

# Untersuchung des mikrovillären Bürstensaums im *C. elegans* Darmepithel mittels Puls-RNAi

Inaugural Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

Dr. nat. med.

der Medizinischen Fakultät

und

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität zu Köln

vorgelegt von

Stephanie Adler

aus Leipzig

Copyshop Deutz, Köln

2024

Betreuer: Dr. rer. nat. habil. Olaf Bossinger

Referenten Prof. Dr. Martin Scaal  
PD Dr. Michael Kroiher

Datum der mündlichen Prüfung: 03.09.2024

Die vorliegende Dissertation wurde im Rahmen einer Sachbeihilfe (BO 1061/11-3) von der DFG unterstützt.



# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis .....</b>	<b>I</b>
<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>V</b>
<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>VII</b>
<b>Abkürzungen .....</b>	<b>VIII</b>
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1 Der mikrovilläre Bürstensaum in Enterozyten.....	1
1.2 Eigenschaften des Modellorganismus <i>C. elegans</i> .....	3
1.3 Epithelgewebe in <i>C. elegans</i> .....	5
1.3.1 Die Entwicklung des Darms .....	5
1.3.2 Aufbau einer Darmzelle und Bestandteile des Darmepithels .....	7
1.3.3 Spermathek und H-Zelle: weitere röhrenförmige Epithelgewebe in <i>C. elegans</i> .....	12
1.4 Die Methode der RNA-vermittelten Interferenz (RNAi) durch Fütterung und darmspezifische RNAi .....	13
1.5 Ziel .....	15
<b>2 Material und Methoden .....</b>	<b>16</b>
2.1 Molekularbiologische Methoden .....	16
2.1.1 Bakterienstämme und Vektoren .....	16
2.1.2 Nährmedien.....	16
2.1.3 Polymerasekettenreaktion (PCR) .....	17
2.1.4 Oligonukleotide .....	18
2.1.5 Agarosegelelektrophorese .....	18
2.1.6 Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen.....	19

2.1.7	Ligation .....	19
2.1.8	Transformation.....	20
2.1.9	Isolierung von Plasmid-DNA .....	20
2.1.10	Photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA .....	21
2.1.11	Sequenzierung.....	22
2.2	<i>C. elegans</i> -Methoden .....	22
2.2.1	Kultivierung von <i>C. elegans</i> .....	22
2.2.2	Agarplatten zur Haltung von <i>C. elegans</i> .....	23
2.3	RNA-vermittelte Interferenz (RNAi) durch Fütterung.....	23
2.3.1	Herstellung der RNAi-Agarplatten.....	24
2.3.2	Herstellung der <i>E. coli</i> -ÜN-Kultur .....	24
2.3.3	Animpfen der RNAi-Agarplatten mit der ÜN-Kultur.....	24
2.3.4	Ansetzen der RNAi-Experimente .....	25
2.4	Mikroskopie.....	25
2.4.1	Herstellung der Agarose-beschichteten Objektträger .....	26
2.5	Auswertung .....	27
2.5.1	Ermittlung der Körperlänge.....	27
2.5.2	Quantifizierung der Fluoreszenzsignale .....	27
2.6	Statistik.....	29
2.7	Chemikalien, Materialien, Geräte und Software .....	29
<b>3</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>33</b>
3.1	Etablierung von RNAi-Pulsexperimenten zur Untersuchung des mikrovillären Bürstensaums in <i>C. elegans</i> .....	33
3.2	<i>act-5(RNAi)</i> und <i>aps-1(RNAi)</i> führen zu Veränderungen der Fluoreszenzsignale der Mikrovilli-Marker ACT-5 und PEPT-1 .....	35

3.2.1	Das ACT-5::YFP-Fluoreszenzsignal ist nach postembryonaler <i>act-5</i> Dauer- und Puls-RNAi reduziert.....	35
3.2.2	Postembryonale und embryonale <i>aps-1(RNAi)</i> reduziert die Fluoreszenzsignale von ACT-5::YFP und PEPT-1::dsRed .....	38
3.3	<i>act-5(RNAi)</i> im Wildtyp N2 induziert embryonale Letalität wahrscheinlich aufgrund der Sequenzähnlichkeit zu anderen Aktin-Genen ( <i>act-1, act-2, act-3, act-4</i> ).....	42
3.4	Embryonale <i>act-5</i> und <i>aps-1</i> Puls-RNAi führt zu einer verzögerten Entwicklung und einer verringerten Nachkommenzahl in OLB11 und JM125 .....	45
3.5	Die Auswirkungen postembryonaler <i>act-5</i> Puls-RNAi .....	48
3.5.1	Nach kurzer Puls-RNAi wirkt der RNAi-Effekt nach .....	48
3.5.2	Postembryonale <i>act-5</i> Puls-RNAi führt zu einer verzögerten Larval- und Adultentwicklung.....	50
3.5.3	Postembryonale <i>act-5</i> Puls-RNAi führen zu einer verringerten Nachkommenzahl.....	57
3.6	Darmspezifische <i>rab-11.1(RNAi)</i> führt zu einer verringerten Nachkommenzahl in der P0 und zu einer verzögerten Entwicklung der F1 .....	59
3.7	Darmspezifische <i>par-5(RNAi)</i> sowie <i>cdh-5(RNAi)</i> in OLB11 hat weder Einfluss auf die Entwicklung noch auf die Nachkommenzahl.....	62
3.8	Visualisierung des Mikrotubuli-Netzwerks und darmspezifische Tubulin-RNAi.....	64
3.8.1	Visualisierung des Mikrotubuli-Netzwerks im <i>C. elegans</i> Darmepithel während der Entwicklung anhand des Mikrotubuli-assoziierten Proteins MAPH-1.1 als Marker.....	65
3.8.2	Darmspezifische Tubulin-RNAi hat keinen Einfluss auf die Nachkommenzahl .....	67
3.8.3	Veränderung des GFP::MAPH-1.1-Fluoreszenzsignals bei postembryonaler RNAi gegen einzelne Tubulin-Gene.....	72
<b>4</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>77</b>
4.1	Auswirkungen der <i>act-5(RNAi)</i> auf andere Aktine und Gewebe wird anhand darmspezifischer RNAi in OLB11 umgangen .....	77
4.2	Veränderungen im apikalen Bürstensaum sind erkennbar in Fluoreszenz- und DIK-Mikroskopie nach RNAi gegen <i>act-5, aps-1</i> oder <i>rab-11.1</i> .....	79

4.3	Variierende Auswirkungen auf die Kennzeichen Entwicklung und Nachkommenzahl, abhängig von der Dauer der Puls-RNAi, deuten auf eine Phase der MV-Bildung vorrangig zu Beginn der postembryonalen Entwicklung hin.....	82
4.4	Die Regenerationsfähigkeit der <i>C. elegans</i> Enterozyten nach Puls-RNAi .....	85
4.5	Offene Fragen in Bezug auf die mögliche Rolle eines Cadherins im mikrovillären Bürstensaum .....	88
4.6	Offene Fragen in Bezug auf darmspezifische Tubuline.....	90
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>94</b>
<b>6</b>	<b>Abstract .....</b>	<b>96</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>98</b>
<b>8</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>107</b>
8.1	Postembryonale <i>act-5</i> Puls-RNAi reduziert das ACT-5::YFP-Fluoreszenzsignal.....	107
8.2	Die F1-Nachkommenzahl nach postembryonaler <i>let-413</i> Puls-RNAi in den Stämmen JM125 und CE81 .....	108
8.3	Postembryonale <i>act-5</i> Dauer- und Puls-RNAi führt zu einem verminderten Körperlängenwachstum.....	109
8.4	Tubulin-RNAi .....	110
8.5	Sequenzen der RNAi-Fütterungskonstrukte .....	114
	<b>Danksagung .....</b>	<b>121</b>
	<b>Erklärung .....</b>	<b>122</b>
	<b>Lebenslauf .....</b>	<b>123</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 Die Mikrovilli befinden sich auf den Enterozyten der Villi des Darmepithels.....	2
Abb. 2 Der Entwicklungszyklus von <i>C. elegans</i> . .....	4
Abb. 3 Zellstammbaum des <i>C. elegans</i> Darms und Anordnung dieser Zellen in Ring-Segmenten .....	6
Abb. 4 Die Entwicklung des mikrovillären Bürstensaums im <i>C. elegans</i> Darm auf elektronenmikroskopischer Ebene.....	7
Abb. 5 Zelluläre Organisation einer <i>C. elegans</i> Enterozyte. ....	12
Abb. 6 Schematische Darstellung des OLB11-Genotyps.....	15
Abb. 7 Beispielhafte Darstellung der Ermittlung der Körperlänge in FIJI. ....	27
Abb. 8 Beispielhafte Darstellung der Quantifizierung des apikalen Fluoreszenzsignals PEPT-1::DsRed in FIJI. ....	28
Abb. 9 Schematische Darstellung der RNAi-Pulsexperimente. ....	34
Abb. 10 <i>In vivo</i> Fluoreszenzaufnahmen des ACT-5::YFP-Signals im Darm von JM125-Würmern bei postembryonaler <i>act-5(RNAi)</i> und nach 7 h und 3,5 h postembryonaler <i>act-5</i> Puls-RNAi mit Quantifizierung der Fluoreszenzsignale. ....	37
Abb. 11 <i>In vivo</i> DIK- und Fluoreszenzaufnahmen des ACT-5::YFP-Signals im Darmepithel von JM125 an Tag 4 bei postembryonaler <i>aps-1(RNAi)</i> und an Tag 2 nach embryonaler <i>aps-1</i> Puls-RNAi mit Quantifizierung des Fluoreszenzsignals. ....	40
Abb. 12 <i>In vivo</i> DIK- und Fluoreszenzaufnahmen des PEPT-1::DsRed-Signals im Darmepithel von CE81 bei postembryonaler <i>act-5(RNAi)</i> an Tag 2 und bei postembryonaler <i>aps-1(RNAi)</i> an Tag 5 mit Quantifizierung der Fluoreszenzsignale. ....	41
Abb. 13 Vergleich der Nukleinsäuresequenzen der fünf Aktine des <i>C. elegans</i> Genoms und des verwendeten <i>act-5(RNAi)</i> -Klons. ....	44
Abb. 14 Embryonale Letalität der F1 nach <i>act-5(RNAi)</i> in Wildtyp N2 (A-C') und OLB11 (D-F') L4-Larven. ....	44
Abb. 15 Embryonale <i>act-5</i> und <i>aps-1</i> Puls-RNAi in OLB11 und JM125 verzögert die F1-Entwicklung und verringert die F2-Nachkommenzahl. ....	47
Abb. 16 Durchschnittliche Nachkommenzahl in adulten Wildtyp N2 Hermaphroditen nach postembryonaler <i>let-413</i> Puls- und Dauer-RNAi, beginnend in L1-Larven. ....	49
Abb. 17 Entwicklung der P0 auf Kontrollplatten im Anschluss an die angegebene <i>act-5</i> Puls-RNAi in Wildtyp N2, JM125 und OLB11 L1-Larven.....	52
Abb. 18 DIK-Aufnahmen des Darmepithels an Tag 1 und Tag 7 nach 7 h bzw. 3,5 h darmspezifischer postembryonaler <i>act-5</i> Puls-RNAi, Start OLB11 L1. ....	53
Abb. 19 DIK-Aufnahmen bei postembryonaler <i>act-5</i> Dauer-RNAi in N2, JM125 und OLB11 L1-Larven .....	54
Abb. 20 Körperlänge bei postembryonaler <i>act-5</i> Dauer-RNAi in JM125 und nach 7 h und 3,5 h postembryonaler <i>act-5</i> Puls-RNAi in JM125 und OLB11 L1-Larven. ....	56

Abb. 21 Reduzierung der F1-Nachkommenzahl bei <i>act-5</i> Dauer-RNAi in Wildtyp N2 und OLB11 L4-Larven und nach postembryonaler <i>act-5</i> Puls-RNAi in OLB11, N2 und JM125 L1-Larven. ....	58
Abb. 22 Larvaler Arrest im Wildtyp N2 sowie Entwicklung und Anzahl der Nachkommen bei postembryonaler <i>rab-11.1(RNAi)</i> in P0 und F1 in OLB11. ....	61
Abb. 23 Entwicklung und Nachkommenzahl bei postembryonaler <i>par-5(RNAi)</i> und <i>cdh-5(RNAi)</i> in P0 und F1 in Wildtyp N2 und in OLB11. ....	63
Abb. 24 <i>In vivo</i> -Dokumentation der Entwicklung des MAPH-1.1::GFP-Fluoreszenzsignals im Darmepithel von BOX188 Embryonen und während der postembryonalen Entwicklung von der L1-Larve bis zum Adulten. ....	66
Abb. 25 Vergleich der gespleißten Nukleinsäuresequenzen (ohne UTR) der Gene, die im Zusammenhang mit dem Mikrotubuli-Netzwerk untersucht wurden (Clustal Omega 1.2.2, Geneious). ....	68
Abb. 26 <i>In vivo</i> -Dokumentation des GFP::MAPH-1.1-Fluoreszenzsignals nach postembryonaler <i>tba-4(RNAi)</i> in BOX188 L1-Larven an Tag 5 und Quantifizierung der Fluoreszenzintensität. ....	73
Abb. 27 <i>In vivo</i> -Dokumentation des GFP::MAPH-1.1-Fluoreszenzsignals nach postembryonaler <i>tbb-2(RNAi)</i> sowie <i>tbb-4(RNAi)</i> in BOX188 L1-Larven an Tag 3 und Quantifizierung der Fluoreszenzintensität. ....	74
Abb. 28 <i>In vivo</i> -Dokumentation des GFP::MAPH-1.1-Fluoreszenzsignals nach postembryonaler <i>tbg-1(RNAi)</i> in BOX188 L1-Larven an Tag 2 und Quantifizierung der Fluoreszenzintensität. ....	75
Abb. 29 Visualisierung der möglichen Herunterregulierung der aus dem ACT-5::GFP Fluoreszenzsignal abgeleiteten <i>act-5</i> Expression nach (Bidaud-Meynard et al., 2021) durch die temporäre Exposition auf RNAi-Platten. ....	86
Abb. 30 Schematische Zusammenfassung der Methode der Puls-RNAi sowie die Auswirkungen auf die Entwicklung und Nachkommenzahl. ....	88
Abb. 31 Quantifizierung des ACT-5::YFP-Fluoreszenzsignals bis Tag 7 nach postembryonaler <i>act-5</i> Puls-RNAi in JM125 L1-Larven. ....	107
Abb. 32 Durchschnittliche Nachkommenzahl in adulten Hermaphroditen nach postembryonaler <i>let-413</i> Puls- und Dauer-RNAi, beginnend in L1-Larven. ....	108
Abb. 33 Körperlänge bei postembryonaler <i>act-5</i> Dauer-RNAi in CE81 und nach 7 h und 3,5 h postembryonaler <i>act-5</i> Puls-RNAi in JM125 L1-Larven. ....	109

## Tabellenverzeichnis

Tab. 1 Klonierungsbakterien und Vektor für RNAi-Konstrukte .....	16
Tab. 2 PCR-Programm .....	17
Tab. 3 Bezeichnung und Sequenz der Oligonukleotide .....	18
Tab. 4 Verwendete <i>C. elegans</i> -Stämme.....	22
Tab. 5 Genotyp des für RNAi durch Fütterung verwendeten Bakterienstamms HT115 (DE3) .....	24
Tab. 6 Mikroskope mit Kamera und Objektiven .....	25
Tab. 7 Reagenziensätze und Hersteller.....	30
Tab. 8 Geräte mit Modellbezeichnung und Herstellerangabe .....	30
Tab. 9 Software.....	32
Tab. 10 Prozentsätze identischer Basen der Exonsequenzen der fünf <i>C. elegans</i> Aktine und des <i>act-5(RNAi)</i> -Klons.....	43
Tab. 11 Phänotypischer Vergleich von WT und OLB11 bei postembryonaler RNAi beginnend in L1 bis zum Adulten.....	69
Tab. 12 F1- und F2-Nachkommenzahl bei Tubulin-RNAi in OLB11 L1-Larven. ....	71
Tab. 13 Übereinstimmung der gespleißten Nukleinsäuresequenz mit UTR des jeweiligen Tubulin-Gens mit der getroffenen mRNA-Sequenz (BLASTN 2.10.1+, (Altschul et al., 1997)) .....	110
Tab. 14 Übereinstimmung der in Wormbase ( <i>C. elegans</i> Sequencing Consortium genome project (PRJNA13758)) geblasteten RNAi-Klon-Sequenzen mit den getroffenen Tubulin-Genen.....	113

## Abkürzungen

::	Promoter
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
Abd.	Abdeckung
<i>act-5</i>	Actin Gene 5
<i>aps-1</i>	Adaptin Small Chain Clathrin Associated Complex Gene 1
<i>ben-1</i>	BENZimidazole resistant
BJ	Stammkürzel des Leube-Labors
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
CCC	Cadherin-Catenin complex
<i>cdh-5</i>	Cadherin Family Gene 5
CE	Stammkürzel des Labors
CFP	Blau fluoreszierendes Protein
CGC	Caenorhabditis Genetics Center
DAC	DLG-1/AJM-1 complex
dH <sub>2</sub> O	destilliertes Wasser
DIK	differentieller Interferenzkontrast
DsRed	Rot fluoreszierendes Protein
dsRNA	doppelsträngige RNA
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
emb.	embryonal
EtOH	Ethanol
F1/A	F1 Nachkommen pro P0 Adulten
F2/A	F2 Nachkommen pro F1 Adulten
FL-Signal	Fluoreszenzsignal
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
JM	Stammkürzel des McGhee-Labors
l	Liter

LB	Lysogeny Broth
<i>let-413</i>	Lethal Gene 413
Lva	larvaler Arrest Phänotyp (Simmer et al., 2003)
MAP	Mikrotubuli-assoziiertes Protein
<i>mec-7/mec-12</i>	Mechanosensory abnormality
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mRNA	messenger-RNA
MTOC	Mikrotubuli-organisierendes Zentrum
MVID	microvilli inclusion disease
n.s.	nicht signifikant
ncMTOC	nicht-zentrosomales Mikrotubuli-organisierendes Zentrum
NGM	Nematode Growth Medium
nm	Nanometer
<i>noca-1</i>	Non-Centrosomal microtubule Array
OD	optische Dichte
OLB	Stammkürzel des Bossinger-Labors
OLB11	darmspezifischer RNAi-Stamm
P0	Parentalgeneration
<i>par-5</i>	Abnormal Embryonic Partitioning of Cytoplasm Gene 5
PBST	Phosphate Buffered Saline mit Tween
pEmb	partiell embryonal letaler Phänotyp (Simmer et al., 2003)
<i>pept-1</i>	Peptide transporter family 1
pLvl	partiell larval letaler Phänotyp (Simmer et al., 2003)
pPvl	partieller Phänotyp: protruding vulva (Simmer et al., 2003)
<i>rab-11.1</i>	RAB Family Gene 11.1
RISC	RNA-induced silencing complex
RNAi	RNA-vermittelte Interferenz
ROI	Bereich von Interesse
rpm	Umdrehungen pro Minute

<i>rrf-3</i> Mutante	hypersensitiv auf somatische RNAi (Simmer et al., 2003)
RT	Raumtemperatur
siRNA	small interfering RNA
Ste	steriler Phänotyp (Simmer et al., 2003)
<i>tba-(1-9)</i>	Alpha-Tubulin
<i>tbb-(1-6)</i>	Beta-Tubulin
<i>tbg-1</i>	Gamma-Tubulin
Tet	Tetracyclin
ÜN	über Nacht
UTR	untranslatierte Region
VC	Vektorkontrolle (Kontrollgruppe)
WT	Wildtyp (N2 Varietät Bristol)
YFP	Gelb fluoreszierendes Protein

# 1 Einleitung

Der Nematode *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) ist ein metazoischer Organismus, dessen Darm eine große Ähnlichkeit zu den Därmen anderer Metazoen aufweist (Bossinger et al., 2015). Dazu zählen die Mikrovilli, angeordnet als mikrovillärer Bürstensaum an der apikalen Membrandomäne der Enterozyten. Die Mikrovilli tragen als Oberflächenvergrößerung maßgeblich zur Hauptfunktion des Darms, der Resorption von Nährstoffen aus der verdauten Nahrung im Darmlumen in die Enterozyten, bei.

Dennoch gibt es in *C. elegans* einen entscheidenden Unterschied zum Darmepithel der Vertebraten (Gehart & Clevers, 2019): Es gibt keine intestinalen Stammzellen. Stattdessen wird der Darm, einer invarianten Zelllinie folgend, monoklonal aus der E-Blastomere gebildet, sodass sich eine definierte Zellzahl von 20 Enterozyten ergibt, die am Ende der Embryonalentwicklung den Darm bilden (Leung et al., 1999; Sulston et al., 1983). Folglich kann in *C. elegans* keine Zellerneuerung der Enterozyten erfolgen (Dimov & Maduro, 2019). Diese Eigenschaft der Zellkonstanz eines Organs wird als Eutelie bezeichnet (Sulston et al., 1983; van Cleave, 1932).

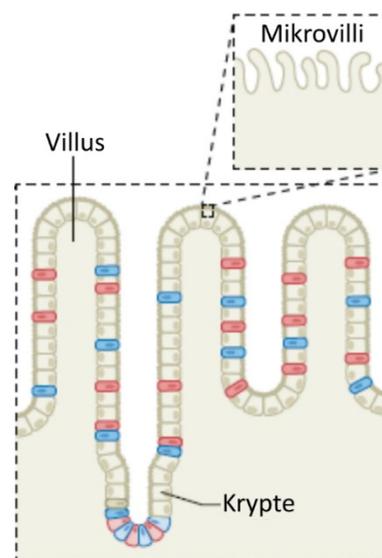
Dieser simple, invariante Aufbau des Darms von *C. elegans* ermöglicht es, Untersuchungen in einer kontrollierten Umgebung durchzuführen. Gleichzeitig ist der Aufbau dieses Darms ähnlich genug zu den Därmen komplexerer Vertebraten, sodass sich die Möglichkeit bietet, aus Beobachtungen im *C. elegans* Darm Rückschlüsse auf ähnliche Därme komplexerer Organismen zu ziehen.

## 1.1 Der mikrovilläre Bürstensaum in Enterozyten

Das Hauptmerkmal der Mikrovilli ist, dass es sich um fingerförmige Ausstülpungen handelt, die aus Aktin-Filamenten bestehen. Da sie in verschiedenen Zelltypen vorkommen, variieren sie in Größe, Anzahl, Funktion und Anordnung, um die jeweiligen speziellen Anforderungen zu erfüllen (Crawley, Mooseker, et al., 2014; Sharkova et al., 2023). In dieser Arbeit liegt der Schwerpunkt auf den Mikrovilli der Enterozyten, die den Großteil des Darmepithels darstellen. Das einschichtige Darmepithel ist von *C. elegans* bis zum Menschen konserviert (Coch & Leube, 2016). Im Dünndarmepithel der Vertebraten differenzieren die Enterozyten aus den Stammzellen der Krypte apikal entlang der Villi (Sharkova et al., 2023; Stojanović et

al., 2022). Die dicht gepackten Mikrovilli an der apikalen Membran der Enterozyten bilden einen dem Darmlumen zugewandten geordneten Bürstensaum (Abb. 1). Dieser dient dazu, die Absorptionsfläche für die Nährstoffaufnahme aus dem Lumen zu vergrößern (Crawley, Mooseker, et al., 2014; Sharkova et al., 2023). Generell basieren die Funktionen des Darms auf der Existenz und der Beschaffenheit des mikrovillären Bürstensaums.

Mikrovilli können von verschiedenen Erkrankungen betroffen sein (Babcock et al., 2022). Schädigungen können auch durch verschiedene Ursachen wie physische Verletzungen oder Entzündungen hervorgerufen werden. Einer dauerhaften Beeinträchtigung wird durch die Selbsterneuerung der Zellen aus den Darmkrypten (Abb. 1) entgegengewirkt (Rees et al., 2020). Bei der Wundheilung kommt es zu Zellwanderungen und einem dynamischen Abbau der Mikrovilli, um die Verletzung entsprechend ausgleichen zu können (Delacour et al., 2016; Ubelmann et al., 2013).



**Abb. 1 Die Mikrovilli befinden sich auf den Enterozyten der Villi des Darmepithels.**

Zwischen den Villi des Darmepithels befinden sich Krypten, aus denen sich verschiedene Zelltypen (rot, blau) mit darmspezifischer Funktion differenzieren. Die ausdifferenzierten Enterozyten weisen an ihrer apikalen Seite einen mikrovillären Bürstensaum auf. Abb. entnommen und modifiziert aus (Stojanović et al., 2022).

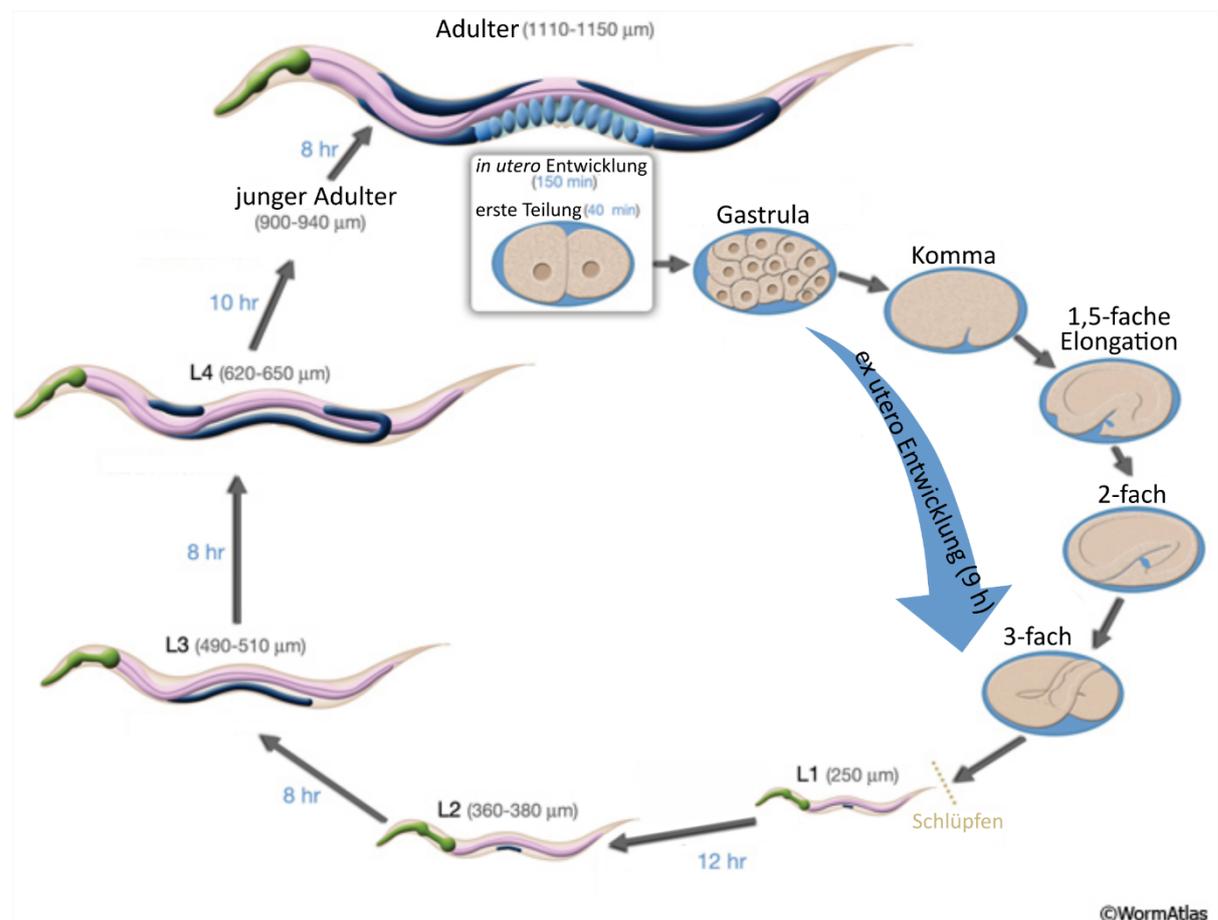
## 1.2 *Eigenschaften des Modellorganismus C. elegans*

Der Nematode *C. elegans* hat einige praktische Eigenschaften, die ihn zu einem guten Modellorganismus machen. Im Labor ist eine einfache Kultivierung auf Agarplatten mit *E. coli* als Nahrungsquelle möglich. Meist wird eine Kultivierungstemperatur von 15 °C bis 20 °C verwendet (B. Zhang et al., 2015). Die Entwicklungszeit ist temperaturabhängig und verkürzt sich bei höheren Temperaturen (Corsi et al., 2015). Bei 22 °C beträgt die Zeit von der Befruchtung bis zum Erreichen des fortpflanzungsfähigen Adultstadiums etwa drei Tage (Abb. 2). Die Fortpflanzung erfolgt als Hermaphrodit durch Selbstbefruchtung, bei der nach der Bildung der Spermien die Oozyten heranreifen und beim Passieren der Spermathek befruchtet werden. Auf diese Weise können bis zu 300 eigene Nachkommen pro Hermaphroditen erzeugt werden. In Kombination mit männlichen Tieren, die in der Natur zu weniger als 0,2 % vorkommen (Corsi et al., 2015), können bis zu 1000 Nachkommen pro Hermaphroditen entstehen.

Der Ablauf der embryonalen und postembryonalen Entwicklung bis zum Hermaphroditen mit 959 bzw. zum männlichen Tier mit 1031 somatischen Zellen ist durch den invarianten Zellstammbaum vollständig bekannt (Sulston et al., 1983; Sulston & Horvitz, 1977). Die Embryogenese umfasst die Entwicklung von der Zygote bis zum Schlupf der L1-Larve. Zum Zeitpunkt der Ablage befinden sich die Embryonen in der Gastrulationsphase, in der die beiden bis dahin gebildeten Darmzellen in das Innere des Embryos wandern (Bossinger et al., 2015; Leung et al., 1999). Die folgenden Embryonalstadien werden nach Form und Länge eingeteilt: Nach den Stadien Bohne und Komma folgen die Streckungsstadien Kaulquappe (1,5-fach gestreckt), Pflaume (2-fach gestreckt), Schlinge (3-fach gestreckt) und Brezel (4-fach gestreckt). Nach dem Schlupf folgt die postembryonale Entwicklung mit vier Larvenstadien. Zwischen den Larvenstadien findet jeweils eine Häutung statt. Ausgehend von einer Körperlänge der L1-Larve von 250 µm nimmt die Körperlänge mit jedem Larvenstadium um 100 – 130 µm sowie mit dem Übergang zum Jungtier und zum Adultstadium um 210 – 280 µm zu (Abb. 2, (Byerly et al., 1976)).

Die geringe Größe, der kurze Lebenszyklus und die hohe Nachkommenzahl von *C. elegans* ermöglichen die einfache und kostengünstige Herstellung einer ausreichend großen Population für Experimente. Aufgrund der geringen Größe und der hohen Transparenz kann *C. elegans* in allen Entwicklungsstadien mikroskopisch untersucht werden, wobei auch

Fluoreszenzmarkierungen *in vivo* oder Antikörperfärbungen eingesetzt werden können (Corsi et al., 2015). Die Sequenzierung des *C. elegans* Genoms (*C. elegans* Sequencing Consortium, 1998; Hillier et al., 2005) ist insbesondere für die Untersuchung der Funktion eines Zielgens mittels RNAi von großem Nutzen (1.4, (Ahringer, 2006)). Umfangreiche Informationen zu einzelnen Genen finden sich auch in WormBase (Davis et al., 2022). *Caenorhabditis elegans* ist daher ein idealer Modellorganismus, um die Lücke zwischen *in vitro*-Kulturen und Vertebraten-Modellorganismen zu schließen.



**Abb. 2 Der Entwicklungszyklus von *C. elegans*.**

Die Entwicklung beginnt mit der Fertilisation und einer anschließenden *in utero* Entwicklung, bis die Embryonen in der Gastrulationsphase abgelegt werden, sodass die weitere Entwicklung der Morphogenesestadien der Embryonen *ex utero* erfolgt. Die Larvenentwicklung besteht aus den vier Stadien L1 bis L4, an die sich das Stadium des jungen Adulten anschließt. Hat *C. elegans* das adulte Stadium erreicht, beginnt die Bildung der nachfolgenden Generation. Ab der L1-Larve wird in Klammern die Körperlänge/der Körperlängenbereich von *C. elegans* im jeweiligen Stadium angegeben. Die Stundenangabe neben den Pfeilen gibt die Zeitspanne an, die bei einer Inkubationstemperatur von 22 °C vergeht, bis das nachfolgende Stadium erreicht wird. Das Stadium der Dauerlarve wurde hier nicht berücksichtigt. Dabei handelt es sich um einen Entwicklungsweg, der bei ungünstigen Umweltbedingungen nach dem L1-Stadium stattfinden kann. Farblich wurden die folgenden anatomischen Hauptstrukturen hervorgehoben: hellblau=Embryonen, grün=Pharynx, blau=Gonade, rosa=Darm. Abb. entnommen und modifiziert aus (Altun & Hall, 2009)

### **1.3 Epithelgewebe in *C. elegans***

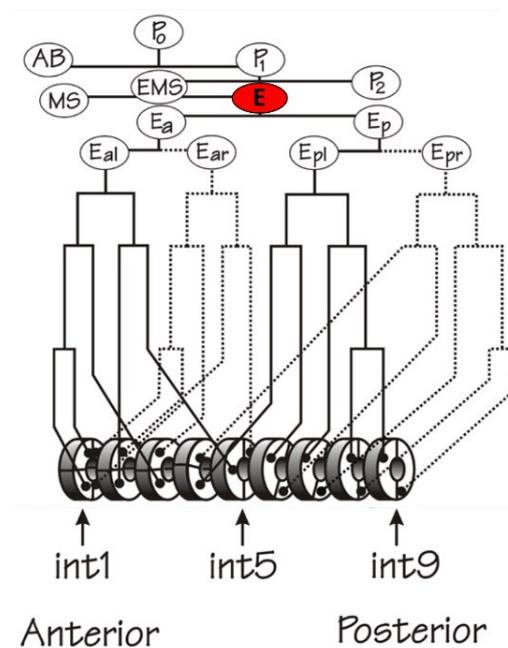
*C. elegans* hat einen einfachen Körperbau, aber viele seiner Organe sind denen in komplexeren Organismen ähnlich. Einige dieser Organe bestehen aus Epithelgewebe, das ein wichtiger Bestandteil metazoischer Organismen ist. Epithelgewebe können nach ihrer Funktion in verschiedene Kategorien eingeteilt werden: klassisches Epithelgewebe in Schicht- oder Röhrenform (Epidermis und Vulva bzw. Darm, H-Zelle und Pharynx) und kontraktiles Myoepithelgewebe (Spermathek) (Michaux et al., 2001). Pharynx und Darm sind Teil des Verdauungssystems, wobei die Nahrung durch die Mundöffnung in den Pharynx gelangt und von dort durch die Pharynx-Darm-Klappe in den Darm transportiert wird. Der Darm macht etwa 1/3 der somatischen Gewebemasse von *C. elegans* aus (McGhee, 2007) und ist damit eines der Hauptorgane. Der Darm steht im Mittelpunkt dieser Arbeit, wobei auch die H-Zelle und die Spermathek berücksichtigt werden.

#### **1.3.1 Die Entwicklung des Darms**

Nach dem 4-Zellstadium des Embryos beginnt die Bildung des Darmepithels mit der Anlage der Gründerzelle E aus der Zellteilung der EMS-Somazelle (Sulston et al., 1983). Während der Embryogenese entstehen daraus die 20 Enterozyten des Darmepithels (McGhee, 2007; Sulston et al., 1983). Nach der ersten Teilung der Gründerzelle wandern die E2-Vorläuferzellen während der Gastrulation in das Innere des Embryos, sodass dort weitere Zellteilungen zur Bildung des Darms stattfinden können. Im Bohne- und Komma-Stadium besteht der Darm noch aus 16 Enterozyten, bis schließlich am Ende des Komma-Stadiums die Abfolge der vorgegebenen Zellteilungen und -drehungen abgeschlossen ist. In der Endform des Darms liegen sich die 20 Enterozyten als Zellpaare gegenüber und bilden so aneinandergereihte ringförmige Segmente (Abb. 3). Das erste dieser „Ints“ besteht aus vier Enterozyten, die anderen acht aus je einem Paar. Zwischen den apikalen, einander zugewandten Seiten der Enterozyten bildet sich das Lumen (Leung et al., 1999). Elektronenmikroskopisch ist die Bildung des Lumens ab dem Kommasegmentstadium erkennbar (vgl. Abb. 4) (Bossinger et al., 2015). In den folgenden Elongationsstadien treten zunächst einzelne Ausstülpungen der apikalen Membran auf, die mit fortschreitender Entwicklung eine strukturierte Anordnung fingerförmiger Ausstülpungen erreichen (Abb. 4, (Bidaud-Meynard et al., 2021)). Es handelt sich um Mikrovilli, die auf der apikalen Membran

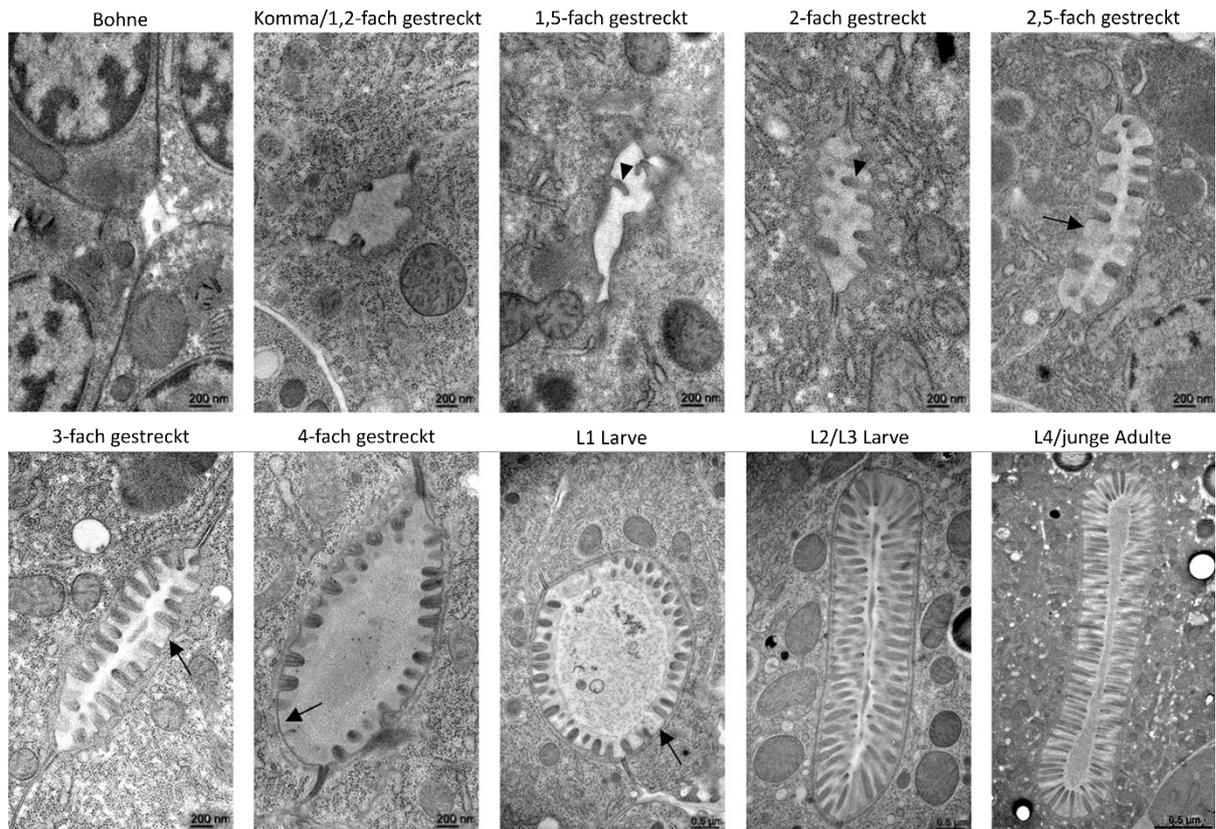
bürstenartig angeordnet sind. Dichte, Länge und Breite der Mikrovilli nehmen mit fortschreitender Entwicklung zu (Bidaud-Meynard et al., 2021). Es wird vermutet, dass Mikrovilli nicht nur als einzelne Ausstülpungen auftreten, sondern dass sich zwei identische Mikrovilli aus einer Ausstülpung durch Gabelung seitlich aufspalten (Zhu et al., 2022).

Während der postembryonalen Entwicklung nimmt das Volumen der Darmzellen proportional zum Gesamtwachstum des Organismus zu. Entsprechend vergrößert sich auch das Darmlumen. In den elektronenmikroskopischen Schnitten des embryonalen 4-fachen Streckungsstadiums und der L1-Larve (Abb. 4), in denen das Lumen eine eher runde Form aufweist, war vermutlich die gute Sichtbarkeit der Anordnung der Mikrovilli ausschlaggebend. Die typisch ellipsoide Form des Lumens (Leung et al., 1999) ist in den 2,5- und 3-fachen Streckungsstadien sowie in den Schnitten der L2/L3-Larve und des L4/Jungtieres zu erkennen.



**Abb. 3 Zellstammbaum des *C. elegans* Darms und Anordnung dieser Zellen in Ring-Segmenten**

Die 20 Enterozyten gehen klonal aus der E-Blastomere hervor und ordnen sich gegenüberliegend zu Ints (ringförmige Segmente) an. Die Linien geben wieder, aus welcher Teilung genau welche Enterozyten entstanden. Das erste Int besteht aus vier, alle anderen aus zwei Enterozyten. Abb. entnommen aus (McGhee, 2007)



**Abb. 4 Die Entwicklung des mikrovillären Bürstensaums im *C. elegans* Darm auf elektronenmikroskopischer Ebene.**

Aufnahmen des Darmlumens im jeweiligen Stadium. Pfeilspitzen markieren sich ausbildende Mikrovilli in den 1,5- und 2-fachen Streckungsstadien. Ab dem 2,5-fach gestrecktem Stadium bis zur L1-Larve weisen Pfeile auf Leerräume zwischen den Mikrovilli hin. Größenbalken in Embryonalstadien: 200 nm, in Larvenstadien 0,5 µm. entnommen aus (Bidaud-Meynard et al., 2021)

### 1.3.2 Aufbau einer Darmzelle und Bestandteile des Darmepithels

Die Mikrovilli bestehen im Kern aus gebündelten Aktinfilamenten (Abb. 5), die bis zum darunter liegenden Endgeflecht reichen (Bossinger et al., 2004; Leung et al., 1999; Mooseker, 1985). Das Terminalgeflecht enthält den „Endotubulus“, eine Struktur aus Intermediärfilamenten, die unterhalb der apikalen Membran entlang des Lumens verläuft (Bossinger et al., 2004; Munn & Greenwood, 1984). Ohne das Protein IFO-1 (Intestinal Filament Organizer) fehlt diese Struktur und die Anordnung der Intermediärfilamente um das Darmlumen herum (Carberry et al., 2012). Die Anordnung der Mikrovilli bleibt davon unberührt.

Die benachbarten Enterozyten sind interzellulär durch die *C. elegans* apical junction (CeAJ, Abb. 5) verbunden (Bossinger et al., 2001; McMahon et al., 2001; Pásti & Labouesse, 2014). Es besteht aus untereinander angeordneten Komplexen. Der basale Komplex besteht aus den Proteinen DLG-1 und AJM-1 (DAC) (Bossinger et al., 2001; Köppen et al., 2001; McMahon et

al., 2001). Darunter befindet sich das *C. elegans* Scribble Ortholog LET-413 und verhindert die basale Ausbreitung der apikalen Strukturen (Bossinger et al., 2004). Der apikale Komplex der CeAJ besteht aus den Proteinen Cadherin und Catenin (CCC) (Costa et al., 1998). Die zur Cadherin-Familie gehörenden Proteine in *C. elegans* sind in Metazoen konserviert (Hardin et al., 2013). Als Bestandteil des CCC üben sie ihre Funktion bei der Zell-Zell-Adhäsion aus. Aus der Literatur ist bekannt, dass Adhäsionsproteine der Cadherin-Superfamilie in anderen Modellorganismen und auch in Zellkulturen für die gleichmäßige Ausbildung eines mikrovillären Bürstensaums in epithelialen Geweben entscheidend sind (Crawley, Shifrin, et al., 2014; Pelaseyed & Bretscher, 2018; Pinette et al., 2019; Tyska, 2016; Weck et al., 2020). Kürzlich konnte gezeigt werden, dass das Nematoden-spezifische Cadherin CDH-8 an der Teilung der entstehenden Mikrovilli beteiligt ist (Zhu et al., 2022). Über das ebenfalls Nematoden-spezifische Cadherin CDH-5 ist, neben einem möglichen Ortholog Cad99C in der Mikrovillibildung des Follikelepithels, wenig bekannt (Chung & Andrew, 2014; D'Alterio et al., 2005; Pettitt, 2005; Schlichting et al., 2006).

Ein weiterer Hauptbestandteil des Zytoskeletts ist das Mikrotubuli-Netzwerk. In *C. elegans* besteht die Tubulin-Familie aus neun  $\alpha$ -, sechs  $\beta$ - und einem  $\gamma$ -Tubulin (Hurd, 2018). Aufgrund des Auftretens der verschiedenen Tubulin-Isoformen wird vermutet, dass ihnen spezifische Funktionen zugeordnet sind (Fulton et al., 1976).

Im Darm von *C. elegans* sind Mikrotubuli während der Embryonalentwicklung an der Polarisierung und Etablierung der apikalen Membrandomäne beteiligt (Leung et al., 1999). Dabei geht die Funktion des Mikrotubuli-organisierenden Zentrums (MTOC) vom Zentrosom auf nicht-zentrosomale Mikrotubuli-organisierende Zentren (ncMTOC) an der apikalen Membran über (Feldman & Priess, 2012). Von diesen aus verlaufen die Mikrotubuli in paralleler Anordnung entlang der apikal-basalen Polaritätsachse (Abb. 5, (Sallee & Feldman, 2021; Sanchez & Feldman, 2017)). Darüber hinaus können Mikrotubuli in Epithelzellen von adhäsiven Zellverbindungskomplexen ausgehen (Sallee & Feldman, 2021).

Nach Depolymerisation des Mikrotubuli-Netzwerks in Zellkulturlinien und Säugermodellorganismen kommt es zu einer ektopischen Lokalisation von Mikrovilli und apikalen Markerproteinen (Achler et al., 1989; Gilbert et al., 1991; Tonucci et al., 2018).

Die endogene Expression von Tubulin-Isoformen wurde kürzlich gewebespezifisch und entwicklungsstadienabhängig über einen CRISPR/Cas9-Ansatz untersucht, was bisher aufgrund von Konservierung und Ähnlichkeit schwierig war (Nishida et al., 2021). Daraus wurde die Hypothese abgeleitet, dass das Mikrotubuli-Netzwerk hauptsächlich aus den Tubulinen mit der höchsten Expression in allen Geweben (TBA-1, TBA-2, TBB-1 und TBB-2) besteht und durch den Einbau gewebespezifischer Tubuline eine Anpassung an die konkret benötigte Funktion stattfindet (Nishida et al., 2021). Die bisher nachgewiesene Expression von TBA-4, TBA-7 und TBB-6 konnte bis auf TBB-6 mit diesem Ansatz im Darm bestätigt werden (Nishida et al., 2021).

Um die Schwierigkeiten aufgrund der Ähnlichkeit der Tubuline zu umgehen und das gesamte Mikrotubuli-Netzwerk direkt sichtbar zu machen, eignet sich das Protein MAPH-1.1 (Mikrotubule-associated protein 1 homolog 1), das als Vertreter der Mikrotubuli-assoziierten Proteinfamilie MAP1 in dynamischen Mikrotubulianordnungen in somatischen Geweben lokalisiert (Waaijers et al., 2016).

Neben Intermediärfilamenten und Mikrotubuli sind Aktinfilamente ein Hauptbestandteil des Zytoskeletts. Das Genom von *C. elegans* enthält fünf Aktin-Gene (Files et al., 1983; MacQueen et al., 2005), von denen *act-1*, *act-2* und *act-3* während der Embryogenese redundant sind (Velarde et al., 2007). Die ersten vier Aktin-Isoformen spielen eine wichtige Rolle in verschiedenen Geweben, einschließlich Muskelgewebe, Epidermis und somatischen Gonaden (Costa et al., 1997; Kelley & Cram, 2019; Ono, 2022; Pollard, 2016; Priess & Hirsh, 1986; Velarde et al., 2007). Von besonderem Interesse ist die Aktin-Isoform *act-5*, die als einzige im Darm von *C. elegans* exprimiert wird und spezifisch in den Mikrovilli sowie im darunter liegenden End-Filamentgeflecht lokalisiert ist (Abb. 5) (Bidaud-Meynard et al., 2019; MacQueen et al., 2005). Das Fehlen von ACT-5 führt zu einer Verminderung bis hin zum vollständigen Verlust der Mikrovilli sowie zu larvaler Letalität (Gobel et al., 2004; MacQueen et al., 2005). Eine Mikrovilli-spezifische Funktion von ACT-5 kann aus Rettungsexperimenten abgeleitet werden, in denen die Expression anderer *C. elegans*-Aktine nicht ausreichte, um diesen Phänotyp zu retten (MacQueen et al., 2005). Obwohl *act-5* und *act-3* in unterschiedlichen Geweben exprimiert werden, konnte in einer lebensfähigen *act-5* Mutante

gezeigt werden, dass der *act-3* Promoter als transkriptionelle Anpassung im Darm diesen Mangel kompensieren kann (Seroby et al., 2020).

Die Hauptfunktion des Darms von *C. elegans* ist die Aufnahme von Nährstoffen aus der verdauten Nahrung im Darmlumen in die Enterozyten. Dazu lokalisiert sich der Oligopeptidtransporter PEPT-1 (früher OPT-2/PEP-2) als einzige der drei Isoformen der H<sup>+</sup>-gekoppelten Peptidtransporterfamilie SLC15 (solute carrier family 15 member 1) in *C. elegans* (PEPT-1–3) spezifisch in der apikalen Membran der Enterozyten (Fei et al., 1998, 2000) (Abb. 5). Der Verlust dieser Resorptionskapazität durch Deletion von PEPT-1 in einer Mutante oder durch RNAi führt zu Entwicklungs- und Reproduktionsstörungen. Dieser Phänotyp zeigt, dass die PEPT-1-vermittelte Aufnahme von Di- und Tripeptiden eine Schlüsselrolle in der Proteinversorgung von *C. elegans* während der Entwicklung und Reproduktion spielt (Meissner et al., 2004; Nehrke, 2003).

Die Aufteilung der Enterozyten in eine apikale und eine basolaterale Membrandomäne wird durch einen regulierten intrazellulären Transport erreicht, der aus mehreren Komponenten besteht. Diese Sortierungs- und Transportprozesse sind auch für die Bildung des Bürstensaums an der apikalen Membrandomäne notwendig, sodass eine Störung dieser Prozesse zu pathologischen Veränderungen im mikrovillären Bürstensaum der Enterozyten führen kann (Engevik & Goldenring, 2018; K. Sato et al., 2014).

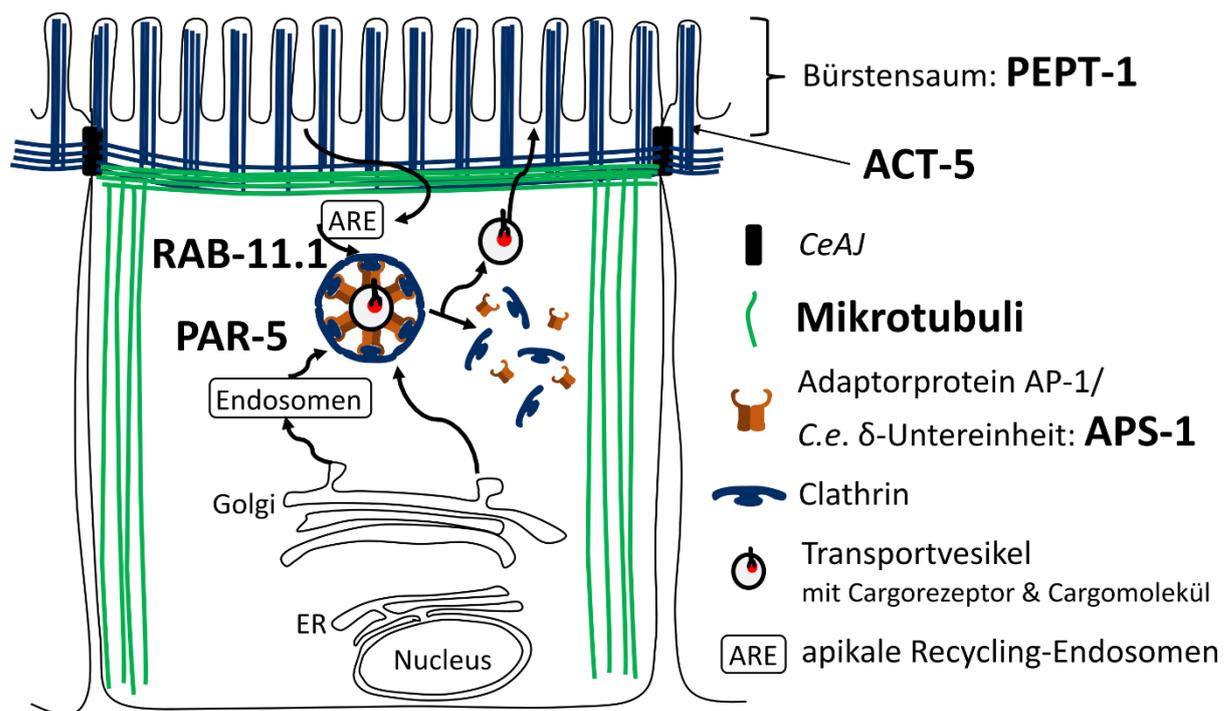
Der AP-1 Komplex ist an der Bildung intrazellulärer Vesikel und der Lokalisierung apikaler Proteine im Darm von *C. elegans* beteiligt (Duncan, 2022; Nakatsu et al., 2014). Als Heterotetramer besteht AP-1 aus vier Untereinheiten, die von fünf Genen im *C. elegans* Genom kodiert werden (Duncan, 2022; Nakatsu et al., 2014). Insbesondere für die Sigma-Untereinheit APS-1 (Abb. 5) ist bekannt, dass ihr Verlust zur Bildung von ektopischen Lumen und Mikrovilli führt, wie sie bei der Microvilli inclusion disease (MVID) auftreten (Shafaq-Zadah et al., 2012; H. Zhang et al., 2012, 2013).

Nahe bei APS-1 und ebenfalls mit diesem Protein ko-lokalisiert ist die RAB-GTPase RAB-11. Beide Proteine sind für die korrekte Lokalisation des jeweils anderen notwendig (Gillard et al., 2015; H. Zhang et al., 2012). RAB-11 gehört zur Familie der Rab-Proteine, die die Bewegung und Bindung von Vesikeln beim intrazellulären Transport regulieren (Hervé &

Bourmeyster, 2018). Da es im Genom von *C. elegans* zwei Rab11-Homologe gibt, wird *rab-11.1* (Abb. 5) aufgrund des höheren Expressionsniveaus und einer 85,2%igen Sequenzidentität zu *rab-11.2* für Untersuchungen bevorzugt (Los et al., 2011). Die Funktion von RAB11 ist in Zellkultur- und Säugermodellorganismen für die korrekte Anordnung des mikrovillären Bürstensaums notwendig (Engevik & Goldenring, 2018). Ein Verlust dieser Funktion führt bei Mäusen zum Phänotyp der MVID (Babcock et al., 2022).

