.
- Clark, J. M.** (1988). Novel non-templated nucleotide addition reactions catalyzed by procaryotic and eucaryotic DNA polymerases. *Nucleic acids res.* **16**, 9677–9686.
- Convey, P. and McInnes, S. J.** (2005). Exceptional tardigrade dominated ecosystems in Ellsworth Land, Antarctica. *Ecology* **86**, 519–527.
- Denver, D. R., Clark, K. A. and Raboin, M. J.** (2011). Reproductive mode evolution in nematodes: insights from molecular phylogenies and recently discovered species. *Mol. Phylogen. Evol.* **61**, 584–92.
- Deppe, U., Schierenberg, E., Cole, T., Krieg, C., Schmitt, D., Yoder, B. and Von Ehrenstein, G.** (1978). Cell lineages of the embryo of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **75**, 376–80.
- Dorris, M., De Ley, P. and Blaxter, M. L.** (1999). Molecular analysis of nematode diversity and the evolution of parasitism. *Parasitology today* **15**, 188–93.
- Draper, B. W., Mello, C. C., Bowerman, B., Hardin, J. and Priess, J. R.** (1996). MEX-3 is a KH domain protein that regulates blastomere identity in early *C. elegans* embryos. *Cell* **87**, 205–216.
- Edgar, L. G. and McGhee, J. D.** (1988). DNA synthesis and the control of embryonic gene expression in *C. elegans*. *Cell* **53**, 589–99.
- Edgar, L. G., Carr, S., Wang, H. and Wood, W. B.** (2001). Zygotic expression of the *caudal* homolog *pal-1* is required for posterior patterning in *Caenorhabditis elegans* embryogenesis. *Dev. Biol.* **229**, 71–88.

- Fraser, A. G., Kamath, R. S., Zipperlen, P., Martinez-Campos, M., Sohrmann, M. and Ahringer, J.** (2000). Functional genomic analysis of *C. elegans* chromosome I by systematic RNA interference. *Nature* **408**, 325–30.
- Freckman, D. W. and Virginia, R. A.** (1997). Low-diversity antarctic soil nematode communities: Distribution and response to disturbance. *Ecology* **78**, 363–369.
- Geertsma, E. R., Groeneveld, M., Slotboom, D.-J. and Poolman, B.** (2008). Quality control of overexpressed membrane proteins. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **105**, 5722–7.
- Goldstein, B. and Hird, S. N.** (1996). Specification of the anteroposterior axis in *Caenorhabditis elegans*. *Development* **122**, 1467–1474.
- Goldstein, B., Frisse, L. M. and Thomas, W. K.** (1998). Embryonic axis specification in nematodes: evolution of the first step in development. *Curr. Biol.* **8**, 157–60.
- Guo, S. and Kempthues, K. J.** (1995). *par-1*, a gene required for establishing polarity in *C. elegans* embryos, encodes a putative Ser/Thr kinase that is asymmetrically distributed. *Cell* **81**, 611–20.
- Gönczy, P. and Rose, L. S.** (2005). Asymmetric cell division and axis formation in the embryo. *WormBook*, ed. The *C. elegans* Research Community, WormBook, doi/10.1895/wormbook.1.30.1, <http://www.wormbook.org>
- Holterman, M., Van der Wurff, A., Van den Elsen, S., Van Megen, H., Bongers, T., Holovachov, O., Bakker, J., Helder, J., Wurff, A. Van Der, Elsen, S. Van Den, et al.** (2006). Phylum-wide analysis of SSU rDNA reveals deep phylogenetic relationships among nematodes and accelerated evolution toward crown Clades. *Mol. Biol. Evol.* **23**, 1792–800.
- Huang, N. N., Mootz, D. E., Walhout, A. J., Vidal, M. and Hunter, C. P.** (2002). MEX-3 interacting proteins link cell polarity to asymmetric gene expression in *Caenorhabditis elegans*. *Development* **129**, 747–759.