Im Darm von *C. elegans* beeinflusst RAB-11.1 die Lokalisation des apikalen Peptidtransporters PEPT-1 und wird seinerseits durch das Herunterregulieren eines  $\alpha$ -Tubulins beeinflusst (Shafaq-Zadah et al., 2012; Winter et al., 2012).

Eine clusterartige Anordnung von RAB-11-positiven apikalen Recycling-Endosomen an der basolateralen Membran, an der auch F-Aktin und apikale Zytoskelett-bindende Proteine nachgewiesen wurden, tritt bei einem Funktionsverlust von PAR-5 auf (Winter et al., 2012). PAR-5 (Abb. 5) ist ein Mitglied der PAR-Familie von *C. elegans* (PARTitioning defective, (Kemphues et al., 1988)). Das Äquivalent von PAR-5 bei Säugetieren ist das Protein 14-3-3 $\zeta$ , das zur Familie der 14-3-3 Proteine gehört, die als Regulatoren im Zytoplasma der Zelle vorkommen (Mackintosh, 2004; Morton et al., 2002; Wang & Shakes, 1996). Die zytosolischen 14-3-3 Proteine haben eine regulatorische Funktion und interagieren mit Bindungspartnern über phosphorylierte Bindungsmotive (Mugabo & Lim, 2018; Wang & Shakes, 1996). Sie beeinflussen auch das Aktinnetzwerk und den vesikulären Transport (Roth et al., 1999; Roth & Burgoyne, 1995). Im Darm von *C. elegans* beeinflusst PAR-5 die Aufrechterhaltung der Polarität und die daran beteiligten Endosomen (K. Sato et al., 2014; Winter et al., 2012). Ein Mangel an PAR-5 führt zu Sterilität oder geringer Fruchtbarkeit, gefolgt von embryonaler Letalität (Morton et al., 2002).



**Abb. 5 Zelluläre Organisation einer *C. elegans* Enterozyte.**

Darstellung des Aufbaus der apikalen Membrandomäne sowie der für diese Arbeit wichtigen Komponenten der Enterozyten, auf die im Text eingegangen wird. Anordnung der Mikrotubuli nach (Coch & Leube, 2016; Sallee & Feldman, 2021).

### 1.3.3 Spermathek und H-Zelle: weitere röhrenförmige Epithelgewebe in *C. elegans*

In *C. elegans* gibt es noch weitere röhrenförmige Epithelgewebe, die ähnliche Strukturen wie der Darm aufweisen oder deren Zustand durch eine Messung leicht erfasst werden kann. Die Spermathek besteht aus 30 Zellen und wird im L3-Stadium gebildet. Es folgt im L4-Stadium die Bildung und Lagerung der Spermien. Nach erfolgter Maturation der Oozyten vor Eintritt in die Spermathek werden diese schließlich während der Passage befruchtet (Altun & Hall, 2009; Kimble & Hirsh, 1979). LET-413 spielt eine Rolle bei der Aufrechterhaltung der Polarität im Darm und ist auch für die postembryonale Entwicklung der Spermathek relevant (Bossinger et al., 2004; Pilipiuk et al., 2009). Die fehlerhafte Ausbildung der Spermathek durch einen Mangel an LET-413 führt zu einem fehlerhaften Ovulationsprozess. Dies wiederum führt zur Sterilität der betroffenen Hermaphroditen (Pilipiuk et al., 2009). Ein solcher Phänotyp lässt sich anhand fehlender Nachkommen direkt und einfach nachweisen und erlaubt Rückschlüsse auf den Zustand der Spermathek.

Die H-Zelle bildet zusammen mit einer Porenzelle und einer Duktuszelle das exkretorische System, das die Osmolarität in *C. elegans* reguliert (Buechner et al., 2020). Die Duktuszelle ist das Bindeglied zwischen der Porenzelle an der Oberfläche und der H-Zelle im Körperinneren.

Die H-Zelle ist eine mononukleäre Zelle, die sich in Form eines viergängigen Kanals von der Duktuszelle unterhalb des hinteren Endes des Pharynx sowohl anterior als auch posterior entlang der Körperlänge erstreckt. Überschüssige Flüssigkeit wird durch sie zur Duktuszelle und von dort durch die Porenzelle nach außen geleitet (Buechner et al., 2020). Der Durchmesser des Lumens der H-Zelle wird durch die Dicke des End-Filamentgeflechts bestimmt, das dem osmotischen Druck entgegenwirkt (Buechner et al., 2020). Ähnlich wie im Darm besteht dieses End-Filamentgeflecht aus Intermediär- und Aktinfilamenten (Buechner, 2002; Sundaram & Buechner, 2016). Hier ist auch ACT-5 lokalisiert (MacQueen et al., 2005), das zusammen mit den Mikrotubuli in der H-Zelle eine Rolle für deren ausreichendes Wachstum spielt (Buechner et al., 2020; Khan et al., 2019). Nach der Anlage der H-Zelle in der späten Embryogenese kommt es zu einem raschen Wachstum, bis die Kanäle der H-Zelle am Ende des L1-Stadiums ihre Endpositionen an den jeweiligen Enden des Wurms erreicht haben (Buechner, 2002; Buechner et al., 2020). Es liegt daher nahe, dass in einer *act-5* Deletionsmutante die Funktionsbeeinträchtigung von ACT-5 an dieser Stelle zu einer frühen larvalen Letalität beitragen könnte (MacQueen et al., 2005).

Direkte Beeinträchtigungen der Intermediärfilamente in der H-Zelle oder auch indirekte Effekte auf diese und die Aktinfilamente, z. B. über das ebenfalls im Darm vorkommende Ankerprotein ERM-1, führen zur Bildung von flüssigkeitsgefüllten Vakuolen (Buechner et al., 1999, 2020; Khan et al., 2019; Ramalho et al., 2020). In diesem Zusammenhang war an den erweiterten Stellen des Lumens der H-Zelle weniger ACT-5 an der apikalen Membran vorhanden (Ramalho et al., 2020).

#### **1.4 Die Methode der RNA-vermittelten Interferenz (RNAi) durch Fütterung und darmspezifische RNAi**

Bei der RNA-vermittelten Interferenz durch Fütterung wird ausgenutzt, dass die Aufnahme von dsRNA-produzierenden Bakterien mit der Nahrung zu einer Herunterregulierung des Gens auf mRNA-Ebene führt (Fire et al., 1998; Timmons & Fire, 1998). Für die Anwendung bedeutet dies, dass sich in einem Vektor, der in die als Nahrungsquelle verwendeten Bakterien eingebracht wird, eine codierende Sequenz des zu herunterregulierenden Gens, flankiert von zwei T7-Promotoren, befindet. Die Expression der T7-RNA-Polymerase und damit die bidirektionale Transkription der eingefügten Gensequenz wird durch ein modifiziertes Lactose-Operon unter Verwendung von IPTG als Induktor gesteuert. Der Abbau

der exprimierten dsRNA wird durch die Verwendung eines RNaseIII-defizienten *E. coli*-Stammes verhindert. Dadurch wird die exprimierte dsRNA gleichzeitig mit den Bakterien bei der Nahrungsaufnahme in *C. elegans* aufgenommen und anschließend intrazellulär prozessiert. Diese Prozessierung beruht auf der Spaltung der von den Darmzellen aufgenommenen doppelsträngigen RNA (dsRNA) in siRNA (small interfering RNA), die dann im RISC, dem RNA-induced silencing complex, als Vorlage für die komplementäre zelleigene mRNA dient, die schließlich degradiert wird (Tabara et al., 2002). Das Argonautenprotein RDE-1 wird in allen Geweben für den Ablauf der exogenen RNAi benötigt (Sijen et al., 2001; Tabara et al., 1999). Im RISC bindet die einzelsträngige siRNA an RDE-1 und führt diesen Komplex zur Ziel-mRNA (Braukmann et al., 2017). Welche weiteren Proteine in welcher Weise beteiligt sind, wird in einigen Übersichtsarbeiten erläutert, die auch neuere Entwicklungen zusammenfassen (Braukmann et al., 2017; Grishok, 2005, 2013). Die Nachkommen können durch den Transport von dsRNA in die Oozyten beeinflusst werden (Marré et al., 2016). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass dsRNA-induzierte RNAi und ein antiviraler Signalweg in *C. elegans* auf demselben Mechanismus beruhen (Dai & Gu, 2020). Bei RNAi durch Fütterung wird der Phänotyp nach Ablauf der Verweildauer evaluiert (Ahringer, 2006).

Der *C. elegans* OLB11 Stamm ermöglicht gewebespezifische RNAi im Darm (McGhee et al., 2009; Pilipiuk et al., 2009). Die RNAi-Sensitivität wird durch die Expression des wildtypischen *rde-1* Gens unter der Kontrolle des darmspezifischen *elt-2* Promotors (Fukushige et al., 1998, 1999; Hawkins & McGhee, 1995; McGhee et al., 2009) in der RNAi-insensitiven *rde-1(ne219)* Mutante (Tabara et al., 1999) erreicht. Die Expression von ELT-2 beginnt bereits im 2E-Stadium (Fukushige et al., 1998; Hawkins & McGhee, 1995).



**Abb. 6 Schematische Darstellung des OLB11-Genotyps.**

Die dunkelgraue Region stellt den RNAi-sensitiven Darm in der embryonalen Entwicklung dar. In den restlichen, hellgrau dargestellten Geweben liegt der RNAi-resistente, mutante Hintergrund vor. Abb. entnommen aus (Bossinger & Cowan, 2012).

## 1.5 Ziel

Das Fehlen von Stammzellen im Darm von *C. elegans* und die damit verbundene fehlende Fähigkeit zur Selbsterneuerung der Enterozyten führt dazu, dass diese bei einer Schädigung des Darmepithels nicht ersetzt werden können. Daraus ergibt sich die Frage, ob die Enterozyten in der Lage sind, durch RNAi induzierte Defekte im mikrovillären Bürstensaum zu kompensieren. Zu diesem Zweck sollen mit Hilfe von darmspezifischer RNAi durch Fütterung vorübergehend Defekte in den Mikrovilli induziert und deren Auswirkungen auf die Entwicklung und Reproduktion untersucht werden. Da das Aktin ACT-5 ein Hauptbestandteil der Mikrovilli ist, ist dieses Protein ein geeigneter Kandidat, um durch dessen Herunterregulierung zu einer Beeinträchtigung des mikrovillären Bürstensaums zu führen. Es wird auch untersucht, wie weit die Puls-RNAi verkürzt werden kann, um noch Effekte zu zeigen. Die Eignung bestimmter apikaler Proteine als Mikrovilli-Marker wird ebenfalls untersucht.

Darmspezifisch wird die Rolle von Proteinen untersucht, die an zellulären Prozessen in den Enterozyten beteiligt sind und von denen aus der Literatur eine Assoziation mit dem mikrovillären Bürstensaum bekannt ist. Weiterhin soll darmspezifisch und mit Hilfe eines geeigneten transgenen Stamms untersucht werden, welche einzelnen Tubulin-Isoformen im Mikrotubuli-Netzwerk des Darms eine Rolle spielen könnten.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Molekularbiologische Methoden

#### 2.1.1 Bakterienstämme und Vektoren

Der *E. coli*-Stamm XL1-Blue wurde, zusammen mit dem Vektor pPD129.36, zum Klonieren von cDNA-Fragmenten verwendet, die anschließend in die RNAi-Bakterien HT115 (DE3) transformiert und als RNAi-Konstrukte verwendet wurden (siehe 2.1.8, 2.3).

Tab. 1 Klonierungsbakterien und Vektor für RNAi-Konstrukte

		Merkmale	Bezugsquelle
<b><i>E. coli</i>-Stamm</b>	XL1-Blue	endA1 gyrA96(nal <sup>R</sup> ) thi-1 recA1 relA1 lac glnV44 F'[:Tn10 proAB <sup>+</sup> lacI <sup>q</sup> Δ(lacZ)M15] hsdR17(r <sub>K</sub> <sup>-</sup> m <sub>K</sub> <sup>+</sup> )	Stratagene, Santa Clara, USA
<b>Vektor</b>	pPD129.36/L4440	Amp <sup>R</sup> , T7p, T7p, lacZ <sup>N</sup> , OriF1>>, OriF1<<, Größe: 2790 bp	Fire Lab <i>C. elegans</i> Vector Kit 1999, Addgene # 1654

#### 2.1.2 Nährmedien

Das LB-Medium und der LB-Agar zur Bakterienkultivierung wurden mit demineralisiertem Wasser (dH<sub>2</sub>O) angesetzt und bei 121 °C autoklaviert und anschließend bei RT gelagert. Die zur Resistenzselektion eingesetzten Antibiotika wurden mit autoklaviertem dH<sub>2</sub>O angesetzt, steril filtriert und in einer Verdünnung von 1:1.000 eingesetzt. Gebrauchsfertige LB-Agar-Platten wurden bei 4 °C gelagert.

LB-Medium: 10 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 10 g NaCl auf 1 l dH<sub>2</sub>O

LB-Agar: 15 g Agar auf 1 l LB-Medium

Carbenicillin: 100 mg/ml Stammlösung

Tetracyclin: 12,5 mg/ml Stammlösung

### 2.1.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) wird zur Amplifikation von DNA-Fragmenten von einem DNA-Template verwendet. Dazu wurden spezifische Oligonukleotide designt, die an komplementäre Sequenzen auf den gegenüberliegenden Strängen des DNA-Template binden, sodass dadurch die zu amplifizierende Zielsequenz flankiert ist. Als DNA-Polymerase wurde die KAPA2G Fast DNA-Polymerase verwendet, die gentechnisch so entwickelt wurde, dass eine höhere Prozessivität und eine schnellere Elongation als mit der thermostabilen Taq-Polymerase aus *Thermus aquaticus* (Clark, 1988) gegeben ist.

Der Standard-PCR-Ansatz wurde in einem Endvolumen von 25 µl angesetzt, bestehend aus:

2xKAPA2G Fast ReadyMix	12,5 µl
DNA-Template	0,1-1 ng
10 µM genspezifisches Vorwärts-Oligonukleotid	1,25 µl
10 µM genspezifisches Rückwärts-Oligonukleotid	1,25 µl
	ad 25 µl dH <sub>2</sub> O

Die Tab. 2 listet die einzelnen Schritte und die Parameter des verwendeten PCR-Programms auf. Die Hybridisierungstemperatur wurde abhängig von der Schmelztemperatur der jeweiligen Vorwärts- und Rückwärts-Oligonukleotide gewählt.

Tab. 2 PCR-Programm

Schritt	Temperatur	Dauer	Zyklusanzahl
<b>Initiale Denaturierung</b>	95 °C	3 min	1
<b>Denaturierung</b>	95 °C	10-15 s	25-40
<b>Hybridisierung</b>	50-60 °C	10-15 s	
<b>Elongation</b>	72 °C	1-15 s/kb	
<b>Finale Extension</b>	72 °C	1 min/kb	1

### 2.1.4 Oligonukleotide

Die genspezifischen Oligonukleotide für die PCR-Reaktion wurden mit dem Programm Geneious (Tab. 9) entworfen und von der Metabion International AG (Planegg) in getrocknetem Zustand bezogen. Die Oligonukleotide wurden in autoklaviertem dH<sub>2</sub>O zu einer 100 µM Stammlösung gelöst. Diese wurde auf eine Konzentration von 10 µM verdünnt, die für die weitere Anwendung eingesetzt wurde. Zur Sequenzierung des im Vektor jeweilig integrierten Gen-Abschnitts wurden Oligonukleotide, die spezifisch für den Vektor ppD129.36 sind, verwendet.

Tab. 3 Bezeichnung und Sequenz der Oligonukleotide

Bezeichnung	Orientierung	Sequenz (5' → 3')
<b>pPD129.36 for</b>	vorwärts	GATAACCGTATTACCGCCTTTG
<b>pPD129.36 rev</b>	rückwärts	CGATTAAGTTGGGTAACGCCA
<b><i>ben-1 (tbb-5) for</i></b>	vorwärts	AACTTGCAGTCAACATGG
<b><i>ben-1 (tbb-5) rev</i></b>	rückwärts	AACTCCTGAATAGCTGTCGAG
<b><i>tba-6 for</i></b>	vorwärts	AAGCAGGAGTTCAGATTGG
<b><i>tba-6 rev</i></b>	rückwärts	AATCCTTGAAGTCCATTGC
<b><i>tba-7 for</i></b>	vorwärts	TAGTCTCCTCCATCACGGC
<b><i>tba-7 rev</i></b>	rückwärts	ACTTATAGTCCAATCTCTGCC
<b><i>mec-7 for</i></b>	vorwärts	TGTCCTTGTTGACTTGGAGC
<b><i>mec-7 rev</i></b>	rückwärts	TCTCGACAAGCTGGTGGAC
<b><i>noca-1 for</i></b>	vorwärts	AGACGAATCTCTAAATCAG
<b><i>noca-1 rev</i></b>	rückwärts	TTCACGGAGAACAAGGAG

### 2.1.5 Agarosegelelektrophorese

Um die DNA-Fragmente der PCR-Produkte nach der Größe aufzutrennen, wurde eine Gelelektrophorese mit 1 %igen Agarosegelen (Biozym LE Agarose, Biozym Scientific GmbH) in 1x TAE-Laufpuffer durchgeführt. Um die DNA-Banden unter UV-Licht detektieren zu können, wurde die Agarose-Lösung mit 4 µl/100 ml Agarose-Lösung des Fluoreszenzfarbstoffs HDGreen™ Plus DNA-Dye (INTAS Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen) versetzt.

Den DNA-Proben wurde vor dem Auftragen 6x DNA-Auftragsfarbstoff hinzugefügt (6x DNA Loading Dye, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Zur Bestimmung der Größe der DNA-Banden wurde neben den Proben ein Größenstandard (GeneRuler™ 1 kB DNA-Leiter, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) im Agarosegel aufgetragen. Die Gelelektrophorese wurde bei einer Spannung von 100 V durchgeführt. Die Visualisierung der DNA-Fragmente im Agarosegel erfolgte mittels eines UV-Transilluminators (Tab. 8).

50x TAE Puffer: 242,28 g Tris Base, 100 ml 0,5 M EDTA pH 8, ad 1 l dH<sub>2</sub>O

### **2.1.6 Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen**

Um das PCR-Produkt aus dem Agarosegelausschnitt der DNA-Banden zu gewinnen, wurden das NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Kit (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren) und das Monarch® DNA Gel Extraction Kit (New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main) verwendet.

### **2.1.7 Ligation**

Der Vektor pPD129.36 wurde mit dem Restriktionsenzym EcoRV geschnitten. An die Schnittstellen wurden 3'-terminale Thymin-Überhänge angefügt. Dadurch kann das PCR-Produkt, an dessen 3'-Enden sich durch die Taq-Polymerase Adenin-Überhänge befinden (Clark, 1988), mit dem Vektor ligiert werden. Die T4 DNA-Ligase katalysiert dabei die Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen den Doppelstrang-Fragmenten.

#### Ligationsansatz:

35 ng Plasmid (pPD129.36)

1 µl 10x Ligase-Puffer

10 ng DNA (PCR-Produkt)

0,5 µl T4 Ligase (5 U/µl, Fermentas)

ad 10 µl dH<sub>2</sub>O

ÜN bei 15 °C

### 2.1.8 Transformation

Die *E. coli* Bakterienstämme XL1-Blue und HT115 (DE3) wurden in 100 µl Aliquots bei -80 °C aufbewahrt. Zur Transformation wurden diese auf Eis aufgetaut und mit 10 µl des Ligationsansatzes (2.1.7) versetzt. Nach 20 Minuten Inkubation auf Eis wurde ein Hitzeschock bei 42 °C und 800 rpm im Heizschüttler (Tab. 8) durchgeführt. Nach der Zugabe von 900 µl LB-Medium erfolgte eine weitere Inkubation im Heizschüttler bei 37 °C und 800 rpm für 1 h. Zur Resistenzselektion wurden die Bakterien auf LB<sub>Carb, Tet</sub>-Agarplatten ausplattiert.

### 2.1.9 Isolierung von Plasmid-DNA

Die Isolierung von Plasmid-DNA wurde nach dem nachfolgend beschriebenen Protokoll durchgeführt. Dabei handelt es sich um die alkalische Lyse der Bakterienzellen und der anschließenden Bindung der Plasmid-DNA an eine Kieselgel-Matrix. Dazu wurden für eine ÜN-Kultur 3 ml LB-Medium mit einer Einzelkolonie angeimpft und anschließend ÜN bei 37 °C und 180 rpm inkubiert. Die Zellen wurden pelletiert und anschließend in 200 µl Merlin I resuspendiert. Nach der Zugabe von 200 µl Merlin II wurde das Reaktionsgefäß zehnmal invertiert. Danach wurden 200 µl Merlin III hinzugegeben und das Reaktionsgefäß fünfmal invertiert. Der Ansatz wurde 5 Minuten bei RT inkubiert. Die Zelltrümmer, genomische DNA und RNA wurden durch Zentrifugation (10 Minuten bei 20.000xg) pelletiert. Der Überstand im Reaktionsgefäß wurde mit 1 ml Merlin IV in einem neuen Reaktionsgefäß für 5 Minuten auf einem Rotator inkubiert. Die an das Kieselgel gebundene Plasmid-DNA wurde über eine Säule mit 2x 1 ml Potassium Wash mittels einer Vakuumpumpe gewaschen. Die Säule wurde getrocknet, bevor die Plasmid-DNA in 50 µl 10 mM Tris, pH 8,5 (vorgewärmt auf 70 °C), eluiert wurde.

Merlin I:                    50 mM TrisCl (pH 7,6)  
                                  10 mM EDTA  
                                  100 µg/ml RNase A  
                                  ad 100 ml dH<sub>2</sub>O

Merlin II:                    0,2 M NaOH  
                                  1 % SDS  
                                  ad 100 ml dH<sub>2</sub>O

<u>Merlin III:</u>	61,35 g Kaliumacetat 35,7 ml Eisessig ad 500 ml dH <sub>2</sub> O
<u>Merlin IV:</u>	66,84 g Guanidiniumhydrochlorid 33,33 ml Merlin III pH 5,5 mit 10 M NaOH einstellen ad 100 ml dH <sub>2</sub> O 1,5 g Kieselgel 60
<u>Potassium Wash:</u>	80 mM Kaliumacetat 8,3 mM Tris (pH 7,5) 40 µM EDTA 55 % EtOH (100 %) ad 100 ml dH <sub>2</sub> O

Alternativ wurde das GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) verwendet.

#### **2.1.10 Photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA**

Die Reinheit sowie die Konzentration der Plasmid-DNA wurde mit einem Nanophotometer (Tab. 8) quantifiziert. Dabei wurde der Elutionspuffer 10 mM Tris, pH 8,5 als Referenz verwendet. Die Konzentration der Plasmid-DNA wurde bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Des Weiteren wurden die Quotienten A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> sowie A<sub>260</sub>/A<sub>230</sub> berechnet, um die Reinheit der Probe zu bestimmen. Dabei weisen Werte abweichend der nachstehend angegebenen Referenzwerte auf eine Kontamination der Probe mit Proteinen bzw. organischen Substanzen hin.

$$A_{260}/A_{280} = 1,8-2,0$$

$$A_{260}/A_{230} \geq 2,0$$

### 2.1.11 Sequenzierung

Die Sequenz der isolierten Plasmid-DNA wurde mittels Sanger-Sequenzierung von Eurofins GATC (Sequencing Department, Köln) bestimmt. Dazu wurden jeweils 5 µl Plasmid-DNA (80-100 ng/µl) und 5 µl Oligonukleotid (5 pmol/µl; spezifisch für den Vektor pPD129.36 (Tab. 3)) in ein Reaktionsgefäß gegeben und eingeschickt. Die erhaltenen Sequenzdaten wurden mit der Software Geneious (Tab. 9) analysiert und über das Wormbase BLAST Programm ([https://wormbase.org/tools/blast\\_blat](https://wormbase.org/tools/blast_blat)) mit dem *C. elegans* Genom (*C. elegans* Sequencing Consortium genome project, PRJNA13758) verglichen.

## 2.2 *C. elegans*-Methoden

### 2.2.1 Kultivierung von *C. elegans*

Die nachfolgend genannten *C. elegans* Stämme (Tab. 4) wurden unter Standardbedingungen (Brenner, 1974) bei 15 °C auf Minimalmedium-Agarplatten (2.2.2, (Lahl et al., 2003)) kultiviert, auf denen der Uracil-auxotrophe *E. coli*-Stamm OP50 (CGC Minnesota, MN, USA) als Nahrungsquelle verwendet wurde. Die OP50-Bakterien wurden auf LB Agar-Platten bei 4 °C gehalten und in LB-Medium kultiviert (2.1.2).

Tab. 4 Verwendete *C. elegans*-Stämme

Bezeichnung	Genotyp	Bezugsquelle
<b>BOX188</b>	<i>maph-1.1(mib12[GFP::<i>maph-1.1</i>]) I</i>	Mike Boxem (Waaaijers et al., 2016)
<b>N2</b>	Wildtyp, Varietät Bristol	Caenorhabditis Genetics Center
<b>JM125</b>	<i>Kcls38[p<sub>ges-1</sub>::<i>act-5</i>::<i>yfp</i>]</i>	James D. McGhee, Calgary University
<b>CE81</b>	<i>pept-1::DsRed</i> (früher <i>opt-2</i> )	Exelixis Inc., South San Francisco CA, USA
<b>OLB11</b>	<i>rde-1(ne219); dusls[elt-2::<i>rde-1+rol-6</i>]</i>	AG Bossinger (McGhee et al., 2009; Pilipiuk et al., 2009)

### 2.2.2 Agarplatten zur Haltung von *C. elegans*

#### NGM Agarplatten:

12 g NaCl

10 g Bacto Pepton

70 g Bacto Agar

ad 4 l mit dH<sub>2</sub>O, anschließend autoklavieren

bei 60 °C Zugabe von:

100 ml 1 M Kaliumphosphatpuffer pH6

4 ml 1 M CaCl<sub>2</sub>

4 ml 1 M MgSO<sub>4</sub>

4 ml Cholesterol (0,4 g Cholesterin + 80 ml 95 % EtOH)

8 ml Nystatin (10.000 U/ml)

#### Salzfreie Agarplatten (Minimalmedium, (Lahl et al., 2003):

80 g Agar

ad 4 l mit dH<sub>2</sub>O, anschließend autoklavieren

bei 60 °C Zugabe von

4 ml Cholesterol (0,4 g Cholesterin + 80 ml 95 % EtOH)

### 2.3 RNA-vermittelte Interferenz (RNAi) durch Fütterung

Für die RNAi-Experimente dieser Arbeit wurde die Fütterungsmethode mit dem *E. coli*-Stamm HT115(DE3) verwendet. Bei dieser Methode führt die Aufnahme von dsRNA-produzierenden Bakterien über die Nahrung zu einer Herunterregulierung des Gens auf mRNA-Ebene (1.4) (Fire et al., 1998; Timmons & Fire, 1998). Es wurden Fütterungsbakterien mit der Zielsequenz des entsprechenden Gens aus der RNAi-Fütterbibliothek, die von Source BioScience vertrieben wird, verwendet (Fraser et al., 2000; Kamath et al., 2003; Kamath & Ahringer, 2003). Falls keine Fütterbakterien mit dem gewünschten Insert im Vektor in dieser RNAi-Fütterbibliothek vorhanden waren, wurden diese durch die Klonierung von cDNA-Fragmenten in den pPD129.36 Vektor und die Transformation in *E. coli* HT115 (DE3) selbst hergestellt (Tab. 3).

Tab. 5 Genotyp des für RNAi durch Fütterung verwendeten Bakterienstamms HT115 (DE3)

<i>E. coli</i> -Stamm	Genotyp	Bezugsquelle
HT115 (DE3)	F-, mcrA, mcrB, IN(rrnD-rrnE)1, rnc14::Tn10 (IPTG-induzierbare T7 Polymerase) (RNase III minus)	CGC Minneapolis, MN, USA

### 2.3.1 Herstellung der RNAi-Agarplatten

Für die RNAi-Experimente wurden NGM-Agarplatten (2.2.2) verwendet, denen Antibiotika zur Resistenzselektion der Bakterien sowie IPTG zur Induktion der T7-RNA-Polymerase zugesetzt wurden. Die Platten wurden bei RT getrocknet und anschließend bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C maximal zwei Wochen aufbewahrt.

Carbenicillin: Verdünnung 1:1.000 einer 100 mg/ml Stammlösung

Tetracyclin: Verdünnung 1:1.000 einer 12,5 mg/ml Stammlösung (in EtOH)

Kanamycin: Verdünnung 1:1.000 einer 50 mg/ml Stammlösung

IPTG: Verdünnung 1:500 einer 1 M Stammlösung

### 2.3.2 Herstellung der *E. coli*-ÜN-Kultur

Es wurden jeweils 5 ml LB<sub>Carb, Tet</sub>-Medium mit einer Einzelkolonie der mit dem jeweiligen Insert des gewünschten Zielgens transformierten *E. coli* HT115 (DE3) inokuliert. Anschließend wurde die Kultur über Nacht im Schüttler bei 37 °C und 180 rpm kultiviert.

### 2.3.3 Animpfen der RNAi-Agarplatten mit der ÜN-Kultur

Die Konzentration der *E. coli*-ÜN-Kultur wurde bei OD<sub>600</sub> bestimmt. Anschließend wurde die Bakterienkultur im benötigten Endvolumen auf eine OD<sub>600</sub> von 1 verdünnt. Um nachfolgend die Expression der dsRNA zu induzieren, wurden pro 1 ml Endvolumen 7 µl 1 M IPTG hinzugegeben. Für vier Stunden erfolgte eine weitere Inkubation bei 37 °C und 180 rpm. Die RNAi-Agarplatten (2.3.1) wurden mit jeweils 500 µl beimpft und zwei Tage lang bei RT getrocknet. Danach wurden die Platten bei 4 °C bis zur experimentellen Verwendung maximal zwei Wochen lang gelagert.

### 2.3.4 Ansetzen der RNAi-Experimente

Die beimpften RNAi-Agarplatten wurden vor der ersten Verwendung für 1 h bei 37 °C inkubiert, um die dsRNA-Produktion in den HT115 (DE3)-Bakterien anzuregen. Die RNAi-Experimente wurden mit Larven in L1- oder im L4-Stadium gestartet und anschließend bei 15 °C gelagert. Als Negativkontrolle wurde das RNAi-Konstrukt VC (Vektorkontrolle) verwendet, in dem keine spezifische Gensequenz in den Vektor pPD129.36 kloniert wurde, sodass dieser als Leervektor in den HT115 (DE3)-Bakterien vorliegt. Als Positivkontrollen wurden RNAi-Konstrukte verwendet, deren Phänotyp bereits bekannt ist, z. B. *mex-3(RNAi)* oder *let-413(RNAi)*, die einen sterilen Phänotyp zeigen. Die Würmer wurden alle drei Tage auf neue RNAi-Platten gesetzt, damit eine kontinuierliche Aufnahme der dsRNA-produzierenden Bakterien gewährleistet ist. Die Larven wurden mit Hilfe einer ausgezogenen Pasteurpipette übertragen. Um eine eindeutige Auszählung der Nachkommenzahl zu ermöglichen, wurden die Adulten, nachdem die Ablage der Embryonen begonnen hatte, alle 24 h auf neue Platten gesetzt. Die Auszählung der Nachkommen erfolgte insgesamt für eine Dauer von vier Tagen, da nach diesem Zeitraum die Nachkommenproduktion beendet war. Nachdem die Adulten von einer Platte entfernt worden waren, wurde nach 24 h überprüft, ob auf dieser Platte abgelegte Embryonen letal waren. Um anschließend an die Entwicklung der P0-Generation auch die der F1-Generation zu verfolgen, wurden F1 L1-Larven ebenfalls auf RNAi-Platten weitergesetzt, um die kontinuierliche Aufnahme der dsRNA-produzierenden Bakterien aufrechtzuerhalten. Das Ansetzen der RNAi-Pulsexperimente wird in 3.1 erläutert.

## 2.4 Mikroskopie

Die verwendeten Mikroskope und die Bestandteile sind in Tab. 6 aufgelistet. Es wurden Lebendbeobachtung von *C. elegans* auf Agarplatten mit dem Binokular Stemi 2000 und Stemi 508 durchgeführt. Das Darmepithel und ggf. das Fluoreszenzmuster wurden mit dem Axio Imager Z1 oder dem LSM880 dokumentiert.

Tab. 6 Mikroskope mit Kamera und Objektiven

Mikroskop	Bestandteile	Hersteller
Binokular	Stemi 2000, Lampe KL200	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena
	Stemi 508	

Mikroskop	Bestandteile	Hersteller
<b>Fluoreszenzmikroskop Axio Imager Z1</b>	AxioCam MRm	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena
	FLUAR 2,5x/0,12	
	EC-Plan-NEOFLUAR 10x/0,3	
	LC1 Plan-APOCHROMAT 25x/0,8	
	Plan-APOCHROMAT 63x/1,4 Oil DIC	
	Plan-APOCHROMAT 40x/0,75 Oil DIC	
	Plan-APOCHROMAT 100x/1,4 Oil DIC	
<b>Laser-Scanning-Mikroskop LSM880</b>	LSM T-PMT	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena
	EC-Plan-NEOFLUAR 10x/0,3	
	LC1 Plan-APOCHROMAT 25x/0,8	
	Plan-APOCHROMAT 63x/1,4 Oil DIC	

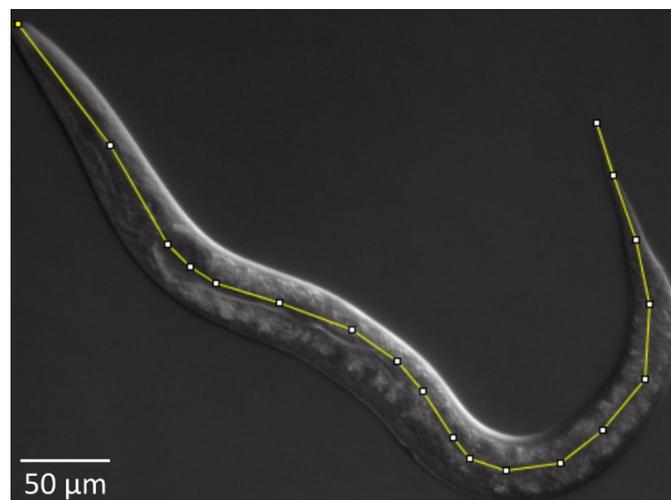
#### 2.4.1 Herstellung der Agarose-beschichteten Objektträger

Für Lebendbeobachtungen von *C. elegans* Embryonen, Larven und Adulten mit höheren Vergrößerungen wurden diese in einen Wassertropfen auf einem Objektträger mit Agarosepad transferiert. Für das Agarosepad wurde eine 3 %ige Agaroselösung in dH<sub>2</sub>O in der Mikrowelle aufgeköcht. Ein Tropfen dieser Agaroselösung wurde auf den Objektträger gegeben und durch das Auflegen eines zweiten Objektträgers über einem Abstandshalter gespreizt. Um Larven und Adulte zu betäuben, wurde das Wasser auf dem Agarosepad abgenommen und durch 4 µl Levamisol (5 mM) ersetzt. Das Deckglas wurde mit Vaseline abgedichtet. Die Fotodokumentation der Präparate erfolgte mit dem Axio Imager Z1 mit der Software ZEN (blue edition) und mit dem LSM880 mit ZEN (black edition). Die Auswertung erfolgte mit FIJI (Schindelin et al., 2012) und die Erstellung der Collagen mit Inkscape (Tab. 9).

## 2.5 Auswertung

### 2.5.1 Ermittlung der Körperlänge

Mit dem Axio Imager Z1 (Tab. 6) wurden Larven und adulte Würmer, die auf einem Objektträger mit Agarose-Pad (2.4.1) betäubt wurden, unter zehnfacher Vergrößerung aufgenommen. Zur Ermittlung der Körperlänge wurde mit FIJI (Schindelin et al., 2012) in DIK-Aufnahmen mit der Funktion „segmented line“ eine Linie von der anterioren Pharynxöffnung bis zur posterior zulaufenden Schwanzspitze gezogen. Die Messung wurde in jedem Wurm jeweils dreimal durchgeführt.



**Abb. 7** Beispielhafte Darstellung der Ermittlung der Körperlänge in FIJI.

Die Körperlänge wurde mit Hilfe der Funktion „segmented line“ ermittelt. Die Messung wurde für jeden Wurm dreimal wiederholt. Hier ist bspw. eine JM125 Larve aus der Kontrollgruppe an Tag 2 abgebildet. Größenbalken: 50 µm

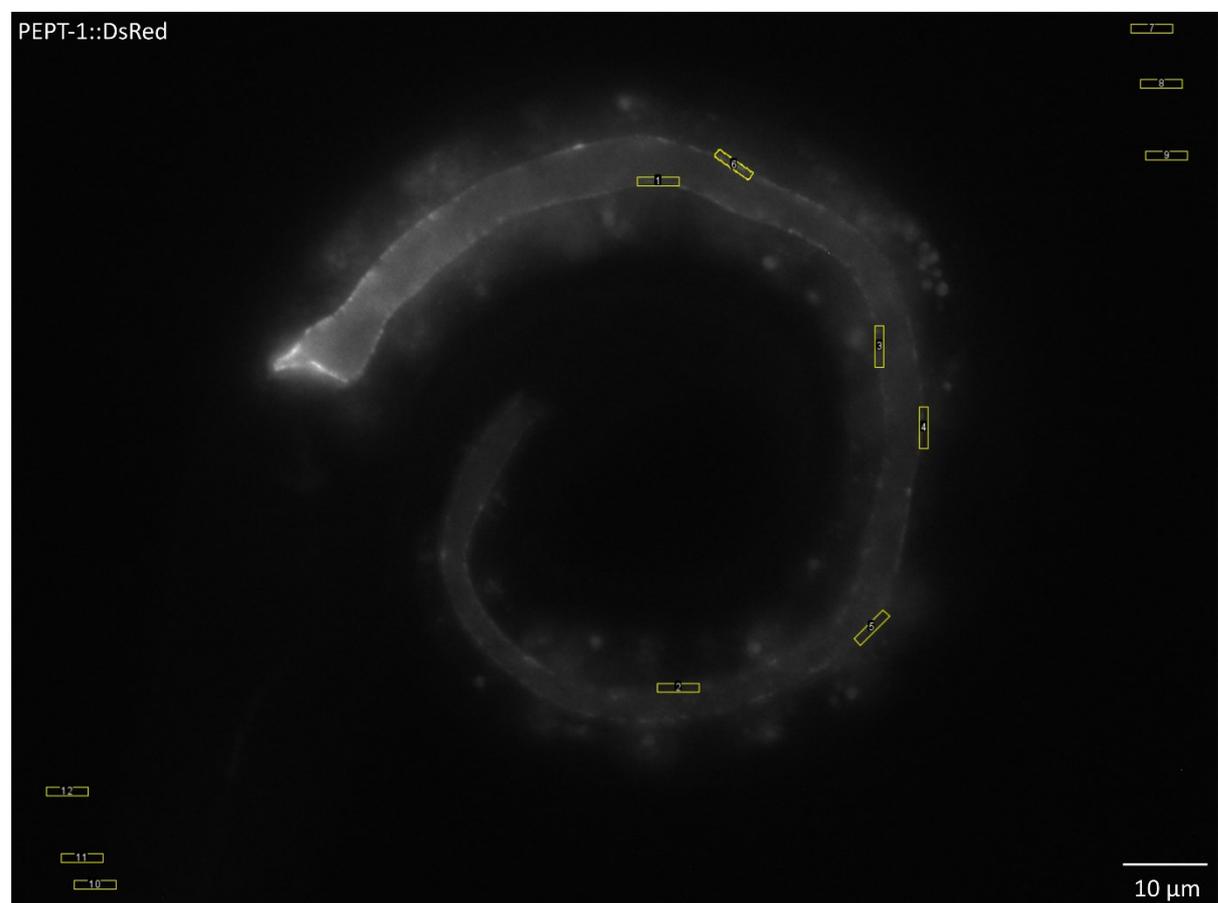
### 2.5.2 Quantifizierung der Fluoreszenzsignale

Zur Auswertung der Reduktion des Fluoreszenzsignals an der apikalen Membran wurde in FIJI (Schindelin et al., 2012) manuell ein Bereich von Interesse (ROI) definiert. Diese ROI wurde sechsmal an unterschiedlichen Positionen der apikalen Membran sowie im Hintergrundbereich festgelegt (Abb. 8). Für alle ROI wurden mit Hilfe der Funktion „measurement“ die „integrated density“, die Summe aller Pixel einer Region, sowie der Mittelwert der Hintergrundfluoreszenzintensität als auch die Größe der ROI bestimmt. Daraus wurde die

$$\text{Korrigierte Fluoreszenzintensität} = \text{Integrated Density} - \text{Hintergrundfluoreszenzintensität} \cdot \text{ROI}$$

berechnet (Gavet & Pines, 2010). Der Vorteil dieser Berechnung ist, dass die Fluoreszenzintensität nicht einfach nur gemittelt wird, wodurch sonst sehr helle oder sehr dunkle Pixelwerte verloren gehen würden. Ein weiterer Vorteil ist, dass so die Werte für ROIs unterschiedlicher Größe verglichen werden können.

Es wurde darauf geachtet, dass die ROI gleichmäßig an der apikalen Membran verteilt wurden, um eine aussagekräftige Quantifizierung der Fluoreszenzintensität zu gewährleisten. Dabei wurde das erste Int des Darms von den Messungen ausgenommen, da dort das Fluoreszenzsignal im Vergleich zum restlichen Darm meist inhomogen erscheint. Eine mögliche Erklärung ist, dass das erste Int, im Vergleich zu Int2-Int8, sich nicht aus zwei Enterozyten zusammensetzt, sondern aus vier.



**Abb. 8** Beispielhafte Darstellung der Quantifizierung des apikalen Fluoreszenzsignals PEPT-1::DsRed in FIJI. Die Intensität des Fluoreszenzsignals wurde innerhalb einer ROI bestimmt. Um repräsentative Messwerte zu erhalten, wurde die ROI sechs Mal im apikalen Fluoreszenzsignal sowie sechs Mal im Hintergrund berechnet. Größenbalken: 10 µm

## 2.6 Statistik

Die statistische Auswertung wurde mit Microsoft Excel (Microsoft Office 365 ProPlus, Tab. 9) durchgeführt. Die dargestellten Fehlerindikatoren entsprechen der ermittelten Standardabweichung des jeweiligen Mittelwerts. Zur Bestimmung der statistischen Signifikanz wird von folgenden Hypothesen ausgegangen:

- Nullhypothese  $H_0$ : Durch RNAi induzierte Defekte wirken sich nicht auf den Readout (z.B. Nachkommenanzahl, Intensität des Fluoreszenzsignals) aus.
- Gegenhypothese  $H_1$ : Durch RNAi induzierte Defekte wirken sich auf den Readout (z.B. Nachkommenanzahl, Intensität des Fluoreszenzsignals) aus.

Um zu bestimmen, ob die Nullhypothese  $H_0$  zu Gunsten der Gegenhypothese  $H_1$  zu verwerfen ist, wurde ein Zweistichproben t-Test durchgeführt. Dabei wird berücksichtigt, dass es sich um zwei Stichproben aus unabhängigen Grundgesamtheiten handelt (ungleiche Varianzen, heteroskedastisch). Der p-Wert gibt die Wahrscheinlichkeit wieder, dass die Nullhypothese  $H_0$  irrtümlich verworfen wurde, da eine Abweichung von der Norm nur durch Zufall zustande kommt. Die Signifikanzniveaus wurden entsprechend gekennzeichnet:  $p < 0,05 \triangleq *$ ,  $p < 0,01 \triangleq **$  und  $p < 0,001 \triangleq ***$

## 2.7 Chemikalien, Materialien, Geräte und Software

Die Chemikalien wurden bezogen von: AppliChem GmbH (Darmstadt), Bio-Rad Laboratories GmbH (Feldkirchen), Biozym Scientific GmbH (Hessisch Oldendorf), Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe), Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München) und LINARIS Biologische Produkte GmbH (Dossenheim). Das Laborequipment (z. B. Reaktionsgefäße, Petrischalen, Pipettenspitzen) wurde bezogen von: Eppendorf AG (Hamburg), SARSTEDT AG & Co. KG (Nümbrecht), BRAND GmbH & Co. KG (Wertheim) und A. Hartenstein GmbH (Würzburg). Außerdem wurden die nachfolgend aufgelisteten Reagenziensätze (Tab. 7), Geräte (Tab. 8) und Software (Tab. 9) verwendet.

Tab. 7 Reagenziensätze und Hersteller

Reagenziensatz (Kit)	Hersteller
GeneJET™ Plasmid-Miniprep-Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
KAPA2G Fast ReadyMix mit Dye	Kapa Biosystems, London (England)
Monarch® DNA Gel Extraction Kit	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main
NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren

Tab. 8 Geräte mit Modellbezeichnung und Herstellerangabe

Gerät	Modellbezeichnung	Hersteller
Autoklav	Systec V-65	Systec GmbH, Linden
Binokular	Stemi 2000 Lampe KL200	Carl Zeiss AG, Jena
Brutschränke	function line B12	Heraeus Kulzer, Hanau
	WKr 1811	Liebherr-Hausgeräte GmbH, Ochsenhausen
Deckgläser	24x32 mm	VWR International GmbH, Langenfeld
Fluoreszenzbinokular	Leica MZ 16 FA + KL1500LCD	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar
	Nikon AZ100M	Nikon GmbH, Düsseldorf
	EOS 6D	Canon GmbH, Krefeld
Geldokumentationsdrucker	Mitsubishi Electric Video Copy Processor P93E	Mitsubishi Electric, Ratingen
Heizschüttler	Thermomixer Comfort	Eppendorf AG, Hamburg
Inkubationsschüttler	INFORS HAT – Minitron	INFORS HAT, Basel (Schweiz)
Magnetrührer mit Heizung	RCT-Basic	IKA Werke, Staufen
Membranvakuumpumpe	Vac-Man Laboratory Vakuum Manifold	Vacuubrand GmbH & Co. KG, Wertheim

<b>Gerät</b>	<b>Modellbezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
<b>Mikroliterzentrifuge</b>	Z216MK mit Kühlsystem	Hermle Labortechnik GmbH, Wehingen
<b>Minizentrifuge</b>	SPROUT 12V	Heathrow Scientific, Vernon Hills (USA)
<b>Nanophotometer</b>	P-class P330 (Lid 10)	Implen GmbH, München
<b>PCR-Maschine</b>	Mastercycler	Eppendorf AG, Hamburg
<b>Photometer</b>	Biophotometer	Eppendorf AG, Hamburg
<b>Pipetten</b>	Research plus	Eppendorf AG, Hamburg
<b>Pipettierhelfer</b>	accu-jet® pro	BRAND GmbH & Co. KG (Wertheim)
<b>Präzisionswaagen</b>	Precisa 321 LS 220A	Precisa Gravimetrics AG, Dietikon (Schweiz)
	Talent TE4101	Sartorius AG, Göttingen
<b>Pumpe</b>	INTEGRA Dose it	IBS Integra Biosciences, Zizers (Schweiz)
<b>Stereomikroskop</b>	Stemi 508	Carl Zeiss AG, Jena
<b>Sterilbank</b>	Holten Lamin Air	IBS Integra Biosciences, Zizers (Schweiz)
<b>Stromversorgung Gelkammer</b>	PowerPac Basic Power Supply	Bio-Rad Laboratories Ltd., Hertfordshire (England)
<b>Trockenschrank</b>	WTC	Binder GmbH, Tuttlingen
<b>UV-Transilluminator</b>	UV-Transilluminator 312 nm/160x200 mm	INTAS GmbH, Göttingen
<b>Vortex</b>	Genie 2	Scientific Industries, New York (USA)

Tab. 9 Software

<b>Software</b>	<b>Herkunft</b>
<b>Adobe Photoshop Elements x.x.</b>	Adobe Inc., San José, CA, USA
<b>Excel (Microsoft Office 365 ProPlus)</b>	Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA
<b>FIJI</b>	Schindelin <i>et al.</i> , 2012
<b>Geneious R6 6.1.8</b>	Biomatters, Ltd., Auckland, New Zealand
<b>Inkscape (0.29.4)</b>	Free Software Foundation, Inc., Boston, MA, USA
<b>Zen 2012, Blue und Black Edition</b>	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Etablierung von RNAi-Pulsexperimenten zur Untersuchung des mikrovillären Bürstensaums in *C. elegans*

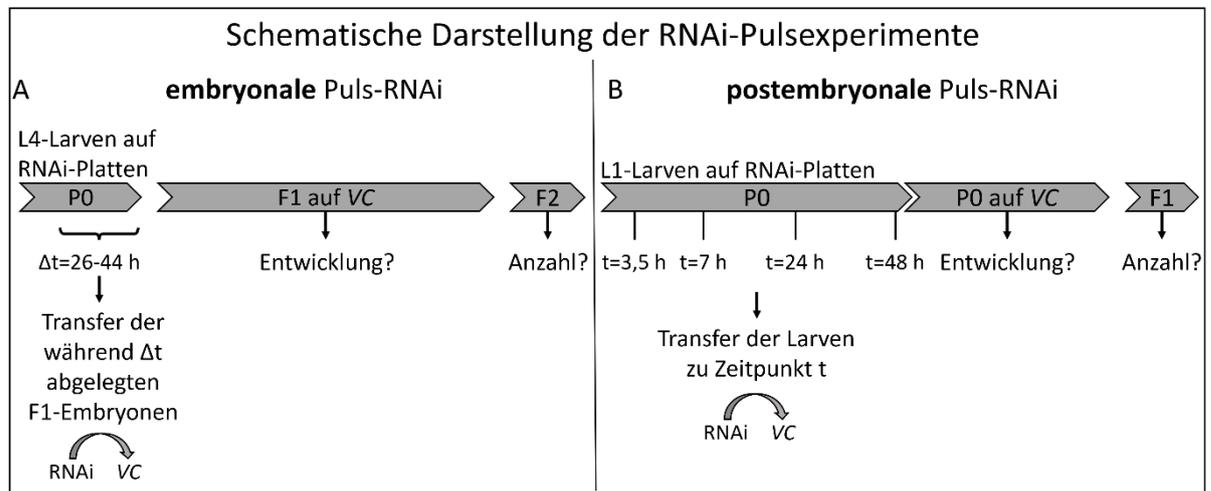
Die Abwesenheit von Stammzellen im *C. elegans* Darm und die damit einhergehende fehlende Fähigkeit der Selbsterneuerung der Enterozyten führt dazu, dass diese bei einer Schädigung des Darmepithels nicht ersetzt werden können. Ob die Enterozyten aber in der Lage sind Defekte im Mikrovilli-Saum, die durch temporäre darmspezifische RNAi induziert werden, zu reparieren, ist bisher nicht bekannt. Dazu wurden *C. elegans* Würmer für unterschiedliche Zeiträume auf RNAi-Platten gehalten und sowohl embryonale als auch postembryonale Puls-RNAi eingesetzt (Abb. 9 A, B). Die weitere Beurteilung erfolgte anhand der Entwicklung der von Puls-RNAi betroffenen Generation sowie der Anzahl der Nachkommen in der Folgegeneration.

**Um embryonale Puls-RNAi (Abb. 9 A)** hervorzurufen, wurde mit L4-Larven (= P0) auf RNAi-Platten gestartet. Diese Larven erreichten das adulte Stadium und legten Embryonen ab (= F1). Die im Zeitraum von 26-44 h der Verweildauer der P0 auf den RNAi-Platten abgelegten Embryonen wurden dann mit einer ausgezogenen Pasteurpipette auf Kontrollplatten transferiert und die Entwicklung der F1-Generation und ihre Nachkommenzahl (= F2) dokumentiert. Um eine kontinuierliche Nahrungsaufnahme zu gewährleisten, wurden die Kontrollplatten alle drei Tage gewechselt.

**Um postembryonale Puls-RNAi (Abb. 9 B)** von 3,5 h; 7 h; 24 h oder 48 h hervorzurufen, wurden gerade geschlüpfte L1-Larven (= P0) mit einer ausgezogenen Pasteurpipette auf RNAi-Platten gesetzt und danach auf Kontrollplatten transferiert. Auf diesen wurde dann die weitere Entwicklung der P0 und, wenn vorhanden, die Anzahl der Nachkommen (= F1) dokumentiert. Auch hier wurden die Kontrollplatten alle drei Tage gewechselt.

Neben dem Wildtyp N2 (WT) Stamm wurde auch der darmspezifische RNAi-Stamm OLB11 eingesetzt (McGhee et al., 2009; Pilipiuk et al., 2009). Da sowohl der WT als auch OLB11 keine Reporterstämme mit Markern für den mikrovillären Bürstensaum sind, wurden weiterhin die Stämme JM125 (ACT-5::YFP) und CE81 (PEPT-1::DsRed) eingesetzt, um die Auswirkungen der RNAi *in vivo* zu analysieren und zu quantifizieren.

Da *act-5(RNAi)* im WT und in CE81 zu embryonaler Letalität führt (3.3), konnte embryonale *act-5* Puls-RNAi nur in OLB11 und JM125 durchgeführt werden. Dies gilt auch für embryonale *aps-1* Puls-RNAi.



**Abb. 9 Schematische Darstellung der RNAi-Pulsexperimente.**

(A) Für **embryonale Puls-RNAi** wurde das Experiment mit L4-Larven (= P0) auf RNAi-Platten gestartet. Diese Larven erreichten das adulte Stadium und legten Embryonen (= F1) ab. Die Embryonen, die in einem Zeitraum von 26-44 h ( $\Delta t=18$  h) abgelegt wurden, wurden auf Kontrollplatten (VC) transferiert. Die Entwicklung der F1 bis zum adulten Wurm sowie die Anzahl der F2-Nachkommen wurden dokumentiert. (B) Für **postembryonale Puls-RNAi** wurden gerade geschlüpfte L1-Larven (= P0) auf RNAi-Platten gesetzt. Nach den angegebenen Zeitspannen wurden diese Larven auf Kontrollplatten (VC) transferiert. Die Entwicklung der Larven bis zum adulten Wurm und die Anzahl der F1-Nachkommen wurden dokumentiert.

### **3.2 *act-5(RNAi)* und *aps-1(RNAi)* führen zu Veränderungen der Fluoreszenzsignale der Mikrovilli-Marker ACT-5 und PEPT-1**

Um *in vivo* Veränderungen der Mikrovilli beobachten zu können, sind geeignete Marker erforderlich. Die Proteine ACT-5 und PEPT-1 wurden aufgrund ihrer Lokalisation und Funktion in der apikalen Membrandomäne der Enterozyten ausgewählt (1.3.2).

Das Fehlen von ACT-5 führt zu einer Abnahme bis hin zu einem vollständigen Verlust der Mikrovilli sowie zu larvalem Arrest bzw. in der Deletionsmutante zu larvaler Letalität (Gobel et al., 2004; MacQueen et al., 2005). Die korrekte Lokalisation von PEPT-1 wird durch den Funktionsverlust von APS-1, der Sigma-Untereinheit des konservierten Clathrin-Adapterproteinkomplexes AP-1, der an der Bildung intrazellulärer Transportvesikel zur apikalen Membrandomäne beteiligt ist, gestört (Nakatsu et al., 2014; Shafaq-Zadah et al., 2012; H. Zhang et al., 2012).

Da die Fluoreszenzsignale von ACT-5 und PEPT-1 in den Reporterstämmen JM125 bzw. CE81 entlang der apikalen Membran lokalisieren, wurden zur Quantifizierung Messbereiche entlang dieser festgelegt (siehe Material und Methoden 2.5.2). Aufgrund eines generell inhomogeneren Fluoreszenzsignals der ersten vier anterioren Darmzellen wurden diese von der Messung ausgenommen.

#### **3.2.1 Das ACT-5::YFP-Fluoreszenzsignal ist nach postembryonaler *act-5* Dauer- und Puls-RNAi reduziert**

In den JM125 Larven der Kontrollgruppe verlief das ACT-5::YFP-Fluoreszenzsignal deutlich entlang der apikalen Membran der Enterozyten (Abb. 10 A, A'). Bei postembryonaler *act-5* Dauer-RNAi wurde ein unregelmäßigerer Verlauf dieses Fluoreszenzsignals an Tag 2 (Abb. 10 B, B') und Tag 3 beobachtet. Die Fluoreszenzintensität in den *act-5(RNAi)*-Würmern war von 63.686 A.U. auf 17.579 AU bzw. von 82.010 A.U. auf 20.999 A.U. signifikant verringert (Abb. 10 C). Es stellt sich nun die Frage, ob nach kurzer postembryonaler *act-5* Puls-RNAi von 7 h bzw. 3,5 h in L1-Larven Auswirkungen auf das ACT-5::YFP-Fluoreszenzsignal auftreten, die während der nachfolgenden Entwicklung auf Kontrollplatten (zu den Messzeitpunkten Tag 1, 3, und 7) anhalten.

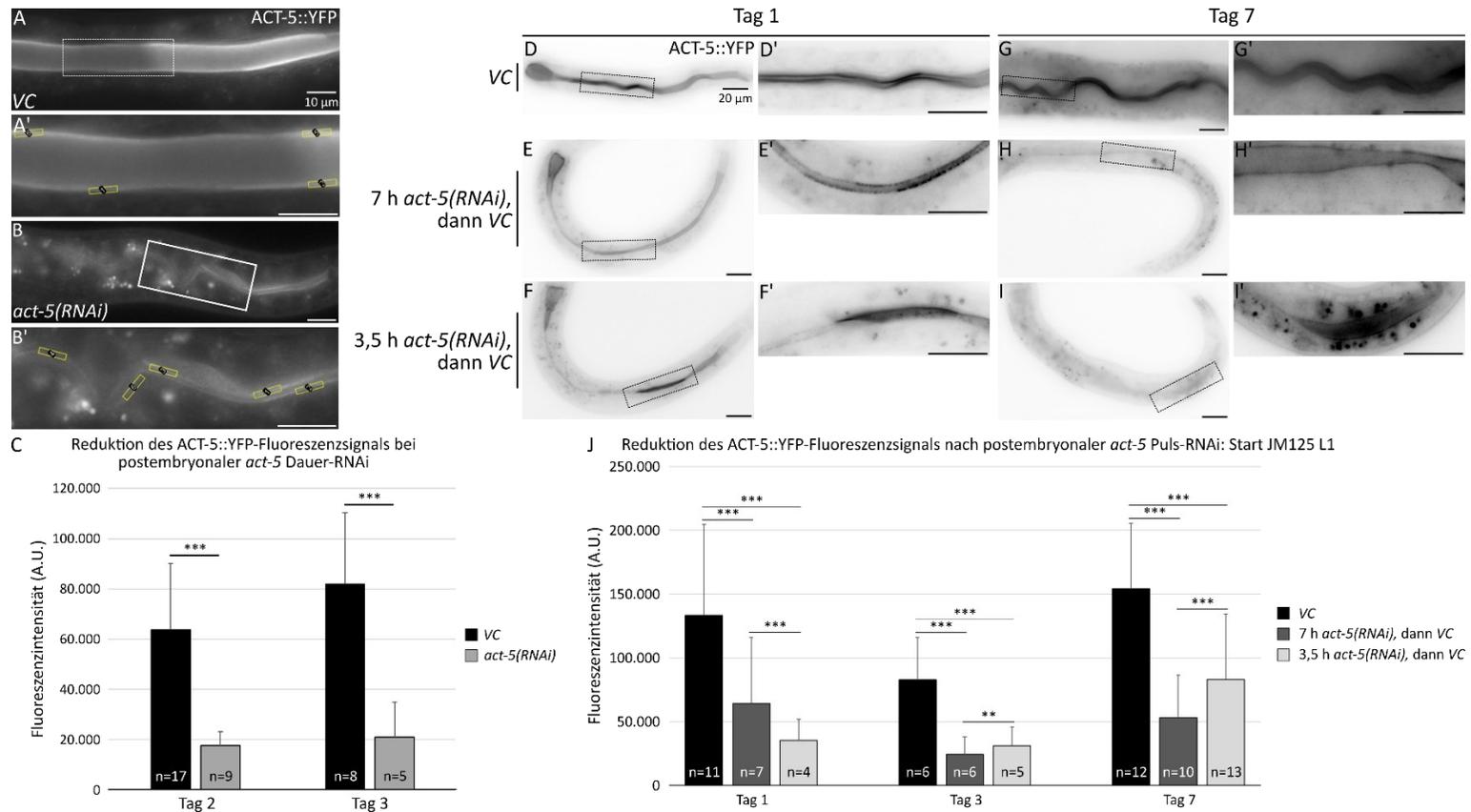
Bereits an Tag 1 war in den RNAi-Würmern eine geringere Kontinuität des Fluoreszenzsignals an der apikalen Membran zu erkennen (Abb. 10 F, F', H, H'). Insgesamt erscheint das Fluoreszenzsignal inhomogener als in den Kontrollwürmern (Abb. 10 D, D'). Dies konnte auch

an Tag 7 in den Würmern, die das adulte Stadium nicht erreicht hatten, beobachtet werden (Abb. 10 G, G', I, I'). Bei den mit Fluoreszenzsignal dekorierten Aggregaten in Abb. 10 I' handelt es sich vermutlich um autofluoreszierende Darm-Granula.

Für eine bessere Übersichtlichkeit wurde in Abb. 10 die Fluoreszenzintensität nur über die Tage 1, 3 und 7 aufgetragen. In Abb. 31 wird diese über einen Verlauf von sieben Tagen dargestellt.

An Tag 1 war die Fluoreszenzintensität nach 7 h *act-5* Puls-RNAi mit 64.358 A.U. höher als nach 3,5 h *act-5* Puls-RNAi mit 35.266 A.U., aber niedriger als auf Kontrollplatten mit 133.307 A.U. (Abb. 10 J). An Tag 3 und Tag 7 war die Fluoreszenzintensität nach 3,5 h *act-5* Puls-RNAi (31.130 A.U. bzw. 83.117 A.U.) höher als nach 7 h *act-5* Puls-RNAi (24.432 A.U. bzw. 52.974 A.U.), und jeweils niedriger als auf Kontrollplatten (82.836 A.U. bzw. 154.226 A.U.). Auffällig ist, dass an Tag 1 nach 3,5 h *act-5* Puls-RNAi die Fluoreszenzintensität zu 21,8 % weiter reduziert ist als nach einem 7 h *act-5* Puls-RNAi. Dabei ist zu beachten, dass die Auswertung der Fluoreszenzintensität nach 7 h *act-5* Puls-RNAi eine Standardabweichung von 80,1 % des Mittelwerts ergab. Eine mögliche Erklärung ist ein inhomogenes Fluoreszenzsignal entlang der apikalen Membran in Verbindung mit der geringen Anzahl an Messungen (n=7 bzw. n=4).

Es bleibt festzuhalten, dass die Fluoreszenzintensität des ACT-5 Signals nach kurzer postembryonaler *act-5* Puls-RNAi gegenüber der Fluoreszenzintensität der Kontrollgruppe an den Tagen 1, 3 und 7 auf Kontrollplatten signifikant reduziert bleibt. Es ist jedoch zu prüfen, ob der RNAi-Effekt nach Transfer der Tiere auf Kontrollplatten anhält und damit die *act-5* mRNA weiter herunterreguliert wird. Ergebnisse, die in 3.5 beschrieben werden, deuten darauf hin, dass dies wahrscheinlich nicht auf Dauer der Fall ist.



**Abb. 10** *In vivo* Fluoreszenzaufnahmen des ACT-5::YFP-Signals im Darm von JM125-Würmern bei postembryonaler *act-5(RNAi)* und nach 7 h und 3,5 h postembryonaler *act-5* Puls-RNAi mit Quantifizierung der Fluoreszenzsignale.

Tag 1-3, Tag 7 sind Messzeitpunkte. (A,B) *In vivo* FL-Signal von ACT-5::YFP bei *act-5* Dauer-RNAi (A: VC, B: *act-5(RNAi)*) an der apikalen Membran. (A',B') Vergrößerungen der in (A, B) markierten Bereiche mit bspw. Messbereichen an der apikalen Membran. (C) **Quantifizierung des FL-Signals.** Start JM125 L1. Tag 2,3=Verweildauer auf RNAi. VC: 63.686±26.484 A.U., 82.010±28.272 A.U.; *act-5(RNAi)*: 17.579±5.483 A.U., 20.999±13.804 A.U. (D-I) *In vivo* FL-Signal von ACT-5::YFP nach 7/3,5 h postembryonaler *act-5* Puls-RNAi an Tag 1 und Tag 7, Start JM125 L1. (D,D',G,G') Starkes FL-Signal von ACT-5::YFP an der apikalen Membran in der Kontrollgruppe an Tag 1 (D,D') und Tag 7 (G,G'). Schwächeres FL-Signal an Tag 1 nach 7 h (E,E') und 3,5 h (F,F') *act-5* Puls-RNAi. Vereinzelt gibt es Abschnitte, in denen das Fluoreszenzsignal an der apikalen Membran stärker hervortrat. Keine Erholung des FL-Signals bis zu Tag 7 (H-I'). (J) **Quantifizierung des FL-Signals.** Start JM125 L1, ACT-5::YFP FL-Intensität an Tag 1, Tag 3, Tag 7 auf Kontrollplatten: 133.307±71.247 A.U., 82.836±33.149 A.U., 154.226±51.275 A.U. ; nach 7 h *act-5* Puls-RNAi: 64.358±51.525 A.U., 24.432±13.712 A.U., 52.974±33.680 A.U. ; nach 3,5 h *act-5* Puls-RNAi: 35.266±16.889 A.U., 31.130±14.871 A.U., 83.117±51.116 A.U.; Größenbalken in (A-B'): 10 µm, in (D-I'): 20 µm. \*\*p-Wert<0,01, \*\*\* p-Wert<0,001.

### 3.2.2 Postembryonale und embryonale *aps-1(RNAi)* reduziert die Fluoreszenzsignale von ACT-5::YFP und PEPT-1::dsRed

Während der postembryonalen Entwicklung und nach embryonaler Puls-RNAi wurden die Auswirkungen der Herunterregulierung von APS-1 auf die Mikrovilli-Marker ACT-5 (Abb. 11; JM125 Stamm) und PEPT-1 (Abb. 12 D-F; CE81 Stamm) untersucht.

In JM125 Larven waren bei postembryonaler *aps-1* Dauer-RNAi im Darmepithel Vakuolen unterschiedlicher Größe zu sehen (Abb. 11 C, C', Asterisk). In den Kontrollwürmern war hingegen ein intaktes Darmepithel (Abb. 11 A) zu erkennen, durch das ein Lumen (L) verläuft, das apikal von einem Bürstensaum ausgekleidet ist (Abb. 11 A', Pfeile). Die apikale Membran dieses Darmepithels war entlang des Lumens durchgehend mit ACT-5::YFP-Fluoreszenzsignal dekoriert (Abb. 11 B, B'). Bei postembryonaler *aps-1* Dauer-RNAi zeigte das ACT-5::YFP-Fluoreszenzsignal eine zytoplasmatische Verteilung und lokalisierte auch an den Rändern der Vakuolen im Darmepithel. (Abb. 11 D, Pfeile). Das Lumen verlief nicht so gerade wie in der Kontrollgruppe, sondern wurde durch die Vakuolen beiseitegeschoben. Stellenweise war ein apikaler Bürstensaum, der auch mit ACT-5::YFP dekoriert war, zu erkennen (Abb. 11 C', D', Pfeile).

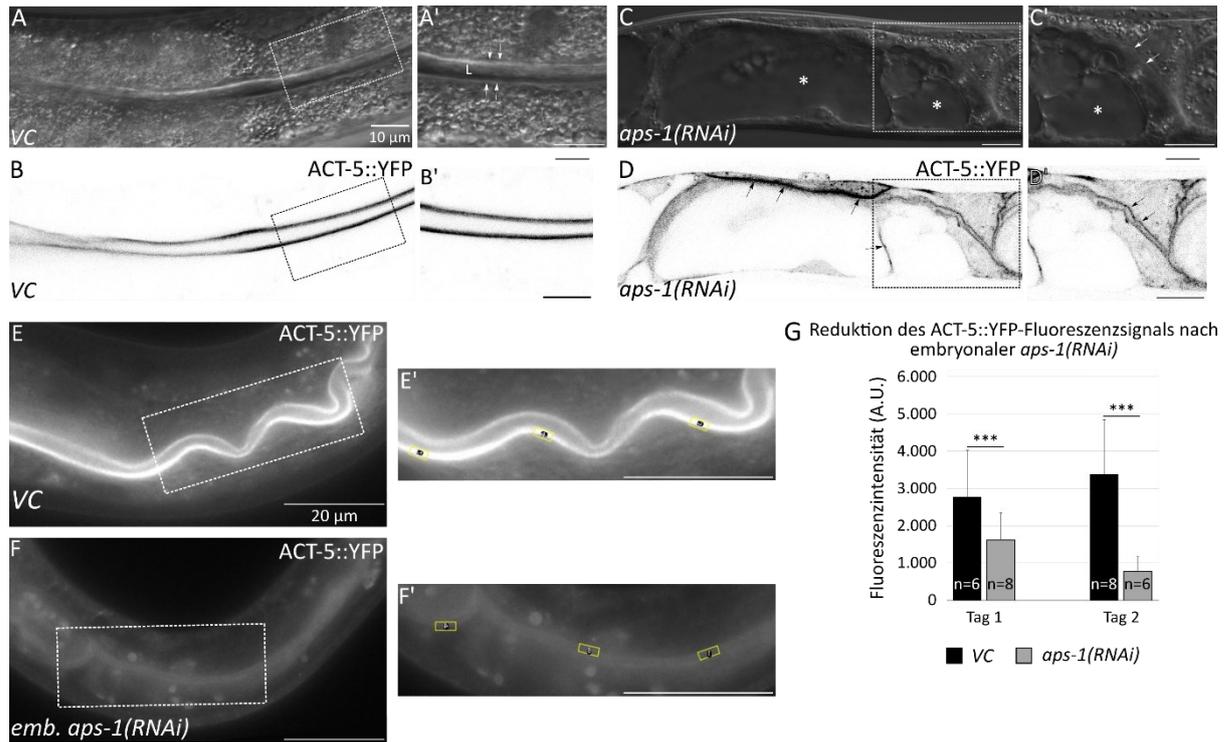
Nach embryonaler *aps-1* Puls-RNAi wurde ein Fluoreszenzsignal an der apikalen Membran im Darmepithel der sich nun auf Kontrollplatten entwickelnden F1-Generation beobachtet (Abb. 11 F). Die Fluoreszenzsignale der sich gegenüberliegenden apikalen Seiten erschienen diffus und nicht klar trennbar (Abb. 11 F'). Für eine verbesserte Sichtbarkeit wurde an den Aufnahmen nach der Quantifizierung eine automatische Helligkeit/Kontrast-Anpassung vorgenommen. Nach embryonaler *aps-1* Puls-RNAi lag die Fluoreszenzintensität an Tag 1 und Tag 2 der folgenden Entwicklung auf Kontrollplatten mit 1619 A.U. bzw. 783 A.U. unter der Kontrollgruppe mit 2765 A.U. bzw. 3383 A.U. (Abb. 11 G). Eine Quantifizierung an späteren Tagen konnte nicht vorgenommen werden, da das Fluoreszenzsignal zu diffus und inhomogen war.

Auch das PEPT-1::DsRed-Fluoreszenzsignal lokalisierte in der Kontrollgruppe an der apikalen Membran (Abb. 12 A, A'). Bei postembryonaler *act-5* Dauer-RNAi war dieses Fluoreszenzsignal deutlich diffuser verteilt (Abb. 12 B, B'). Dies zeigte sich auch an der signifikanten Verringerung der Fluoreszenzintensität an Tag 2 und Tag 3 von 92.254 A.U. auf 10.264 A.U. bzw. von 102.074 A.U. auf 11.582 A.U. (Abb. 12 C). Diese Auswirkungen auf das

PEPT-1::DsRed-Fluoreszenzsignal zeigen, dass es sich um einen geeigneten Mikrovilli-Marker handelt.

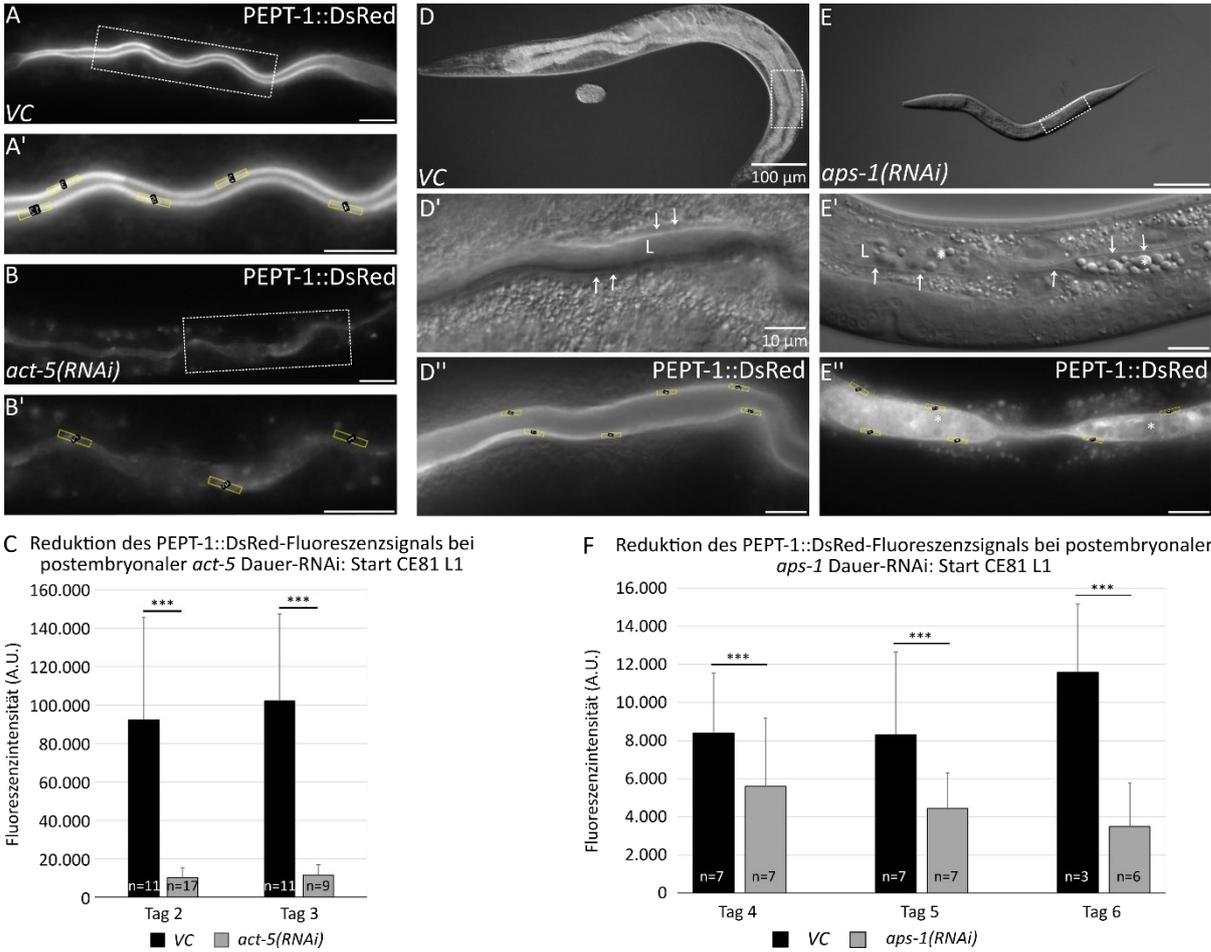
Ähnliche Auswirkungen wurden bei postembryonaler *aps-1* Dauer-RNAi in CE81 beobachtet. In der Kontrollgruppe verlief das PEPT-1::DsRed-Fluoreszenzsignal deutlich entlang der apikalen Membran, die im Darmepithel neben dem freien Lumen (L) zu erkennen war (Abb. 12 D', D''). Die Übersichtsaufnahme an Tag 5 zeigt, dass bei *aps-1(RNAi)* die Larven erst im L4-Stadium und damit in der Entwicklung langsamer als die bereits Adulten auf Kontrollplatten waren (Abb. 12 D, E). In den L4-Larven war nur stellenweise ein apikaler Bürstensaum entlang des Lumens (L) zu erkennen (Abb. 12 E', Pfeile). Das Lumen selbst schien nicht frei zu sein, sondern mit kugelförmigen Gebilden gefüllt (Abb. 12 E', Asterisk). Diese kugelförmigen Objekte waren nicht mit Fluoreszenzsignal dekoriert (Abb. 12 E'', Asterisk). Insgesamt erschien das PEPT-1::DsRed-Fluoreszenzsignal bei *aps-1(RNAi)* diffus. An Tag 4 bis Tag 6 betrug die Fluoreszenzintensität in der Kontrollgruppe 8388 A.U., 8305 A.U. bzw. 11.592 A.U., während bei *aps-1(RNAi)* die Intensität mit 5597 A.U., 4433 A.U. und 3496 A.U. niedriger war (Abb. 12 F).

Die Defekte im Darmepithel nach postembryonaler *aps-1(RNAi)* sowie die Fehllokalisierung des ACT-5::YFP-Fluoreszenzsignals lassen vermuten, dass die Beschaffenheit der Mikrovilli nicht mehr physiologisch ist. Die Reduktion des PEPT-1::DsRed-Fluoreszenzsignals in Verbindung mit der Funktion von PEPT-1 für die Nahrungsaufnahme als Peptidtransporter (1.3.2) ist ein Hinweis darauf, dass die durch postembryonale *aps-1(RNAi)* induzierten Defekte die Nahrungsaufnahme beeinträchtigen.



**Abb. 11** *In vivo* DIK- und Fluoreszenzaufnahmen des ACT-5::YFP-Signals im Darmepithel von JM125 an Tag 4 bei postembryonaler *aps-1(RNAi)* und an Tag 2 nach embryonaler *aps-1* Puls-RNAi mit Quantifizierung des Fluoreszenzsignals.

*In vivo* DIK- und Fluoreszenzaufnahmen von JM125 (ACT-5::YFP) an Tag 4 (nach Start als L1-Larve) auf Kontrollplatten (A, B) bzw. bei postembryonaler *aps-1(RNAi)* (C, D). (A'-D') Vergrößerung der in (A-D) markierten Bereiche. (A') Im Darmepithel war ein freies Lumen (L), ausgekleidet von einem apikalen Bürstensaum (Pfeile), zu erkennen. (B, B') Auf Kontrollplatten lokalisierte das ACT-5::YFP-Fluoreszenzsignal am apikalen Bürstensaum. (C) Bei postembryonaler *aps-1(RNAi)* befanden sich Vakuolen unterschiedlicher Größen im Darmepithel. (C') Die Vakuolen (Asterisk) drängten das Lumen aus einem geraden Verlauf durch das Darmepithel an die Seite. Stellenweise war ein apikaler Bürstensaum (Pfeile) zu erkennen. (D) Das ACT-5::YFP-Signal zeigte eine zytoplasmatische Verteilung und lokalisierte auch an den Rändern der Vakuolen (Pfeile). (D') Wo in (C') ein apikaler Bürstensaum zu erkennen war, lokalisierte auch das apikale Fluoreszenzsignal (Pfeile). (E) *In vivo* ACT-5::YFP-Signal an der apikalen Membran im Darm von F1-Larven der Kontrollgruppe und (F) nach embryonaler *aps-1* Puls-RNAi an Tag 2. Es wurde nach der Quantifizierung eine automatische Helligkeit/Kontrast-Anpassung zur besseren Sichtbarkeit des Signals in RNAi-Larven vorgenommen. (E', F') Die Vergrößerungen der in (E) und (F) markierten Bereiche geben beispielsweise die Messbereiche an der apikalen Membran wieder. (G) **Quantifizierung des FL-Signals**. Start JM125 L4, ACT-5::YFP-Fluoreszenzintensität an der apikalen Membran des Darmepithels der F1 an Tag 1 und Tag 2 auf Kontrollplatten: 2765±1262 A.U., 3383±1454 A.U., nach embryonaler *aps-1* Puls-RNAi: 1618±730 A.U., 783±401 A.U. \*\*\*p-Wert<0,001. Größenbalken in (A-D'): 10 µm in (E-F'): 20 µm.



**Abb. 12** *In vivo* DIK- und Fluoreszenzaufnahmen des PEPT-1::DsRed-Signals im Darmepithel von CE81 bei postembryonaler *act-5(RNAi)* an Tag 2 und bei postembryonaler *aps-1(RNAi)* an Tag 5 mit Quantifizierung der Fluoreszenzsignale.

(A,B) *In vivo* Fluoreszenzsignal von PEPT-1::DsRed bei *act-5(RNAi)* an der apikalen Membran. (A: VC, B: *act-5(RNAi)*) (A',B') Vergrößerungen der in (A,B) markierten Bereiche mit bspw. Messbereichen an der apikalen Membran. (C) **Quantifizierung des FL-Signals.** Start CE81 L1, PEPT-1::DsRed-Fluoreszenzintensität an Tag 2 und Tag 3 (Verweildauer auf RNAi). VC: 92.254±53.305 A.U., 102.074±45.328 A.U.; *act-5(RNAi)*: 10.264±5194 A.U., 11.582±5329 A.U. (D-E'') ***In vivo* DIK- und Fluoreszenzaufnahmen** von CE81 (PEPT-1::DsRed) an Tag 5 (Start L1). (D-D'') Adler Wurm der Kontrollgruppe. (E-E'') L4-Larve an Tag 5 bei *aps-1(RNAi)* nach Start als L1-Larve. (D', E') Vergrößerung des markierten Bereichs in (D) bzw. (E). (D') Im Darmepithel war ein freies Lumen (L), umgeben von einem apikalen Bürstensaum (Pfeile), zu erkennen. (E') Im Darmepithel schien das Lumen (L) mit kugelförmigen Gebilden (Asterisk) gefüllt zu sein. Stellenweise war ein apikaler Bürstensaum erkennbar (Pfeile). (D'', E'') PEPT-1::DsRed-Signal im Ausschnitt (D') bzw. (E'). Die Messbereiche zur Quantifizierung des Signals sind als kleine Boxen an der apikalen Membran dargestellt. In der Kontrolle (D) lokalisierte das Fluoreszenzsignal an der apikalen Membran. Nach fünf Tagen *aps-1(RNAi)* lokalisierte das Fluoreszenzsignal weiterhin an der apikalen Membran und erschien insgesamt diffus. Die kugelförmigen Gebilde (Asterisk) im Lumen in (E') schienen nicht mit Fluoreszenzsignal markiert zu sein. (F) **Quantifizierung des FL-Signals.** Start CE81 L1, PEPT-1::DsRed-Fluoreszenzintensität an Tag 4, Tag 5 und Tag 6 (Verweildauer auf RNAi). VC: 8388±3145 A.U., 8305±4356 A.U., 11.592±3594 A.U.; *aps-1(RNAi)*: 5597±3563 A.U., 4433±1876 A.U., 3496±2278 A.U.; \*\*\*p-Wert<0,001. Größenbalken: 10 µm, außer in (C, D): 100 µm.

### **3.3 *act-5(RNAi)* im Wildtyp N2 induziert embryonale Letalität wahrscheinlich aufgrund der Sequenzähnlichkeit zu anderen Aktin-Genen (*act-1*, *act-2*, *act-3*, *act-4*)**

Die Letalität der F1-Generation im Wildtyp N2 (WT) betrug nach embryonaler *act-5(RNAi)* 49,2 % im Vergleich zu 0,1 % auf Kontrollplatten (Abb. 14 A). Der embryonal letale Phänotyp äußerte sich durch große Vakuolen im Embryo (Abb. 14 B, Asterisk). Schlüpfende L1-Larven zeigten Verbreiterungen im Pharynx (Abb. 14 C, Pfeile) sowie ein amorphes Lumen (L) und Vakuolen im Darmepithel (Abb. 14 C', L und Asterisk). Wird der embryonal letale Phänotyp im WT durch die Herunterregulierung anderer Aktin-Gene nach *act-5(RNAi)* induziert?

Es wurde bereits gezeigt, dass ACT-1–4 eine Proteinsequenzidentität von 99 % teilen, während diese zu ACT-5 nur 93 % beträgt (MacQueen et al., 2005). Die Analyse der Sequenzidentität des *act-5(RNAi)*-Klons zu anderen Nukleinsäuresequenzen des *C. elegans* Genoms ist wesentlich, da für die Effektivität des RNAi-Klons dessen Sequenzidentität zum Zielgen entscheidend ist. Mit Hilfe der Sequenzanalyse-Software Geneious (Tab. 9) wurde ein Referenz-Alignment durchgeführt, um die Identität zwischen den Nukleinsäuresequenzen der fünf Aktine des *C. elegans* Genoms (*act-1*–*act-5*) und des in RNAi-Experimenten verwendeten *act-5(RNAi)*-Klons zu visualisieren. Die hohe Sequenzidentität der Nukleinsäuresequenzen der fünf *C. elegans* Aktine von über 80 % (Tab. 10) bedingt, dass der *act-5(RNAi)*-Klon auch einen hohen Anteil der Nukleinsäuresequenzen der Gene *act-1*–*act-4* abdeckt. Dabei ist zu beachten, dass der *act-5(RNAi)*-Klon vorwiegend Exon-Anteile der Nukleinsäuresequenzen abdeckt (Abb. 13, Exons in blau dargestellt). Da der RNAi-Mechanismus auf der Degradierung der zum RNAi-Klon komplementären mRNA beruht (Fire et al., 1998; Timmons & Fire, 1998), ist die Höhe des Exon-Anteils der Sequenzidentität bedeutend für die erfolgreiche Herunterregulierung der Genexpression. Der *act-5(RNAi)*-Klon deckt zwischen 79,2 % und 81,1 % der Exonsequenzen der weiteren *C. elegans* Aktine *act-1*–*act-4* ab (Abb. 13, Tab. 10). Daher liegt die Vermutung nahe, dass *act-5(RNAi)* ebenfalls zum Abbau der mRNA anderer Aktin-Gene führt und so ein embryonal-letaler Phänotyp induziert wird. Unter Einbeziehung der systemischen Wirkung von RNAi (Fire et al., 1998; Jose, 2015) bedeutet dies, dass die Funktionen der Aktin-Isoformen in anderen Geweben gestört werden, wodurch die Analyse des *act-5(RNAi)*-Phänotyps erschwert wird.

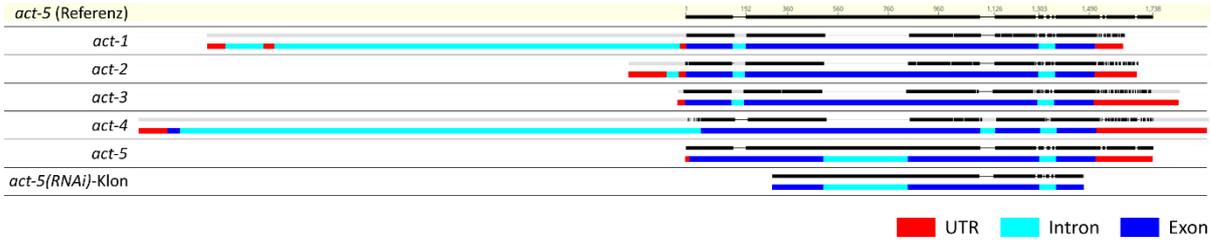
Um diese Hypothese weiter zu überprüfen, wurde embryonale *act-5(RNAi)* im darmspezifischen OLB11 Stamm durchgeführt. In Kontrollexperimenten zeigte sich jedoch, dass OLB11 im Gegensatz zum WT generell eine embryonale Letalität von 10,6 % (Abb. 14 D) aufweist, was wahrscheinlich auf nicht ausgekreuzte Mutationen in diesem transgenen Stamm hindeutet. Weiterhin deutet der erhöhte Anstieg der embryonalen Letalität auf 21,4 % nach *act-5(RNAi)* daraufhin, dass die im OLB11 Hintergrund existierende *rde-1(ne219)* Mutation nicht gänzlich RNAi-insensitiv ist (O. Bossinger, persönliche Mitteilung) und auch hier, wie im WT, wahrscheinlich andere Aktin-Gene herunterreguliert werden.

Im WT wurden morphologischen Veränderungen in der F1 beobachtet (Abb. 14 C, C'). Im Gegensatz dazu war in geschlüpften OLB11 F1 L1-Larven nach embryonaler *act-5(RNAi)* ein Darmlumen (L), das apikal von einem Bürstensaum (weiße Pfeile) ausgekleidet war (Abb. 14 F'), zu erkennen.

Ob die Mikrovilli des Darmepithels zu diesem Zeitpunkt schon geschädigt sind, sollte in den nun folgenden Experimenten analysiert werden. Dazu wurde neben dem OLB11 Stamm auch der JM125 Stamm (ACT-5::YFP) eingesetzt, der aufgrund einer Mutation im *drh-1* Gen eine verringerte Sensitivität gegenüber RNAi aufweist (O. Bossinger, persönliche Mitteilung). Beide Stämme generieren nach embryonaler *act-5(RNAi)* eine genügende Anzahl schlüpfender L1-Larven, deren weitere Entwicklung zum Adulten und deren Nachkommenzahl dokumentiert werden können.

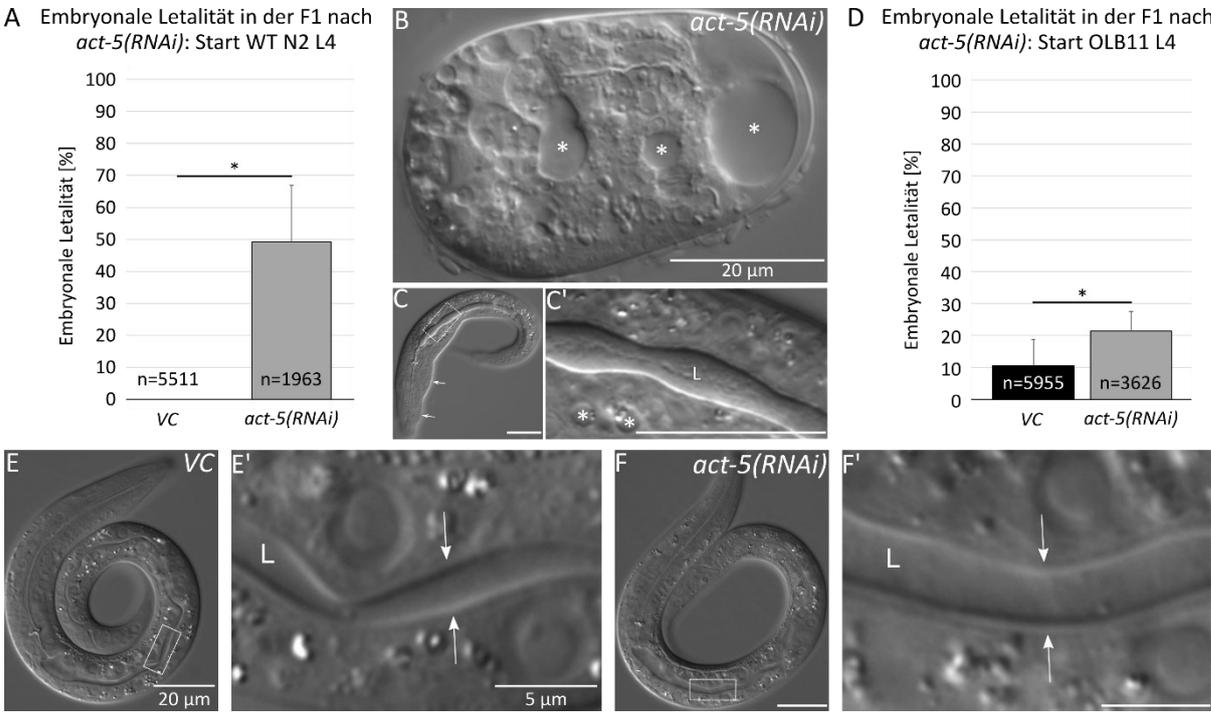
	<i>act-5</i>	<i>act-5(RNAi)</i> -Klon
<i>act-1</i>	84,1 %	79,9 %
<i>act-2</i>	82,5 %	79,2 %
<i>act-3</i>	84,1 %	79,9 %
<i>act-4</i>	85,2 %	81,1 %
<i>act-5</i>		96,6 %

Tab. 10 Prozentsätze identischer Basen der Exonsequenzen der fünf *C. elegans* Aktine und des *act-5(RNAi)*-Klons.



**Abb. 13 Vergleich der Nukleinsäuresequenzen der fünf Aktine des *C. elegans* Genoms und des verwendeten *act-5(RNAi)*-Klons.**

Die Sequenz des *act-5* Gens wurde als Referenzsequenz festgelegt. Identische Nukleinsäuren sind in schwarz dargestellt, unterschiedliche Nukleinsäuren in grau. Die Bindestriche zwischen grauen oder schwarzen Blöcken sind Lücken, die vom Algorithmus dort eingefügt wurden, wo in den anderen Sequenzen kein Bereich zugeordnet werden konnte. Die Nukleinsäuresequenzen wurden folgendermaßen annotiert: UTR (rot), Introns (hellblau), Exons (blau).



**Abb. 14 Embryonale Letalität der F1 nach *act-5(RNAi)* in Wildtyp N2 (A-C') und OLB11 (D-F') L4-Larven.**

(A) **Start N2 L4**, F1 embryonal letal auf Kontrollplatten (n=5511 Embryonen von 25 P0-Adulten) unter 0,1%, bei *act-5(RNAi)* (n=1963 Embryonen von 25 P0-Adulten) zu 49,2%±17,7%. (B-C') **DIK-Aufnahmen der N2 F1**: (B) Embryonal letaler Phänotyp nach *act-5(RNAi)* mit großen Vakuolen (Asterisk). (C, C') Die L1-Larven zeigten ein amorphes Lumen (L in C') und Vakuolen im Darmepithel (Asterisk in C'). Die Pfeile zeigen auf Verbreiterungen des Pharynx in (C). (D) **Start OLB11 L4**, F1 embryonal letal auf Kontrollplatten (n=5955 Embryonen von 39 P0-Adulten) zu 10,6%±8,1%, bei *act-5(RNAi)* (n=3626 Embryonen von 44 P0-Adulten) zu 21,4%±6,2%. (E-F') **DIK-Aufnahmen der OLB11 F1**: (E, E') Soeben geschlüpften L1-Larven auf Kontrollplatten wiesen ein Lumen (L) mit apikalem Bürstensaum (Pfeile) auf. (F, F') Im Darmepithel der F1 L1-Larven bei *act-5(RNAi)* war ebenso ein Lumen (L) mit apikalem Bürstensaum (Pfeile) zu erkennen. Größenbalken: (C-F) 20 μm, (E', F') 5 μm. \*p-Wert<0,05

### **3.4 Embryonale *act-5* und *aps-1* Puls-RNAi führt zu einer verzögerten Entwicklung und einer verringerten Nachkommenzahl in OLB11 und JM125**

Für eine embryonale *act-5/aps-1* Puls-RNAi wurde mit L4-Larven (= P0) des darmspezifischen RNAi-Stamms OLB11 und des JM125 Stamms (ACT-5::YFP) auf RNAi-Platten gestartet. Die im Zeitraum von 26-44 h auf den RNAi-Platten abgelegten Embryonen (= F1) wurden dann mit einer ausgezogenen Pasteurpipette auf Kontrollplatten transferiert und ihre Entwicklung und Nachkommenzahl (= F2) dokumentiert.

Aus den OLB11 bzw. JM125 Embryonen auf Kontrollplatten entwickelten sich bis zum vierten Tag (n=47, Abb. 15 A) bzw. fünften Tag (n=638, Abb. 15 C, E) 100 % zu Adulten.

**Nach embryonaler *act-5* Puls-RNAi (n=47) in OLB11** erreichten am vierten Tag nur 17 % das adulte Stadium, während 6,4 % junge Adulte, 61,7 % L4- und 14,9 % L3-Larven waren (**Abb. 15 A**). Am fünften Tag hatten 61,7 % das junge adulten und 23,4 % das adulte Stadium erreicht, sodass 8,5 % im L3- und 6,4 % im L4-Stadium waren. Die L3-Larven entwickelten sich bis zum nächsten Tag weiter. Am sechsten Tag waren 2,1 % jeweils im L4- und im jungen adulten Stadium. 95,8 % waren im adulten Stadium. Bis zum siebten Tag hatten sich alle OLB11 Larven nach einer embryonalen *act-5* Puls-RNAi zu Adulten entwickelt. Die Nachkommenzahl dieser Adulten war von  $170 \pm 72$  F2/A (VC, n=30) auf  $100 \pm 66$  F2/A (n=29) signifikant verringert (**Abb. 15 B**).

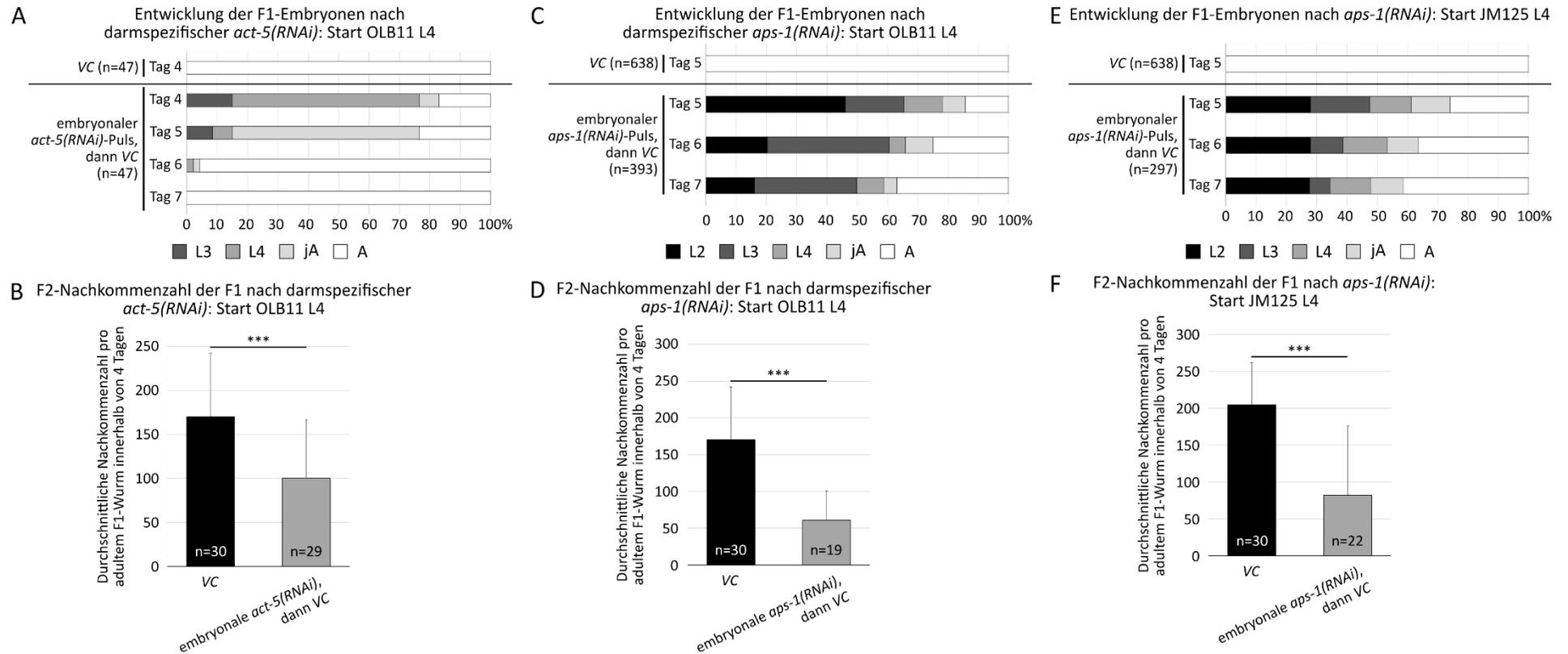
**Nach embryonaler *aps-1* Puls-RNAi (n=393) in OLB11** lag der Anteil der Adulten am fünften Tag bei 14,2 %. 7,6 % waren junge Adulte, während sich 12,7 % im L4-, 19,3 % im L3- und 46,1 % im L2-Stadium befanden (**Abb. 15 C**). Der Anteil der L2-Larven sank bis zum siebten Tag auf 16,0 %. 33,8 % befanden sich im L3-Stadium. 8,9 % hatten sich zu L4-Larven und 4,3 % zu jungen Adulten weiterentwickelt. Insgesamt erreichten am siebten Tag 36,9 % das adulte Stadium. Die Nachkommen dieser Adulten war von  $170 \pm 72$  F2/A (VC, n=30) auf  $61 \pm 40$  F2/A (n=19) signifikant verringert (**Abb. 15 D**).

**Am fünften Tag nach embryonaler *aps-1* Puls-RNAi (n=297) in JM125** betrug der Anteil der Adulten 25,9 % (**Abb. 15 E**). Bis zum siebten Tag entwickelten sich insgesamt 41,4 % zum Adulten. Der Anteil der L2-Larven blieb bei 27,6 %. Die Anteile der L3- und L4-Larven sowie der jungen Adulten verringerten sich bis zum siebten Tag auf 6,7 % und 13,5 % bzw. 10,8 %.

---

Die Adulten legten mit  $82 \pm 94$  F2/A ( $n=30$ ) signifikant weniger Nachkommen ab (VC:  $205 \pm 57$  F2/A,  $n=22$ ) (**Abb. 15 F**).

Zusammenfassend bleibt festzuhalten, dass sich nach embryonaler *act-5/aps-1* Puls-RNAi die Entwicklung der F1 zum Adulten deutlich verzögert und nach *aps-1(RNAi)* in beiden Stämmen nur ca. 40 % der Tiere das Adultstadium erreichen. Da in OLB11 embryonales *aps-1(RNAi)* nur darmspezifisch gewirkt hat, in JM125 jedoch in allen Geweben, sind die verzögerte Entwicklung und die verringerte Nachkommenzahl der F1 auch in JM125 auf embryonal induzierte Defekte im Darmepithel zurückzuführen, die sehr wahrscheinlich während der postembryonalen Entwicklung nicht mehr ausgeglichen werden können (siehe Diskussion). Die Bildung der Mikrovilli im Darmepithel von *C. elegans* setzt schon während der Embryogenese ein (Bossinger et al., 2015; Leung et al., 1999) und wird während der Larvalentwicklung fortgesetzt (<https://www.wormimage.org/> und (Bidaud-Meynard et al., 2021)). Daher sollte im folgenden Kapitel überprüft werden, inwieweit postembryonale *act-5* Puls-RNAi sich auf die Larvalentwicklung, die Nachkommenzahl und die Körperlänge auswirkt.



**Abb. 15 Embryonale *act-5* und *aps-1* Puls-RNAi in OLB11 und JM125 verzögert die F1-Entwicklung und verringert die F2-Nachkommenzahl.**

(A,C,E) **Verzögerte Entwicklung** der F1-Embryonen und (B,D,F) **verringerte F2-Nachkommenzahl** auf Kontrollplatten nach embryonaler Puls-RNAi. (A) **Start OLB11 L4**. Entwicklung der F1 der Kontrollgruppe (n=47): an Tag 4 zu 100% A; nach embryonaler *act-5* Puls-RNAi (n=47) an Tag 4: 14,9% L3, 61,7% L4, 6,4% jA, 17,0% A; Tag 5: 8,5% L3, 6,4% L4, 61,7% jA, 23,4% A; Tag 6: je 2,1% L4 und jA, 95,8% A; Tag 7: 100% A. (B) **OLB11 F2-Nachkommenzahl** der Adulten der F1: 170±72 F2/A auf VC (n=30), nach embryonaler *act-5* Puls-RNAi (n=29) 100±66 F2/A. (C) **Start OLB11 L4**. Entwicklung der F1 der Kontrollgruppe (n=638): an Tag 5 zu 100% A; nach embryonaler *aps-1* Puls-RNAi (n=393) an Tag 5: 46,1% L2, 19,3% L3, 12,7% L4, 7,6% jA, 14,2% A; Tag 6: 20,4% L2, 40,2% L3, 5,3% L4, 9,2% jA, 24,9% A; Tag 7: 16,0% L2, 33,8% L3, 8,9% L4, 4,3% jA, 36,9% A. (D) **OLB11 F2-Nachkommenzahl** der Adulten der F1: 170±72 F2/A auf VC (n=30), nach embryonaler *aps-1* Puls-RNAi 61±40 F2/A (n=19). (E) **Start JM125 L4**. Entwicklung der F1 der Kontrollgruppe (n=638): an Tag 5 zu 100% A; nach embryonaler *aps-1* Puls-RNAi (n=297) an Tag 5: 27,9% L2, 19,5% L3, 13,8% L4, 12,8% jA, 25,9% A; Tag 6: 27,9% L2, 10,8% L3, 14,5% L4, 10,4% jA, 36,4% A; Tag 7: 27,6% L2, 6,7% L3, 13,5% L4, 10,8% jA, 41,4% A. (F) **JM125 F2-Nachkommenzahl** der Adulten der F1: 205±57 F2/A auf VC (n=30), nach embryonaler *aps-1* Puls-RNAi 82±94 F2/A (n=22). Legende: (A) L3(dunkelgrau), L4 (grau), jA: junge Adulte (hellgrau), A: Adulte (weiß); (C, E) L2 (schwarz), L3 (dunkelgrau), L4 (grau), jA: junge Adulte (hellgrau), A: Adulte (weiß).\*\*\* p-Wert<0,001

### 3.5 Die Auswirkungen postembryonaler *act-5* Puls-RNAi

Die bisherigen Ergebnisse zeigen, dass sich durch embryonale RNAi induzierte Defekte im Darmepithel auf die postembryonale Entwicklung von *C. elegans* auswirken. Mit dem Schlüpfen der L1-Larve ist die embryonale Entwicklung des Darmepithels zunächst abgeschlossen und geht in die postembryonale Entwicklung über, in der die Anzahl der Mikrovilli stetig zunimmt (<https://www.wormimage.org/> und (Bidaud-Meynard et al., 2021)). Daher sollte in diesem Kapitel überprüft werden, inwieweit sich postembryonale, darmspezifische *act-5* Puls-RNAi auf die weitere Entwicklung von *C. elegans* auswirkt. Die Länge der Puls-RNAi wurde dabei von 48 h, auf 24 h, auf 7 h und auf 3,5 h stetig reduziert. Zunächst soll aber in 3.5.1 überprüft werden, ob der RNAi-Effekt nach dem Transfer der Tiere auf Kontrollplatten weiterhin anhält, oder wann er zum Erliegen kommt.

Zur Klärung dieser Frage diente die Entwicklung des Epithels der Spermathek im L3- und L4-Larvenstadium (Kimble & Hirsh, 1979). Diese kann durch *let-413(RNAi)* beeinflusst werden. Eine nicht korrekt ausgebildete Spermathek korreliert mit der verringerten Anzahl der produzierten Nachkommen (Iwasaki et al., 1996; Pilipiuk et al., 2009).

#### 3.5.1 Nach kurzer Puls-RNAi wirkt der RNAi-Effekt nach

Dies soll hier am Beispiel der Spermathek von *C. elegans* demonstriert werden. Wenn L1-Larven des Wildtyps N2 permanent auf *let-413(RNAi)*-Platten gehalten wurden, so erreichten diese nach 96 h das adulte Stadium, aber legten danach nur wenige F1-Embryonen ( $4 \pm 4/A$ ) im Vergleich zur Kontrollgruppe ( $275 \pm 38/A$ ) ab (Abb. 16).

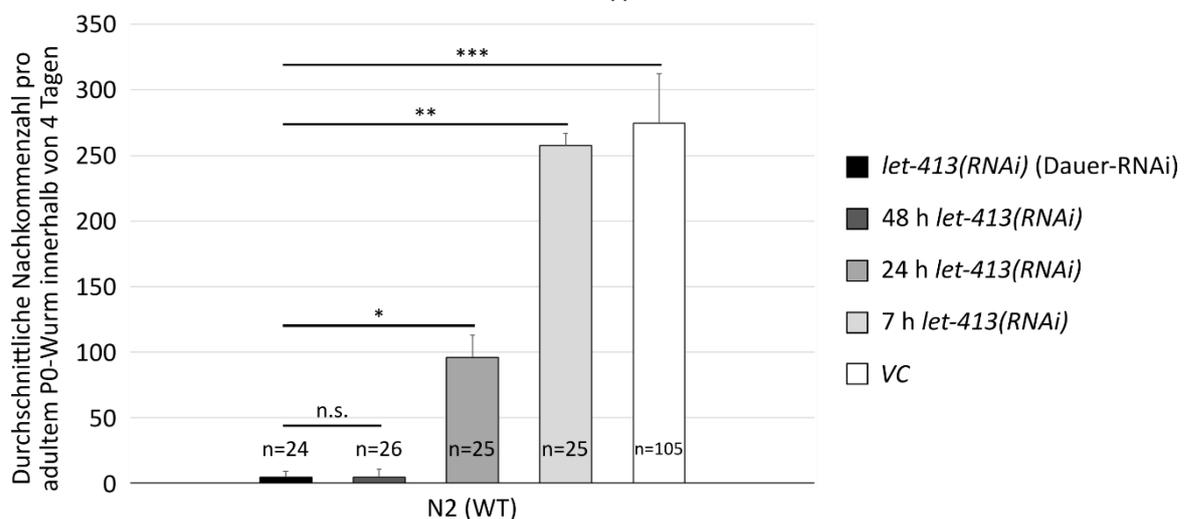
Nun wurden WT L1-Larven auf *let-413(RNAi)*-Platten gesetzt und nach 48 h, 24 h und 7 h jeweils auf Kontrollplatten transferiert. Sobald Nachkommen produziert wurden, wurde deren Anzahl über die folgenden vier Tage dokumentiert (Abb. 16). Nach 48 h *let-413* Puls-RNAi war die produzierte Nachkommenzahl mit  $4 \pm 6$  Nachkommen pro Adulten nicht signifikant unterschiedlich im Vergleich zu *let-413* Dauer-RNAi. Bei *let-413* Puls-RNAi von 24 h war die F1-Nachkommenzahl schon signifikant erhöht ( $96 \pm 18/A$ ) und bei 7 h Puls-RNAi ( $257 \pm 10/A$ ) glich sie der der Kontrollgruppe (Abb. 16). Diese Ergebnisse konnten an den Markerstämmen JM125 und CE81 bestätigt werden (Abb. 32).

Wie sind diese Ergebnisse nun zu interpretieren? Die *C. elegans* Spermathek wird innerhalb von 10 h von der Mitte des L3-Larvenstadiums bis zur Mitte des L4-Larvenstadiums gebildet

(30 h bzw. 40 h postembryonale Entwicklung) (Byerly et al., 1976; Kimble & Hirsh, 1979). 48 h *let-413* Puls-RNAi ab dem L1-Larvenstadium deckt also die gesamte Entwicklung der Spermathek ab und führt daher wie ein Dauerpuls zu fast 100 % Sterilität. 24 h *let-413* Puls-RNAi endet 6 h vor Beginn der Entwicklung der Spermathek, aber induziert trotzdem noch ca. 37 % Sterilität. Hochgerechnet müssten 16 h *let-413* Puls-RNAi also zu keiner Sterilität mehr führen. Da dieser Versuch nicht durchgeführt wurde, bestätigt zumindest 7 h *let-413* Puls-RNAi diese Annahme (Abb. 16).