- Hunter, C. P. and Kenyon, C.** (1996). Spatial and temporal controls target pal-1 blastomere-specification activity to a single blastomere lineage in *C. elegans* Embryos. *Cell* **87**, 217–226.
- Inoue, H., Nojima, H. and Okayama, H.** (1990). High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* **96**, 23–28.
- Kamath, R. S., Fraser, A. G., Dong, Y., Poulin, G., Durbin, R., Gotta, M., Kanapin, A., Le Bot, N., Moreno, S., Sohrmann, M., et al.** (2003). Systematic functional analysis of the *Caenorhabditis elegans* genome using RNAi. *Nature* **421**, 231–7.
- Kimble, J. and Hirsh, D.** (1979). The postembryonic cell lineages of the hermaphrodite and male gonads in *Caenorhabditis elegans*. *Dev. Biol.* **70**, 396–417.
- Laemmli, U. K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–5.
- Lahl, V., Halama, C. and Schierenberg, E.** (2003). Comparative and experimental embryogenesis of Plectidae (Nematoda). *Dev. Genes Evol.* **213**, 18–27.
- Lahl, V., Sadler, B. and Schierenberg, E.** (2006). Egg development in parthenogenetic nematodes: variations in meiosis and axis formation. *Int. J. Dev. Biol.* **50**, 393–8.
- Lahl, V., Schulze, J. and Schierenberg, E.** (2009). Differences in embryonic pattern formation between *Caenorhabditis elegans* and its close parthenogenetic relative *Diploscapter coronatus*. *Int. J. Dev. Biol.* **53**, 507–15.
- Laugsch, M. and Schierenberg, E.** (2004). Differences in maternal supply and early development of closely related nematode species. *Dev. Biol.* **662**, 655–662.
- Maupas, E.** (1899). La mue et l'enkystement chez les nématodes. *Arch. Zool. Exp. Gén.* **7**, 563–628.

- Meldal, B. H. M., Debenham, N. J., De Ley, P., De Ley, I. T., Vanfleteren, J. R., Vierstraete, A. R., Bert, W., Borgonie, G., Moens, T., Tyler, P. a, et al.** (2007). An improved molecular phylogeny of the Nematoda with special emphasis on marine taxa. *Mol. Phylogen. Evol.* **42**, 622–36.
- Merritt, C. and Seydoux, G.** (2010). Transgenic solutions for the germline. *WormBook*, ed. The *C. elegans* Research Community, WormBook, doi/10.1895/wormbook.1.148.1, <http://www.wormbook.org>.
- Mitreva, M., Jasmer, D. P., Zarlenga, D. S., Wang, Z., Abubucker, S., Martin, J., Taylor, C. M., Yin, Y., Fulton, L., Minx, P., et al.** (2011). The draft genome of the parasitic nematode *Trichinella spiralis*. *Nature Genetics* **43**, 228–35.
- Mootz, D., Ho, D. M. and Hunter, C. P.** (2004). The STAR/Maxi-KH domain protein GLD-1 mediates a developmental switch in the translational control of *C. elegans* PAL-1. *Development* **131**, 3263–72.
- Niessing, D., Blanke, S. and Jäckle, H.** (2002). Bicoid associates with the 5'-cap-bound complex of *caudal* mRNA and represses translation. *Genes & Development* **16**, 2576–82.
- Pagano, J. M., Farley, B. M., Essien, K. I. and Ryder, S. P.** (2009). RNA recognition by the embryonic cell fate determinant and germline totipotency factor MEX-3. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **106**, 20252–7.
- Petersen, C. P. and Reddien, P. W.** (2009). Wnt signaling and the polarity of the primary body axis. *Cell* **139**, 1056–68.
- Powell-Coffman, J. a, Knight, J. and Wood, W. B.** (1996). Onset of *C. elegans* gastrulation is blocked by inhibition of embryonic transcription with an RNA polymerase antisense RNA. *Dev. Biol.* **178**, 472–83.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T.** (1989). Molecular Cloning: a laboratory manual. 2nd ed. *Cold Spring Harbour Laboratory Press* 1659.

- Schoppmeier, M., Fischer, S., Schmitt-Engel, C., Lo, U., Löhr, U. and Klingler, M.** (2009). An ancient anterior patterning system promotes caudal repression and head formation in ecdysozoa. *Curr. Biol.* **19**, 1811–5.
- Schubert, C. M., Lin, R., De Vries, C. J., Plasterk, R. H. and Priess, J. R.** (2000). MEX-5 and MEX-6 function to establish soma/germline asymmetry in early *C. elegans* embryos. *Mol. Cell* **5**, 671–82.
- Schulze, J. and Schierenberg, E.** (2009). Embryogenesis of *Romanomermis culicivorax*: an alternative way to construct a nematode. *Dev. Biol.* **334**, 10–21.
- Schulze, J. and Schierenberg, E.** (2011). Evolution of embryonic development in nematodes. *EvoDevo* **2**, 18
- Schulze, J., Houthoofd, W., Uenk, J., Vangestel, S. and Schierenberg, E.** (2012). *Plectus* - a stepping stone in embryonic cell lineage evolution of nematodes. *EvoDevo* **3**, 13.
- Seydoux, G., Mello, C. C., Pettitt, J., Wood, W. B., Priess, J. R. and Fire, A.** (1996). Repression of gene expression in the embryonic germ lineage of *C. elegans*. *Nature* **382**, 713-716.
- Siomi, H., Matunis, M. J., Michael, W. M. and Dreyfuss, G.** (1993). The pre-mRNA binding K protein contains a novel evolutionary conserved motif. *Nucleic Acids Res.* **21**, 1193–1198.
- Skiba, F. and Schierenberg, E.** (1992). Cell lineages, developmental timing, and spatial pattern formation in embryos of free-living soil nematodes. *Dev. Biol.* **151**, 597–610.
- Stein, L. D., Bao, Z., Blasiar, D., Blumenthal, T., Brent, M. R., Chen, N., Chinwalla, A., Clarke, L., Clee, C., Coghlan, A., et al.** (2003). The genome sequence of *Caenorhabditis briggsae*: a platform for comparative genomics. *PLoS Biology* **1**, 166–192.
- Strome, S.** (2005). Specification of the germ line. *WormBook*, ed. The *C. elegans* Research Community, WormBook, doi/10.1895/wormbook.1.9.1, <http://wormbook.org>.