Es bleibt also festzuhalten, dass 24 h Puls-RNAi, wie in dem hier gezeigten Beispiel bis zu 6 h nachwirken kann. Bei einem kürzeren Puls von 7 h oder 3,5 h müsste sich die Nachwirkzeit dementsprechend verringern. Ausschlaggebend für den RNAi-Effekt ist die Menge an doppelsträngiger RNA, die *C. elegans* mit den Bakterien als Nahrung in einer bestimmten Zeit aufnimmt. Diese wird dann zunächst in primäre siRNAs umgewandelt, woraufhin dann neue, sekundäre siRNAs produziert werden, die den RNAi-Effekt am Laufen halten (Grishok, 2013).

F1-Nachkommenzahl nach unterschiedlich lang andauernder postembryonaler *let-413* Puls-RNAi: Start Wildtyp N2 L1



**Abb. 16 Durchschnittliche Nachkommenzahl in adulten Wildtyp N2 Hermaphroditen nach postembryonaler *let-413* Puls- und Dauer-RNAi, beginnend in L1-Larven.**

Die *let-413(RNAi)*-Würmer wurden nach der jeweils angegebenen Zeit der Puls-RNAi auf Kontrollplatten umgesetzt. Die von den Adulten nach 48 h *let-413* Puls-RNAi produzierte Nachkommenzahl unterschied sich mit  $4 \pm 6$  F1/A nicht signifikant von der Nachkommenzahl nach *let-413* Dauer-RNAi ( $4 \pm 4$  F1/A). Die Nachkommenzahl war nach kürzerer *let-413* Puls-RNAi von 24 h *let-413* Puls-RNAi ( $96 \pm 18$  F1/A) und 7 h *let-413* Puls-RNAi ( $257 \pm 10$  F1/A) sowie nach einer Entwicklung ausschließlich auf Kontrollplatten ( $275 \pm 38$  F1/A) signifikant erhöht. \* p-Wert < 0,05, \*\* p-Wert < 0,01, \*\*\* p-Wert < 0,001.

### 3.5.2 Postembryonale *act-5* Puls-RNAi führt zu einer verzögerten Larval- und Adultentwicklung

Um eine ausreichende Herunterregulierung der *act-5* mRNA mittels RNAi durch Fütterung zu gewährleisten, wurden zunächst längere postembryonale *act-5* Puls-RNAi in L1-Larven im Wildtyp N2 (WT) und im darmspezifischen RNAi-Stamm OLB11 mit einer Dauer von 48 h und 24 h durchgeführt. Um die Auswirkungen kurzer Puls-RNAi von 7 h und 3,5 h *in vivo* untersuchen zu können, wurde dann auch der Stamm JM125 (ACT-5::YFP) eingesetzt. In der Kontrollgruppe waren die L1-Larven der Stämme WT, OLB11 und JM125 auf Kontrollplatten zu 100 % adult (Abb. 17).

**Im Wildtyp N2** entwickelten sich die L1-Larven, die sich zunächst für **48 h** (n=80) bzw. **24 h** (n=62) auf *act-5(RNAi)*-Platten befanden und dann auf Kontrollplatten umgesetzt wurden, nach vier Tagen nur bis zum L2/L3-Larvenstadium und entwickelten sich auch nach sieben Tagen nicht darüber hinaus (Abb. 17 A).

**Auch OLB11 L1-Larven** kamen nach **48 h** *act-5* Puls-RNAi nicht über das L2/L3-Larvenstadium hinaus (n=57, Abb. 17 B). Nach **24 h** *act-5* Puls-RNAi (n=56) waren dann am vierten Tag noch immer 92,8 % im L2/L3-Larvenstadium, aber 3,6 % im L4- und 3,6 % im jungen adulten Stadium. Diese entwickelten sich im weiteren Verlauf zu Adulten und produzierten Nachkommen. Bis zum siebten Tag sank der Anteil der Larven im L2/L3-Stadium auf 82,1 %, sodass sich 7,1 % noch zu L4-Larven, 1,8 % zu jungen Adulten und 9 % zu Adulten entwickelten.

Deshalb sollte nun überprüft werden, wie sich kürzere Puls-RNAi von 7 h bzw. 3,5 h ab dem L1-Larvenstadium auf das Erreichen des Adultstadiums im WT, in JM125 und in OLB11 auswirken.

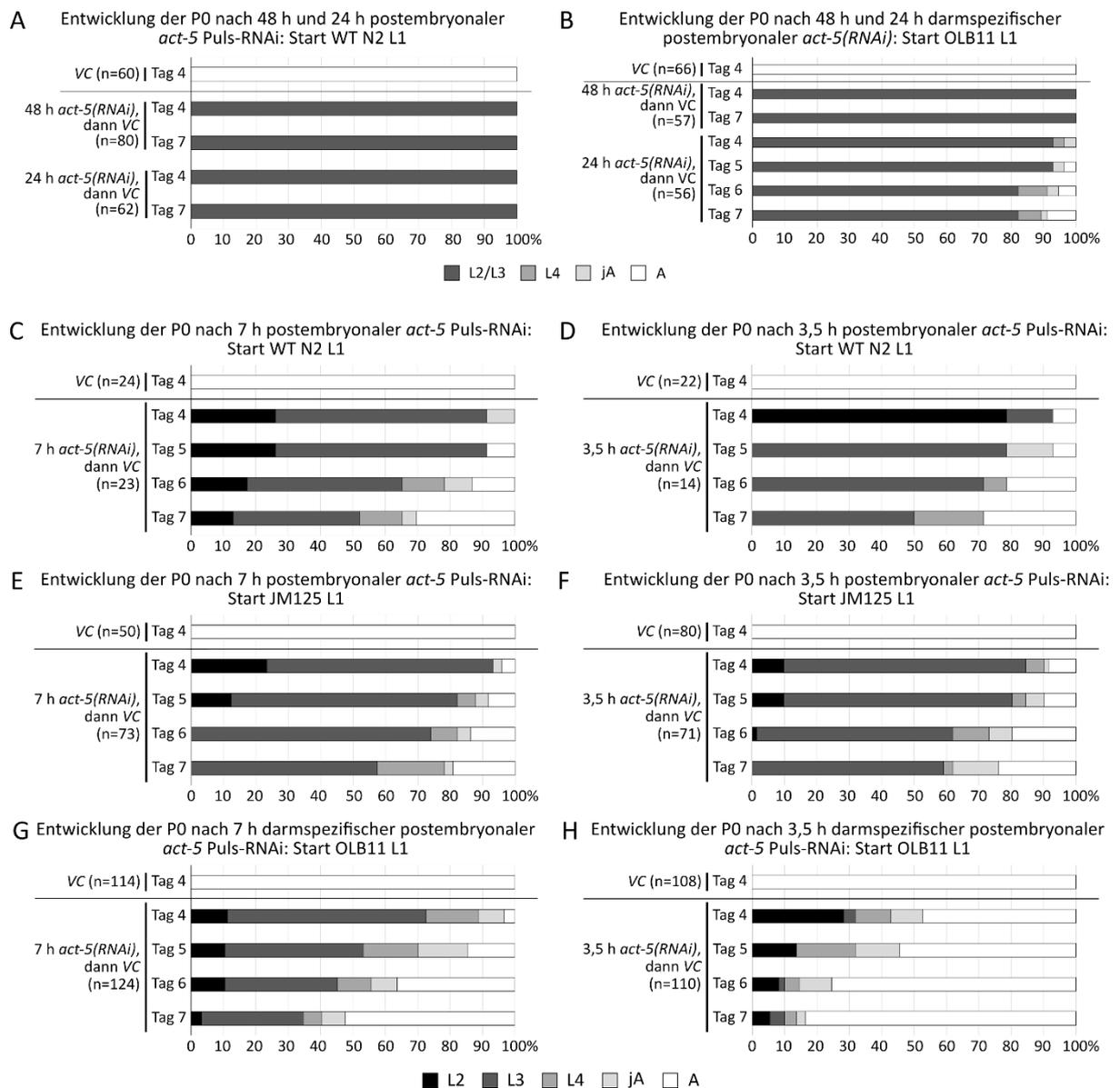
Alle L1-Larven der Kontrollgruppe der drei Stämme erreichten am vierten Tag das Adultstadium (Abb. 17). Nach 7 h bzw. 3,5 h *act-5* Puls-RNAi wurde die Entwicklung der L1-Larven auf Kontrollplatten bis zu Tag 7 dokumentiert. Die Details können Abb. 17 entnommen werden. Die Ergebnisse lassen sich wie folgt zusammenfassen:

- 1) Puls-RNAi von 7 h und 3,5 h bewirkte in den drei Stämmen eine verzögerte Entwicklung der L1-Larven zum Adulten, und nicht alle L1-Larven wurden adult.
- 2) Nach 7/3,5 h Puls-RNAi waren an Tag 4 im WT 0/7,1 % (n=23/14), in JM125 4,1/8,5 % (n=73/71) und in OLB11 3,2/47,3 % (n=124/110) der L1-Larven adult geworden.

- 3) An Tag 7 stieg dieser Prozentsatz im WT auf 30,4/28,6 %, in JM125 auf 19,2/23,9 % und in OLB11 auf 52,4/83,6 %.
- 4) Im darmspezifischen RNAi-Stamm OLB11 entwickelten sich die meisten Adulttiere und ihre Anzahl stieg nach 3,5 h Puls-RNAi deutlich an, wohingegen sie im WT und in JM125 ungefähr gleichblieb.
- 5) An Tag 7 nach 7/3,5 h Puls-RNAi arretierte die Entwicklung der Larven im WT, in JM125 und in OLB11 zu 39,1/50 % bzw. 57,5/59,1 % und 31,5/4,5 % im L3-Larvenstadium.

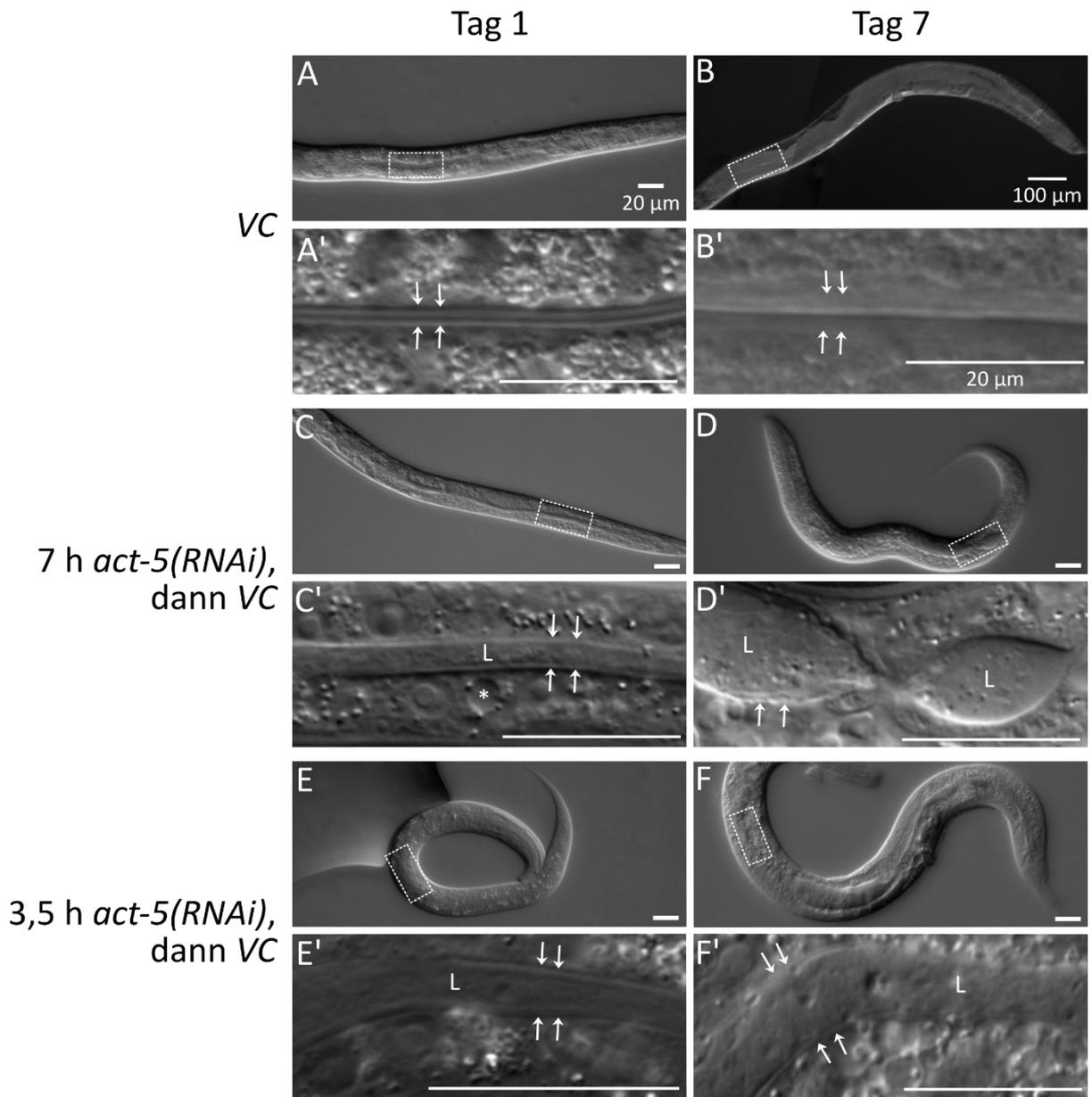
Aufgrund der Sequenzähnlichkeit der *C. elegans* Aktine (Abb. 13, Tab. 10) interferiert 7/3,5 h *act-5* Puls-RNAi wahrscheinlich im WT und in JM125 auch mit der postembryonalen Zellteilung (Sulston & Horvitz, 1977), was die Unterschiede im larvalen L3-Arrest gegenüber OLB11 erklären könnte. Die darmspezifische Herunterregulierung der *act-5* Genfunktion für 24/7/3,5 h (Abb. 17 B,G,H) verzögert weiterhin die Larvalentwicklung, jedoch erreichen mehr Tiere das Adultstadium (s. Diskussion).

Im Folgenden wurden nun in OLB11 die morphologischen Veränderungen des *C. elegans* Darmepithels nach 7/3,5 h *act-5* Puls-RNAi bei DIK-Mikroskopie dokumentiert. Die L1-Larven wurden nach der jeweiligen Puls-RNAi auf Kontrollplatten transferiert und das Darmepithel nach 24 h (Tag 1) und nach 168 h (Tag 7) analysiert (Abb. 18). In der Kontrollgruppe war sowohl an Tag 1 in der L2-Larve als auch an Tag 7 im Adulten ein freies Lumen, umgeben von einem apikalen Bürstensaum (Pfeile), zu erkennen (Abb. 18 A', B'). An Tag 1 nach 7/3,5 h *act-5* Puls-RNAi war kein freies Lumen (L) zu beobachten (Abb. 18 C', E'). Das Lumen erschien verbreitert und wahrscheinlich mit aufgenommenen Bakterien gefüllt. Es war, wie in den Larven auf Kontrollplatten, von einem apikalen Bürstensaum umgeben (Pfeile). An Tag 7 erschien der apikale Bürstensaum schmal (Abb. 18 D', F', Pfeile) um das amorphe Lumen (L). Stellenweise traten Verdickungen, aber auch Einschnürungen des Darmlumens auf (Abb. 18 D, D', F). Ähnliche Phänotypen sind auch in der *ifo-1* Mutante zu beobachten (Carberry et al., 2012), bei der das terminale Netzwerk im Darmepithel fehlt (s. Diskussion).



**Abb. 17** Entwicklung der P0 auf Kontrollplatten im Anschluss an die angegebene *act-5* Puls-RNAi in Wildtyp N2, JM125 und OLB11 L1-Larven.

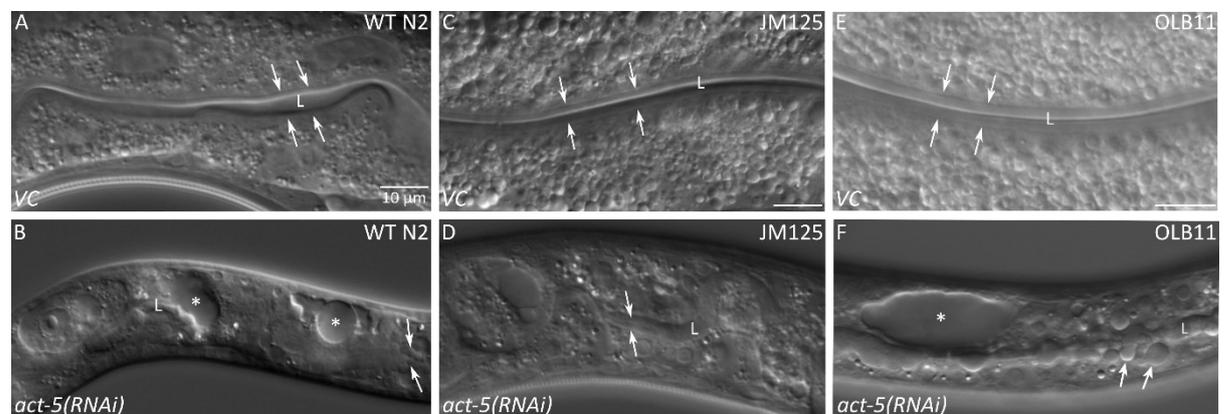
Auf Kontrollplatten (VC) waren die L1-Larven der drei Stämme an Tag 4 zu 100% A. (A) 48 h und 24 h *act-5* Puls-RNAi in N2 L1: an Tag 4 und Tag 7 zu 100% im L2/L3-Stadium, keine Weiterentwicklung. (B) 48 h/24 h *act-5* Puls-RNAi in OLB11 L1: 100% im L2/L3-Stadium, keine Weiterentwicklung/Tag 4: 92,8% L2/L3, 3,6% L4, 3,6% jA; Tag 5: 92,8% L2/L3, 3,6% jA, 3,6% A; Tag 6: 82,1% L2/L3, 8,9% L4, 3,6% jA, 5,4% A; Tag 7: 82,1% L2/L3, 7,1% L4, 1,8% jA, 9% A. (C) 7 h *act-5* Puls-RNAi in N2 L1: Tag 4: 26,1% L2, 65,2% L3, 8,7% jA; Tag 5: 26,1% L2, 65,2% L3, 8,7% A; Tag 6: 17,4% L2, 47,8% L3, 13,0% L4, 8,7% jA, 13,0% A; Tag 7: 13,0% L2, 39,1% L3, 13,0% L4, 4,3% jA, 30,4% A. (D) 3,5 h *act-5* Puls-RNAi in N2 L1: Tag 4: 78,6% L2, 14,3% L3, 7,1% A; Tag 5: 78,6% L3, 14,3% jA, 7,1% A; Tag 6: 71,4% L3, 7,1% L4, 21,4% A; Tag 7: 50% L3, 21,4% L4, 28,6% A. (E) 7 h *act-5* Puls-RNAi in JM125 L1: Tag 4: 23,3% L2, 69,9% L3, 2,7% jA, 4,1% A; Tag 5: 12,3% L2, 69,9% L3, 5,5% L4, 4,1% jA, 8,2% A; Tag 6: 74% L3, 8,2% L4, 4,1% jA, 13,7% A; Tag 7: 57,5% L3, 20,5% L4, 2,7% jA, 19,2% A. (F) 3,5 h *act-5* Puls-RNAi in JM125 L1: Tag 4: 9,9% L2, 74,6% L3, 5,6% L4, 1,4% jA, 8,5% A; Tag 5: 9,9% L2, 70,4% L3, 4,2% L4, 5,6% jA, 9,9% A; Tag 6: 1,4% L2, 60,6% L3, 11,3% L4, 7% jA, 19,7% A; Tag 7: 59,2% L3, 2,8% L4, 14,1% jA, 23,9% A. (G) 7 h *act-5* Puls-RNAi in OLB11 L1: Tag 4: 11,3% L2, 61,3% L3, 16,1% L4, 8,1% jA, 3,2% A; Tag 5: 10,5% L2, 42,7% L3, 16,9% L4, 15,3% jA, 14,5% A; Tag 6: 10,5% L2, 34,7% L3, 10,5% L4, 8,1% jA, 36,3% A; Tag 7: 3,2% L2, 31,5% L3, 5,6% L4, 7,3% jA, 52,4% A. (H) 3,5 h *act-5* Puls-RNAi in OLB11 L1: Tag 4: 28,2% L2, 3,6% L3, 10,9% L4, 10% jA, 47,3% A; Tag 5: 13,6% L2, 18,2% L4, 13,6% jA, 54,5% A; Tag 6: 8,2% L2, 1,8% L3, 4,5% L4, 10,0% jA, 75,5% A; Tag 7: 5,5% L2, 4,5% L3, 3,6% L4, 2,7% jA, 83,6% A. Legende: (A, B) L2/L3 (dunkelgrau), L4 (grau), jA: junge Adulte (hellgrau), A: Adulte (weiß); (C-H): L2 (schwarz), L3 (dunkelgrau), L4 (grau), jA: junge Adulte (hellgrau), A: Adulte (weiß).



**Abb. 18** DIK-Aufnahmen des Darmepithels an Tag 1 und Tag 7 nach 7 h bzw. 3,5 h darmspezifischer postembryonaler *act-5* Puls-RNAi, Start OLB11 L1.

(A-B') **Auf Kontrollplatten:** Im Darmepithel war ein freies Lumen, umgeben von einem apikalen Bürstensaum (Pfeile), zu sehen. (C, C') **Tag 1 nach 7 h postembryonaler *act-5* Puls-RNAi:** Es war ein von einem apikalen Bürstensaum (Pfeile) umgebenes Lumen (L) zu erkennen, das nicht frei zu sein schien. (D, D') **Tag 7 nach 7 h *act-5* Puls-RNAi:** Es waren Verdickungen des Lumens (L) im Darmepithel zu erkennen; das Lumen schien stellenweise von einem schmalen apikalen Bürstensaum begrenzt zu sein (Pfeile). (E, E') **Tag 1 nach 3,5 h postembryonaler *act-5* Puls-RNAi:** Es war ein von einem apikalen Bürstensaum (Pfeile) umgebenes Lumen (L) zu erkennen, das nicht frei zu sein schien (F, F') **Tag 7 nach 3,5 h *act-5* Puls-RNAi:** Es traten stellenweise Verdickung des Darmlumens (F) sowie ein schmaler apikaler Bürstensaum (F', Pfeile) um das amorphe Lumen (L) auf. Größenbalken: (B) 100  $\mu$ m, (A-F', außer B) 20  $\mu$ m.

Weitere morphologische Veränderungen wurden auch in den arretierten WT, JM125 und OLB11 Larven bei postembryonaler *act-5* Dauer-RNAi beobachtet (Abb. 19). Im Darmepithel der Würmer auf Kontrollplatten war jeweils ein durchgängig intaktes Darmepithel, in dem das freie Lumen (L) apikal von einem Bürstensaum (Pfeile) ausgekleidet wurde, zu sehen (Abb. 19 A (WT N2), C (JM125), E (OLB11)). Bei postembryonaler *act-5* Dauer-RNAi wurden die Tiere hingegen nicht adult. Im Darmepithel war ein amorphes Lumen (L) (Abb. 19 B, D, F) zu erkennen. Der apikale Bürstensaum war, wahrscheinlich durch angeschwollene Darmzellen, nur stellenweise klar abgegrenzt zum Lumen zu erkennen (Abb. 19 D, Pfeile). Es traten Vakuolen auf, die sich vermutlich in den Darmzellen befinden (Asteriske in Abb. 19 B und F). Des Weiteren waren kugelförmige „Ausstülpungen“ des Lumens in das Zytoplasma (Pfeile in Abb. 19 B, F) auffällig. Angesichts des konformen Auftretens von Veränderungen im Darmepithel und larvalem Arrest in den wildtypischen Stämmen N2, JM125 und CE81 (N2, JM125: Abb. 19 A-D', CE81: Abb. 12 A', B') und im darmspezifischen RNAi-Stamm OLB11 nach postembryonaler *act-5* Dauer-RNAi (Abb. 19 E-F') ist davon auszugehen, dass dies auf die Auswirkungen von *act-5(RNAi)* im Darm zurückgeführt werden kann.



**Abb. 19** DIK-Aufnahmen bei postembryonaler *act-5* Dauer-RNAi in N2, JM125 und OLB11 L1-Larven (A, B) **Start WT N2 L1, Tag 3.** (C, D) **Start JM125 L1, Tag 4.** (E, F) **Start OLB11 L1, Tag 7.** (A, C, E) **Auf Kontrollplatten** befanden sich junge adulte (A) bzw. adulte Würmer (C, E). Im Darmepithel war ein Lumen (L) mit apikalem Bürstensaum (Pfeile) zu erkennen. (B, D, F) **Bei *act-5(RNAi)*** waren die Tiere weder junge Adulte noch adult. (B) **N2:** Im Darmepithel waren Vakuolen (weiße Asterisk) und ein amorphes Lumen (L) zu erkennen. Die Pfeile markieren kugelförmige „Ausstülpungen“ des Lumens in das Zytoplasma. (D) **JM125:** Im Darmepithel war ein amorphes Lumen (L) zu erkennen. Weiße Pfeile markieren den stellenweise erkennbaren apikalen Bürstensaum. (F) **OLB11:** Im Darmepithel waren Vakuolen (Asterisk) und ein amorphes Lumen (L) zu erkennen. Die Pfeile markieren kugelförmige „Ausstülpungen“ des Lumens in das Zytoplasma. Größenbalken: 10  $\mu$ m

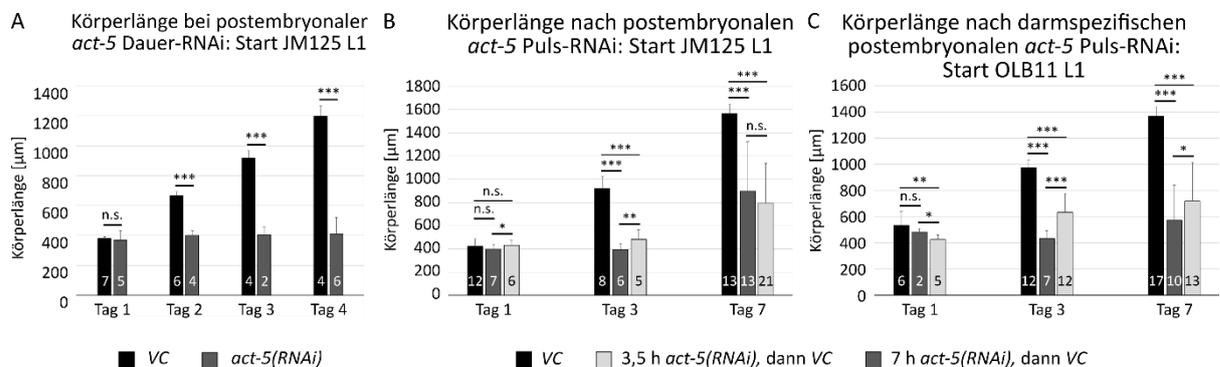
Wie gezeigt wurde, wirken sich sowohl *act-5* Dauer- als auch Puls-RNAi auf die Entwicklung und das Erscheinungsbild der Würmer aus. Um diese Untersuchungen zu ergänzen, wurde auch das Längenwachstum untersucht. Es wurde für die Körperlänge vom anterioren (Mund) bis posterioren Ende (Schwanzspitze) eine Längenmessung durchgeführt (Abb. 7 in 2.5.1). In der Literatur ist die Körperlänge einer L1-Larve mit 250  $\mu\text{m}$  angegeben (Abb. 2 in 1.2, (Byerly et al., 1976)). In den folgenden drei Larvenstadien wächst die Körperlänge um 100 – 130  $\mu\text{m}$  sowie um 210 – 280  $\mu\text{m}$  bei den Entwicklungsschritten zum jungen Adulten und Adulten.

Das Längenwachstum wurde bei postembryonaler *act-5* Dauer-RNAi an den ersten vier Tage gemessen (Abb. 20 A). Die Zunahme der Körperlänge von Tag 1 bis Tag 4 von 380  $\mu\text{m}$  auf 1198  $\mu\text{m}$  der JM125 Tiere auf Kontrollplatten entspricht ungefähr den Werten für eine L2-Larve (Tag 1) und ein adultes Tier (Tag 4). Nach einer anfänglichen Zunahme um 42  $\mu\text{m}$  (Körperlänge) stagnierte das Längenwachstum bei postembryonaler *act-5* Dauer-RNAi (Abb. 20 A). Eine Körperlänge von 400 – 410  $\mu\text{m}$  liegt zwischen den Mittelwerten für eine L2- und eine L3-Larve (Abb. 2). Dieses Ergebnis passt zu der Beobachtung eines larvalen Arrests. In CE81 (PEPT-1::DsRed) Larven wurde bei postembryonaler *act-5* Dauer-RNAi ebenfalls beobachtet, dass das Längenwachstum der Larven stagniert, und dass die Körperlänge der Larven der Kontrollgruppe zu den bekannten Werten der Entwicklungsstadien passt (Abb. 33 A).

Nach Puls-RNAi wurde, für eine besser Übersichtlichkeit, die Körperlänge in JM125 und OLB11 an Tag 1, Tag 3 und Tag 7 aufgetragen (Abb. 20 B, C). Über einen Verlauf von sieben Tagen wird diese von JM125 Larven in Abb. 33 B gezeigt. An Tag 3 hatten die Larven der Kontrollgruppe in JM125 und OLB11 eine durchschnittliche Körperlänge von 921  $\mu\text{m}$  bzw. 975  $\mu\text{m}$  erreicht (Abb. 20 B, C, Tag 3). Dies entspricht der Körperlänge eines jungen Adulten, was wiederum zu der Beobachtung passt, dass die Larven der Kontrollgruppe an Tag 4 alle zu Adulten entwickelt waren. Die Körperlänge an Tag 7 lag um 200 – 400  $\mu\text{m}$  höher als die Spanne, die in der Literatur für das adulte Stadium angegeben ist (Abb. 20 B, C, Tag 7). Die JM125 Kontrollgruppe hatte an Tag 4 bereits eine um 100  $\mu\text{m}$  höhere durchschnittliche Körperlänge als für Adulte bekannt ist, die sich an Tag 5 um weitere 200  $\mu\text{m}$  erhöhte (Abb. 33 B, s. Diskussion).

Nach Puls-RNAi sind die Larven kürzer als in der Kontrollgruppe (Abb. 20 B, C). Dies ist auch in den Übersichtsaufnahmen in Abb. 18 (OLB11) zu erkennen. Die Körperlänge der JM125

Tiere war, außer an Tag 7, nach 7 h Puls-RNAi kleiner als nach 3,5 h Puls-RNAi (Abb. 20 B, Abb. 33 B). An Tag 7 war nach 7 h Puls-RNAi der Anteil der L3 Larven um 2 % geringer als in der anderen Gruppe. Der Austausch in der Position, wessen Körperlänge im Vergleich kürzer ist, kann sich durch ein solches Fortschreiten in den Entwicklungsstadien ergeben haben. Die OLB11 Tiere erreichten nach 3,5 h Puls-RNAi eine größere Körperlänge als nach 7 h Puls-RNAi. Dies passt zu der Verteilung auf die Entwicklungsstadien: An Tag 7 war nach 3,5 h Puls-RNAi der Anteil der L3 Larven deutlich geringer (4,5 % vs. 31 % nach 3,5/7 h), und mehr Larven erreichten das adulte Stadium (83,6 % vs. 52,4 % nach 3,5/7 h) (Abb. 17 G, H). Jeweils an Tag 7 ist die Standardabweichung höher als zu den anderen Messzeitpunkten. Zu diesem Zeitpunkt sind die Unterschiede in den Entwicklungsstadien am größten, da aufgrund der verzögerten Entwicklung nach Puls-RNAi die Tiere nicht gleichmäßig weit entwickelt sind. Dadurch unterscheiden sich die Mittelwerte der Körperlänge (JM125: 900  $\mu\text{m}$  bzw. 793  $\mu\text{m}$ ; OLB11: 573  $\mu\text{m}$  bzw. 720  $\mu\text{m}$ ) auch von der Körperlänge eines Adulten in der Literatur (1150  $\mu\text{m}$ , Abb. 2 in 1.2), obwohl bis zu Tag 7 nach Puls-RNAi das adulte Stadium erreicht und auch Nachkommen gebildet wurden.



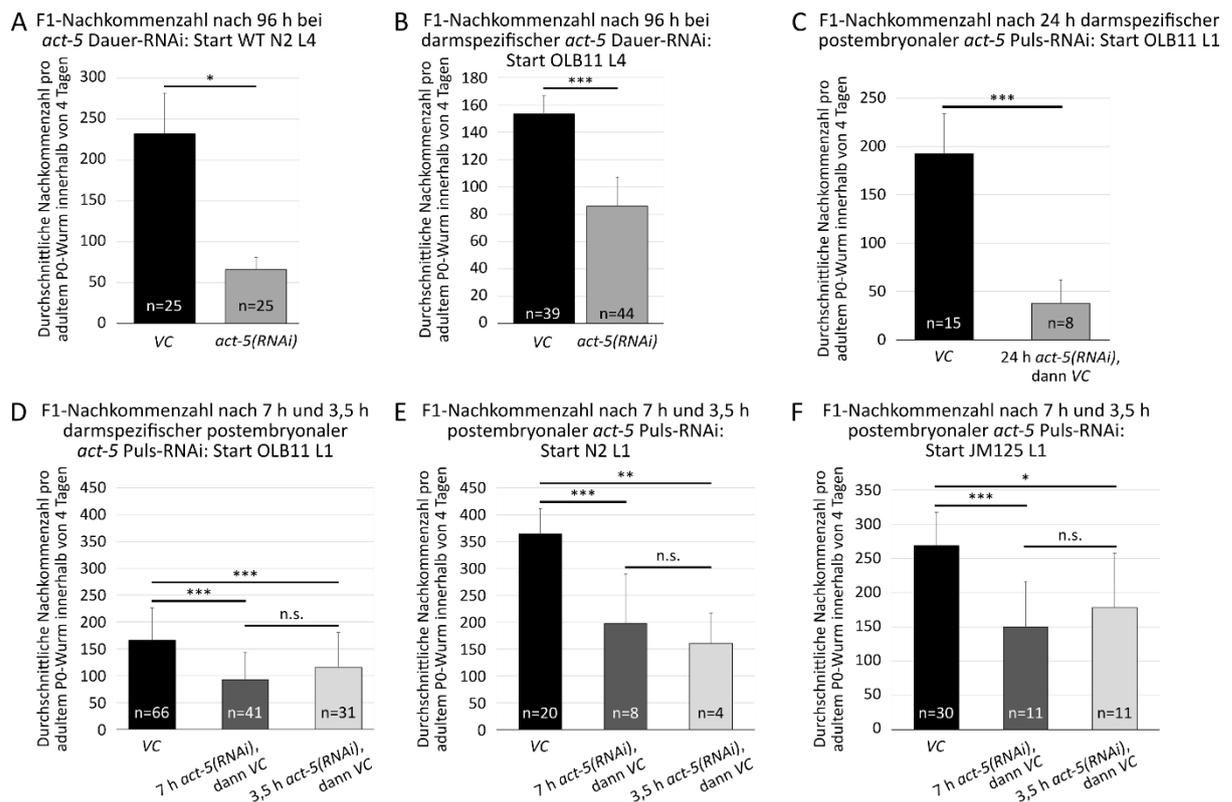
**Abb. 20 Körperlänge bei postembryonaler *act-5* Dauer-RNAi in JM125 und nach 7 h und 3,5 h postembryonaler *act-5* Puls-RNAi in JM125 und OLB11 L1-Larven.**

Tag 1–4, Tag 7 sind Messzeitpunkte (A) Tag 1-4 geben hier gleichzeitig auch die Verweildauer auf RNAi an. (A) **Start JM125 L1, Körperlänge** an Tag 1, Tag 2, Tag 3 und Tag 4 auf Kontrollplatten: 380 $\pm$ 10  $\mu\text{m}$ , 666 $\pm$ 27  $\mu\text{m}$ , 918 $\pm$ 48  $\mu\text{m}$  und 1198 $\pm$ 70  $\mu\text{m}$ ; bei *act-5(RNAi)*: 368 $\pm$ 63  $\mu\text{m}$ , 402 $\pm$ 29  $\mu\text{m}$ , 405 $\pm$ 53  $\mu\text{m}$  und 410 $\pm$ 110  $\mu\text{m}$ . (B) **Start JM125 L1, Körperlänge** an Tag 1, Tag 3 und Tag 7 auf Kontrollplatten: 422 $\pm$ 66  $\mu\text{m}$ , 921 $\pm$ 100  $\mu\text{m}$  und 1565 $\pm$ 87  $\mu\text{m}$ ; nach 7 h postembryonaler *act-5* Puls-RNAi: 397 $\pm$ 42  $\mu\text{m}$ , 395 $\pm$ 51  $\mu\text{m}$  und 900 $\pm$ 424  $\mu\text{m}$ ; nach 3,5 h postembryonaler *act-5* Puls-RNAi: 432 $\pm$ 46  $\mu\text{m}$ , 481 $\pm$ 84  $\mu\text{m}$  und 793 $\pm$ 342  $\mu\text{m}$ . (C) **Start OLB11 L1, Körperlänge** an Tag 1, Tag 3 und Tag 7 auf Kontrollplatten: 532 $\pm$ 108  $\mu\text{m}$ , 975 $\pm$ 61  $\mu\text{m}$  und 1370 $\pm$ 68  $\mu\text{m}$ ; nach 7 h postembryonaler *act-5* Puls-RNAi: 485 $\pm$ 26  $\mu\text{m}$ , 432 $\pm$ 63  $\mu\text{m}$  und 573 $\pm$ 268  $\mu\text{m}$ ; nach 3,5 h postembryonaler *act-5* Puls-RNAi: 426 $\pm$ 36  $\mu\text{m}$ , 634 $\pm$ 143  $\mu\text{m}$  und 720 $\pm$ 296  $\mu\text{m}$ . n.s.: nicht signifikant, \*p-Wert<0,05, \*\*p-Wert<0,01, \*\*\* p-Wert<0,001.

### 3.5.3 Postembryonale *act-5* Puls-RNAi führen zu einer verringerten Nachkommenzahl

Da der Darm Dotterproteine produziert, die in die Oozyten eingelagert werden (McGhee, 2007), soll nun überprüft werden, inwieweit die Herunterregulierung der *act-5* Genfunktion die Anzahl der Nachkommen beeinflusst. Bei postembryonaler *act-5* Dauer-RNAi arretiert die Entwicklung der L1-Larven (Gobel et al., 2004; MacQueen et al., 2005), sodass hier mit Dauer-RNAi bei L4-Larven gestartet wurde, um zu prüfen, ob dies überhaupt Auswirkungen auf die Nachkommenzahl hat. Im Wildtyp N2 (WT) und im darmspezifischen RNAi-Stamm OLB11 wurden bei Dauer-RNAi innerhalb von vier Tagen deutlich weniger Nachkommen gebildet als auf Kontrollplatten (WT: 232 F1/A zu 66 F1/A, Abb. 21 A; OLB11: 153 F1/A zu 86 F1/A, Abb. 21 B).

Nun wurden OLB11, WT und JM125 (ACT-5::YFP) L1-Larven mit postembryonaler *act-5* Puls-RNAi behandelt und die Nachkommenzahl dokumentiert. In OLB11 wurden nach 24 h *act-5* Puls-RNAi signifikant weniger Nachkommen gebildet (VC: 192 F1/A zu 38 F1/A, Abb. 21 C). Nach 7/3,5 h postembryonaler *act-5* Puls-RNAi war die F1-Nachkommenzahl im Vergleich zur Kontrolle sowohl in OLB11 als auch im WT und in JM125 signifikant verringert (Abb. 21 D-F). **In OLB11** verringerte sie sich von 165 F1/A (VC) auf 92 F1/A bzw. 115 F1/A (Abb. 21 D), **im WT** von 365 F1/A (VC) auf 198 F1/A bzw. 160 F1/A (Abb. 21 E) und **in JM125** von 269 F1/A (VC) auf 150 F1/A bzw. 178 F1/A nach (Abb. 21 F). Die ungewöhnlich hohe Nachkommenzahl in der Kontrollgruppe des WTs war wahrscheinlich auf die Anwesenheit von Männchen in der Population, bevor die Tiere vereinzelt wurden, zurückzuführen.



**Abb. 21** Reduzierung der F1-Nachkommenzahl bei *act-5* Dauer-RNAi in Wildtyp N2 und OLB11 L4-Larven und nach postembryonaler *act-5* Puls-RNAi in OLB11, N2 und JM125 L1-Larven.

(A) F1-Nachkommenzahl der WT N2 L4-Larven: 232±49 F1/A auf Kontrollplatten, bei *act-5(RNAi)* 66±15 F1/A. (B) F1-Nachkommenzahl der OLB11 L4-Larven: 153±14 F1/A auf Kontrollplatten, bei *act-5(RNAi)* 86±21 F1/A. (C) F1-Nachkommenzahl der OLB11 L1-Larven: 192±41 F1/A auf Kontrollplatten, nach 24 h postembryonaler *act-5* Puls-RNAi 38±24 F1/A. (D) F1-Nachkommenzahl der OLB11 L1-Larven: 165±61 F1/A auf Kontrollplatten, nach 7 h und 3,5 h postembryonaler *act-5* Puls-RNAi 92±50 F1/A bzw. 115±65 F1/A. (E) F1-Nachkommenzahl der N2 L1-Larven: 365±47 F1/A auf Kontrollplatten, nach 7 h und 3,5 h postembryonalem *act-5* Puls-RNAi 198±92 F1/A bzw. 160±57 F1/A. (F) F1-Nachkommenzahl der JM125 L1-Larven: 269±48 F1/A auf Kontrollplatten, nach 7 h und 3,5 h postembryonaler *act-5* Puls-RNAi 150±65 F1/A bzw. 178±80 F1/A. n.s.: nicht signifikant, \*p-Wert<0,05, \*\*p-Wert<0,01, \*\*\* p-Wert<0,001.

### **3.6 Darmspezifische *rab-11.1(RNAi)* führt zu einer verringerten Nachkommenzahl in der P0 und zu einer verzögerten Entwicklung der F1**

Die Beeinträchtigung des endosomalen Transports in Epithelien führt zu einer fehlerhaften Lokalisierung von Membrankomponenten, die sich auch auf die Mikrovilli auswirken kann (Parker et al., 2018; Román-Fernández & Bryant, 2016). Der Verlust von APS-1 führt zu einer Reduktion RAB-11 positiver Endosomen (Gillard et al., 2015). Wird RAB-11 ausgeschaltet, ruft dies eine intrazelluläre Akkumulation von ACT-5 und PEPT-1 hervor (Cheng et al., 2022; Shafaq-Zadah et al., 2012). Wie sich ein auf den Darm beschränkter RAB-11 Verlust auf die Entwicklung und Nachkommenzahl auswirkt, wurde hier im darmspezifischen RNAi-Stamm OLB11 untersucht.

Zu *rab-11* gehören zwei Isoformen, *rab-11.1* und *rab-11.2*, die zu 85,2 % identisch sind (Los et al., 2011). Der Anwendung in anderen Studien folgend, wurden hier auch die *E. coli* HT115 RNAi-Fütterbakterien (Klon I-19G13) aus der RNAi-Fütterbibliothek (Fraser et al., 2000; Kamath et al., 2003; Kamath & Ahringer, 2003) verwendet. Weitere Gründe dafür sind das höhere Expressionslevel von *rab-11.1* im Vergleich zu *rab-11.2* (Los et al., 2011) sowie das Auftreten eines stärkeren Phänotyps bei *rab-11.1(RNAi)* als bei *rab-11.2(RNAi)* (Szumowski et al., 2014, 2016).

Bei postembryonaler *rab-11.1(RNAi)* in L1-Larven lag der Wildtyp N2 (WT) ab dem zweiten Tag hinter der Entwicklung der Kontrollgruppe und verblieb im L4-Stadium (Abb. 22 A). An Tag 13 reagierten diese Larven nicht mehr auf Berührungen (†).

Die OLB11 Larven entwickelten sich in den ersten drei Tagen leicht verzögert im Vergleich zur Kontrollgruppe, erreichten dann zusammen mit dieser an Tag 4 das adulte Stadium (Abb. 22 B) und bildeten F1-Nachkommen (Abb. 22 C). Diese waren von 209 F1/A auf 67 F1/A reduziert.

Die OLB11 F1-Nachkommen wurden auf *rab-11.1(RNAi)*-Platten weitergesetzt, um zu beobachten, ob diese sich bei einem anhaltenden RNAi-Effekt durch embryonale und postembryonale RNAi zu Adulten entwickeln können.

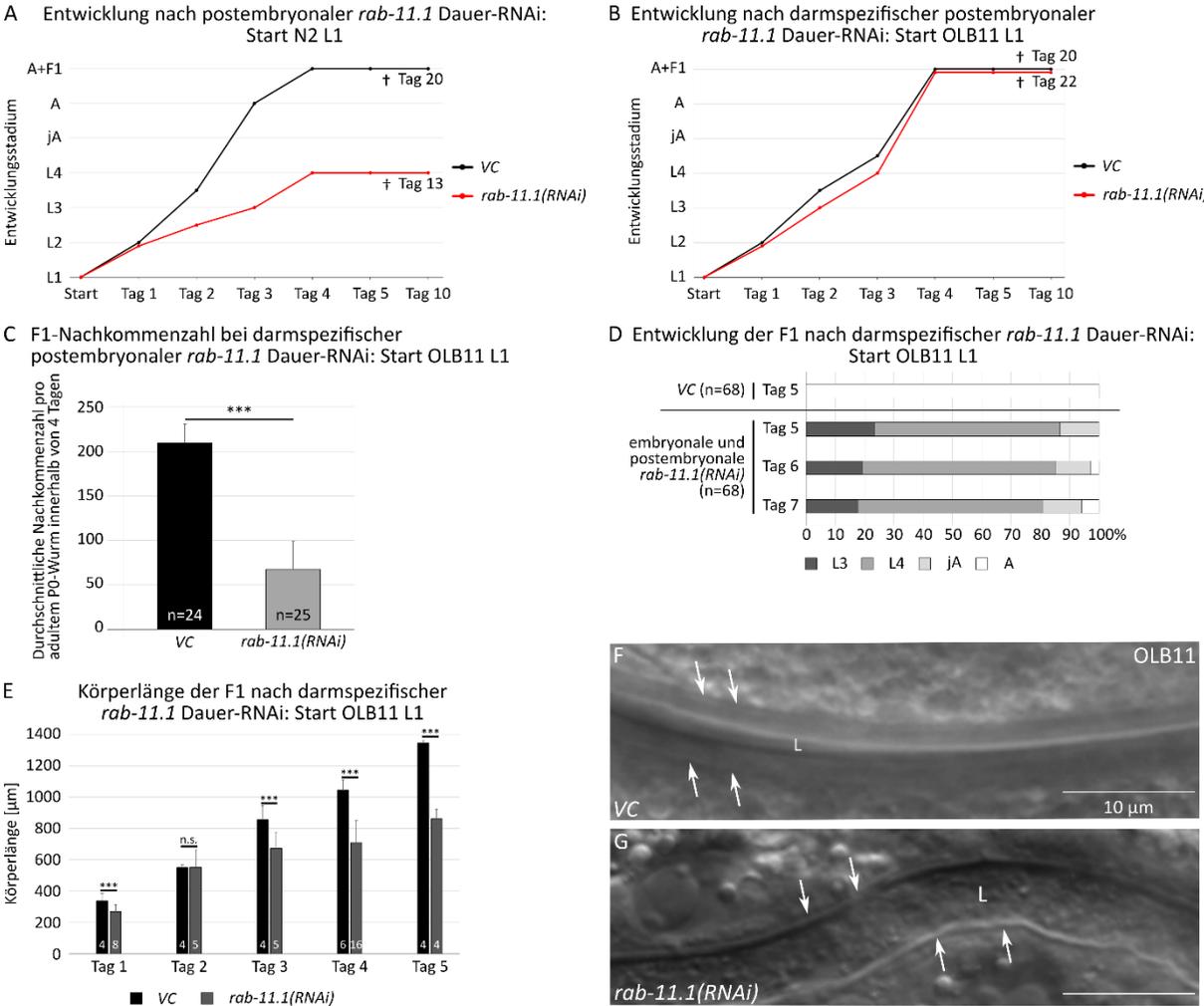
An Tag 5 waren die Larven der Kontrollgruppe zu 100 % adult und bildeten F2-Nachkommen. Währenddessen waren auf *rab-11.1* Dauer-RNAi an Tag 5 23,5 % im L3-, 63,2 % der Larven im L4-Stadium sowie 13,2 % junge Adulte (Abb. 22 D). An Tag 7 verblieben noch 17,6 % im L3- bzw. 63,2 % im L4-Stadium. Der Anteil an jungen Adulten lag weiterhin bei 13,2 %. Manche

Tiere hatten sich weiterentwickelt, denn der Anteil an Adulten stieg von 2,9 % (Tag 6) auf 5,9 % (Tag 7) an.

Um diese verzögerte Entwicklung im Detail zu untersuchen, wurde die Körperlänge an Tag 1 bis Tag 5 vermessen (Abb. 22 E). Diese nimmt kontinuierlich mit der Zeit zu. Die Körperlänge der Kontrollgruppe wuchs von Tag 1 bis Tag 5 von 337  $\mu\text{m}$  auf 1346  $\mu\text{m}$ . Dies stimmt mit der Körperlänge einer L2-Larve (Tag 1 nach dem Schlüpfen) und einem adulten Tier (Tag 5) überein (vgl. Abb. 2). Bei *rab-11.1* Dauer-RNAi nahm die Körperlänge in diesem Zeitraum von 269  $\mu\text{m}$  auf 861  $\mu\text{m}$  zu. Ab Tag 3 vergrößert sich die Differenz in der Körperlänge mit jedem Tag, da die Larven auf *rab-11.1(RNAi)* arretieren, während sich die Kontrollgruppe zu Adulten entwickelte. Eine mittlere Körperlänge von 861  $\mu\text{m}$  liegt zwischen den angegebenen Werten für eine L4-Larve bzw. einen jungen Adulten (Abb. 2). Dies passt zu der Beobachtung, dass 63,2% der F1-Larven auf *rab-11.1(RNAi)* an Tag 5 im L4-Stadium waren (Abb. 22 D).

Neben den Auswirkungen auf Entwicklung und Nachkommen wurden auch morphologische Änderungen in OLB11 beobachtet. Im Vergleich zu der Kontrollgruppe erschien das Darmlumen (L) in *rab-11.1(RNAi)*-Würmern nicht frei, und der apikale Bürstensaum war weniger prominent zu erkennen (Abb. 22 F, G). Diese Veränderungen im Darmepithel traten auch in der OLB11 F1 bei *rab-11.1* Dauer-RNAi auf (Daten nicht gezeigt). Diese Auswirkungen auf das Darmlumen und den apikalen Bürstensaum bei *rab-11.1(RNAi)* ähneln dem bei postembryonaler *act-5* Dauer- und Puls-RNAi beobachteten Phänotyp in DIK-Aufnahmen (Abb. 18, Abb. 19). Allerdings traten Entwicklungsverzögerungen erst bei der Kombination aus embryonaler und postembryonaler *rab-11.1(RNAi)* auf.

RAB-11 ist, als Komponente des endosomalen Transports, abhängig von dessen Regulationskomponenten. Umgekehrt ist die Funktion von RAB-11 wesentlich für die Cargo-Proteine, die transportiert werden. Im Folgenden wurde untersucht, ob sich die Herunterregulierung von zwei Kandidaten aus den Bereichen Regulation und Cargo auf die Entwicklung und Nachkommenzahl auswirkt.



**Abb. 22 Larvaler Arrest im Wildtyp N2 sowie Entwicklung und Anzahl der Nachkommen bei postembryonaler *rab-11.1(RNAi)* in P0 und F1 in OLB11.**

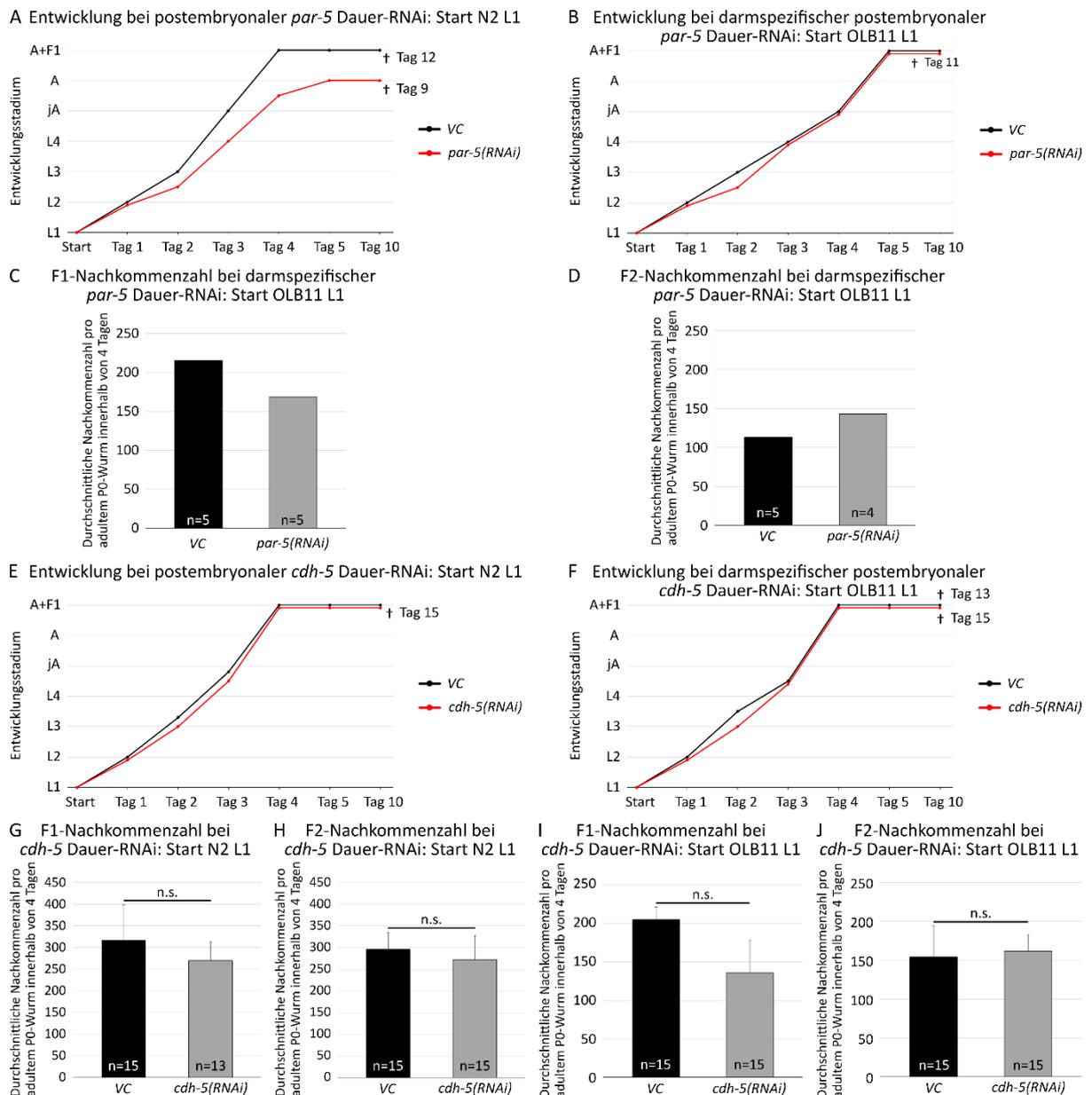
(A) **Entwicklung, Start WT L1** (jeweils n=120): In der Kontrollgruppe waren die Tiere an Tag 3 adult und bildeten ab Tag 4 F1-Nachkommen. Bei *rab-11.1* Dauer-RNAi verzögerte sich die Entwicklung ab Tag 2. Bis Tag 4 wurde nur das L4-Stadium erreicht, in dem die Tiere arretierten. (B) **Entwicklung, Start OLB11 L1** (jeweils n=240): In der Kontrollgruppe waren die Tiere ab Tag 4 Adulte und bildeten F1-Nachkommen. Bei *rab-11.1* Dauer-RNAi war die Entwicklung in den ersten drei Tagen leicht verzögert. Die Larven erreichten bis Tag 4 das adulte Stadium und bildeten F1-Nachkommen. (C) **F1-Nachkommenzahl der OLB11 L1-Larven**: 209±22 F1/A auf Kontrollplatten, 67±32 F1/A bei postembryonaler *rab-11.1* Dauer-RNAi. (D) **Entwicklung der OLB11 F1** (n=68) fortlaufend auf RNAi; in der Kontrollgruppe an Tag 5 zu 100% adult. Nach *rab-11.1* Dauer-RNAi war die F1 an Tag 5 zu 23,5% L3, 63,2% L4, 13,2% jA. Tag 6: 19,1% L3, 66,2% L4, 11,8% jA, 2,9% A. Tag 7: 17,6% L3, 63,2% L4, 13,2% jA, 5,9% A. (E) **Start OLB11 L1, Körperlänge der F1** an Tag 1-Tag 5 auf Kontrollplatten: 337±47 µm, 549±19 µm, 855±89 µm, 1043±65 µm, 1346±15 µm; bei *rab-11.1(RNAi)*: 269±44 µm, 551±113 µm, 673±102 µm, 708±140 µm, 861±63 µm. (F, G) **DIK-Aufnahmen OLB11 P0 an Tag 6**. (G) Auf Kontrollplatten: Im Darmepithel war ein Lumen (L) mit apikalem Bürstensaum (Pfeile) zu erkennen. (H) Auf *rab-11.1(RNAi)*-Platten: Im Darmepithel war ein schmaler apikaler Bürstensaum (Pfeile) sowie ein Lumen (L), in dem sich vermutlich bakterielle Überreste befinden, zu sehen. Legende: L3 (dunkelgrau), L4 (grau), junge Adulte (hellgrau), Adulte (weiß); Größenbalken: 10 µm. n.s.: nicht signifikant. \*\*\*p-Wert<0,001.

### **3.7 Darmspezifische *par-5(RNAi)* sowie *cdh-5(RNAi)* in *OLB11* hat weder Einfluss auf die Entwicklung noch auf die Nachkommenzahl**

Die Herunterregulierung von PAR-5 führt zu einer Veränderung der korrekten apikalen Lokalisation von RAB-11 positiven Endosomen zur basalen Membran der Enterozyten (Winter et al., 2012). Auch konnte gezeigt werden, dass RAB-11 Endosomen für den apikalen Transport von Cadherin 99C (Cad99C) in *D. melanogaster* erforderlich sind (Khanal et al., 2017). Das Nematoden-spezifische Cadherin CDH-5 (Pettitt, 2005) ist ein mögliches Ortholog des *D. melanogaster* Cad99C (BLASTP Ergebnisliste der Unterkategorie „Homologie“, (<http://www.wormbase.org/db/get?name=WBGene00000397;class=cdh-5>)). CDH-5 ist bisher nicht funktionell charakterisiert. In Anbetracht der orthologen Beziehung zu Cad99C wäre eine Funktion als Adhäsionsmolekül zur Stabilisierung der Mikrovilli denkbar. Somit wurden die Auswirkungen einer Herunterregulierung von CDH-5 als möglichem Cargo- und von PAR-5 als bekanntem Regulations-Protein auf die Entwicklung und Nachkommenzahl im Wildtyp N2 (WT) und im darmspezifischen RNAi-Stamm OLB11 untersucht.

Während die WT Larven der Kontrollgruppe sich bis Tag 4 zu Adulten entwickelten und F1-Nachkommen bildeten (Abb. 23 A), wurde bei postembryonaler *par-5(RNAi)* erst an Tag 5 das adulte Stadium erreicht. Diese Adulten produzierten insgesamt nur 39 Embryonen, die letal waren (Daten nicht gezeigt). Die OLB11 L1-Larven entwickelten sich sowohl in der Kontrollgruppe als auch bei *par-5(RNAi)* innerhalb von fünf Tagen zu Adulten (Abb. 23 B) und bildeten F1-Nachkommen. In der Kontrollgruppe (216 F1/A) wurden mehr Nachkommen als bei *par-5(RNAi)* (169 F1/A) gebildet (Abb. 23 C). Diese F1-Nachkommen entwickelten sich ebenfalls innerhalb von fünf Tagen zu Adulten (Daten nicht gezeigt) und produzierten F2-Nachkommen. Diesmal lag die Nachkommenzahl bei *par-5(RNAi)* über dem Wert der Kontrollgruppe (143 F2/A vs. 113 F2/A, (Abb. 23 D)). Eine Signifikanzbestimmung war infolge einer einzelnen Durchführung des Experiments nicht möglich. Für eine Reproduktion der Beobachtungen von (Winter et al., 2012) fehlt in OLB11 ein Fluoreszenz-markiertes RAB-11-Protein.

Bei *cdh-5(RNAi)* folgten sowohl die WT als auch die OLB11 Larven der Entwicklung in der Kontrollgruppe. Innerhalb von vier Tagen waren die Tiere adult und produzierten F1-Nachkommen (Abb. 23 E, F). Die F1-Nachkommen beider Stämme entwickelten sich im gleichen Zeitraum zu Adulten (Daten nicht gezeigt) und produzierten F2-Nachkommen.



**Abb. 23** Entwicklung und Nachkommenzahl bei postembryonaler *par-5(RNAi)* und *cdh-5(RNAi)* in P0 und F1 in Wildtyp N2 und in OLB11.

(A) Auf Kontrollplatten entwickelte sich die **WT L1-Larven** (je n=40) innerhalb von 4 Tagen von L1 zu Adulten und produzierte ab Tag 5 Embryonen. Das adulte Stadium wurde auf *par-5(RNAi)* nur in Einzelfällen erreicht. Die wenigen abgelegten Eier waren letal. (B) Die **OLB11 L1-Larven** (jeweils n=20) entwickelten sich auf *par-5(RNAi)* parallel zur Kontrollgruppe zu Adulten und produzierten Nachkommen ab Tag 5. (C, D) **Nachkommen bei *par-5(RNAi)*** von jeweils 5 bzw. 4 OLB11 Adulten. Eine Signifikanzbestimmung war nicht möglich. (C) VC: 216 F1/A, *par-5(RNAi)*: 169 F1/A. (D) VC: 113 F2/A, *par-5(RNAi)*: 143 F2/A. (E, F) Bei **postembryonaler *cdh-5(RNAi)*** in (E) **WT L1-Larven** (VC n=120, *cdh-5(RNAi)* n=125) und (F) **OLB11 L1-Larven** (VC n=120, *cdh-5(RNAi)* n=125) wurde innerhalb von 4 Tagen das adulte Stadium erreicht und Nachkommen produziert. (G, H) **F1- und F2-Nachkommenzahl des WT:** (G) VC: 318±81 F1/A, *cdh-5(RNAi)*: 270±43 F1/A, (H) VC: 297±38 F2/A, *cdh-5(RNAi)*: 273±55 F2/A. (I, J) **F1- und F2-Nachkommenzahl des OLB11:** (I) VC: 205±17 F1/A, *cdh-5(RNAi)*: 135±43 F1/A, (J) VC: 154±39 F2/A, *cdh-5(RNAi)*: 162±22 F2/A. † längste Lebensspanne. n.s. = nicht signifikant. Die F1 wurde weiter auf die jeweiligen RNAi-Platten umgesetzt.

Im WT wurden bei *cdh-5(RNAi)* weniger Nachkommen gezählt als in der Kontrollgruppe (F1: 318 F1/A vs. 270 F1/A; F2: 297 F2/A vs. 273 F2/A) (Abb. 23 G, H). Die OLB11 F1-Nachkommen waren bei *cdh-5(RNAi)* von 205 F1/A auf 135 F1/A ebenfalls verringert (Abb. 23 I). In der F2-Generation lag hingegen die Nachkommenzahl bei *cdh-5(RNAi)* leicht über dem Wert der Kontrollgruppe (162 F2/A vs. 154 F2/A) (Abb. 23 J). Die beschriebenen Unterschiede in der Nachkommenproduktion wiesen keine Signifikanz auf. Daher ist davon auszugehen, dass diese Unterschiede aufgrund von natürlichen Schwankungen in der Nachkommenproduktion zustande kommen.

Mit diesen Untersuchungen wurden in OLB11 weder auffällige Auswirkungen auf die Entwicklung noch auf die Nachkommenzahl aufgrund einer Herunterregulierung von *par-5(RNAi)* und *cdh-5(RNAi)* festgestellt (s. Diskussion).

### **3.8 Visualisierung des Mikrotubuli-Netzwerks und darmspezifische Tubulin-RNAi**

Der Verlust des Regulations-Proteins PAR-5 durch RNAi führt zu einer zytoplasmatischen Fehllokalisierung von RAB-11 Endosomen. Dies tritt auch bei RNAi gegen *tba-1*, *tba-2*, *tba-4*, *tbb-1* und *tbb-2* auf (Winter et al., 2012). Des Weiteren wurde die Bildung von ACT-5 Aggregaten nach *tba-2(RNAi)* beobachtet (Saegusa et al., 2014).

Die Einschränkung einzelner Tubuline durch RNAi kann sich demnach auf einzelne der bisher in dieser Arbeit beschriebenen Proteine auswirken. Daher soll nun zunächst gezeigt werden, wie das Mikrotubuli-Netzwerk mit Hilfe eines fluoreszenzmarkierten Proteins dargestellt werden kann. MAPH-1.1 (Mikrotubuli-assoziiertes Protein 1 Homolog 1) lokalisiert an dynamischen Mikrotubuli-Anordnungen in somatischen Geweben in *C. elegans* (Waaijers et al., 2016). Im Reporterstamm BOX188 kann mittels GFP::*MAPH-1.1* das Mikrotubuli-Netzwerk gesamtheitlich dargestellt werden, ohne dass durch die Fluoreszenzmarkierung die Funktion des Netzwerks eingeschränkt wird.

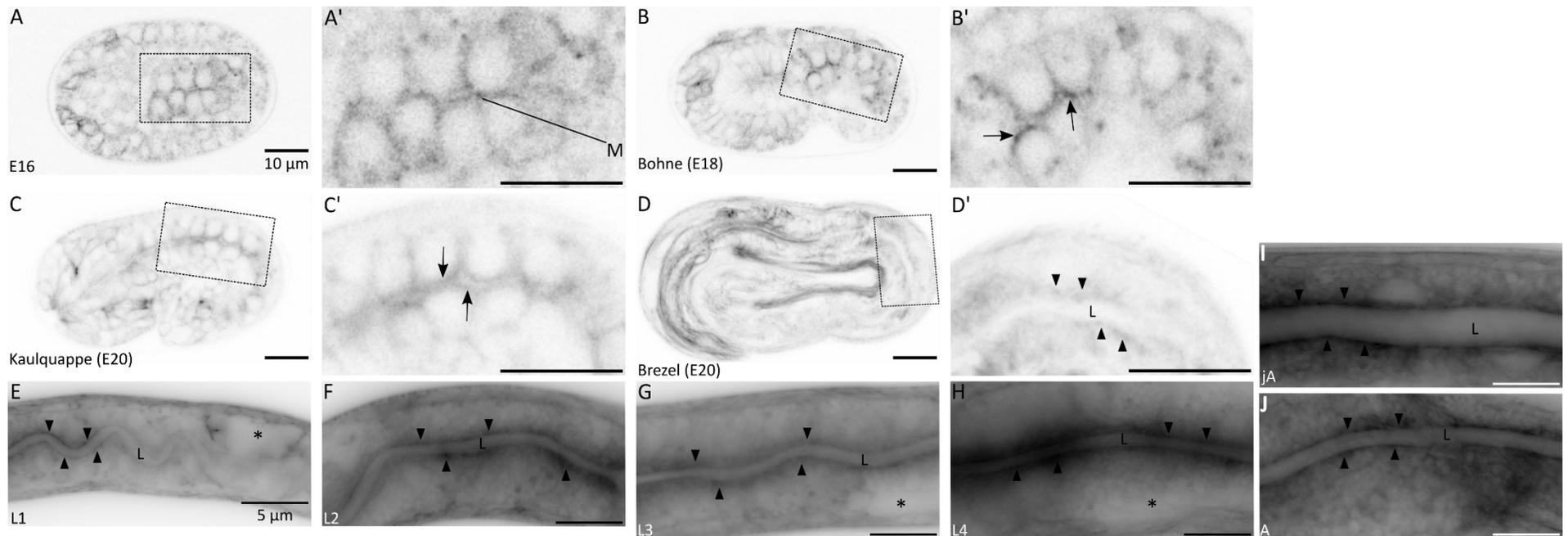
Die Auswirkung auf die Entwicklung und Nachkommenzahl von RNAi gegen einzelne Tubuline wurde im Wildtyp N2 und im darmspezifischen RNAi-Stamm OLB11 untersucht. Darauf folgend wurden gegen vier dieser Tubuline RNAi in BOX188 wiederholt, um die Auswirkungen auf das GFP::*MAPH-1.1*-Fluoreszenzsignal zu untersuchen.

### 3.8.1 Visualisierung des Mikrotubuli-Netzwerks im *C. elegans* Darmepithel während der Entwicklung anhand des Mikrotubuli-assoziierten Proteins MAPH-1.1 als Marker

Anhand des GFP::MAPH-1.1-Fluoreszenzsignals in BOX188 wird im Folgenden die Entwicklung des Mikrotubuli-Netzwerks im *C. elegans* Darmepithel während der Embryonalentwicklung ab dem E16-Stadium bis zum Adulten verfolgt.

Im E16-Stadium liegen die Enterozyten einander an der ventralen Mittellinie gegenüber (M in Abb. 24 A, A'). Das GFP::MAPH-1.1-Fluoreszenzsignal akkumulierte an der apikalen Membran der Enterozyten und verlief dann entlang der lateralen Membran. In den folgenden Embryonalstadien Bohne (E18, Abb. 24 B, B') und Kaulquappe (E20, Abb. 24 C, C') blieb die Akkumulation des GFP::MAPH-1.1-Fluoreszenzsignals an der apikalen Membran (Pfeile in Abb. 24 B', C') sowie die Ausbreitung über die laterale Membran erhalten. Dieses Springbrunnen-förmige Muster des Fluoreszenzsignals war in Embryonen im Brezel-Stadium, die kurz davor waren, als Larven zu schlüpfen, nicht mehr zu sehen. Das GFP::MAPH-1.1-Fluoreszenzsignal dekorierte durchgehend die apikale Membran (Pfeilspitzen in Abb. 24 D') entlang des Lumens (L) und verlief von dort in einem radialen Netzwerk in das Zytoplasma. Eine Anreicherung entlang der lateralen Membran der einzelnen Enterozyten wurde nicht beobachtet. In allen Embryonalstadien trat ein Fluoreszenzsignal ebenfalls in den übrigen somatischen Geweben auf (Abb. 24 A-D).

Die apikale Anreicherung des GFP::MAPH-1.1-Fluoreszenzsignals im Brezelstadium trat auch danach in der L1-Larve auf (Abb. 24 E). Während der postembryonalen Entwicklung von der L1-Larve bis zum Adulten war im Darmepithel jeweils eine durchgängige Anreicherung von GFP::MAPH-1.1 an der apikalen Membran entlang des Lumens (L) zu beobachten (Pfeilspitzen in Abb. 24 E-J). Von der apikalen Membran verlief das GFP::MAPH-1.1-Muster in einem radialen Netzwerk in das Zytoplasma. Die Position der apikalen Anreicherung ist von anderen Studien genauer als sich unterhalb des apikalen ERM-1-Signals befindend beschrieben worden, woraus eine Verbindung zu den Intermediär-Filamenten, die eine Rolle in der Verankerung von Mikrotubuli-Nukleatoren spielen, abgeleitet wird (Oriolo et al., 2007; Ramalho, 2019).



**Abb. 24** *In vivo*-Dokumentation der Entwicklung des MAPH-1.1::GFP-Fluoreszenzsignals im Darmepithel von BOX188 Embryonen und während der postembryonalen Entwicklung von der L1-Larve bis zum Adulten.

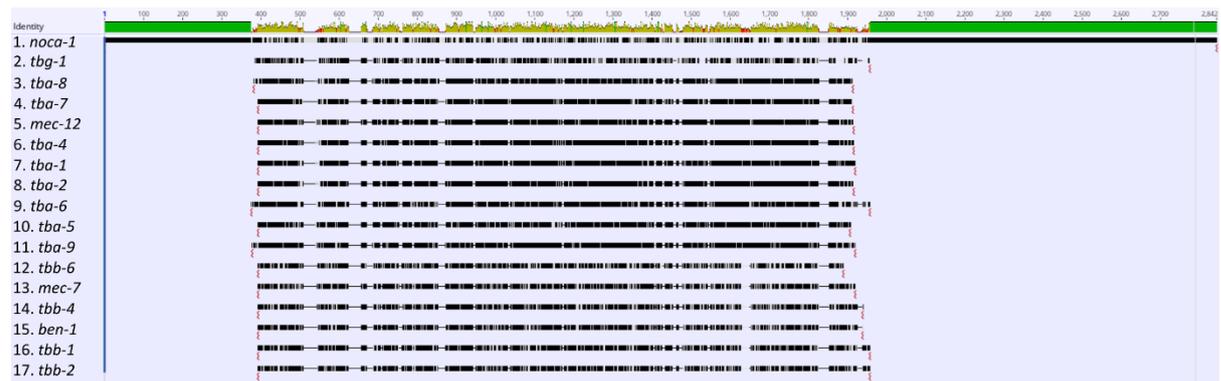
(A-D) **Embryo** im (A) E16-, (B) E18- (**Bohne**), (C) E20- (**Kaulquappe**) und (D) **Brezel-Stadium** kurz vor dem Schlüpfen. (A'-D') Vergrößerung des jeweils zugehörigen markierten Bereichs. (A') GFP::MAPH-1.1 lokalisiert rings um die Enterozyten an der apikalen und basolateralen Membran. (B') Das Fluoreszenzsignal akkumuliert an der apikalen Membran der Enterozyten (Pfeile) und zieht von dort über die laterale Membran nach basal. (C') Wie im vorausgegangenen Embryonalstadium (B') akkumuliert das Fluoreszenzsignal an der apikalen Membran (Pfeile) und breitet sich nach lateral aus. (D') Das Fluoreszenzsignal dekoriert die apikale Membran der Enterozyten (Pfeilspitzen) und verläuft von dort radial in das Zytoplasma. Eine Anreicherung entlang der lateralen Membran der einzelnen Enterozyten kann nicht beobachtet werden. Sowohl im Darmepithel der **Larvenstadien L1 bis L4** (E-H) als auch in **jungen Adulten** (I) und **Adulten** (J) akkumuliert das Fluoreszenzsignal an der apikalen Membran (Pfeilspitzen) und verläuft von dort in einem strahlenartigen Netzwerk in das Zytoplasma. Asteriske markieren in (E) das Gonadenprimordium und in (G) und (H) jeweils einen Gonadenarm. Größenbalken: (A-D') 10  $\mu\text{m}$ , (E-J) 5  $\mu\text{m}$ .

### 3.8.2 Darmspezifische Tubulin-RNAi hat keinen Einfluss auf die Nachkommenzahl

Im *C. elegans* Genom besteht die Tubulin-Familie aus neun  $\alpha$ - und sechs  $\beta$ -Tubulinen sowie einem  $\gamma$ -Tubulin ((Hurd, 2018), 1.3.2). Im Wildtyp N2 und im darmspezifischen RNAi-Stamm OLB11 wurde mittels RNAi gegen diese Gene die Auswirkungen auf die Entwicklung und Nachkommenzahl untersucht. Dabei wurde auch *noca-1(RNAi)* durchgeführt, da dieses Verankerungsprotein aufgrund einer Lokalisierung im embryonalen Darmepithel apikal am nicht-zentrosomalen Mikrotubuli-Organisationszentrum von Interesse ist (Sallee et al., 2018). Die in der RNAi-Fütterbibliothek des Ahringer-Labors (siehe 2.3) vorhandenen RNAi-Klone wurden zunächst auf ihre Richtigkeit überprüft und die fehlerhaften bzw. fehlenden RNAi-Klone selbst hergestellt (Tab. 3 in 2.1.4). Dabei wurde darauf geachtet, dass die Sequenz des jeweiligen RNAi-Klons eine Sequenz in allen Isoformen des Ziel-Gens abdeckt.

Aufgrund der Vielfältigkeit der Isoformen a-i von *noca-1* deckt der RNAi-Klon aus der RNAi-Fütterbibliothek lediglich die ersten acht Isoformen a-h ab. Zusätzlich wurde hier ein RNAi-Klon hergestellt, der die letzten Isoformen h und i gemeinsam abdeckt. Diese beiden Klone wurden zunächst getrennt verwendet. Da keine unterschiedlichen Auswirkungen festgestellt wurden, wurde in weiteren Experimenten nur der *noca-1(RNAi)*-Klon aus der RNAi-Fütterbibliothek verwendet.

Aufgrund der hohen Sequenzähnlichkeit nicht nur innerhalb der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Tubuline, sondern auch zwischen diesen Gruppen (Tab. 13 in 8.4), kann davon ausgegangen werden, dass durch RNAi gegen ein einzelnes Tubulin-Gen auch die mRNA ähnlicher Tubulin-Gene abgebaut wird (Tab. 14 in 8.4). Die hohe Sequenzähnlichkeit zwischen diesen untersuchten Genen wurde in Abb. 25 mittels eines Alignments der gespleißten Nukleinsäuresequenzen dieser Gene visualisiert (Sequenzanalysesoftware Geneious (Tab. 9)).



**Abb. 25 Vergleich der gespleißten Nukleinsäuresequenzen (ohne UTR) der Gene, die im Zusammenhang mit dem Mikrotubuli-Netzwerk untersucht wurden (Clustal Omega 1.2.2, Geneious).**

Die Sequenzen wurden nach ihrer Ähnlichkeit gruppiert. Identische Nukleinsäuren sind in schwarz dargestellt. Die Bindestriche stellen Lücken dar, die vom Algorithmus dort eingefügt wurden, wo in den anderen Sequenzen kein Bereich zugeordnet werden konnte.

Die Experimente wurden mit WT und OLB11 L1-Larven begonnen. Die Entwicklung der P0-Generation zu adulten Tieren sowie die Entwicklung der F1-Generation wurde auf RNAi-Platten fortlaufend verfolgt. Dauerte die Entwicklung zum Adulten auf RNAi ein bis zwei Tage länger als auf Kontrollplatten, wurde dies als langsamere Entwicklung vermerkt (slower dev. in Tab. 11). Im Hinblick auf die Nachkommenzahl wurde lediglich festgehalten, ob F1-Nachkommen abgelegt wurden, oder nicht (F1 oder keine F1 in Tab. 11). Die geschlüpften Larven wurden nicht ausgezählt.

Im WT wurde nach postembryonaler *tba-2(RNAi)*, *tbb-1(RNAi)*, *tbb-2(RNAi)* und *tbg-1(RNAi)* in L1-Larven jeweils Sterilität beobachtet, d.h. die L1-Larven entwickelten sich zu Adulten, die jedoch keine Nachkommen produzierten. In OLB11 wurde keine Sterilität beobachtet. Daher ist davon auszugehen, dass die beobachtete Sterilität im WT nicht auf einen RNAi-Effekt im Darm zurückzuführen ist.

Eine langsamere Entwicklung (slower dev. in Tab. 11) trat im WT und in OLB11 bei *ben-1(RNAi)* und *noca-1(RNAi)* auf. Dies wurde in OLB11 zusätzlich bei RNAi gegen *tba-4*, *tba-5*, *tba-8*, *tba-9* sowie *tbb-2*, *tbg-1* und *mec-7* festgestellt. Warum tritt diese Beobachtung in OLB11 auf, jedoch nicht im WT? Eine Möglichkeit ist, dass eine Mutation im OLB11 Hintergrund zu einer höheren RNAi-Sensitivität als im WT führt. Um dies zu überprüfen, wurden die Ergebnisse mit denen in der RNAi-hypersensitiven *rrf-3* Mutante (Simmer et al., 2003) verglichen. Der larvale Arrest bzw. die larvale Letalität, die dort in der *rrf-3* Mutante bei *tba-4(RNAi)* bzw. *tbb-2(RNAi)* beschrieben wurden, könnten als stärkere Auswirkungen auf die Entwicklung interpretiert werden.

Die RNAi-Hypersensitivität der *rrf-3* Mutante erklärt den larvalen Arrest bei *tba-1(RNAi)*, währenddessen in WT und OLB11 keine Abweichungen in Entwicklung und Nachkommen beobachtet wurden. Während im WT bei *tba-2(RNAi)* und *tbb-2(RNAi)* Sterilität auftrat, wurde in der Mutante ein larvaler Arrest bzw. eine larvale Letalität beobachtet (Simmer et al., 2003).

Vermutlich ist die langsamere Entwicklung auf individuelle Ausnahmererscheinungen zurückzuführen, die nicht durch den RNAi-Effekt hervorgerufen wurden. Ebenso ist es möglich, dass es aufgrund von Redundanz innerhalb der Tubulin-Familie zu keinen sichtbaren Auswirkungen nach RNAi kommt.

**Tab. 11 Phänotypischer Vergleich von WT und OLB11 bei postembryonaler RNAi beginnend in L1 bis zum Adulten.** F1=abgelegte Embryonen auf Agarplatte, keine F1=keine abgelegten Embryonen auf Agarplatte. Geschlüpfte Larven wurden nicht ausgezählt. slower dev.=langsamere Entwicklung zum Adulten (= um 1-2 Tage verzögert). Phänotypen in *rrf-3* Mutante beschrieben in (Simmer et al., 2003): Lva: larvaler Arrest, pLvl: partiell larval letal, pEmb: partiell embryonal letal, pPvl: partiell protruding vulva, WT: wildtypisch, Ste: steril.

Gen	Exon-Abd. des RNAi-Klons	WT (Phän.)	OLB11 (Phän.)	Literatur (Simmer et al., 2003)
<i>tba-1</i>	80 %	F1	F1	Lva
<i>tba-2</i>	95 %	keine F1	F1	Lva, pLvl
<i>mec-12</i>	40 %	F1	F1	WT
<i>tba-4</i>	77 %	F1	slower dev.	Lva
<i>tba-5</i>	58 %	F1	slower dev.	WT
<i>tba-6</i>	66 %	F1	F1	WT
<i>tba-7</i>	100 %	F1	F1	WT
<i>tba-8</i>	60 %	F1	slower dev.	WT
<i>tba-9</i>	62 %	F1	slower dev.	n/a
<i>tbb-1</i>	90 %	keine F1	F1	F1 Lva, pEmb
<i>tbb-2</i>	83 %	keine F1	slower dev.	Lvl
<i>tbb-4</i>	84 %	F1	F1	WT
<i>ben-1</i>	80 %	slower dev.	slower dev.	WT
<i>tbb-6</i>	92 %	F1	F1	WT
<i>mec-7</i>	100 %	F1	slower dev.	WT
<i>tbg-1</i>	68 %	keine F1	slower dev.	pPvl, Ste
<i>noca-1</i>	62 %	slower dev.	slower dev.	WT

Um die Anzahl der Nachkommen bei darmspezifischer Tubulin-RNAi genauer zu untersuchen, wurden jeweils die F1-Nachkommen von fünf Adulten ausgezählt. Die F1 wurde fortlaufend auf RNAi-Platten gehalten und anschließend die F2-Nachkommen von fünf Adulten bestimmt (Tab. 12). Die embryonale Letalität entsprach der Hintergrundletalität in OLB11 (3.3) unter Berücksichtigung von Schwankungen von Tier zu Tier (Daten nicht gezeigt).

Bei der ersten Durchführung lag die Nachkommenzahl in der Kontrollgruppe bei 146 F1/A bzw. bei 144 F2/A (Tab. 12). In 12 von 17 Fällen wurde nach Tubulin-RNAi eine höhere F1-Nachkommenzahl (150-194 F1/A) und nachfolgend außer bei *tba-5(RNAi)* und *ben-1(RNAi)* auch eine höhere F2-Nachkommenzahl (154-227 F2/A) als in der Kontrollgruppe erfasst. In den verbleibenden fünf Fällen von RNAi gegen *tba-2*, *tba-7*, *tba-8*, *tba-9* sowie *tbg-1* wurden weniger F1-Nachkommen (116-146 F1/A) als in der Kontrollgruppe erfasst. Nur bei *tba-2(RNAi)* und *tbg-1(RNAi)* war auch die F2-Nachkommenzahl geringer als in der Kontrollgruppe (93 F2/A bzw. 136 F2/A).

Dieses Experiment wurde mit RNAi gegen *tba-1*, *mec-12* und *tbb-2* wiederholt, um zu überprüfen, ob erneut eine höhere Nachkommenzahl als in der Kontrollgruppe auftritt. Die Entscheidung für eine Wiederholung von *tba-7(RNAi)* war aufgrund einer Schwankung in der embryonalen Letalität getroffen worden (Daten nicht gezeigt).

Nun lag die Nachkommenzahl bei 201 F1/A und bei 178 F2/A in der Kontrollgruppe. Die F1-Nachkommenzahl auf RNAi-Platten lag in dieser zweiten Durchführung unterhalb des Wertes der Kontrollgruppe. Die Verringerung betrug bis zu 30 Nachkommen.

Es traten Schwankungen in der Nachkommenzahl zwischen der F1- und der F2-Generation sowie von der ersten zur zweiten Durchführung auf. Die deutlich höhere Nachkommenzahl als in der Kontrollgruppe im ersten Durchlauf konnte beim zweiten Mal nicht bestätigt werden. In Verbindung mit unauffälligen DIK-Aufnahmen (Daten nicht gezeigt) ergeben sich hieraus keine eindeutigen phänotypischen Beobachtungen.

Anhand der Nachkommenzahl konnte kein Einfluss der Tubulin-RNAi in OLB11 festgestellt werden. Dabei ist zu beachten, dass dies auch an der Qualität der RNAi-Klone liegen kann. Der Exon-Anteil eines RNAi-Klons sollte möglichst groß sein, da dieser für den erfolgreichen Abbau der komplementären mRNA erforderlich ist (Fire et al., 1998; Timmons & Fire, 1998). Man könnte von einer geringeren Exon-Abdeckung auf eine nicht effektive RNAi-Wirkung schließen, vor allem, wenn auch in der *rrf-3* Mutante kein Phänotyp beobachtet wurde. Dies

trifft auf *tba-4*, *tba-5*, *tba-6* und *tba-8* bei einer Exon-Abdeckung zwischen 40 – 66 % (Tab. 11) zu. Bei *tbb-4* bis *mec-7* wurde allerdings auch kein Phänotyp in der hypersensitiven RNAi-Mutante beobachtet, obwohl die Exon-Abdeckung jeweils über 80 % betrug.

**Tab. 12 F1- und F2-Nachkommenzahl bei Tubulin-RNAi in OLB11 L1-Larven.** Die F1-Generation wurde kontinuierlich auf den jeweiligen RNAi-Platten gehalten. Der Wert in Klammern () gibt die Nachkommenzahl bei einer wiederholten Durchführung des Experiments an.

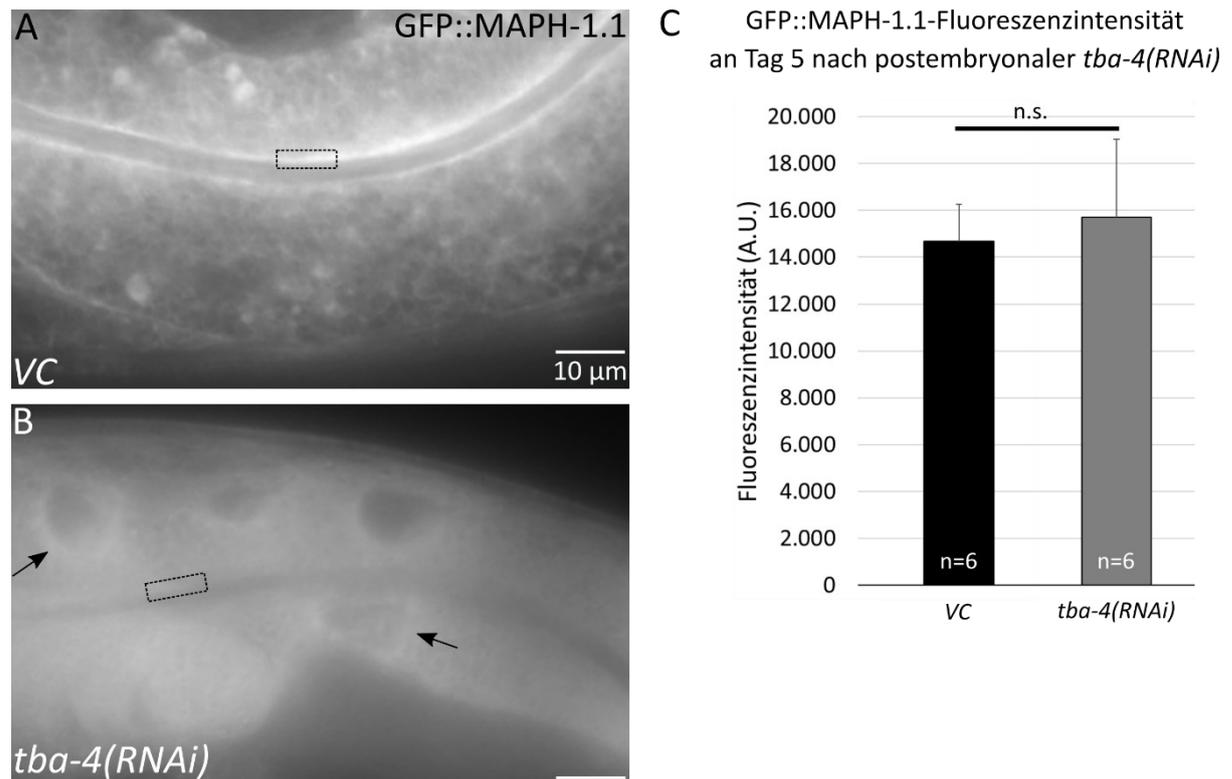
<b>RNAi</b>	<b>F1/A (n=5)</b>	<b>F2/A (n=5)</b>
<b>VC</b>	146 (201)	144 (178)
<b><i>tba-1</i></b>	194 (196)	227 (181)
<b><i>tba-2</i></b>	122	93
<b><i>mec-12</i></b>	168 (190)	164 (120)
<b><i>tba-4</i></b>	170	171
<b><i>tba-5</i></b>	167	132
<b><i>tba-6</i></b>	163	154
<b><i>tba-7</i></b>	146 (170)	145 (118)
<b><i>tba-8</i></b>	140	177
<b><i>tba-9</i></b>	147	189
<b><i>tbb-1</i></b>	175	175
<b><i>tbb-2</i></b>	193 (170)	175 (139)
<b><i>tbb-4</i></b>	167	157
<b><i>ben-1</i></b>	150	112
<b><i>tbb-6</i></b>	169	155
<b><i>mec-7</i></b>	170	165
<b><i>tbg-1</i></b>	116	136
<b><i>noca-1</i></b>	180	167

### 3.8.3 Veränderung des GFP::MAPH-1.1-Fluoreszenzsignals bei postembryonaler RNAi gegen einzelne Tubulin-Gene

Für einige der 16 Tubulin-Gene des *C. elegans* Genoms wurde bereits gezeigt, dass die Herunterregulierung dieser durch RNAi zu einer Störung der apikalen Lokalisierung wichtiger Komponenten der Enterozyten führt: Die Bildung von ACT-5 Aggregaten bei *tba-2(RNAi)* sowie die zytoplasmatische Fehllokalisierung von RAB-11 Endosomen bei *tba-4(RNAi)* und *tbb-2(RNAi)* (Saegusa et al., 2014; Winter et al., 2012) weisen auf eine Rolle dieser Tubulin-Gene im *C. elegans* Darm hin.

Aufgrund dieser Informationen sowie der Beobachtung einer leicht verzögerten Entwicklung in OLB11 Larven nach *tba-4(RNAi)*, *tbb-2(RNAi)* sowie *tbg-1(RNAi)* (Tab. 11) wurde in Larven des BOX188 untersucht, ob RNAi gegen *tba-4*, *tbb-2*, *tbb-4* und *tbg-1* zu Veränderungen des GFP::MAPH-1.1-Fluoreszenzsignals im Darmepithel führt. Die Quantifizierung der Intensität des GFP::MAPH-1.1-Fluoreszenzsignals erfolgte durch die Festlegung einzelner Messbereiche entlang der apikalen Membran (siehe Material und Methoden 2.5.2 sowie beispielhaft gestrichelte Boxen in Abb. 26 A, B, Abb. 27 A-C und Abb. 28 A, B).

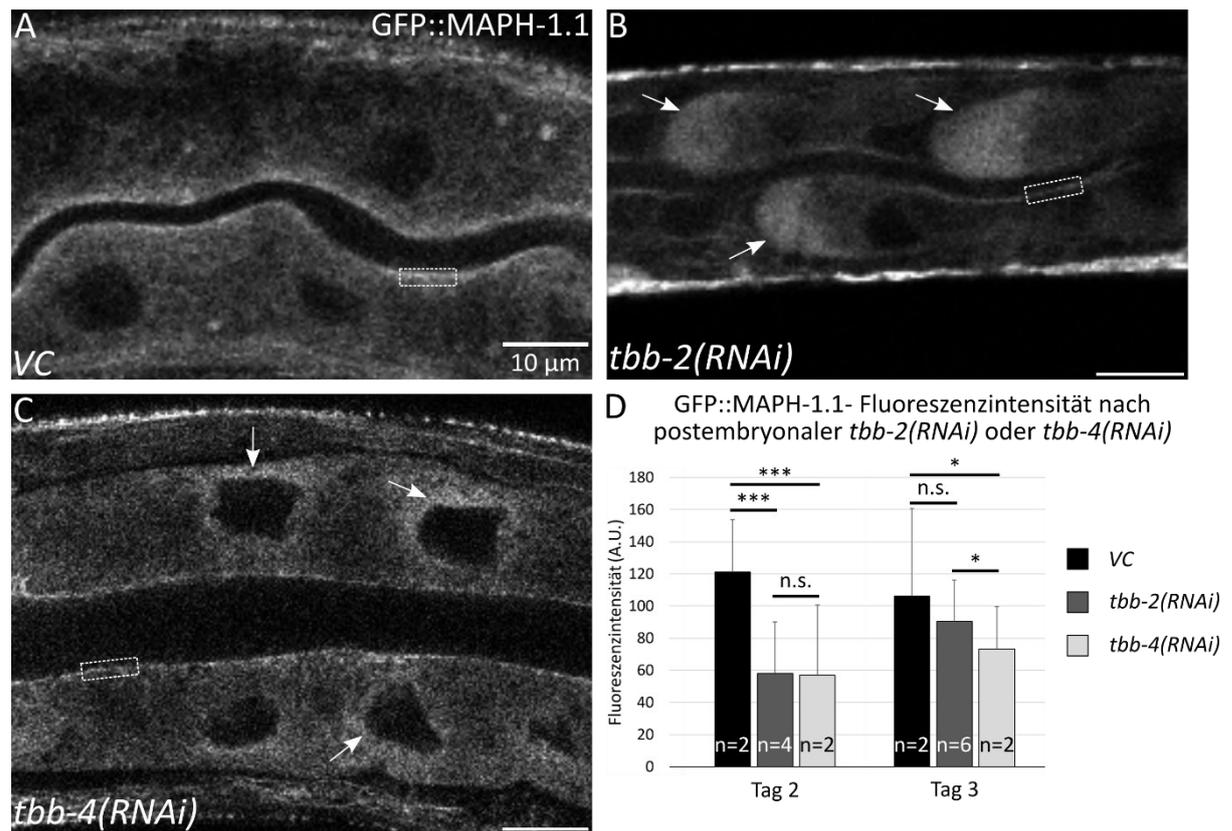
In den Adulten der Kontrollgruppe an Tag 5 akkumulierte das GFP::MAPH-1.1-Fluoreszenzsignal apikal entlang des Lumens und breitete sich von dort in einem radialen Netzwerk in das Zytoplasma aus (Abb. 26 A). Nach *tba-4(RNAi)* lokalisierte das Fluoreszenzsignal ebenfalls apikal (Abb. 26 B). Insgesamt wirkte das Fluoreszenzmuster im Zytoplasma homogen verteilt, wobei die Pfeile auf eine mögliche Akkumulierung des Fluoreszenzsignals um die Zellkerne hinweisen (Abb. 26 B). Die Quantifizierung der Fluoreszenzintensität an der apikalen Membran ergab eine nicht signifikante Zunahme von 6,9 % gegenüber der Kontrollgruppe (Abb. 27 C).



**Abb. 26** *In vivo*-Dokumentation des GFP::MAPH-1.1-Fluoreszenzsignals nach postembryonaler *tba-4(RNAi)* in BOX188 L1-Larven an Tag 5 und Quantifizierung der Fluoreszenzintensität.

(A) In der **Kontrollgruppe** war das Fluoreszenzsignal apikal an der Membran des Darmepithels akkumuliert und breitete sich von dort in einem radialen Netzwerk in das Zytoplasma aus. (B) Nach fünf Tagen auf ***tba-4(RNAi)*** lokalisierte das Fluoreszenzmuster weiterhin apikal und schien um die Zellkerne zu akkumulieren (Pfeile). (C) Die **Quantifizierung der Fluoreszenzintensität** an der apikalen Membran ergab eine nicht signifikante Zunahme um 6,9 % von 14.684±1564 A.U. in der Kontrollgruppe auf 15.694±3343 A.U. *nach tba-4(RNAi)*. Gestrichelte Boxen: Beispielhafter Messbereich der Fluoreszenzintensität. Größenbalken: 10  $\mu$ m. n.s.: nicht signifikant.

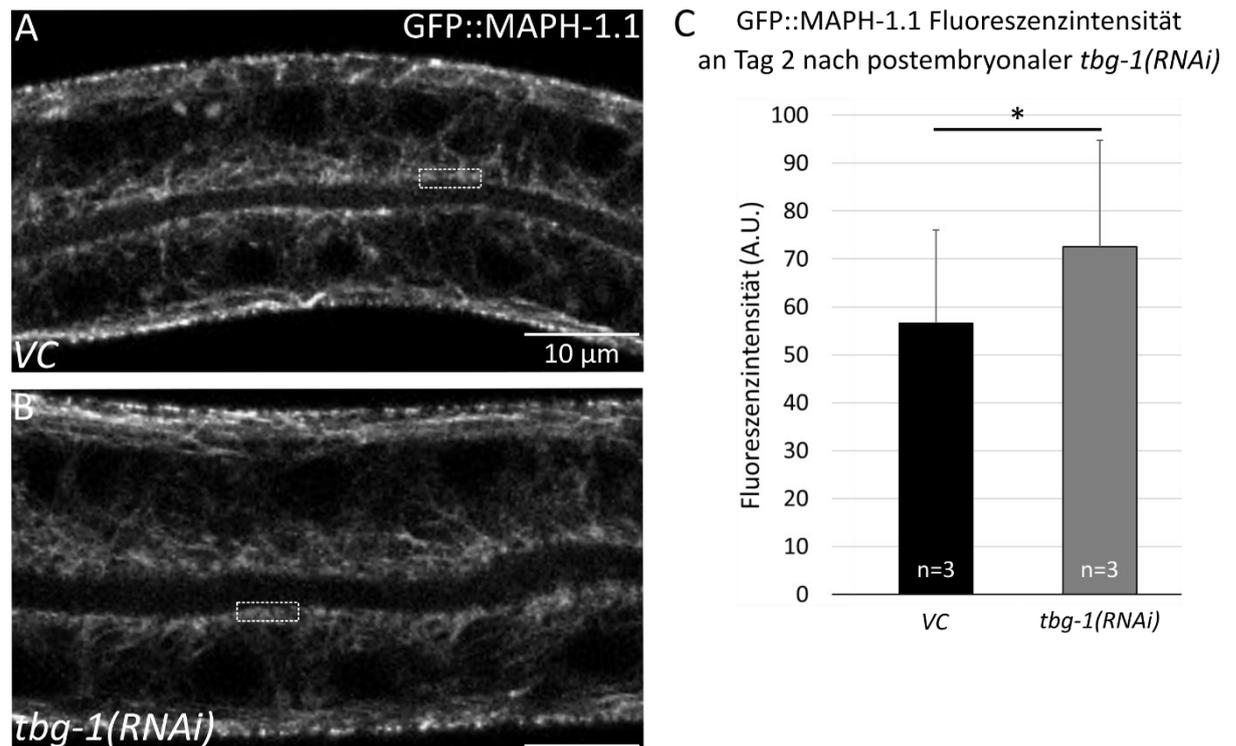
Nach *tbb-2(RNAi)* bzw. *tbb-4(RNAi)* wurde eine Umverteilung des Fluoreszenzmusters GFP::MAPH-1.1 im Zytoplasma (Pfeile in Abb. 27 B) und um die Zellkerne herum (Pfeile in Abb. 27 C) beobachtet. Zugleich ist weiterhin zu sehen, dass das GFP::MAPH-1.1-Fluoreszenzsignal an der apikalen Membran lokalisierte (Abb. 27 A, B, C). Die Quantifizierung des Fluoreszenzsignals ergab nach *tbb-2(RNAi)* bzw. *tbb-4(RNAi)* am zweiten Tag eine signifikante Reduktion der Fluoreszenzintensität an der apikalen Membran um 52 % bzw. 52,9 % der Fluoreszenzintensität der Kontrollgruppe (Abb. 27 D). Am dritten Tag lag diese Reduktion nur noch bei 14,8 % bzw. 30,9 %.



**Abb. 27** *In vivo*-Dokumentation des GFP::MAPH-1.1-Fluoreszenzsignals nach postembryonaler *tbb-2(RNAi)* sowie *tbb-4(RNAi)* in BOX188 L1-Larven an Tag 3 und Quantifizierung der Fluoreszenzintensität.

(A) In der **Kontrollgruppe** lokalisierte das Fluoreszenzsignal an der apikalen Membran und breitete sich in einem radialen Netzwerk in das Zytoplasma aus. (B) Nach *tbb-2(RNAi)* oder (C) *tbb-4(RNAi)* lokalisierte das Fluoreszenzsignal weiterhin apikal entlang des Lumens. Die Pfeile deuten auf eine mögliche Akkumulierung des Fluoreszenzsignals im Zytoplasma (B) und um die Zellkerne (C). (D) Die **Quantifizierung der Fluoreszenzintensität** an der apikalen Membran ergab an Tag 2 nach *tbb-2(RNAi)* eine Reduktion um 52 % ( $58 \pm 32$  A.U.) bzw. nach *tbb-4(RNAi)* um 52,9 % ( $57 \pm 44$  A.U.) der Fluoreszenzintensität der Kontrollgruppe ( $121 \pm 33$  A.U.). An Tag 3 betrug die Fluoreszenzintensität nach *tbb-2(RNAi)* 14,8 % ( $90 \pm 26$  A.U.) bzw. nach *tbb-4(RNAi)* 30,9 % ( $73 \pm 26$  A.U.) weniger als die Fluoreszenzintensität der Kontrollgruppe ( $106 \pm 54$  A.U.). Größenbalken 10  $\mu$ m. n.s.: nicht signifikant, \*p-Wert<0,05, \*\*\*p-Wert<0,001.

Nach *tbg-1(RNAi)* konnte keine Akkumulierung des Fluoreszenzsignals um die Zellkerne beobachtet werden (Abb. 28 B). Sowohl in der Kontrollgruppe als auch nach *tbg-1(RNAi)* akkumulierte das GFP::MAPH-1.1-Fluoreszenzsignal apikal entlang des Lumens und verlief in einem radialen Netzwerk in das Zytoplasma (Abb. 28 A, B). Die Quantifizierung ergab eine signifikante Zunahme um 22,1 % der apikalen Fluoreszenzintensität nach *tbg-1(RNAi)* im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abb. 28 C).



**Abb. 28** *In vivo*-Dokumentation des GFP::MAPH-1.1-Fluoreszenzsignals nach postembryonaler *tbg-1(RNAi)* in BOX188 L1-Larven an Tag 2 und Quantifizierung der Fluoreszenzintensität.

(A) In der **Kontrollgruppe** verlief das Fluoreszenzsignal an der apikalen Membran des Darmepithels und von dort in einem radialen Netzwerk in das Zytoplasma. (B) Nach zwei Tagen auf *tbg-1(RNAi)* war das Fluoreszenzsignal im Darmepithel unverändert. (C) Eine **Quantifizierung der Fluoreszenzintensität** an der apikalen Membran ergab eine Zunahme um 22,1 % von  $57 \pm 19$  A.U. in der Kontrollgruppe auf  $73 \pm 22$  A.U. nach *tbg-1(RNAi)*. Gestrichelte Boxen: Beispielhafter Messbereich der Fluoreszenzintensität. Größenbalken 10  $\mu$ m. \*p-Wert < 0,05.

Die Veränderungen des GFP::MAPH-1.1-Fluoreszenzsignals nach Tubulin-RNAi wurden im Folgenden in Verbindung mit der Sequenzähnlichkeit der Tubulin-Gene betrachtet. Das  $\alpha$ -Tubulin *tba-4* weist eine Sequenzähnlichkeit von über 80 % mit den anderen acht  $\alpha$ -Tubulinen auf (Tab. 13). Dies lässt vermuten, dass durch *tba-4(RNAi)* auch weitere  $\alpha$ -Tubuline, wie z.B. *tba-2* (Tab. 14), herunterreguliert werden. Es wurde bereits festgestellt, dass *tba-2(RNAi)* den Gesamtproteingehalt von  $\alpha$ -Tubulin deutlich reduziert (Saegusa et al., 2014). Hier wird die Verteilung des Mikrotubuli-assoziierten Proteins MAPH-1.1 und nicht die Verteilung eines Tubulins direkt mittels Fluoreszenzmarkierung untersucht. Statt einer deutlichen Reduzierung des GFP::MAPH-1.1-Fluoreszenzsignals scheint es hier nach dem Ausschalten einzelner Tubulin-Gene zu einer Umverteilung des Fluoreszenzsignals zu kommen. Dies ist bei *tbb-2(RNAi)* und *tbb-4(RNAi)* am deutlichsten erkennbar (Abb. 27 B, C, Pfeile). Diese zwei  $\beta$ -Tubuline teilen, neben einer hohen Sequenzähnlichkeit zueinander (78 %), auch die weiteren ihnen ähnlichsten  $\beta$ -Tubuline *tbb-1*, *ben-1* und *mec-7* mit einer

Sequenzähnlichkeit von 78-81 %. Das  $\gamma$ -Tubulin *tbg-1* hat keine Sequenzähnlichkeit zu den  $\alpha$ - und  $\beta$ -Tubulinen (Tab. 13, Tab. 14) und unterscheidet sich von diesen auch durch dessen Funktion in der Mikrotubuli-Keimbildung (Sanchez & Feldman, 2017), woraus sich eine mögliche Erklärung für die nicht beobachtete Umverteilung des GFP::*MAPH-1.1*-Fluoreszenzsignals nach *tbg-1(RNAi)* ergibt. Ein Verlust von TBG-1 beeinflusst demnach nicht die Lokalisation von *MAPH-1.1* und damit im Rückschluss nicht die Organisation des Mikrotubuli-Netzwerks. Indirekt kann aus der Veränderung des GFP::*MAPH-1.1*-Fluoreszenzmusters nach *tbb-2(RNAi)* und *tbb-4(RNAi)*, aufgrund der Funktion von *MAPH-1.1* als Mikrotubuli-assoziiertes Protein, auf eine Beteiligung dieser Tubulin-Gene am Mikrotubuli-Netzwerk im *C. elegans* Darm geschlossen werden.

## 4 Diskussion

Mit Hilfe von Puls-RNAi durch Fütterung in Form einer temporären Exposition auf RNAi Platten wurden in L1-Larven bzw. in Embryonen über die Exposition der Parentalgeneration ab dem L4-Stadium Defekte im mikrovillären Bürstensaum verursacht. Dies diente dazu, einen Eindruck über die Regenerationsfähigkeit der *C. elegans* Enterozyten nach induzierten Defekten im Darm, abhängig vom Entwicklungszeitpunkt, zu gewinnen. Da es sich bei *C. elegans* um einen eutelischen Organismus handelt (Sulston & Horvitz, 1977), ist zu bedenken, dass die 20 Enterozyten des Darms während der gesamten Lebensphase bestehen bleiben.

Andere Studien haben ebenfalls zeitlich beschränkte RNAi durch Fütterung oder durch Inkubation in einer RNAi-Flüssigkultur (soaking) angewendet. Diese unterscheiden sich jedoch zum einen durch die Länge der Zeiträume (über 7 h hinaus) und zum anderen durch das Ziel, einen stark ausgeprägten Phänotyp zu vermeiden oder die Auswertung sofort im Anschluss durchzuführen (Dutta et al., 2019; Lehmann et al., 2012; Pickering et al., 2013; Sladowska et al., 2021). Dem hier verwendeten Aufbau am ähnlichsten ist die von Green et al. (2011) durchgeführte Studie, bei der auf eine 24 h-Inkubation in RNAi-Flüssigkulturen eine 48 h-Erholungsphase auf NGM-Platten sowie eine Auswertung hinsichtlich eines Phänotyps der Gonade und Fertilität folgte.

Hingegen wurde in dieser Arbeit eine mögliche Rekonvaleszenz des mikrovillären Bürstensaums über einen Zeitraum von sieben Tagen untersucht und die Regenerationsfähigkeit dabei mit Blick auf den gesamten Organismus in Form der erfolgenden Entwicklung und der Bildung von Nachkommen ausgewertet.

### **4.1 Auswirkungen der *act-5(RNAi)* auf andere Aktine und Gewebe wird anhand darmspezifischer RNAi in OLB11 umgangen**

Der mutante Hintergrund des OLB11 trägt eine Mutation im *rde-1* Gen, die zu einer Insensitivität gegenüber RNAi führt. Dadurch, dass das *rde-1* Gen unter die Kontrolle des darmspezifischen *elt-2* Promoters gebracht wurde, ist nur dieses Gewebe in OLB11 RNAi-sensitiv, sodass ein RNAi-Effekt in den anderen Geweben umgangen wird (Pilipiuk et al., 2009). Hinzu kommt, dass das *act-5* Expressionsmaximum erst im L1-Stadium erreicht wird (Bidaud-Meynard et al., 2021). Aus diesen Gründen kann, nach *act-5(RNAi)* in L4-Larven, die

OLB11 F1-Generation mit intaktem Darmepithel schlüpfen, bevor die *act-5(RNAi)* postembryonal dazu führt, dass das zu diesem Entwicklungszeitpunkt essenzielle ACT-5 Protein nicht gebildet wird, wodurch die Schädigung des Darmepithels entsteht.

Im Wildtyp N2 treten aufgrund des systemischen RNAi-Effekts und der Sequenzähnlichkeit der *C. elegans* Aktine eine hohe embryonale Letalität der F1 und morphologische Veränderungen in den geschlüpften L1-Larven auf, die nicht allein auf den Abbau der *act-5 mRNA* im Darm zurückzuführen sind.

Es wird vermutet, dass die in *act-5* Mutanten auftretende Letalität im L1-Stadium anstatt auf die Rolle von ACT-5 im Darm stattdessen auf eine wichtige Funktion im H-förmigen Exkretionskanalsystem zurückzuführen ist (MacQueen et al., 2005). Das Aktin-Zytoskelett könnte eine wichtige Rolle beim Wachstum des Kanalsystems entlang der gesamten Körperlänge während der embryonalen und larvalen Entwicklung spielen (Buechner et al., 2020).