- Strome, S. and Wood, W. B.** (1983). Generation of asymmetry and segregation of germ-line granules in early *C. elegans* embryos. *Cell* **35**, 15–25.
- Sulston, J. E. and Horvitz, H. R.** (1977). Post-embryonic Cell Lineages of the Nematode, *Caenorhabditis elegans*. *Dev. Biol.* **156**, 110–156.
- Sulston, J. E., Schierenberg, E., White, J. G. and Thomson, J. N.** (1983). The embryonic cell lineage of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Dev. Biol.* **100**, 64–119.
- The *C. elegans* Sequencing Consortium** (1998). Genome Sequence of the Nematode *C. elegans*: A Platform for Investigating Biology. *Science* **282**, 2012–2018.
- Valverde, R., Edwards, L. and Regan, L.** (2008). Structure and function of KH domains. *The FEBS Journal* **275**, 2712–26.
- Vernet, C. and Karen, A.** (1997). STAR, a gene family involved in signal transduction and activation of RNA. *Trends in Genetics* **13**, 479–484.
- Waring, D. A. and Kenyon, C. J.** (1991). Regulation of cellular responsiveness to inductive signals in the developing *C. elegans* nervous system. *Nature* **350**, 712–715.
- Weismann, A.** (1889). *Essays Upon Heredity*. Clarendon Press Verlag, Oxford.

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Einhard Schierenberg danke ich für die Betreuung und für sein stetes Interesse am Fortgang dieser Arbeit.

Herrn Dr. Michael Kroiher danke ich für die Betreuung, die Hilfe bei Problemen im Labor, Diskussionen beim Schreiben dieser Arbeit und die Aufmunterungen wenn mal wieder was nicht funktionierte.

Prof. Itai Yanai danke ich für die Überlassung der Genomdaten von *A. nanus*.

Prof. Yuji Kohara danke ich für die Überlassung der Genomdaten von *D. coronatus*.

Allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Schierenberg danke ich für die tolle Arbeitsatmosphäre. Es hat mir immer Spaß gemacht mit euch zu arbeiten. Besonders bedanken möchte ich mich bei:

Elisabeth Trojtza, dafür, dass ich immer alle Würmer bekommen habe, dir mir mal wieder gestorben waren und für viele Gespräche über alles, was es zu besprechen gab.

Phillip Schiffer danke ich für die Überlassung der Genomdaten der Panagrolaimiden, sowie für seine Hilfe bei Problemen mit Sequenzen und Computern.

Jens Schulze danke ich für seine Hilfe beim Mikroskopieren und dafür, dass er immer weiß welche Zelle wo zu finden ist.

Lydia Lubowiecki danke ich für die gemeinsame Bearbeitung des Panagrolaimus Projekts. Es war toll mit dir zusammen zu arbeiten.

Theresa Vogt und Ndifon Nsah danke ich für die gemeinsame Zeit im Labor, mit euch wird es nie langweilig.

Verena Hammes danke ich für viele lustige Kaffeetreffen, für die Diskussion aller Probleme und für die regelmäßige Frage: „Was machen die Würmchen?“

Ich danke meiner Familie für ihre Unterstützung während meines gesamten Studiums. Besonders danke ich meinen Eltern, die mich immer in meinen Entscheidungen bestärkt haben und ohne die ich heute nicht so wäre wie ich bin.

Ganz besonders danke ich Markus Becker, der mich immer unterstützt und mir unendlich viele biochemischen Fragen beantwortet hat. Danke, dass du alle meine Launen ausgehalten hast. Es war bestimmt nicht immer einfach.

Erklärung

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit – einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen –, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; dass sie – abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen – noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluss des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde.

Die Bestimmungen der Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Herrn Prof. Dr. Einhard Schierenberg betreut worden.

Julia Camps