Während der Embryogenese sind Aktinfilamente an verschiedenen zellbiologischen Vorgängen beteiligt und spielen auch eine wichtige Rolle in der Epidermis und den Muskelzellen (Costa et al., 1997; Kelley & Cram, 2019; Pollard, 2016; Priess & Hirsh, 1986; Velarde et al., 2007). Außerdem werden die Aktinfilamente für eine ausreichende Kontraktilität der Spermathek sowie der angrenzenden somatischen Hüllzellen und der spermathekal-uterinen Klappe benötigt (Kelley & Cram, 2019). Aufgrund der systemischen Wirkung der RNAi können diese Funktionen nach *act-5(RNAi)* beeinträchtigt sein, woraus die verringerte F1-Nachkommenzahl und die erhöhte embryonale Letalität im WT resultieren kann. Außerdem wurde bereits gezeigt, dass nach *act-5(RNAi)* die Aufnahme des Dotterproteins in die Oozyten gestört ist (Balklava et al., 2007), wodurch fehlende Nährstoffe ebenfalls eine Erklärung für die Beeinträchtigung der Nachkommenproduktion sind. Aus der Störung der Aufnahme des Dotterproteins in die Oozyten resultiert eine Akkumulierung des Dotterproteins in der Körperhöhle (Balklava et al., 2007). Dies wurde hier nicht überprüft.

Während also im WT aufgrund des systemischen RNAi-Effekts und der Sequenzähnlichkeit der *C. elegans* Aktine Defekte auftreten, die nicht allein auf den Abbau der *act-5 mRNA* zurückzuführen sind, werden diese durch darmspezifische RNAi in OLB11 umgangen. Dadurch kann zunächst eine normale embryonale Entwicklung erfolgen. Dennoch ist eine verringerte

Nachkommenzahl und eine erhöhte embryonale Letalität zu beobachten. Dies ist damit auf die hier ausschließlich im Darm induzierten Defekte nach *act-5(RNAi)* zurückzuführen.

#### **4.2 Veränderungen im apikalen Bürstensaum sind erkennbar in Fluoreszenz- und DIK-Mikroskopie nach RNAi gegen *act-5*, *aps-1* oder *rab-11.1***

Bereits einen Tag nach kurzer postembryonaler *act-5* Puls-RNAi (7h bzw. 3,5 h) in L1-Larven wurde eine Reduktion der ACT-5 Fluoreszenzintensität im Stamm JM125 (ACT-5::YFP) beobachtet. Eine Begründung für die umgehende Auswirkung der RNAi auf die Fluoreszenzintensität ist, dass über den Wirkmechanismus der *act-5(RNAi)* auch die mRNA des ACT-5::YFP direkt herunterreguliert wird. Hinzu kommt, dass die *act-5* Expression im L1-Stadium ihren Höchststand erreicht (Bidaud-Meynard et al., 2021), sodass eine nennenswerte Auswirkung bei einem Eingriff mittels RNAi in diesem Stadium zu erwarten ist. Das vorhandene Restsignal ist zum einen darauf zurückzuführen, dass ACT-5 bereits während der Embryonalentwicklung exprimiert wird (Bidaud-Meynard et al., 2021; MacQueen et al., 2005) und daher das bereits gebildete Protein von dem RNAi-Mechanismus nicht beeinträchtigt wird (Fire et al., 1998). Zum anderen führt RNAi grundsätzlich nur zu einer Herunterregulierung, nicht jedoch zu einer kompletten Ausschaltung der Genexpression (Ahringer, 2006; Timmons et al., 2001).

Ein Anstieg der Fluoreszenzintensität bedeutet, dass neues, fluoreszenzmarkiertes ACT-5 gebildet wird. Dieses trägt vermutlich zu der Regenerationsfähigkeit der Enterozyten bei, sodass die verzögerte Entwicklung und auch die Bildung von Nachkommen ermöglicht wird. Allerdings bleibt eine signifikante Reduktion im Vergleich zur Kontrollgruppe bestehen. Eine mögliche Erklärung ist, dass die Herunterregulierung der *act-5* mRNA auch nach dem Transfer der JM125-Larven auf Kontrollplatten weiter anhält und daher nicht im vollen physiologischen Umfang neues, fluoreszenzmarkiertes Protein gebildet werden kann. Aus den Untersuchungsergebnissen bezüglich eines potenziell andauernden RNAi-Effekts mittels des *let-413(RNAi)*-Klons lässt sich ableiten, dass der RNAi-Effekt, bezogen auf die Spermathek, um bis zu 6 h nachwirkt (3.5.1). Wenn man diese Annahme auf die Puls-RNAi Experimente im Darmepithel überträgt, sollte der Effekt bereits am nächsten Tag nach dem Transfer auf Kontrollplatten nachlassen. Allerdings wurde in den folgenden sieben Tagen kein eindeutiger Trend einer kontinuierlichen Zu- oder Abnahme der Fluoreszenzintensität festgestellt.

Eine weitere Erklärung für die fortbestehende Reduktion der Fluoreszenzintensität ist, dass sich die *act-5* Expression im Laufe der larvalen Entwicklung verringert. Die gemessene Fluoreszenzintensität könnte vermutlich der zu diesem Entwicklungszeitpunkt vorgesehenen Expression entsprechen. Das durch die Puls-RNAi verursachte Defizit während des Expressionsmaximums im L1-Stadium wird in diesem Fall auch nach dem Abklingen des RNAi-Effekts durch eine normale Expression im Verlauf der weiteren Entwicklung nicht ausgeglichen werden können. Der Höchststand der *act-5* Expression im L1-Stadium sowie die Verringerung dieser Expression auf annähernd die Hälfte bis zum L4/jungen adulten Stadium wurde mittels einer Fluoreszenzmarkierung unter eigenem Promoter gezeigt (Bidaud-Meynard et al., 2021). Zu beachten ist, dass im hier verwendeten Reporterstamm JM125 das fluoreszenzmarkierte *act-5* Gen dem *ges-1* Promoter unterliegt.

Für eine detaillierte Analyse ist es notwendig, das *act-5* Expressionslevel der Kontrollgruppe zu diskreten Zeitpunkten mit dem der jeweiligen Pulsgruppe zu vergleichen. Eine Überexpression zum Ausgleich der vorangegangenen Herunterregulierung scheint unwahrscheinlich, da die Fluoreszenzintensität reduziert bleibt.

Die Schwankungen von Tag zu Tag zwischen Zu- und Abnahme der Fluoreszenzintensität kann durch die jeweils hohen Standardabweichungen und die eher geringe Anzahl Messwerte zustande kommen. Die hohen Standardabweichungen resultieren daraus, dass aufgrund der verzögerten Entwicklung an den späteren Tagen Würmer aus verschiedenen Larvenstadien zusammen ausgewertet wurden. Die hohe Standardabweichung an Tag 1 in der Kontrollgruppe hängt vermutlich mit dem *act-5* Expressionsmaximum in diesem Stadium und einer nicht 100 %igen Synchronisation der L1-Larven zusammen, sodass es zu größeren Unterschieden kommt.

PEPT-1 wird ebenfalls bereits nach der Polarisierung des Darmepithels während der Embryonalentwicklung exprimiert (Kang et al., 2009; Nehrke, 2003), wodurch eine Restfluoreszenzintensität nach RNAi bestehen bleibt. Bei postembryonaler *aps-1(RNAi)* aufgetretene Löcher im PEPT-1-Fluoreszenzsignal an der apikalen Oberfläche des Darmlumens stimmen mit den kugelförmigen Gebilden, die in der DIK-Mikroskopie zu sehen sind, überein. Ähnliche kugelförmige Gebilde treten in der *wts-1* Mutante auf, deren Mutation den Sortierungsprozess für apikale Proteine beeinträchtigt (Kang et al., 2009). Auch

*aps-1* ist an Sortierungs- und Transportprozessen apikaler Proteine beteiligt (Shafaq-Zadah et al., 2012; H. Zhang et al., 2012). Somit hängt das Auftreten der kugelförmigen Gebilde vermutlich mit der Beeinträchtigung der Sortierungs- und Transportprozesse zusammen.

Gemeinsam mit der Reduktion des ACT-5 Fluoreszenzsignals weist diese Beobachtung darauf hin, dass der Verlust von APS-1 während der postembryonalen Entwicklung zu einer Beeinträchtigung der Mikrovilli-Organisation führt. Diese Annahme wurde durch das Auftreten einer geringeren Mikrovilli-Dichte nach postembryonaler *aps-1(RNAi)* auf elektronenmikroskopischer Ebene bestätigt (T. Vogt, persönliche Mitteilung).

In Verbindung mit der Reduktion des PEPT-1-Fluoreszenzsignals ist davon auszugehen, dass diese Kugeln kein abgebautes PEPT-1-Protein enthalten und die PEPT-1-Verteilung das Lumen nicht mehr vollständig auskleidet. Dieser Mangel lässt auf einen Verlust bzw. zumindest die Beeinträchtigung der Resorptionsleistung von PEPT-1 schließen. Eine verminderte Resorptionsleistung von Di- und Tripeptiden aus dem Lumen impliziert eine Störung der Nahrungsverwertung, was wiederum eine mögliche Erklärung für die beobachteten Ablagerungen im Darmlumen ist. Diese Ablagerungen wurden auch bei einer Herunterregulierung von *rab-11.1* beobachtet. ACT-5 und PEPT-1 lokalisieren bei Verlust von RAB-11.1 falsch intrazellulär anstatt apikal (Cheng et al., 2022; Shafaq-Zadah et al., 2012). Zusammengenommen lässt sich daraus ableiten, dass eine Beeinträchtigung der Mikrovilli bzw. dieser apikalen Proteine zu einer Verringerung der Nahrungsaufnahme und damit zu sichtbaren Ablagerungen im Darmlumen führt.

Weitere Veränderungen des Darmepithels treten in Form eines geweiteten oder verengten Darmlumens auf (Abb. 18). Ein ähnlicher Phänotyp wurde in der *ifo-1* Mutante beobachtet, in der das terminale Netzwerk des Darmepithels fehlt (Carberry et al., 2012). Diese Mutante hat mit den in dieser Arbeit untersuchten RNAi-Tieren eine Reduktion des F-Aktin im Darm gemein.

Die hier im Darmepithel beobachteten Vakuolen erinnern an den Phänotyp der *erm-1* Mutante, bei der ebenfalls Vakuolen im Darmepithel und in der H-Zelle auftreten (Ramalho et al., 2020). Die H-Zelle ist Teil des *C. elegans* Exkretionskanalsystems, das entlang des gesamten Körpers verläuft. Ein geweitete Lumen und Vakuolenbildung wurden auch bei anderen Mutanten, die die Struktur des Exkretionskanal-Lumens beeinträchtigen, gezeigt (Buechner et al., 1999, 2020). Wenn das Aktin-Zytoskelett eine wichtige Rolle beim

Wachstum des Kanalsystems während der embryonalen und larvalen Entwicklung spielt (Buechner et al., 2020), könnte eine Schwächung dieses Zytoskeletts durch RNAi eine Erklärung für die Bildung der Vakuolen liefern. Durch die Vakuolenbildung wird schließlich das Darmlumen verschoben, und der apikale Bürstensaum ist nicht mehr deutlich zu erkennen.

Insgesamt betrachtet folgt, dass durch direkte oder indirekt Auswirkungen der RNAi gegen *act-5* bzw. *aps-1* auf den apikalen Bürstensaum eine ausreichende Proteinversorgung von *C. elegans* für eine physiologische Entwicklung und Reproduktion nicht mehr gegeben ist.

#### **4.3 Variierende Auswirkungen auf die Kennzeichen Entwicklung und Nachkommenzahl, abhängig von der Dauer der Puls-RNAi, deuten auf eine Phase der MV-Bildung vorrangig zu Beginn der postembryonalen Entwicklung hin**

Sowohl nach embryonaler als auch nach postembryonaler Puls-RNAi kommt es zu Entwicklungsverzögerungen und einer verringerten Nachkommenzahl. Aus der Reduktion der Fluoreszenzsignale (4.2) lässt sich ableiten, dass durch die RNAi Defekte in den Mikrovilli induziert werden, von denen auch der Oligopeptidtransporter PEPT-1 betroffen ist. Daraus folgt, dass dessen Resorptionsleistung beeinträchtigt ist, woraus man eine Störung der Nahrungsverwertung ableiten kann. Als Auswirkung von Nahrungsmangel wurde eine Reduktion der Nachkommenschaft beschrieben (Hibshman et al., 2016). Außerdem wurde das Auftreten von Entwicklungs- und Reproduktionsstörungen nach dem Verlust der PEPT-1 Resorptionsleistung bereits nachgewiesen (Meissner et al., 2004; Nehrke, 2003).

Eine Reduktion der Nachkommen wurde im Wildtyp N2, im JM125 (ACT-5::YFP) und im darmspezifischen Stamm OLB11 in Folge von *act-5*, *aps-1* und *rab-11.1* Puls- bzw. Dauer-RNAi gezeigt. Es ist möglich, dass durch eine verringerte Nährstoffaufnahme aufgrund der Desorganisation des apikalen Bürstensaums weniger Dotterprotein gebildet werden kann. Da keine Ablage von unbefruchteten Oozyten beobachtet wurde, liegt die Vermutung einer verringerten Bildung von Oozyten nahe.

Im WT und in JM125 war nach postembryonaler *act-5* Puls-RNAi die F1-Nachkommenzahl stärker verringert als im darmspezifischen Stamm OLB11. Die Funktion anderer Aktine in anderen Geweben, deren Beeinträchtigung zu einer verringerten F1-Nachkommenzahl beitragen kann, liegt in der Beteiligung an der spermathekalen Kontraktilität (Kelley & Cram,

2019). Die Reduktion der F1-Nachkommen in OLB11 kann damit erklärt werden, dass nach *act-5(RNAi)* die Aufnahme der im Darm durch Vitellogenese hergestellten Dotterproteine in die Oozyten gestört ist (Balklava et al., 2007; Kimble & Sharrock, 1983).

Nach embryonaler *aps-1* Puls-RNAi war die Anzahl der Nachkommen in OLB11 um 22,9 % niedriger als nach embryonaler *act-5* Puls-RNAi. Dies kann auf dem beschriebenen Nahrungsmangel, der aus der Desorganisation des apikalen Bürstensaums in Folge der RNAi resultiert, beruhen. Zieht man zu der stärkeren Reduktion der F2-Nachkommenzahl die ebenfalls geringere Anzahl F1-Adulter bei embryonaler *aps-1* Puls-RNAi in OLB11 hinzu, weist dies auf umfassendere Auswirkungen dieser RNAi hin. Dies ist nachvollziehbar, da sich *aps-1(RNAi)* nicht alleinig auf den Mikrovilli-Bestandteil ACT-5 auswirkt, sondern durch die Beeinträchtigung der Sortierungs- und Transportprozesse apikaler Proteine weitreichendere Auswirkungen in den Enterozyten möglich sind.

Ein weiterer Ansatzpunkt ist eine mögliche Störung des SNARE-Proteins SNAP-29 durch *aps-1(RNAi)*, da dieses für die Sekretion des Dotterproteins YP170 in den Enterozyten verantwortlich ist (M. Sato et al., 2011). Ein Mangel an SNAP-29, das an RAB-11 Endosomen und an den Mikrovilli in den *C. elegans* Enterozyten lokalisiert, führt neben Polaritäts- und Sekretionsdefekten auch zu einer geringen Nachkommenzahl bis hin zur Sterilität (Bidaud-Meynard et al., 2019; Kang et al., 2011).

Neben einer Abnahme des Dotterproteins aufgrund eines Nährstoffmangels kann auch der endosomale Transport des Dotterproteins und dessen Rezeptor, an dem RAB-11.1 als Rab-GTPase beteiligt ist (Grant & Sato, 2006), verringert sein. In diesem Fall sollte eine Akkumulierung des Dotterproteins visualisierbar sein. Gegen die These, dass eine Verringerung des Dotterproteins die Anzahl der Nachkommen beeinflusst, spricht, dass in YPR-Mutanten (yolk protein regulating), in denen eine verringerte Dotterproteinmenge vorliegt, kein Einfluss auf die Anzahl lebensfähiger Nachkommen festgestellt wurde (Van Rompay et al., 2015).

Hinsichtlich der Entwicklungsstörungen wurde erwartet, dass sich in OLB11 die meisten Adulttiere entwickeln, da in diesem Stamm der RNAi-Effekt auf den Darm beschränkt ist und so zusätzliche Auswirkungen durch die Sequenzähnlichkeit der *C. elegans* Aktine umgangen werden (4.1). Diese Erwartung traf bei postembryonaler *act-5* Puls-RNAi zu. Allerdings lag der Anteil der Adulttiere nach embryonaler *aps-1* Puls-RNAi um bis zu 11,7 % unter dem Anteil

im Stamm JM125. Nach embryonaler *act-5* Puls-RNAi erreichten sogar alle OLB11 Würmer das adulte Stadium. Diese unterschiedlichen Auswirkungen embryonaler *act-5* und *aps-1* Puls-RNAi hängen vermutlich mit der unterschiedlichen Rolle der Proteine, die herunterreguliert werden, zusammen. Während *act-5(RNAi)* eine Strukturkomponente der Mikrovilli herunterreguliert, wirkt sich *aps-1(RNAi)* auf Sortierungs- und Transportprozesse in den Enterozyten aus, wodurch vermutlich umfangreichere Defekte induziert werden.

Im WT ist postembryonale *rab-11.1(RNAi)* für einen larvalen Arrest ausreichend, während dieser in OLB11 erst in der F1 nach einer Kombination aus embryonaler und postembryonaler *rab-11.1* Dauer-RNAi auftritt. Dies zeigt, dass im WT vermutlich nicht die Herunterregulierung von RAB-11.1 im Darm, sondern in anderen Geweben, verantwortlich für den larvalen Arrest ist. Der Verlust von RAB-11.1 stört die Entwicklung der Gonaden (Green et al., 2011).

Der larvale Arrest erst in der F1 des OLB11 nach embryonaler und postembryonaler *rab-11.1* Dauer-RNAi lässt vermuten, dass die RNAi während der embryonalen Entwicklung für die Ausbildung eines larvalen Arrests am Ende der Larvalentwicklung im L4-Stadium relevant ist. Dies deutet darauf hin, dass *rab-11.1* im Darm in Bezug auf die Entwicklung eine besondere Rolle spielt. Ebenfalls im Darm ruft der Verlust von RAB-11.1 die intrazelluläre Akkumulation von ACT-5 und PEPT-1 hervor (Cheng et al., 2022; Shafaq-Zadah et al., 2012). Eine Störung dieser apikalen Proteine wurde auch hier bei postembryonaler *act-5(RNAi)* und *aps-1(RNAi)* beobachtet, wobei auch ein larvaler Arrest auftrat. Wenn die Lokalisierung dieser beiden Proteine in der F1 bereits ab der Embryonalentwicklung beeinträchtigt ist, könnte dies durch die daraus resultierenden Auswirkungen eine mögliche Erklärung für den späten larvalen Arrest sein.

Für eine vollständige Untersuchung der Entwicklungsstörungen wurde die Körperlänge nach Puls-RNAi in JM125 und OLB11 gemessen. In beiden Stämmen liegt die Körperlänge in der Kontrollgruppe über den in der Literatur angegebenen Werten für Adulte. Eine mögliche Erklärung ist, dass die Literaturwerte auf Messungen an fixierten statt betäubten Würmern beruhen, und außerdem im WT durchgeführt wurden (Byerly et al., 1976). Die Körperlänge der Tiere des JM125 war dabei noch größer als die der OLB11 Tiere. Es ist möglich, dass der JM125 Stamm neben einer Eigenart im Hinblick auf den RNAi-Effekt (3.3) auch weitere Besonderheiten aufweist.

Die signifikanten Unterschiede in der Körperlänge bereits einen Tag nach kurzer Puls-RNAi sind möglicherweise auf die geringe Anzahl der Messwerte und eine nicht absolute Synchronisation der L1-Larven zu Beginn zurückzuführen. Am siebten Tag war die Standardabweichung der Körperlänge der Tiere auf *act-5(RNAi)* deutlich höher als an den anderen ausgewerteten Tagen. Dies hängt vermutlich damit zusammen, dass zu diesem Zeitpunkt nur ein Teil der Larven das adulte Stadium erreicht hatte, sodass es zu größeren Längenunterschieden in der Gesamtpopulation kam. Daher waren die Längenunterschiede zwischen den mit einem RNAi-Puls behandelten Gruppen an diesem Tag auch nicht bzw. nur wenig signifikant.

#### **4.4 Die Regenerationsfähigkeit der *C. elegans* Enterozyten nach Puls-RNAi**

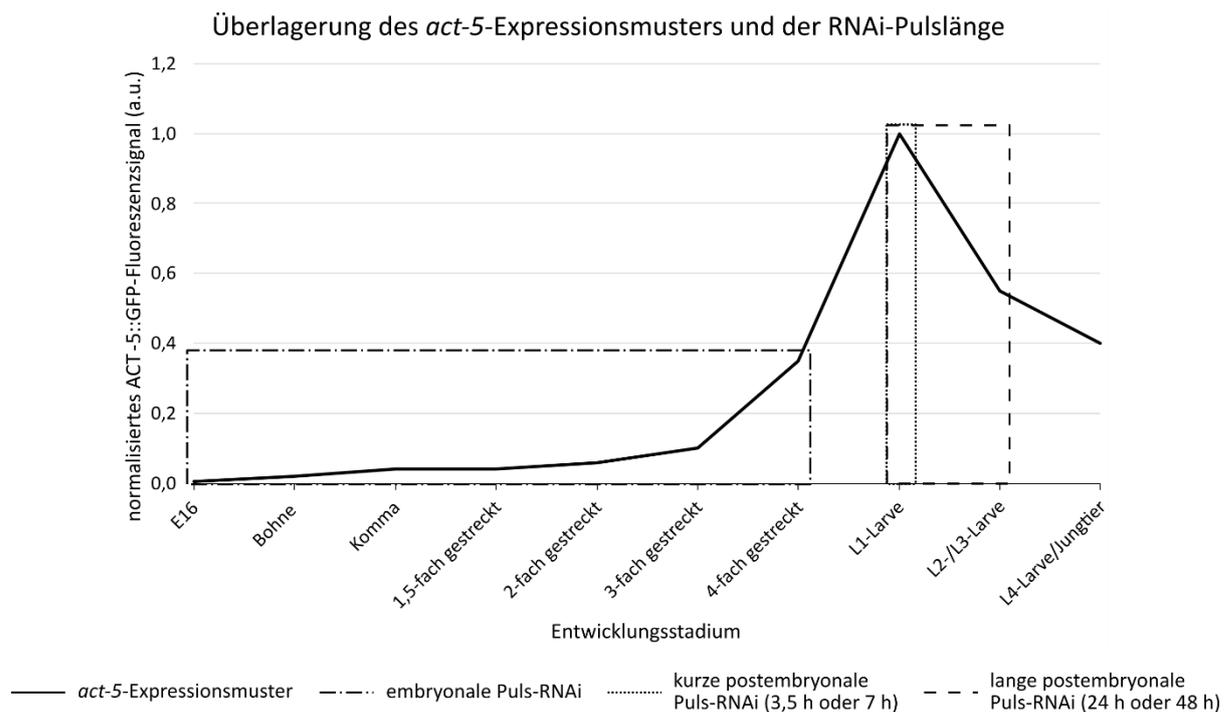
Die Frage nach der Regenerationsfähigkeit der Enterozyten geht mit der Überlegung einher, ob die Mikrovilli-Bildung primär zu einem bestimmten Entwicklungszeitpunkt erfolgt oder es über die gesamte postembryonale Entwicklung zu Erneuerungen kommt. Generell kann kurzzeitige RNAi nur dann zu einem Phänotyp führen, wenn während dieses Zeitraums eine kontinuierliche Expression des Zielgens erfolgt und diese für eine physiologische Entwicklung erforderlich ist (Lehmann et al., 2012).

Auf elektronenmikroskopischer Ebene wurde gezeigt, dass die Bildung der Mikrovilli während der Embryogenese beginnt und ihre Anzahl mit der Vergrößerung des Darmlumens während der Larvalentwicklung steigt (1.3.1). Dies sagt nichts darüber aus, ob während der larvalen Entwicklung kontinuierlich ACT-5 gebildet wird und am apikalen Bürstensaum ein Austausch stattfindet. Mittels eines fluoreszenzmarkierten ACT-5::GFP unter eigenem Promoter wurde gezeigt, dass im L1-Stadium die Expression dieses Proteins am höchsten ist, und sich bis zum Ende der Larvalentwicklung (=junge Adulte) halbiert (Bidaud-Meynard et al., 2021). Dies spricht gegen eine ständige Erneuerung des ACT-5 Proteins und eine regelmäßige Neubildung der Mikrovilli über die gesamte Entwicklung.

Über dieses Expressionsmuster wurden in Abb. 29 die Zeitfenster der in dieser Arbeit verwendeten Puls-RNAi über den Entwicklungsstadien eingetragen, in denen sich die Tiere auf den RNAi-Platten befanden. Embryonen, die über die Exposition der P0-Generation ab dem L4-Stadium eine Herunterregulierung erfahren haben (Rechteck in Strich-Punktstruktur, Abb. 29) und sich anschließend auf Kontrollplatten weiterentwickeln, haben die Möglichkeit,

dass der RNAi-Effekt genau dann nachlässt, wenn in der postembryonalen Entwicklung ein Expressionsmaximum für das ACT-5-Protein vorgesehen ist. Allerdings ist es auch möglich, dass der RNAi-Effekt trotz Transfer auf Kontrollplatten noch anhält, wie aus der Untersuchung des *let-413(RNAi)*-Klon und des Sterilitäts-Readouts in der Spermathek, einem anderen *C. elegans* Epithelgewebe, geschlossen wurde (3.5.1). Es ist davon auszugehen, dass in der dabei ermittelten möglichen Zeitspanne von 6 h die Expression weiterhin herunterreguliert ist.

Überträgt man diese Annahme auf die Ergebnisse nach *act-5* Puls-RNAi im Darmepithel, ist davon auszugehen, dass nach einer embryonalen Puls-RNAi mehr ACT-5 Protein gebildet werden kann als nach dem Nachlassen der Herunterregulierung zu einem späteren Zeitpunkt in der Entwicklung, wenn das Expressionsmaximum bereits verpasst wurde (postembryonale Puls-RNAi, gepunktetes und gestricheltes Rechteck, Abb. 29).



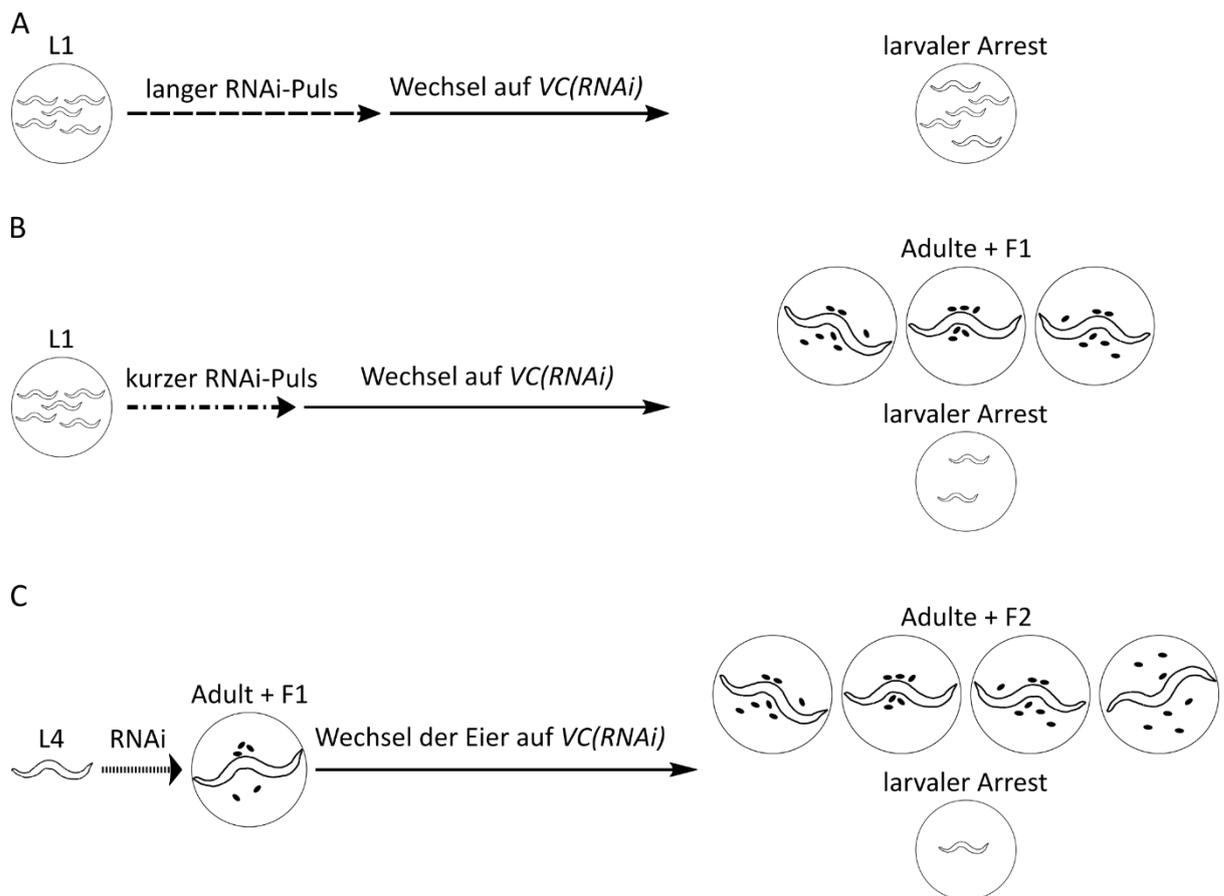
**Abb. 29 Visualisierung der möglichen Herunterregulierung der aus dem ACT-5::GFP Fluoreszenzsignal abgeleiteten *act-5* Expression nach (Bidaud-Meynard et al., 2021) durch die temporäre Exposition auf RNAi-Platten.**

**Rechteck mit Strich-Punktkontur:** Die *act-5* Expression wird in der embryonalen Entwicklung der F1 durch Exposition der P0 ab dem L4-Stadium auf RNAi-Platten herunterreguliert. Während der nachfolgenden Entwicklung der F1-Embryonen auf Kontrollplatten ist in der Kontrollgruppe das Expressionsmaximum im L1-Stadium vorgesehen. **Gepunktetes und gestricheltes Rechteck:** Die kurze und lange postembryonale *act-5* Puls-RNAi deckt, beginnend im L1-Stadium, den expressionsstarken Bereich ab.

Nach langer Puls-RNAi von 48 h und 24 h wurde nur eine geringfügige Weiterentwicklung und vorwiegend ein larvaler Arrest beobachtet (Abb. 30 A). Hingegen trat nach kurzer Puls-RNAi von 7 h und 3,5 h sowie noch ausgeprägter nach einer embryonalen Puls-RNAi eine Weiterentwicklung der betroffenen *C. elegans* Würmer bis zu Adulten, die Nachkommen bilden, auf (Abb. 30 B, C). Diese Ergebnisse stützen die Vermutung, dass mittels RNAi die Mikrovilli-Bildung zu Beginn der postembryonalen Entwicklung so gestört wird, dass die Mikrovilli-Bildung während der nachfolgenden Entwicklung nicht ausreicht, um die Auswirkungen auszugleichen, obwohl eine dauerhaft anhaltende Inhibition der Genexpression nicht mehr stattfindet.

Da bereits kurze Pulse von 3,5 h *act-5(RNAi)* ausreichen, um sich auf die systemischen Kennzeichen Entwicklung und Nachkommenzahl auszuwirken, sollte dieser Puls-Zeitraum weiter verkürzt werden, um die erforderliche Mindestlänge der Puls-RNAi zu ermitteln. Alternativ kann auch mit älteren Larvenstadien für einen definierten kurzen Zeitraum eine Puls-RNAi eingesetzt werden, denn auch im L4-Stadium wirkt sich das Einsetzen der RNAi noch auf die Anzahl und Letalität der Nachkommen aus.

Aus den hier erzielten Ergebnissen ist, unter Berücksichtigung des Rückgangs der *act-5* Expression in der späten larvalen Entwicklung (Bidaud-Meynard et al., 2021), abzuleiten, dass man zu Beginn der postembryonalen Entwicklung mittels RNAi erfolgreich in die Mikrovilli-Bildung eingreifen kann, während eine spätere Mikrovilli-Assemblierung während der fortgeschrittenen postembryonalen Entwicklung vermutlich nicht erfolgt. Die Regenerationsfähigkeit der *C. elegans* Enterozyten besteht demnach nicht in einem Zellaustausch, da diese Möglichkeit aufgrund der Zellkonstanz (Sulston & Horvitz, 1977) nicht gegeben ist, sondern in der Rückkehr zum physiologischem Programm nach abnehmendem RNAi-Effekt. Dabei ist der Entwicklungszeitpunkt, zu dem der RNAi-Effekt eingesetzt hat, sowie die Dauer dessen entscheidend. Das Ausmaß der Auswirkungen, die durch die Herunterregulierung des Zielgens hervorgerufen werden, ist von der Rolle des exprimierten Proteins abhängig.



**Abb. 30 Schematische Zusammenfassung der Methode der Puls-RNAi sowie die Auswirkungen auf die Entwicklung und Nachkommenzahl.**

(A) **Lange postembryonale *act-5* Puls-RNAi** von 48 h und 24 h führten in WT N2 und OLB11 L1-Larven zu einem larvalen Arrest. Da weniger als 10 % nach 24 h das adulte Stadium erreichten, wurde dies zur Vereinfachung aus der Darstellung ausgenommen. (B) Nach **kurzer postembryonaler *act-5* Puls-RNAi** von 7 h und 3,5 h entwickelte sich die Mehrheit zu Adulten und produzierte Nachkommen. (C) Nach **embryonaler Puls-RNAi** durch eine Exposition der P0-Generation ab dem L4-Stadium entwickelte sich die F1 anschließend auf Kontrollplatten mehrheitlich zu Adulten mit Nachkommen.

#### **4.5 Offene Fragen in Bezug auf die mögliche Rolle eines Cadherins im mikrovillären Bürstensaum**

Der physiologische Ablauf der Transportprozesse in den *C. elegans* Enterozyten ist u. a. auf Regulations- und Adapterproteine angewiesen, um die Cargoproteine in den Transportvesikeln an das richtige Ziel zu befördern.

Als Regulationsprotein ist PAR-5 an der Verteilung der RAB-11 Endosomen an der apikalen Membran beteiligt (Winter et al., 2012). Bei der Verwendung des *par-5(RNAi)*-Klons trat im Wildtyp N2 der bekannte sterile Phänotyp auf (Morton et al., 2002). Daher ist davon auszugehen, dass der RNAi-Klon zu einer Herunterregulierung der *par-5* mRNA führt. Das Ausbleiben eines mit DIK-Optik zu erfassenden Phänotypen oder die fehlenden Beobachtungen hinsichtlich Entwicklung und Nachkommenzahl im darmspezifischen RNAi-

Stamm OLB11 bedeuten daher nicht, dass keine RNAi stattfindet. Da in OLB11 kein fluoreszenzmarkiertes Protein vorliegt, ist eine Überprüfung der Beobachtung, dass nach einem Verlust von PAR-5 die Lokalisierung von F-Aktin und RAB-11 gestört ist (Winter et al., 2012), nur mittels Antikörperfärbung möglich. Eine Reproduzierung dieser Beobachtung würde nachweisen, dass *par-5(RNAi)* im OLB11-Darm stattfindet, die Auswirkungen aber nicht zu Entwicklungsverzögerungen und Reduzierung der Nachkommen führen.

CDH-5 wird als Nematoden-spezifisches Cadherin angesehen, zu dem Orthologe, jedoch mit deutlichen Strukturunterschieden, in weiteren Organismen vermutet werden (Cox et al., 2004; Pettitt, 2005). Dazu gehören das Cad99C in *D. melanogaster* sowie das Protocadherin-15 (PCDH15) in Säugetieren, die zur uniformen Ausbildung der Mikrovilli beitragen (D'Alterio et al., 2005; Glowinski et al., 2014; Schlichting et al., 2006). Dass die auf Protocadherin basierende intermikrovilläre Adhäsion auch für die korrekte Ausbildung des Bürstensaums in Enterozyten erforderlich ist, wurde in Zellkultur gezeigt (Crawley, Shifrin, et al., 2014). Das daran beteiligte  $\mu$ -Protocadherin/CDHR5 ist verwandt mit dem PCDH15 (Weck et al., 2020).

Aus diesen Gründen ist eine mögliche Beteiligung von CDH-5 an der intermikrovillären Adhäsion in den *C. elegans* Enterozyten denkbar. Allerdings wurden bei der Herunterregulierung von *cdh-5* im WT und in OLB11 weder generellen Auswirkungen auf die Entwicklung und die Nachkommenzahl noch mit DIK-Mikroskopie auf das Darmepithel festgestellt. Es ist möglich, dass mit diesen Kennzeichen die Auswirkungen von *cdh-5(RNAi)* nicht zu erfassen sind. Die Aussagekraft des Experiments kann auch durch die geringe Anzahl der Durchführungen begrenzt sein. Eine wiederholte Durchführung, u. a. mit der Betrachtung anderer Kennzeichen, ist denkbar. Zusätzliche Erkenntnisse könnten eventuell durch die Durchführung von *cdh-5(RNAi)* in der *rrf-3*-Mutante gewonnen werden, die hypersensitiv gegen RNAi ist und möglicherweise einen Phänotyp zeigt, der im WT ausbleibt (Simmer et al., 2003). Die Falsch-Negativ-Rate bei RNAi durch Fütterung liegt bei 30 % über alle *C. elegans* Gene (Kamath et al., 2003) und hängt mit einer geringeren Effizienz der RNAi zusammen (Simmer et al., 2003). Aufgrund dessen ist es zwingend erforderlich, nachzuweisen, dass der *cdh-5(RNAi)*-Klon effektiv ist. Die Herunterregulierung der mRNA kann mittels RT-PCR getestet werden, wobei allerdings bereits gebildetes und eventuell noch stabiles Protein nicht

erfasst werden würde (Ahringer, 2006). Am einfachsten gelänge dieser Nachweis über die Verwendung eines Reporterstammes oder eines Antikörpers, um die Proteinreduktion zu quantifizieren. Diese Methoden stehen jedoch beide nicht unmittelbar ohne große Vorbereitungen zur Verfügung.

Neben einer Ineffizienz des RNAi-Klons ist es auch denkbar, dass bei Verlust von CDH-5 andere Cadherine des *C. elegans* Genoms dessen Funktion kompensieren.

Mutanten des Nematoden-spezifischen Cadherin CDH-8 (Cox et al., 2004; Pettitt, 2005) weisen ebenfalls keinen direkt ersichtlichen Phänotyp auf. Neben einer unveränderten äußeren Morphologie und Nachkommenzahl zeigen sie lediglich ein verlangsamtes, aber dennoch WT-Länge erreichendes Wachstum (Zhu et al., 2022). Bei genauer Analyse des mikrovillären Bürstensaums der Enterozyten der mutanten *C. elegans* Larven wurde ein Mangel an borstenförmigen Strukturen im Nanogrößenbereich entlang der lateralen Membran der Mikrovilli beobachtet, wodurch diese einen geringeren Abstand zueinander aufwiesen (Zhu et al., 2022). Verbunden mit der Tatsache, dass vermehrt Y- oder V-förmige Mikrovilli auftraten, kam man zu dem Schluss, dass durch Division aus einem Mikrovilli zwei Mikrovilli werden. Dieser Trennungsprozess wird durch CDH-8 unterstützt, indem es als Abstandhalter für die gleichmäßige Ausrichtung der Mikrovilli sorgt (Zhu et al., 2022). Neben CDH-8 wurden auch die Cadherine CDH-3 und CDH-10, jedoch nicht CDH-5, untersucht, deren Verlust jedoch keine Auswirkungen auf die borstenförmigen Strukturen an der lateralen Mikrovilli-Membran hatte (Zhu et al., 2022).

#### **4.6 Offene Fragen in Bezug auf darmspezifische Tubuline**

Mikrotubuli sind für die Ausbildung des apikalen Bürstensaums in Enterozyten notwendig. In Zellkulturlinien und Säugetier-Modellorganismen wurde beobachtet, dass eine Störung des Mikrotubuli-Netzwerks durch eine Depolymerisierung zu einer ektopischen Lokalisierung von Mikrovilli sowie apikaler Marker-Proteine führt (Achler et al., 1989; Gilbert et al., 1991; Tonucci et al., 2018). Auch in den *C. elegans* Enterozyten wurde beobachtet, dass die Mikrotubuli für die Etablierung der Polarität des Darmepithels während der Embryonalentwicklung erforderlich sind (Feldman & Priess, 2012).

Es wird vermutet, dass der Hauptteil des Mikrotubuli-Netzwerks aus den breit exprimierten Tubulinen, die in allen Geweben jeweils die höchste Expression zeigen, gebildet und durch

den Einbau Gewebe-spezifischer Tubuline dieses Netzwerk den jeweiligen Anforderungen angepasst wird (Nishida et al., 2021). Zu den breit exprimierten Tubulinen gehören jeweils zwei  $\alpha$ - und  $\beta$ -Tubuline, TBA-1, TBA-2, TBB-1 und TBB-2, deren Expression im *C. elegans* Darm mittels eines mit CRISPR/Cas erzeugtem GFP-knock-in Stamms nachgewiesen wurde (Nishida et al., 2021). Auf diese Art kann jedoch nicht das gesamte Mikrotubuli-Netzwerk auf einmal dargestellt werden. Außerdem kann es durch die Fusion eines Fluoreszenzproteins an ein Tubulin-Gen zu Beeinträchtigungen kommen. Aufgrund der Redundanz der Tubulin-Isoformen würde dies nicht zwingend zu einer Einschränkung der Viabilität führen, dennoch könnte die Beschaffenheit des Mikrotubuli-Netzwerks unter Umständen verfälscht wiedergegeben werden (Shah et al., 2022).

Mit Hilfe des MAPH-1.1-Fusionsproteins wird ein gesamtheitlicher Eindruck über das Mikrotubuli-Netzwerk ermöglicht, da das Mikrotubuli-assoziierte Protein an den Mikrotubuli-Anordnungen in somatischen Geweben in *C. elegans* lokalisiert (Waaijers et al., 2016). Auf diese Art werden die Mikrotubuli durch die Fluoreszenzmarkierung nicht beeinträchtigt. Der Verlauf des MAPH-1.1-Fluoreszenzsignals in den embryonalen Entwicklungsstadien E16 und Kaulquappe entspricht auch dem bereits mit Antikörperfärbung gegen  $\alpha$ - bzw.  $\beta$ -Tubulin nachgewiesenem Muster (Feldman & Priess, 2012; Leung et al., 1999; Pickett et al., 2022).

Es ist zu beachten, dass mit dieser Methode allerdings nicht das Mikrotubuli-Netzwerk direkt visualisiert wird. Eine Veränderung des Fluoreszenzmusters nach der Herunterregulierung einzelner Tubuline mittels RNAi bedeutet in erster Linie eine veränderte Lokalisierung des MAPH-1.1-Proteins. Ein Zusammenhang mit der erfolgten Tubulin-RNAi liegt nahe, muss aber nicht der einzige Auslöser sein.

Nach der Herunterregulierung der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Tubuline *tba-4* sowie *tbb-2* und *tbb-4* zeigte sich eine mögliche Akkumulierung des MAPH-1.1-Fluoreszenzsignals um die Zellkerne (*tba-4(RNAi)*, *tbb-4(RNAi)*) bzw. im Zytoplasma der Enterozyten (*tbb-2(RNAi)*). Daher ist zu vermuten, dass sich entsprechend auch das Mikrotubuli-Netzwerk an diesen Stellen verdichtet. Aufgrund der geringen Anzahl der Messwerte ist es notwendig, die Aussagekraft dieser Ergebnisse durch eine erneute Durchführung zu erhöhen. Dabei ist es auch empfehlenswert, zu untersuchen, ob die Veränderung des Fluoreszenzsignals anstatt einer Messung an der apikalen Membran besser mit einer Messung durch den Darm von dorsal nach ventral erfasst werden kann. Da TBA-7 im Darm exprimiert wird (Hurd, 2018; Nishida et

al., 2021), sollte hier nach Herunterregulierung auch eine Auswirkung auf das MAPH-1.1-Fluoreszenzmuster im Darm untersucht werden.

Als Folge der Herunterregulierung des  $\alpha$ -Tubulins *tba-2* zu Beginn der larvalen Entwicklung wurde die Bildung von ACT-5-Aggregaten beobachtet, die jedoch nicht bei einem Einsetzen der Herunterregulierung erst in der L3-Larve auftrat (Saegusa et al., 2014). Die Abwesenheit einer ACT-5-Akkumulierung in diesem Stadium ist vermutlich auf die abnehmende *act-5* Expression in der späten larvalen Entwicklung (Bidaud-Meynard et al., 2021) zurückzuführen. Die Tubuline TBA-4 und TBB-2 sind außerdem für die korrekte Lokalisierung der RAB-11 Endosomen im Darmepithel erforderlich (Winter et al., 2012). Dies zeigt, dass die Störung einzelner Tubuline Auswirkungen auf den endosomalen Transport haben kann. In der Embryogenese verzögert eine Störung des Mikrotubuli-Netzwerks die, für die anschließende Polarisierung des Darmepithels notwendige, Umpositionierung von  $\gamma$ -Tubulin und PAR-3 von der lateralen zur apikalen Membran (Feldman & Priess, 2012).

Um eine Beteiligung einzelner Tubuline am Mikrotubuli-Netzwerk des Darms zu untersuchen, wurden die einzelnen Isoformen mittels RNAi herunterreguliert. Anhand der nachfolgenden Entwicklung und der gebildeten Nachkommen ist es nicht möglich, eine Aussage darüber zu treffen, ob die Herunterregulierung im darmspezifischen OLB11 einen Einfluss auf das Darmepithel hatte. Dies führt zu der Frage, ob die eingesetzten RNAi-Klone zu einem ausreichenden RNAi-Effekt führen. Der Exon-Anteil eines RNAi-Klons sollte möglichst groß sein, um einen genügenden Abbau der komplementären mRNA als Grundlage für den RNAi-Effekt hervorzurufen (Fire et al., 1998; Timmons & Fire, 1998).

Weil *tba-2(RNAi)*, *tbb-1(RNAi)*, *tbb-2(RNAi)* und *tbg-1(RNAi)* im Wildtyp N2 zu Sterilität führte, ist davon auszugehen, dass diese RNAi-Klone funktionieren. Da die Sterilität nicht im darmspezifischen OLB11 Stamm auftrat, hängt dieser Phänotyp nicht mit einer Herunterregulierung im Darmepithel zusammen.

Auffallend ist, dass eine Herunterregulierung von *tba-4*, *tba-5*, *tba-8*, *tba-9* und *mec-7* im WT nicht zu einem Phänotyp führt, in OLB11 jedoch die Entwicklung zu Adulten leicht verlangsamt war. Eine Möglichkeit ist, dass im OLB11-Hintergrund eine Mutation in *rrf-3* vorliegt, was zu einer Veränderung der RNAi-Sensitivität führen würde. Allerdings trat in der der RNAi-hypersensitiven *rrf-3* Mutante nur bei *tba-4(RNAi)* ein larvaler Arrest auf (Simmer

et al., 2003). Eine Gewebe-spezifische Expression im Darm wurde neben TBA-4 auch für TBA-7 und TBB-6 gezeigt (Hurd, 2018). Bis auf TBB-6 wurde diese Expression auch mittels des jeweiligen CRISPR/Cas GFP-knock-in Stamms gezeigt, über die eine präzisere Aussage zum endogenen Vorkommen des jeweiligen Proteins getroffen werden soll (Nishida et al., 2021). Sowohl die Herunterregulierung mittels *tba-7(RNAi)* als auch *tbb-6(RNAi)* ergab keinen Phänotyp im WT oder in OLB11 im Hinblick auf die Entwicklung und Nachkommenzahl.

Es ist möglich, dass es aufgrund von Redundanz innerhalb der Tubulin-Familie zu keinen aufschlussreichen Beobachtungen hinsichtlich der Kennzeichen Entwicklung und Nachkommenzahl kommen konnte.

Auch wenn hier im darmspezifischen RNAi-Stamm OLB11 nach Herunterregulierung der im Darm exprimierten Tubuline (Hurd, 2018; Nishida et al., 2021) kein eindeutiger Phänotyp zu erkennen war, sollte vor allem die Rolle von TBA-4 und TBA-7 im Darm weiter untersucht werden.

## 5 Zusammenfassung

Enterozyten, die den Metazoen-Darm auskleiden, besitzen an ihrer apikalen Oberfläche Aktin-basierte Membranausstülpungen, so genannte Mikrovilli, um durch diese Oberflächenvergrößerung eine erhöhte Nährstoffaufnahme zu erreichen. Dieser Bürstensaum ist ein wesentliches Merkmal des Darms von *C. elegans*. Die Besonderheit, dass der Darm aus einer definierten Zellzahl von nur 20 Enterozyten besteht, die sich aufgrund fehlender intestinaler Stammzellen lebenslang nicht erneuern können, wirft eine spannende Frage auf: Ist eine Kompensation von Defekten im mikrovillären Bürstensaum durch die vorhandenen Enterozyten möglich?

Um diese Frage zu beantworten, wurde Puls-RNAi durch Fütterung in Form einer temporären Exposition auf RNAi-Platten etabliert. Permanente und Puls-RNAi gegen *act-5* und *aps-1* schädigte das Darmepithel während der embryonalen und postembryonalen Entwicklung, indem die Fluoreszenzsignale der Mikrovilli-Marker ACT-5::YFP und PEPT-1::DsRed reduziert wurden. Im Wildtyp N2 war die Untersuchung der Langzeitauswirkungen auf Entwicklung und Reproduktion nach embryonaler Puls-RNAi aufgrund des Auftretens embryonaler Letalität, bedingt durch die Sequenzähnlichkeit des *act-5* Gens zu den anderen Aktin-Genen (*act-1*, *act-2*, *act-3*, *act-4*), nicht möglich. In den Stämmen OLB11 und JM125, die eine darmspezifische bzw. reduzierte Sensitivität gegenüber RNAi aufweisen, führte embryonale Puls-RNAi zu einer verzögerten Entwicklung und einer reduzierten Nachkommenzahl. Die Möglichkeit, dass der RNAi-Effekt in Abhängigkeit von der Pulslänge auch nach dem Transfer auf Kontrollplatten erhalten bleibt, wurde anhand von postembryonaler Puls-RNAi in einem weiteren Epithelgewebe, der Spermathek, gezeigt. Kurze postembryonale Puls-RNAi gegen *act-5* führte ebenfalls zu einer verzögerten Larval- und Adultentwicklung sowie zu einer reduzierten Nachkommenzahl. Es ist also möglich, die Bildung des mikrovillären Bürstensaums in der frühen Entwicklung zu stören. Die Kompensation der Defekte in den Enterozyten von *C. elegans* beruht wahrscheinlich auf einer physiologisch erhöhten Expression nach Abnahme des RNAi-Effekts im weiteren Entwicklungsverlauf.

Die Untersuchung der Langzeiteffekte auf Entwicklung und Nachkommenzahl wurde auf weitere Komponenten des Transportprozesses in *C. elegans* Enterozyten ausgeweitet, die für den mikrovillären Bürstensaum wichtig sind. Während darmspezifische Dauer-RNAi gegen

*rab-11.1* die Anzahl der F1-Nachkommen in P0 reduzierte und zu einer verzögerten Entwicklung führte, wurde dies bei Dauer-RNAi gegen *par-5* und *cdh-5* nicht beobachtet.

Das Mikrotubuli-Netzwerk im Darm von *C. elegans* wurde während der Entwicklung durch das Fluoreszenzsignal des Mikrotubuli-assoziierten Proteins MAPH-1.1 visualisiert. Die Auswertung der Nachkommenzahl nach darmspezifischer Tubulin-RNAi gibt Aufschluss darüber, welche Tubulin-Isoformen im Darm konkret beteiligt sind. Die Veränderung des Fluoreszenzsignals von MAPH-1.1 nach Tubulin-RNAi lässt auf die Beteiligung einzelner Tubulin-Isoformen schließen, was die Komplexität des Mikrotubuli-Netzwerks unterstreicht.

## 6 Abstract

Enterocytes lining the metazoan intestine have actin-based membrane protrusions called microvilli on their apical surface to enhance nutrient uptake. This microvilli-like brush border is an essential feature of the *C. elegans* intestine. The peculiarity that it consists of a defined cell number of only 20 enterocytes, which cannot renew themselves for life due to the lack of intestinal stem cells, raises an exciting question: Can the existing enterocytes compensate for defects in the microvillar brush border?

To answer this question, pulse RNAi was established by feeding in the form of transient exposure to RNAi plates. Permanent and pulse RNAi against *act-5* or *aps-1* damaged the intestinal epithelium during embryonic and postembryonic development by reducing the fluorescence signals of the microvilli markers ACT-5::YFP and PEPT-1::DsRed. In wild-type N2, it was not possible to study long-term effects on development and reproduction after embryonic pulse RNAi because of embryonic lethality caused by the sequence similarity of the *act-5* gene to the other actin genes (*act-1*, *act-2*, *act-3*, *act-4*). In the OLB11 and JM125 strains, which exhibit intestine-specific and reduced sensitive to RNAi, respectively, embryonic pulse RNAi resulted in delayed development and reduced number of offspring. The possibility that the pulse length-dependent RNAi effect persists after transfer to control plates was demonstrated using postembryonic pulse RNAi in another epithelial tissue, the spermatheca. Short postembryonic pulse RNAi against *act-5* also resulted in delayed larval and adult development and reduced number of offspring. Thus, it is possible to disrupt the formation of the microvillus brush border in early development. The compensation of the defects in *C. elegans* enterocytes is probably based on a physiologically increased expression after a decrease of the RNAi effect in the further course of development.

The investigation of long-term effects on development and progeny number was extended to other components of the transport process in *C. elegans* enterocytes that are important for the microvillous brush border. While intestine-specific permanent RNAi against *rab-11.1* reduced the number of F1 progeny in P0 and led to delayed development, this was not observed with permanent RNAi against *par-5* and *cdh-5*.

The microtubule network in the intestine of *C. elegans* was visualized during development using the fluorescence signal of the microtubule-associated protein MAPH-1.1. Evaluation of the number of offspring after intestine-specific tubulin RNAi provides information on which tubulin isoforms are specifically involved in the intestine. The change in fluorescence signal of MAPH-1.1 after tubulin RNAi indicates the involvement of individual tubulin isoforms and underscores the complexity of the microtubule network.

## 7 Literaturverzeichnis

- Achler, C., Filmer, D., Merte, C., & Drenckhahn, D. (1989). Role of microtubules in polarized delivery of apical membrane proteins to the brush border of the intestinal epithelium. *Journal of Cell Biology*, *109*(1), 179–189. <https://doi.org/10.1083/jcb.109.1.179>
- Ahringer, J. (2006). Reverse genetics. *WormBook*, ed. The *C. elegans* Research Community, WormBook. <https://doi.org/10.1895/wormbook.1.47.1>
- Altschul, S., Madden, T., Schäffer, A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., & Lipman, D. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, *25*(17), 3389–3402. <https://doi.org/10.1093/nar/25.17.3389>
- Altun, Z. F., & Hall, D. H. (2009). Introduction. In *WormAtlas*. <https://doi.org/10.3908/wormatlas.1.1>
- Babcock, S. J., Flores-Marin, D., & Thiagarajah, J. R. (2022). The genetics of monogenic intestinal epithelial disorders. *Human Genetics*, *142*(5), 613–654. <https://doi.org/10.1007/s00439-022-02501-5>
- Balklava, Z., Pant, S., Fares, H., & Grant, B. D. (2007). Genome-wide analysis identifies a general requirement for polarity proteins in endocytic traffic. *Nature Cell Biology*, *9*(9), 1066–1073. <https://doi.org/10.1038/ncb1627>
- Bidaud-Meynard, A., Demouchy, F., Nicolle, O., Pacquelet, A., Suman, S. K., Plancke, C. N., Robin, F. B., & Michaux, G. (2021). High-resolution dynamic mapping of the *C. elegans* intestinal brush border. *Development*, *148*(23), 1–8. <https://doi.org/10.1242/dev.200029>
- Bidaud-Meynard, A., Nicolle, O., Heck, M., Le Cunff, Y., & Michaux, G. (2019). A V0-ATPase-dependent apical trafficking pathway maintains the polarity of the intestinal absorptive membrane. *Development*, *146*(11), 1–13. <https://doi.org/10.1242/dev.174508>
- Bossinger, O., & Cowan, C. R. (2012). Methods in cell biology: analysis of cell polarity in *C. elegans* embryos. In *Academic Press* (Vol. 107, pp. 207–238). [https://doi.org/10.1016/S0091-679X\(08\)60298-8](https://doi.org/10.1016/S0091-679X(08)60298-8)
- Bossinger, O., Fukushige, T., Claeys, M., Borgonie, G., & McGhee, J. D. (2004). The apical disposition of the *Caenorhabditis elegans* intestinal terminal web is maintained by LET-413. *Developmental Biology*, *268*(2), 448–456. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2004.01.003>
- Bossinger, O., Klebes, A., Segbert, C., Theres, C., & Knust, E. (2001). Zonula adherens formation in *Caenorhabditis elegans* requires *dlg-1*, the homologue of the *Drosophila* gene *discs large*. *Developmental Biology*, *230*(1), 29–42. <https://doi.org/10.1006/dbio.2000.0113>
- Bossinger, O., Wiesenfahrt, T., & Hoffmann, M. (2015). Establishment and maintenance of cell polarity in the *C. elegans* intestine. In *Cell Polarity 2* (pp. 33–65). Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-14466-5\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-319-14466-5_2)
- Braukmann, F., Jordan, D., & Miska, E. (2017). Artificial and natural RNA interactions between bacteria and *C. elegans*. *RNA Biology*, *14*(4), 415–420. <https://doi.org/10.1080/15476286.2017.1297912>
- Brenner, S. (1974). The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, *77*(1), 71–94. <https://doi.org/10.1002/cbic.200300625>
- Buechner, M. (2002). Tubes and the single *C. elegans* excretory cell. *TRENDS in Cell Biology*, *12*(10), 479–484. [https://doi.org/10.1016/S0962-8924\(02\)02364-4](https://doi.org/10.1016/S0962-8924(02)02364-4)
- Buechner, M., Hall, D. H., Bhatt, H., & Hedgecock, E. M. (1999). Cystic canal mutants in *Caenorhabditis elegans* are defective in the apical membrane domain of the renal (excretory) cell. *Developmental Biology*, *214*(1), 227–241. <https://doi.org/10.1006/dbio.1999.9398>
- Buechner, M., Yang, Z., & Al-Hashimi, H. (2020). A series of tubes: The *C. elegans* excretory canal cell as a model for tubule development. *Journal of Developmental Biology*, *8*(3). <https://doi.org/10.3390/JDB8030017>
- Byerly, L., Cassada, R. C., & Russell, R. L. (1976). The life cycle of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Developmental Biology*, *51*(1), 23–33. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(76\)90119-6](https://doi.org/10.1016/0012-1606(76)90119-6)
- C. elegans* Sequencing Consortium. (1998). Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for

- investigating biology. *Science*, 282(5396), 2012–2018. <https://doi.org/10.1126/science.282.5396.2012>
- Carberry, K., Wiesenfahrt, T., Geisler, F., Stöcker, S., Gerhardus, H., Überbach, D., Davis, W., Jorgensen, E. M., Leube, R. E., & Bossinger, O. (2012). The novel intestinal filament organizer IFO-1 contributes to epithelial integrity in concert with ERM-1 and DLG-1. *Development*, 139(10), 1851–1862. <https://doi.org/10.1242/dev.075788>
- Cheng, X., Zhang, P., Zhao, H., Zheng, H., Zheng, K., Zhang, H., & Zhang, H. (2022). Proteotoxic stress disrupts epithelial integrity by inducing MTOR sequestration and autophagy overactivation. *Autophagy*, 19(1), 241–255. <https://doi.org/10.1080/15548627.2022.2071381>
- Chung, S., & Andrew, D. J. (2014). Cadherin 99C regulates apical expansion and cell rearrangement during epithelial tube elongation. *Development*, 141(9), 1950–1960. <https://doi.org/10.1242/dev.104166>
- Clark, J. M. (1988). Novel non-templated nucleotide addition reactions catalyzed by procaryotic and eucaryotic DNA polymerases. *Nucleic Acids Research*, 16(20), 9677–9686. <https://doi.org/10.1093/nar/16.20.9677>
- Coch, R. A., & Leube, R. E. (2016). Intermediate filaments and polarization in the intestinal epithelium. *Cells*, 5(3), 32. <https://doi.org/10.3390/cells5030032>
- Corsi, A. K., Wightman, B., & Chalfie, M. (2015). A transparent window into biology: A primer on *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 200(2), 387–407. <https://doi.org/10.1534/genetics.115.176099>
- Costa, M., Draper, B. W., & Priess, J. R. (1997). The role of actin filaments in patterning the *Caenorhabditis elegans* cuticle. *Developmental Biology*, 184(2), 373–384. <https://doi.org/10.1006/dbio.1997.8530>
- Costa, M., Raich, W., Agbunag, C., Leung, B., Hardin, J., & Priess, J. R. (1998). A putative catenin-cadherin system mediates morphogenesis of the *Caenorhabditis elegans* embryo. *Journal of Cell Biology*, 141(1), 297–308. <https://doi.org/10.1083/jcb.141.1.297>
- Cox, E. A., Tuskey, C., & Hardin, J. (2004). Cell adhesion receptors in *C. elegans*. *Journal of Cell Science*, 117(10), 1867–1870. <https://doi.org/10.1242/jcs.01177>
- Crawley, S. W., Mooseker, M. S., & Tyska, M. J. (2014). Shaping the intestinal brush border. *Journal of Cell Biology*, 207(4), 441–451. <https://doi.org/10.1083/jcb.201407015>
- Crawley, S. W., Shifrin, D. A., Grega-Larson, N. E., McConnell, R. E., Benesh, A. E., Mao, S., Zheng, Y., Zheng, Q. Y., Nam, K. T., Millis, B. A., Kachar, B., & Tyska, M. J. (2014). Intestinal brush border assembly driven by protocadherin-based intermicrovillar adhesion. *Cell*, 157(2), 433–446. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.01.067>
- D’Alterio, C., Tran, D. D. D., Yeung, M. W. Y. A., Hwang, M. S. H., Li, M. A., Arana, C. J., Mulligan, V. K., Kubesh, M., Sharma, P., Chase, M., Tepass, U., & Godt, D. (2005). *Drosophila melanogaster* Cad99C, the orthologue of human Usher cadherin PCDH15, regulates the length of microvilli. *Journal of Cell Biology*, 171(3), 549–558. <https://doi.org/10.1083/jcb.200507072>
- Dai, H., & Gu, W. (2020). Small RNA plays important roles in virus–host interactions. *Viruses*, 12(11), 1271. <https://doi.org/10.3390/v12111271>
- Davis, P., Zarowiecki, M., Arnaboldi, V., Becerra, A., Cain, S., Chan, J., Chen, W. J., Cho, J., da Veiga Beltrame, E., Diamantakis, S., Gao, S., Grigoriadis, D., Grove, C. A., Harris, T. W., Kishore, R., Le, T., Lee, R. Y. N., Luybaert, M., Müller, H. M., ... Sternberg, P. W. (2022). WormBase in 2022-data, processes, and tools for analyzing *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 220(4), iyac003. <https://doi.org/10.1093/genetics/iyac003>
- Delacour, D., Salomon, J., Robine, S., & Louvard, D. (2016). Plasticity of the brush border—the yin and yang of intestinal homeostasis. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, 13(3), 161–174. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2016.5>
- Dimov, I., & Maduro, M. F. (2019). The *C. elegans* intestine: organogenesis, digestion, and physiology. *Cell and Tissue Research*, 377(3), 383–396. <https://doi.org/10.1007/s00441-019-03036-4>
- Duncan, M. C. (2022). New directions for the clathrin adaptor AP-1 in cell biology and human disease. *Current Opinion in Cell Biology*, 76, 102079. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2022.102079>
- Dutta, P., Odedra, D., & Pohl, C. (2019). Planar asymmetries in the *C. elegans* embryo emerge by differential retention of aPARs at cell-cell contacts. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 7, 209. <https://doi.org/10.3389/fcell.2019.00209>

- Engevik, A. C., & Goldenring, J. R. (2018). Trafficking ion transporters to the apical membrane of polarized intestinal enterocytes. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 10(1), a027979. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a027979>
- Fei, Y.-J., Fujita, T., Lapp, D. F., Ganapathy, V., & Leibach, F. H. (1998). Two oligopeptide transporters from *Caenorhabditis elegans*: molecular cloning and functional expression. *Biochemical Journal*, 332(2), 565–572. <https://doi.org/10.1042/bj3320565>
- Fei, Y.-J., Romero, M. F., Krause, M., Liu, J.-C., Huang, W., Ganapathy, V., & Leibach, F. H. (2000). A novel H<sup>+</sup>-coupled oligopeptide transporter (OPT3) from *Caenorhabditis elegans* with a predominant function as a H<sup>+</sup> channel and an exclusive expression in neurons. *Journal of Biological Chemistry*, 275(13), 9563–9571. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.13.9563>
- Feldman, J. L., & Priess, J. R. (2012). A role for the centrosome and PAR-3 in the hand-off of microtubule organizing center function during epithelial polarization. *Current Biology*, 22(7), 575–582. <https://doi.org/10.1038/jid.2014.371>
- Files, J. G., Carr, S., & Hirsh, D. I. (1983). Actin gene family of *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Molecular Biology*, 164(3), 355–375. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(83\)90056-6](https://doi.org/10.1016/0022-2836(83)90056-6)
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E., & Mello, C. C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 391(6669), 806–811. <https://doi.org/10.1038/35888>
- Fraser, A. G., Kamath, R. S., Zipperlen, P., Martinez-Campos, M., Sohrmann, M., & Ahringer, J. (2000). Functional genomic analysis of *C. elegans* chromosome I by systematic RNA interference. *Nature*, 408(6810), 325–330. <https://doi.org/10.1038/35042517>
- Fukushige, T., Hawkins, M. G., & McGhee, J. D. (1998). The GATA-factor *elt-2* is essential for formation of the *Caenorhabditis elegans* intestine. *Developmental Biology*, 198(2), 286–302. <https://doi.org/10.1006/dbio.1998.8899>
- Fukushige, T., Hendzel, M. J., Bazett-Jones, D. P., & McGhee, J. D. (1999). Direct visualization of the *elt-2* gut-specific GATA factor binding to a target promoter inside the living *Caenorhabditis elegans* embryo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(21), 11883–11888. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.21.11883>
- Fulton, C., Simpson, P. A., Goldman, R., Pollard, T., & Rosenbaum, J. (1976). Cell motility. *New York: Cold Spring Harbor Laboratory*, 987–1005.
- Gavet, O., & Pines, J. (2010). Progressive activation of CyclinB1-Cdk1 coordinates entry to mitosis. *Developmental Cell*, 18(4), 533–543. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2010.02.013>
- Gehart, H., & Clevers, H. C. (2019). Tales from the crypt: new insights into intestinal stem cells. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, 16(1), 19–34. <https://doi.org/10.1038/s41575-018-0081-y>
- Gilbert, T., Le Bivic, A., Quaroni, A., & Rodriguez-Boulan, E. (1991). Microtubular organization and its involvement in the biogenetic pathways of plasma membrane proteins in Caco-2 intestinal epithelial cells. *Journal of Cell Biology*, 113(2), 275–288. <https://doi.org/10.1083/jcb.113.2.275>
- Gillard, G., Shafaq-Zadah, M., Nicolle, O., Damaj, R., Pecreaux, J., & Michaux, G. (2015). Control of E-cadherin apical localisation and morphogenesis by a SOAP-1/AP-1/clathrin pathway in *C. elegans* epidermal cells. *Development*, 142(9), 1684–1694. <https://doi.org/10.1242/dev.118216>
- Glowinski, C., Liu, R.-H. S., Chen, X., Darabie, A., & Godt, D. (2014). Myosin VIIA regulates microvillus morphogenesis and interacts with cadherin Cad99C in *Drosophila* oogenesis. *Journal of Cell Science*, 127(22), 4821–4832. <https://doi.org/10.1242/jcs.099242>
- Gobel, V., Barrett, P. L., Hall, D. H., & Fleming, J. T. (2004). Lumen morphogenesis in *C. elegans* requires the membrane-cytoskeleton linker *erm-1*. *Developmental Cell*, 6(6), 865–873. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2004.05.018>
- Grant, B. D., & Sato, M. (2006). Intracellular trafficking. *WormBook*, ed. The *C. elegans* Research Community, WormBook. <https://doi.org/10.1895/wormbook.1.77.1>
- Green, R. A., Kao, H.-L., Audhya, A., Arur, S., Mayers, J. R., Fridolfsson, H. N., Schulman, M., Schloissnig, S.,

- Niessen, S., Laband, K., Wang, S., Starr, D. A., Hyman, A. A., Schedl, T., Desai, A., Piano, F., Gunsalus, K. C., & Oegema, K. (2011). A high-resolution *C. elegans* essential gene network based on phenotypic profiling of a complex tissue. *Cell*, *145*(3), 470–482. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.03.037>
- Grishok, A. (2005). RNAi mechanisms in *Caenorhabditis elegans*. *FEBS Letters*, *579*(26), 5932–5939. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2005.08.001>
- Grishok, A. (2013). Biology and mechanisms of short RNAs in *Caenorhabditis elegans*. In T. Friedmann, J. C. Dunlap, & S. F. Goodwin (Eds.), *Advances in Genetics* (1st ed., Vol. 83, pp. 1–69). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-407675-4.00001-8>
- Hardin, J., Lynch, A., Loveless, T., & Pettitt, J. (2013). Cadherins and their partners in the nematode worm *Caenorhabditis elegans*. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, *116*, 239–262. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394311-8.00011-X>
- Hawkins, M. G., & McGhee, J. D. (1995). *elt-2*, a second GATA factor from the nematode *Caenorhabditis elegans*. In *Journal of Biological Chemistry* (Vol. 270, Issue 24, pp. 14666–14671). <https://doi.org/10.1074/jbc.270.24.14666>
- Hervé, J. C., & Bourmeyster, N. (2018). Rab GTPases, master controllers of eukaryotic trafficking. *Small GTPases*, *9*(1–2), 1–4. <https://doi.org/10.1080/21541248.2018.1428853>
- Hibshman, J. D., Hung, A., & Baugh, L. R. (2016). Maternal diet and insulin-like signaling control intergenerational plasticity of progeny size and starvation resistance. *PLoS Genetics*, *12*(10), e1006396. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006396>
- Hillier, L. W., Coulson, A., Murray, J. I., Bao, Z., Sulston, J. E., & Waterston, R. H. (2005). Genomics in *C. elegans*: So many genes, such a little worm. *Genome Research*, *15*(12), 1651–1660. <https://doi.org/10.1101/gr.3729105>
- Hurd, D. D. (2018). Tubulins in *C. elegans*. *WormBook*, ed. The *C. elegans* Research Community, WormBook. <https://doi.org/10.1895/wormbook.1.182.1>
- Iwasaki, K., McCarter, J., Francis, R., & Schedl, T. (1996). *emo-1*, a *Caenorhabditis elegans* Sec61p gamma homologue, is required for oocyte development and ovulation. *Journal of Cell Biology*, *134*(3), 699–714.
- Kamath, R. S., & Ahringer, J. (2003). Genome-wide RNAi screening in *Caenorhabditis elegans*. *Methods*, *30*(4), 313–321. [https://doi.org/10.1016/S1046-2023\(03\)00050-1](https://doi.org/10.1016/S1046-2023(03)00050-1)
- Kamath, R. S., Fraser, A. G., Dong, Y., Poulin, G., Durbin, R., Gotta, M., Kanapin, A., Le Bot, N., Moreno, S., Sohrmann, M., Welchman, D. P., Zipperlen, P., & Ahringer, J. (2003). Systematic functional analysis of the *Caenorhabditis elegans* genome using RNAi. *Nature*, *421*(6920), 231–237. <https://doi.org/10.1038/nature01278>
- Kang, J., Bai, Z., Zegarek, M. H., Grant, B. D., & Lee, J. (2011). Essential roles of *snap-29* in *C. elegans*. *Developmental Biology*, *355*(1), 77–88. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2011.04.013>
- Kang, J., Shin, D., Yu, J.-R., & Lee, J. (2009). Lats kinase is involved in the intestinal apical membrane integrity in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Development*, *136*(16), 2705–2715. <https://doi.org/10.1242/dev.035485>
- Kelley, C. A., & Cram, E. J. (2019). Regulation of actin dynamics in the *C. elegans* somatic gonad. *Journal of Developmental Biology*, *7*(1), 6. <https://doi.org/10.3390/JDB7010006>
- Kemphues, K. J., Priess, J. R., Morton, D. G., & Cheng, N. (1988). Identification of genes required for cytoplasmic localization in early *C. elegans* embryos. *Cell*, *52*(3), 311–320. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(88\)80024-2](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(88)80024-2)
- Khan, L. A., Jafari, G., Zhang, N., Membreno, E., Yan, S., Zhang, H., & Gobel, V. (2019). A tensile trilayered cytoskeletal endotube drives capillary-like lumenogenesis. *Journal of Cell Biology*, *218*(7), 2403–2424. <https://doi.org/10.1083/jcb.201811175>
- Khanal, I., Elbediwy, A., Diaz de la Loza, M. del C., Fletcher, G. C., & Thompson, B. J. (2017). Shot and Patronin polarise microtubules to direct membrane traffic and biogenesis of microvilli in epithelia. *Journal of Cell Science*, *130*(13), 2221–2221. <https://doi.org/10.1242/jcs.206912>
- Kimble, J., & Hirsh, D. I. (1979). The postembryonic cell lineages of the hermaphrodite and male gonads in

- Caenorhabditis elegans*. *Developmental Biology*, 70(2), 396–417. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(79\)90035-6](https://doi.org/10.1016/0012-1606(79)90035-6)
- Kimble, J., & Sharrock, W. J. (1983). Tissue-specific synthesis of yolk proteins in *Caenorhabditis elegans*. *Developmental Biology*, 96(1), 189–196. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(83\)90322-6](https://doi.org/10.1016/0012-1606(83)90322-6)
- Köppen, M., Simske, J. S., Sims, P. A., Firestein, B. L., Hall, D. H., Radice, A. D., Rongo, C., & Hardin, J. D. (2001). Cooperative regulation of AJM-1 controls junctional integrity in *Caenorhabditis elegans* epithelia. *Nature Cell Biology*, 3(11), 983–991. <https://doi.org/10.1038/ncb1101-983>
- Lahl, V., Halama, C., & Schierenberg, E. (2003). Comparative and experimental embryogenesis of Plectidae (Nematoda). *Development Genes and Evolution*, 213(1), 18–27. <https://doi.org/10.1007/s00427-002-0289-1>
- Lehmann, S., Shephard, F., Jacobson, L. A., & Szewczyk, N. J. (2012). Using multiple phenotype assays and epistasis testing to enhance the reliability of RNAi screening and identify regulators of muscle protein degradation. *Genes*, 3(4), 686–701. <https://doi.org/10.3390/genes3040686>
- Leung, B., Hermann, G. J., & Priess, J. R. (1999). Organogenesis of the *Caenorhabditis elegans* intestine. *Developmental Biology*, 216(1), 114–134.
- Los, F. C. O., Kao, C. Y., Smitham, J., McDonald, K. L., Ha, C., Peixoto, C. A., & Aroian, R. V. (2011). RAB-5- and RAB-11-dependent vesicle-trafficking pathways are required for plasma membrane repair after attack by bacterial pore-forming toxin. *Cell Host and Microbe*, 9(2), 147–151. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2011.01.005>
- Mackintosh, C. (2004). Dynamic interactions between 14-3-3 proteins and phosphoproteins regulate diverse cellular processes. *Biochemical Journal*, 381(2), 329–342. <https://doi.org/10.1042/BJ20031332>
- MacQueen, A. J., Baggett, J. J., Perumov, N., Bauer, R. A., Januszewski, T., Schriefer, L., & Waddle, J. A. (2005). ACT-5 is an essential *Caenorhabditis elegans* actin required for intestinal microvilli formation. *Molecular Biology of the Cell*, 16(7), 3247–3259. <https://doi.org/10.1091/mbc.e04-12-1061>
- Marré, J., Traver, E. C., & Jose, A. M. (2016). Extracellular RNA is transported from one generation to the next in *Caenorhabditis elegans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(44), 12496–12501. <https://doi.org/10.1073/pnas.1608959113>
- McGhee, J. D. (2007). The *C. elegans* intestine. *WormBook*, ed. The *C. elegans* Research Community, WormBook. <https://doi.org/10.1895/wormbook.1.133.1>
- McGhee, J. D., Fukushige, T., Krause, M. W., Minnema, S. E., Goszczynski, B., Gaudet, J., Kohara, Y., Bossinger, O., Zhao, Y., Khattra, J., Hirst, M., Jones, S. J. M., Marra, M. A., Ruzanov, P., Warner, A., Zapf, R., Moerman, D. G., & Kalb, J. M. (2009). ELT-2 is the predominant transcription factor controlling differentiation and function of the *C. elegans* intestine, from embryo to adult. *Developmental Biology*, 327(2), 551–565. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2008.11.034>
- McMahon, L., Legouis, R., Vonesch, J.-L., & Labouesse, M. (2001). Assembly of *C. elegans* apical junctions involves positioning and compaction by LET-413 and protein aggregation by the MAGUK protein DLG-1. *Journal of Cell Science*, 114(12), 2265–2277.
- Meissner, B., Boll, M., Daniel, H., & Baumeister, R. (2004). Deletion of the intestinal peptide transporter affects insulin and TOR signaling in *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Biological Chemistry*, 279(35), 36739–36745. <https://doi.org/10.1074/jbc.M403415200>
- Michaux, G., Legouis, R., & Labouesse, M. (2001). Epithelial biology: lessons from *Caenorhabditis elegans*. *Gene*, 277(1–2), 83–100. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(01\)00700-4](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(01)00700-4)
- Mooseker, M. S. (1985). Organization, chemistry, and assembly of the cytoskeletal apparatus of the intestinal brush border. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 1(1), 209–241.
- Morton, D. G., Shakes, D. C., Nugent, S., Dichoso, D., Wang, W., Golden, A., & Kemphues, K. J. (2002). The *Caenorhabditis elegans par-5* gene encodes a 14-3-3 protein required for cellular asymmetry in the early embryo. *Developmental Biology*, 241(1), 47–58. <https://doi.org/10.1006/dbio.2001.0489>
- Mugabo, Y., & Lim, G. E. (2018). Scaffold proteins: from coordinating signaling pathways to metabolic regulation. *Endocrinology*, 159(11), 3615–3630. <https://doi.org/10.1210/en.2018-00705>

- Munn, E. A., & Greenwood, C. A. (1984). The occurrence of submicrovillar endotube (modified terminal web) and associated cytoskeletal structures in the intestinal epithelia of nematodes. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 306(1125), 1–18.
- Nakatsu, F., Hase, K., & Ohno, H. (2014). The role of the clathrin adaptor AP-1: Polarized sorting and beyond. *Membranes*, 4(4), 747–763. <https://doi.org/10.3390/membranes4040747>
- Nehrke, K. (2003). A reduction in intestinal cell pH<sub>i</sub> due to loss of the *Caenorhabditis elegans* Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Exchanger NHX-2 increases life span. *Journal of Biological Chemistry*, 278(45), 44657–44666. <https://doi.org/10.1074/jbc.M307351200>
- Nishida, K., Tsuchiya, K., Obinata, H., Onodera, S., Honda, Y., Lai, Y.-C., Haruta, N., & Sugimoto, A. (2021). Expression patterns and levels of all tubulin isotypes analyzed in GFP knock-in *C. elegans* strains. *Cell Structure and Function*, 46(1), 51–64. <https://doi.org/10.1247/csf.21022>
- Ono, S. (2022). Imaging of Actin Cytoskeleton in the Nematode *Caenorhabditis elegans*. In R. H. Gavin (Ed.), *Methods in Molecular Biology* (Vol. 2364, pp. 149–158). [https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1661-1\\_8](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1661-1_8)
- Oriolo, A. S., Wald, F. A., Ramsauer, V. P., & Salas, P. J. I. (2007). Intermediate filaments: a role in epithelial polarity. *Experimental Cell Research*, 313(10), 2255–2264. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2007.02.030>
- Parker, S. S., Cox, C., & Wilson, J. M. (2018). Rabs set the stage for polarity. *Small GTPases*, 9(1–2), 116–129. <https://doi.org/10.1080/21541248.2016.1277840>
- Pásti, G., & Labouesse, M. (2014). Epithelial junctions, cytoskeleton, and polarity. *WormBook*, ed. The *C. elegans* Research Community, WormBook. <https://doi.org/10.1895/wormbook.1.56.2>
- Pelaseyed, T., & Bretscher, A. (2018). Regulation of actin-based apical structures on epithelial cells. *Journal of Cell Science*, 131(20), jcs221853. <https://doi.org/10.1242/jcs.221853>
- Pettitt, J. (2005). The cadherin superfamily. *WormBook*, ed. The *C. elegans* Research Community, WormBook. <https://doi.org/10.1895/wormbook.1.50.1>
- Pickering, A. M., Staab, T. A., Tower, J., Sieburth, D., & Davies, K. J. A. (2013). A conserved role for the 20S proteasome and Nrf2 transcription factor in oxidative stress adaptation in mammals, *Caenorhabditis elegans* and *Drosophila melanogaster*. *Journal of Experimental Biology*, 216(4), 543–553. <https://doi.org/10.1242/jeb.074757>
- Pickett, M. A., Sallee, M. D., Cote, L., Naturale, V. F., Akpınaroglu, D., Lee, J., Shen, K., & Feldman, J. L. (2022). Separable mechanisms drive local and global polarity establishment in the *C. elegans* intestinal epithelium. *Development*, 149(22), dev200325. <https://doi.org/10.1242/dev.200325>
- Pilipiuk, J., Lefebvre, C., Wiesenfahrt, T., Legouis, R., & Bossinger, O. (2009). Increased IP<sub>3</sub>/Ca<sup>2+</sup> signaling compensates depletion of LET-413/DLG-1 in *C. elegans* epithelial junction assembly. *Developmental Biology*, 327(1), 34–47. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2008.11.025>
- Pinette, J. A., Mao, S., Millis, B. A., Krystofiak, E. S., Faust, J. J., & Tyska, M. J. (2019). Brush border protocadherin CDHR2 promotes the elongation and maximized packing of microvilli in vivo. *Molecular Biology of the Cell*, 30(1), 108–118. <https://doi.org/10.1091/mbc.E18-09-0558>
- Pollard, T. D. (2016). Actin and actin-binding proteins. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 8(8), a018226.
- Priess, J. R., & Hirsh, D. I. (1986). *Caenorhabditis elegans* morphogenesis: The role of the cytoskeleton in elongation of the embryo. *Developmental Biology*, 117(1), 156–173. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(86\)90358-1](https://doi.org/10.1016/0012-1606(86)90358-1)
- Ramalho, J. J. (2019). *Untangling the animal plumbing: Apical domain formation in C. elegans tubular epithelia*. <http://hdl.handle.net/1874/388148>
- Ramalho, J. J., Sepers, J. J., Nicolle, O., Schmidt, R., Cravo, J., Michaux, G., & Boxem, M. (2020). C-terminal phosphorylation modulates ERM-1 localization and dynamics to control cortical actin organization and support lumen formation during *Caenorhabditis elegans* development. *Development*, 147(14), dev188011. <https://doi.org/10.1242/dev.188011>
- Rees, W. D., Tandun, R., Yau, E., Zachos, N. C., & Steiner, T. S. (2020). Regenerative intestinal stem cells induced by acute and chronic injury: the saving grace of the epithelium? *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8, 1333. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.583919>

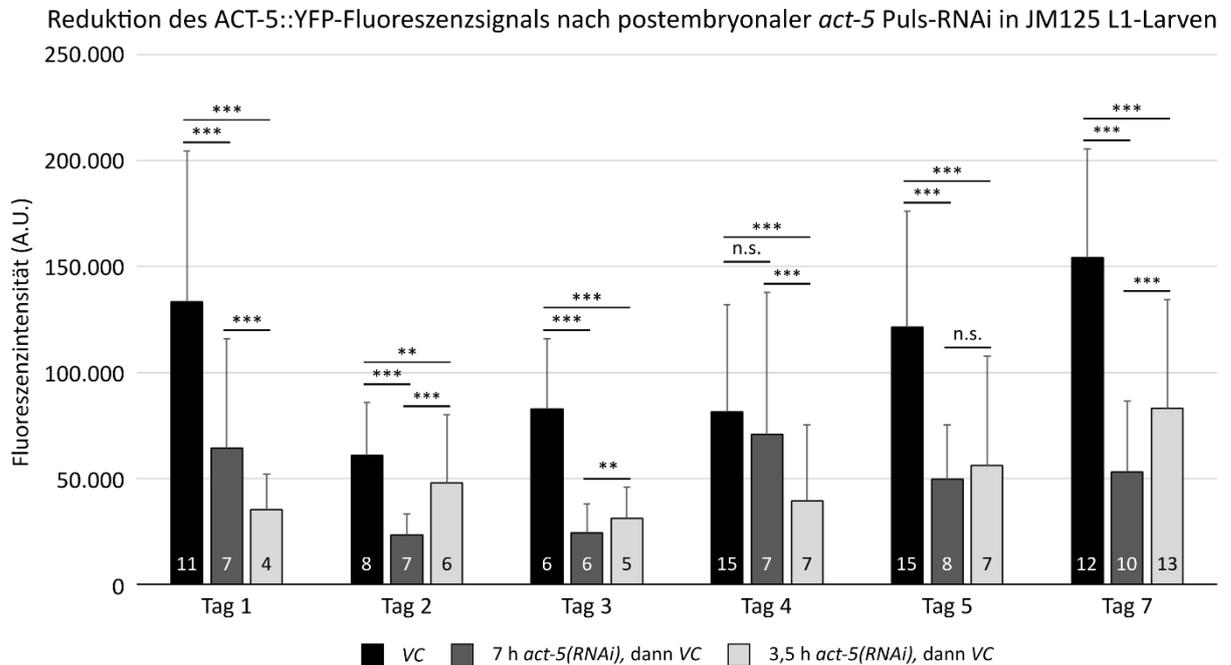
- Román-Fernández, A., & Bryant, D. M. (2016). Complex polarity: building multicellular tissues through apical membrane traffic. *Traffic*, *17*(12), 1244–1261. <https://doi.org/10.1111/tra.12417>
- Roth, D., Birkenfeld, J., & Betz, H. (1999). Dominant-negative alleles of 14-3-3 proteins cause defects in actin organization and vesicle targeting in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters*, *460*(3), 411–416. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(99\)01383-6](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(99)01383-6)
- Roth, D., & Burgoyne, R. D. (1995). Stimulation of catecholamine secretion from adrenal chromaffin cells by 14-3-3 proteins is due to reorganisation of the cortical actin network. *FEBS Letters*, *374*(1), 77–81. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(95\)01080-X](https://doi.org/10.1016/0014-5793(95)01080-X)
- Saegusa, K., Sato, M., Sato, K., Nakajima-Shimada, J., Harada, A., & Sato, K. (2014). *Caenorhabditis elegans* chaperonin CCT/TRiC is required for actin and tubulin biogenesis and microvillus formation in intestinal epithelial cells. *Molecular Biology of the Cell*, *25*(20), 3095–3104. <https://doi.org/10.1091/mbc.E13-09-0530>
- Sallee, M. D., & Feldman, J. L. (2021). Microtubule organization across cell types and states. *Current Biology*, *31*(10), R506–R511. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2021.01.042>
- Sallee, M. D., Zonka, J. C., Skokan, T. D., Raftrey, B. C., & Feldman, J. L. (2018). Tissue-specific degradation of essential centrosome components reveals distinct microtubule populations at microtubule organizing centers. In *PLoS Biology* (Vol. 16, Issue 8). <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2005189>
- Sanchez, A. D., & Feldman, J. L. (2017). Microtubule-organizing centers: from the centrosome to non-centrosomal sites. *Current Opinion in Cell Biology*, *44*, 93–101. <https://doi.org/10.1016/j.ccb.2016.09.003>
- Sato, K., Norris, A., Sato, M., & Grant, B. D. (2014). *C. elegans* as a model for membrane traffic. *WormBook*, ed. The *C. elegans* Research Community, WormBook. <https://doi.org/10.1895/wormbook.1.77.2>
- Sato, M., Saegusa, K., Sato, K., Hara, T., Harada, A., & Sato, K. (2011). *Caenorhabditis elegans* SNAP-29 is required for organellar integrity of the endomembrane system and general exocytosis in intestinal epithelial cells. *Molecular Biology of the Cell*, *22*(14), 2579–2587. <https://doi.org/10.1091/mbc.E11-04-0279>
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J.-Y., White, D. J., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P., & Cardona, A. (2012). Fiji: An open source platform for biological image analysis. *Nature Methods*, *9*(7), 676–682. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019.Fiji>
- Schlichting, K., Wilsch-Bräuninger, M., Demontis, F., & Dahmann, C. (2006). Cadherin Cad99C is required for normal microvilli morphology in *Drosophila* follicle cells. *Journal of Cell Science*, *119*(6), 1184–1195. <https://doi.org/10.1242/jcs.02831>
- Seroby, V., Kontarakis, Z., El-Brolosy, M. A., Welker, J. M., Tolstenkov, O., Saadeldein, A. M., Retzer, N., Gottschalk, A., Wehman, A. M., & Stainier, D. Y. R. (2020). Transcriptional adaptation in *Caenorhabditis elegans*. *ELife*, *9*, e50014. <https://doi.org/10.7554/eLife.50014>
- Shafaq-Zadah, M., Brocard, L., Solari, F., & Michaux, G. (2012). AP-1 is required for the maintenance of apico-basal polarity in the *C. elegans* intestine. *Development*, *139*(11), 2061–2070. <https://doi.org/10.1242/dev.076711>
- Shah, P., Bao, Z., & Zaidel-Bar, R. (2022). Visualizing and quantifying molecular and cellular processes in *Caenorhabditis elegans* using light microscopy. *Genetics*, *221*(4), iyac068. <https://doi.org/10.1093/genetics/iyac068>
- Sharkova, M., Chow, E., Erickson, T., & Hocking, J. C. (2023). The morphological and functional diversity of apical microvilli. *Journal of Anatomy*, *242*(3), 327–353. <https://doi.org/10.1111/joa.13781>
- Sijen, T., Fleenor, J., Simmer, F., Thijssen, K. L., Parrish, S., Timmons, L., Plasterk, R. H. A., & Fire, A. (2001). On the role of RNA amplification in dsRNA-triggered gene silencing. *Cell*, *107*(4), 465–476.
- Simmer, F., Moorman, C., van der Linden, A. M., Kuijk, E., van den Berghe, P. V. E., Kamath, R. S., Fraser, A. G., Ahringer, J., & Plasterk, R. H. A. (2003). Genome-wide RNAi of *C. elegans* using the hypersensitive *rrf-3* strain reveals novel gene functions. *PLoS Biology*, *1*(1), e12. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0000012>
- Sladowska, M., Turek, M., Kim, M.-J., Drabikowski, K., Mussulini, B. H. M., Mohanraj, K., Serwa, R. A., Topf, U., & Chacinska, A. (2021). Proteasome activity contributes to prosurvival response upon mild mitochondrial

- stress in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS Biology*, 19(7), e3001302. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3001302>
- Stojanović, O., Miguel-Aliaga, I., & Trajkovski, M. (2022). Intestinal plasticity and metabolism as regulators of organismal energy homeostasis. *Nature Metabolism*, 4(11), 1444–1458. <https://doi.org/10.1038/s42255-022-00679-6>
- Sulston, J. E., & Horvitz, H. R. (1977). Post-embryonic cell lineages of the nematode, *Caenorhabditis elegans*. *Developmental Biology*, 56(1), 110–156. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(77\)90158-0](https://doi.org/10.1016/0012-1606(77)90158-0)
- Sulston, J. E., Schierenberg, E., White, J. G., & Thomson, J. N. (1983). The embryonic cell lineage of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Developmental Biology*, 100(1), 64–119. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(83\)90201-4](https://doi.org/10.1016/0012-1606(83)90201-4)
- Sundaram, M. V., & Buechner, M. (2016). The *Caenorhabditis elegans* excretory system: A model for tubulogenesis, cell fate specification, and plasticity. *Genetics*, 203(1), 35–63. <https://doi.org/10.1534/genetics.116.189357>
- Szumowski, S. C., Botts, M. R., Popovich, J. J., Smelkinson, M. G., & Troemel, E. R. (2014). The small GTPase RAB-11 directs polarized exocytosis of the intracellular pathogen *N. parisii* for fecal-oral transmission from *C. elegans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(22), 8215–8220. <https://doi.org/10.1073/pnas.1400696111>
- Szumowski, S. C., Estes, K. A., Popovich, J. J., Botts, M. R., Sek, G., & Troemel, E. R. (2016). Small GTPases promote actin coat formation on microsporidian pathogens traversing the apical membrane of *Caenorhabditis elegans* intestinal cells. *Cellular Microbiology*, 18(1), 30–45. <https://doi.org/10.1111/cmi.12481>
- Tabara, H., Sarkissian, M., Kelly, W. G., Fleenor, J., Grishok, A., Timmons, L., Fire, A., & Mello, C. C. (1999). The *rde-1* gene, RNA interference, and transposon silencing in *C. elegans*. *Cell*, 99(2), 123–132. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81644-X](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81644-X)
- Tabara, H., Yigit, E., Siomi, H., & Mello, C. C. (2002). The double-stranded RNA binding protein RDE-4 interacts in vivo with RDE-1, DCR-1 and a conserved DExH-box helicase to direct RNA interference in *C. elegans*. *Cell*, 109(7), 861–871. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00793-6](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00793-6)
- Timmons, L., Court, D. L., & Fire, A. (2001). Ingestion of bacterially expressed dsRNAs can produce specific and potent genetic interference in *Caenorhabditis elegans*. *Gene*, 263(1–2), 103–112. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(00\)00579-5](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(00)00579-5)
- Timmons, L., & Fire, A. (1998). Specific interference by ingested dsRNA. *Nature*, 395(6705), 854. <https://doi.org/10.1038/27579>
- Tonucci, F. M., Ferretti, A., Almada, E., Cribb, P., Vena, R., Hidalgo, F., Favre, C., Tyska, M. J., Kaverina, I., & Larocca, M. C. (2018). Microtubules regulate brush border formation. *Journal of Cellular Physiology*, 233(2), 1468–1480. <https://doi.org/10.1002/jcp.26033>
- Tyska, M. J. (2016). Listen to your gut: Using adhesion to shape the surface of functionally diverse epithelia. *Rare Diseases*, 4(1), 190–200. <https://doi.org/10.1080/21675511.2016.1220469>
- Ubelmann, F., Chamailard, M., El-Marjou, F., Simon, A., Netter, J., Vignjevic, D., Nichols, B. L., Quezada-Calvillo, R., Grandjean, T., Louvard, D., Revenu, C., & Robine, S. (2013). Enterocyte loss of polarity and gut wound healing rely upon the F-actin-severing function of villin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(15), E1380–E1389. <https://doi.org/10.1073/pnas.1218446110>
- van Cleave, H. J. (1932). Eutely or cell constancy in its relation to body size. *The Quarterly Review of Biology*, 7(1), 59–67.
- Van Rompay, L., Borghgraef, C., Beets, I., Caers, J., & Temmerman, L. (2015). New genetic regulators question relevance of abundant yolk protein production in *C. elegans*. *Scientific Reports*, 5(1), 16381. <https://doi.org/10.1038/srep16381>
- Velarde, N., Gunsalus, K. C., & Piano, F. (2007). Diverse roles of actin in *C. elegans* early embryogenesis. *BMC Developmental Biology*, 7, 1–16. <https://doi.org/10.1186/1471-213X-7-142>
- Waaijers, S., Muñoz, J., Berends, C., Ramalho, J. J., Goerdal, S. S., Low, T. Y., Zoumaro-Djayoon, A. D., Hoffmann, M., Koorman, T., Tas, R. P., Harterink, M., Seelk, S., Kerver, J., Hoogenraad, C. C., Bossinger, O.,

- Tursun, B., van den Heuvel, S., Heck, A. J. R., & Boxem, M. (2016). A tissue-specific protein purification approach in *Caenorhabditis elegans* identifies novel interaction partners of DLG-1/Discs large. *BMC Biology*, *14*(1), 1–24. <https://doi.org/10.1186/s12915-016-0286-x>
- Wang, W., & Shakes, D. C. (1996). Molecular evolution of the 14-3-3 protein family. *Journal of Molecular Evolution*, *43*, 384–398. <https://doi.org/10.1007/BF02339012>
- Weck, M. L., Crawley, S. W., & Tyska, M. J. (2020). A heterologous in-cell assay for investigating intermicrovillar adhesion complex interactions reveals a novel protrusion length-matching mechanism. *Journal of Biological Chemistry*, *295*(48), 16191–16206. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA120.015929>
- Winter, J. F., Höpfner, S., Korn, K., Farnung, B. O., Bradshaw, C. R., Marsico, G., Volkmer, M., Habermann, B., & Zerial, M. (2012). *Caenorhabditis elegans* screen reveals role of PAR-5 in RAB-11-recycling endosome positioning and apicobasal cell polarity. *Nature Cell Biology*, *14*(7), 666–676. <https://doi.org/10.1038/ncb2508>
- Zhang, B., Xiao, R., Ronan, E. A., He, Y., Hsu, A. L., Liu, J., & Xu, X. Z. S. (2015). Environmental temperature differentially modulates *C. elegans* longevity through a thermosensitive TRP channel. *Cell Reports*, *11*(9), 1414–1424. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.04.066>
- Zhang, H., Kim, A., Abraham, N., Khan, L. A., & Göbel, V. (2013). Vesicular sorting controls the polarity of expanding membranes in the *C. elegans* intestine. *Worm*, *2*(1), e23702. <https://doi.org/10.4161/worm.23702>
- Zhang, H., Kim, A., Abraham, N., Khan, L. A., Hall, D. H., Fleming, J. T., & Gobel, V. (2012). Clathrin and AP-1 regulate apical polarity and lumen formation during *C. elegans* tubulogenesis. *Development*, *139*(11), 2071–2083. <https://doi.org/10.1242/dev.077347>
- Zhu, H., Li, M., Zhao, R., Li, M., Chai, Y., Zhu, Z., Yang, Y., Li, W., Xie, Z., Li, X., Lei, K., Li, X., & Ou, G. (2022). In situ structure of intestinal apical surface reveals nanobristles on microvilli. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *119*(24). <https://doi.org/10.1073/pnas.2122249119>

## 8 Anhang

### 8.1 Postembryonale *act-5* Puls-RNAi reduziert das ACT-5::YFP-Fluoreszenzsignal

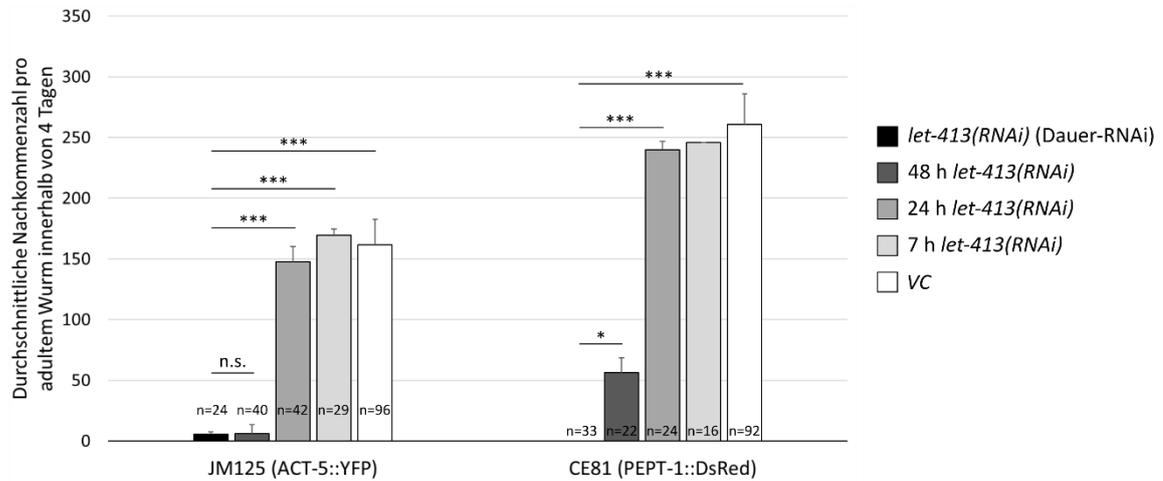


**Abb. 31** Quantifizierung des ACT-5::YFP-Fluoreszenzsignals bis Tag 7 nach postembryonaler *act-5* Puls-RNAi in JM125 L1-Larven.

Start JM125 L1, ACT-5::YFP-Fluoreszenzintensität an Tag 1 bis Tag 5 und an Tag 7, auf **Kontrollplatten**: 133.307±71.248 A.U.(Tag 1), 60.901±24.949 A.U. (Tag 2), 82.836±33.149 A.U. (Tag 3), 81.516±50.633 A.U. (Tag 4), 121.381±54.792 A.U. (Tag 5), 154.225±51.275 A.U. (Tag 7); nach **7 h *act-5*(RNAi)**: 64.358±51.525 A.U. (Tag 1), 23.162±9898 A.U. (Tag 2), 24.432±13.712 A.U. (Tag 3), 70.698±67.186 A.U. (Tag 4), 49.470±25.733 A.U. (Tag 5), 52.974±33.680 A.U. (Tag 7); nach **3,5 h *act-5*(RNAi)**: 35.266±16.889 A.U. (Tag 1), 47.823±32.162 A.U. (Tag 2), 31.130±14.871 A.U. (Tag 3), 39.313±35.945 A.U. (Tag 4), 56.085±51.767 A.U. (Tag 5), 83.117±51.116 A.U. (Tag 7); Tag 1: Reduktion auf 48,3 % (7 h *act-5*(RNAi)) bzw. 26,5 % (3,5 h *act-5*(RNAi)) der Fluoreszenzintensität der Kontrolle. Tag 2: Reduktion auf 38,0 % (7 h *act-5*(RNAi)) bzw. 78,5 % (3,5 h *act-5*(RNAi)). Tag 3: Reduktion auf 29,5 % (7 h *act-5*(RNAi)) bzw. 37,6 % (3,5 h *act-5*(RNAi)). Tag 4: Reduktion auf 86,7 % (7 h *act-5*(RNAi)) bzw. 48,2 % (3,5 h *act-5*(RNAi)). Tag 5: Reduktion auf 40,8 % (7 h *act-5*(RNAi)) bzw. 46,2 % (3,5 h *act-5*(RNAi)). Tag 7: Reduktion auf 34,3 % (7 h *act-5*(RNAi)) bzw. 53,9 % (3,5 h *act-5*(RNAi)). n.s.: nicht signifikant, \*p-Wert<0,05, \*\*p-Wert<0,01, \*\*\* p-Wert<0,001.

## 8.2 Die F1-Nachkommenzahl nach postembryonaler *let-413* Puls-RNAi in den Stämmen JM125 und CE81

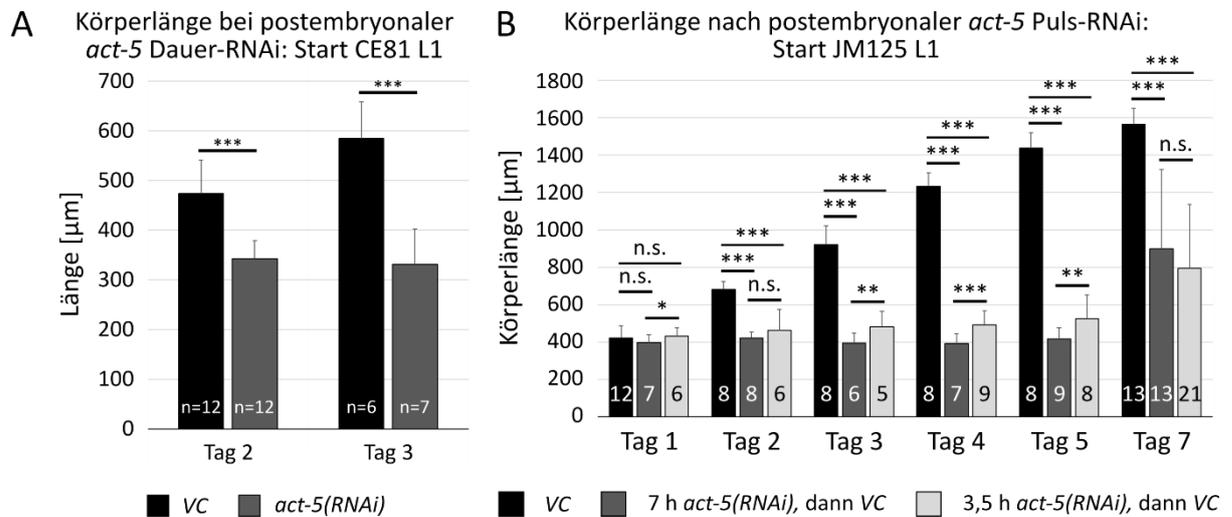
F1-Nachkommenzahl nach unterschiedlich lang andauernder postembryonaler *let-413* Puls-RNAi: Start JM125 und CE81 L1



**Abb. 32** Durchschnittliche Nachkommenzahl in adulten Hermaphroditen nach postembryonaler *let-413* Puls- und Dauer-RNAi, beginnend in L1-Larven.

Die *let-413(RNAi)*-Würmer wurden nach der jeweils angegebenen Zeit der Puls-RNAi auf Kontrollplatten umgesetzt. Die Entwicklung und Eiablage erfolgten bei 15 °C. Von links nach rechts, **JM125**: 5±2 F1/A, 6±7 F1/A, 148±12 F1/A, 170±45 F1/A, 162±21 F1/A; **CE81**: 0 F1/A, 56±12 F1/A, 240±7 F1/A, 246±0 F1/A, 261±25 F1/A. n.s.: nicht signifikant. \* p-Wert < 0,05, \*\* p-Wert < 0,01, \*\*\* p-Wert < 0,001. Die Signifikanz zwischen der Nachkommenzahl nach 7 h *let-413* Puls-RNAi und permanenter *let-413* Dauer-RNAi konnte nicht ermittelt werden.

### 8.3 Postembryonale *act-5* Dauer- und Puls-RNAi führt zu einem verminderten Körperlängenwachstum



**Abb. 33 Körperlänge bei postembryonaler *act-5* Dauer-RNAi in CE81 und nach 7 h und 3,5 h postembryonaler *act-5* Puls-RNAi in JM125 L1-Larven.**

Tag 1–4, Tag 7 sind Messzeitpunkte (A) Tag 2 und Tag 3 geben hier gleichzeitig auch die Verweildauer auf RNAi an. (A) **Start CE81 L1**, Körperlänge an Tag 2 und Tag 3 auf Kontrollplatten:  $474 \pm 66 \mu\text{m}$ ,  $585 \pm 74 \mu\text{m}$ ; **bei *act-5(RNAi)***:  $343 \pm 36 \mu\text{m}$ ,  $332 \pm 70 \mu\text{m}$ . (B) **Start JM125 L1**. In der Kontrollgruppe nimmt die Körperlänge kontinuierlich zu. Im Vergleich dazu ist die Länge nach Puls-RNAi verringert. Körperlänge auf **Kontrollplatten**:  $422 \pm 66 \mu\text{m}$  (Tag 1),  $681 \pm 43 \mu\text{m}$  (Tag 2),  $921 \pm 100 \mu\text{m}$  (Tag 3),  $1235 \pm 73 \mu\text{m}$  (Tag 4),  $1437 \pm 84 \mu\text{m}$  (Tag 5) und  $1565 \pm 87 \mu\text{m}$  (Tag 7); **nach 7 h *act-5(RNAi)***:  $397 \pm 42 \mu\text{m}$  (Tag 1),  $422 \pm 33 \mu\text{m}$  (Tag 2),  $395 \pm 51 \mu\text{m}$  (Tag 3),  $393 \pm 51 \mu\text{m}$  (Tag 4),  $417 \pm 61 \mu\text{m}$  (Tag 5) und  $900 \pm 424 \mu\text{m}$  (Tag 7); **nach 3,5 h *act-5(RNAi)***:  $432 \pm 46 \mu\text{m}$  (Tag 1),  $462 \pm 114 \mu\text{m}$  (Tag 2),  $481 \pm 84 \mu\text{m}$  (Tag 3),  $491 \pm 77 \mu\text{m}$  (Tag 4),  $524 \pm 129 \mu\text{m}$  (Tag 5) und  $793 \pm 342 \mu\text{m}$  (Tag 7). n.s.: nicht signifikant, \*p-Wert<0,05, \*\*p-Wert<0,01, \*\*\* p-Wert<0,001.

## 8.4 Tubulin-RNAi

Tab. 13 Übereinstimmung der gespleißten Nukleinsäuresequenz mit UTR des jeweiligen Tubulin-Gens mit der getroffenen mRNA-Sequenz (BLASTN 2.10.1+, (Altschul et al., 1997))

Eingabesequenz	Treffer	Abgedeckte Sequenz	E-Wert	Sequenzähnlichkeit
<i>tba-1</i>	<i>tba-1</i>	100 %	0,0	100 %
	<i>tba-2</i>	83 %	0,0	87,37 %
	<i>tba-4</i>	83 %	0,0	84,86 %
	<i>mec-12</i>	84 %	0,0	76,20 %
	<i>tba-7</i>	81 %	0,0	72,85 %
	<i>tba-9</i>	80 %	0,0	72,54 %
	<i>tba-8</i>	73 %	0,0	73,22 %
	<i>tba-5</i>	81 %	1e-151	69,34 %
	<i>tba-6</i>	80 %	3e-147	69,12 %
	<i>ben-1</i>	19 %	2e-09	65,69 %
	<i>tbb-4</i>	9 %	7e-09	69,54 %
	<i>tbb-2</i>	19 %	1e-05	68 %
	<i>tbb-1</i>	3 %	5e-04	78,95 %
	<i>mec-7</i>	3 %	0,006	81,13 %
<i>tbb-6</i>	2 %	0,022	88,24 %	
<i>tba-2</i>	<i>tba-2</i>	100 %	0,0	100 %
	<i>tba-1</i>	80 %	0,0	87,37 %
	<i>tba-4</i>	80 %	0,0	85,38 %
	<i>mec-12</i>	80 %	0,0	77,88 %
	<i>tba-7</i>	78 %	0,0	72,59 %
	<i>tba-9</i>	77 %	0,0	71,7 %
	<i>tba-8</i>	67 %	0,0	73,42 %
	<i>tba-6</i>	77 %	1e-151	69,49 %
	<i>tba-5</i>	78 %	2e-141	69,01 %
	<i>tbb-2</i>	13 %	2e-08	73,15 %
<i>tbb-1</i>	11 %	4e-06	73,87 %	
<i>mec-12</i>	<i>mec-12</i>	100 %	0,0	100 %
	<i>tba-2</i>	84 %	0,0	77,88 %
	<i>tba-4</i>	83 %	0,0	77,09 %
	<i>tba-1</i>	84 %	0,0	76,2 %
	<i>tba-9</i>	81 %	0,0	74,47 %
	<i>tba-5</i>	81 %	0,0	73,24 %
	<i>tba-7</i>	84 %	0,0	72,8 %
	<i>tba-6</i>	80 %	0,0	72,38 %
	<i>tba-8</i>	73 %	0,0	73,86 %
	<i>tbb-4</i>	5 %	5e-04	72,41 %
	<i>tbb-2</i>	3 %	0,006	80 %
<i>tba-4</i>	<i>tba-4</i>	100 %	0,0	100 %
	<i>tba-2</i>	90 %	0,0	85,38 %
	<i>tba-1</i>	89 %	0,0	84,86 %
	<i>mec-12</i>	89 %	0,0	77,09 %
	<i>tba-7</i>	87 %	0,0	74,62 %
	<i>tba-9</i>	86 %	0,0	73,28 %

Eingabesequenz	Treffer	Abgedeckte Sequenz	E-Wert	Sequenzähnlichkeit
	<i>tba-8</i>	85 %	0,0	72,33 %
	<i>tba-6</i>	86 %	2e-168	70,31 %
	<i>tba-5</i>	87 %	2e-168	70,41 %
	<i>tbb-6</i>	2 %	0,021	90,62 %
<i>tba-5</i>	<i>tba-5</i>	100 %	0,0	100 %
	<i>tba-6</i>	71 %	0,0	74,62 %
	<i>tba-9</i>	73 %	0,0	73,65 %
	<i>mec-12</i>	72 %	0,0	73,24 %
	<i>tba-4</i>	72 %	2e-168	70,41 %
	<i>tba-8</i>	71 %	2e-161	70,11 %
	<i>tba-1</i>	72 %	1e-151	69,34 %
	<i>tba-7</i>	73 %	2e-142	68,82 %
	<i>tba-2</i>	72 %	3e-141	69,01 %
<i>tba-6</i>	<i>tba-6</i>	100 %	0,0	100 %
	<i>tba-5</i>	86 %	0,0	74,62 %
	<i>tba-9</i>	86 %	0,0	72,71 %
	<i>mec-12</i>	85 %	0,0	72,38 %
	<i>tba-4</i>	85 %	2e-168	70,31 %
	<i>tba-2</i>	86 %	1e-151	69,49 %
	<i>tba-1</i>	85 %	2e-147	69,12 %
	<i>tba-8</i>	84 %	3e-146	69,56 %
	<i>tba-7</i>	85 %	4e-125	68,27 %
	<i>mec-7</i>	3 %	5e-04	82 %
	<i>ben-1</i>	3 %	5e-04	82 %
	<i>tbb-6</i>	3 %	0,021	79,59 %
<i>tba-7</i>	<i>tba-7</i>	100 %	0,0	100 %
	<i>tba-4</i>	91 %	0,0	74,62 %
	<i>mec-12</i>	93 %	0,0	72,8 %
	<i>tba-1</i>	90 %	0,0	72,85 %
	<i>tba-2</i>	90 %	0,0	72,59 %
	<i>tba-9</i>	89 %	2e-161	70,21 %
	<i>tba-5</i>	91 %	2e-142	68,82 %
	<i>tba-8</i>	94 %	1e-138	70,06 %
	<i>tba-6</i>	89 %	4e-125	68,27 %
	<i>mec-7</i>	3 %	0,02	77,19 %
<i>tba-8</i>	<i>tba-8</i>	100 %	0,0	100 %
	<i>mec-12</i>	75 %	0,0	73,86 %
	<i>tba-4</i>	81 %	0,0	72,33 %
	<i>tba-2</i>	71 %	0,0	73,42 %
	<i>tba-1</i>	75 %	0,0	73,22 %
	<i>tba-9</i>	82 %	0,0	71,33 %
	<i>tba-5</i>	82 %	2e-161	70,11 %
	<i>tba-6</i>	81 %	3e-146	69,56 %
<i>tba-9</i>	<i>tba-9</i>	100 %	0,0	100 %
	<i>mec-12</i>	80 %	0,0	74,54 %
	<i>tba-5</i>	82 %	0,0	73,65 %
	<i>tba-4</i>	80 %	0,0	73,28 %

Eingabesequenz	Treffer	Abgedeckte Sequenz	E-Wert	Sequenzähnlichkeit
	<i>tba-6</i>	80 %	0,0	72,71 %
	<i>tba-1</i>	80 %	0,0	72,54 %
	<i>tba-2</i>	80 %	0,0	71,70 %
	<i>tba-8</i>	79 %	0,0	71,33 %
	<i>tba-7</i>	79 %	2e-161	70,21 %
<i>tbb-1</i>	<i>tbb-1</i>	96 %	0,0	100 %
	<i>tbb-2</i>	89 %	0,0	84,77 %
	<i>ben-1</i>	85 %	0,0	81,87 %
	<i>mec-7</i>	87 %	0,0	78,88 %
	<i>tbb-4</i>	85 %	0,0	78,98 %
	<i>tbb-6</i>	84 %	6e-85	66,05 %
	<i>tba-2</i>	1 %	0,021	96,3 %
<i>tbb-2</i>	<i>tbb-2</i>	91 %	0,0	100 %
	<i>tbb-1</i>	81 %	0,0	84,77 %
	<i>ben-1</i>	78 %	0,0	83,49 %
	<i>mec-7</i>	79 %	0,0	78,96 %
	<i>tbb-4</i>	78 %	0,0	78,27 %
	<i>tba-2</i>	6 %	2e-08	73,15 %
<i>tbb-4</i>	<i>tbb-4</i>	99 %	0,0	100 %
	<i>ben-1</i>	81 %	0,0	78,68 %
	<i>tbb-1</i>	79 %	0,0	78,98 %
	<i>mec-7</i>	79 %	0,0	78,53 %
	<i>tbb-2</i>	79 %	0,0	78,24 %
	<i>tbb-6</i>	77 %	1e-37	63,66 %
<i>ben-1</i>	<i>ben-1</i>	100 %	0,0	100 %
	<i>tbb-2</i>	63 %	0,0	83,49 %
	<i>tbb-1</i>	63 %	0,0	81,87 %
	<i>tbb-4</i>	64 %	0,0	78,68 %
	<i>mec-7</i>	63 %	0,0	78,48 %
	<i>tba-1</i>	13 %	3e-09	65,69 %
	<i>tba-6</i>	1 %	7e-04	96,67 %
	<i>tbg-1</i>	1 %	0,029	93,1 %
<i>tbb-6</i>	<i>tbb-6</i>	100 %	0,0	100 %
	<i>tbb-1</i>	85 %	6e-85	66,13 %
	<i>mec-7</i>	83 %	5e-54	64,86 %
	<i>tbb-4</i>	84 %	1e-37	63,66 %
	<i>tba-4</i>	2 %	0,02	90,62 %
<i>mec-7</i>	<i>mec-7</i>	100 %	0,0	100 %
	<i>tbb-2</i>	83 %	0,0	78,96 %
	<i>tbb-1</i>	84 %	0,0	78,88 %
	<i>tbb-4</i>	82 %	0,0	78,53 %
	<i>ben-1</i>	83 %	0,0	78,48 %
	<i>tbb-6</i>	80 %	6e-54	64,86 %
	<i>tba-6</i>	3 %	5e-04	82 %
	<i>tba-1</i>	3 %	0,006	81,13 %
	<i>tba-7</i>	3 %	0,022	77,19 %

Eingabesequenz	Treffer	Abgedeckte Sequenz	E-Wert	Sequenzähnlichkeit
<i>tbg-1</i>	<i>tbg-1</i>	99 %	0,0	100 %
	<i>ben-1</i>	1 %	0,021	93,1 %
<i>noca-1</i>	<i>noca-1</i>	100 %	0,0	100 %

**Tab. 14** Übereinstimmung der in Wormbase (*C. elegans* Sequencing Consortium genome project (PRJNA13758)) geblasteten RNAi-Klon-Sequenzen mit den getroffenen Tubulin-Genen. RNAi-Klone stammen aus der Ahringer RNAi-Fütterbibliothek (Positionsangabe) (Fraser et al., 2000; Kamath et al., 2003; Kamath & Ahringer, 2003) oder wurden selber hergestellt (Primersequenzen in Tab. 3).

RNAi-Sequenz	Treffer	Score (bits)	E-Wert
<i>tba-1</i> (Ahringer, I-4L06, 857 bp)	<i>tba-1</i>	1542	0,0
	<i>tba-4</i>	317	2e-85
	<i>mec-12</i>	111	2e-23
	<i>tba-8</i>	60	7e-08
<i>tba-2</i> (Ahringer, I-6H17, 733 bp)	<i>tba-2</i>	1445	0,0
	<i>tba-4</i>	416	e-115
	<i>mec-12</i>	186	4e-46
	<i>tba-8</i>	50	6e-05
<i>mec-12</i> (Ahringer, III-1N17, 873 bp)	<i>mec-12</i>	1005	0,0
	<i>tba-4</i>	76	1e-12
	<i>tba-5</i>	74	5e-12
	<i>tba-9</i>	44	0,005
<i>tba-4</i> (Ahringer, II-7H07, 853 bp)	<i>tba-4</i>	1530	0,0
	<i>tba-2</i>	400	e-110
	<i>mec-12</i>	174	2e-42
	<i>tba-9</i>	66	1e-09
	<i>tbb-6</i>	40	0,069
<i>tba-5</i> (Ahringer, I-4I03, 760 bp)	<i>tba-5</i>	1116	0,0
	<i>mec-12</i>	74	4e-12
	<i>tba-4</i>	60	7e-08
	<i>tba-9</i>	44	0,004
<i>tba-6</i> (eigener RNAi-Klon, 894 bp)	<i>tba-6</i>	1023	0,0
	<i>tba-9</i>	50	8e-05
	<i>tba-4</i>	50	8e-05
	<i>mec-12</i>	38	0,29
<i>tba-7</i> (eigener RNAi-Klon, 985 bp)	<i>tba-7</i>	904	0,0
	<i>tba-4</i>	54	5e-06
	<i>tba-5</i>	46	0,001
<i>tba-8</i> (Ahringer, X-4B02, 824 bp)	<i>tba-8</i>	1592	0,0
	<i>tba-7</i>	96	1e-18
	<i>tba-4</i>	74	5e-12
	<i>tba-1</i>	70	7e-11
<i>tba-9</i> (Ahringer, X-2K23, 756 bp)	<i>tba-9</i>	1475	0,0
	<i>tba-7</i>	78	3e-13
	<i>tba-6</i>	72	2e-11
	<i>tba-4</i>	52	2e-05
<i>tbb-1</i> (Ahringer, III-5B12, 881 bp)	<i>tbb-1</i>	1626	0,0
	<i>mec-7</i>	143	7e-33

RNAi-Sequenz	Treffer	Score (bits)	E-Wert
<i>tbb-2</i> (Ahringer, III-2A15, 739 bp)	<i>tbb-2</i>	1465	0,0
	<i>mec-7</i>	232	8e-60
	<i>tbb-6</i>	46	0,001
	<i>tba-2</i>	40	0,060
<i>tbb-4</i> (Ahringer, X-4P09, 795 bp)	<i>tbb-4</i>	1568	0,0
	<i>tbb-2</i>	168	1e-40
	<i>tbb-6</i>	44	0,004
<i>ben-1</i> (eigener RNAi-Klon, 1044 bp)	<i>ben-1</i>	521	e-147
	<i>tbb-4</i>	90	1e-16
<i>tbb-6</i> (Ahringer, V-8O23, 806 bp)	<i>tbb-6</i>	1598	0,0
	<i>mec-7</i>	62	2e-08
	<i>tbb-2</i>	46	0,001
	<i>tba-4</i>	40	0,065
<i>mec-7</i> (eigener RNAi-Klon, 678 bp)	<i>mec-7</i>	785	0,0
	<i>tbb-2</i>	216	4e-55
	<i>tbb-6</i>	62	1e-08
	<i>tba-6</i>	36	0,85
<i>tbq-1</i> (Ahringer, III-5K19, 773 bp)	<i>tbq-1</i>	1255	0,0
<i>noca-1</i> (eigener RNAi-Klon, Isoform h und i, 931 bp)	<i>noca-1</i>	842	0,0
<i>noca-1</i> (Ahringer, V-8B02, Isoform a-h, 807 bp)	<i>noca-1</i>	1515	0,0
	<i>cyk-1</i>	40	0,065

## 8.5 Sequenzen der RNAi-Fütterungskonstrukte

### VC (pPD129.36 ohne Insert) (Pilipiuk et al., 2009)

GTGAGCGCGCTATACGACTCACTATAGGGCGAATTGGGTACCGGGCCCCCCTCGAGGTCGACGGTATCGATAAGCTT  
GATATCGAATTCCTGCAGCCCGGGGATCCACGCGTCACGTGGCTAGCCATGGAACCGGTGGATCCACTAGTTCTAGAG  
CGGCCGCCACCGCGGTGGAGCTCGAATTCATCGATGATATCAGATCTGCCGGTCTCCCTATAGTGAGTCGTATTAATTTTCG  
ATAAGCCAGGTTGCTTCTCGCTCACTGACTCGTCTCGCTCGGTCGTTTCGGCTGCGGGCAGCGGTATCAGCTCACTCAA  
GGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAG  
GAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAATCGACGCTCAA  
GTCAGAGGTGGCGAAACCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTTCCCTGGAAAGCTCCCTCGTGCCTCTCCTGTT  
CCGACCCTGCCGTTACCGGATACCTGTCCGCTTTCTCCCTCGGGAAGCGTGGCGCTTCTCATAGCTCACGCTGTAGG  
TATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCGTTTCAGCCGACCGCTGCGCCTTA  
TCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACAGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAG  
CAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACAGCTACACTAGAAGAAGCAGTATTT  
GGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAACAAACCACCGCTGGT  
AGCGGTGGTTTTTTGTTTGAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAGGATCTCAAGAGATCC

### *act-5*, T25C8.2 (Ahringer, III-6D08)

CACCCAGTTCTCCTTACCGAGGCTCCATTGAACCCAAAGAGCAACAGAGAAAAGATGACACAGATCATGTTTGAGACCTT  
CAACTCCAGCCATGTACGTCAACATTCAGGCTGTGCTTTCTTGTACGCTTCCGGAAGAACCACCGGAATCGTTTTGGA  
CACCGGAGATGGTGTCACTCACACCGTTCCAATCTATGAAGTAGGTAGATGGGTTTAGAGAATATAAGAAGACAGCAATC  
TTCTTTGACTTGCGGGTGTAAAGTTTTGGAGATTACGTCTGCTTCGACTAATTTTTGCAGCCAGAAACAGGCTCACAGCGC  
TTTCGGAACCTTTAGTTCAGCTCAGCAGCTTATCCTTAGTTTTAAGTTTTTGGAACTGTAAGAAGTGTAAAGAGCAAG  
GCCACCTCATTTCTGCAAATCATAGCCTGAGCTTCTGATCTTCTATCTGATCCACAATCTTCTGTGAGAATCTTTGGG  
ATCTAAGAAATCTAGAACCTACATCCGATCTTATCTTCTAATCTTCCAGGGATATGCCCTCCACATGCCATCCAACGTCTC  
GATCTTCCGGACGCGACTTGACCGACTACATGATGAAGATCTCACCGAGCGCGGTTACACTTTTACCACCACCGCCGA  
ACGCGAAATCGTCCGGGACATCAAAGAGAAGCTTTGCTACGTGCCACGACTTCGAGTCCGAGCTCGCCGCCCGCCCT  
CCTCCTCCTCCCTCGAGAAGAGCTACGAGCTTCCGACGGACAGGTTATCACCATCGAAACGAGAGATTCCGCTGCCCA

GAAGTCCTCTCCAGCCTGCCTTCATCGGAATGGAAGGTGCCGAATCCACGAGACCACCTACCAATCCATCATGAAGTG  
 CGATGTGACATCAGAAAGGATCTCTACGCCAACACTGTTCTCTCCGGAGGTACCTCCATGTTCCAGGAATCGCTGATCG  
 TATGCAAAAGGAGATTCAACATTTGGCTCCAAGGTAAGCTTACATTTCCAGTACATGAGATTATAATTCTGTATTTTCA  
 GCACAATGAAGATCAAGATTATTGCTCCACCAGAGCGCAAGTACTCCGTCTGGATCGGAGGATCTATTCTTGCTTCCCTCT  
 CAACCTCCAGCAAATGTGGATCTCAAGCAGGA

***aps-1, F29G9.3***

TCAGAAAATCTAATTTTTCAATTGATTTTTAAGTATTTTCAGCGTTTTAAAGTTTGCAAACGATTGTTTCATACTCTGTTTT  
 AGTAAACATGATGCAATACATGCTTCTCTCAGTCGCCAGGGCAAACCTGCGGCTGCAGAAATGGTACACTGCTTACCCCG  
 ACAAGGTAAGTGTATTTCTATTTCATATGTGTAATTTACACTCAATTTTCAGCAAAAAGAAGAAAATTTGCCGCGAACTCA  
 TCACTCAAATTCTGGCGAGAAAACGAAAATGTGTGCGTTCTCGAATACAAGGATTGAAAAGTTGTCTACAAACGGTTC  
 GTATTTTATATTCAAAGTAACAACCTCCATTTCTGTGCCTTAAAATTGTTCTTCTGAAAATAACTTACAAGTTTATA  
 ATCAAAATTTCTGAAAATATAGTTACACACCTAAATCCGAAGTTATTACGTTTTTTTATTCATGAAAAATATTTTGGCGTC  
 AAATTTAGTTGTTTAAAGACATTTTGTGATAAATGAAACAAAACTTAAACAATTCGTTCAATTTTAAATCTCAACAATTT  
 AGATACGCGTCTCTGTATTTCTGCTGCGCCATCGAACAAAACGACAACGAGCTCATCACTTTGGAAGTCACTCATCGTTAC  
 GTAGAACTCCTCGACAAATATTTTGAAGTGTGTTGTGAGCTGGATATCATCTTCAACTTCGAAAAAGCTTACTTCATACTC  
 GACGAATTTTACTGGCTGGTGAATCCAGGAAACAGTAAAAACAAGTTTTGAAGGCGATTGCTGCCAAGATCTCAT  
 TCAAGAAGAAGAACTCCACAAGGATTCTCGAGGATCACGGTTGGGATAATGAAGATAATAGTAACATAATTTATTGA  
 CT

***let-413, F26D11.11 (Pilipiuk et al., 2009)***

GCCGACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCAACCTGGCTTATCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGAG  
 ACCGGCAGATCTGATATCATCGATGAATTCGAGCTCCACCGCGGTGGCGGCCGCTCTAGACGAAACAAATTCGTTATGGT  
 CAAAAATAGAAATCAATTTTAGTAAGCTAAGTATACTTTTCGTCAGAGAAGAGTTGCCGATTGGTATTCGGATTGGTTGG  
 ACATTAAGAGCATAATTAATAAAATTTATGTTTTCGATACTATCTGAAATTCATTTTGAACCAATAGGACAATTTGAGT  
 GTGAAACCACTGTTTTTGTGCATCAAAAAACCAACTTTTGGCAGAGAATAAATATTTTTGAATATTTTCAAATTTTTAAA  
 TTTTGGCAGTGAATCACGAATGTCAAAAAAAAACGTCTAATGTCTAGTTTTTCAGCCAAAATCGGCCTCAATACTCACATG  
 GCCTACTCACAGATGTTCTCGAACTGGCGATGGGGACCGCCTTAACACGACTAATTCACCGTTTCTCGTTTTTGTATCG  
 CCTCATTGCATTATCCTGAGATGCGTTGATCATGTTACATCGTTAGCACGAATCAATTTGTCTCCTTCACGAAGACCACA  
 TCTGTATGCAGCACTTCCAGGTGTGACTTTGGTGACAAAAAGTCTGAATCTCCGTTACTGTTCCGGCGCCGGATCGTTCGA  
 GGTTCCGCCAGCGAAGGAAAAGTCCCAATTTCCAGTGTCTTTTTGGATTCTGATTGTGTGCATGTTTTGAGTGCCTGC  
 GGCAAGATTTGACAACTTGACAAGGAGGTT GCCATTCGTTCTTCTCGTTCTGGTGA

***rab-11.1, F53G12.1 (Ahringer, I-19G13)***

TTTCGGGGGCGAGTAAATTAATGGACAAGGCATTTGAAAAATACACACGTTAGACTGAAAAAACACGATGTGA  
 TTTATGGGATGCAACACTGCTTCTTTGGTGGGTCGGACGCTGGCGAAGGAATGATTGTACCACTGCCACCGCCATATCCTT  
 GTCTGTCAGTTTCTACATGCTTGTGGATACTGATTTGTAGATTTCCGTCAGGATATTAGTGAAAGCTGCTTCAACGTTGG  
 TGCTGTCGAGGGCAGATGTTTCTGAAAAAATAAATAAACGCAATAGATTAGTTTAACTTACCAATAAACGACAAT  
 TGATTTCTTTCGGCGTAGATCTTGGCCTCGTCTGTTGGAAGTGCACGCAATGGCGCAAGTCGCTCTTGTTCGGACCAAC  
 ATAATCACAATGTTCTGATCGGCGTGATCACGAAGCTCCTTCAACCATCGCTCAACATTCCTGTACGTACATGCTTAGCG  
 ATGTCGTAGACTAGGAGAGCTCCGACAGCCCCACGATAGTAAGCGGATGTGATGGCACGGTAACGTTCTGTCCAGCAG  
 TATCCCAAATTTGAGCCTTCACTGTCTTGCCTTACCTACAAAAATAAATTTGAATCATAAGTGATTCTAATGAAGTTC  
 CTCACCGAGATGCTTCTCGTGGCAAACCTCGACTCCGATTGTTGATTTTATTCCAAGTTGAACTCAATTTCTGTGAAACGAG  
 ACAGGAGATTGACTTTCCGACGCCTGAGTCTCCAATCAGAACAACGAAACAATTTTTCGTTTGGGAATTGAAAAATGA  
 AAAACAAATACCCTTGAACAAGTAGTCGATTTCATCGTACGAGAGCCCATCTTACTGCTGAGCTGTAAAATGATAAA  
 GCTTGTGTTGAAAGTTGTGTATATATTGGGACGATTGAAAAAAGAAAAAGGGCATTGGTACATGATTATCAGCCGGGC  
 GCAATGTTTTGTTGAAAAATCGATATTAAGAAGACGAGACTGTTTTATCGGCGGAGAATATTTTATGTTCTGTTCCCG  
 ACACAAACGCGGAGTCAGGAACCGGTTGTCTATCTCGACGGGATTGAAAAAATAAAGTGAAGTATTGTTAAGAATGA  
 TTCAAAGTATATGGAGTTGGGAGTTTTATATTGAATTTTATCAATATATGAGGGTGGTTAGTCAGAAGAAAAATGTGAAA  
 ATGTATATAGAAGTGTGTTATGAAAGAGTATTTGAGGCTTATCATACCCGAAAAAGGGAAGGTGAGCGGCCG

***par-5, M117.2 (Ahringer, IV-6E062)***

CATGAAGAGAATTATGGCTTGGAGATCTAGAGCACTTGAAGACCGAATTTTCTTTCATGATGCTATTGCGCAGTGTTGTAT  
 GGAGTATTGGTGAATACGTTAAGTCTAAAAACAAAACGGTGATTAGGCAACTCTCTCGGCTAACGTACCGGAAATGTTGG  
 AGGATAACTGAAAGTTGAAGAGATGCGAGGAAAGAGAACGGAGTTTCACTCTGAAAACCGAACTATTTTTTCGAAG

CAAGATTTGATGTGAAAGGAAAAGAGGAAAAAGGTCAGCTTTATATAATGGCAATAAAACATTTTCAAATCGTACTTAGT  
 TTCCAGCTTCTGGTTCCCTCCTGCTCTTGATCTTCAGCTCCAACGTGAGATGTCCAGAGAGTGAGATCGTCACGTAGAA  
 GTTGCATGATCAAGGTCGAGTCCTGTACGAATCCTCGTTCAACGTGTCGAGCTCAGCAATAGCATCATCGAAAGCCTGTT  
 TCGCGAGTTGGCAAGCGTCTGAGGTGTTCAAGATCTCGTAGAGAAGACAGAGAAGTTGAGGGCAAGTCCAAGGC  
 GAATGGGTGGGTTGGCTGCATCTTGCCTTAGCGATATCAAGAGCCTCCTGAAAGTCATGCCATTTACATCAAGAATTA  
 GTTATTTCAAATACCTGGTAAGCCTTCTGGGACTTCTCAACAACGGCAGCGGATCCTCTGAAGCGACCTCGGCGAGGT  
 ATCTGTAGTAATCTCTTTTATCTTGAGATAGAAGACCTTCGACTCAGCAGCTCCAGCCTTGA

***cdh-5, F08B4.2 (Ahringer, IV-4K20)***

TCTGATTACCATGGTTGAACCTTTCCAGCAATTAATTGTACATTGGAAGTTTCAATAGTTTTCGGATATCTTGTTTCTTGC  
 AAATCTTCTTTGTCGTTGGATTCACTGCATACCAGTAGATGTGAGTTCGGATCTGAATTTGATTAATAATTTAATTTAAAAA  
 CCACAAATTCCTAAAAATCCAATTAGGTTATTGCCTATCATTTTGTGTTTCTATTGCTAACCTGGTTCTCAATTGCAGTATGC  
 TCAATCATTTTCTCGATCGTCAATAAATTGCAACTTCCAGTAAATTGTCTAGTTGATTTCACTAAATCTTTTATGTTTCTT  
 AATTGTTGTGGTTCAATCCATAAATAATCATCTTGAATCTGTTAGTTGAACCAATCACATTCACGACAACATCAGCTTTTG  
 AACACAATTGTTGCCAGAAATTGGGGAATCGCAGGCGGAAACCTGAAAATATTACATTCCATTGGAAGACATTTATCTT  
 AAACCATTTTCGAGTGAAAAGTTATATTATTACAAAATAGCTTACTCTGAATTCGAAGAATTGGAGTCTATTCTACTCAA  
 AATGGTAGACATGCTCTGTTTTGTGTAATCTCTCAAATGGTGAATAAGAAAAGTATTTTGAATGTGCTGAAAGTGGATC  
 CAAAGCGTAGTTGACCAAGCTGCTGTTTCAAAGATCGCATCTTCAGCCTGCAAATATTAATTTCTCGTATTGATAGATCAA  
 TTAATTTCACTTTACCTTACAGTTAACACTCTGTGAATGCATTTGCAACTGAAGAAACAGCTCCAAAGTATGTGGTCAAT  
 CCCAGATCCGAATCATAACAAAATCGAGGAACATTGTCTGTTACATCAC

***tba-1, F26E4.8 (Ahringer, I-4L06)***

GCTTATCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCGGCAGATCTGATTATTCAGCCGGAATTGTCAACAGGATTATTTA  
 TAATTGAGTTGACCTTGTTTCTAGTTGATCGACTCCTATGATTTTATCATTCTGACTTTACGCCATATGTTATCCGCGTTCA  
 TTTATGATTTCAATTTCTTAATTTCCGTTAATTTTTCAGGTTCTGTTTCAACATGCGTGAGGTCATCTCCATCCACGTCGGAC  
 AAGCCGGAGTCCAAATCGGTAATGCTTGTGGGAGCTCTACTGTCTCGAGCATGGAATCCAGCCCGATGGAACATGCCA  
 TCAGACCAACAAGCCGATGGAGAATCTTTCACCACCTTCTTCCGATACTGGAAACGGAAGATATGTTCCAAGATCGATT  
 TTTGTAGATCTTGAGCCAATGTTGTTGGTAAGCAATAATAAAAACCGTTTCAAATTCAAATTTGTTTTTTTTTTCAGATGA  
 GATCCGCACTGGAACTACAAGAAGCTGTTCCATCCAGAACAGATGATCACCGGAAAGGAAGATGCCGCCAACAACTAC  
 GCTCGTGGTCACTACACCGTCGAAAGGAAGTATCGACTGTTCTCGACAGAATCCGTCGCCTCGCTGACAACTGCAG  
 TGGTCTCAAGGATTCTTCTGTTTCAATTCATTCCGAGGAGGAAGTGGATCTGGATTACCTCATTGCTTATGGAGCGCCT  
 CTCGGTTGACTATGGAAAGAAGTGAAGCTGGAATTTCCATCTACCCAGCCCCACAAGTCTCGACTGCCGTCGTTGAGC  
 CATAAATCTATACTGACGACTCACACCACCTCGAGCACTCCGAC

***tba-2, C47B2.3 (Ahringer, I-6H17)***

GAAGCAGCTATTGGTGATGTCGCTGACGGACAGAGCCTCGTGGTAGGCCTTCTCAGCAGAGATGAGTGGAGTGTAGGC  
 GGCCAATGGGAAGTGAATCTTGGGTATGGACCAAGTTGGTCTGGAACCTGTTGAGATCAACGTTGAGGGCTCCATCG  
 AATCTCAAGGAAGCAGTGATTGAGGAGACAACCTGAAAAAGAGAACATTAGAATACAACAATCAAATTGAGCTCAACA  
 AACCTGGGAGATGATTCTGTTGAGGTTGGTGTAGCTTGGTCTCAACATCCAAGTTTCTGCGGCAGATGTCGTAGATGG  
 CCTCGTTATCGACCATGAAGGCGCAGTCGGAGTGTCCAAGTGGTATGGGTGGTGGAGATCGAGTTGTATGGCTCAAC  
 GACGGCGTTGAGACCTGTGGAGCTGGGTAGATGGAGAAGTGGAGCTTGGACTTCTTCCGAGTTCGACGGAAAGACGT  
 TCCATAAGAAGCGAAGTGAATCCGGATCCGGTACCTCCTCCGAAGGAGTGGAAAGACGAAGAATCCTTGGAGTCCACTGC  
 AGTTATCAGCGAGACGACGGTCTGTGAGGACGGTGTGATGAGCTCCTTCCGACGGTGTAGTGTCCACGAGCGTA  
 GTTGTAGCGCGTCTTCTTCCGGTGTATCTGCTCTGGATGGAAGAGCTTCTGTAGGTTCCAGTGCGAATCTCGTC  
 AACGACAGTTGGCTCGAGAT

***mec-12 (C44B11.3, tba-3) (Ahringer, III-1N17)***

GTCAGTGAGCGAGGAAGCAACCTGGCTTATCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCGGCAGATCTGATTATTTT  
 CGTGGCGAATTTTGAATTTAAAATTTAAAATAAAATTTTATTCAGAAACCTACCTTAAATCCAGTTGGGCACCAA  
 TCTACAAATGAATGCTTCTTAGTCTTAATAGTTGCAATTGCAGCATTACATCCTTTGGCACTACATCTCCACGGAAAA  
 GCAGACAAACTGCCATATACTTCCGTGTCTCGGATCACACTTGACCATCTGGTTATGTGGCTCGAAGCACATATTAGTGA  
 TTTACGCACTGATAGCTGCTGATAGGCTTTTTCCGCTGAGATAACCGGAGAAAATGTGGCTAGCGGGAAGTGAATA  
 CGTGGATAGGGAACCAAGTTTGTCTGGAACCTCGGTCAAGTGCAGCTTGGGGCTCCGTCGAATCGGAGGGAAGCGGTG  
 ATGGAGCTGACGATTTGACCGATGAGACGATTCAAATTTGTGTAGGATGGACGTTCCAGTTGCGACGGCAAA  
 TGTCGTAGATTGCTGGAAATTTTTTGGATTTTTTTTTTGGAAAGTATCAAAAAAATTTTTTTTCGGACAATTTTTTTTCTATT

AAATATTTTTAATAAAAAATTTCTGCCAATAGGCTTTGAACTATTAATAATCTCAGTCCCCAAATTATAAGCTTCAAAAATAAG  
 CCCCATATTGCTTAGGTTCCGGCCCTTTCTATTTTTGGGTCTCACCACGATTTTAAAGGCGCGAAGGGCGAACATTTTCAA  
 ACTAACAGGAACCGAGTCAATATGGGTGTTAAATTGAAGCTCTGAGTGAGCTGATTACAGTTTTT

***tba-4*, F44F4.11 (Ahringer, II-7H07)**

GCAACCTGGCTTATCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCGGCAGATCTGATTGGCGCAACTATTTCCCTATTT  
 CTTCAAGTTCTTCTTGGCCTCGCCGCTGACCACTATTGTCCTTCTTCTCCCCGTAGTATACATAACGCCCGTATATCTTT  
 GCGTTCCTACGTTCTACGATTTTATAGTTAATTTTACTATTCTGAACCTAAATTTCTTTCAATTTTTCAGAGAAAAAAAACCAT  
 GCGTGAGGTAATCTCCATTACGTTGGACAGGCGGGAGTTCAAATTTGAAATGCTTGCTGGGAACTATACTGTCTCGAGC  
 ACGGAATCAACCCGATGGAACCTATGCCTTCTGAGCAACAAAATGAGGGTGGATCCTTACCACGTTCTTCTCAGATACTG  
 GAAATGGACGCTATGTTCCGAGATCTATTTTTGTGGATCTTGAGCCAACAGTCGTCGACGAGATCCGCACTGGAACACTAC  
 AAGAAGCTGTTCCATCCAGAACAAATGATCACTGGGAAGGAAGACGCTGCTAATAACTATGCTCGTGGTCACTACACCGT  
 TGGCAAGGAGCTCATCGACACTACTCTTGACAGAATCCGTCGTCGCGGACAACCTGTAGTGGTCTTCAAGGATTCTTTGT  
 CTTCCACTCCTTGGTGGAGTACTGGATCCGGATTACCTCACTGCTGATGGAACGTTTGTGGTTGACTACGGAAAGA  
 AGTCGAAACTAGAGTTTTCAATCTATCCAGCTCCACAAGTTTCCACTGCAGTCGTTGAGCCATACTCAACTCGATCCTTACTAC  
 TCATACTACTTTGGAGCACTCCGATTGTGCATTTCATGGTTGA

***tba-5*, F16D3.1 (Ahringer, I-4I03)**

AACCTGGCTTATCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCGGCAGATCTGATTTTGATGCCAACTTTAAAACAGTTG  
 GACACCAATCCACAAATTGAATTGCTCTTTTAGTTTTGATTGTTGAAATTGCAGAAATTAATTTCTTTGGTACAACATCTCCA  
 CGATACAAAAGGCAACATGCCATATACTTTCCATTTCTGGATCACACTTACCATTGACTTCTGGTTCAAAGCACACAT  
 TTGTGATTTTCAGACACCGACAGTTGTTCTGTGATATGCTTTTTCTGAAATAAGAAATCATTGATGCAGTAGGCTGAATGT  
 ATTTTGTAGCCGATGGAAAAAGCTGCACGGAGCAATAAACCAAAATAACTAAATTTGAAATCTAATAATCCCTTGAATAT  
 GTTGATAAATTATTAATAATAGATATTTTTACTATTTCCACCTAAATTTGCAAGTCTTAAATGTAATAATTTATAGTAGAC  
 AAATTTCTATTCTAAAAACATGTTTAAAGGTTTGTATGAAAAACAAATAGTAAAAAGATTTTTTTGAAGGAAAAACTCAC  
 GCCGAAATGATTGGAGCATATGTGACAAGTGGAAAGTGAATACGGGGATATGGAACCAAAATTAGTCTACAAAAATTATT  
 TAAAGTGAAAAGAAAATGAAGAAAATATAAAAACCTGAAACTCTGTCAAATCAACATTCAACGCTCCATCGAAACGAAG  
 TGAAGCAGTAATTGATGATACAACCTGTGC

***tba-6*, F32H2.9 (eigener RNAi-Klon, Tab. 3)**

ACCTGGAAGTCAAATATTTTTGTTTTCAATCTTATACACGTGGCCTAAGTTGTCAAAGTTTTCCCACTTCTTACACAAG  
 TTGAATATATGCCATCCAACGTTGTTCAAGAAGTAGACGACCTTCCGAGTATACACTTAATGTTAACTTACATCAATCAT  
 TTCTCTTCAATTGTATATCTTCTTGCATAACAATTAGCTGCATCTTCTTTCCAGACAAAAGCTGTTCCGGATGGAAAA  
 GACTTCGGTATGTTCCAGTGCAGAACTTCGTCTGAATAGTGAACCTTTTTCTAACCTTTTTCTGAAAACATAACCAACGACAG  
 TTGGTTCAAATCGACAAAAGGCAACGTGGAACGTGTTCCACCAGCGGTCTCTGCGAAGAAAAGTGTAAATTGTCTCA  
 GTTTCTTTCATATAAGTGTCTTCAACATGGTAACCATCGGGCTGTATTCCGTGTTCCAGACAAAACAGTTCCAACACG  
 CATTCCAATCTGAACCTCTGCTTAATCAGATCTGCCGCTCCCTATAGTGAGTCGTATTAATTTTCGATAAGCCAGGTTGC  
 TTCTCGTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTCGTTCCGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCAAAAGCGGTAATACGGT  
 TATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAATGTGAGCAAAAAGGCCAGCAAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGG  
 CCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGA  
 AACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTTCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCCTCTCTGTTCCGACCTGCCGCTT  
 A

***tba-7*, T28D6.2 (eigener RNAi-Klon, Tab. 3)**

ACGCTCCGCAATTGCCGTAGTATTCGACAACATACATACCGCCCGTGAACCTTTGCCATATCCCCACCCGGGATTACTG  
 TAGGCGGCTGATAGTTCAATCCAATTTAAACCCAGTCGGACACCAGTCCACAACTGCACGGATCTCTGAGTTTTGATCG  
 ATTTTATCGCAGCCGACACATCCTTCGGCACAACGTCTCCACGATACAGTAAACATAACAGCCATATACTTCCCGTCTTCG  
 GGTACATTTTACATTTGATTTGAGGCTCAAAGCAGCTTTTCGTTATCTCATCAACTGATAGGAACTCGTGGTGGGCTG  
 AAGAGATCAGTGGATTGTAGGCGACAAGGGGAAGTGGATTCTCGGGTAGGGGACCAGATTGGTTTGAATTCGTTTA  
 AATCCACGTTGAGAGCACCGTCAAAGCGTAGAGATGCCGTGATGGAGGAGACTAATCAGATCTGCCGCTCCCTATAG  
 TGAGTCGTATTAATTTTCGATAAGCCAGGTTGCTTCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTCGTTCCGCTGCGGCGAGCG  
 GTATCAGCTCAAAAGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAATGTGAGCAAAAAG  
 GCCAGCAAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCTGACGAGCATCAC  
 AAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTTCCCCTGGAAGCTCC

TCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTCTCCCTTCGGAAGCGTGCGCTTTCTCA  
TAGCTCACGCTGT

***tba-8*, ZK899.4 (Ahringer, X-4B02)**

CCGGCAGATCTGATTCTCGTCTTCCACTCTTTCGGTGGAGGCACTGGATCTGGGTTTCAGCTCTTCTAATGGAGCGACTT  
TCGGTGGAAATTTGGAAAGAAAAGTAAATTGGAGTTCAGGTTTATTTAGTACTTTGTACCACCAGACGTAATCCGAACCT  
TATAGTGTGTATCCAGCACCAAGTCTCCACGTCTGTCGTTGAGCCCTACAACCTCTATTCTGACTACTCACACAACATTGG  
AGCTCTCCGACTGCTCTTTTATGGTGGACAACGAGGCGATTTACGACCTTTGTCGTCAAAAACTTCATGTTGAGGTGAGAG  
GGGAATTATTCACGATGCATTGAAGATAATAATCTCAGAGACCTTCTACTCAAATCTCAACCGTCTTATCGCCCAAGTTG  
TGTCATCGATCACCGCTTCGTAAGATTTGACGGAGCTTTGAATGTTGATTTAAACGAATTCAGGTGAAAAACAAAAA  
GAATATAGAGCGACGGTGACAATGTGATTTAGACAAAACCTGGTCCATATCCAAGAATTCATTTTCCACTGGCTACCTGC  
GCTCCAGTCAATTCAGCTGATAGGGTAAGAGTGCATCAGCCAATTTATTTCAATTATAATTTCAATTAATGGATCCGTTCTA  
CATAAAATGACATGATGTAGTATTACAAGTTAAGCTTTTTTGCAAACGATAACCTCATTTCAGGCTCACCACGAACCTTGT  
CAGTTCAAGATATCACTCACATGTGTTTCGAAAAGGCTAATCAGATGGTGAATGTGACCCAAGTCTGGAAAATACATG  
GTAACCTCAAATAT

***tba-9*, F40F4.5 (Ahringer, X-2K23)**

GAAAATTGTAGAGGGCTGCAGGTATAGCCAAAATTAATACATAATAAATAATTTATTTGTTTATAGGGTTTTCTTGTG  
TTCCATTTTTCGGTGGAGGACTGGAAGTGGGTTTACAGCTCTGCTGATGGAACGTTTATCAGTGGATTATGGAAAAA  
GAGCAAGTTGGAATTTTGCATTTACCCAGCTCCGCAAGTATCAACTTCCATGGTGGAGCCGTATAACTCTATCTTAACAAC  
TCACACAACTCCTGAGCACTCCGATTGCTCATTTATGGTAGATAATGAGGCGATCTATGATATTTGCCGTCGAAACCTGGA  
CCTTGCTCGTCCGACCTACACCAATCTGAATCGACTGATTGCGCAAGTTATCAGTTCAGTCACCGCATCACTTCGTTTTGAT  
GGCGCTTTGAATGTGGATCTGACAGAGTTTCAAATACTGGCTCCATACCCAAGAATTCATTTTCTCTGACAACATAT  
GCCCAATTTTCCGCTGAAAAAGCATAACCAGAGCAAATGACGGTAAGTGTTCAGAGAAGGCTGGTCCAATTGCTATA  
GTTAAGTTGCTGAAATCACCAACAATGTTTCGAGCCAGGAGCGCAAATGGTCAAATGTGATCCAAGAAGAGGAAAAAT  
ATATGGTGAATTTATTTTCGCATATGGCACATAAAAAACATTCCAAATGAATTGCCAAGTTTCTGACAGAAAGTTGATACTG  
TGTA AAAAAGTTGATGCTAATAGTAAGCTC

***tbb-1*, K01G5.7 (Ahringer, III-5B12)**

GCAACCTGGCTTATCGAAATTAATCGACTCACTATAGGGAGACCGGCAGATCTGATTACAATGCCACCCTCTCTGTCCAC  
CAGCTTGTGAGAACACCGACGAGACTTACTGTATCGATAACGAGGCTCTCTACGATATCTGCTACAGAACTCTAAAGCTC  
ACCAACCAACATACGGAGACCTGAACCATCTCGTGTCTCACAATGTCTGGAGTGACTACCTGCCTCCGCTCCCTGGA  
CAGCTGAACGCTGATCTTCGCAAGTTGGCTGTCAACATGGTTCCATTCCCAGTCTTCATTTCTCATGCCTGGATTGCTC  
CACTCTCCGCCAAGGGAGCTCAGGCTTACCGTGCATTGACTGTGCGGAGCTTACTCAACAAATGTTGACGCCAAGAAC  
ATGATGGCTGCTTGCATCCAAGACACGGAAGATACCTCACCGTTGCTGCTATGTTCCGTGGACGCATGTCCATGAGAGT  
AAGTTCAACGATTGCTTGAACCTTTCACTATATGCTTTGTTTTTCAGGAGGTTGACGAGCAGATGCTCAGTGTCCAGAAC  
AAGAACTCCTCGTACTTCTGTTGAATGGATTCCAAACAACGTCAGACTGCTGTGTGCGACATCCCACCACGTGGACTCAA  
GATGGCTGCCACCTTCGTCGGAACTCCACTGCTATCCAGGAGCTCTTCAAGCGTATCTCGGAGCAATTCACCGCCATGTT  
CCGAGAAAGGCCTTCCTTATTGGTACACTGGTGGGGTATGGACGAGATGGAGTTCACCGAGGCTGAAAGCAACATG  
AACGACTTGATCTCGGAGTACCAACAATACCAGGAAGCTACCGCCGAAGACGAGCCACTCGACGAGTTCGCCGGA

***tbb-2*, C36E8.5 (Ahringer, III-2A15)**

GGGAATGGAACCATGTTGACGGCAAGCTTGGGAGATCGGCATTGAGCTGTCTGGGAATCGGAGACAGGTGGTAAC  
CCGGACATGGTGGAGGATACTGAAAATTGTAATTATTAGTTTCAATTTGGGTAACCTTGTGCATAACTTAACTTGAACAA  
GAAATAATAACTTACCAAGATGGTTCAAATCACCGTAGGTTGGGTTGGTGAGTTGAGGGTACGGTAGCAGATGTCGTA  
GAGGGCCTCGTTGCAATGCAGTAGGTCTCATCGGTGTTCTCAACAAGCTGGTGGACGGAGAGGGTGGCATTGTATGGT  
TCTACAACCTGTGTCGGACACCTTTGGCGATGGTACAACCGAGAATGAGCTCATGATTCTGTCTGGTACTCTTCGCGGATT  
TTGGAGATGAGAAGTGTCCATTCCAGATCCGTTCTCCTCCGAGAGAGTGAGTGAGTTGGAATCCTTGAAGACAATC  
GCATCCTTCGGCTTCCTTGGCGATCACGTCAAGCACATTGTCGACAAGCTCAGCTCCTTCTGTGTAGTGACCTTGGCCCA  
GTTGTTTCCGGCTCCGCTTTGTCCGAACACAAAAGTTGTCAGGACGGAACAGCTGGCCGAATGGTCCAGAGCGGACAGAA  
TCCATGGTTCTGGTTCCGATCGACCAACACGGCGCTGGCACATACTTTCCGCTGAAAAAATTAATTAATTAATCAT  
TCCAACTAAACGATTTCCGAA

***tbb-4*, B0272.1 (Ahringer, X-4P09)**

AAACTCCATTTTCGTCCATACCTTCTCCAGTGTACCAATGAAGGAAAGCTTTTCTACGGAAACATAGCTGGAAAATTATATTTT  
 CAGTTTCACTTAGTCTTTTTAAAACCTTCAATTTCAAGCTGAAAACGTTATCAGTTCTTACCTGTGAATTGCTCACTGATTCTC  
 TTGAAAAGCTCTTGAATTGCAGTGGAATTTCCGACGAATGTTGCCGCCATCTTACTCCTCTTGGCGGAATATCACAAAACA  
 GCAGTTTTGACGTTGTTTGAATCCATTCAACGAAGTACGAGGAGTTTTTATTTTGCACATTGAGCATTGCTCGTGCAGCTT  
 CTTTCATGCTCATTCTTCCGCGGAACATTGCAGCAACTGTCAGGTAGCGACCGTGTCTTGGATCGCAGGCTGCCATCATAT  
 TCTTGGCGTCAACATTTGTTGTGTGAGCTCTGGAACGGTGAGCGATCTGAAATTGTTTTGTTAATTTTGAAGCCTTTTT  
 CCTTAAGTCTGCACCTGTATTGCTGGCTTCTCTGGATGTGAGCGGAGCAAATCCGGGCATGAAGAAATGAAGACGTGG  
 GAACGGAACCATGTTAACAGCTAATTTGCGCAAATCTGCATTAGCTAAAAGAAAGTTACATCATAATAATTAAAGGTCTT  
 GCTCTCTTACCTGTCCCGGAAACGAAGACAGGTGGTGACACCACTCATCGTCATCGAAAACGAGATGATTCAAATCTCC  
 GTAGGTCGGTGTGGTGTGAGCTTGTGAGCGTGTGCGAAACAGATGTCATACAAGGCTTCGTTGTCAAT

***ben-1* (C54C6.2, *tbb-5*) (eigener RNAi-Klon, Tab. 3)**

CGAGGAAGCAACCTGGCTTATCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCGGCAGATCTGATTGCTGCAATGTTCCGT  
 GGACGTATGTCAATGAGAGAAGTGCATGATCAAATGATGAATGTGCAGAATAAGAACTCTTCTGATTTTTGTTGAATGGAT  
 TCCGAATAATGTGAAGACTGCGGTCTGTGATTTCCACCACGTGGGCTCAAGATGTCGGCCACTTTTATTGGAACTCGA  
 CAGCTATTCAGGAGTTGTTCAAGAGAATCTCTGAACAATTTACAGGTAATTTATGGAGACGCGGAAAAGTTCAATTTTATT  
 GCGGATTCGAAAAGCGAAAACGCGAAAAAATTATCGACTTTTTCAGAAAAATCAAAAAATTTAAAAAATTTAAATGTTTATT  
 ATATTTTGTATCCAAAAATTACAAAAATTTCTATTAAGGCTTTTTGAAAATTAATATTGAAAAAGTTGCTGGAAACGT  
 GCTCCACCGCAATTTACAACGCTCCGCCCTAATCAGTTGGGTCTCGTTAGGTATTTGGAGGCGAAATTTGTAATCCAAAT  
 GTTTTACCAAATTTAGCCATTTTTCTGCTTTTTTGTGATTTTTTCCGTTTAAAAAATTTCTGTGTCAAAACGATTTTTTC  
 ACCAATTTTCGACATAATTTTTTCAACGAACAGCATCACAAAAATGAATAAAATCGGCAAAAAAATTTCAAAAAACCTTTTAA  
 TTTTCAGTTGTTTTTTATTGAAAATTTGGCGAAACTAATTGAAACATTCTAAATTTACGGTATTAAATATCCAACATGTCCG  
 ATTTTATAGCGAAAATTTATCGATTTTTTCAGAACATAAAAAAACGAGAAAAATTTCAATATTTTATCGAATTTGGTATATT  
 TAAATTTAAAAAATCATAATTTTTCTCAATTTTATGAAATTTTTCAGCAATTTTTTGGTTAAAGTTTGGTAAATTTGGGTTA  
 AAAACATGAATTTAGGCGAAATTCGAAAAAGAAATTTCCAATTTATCGAAAAATCTAAAAAATTTAAAAAATTTAAAAAAT

***tbb-6*, T04H1.9 (Ahringer, V-8O23)**

TAAGGTTCTTAGCGTAATCCGCCGAGAAGCAGAAGCTGCTGACAGTCTGGAAGGATTTCAACTTATTCACCTATTGGGTG  
 GAGGTACTGGATCTGGATTAGGATCTTACTCATCTCAAAGCTCCGAGAAGAGTATTCTGATAAAACCCTGAGCACGTGC  
 TCAATCATTCCATCTGCTAAAGTTTCGGATACGGTTGTCGAGCCATAAATGCAATTTCTCCATGCCCATCTCATGGATA  
 ATTGTGACGAGAATTTCTGCATCGATAATGAAGCAATCTTCGACATCTGCAATACAATCTCAAACCTGAAAATCGCGTAA  
 CATAACGGTATTGAAATCATCTTGGTAAGACTGGAGAGCTGAGGTTTTATTAGTTAATTTTCAAGATCATTCTGTACAACCT  
 ACTGTTTCAGCGTCTCTTGCATTATCTGGAATAACAACCTTTCCAAAGATTCAAAGGAAATCTGAAAACGGATATTCGCAAG  
 CTCAACACTGCAGGTTACCTCGCCTTCATTTCTTCATGACTTCATTGCTCCAGTATATGGAAAAGGAATTATAGATTGTC  
 AGGCATTCAGTATTTCTGATCTTACCCAACAAGTTCTCGATGCCAAGAATATAATGACTTGTAAACCATAATCAGGGAAAAT  
 TCTTGTCTTCTGCTATTATTTACCGTGGTCAACAGACTGAGAAGAAGGATGCTGAACAAATCATCAGTGTGGAAAATGAA  
 GATCCATCTGAAATGATTGAGTCTTTACCAAAGAGCACAAATACCGATGTCTGTGATTTCCATCGAGAGGACTCAAG

***mec-7*, ZK154.3 (eigener RNAi-Klon, Tab. 3)**

CCGGCAGATCTGATTTGCTCTTGTGACTTGGAGCCAGGAACCATGGATTCTGTCGGTTCTGGACCATTCCGACAACCTTTT  
 CCGTCCAGACAATTACGTATTTGGTCAAAGCGGTGCTGGAAACAATTGGGCCAAAGGACACTACCCGAGGGAGCAGAA  
 CTTGTAGACAATGTTCTTGACGTTGTCAGAAAAGAAGCAGAAAGCACAGATTGCCTTCAAGGATTTCAACTTACTCACTCA  
 CTTGGAGGAGGACTGGATCTGGAATGGGAACCTTCTCATTTCAAAAATTCGCGAGGAATATCCTGACCGGATAATGAA  
 CACCTTCTCGGTAGTTCCAAGTCCAAAAGTATCCGACACTGTAGTGAACCCCTACAATGCCACCCTCTCTGTCCACCAGCTT  
 GTCGAGAATCAAGCTTATCGATACCGTGCACCTCGAGGGGGGGCCCGGTACCCAATTCGCCCTATAGTGAGTCGTATTAC  
 GCGCGCTCACTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCTGGCGTTACCCAATTAATCGCCTTGCAGCACAT  
 CCCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGA  
 ATGGGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAAGCGCG

***tbg-1*, F58A4.8 (Ahringer, III-5K19)**

TTTTTCGGGTAAAGTTCTCATTTGGATCGACAACAGGAGAGGTAGCTGCAAAAAACAAAATAAATAGATAAAAATAACATA  
 TTTCCGGAATAAAAAACAAACCGGATTGAATAAAAGTGCATTGGTGGAAACGGAGCCAAATCCAAATACCGAATTGATGGGC  
 ACATTGCAGAGTTGAATCGATATGGAGCAGTGGAAAGTGTCTATGATTCGGGGCGACAAGAGAATTGATATGATCAAATGT  
 TGGTGTATCTGTTTTGAATTTTCCAGCCGCAAGACGGTGCAGTGCAGCATTATCGAGGACAACAACATGATCTGAAAAT

ATTTATTTGAAATTCCTTTTTTTTATTATTACTCAGATACAAAAATTGAGACGGTACCCGGTCTTTTTCACTTAATGCGAATA  
TATGTGAGCCTTTAAGGGTACTGTAATTTCAAACGTTTCGTTGTTGCGGAATTTTCATAGATTTTCGATAAATCATTGTCA  
TTTCGTTTTTAATTTATTAACCTACCAGGATTCTCAATAAGTCTTTCATAGAAAAGTACCCAGTTATATGGATGAACAACAA  
CGTCAGTACTGGTGTCACTATTTGCAAAAACACTGTAAGTTTGAATAACTTTCTCGGAAATGCTTCGCGAAGCCTTTGCA  
GCAAGAGAGATCCCGTTCAGATCCAGTTCCTCCAGAAACACTATGAGTAAATAGAATTCCATCCAAATTGTTTCGATTTT  
CAGCCTCTCGAATGGTGATATCCATTATCTTCTTGAACCTCTCT

***noca-1*, T09E8.1 (Isoform h und i abgedeckt, eigener RNAi-Klon, Tab. 3)**

TTAGACGAATCTCTAAATCAGAGTGTTGCTATTCCGGTTATAATGCCAATTATTTTCTCATTAAAAATATTATTTTTCAGGAA  
GAAGCTCATCTGAACACTTCACAGTTTATTTCACTTCCCTCTCCGACGTCTCATTGAAGCCGCTGCATCTCAAAATCGAG  
CTACACCGATTGATTTTGGTACACGAGAAGTGAAGAAGATGACGATGTTCTCAGTAAGTTGGAGCTAATCGTTCATTTT  
AATGTTCCATTTAAGGTGACACTGGTCGTCGTCGAAGCGTTAACTTAATAACGCCTTCTCCTATTCCAGAAGAAACCGAGG  
ATAACTTAACAGAAACGCCTATTCCTGTAGTTGAACACATTCCAAGAAGTGCAATTTTGAACCTTTCAATCACGAAAATTC  
TCCTTTGTTCTCCGTGAAAATCAGATCTGCCGGTCTCCCTATAGTGAGTCGATTAATTTGATAAGCCAGGTTGCTTCTC  
GCTCACTGACTCGTGCCTCGTTCGTTGCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCA  
CAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCG  
TTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCC  
GACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTTCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGG  
ATACCTGTCCGCCTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGCGCTTTTTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGT  
CGTTGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCGTTT

***noca-1*, T09E8.1 (Isoform a-h abgedeckt, Ahringer, V-8B02)**

TTTTGTTGAGATTCTTCGTCTAAATCGTCTCATTCAATGGAAGCAGTAACTTGTCTACAAGCGAACAACTCCGATTGCAA  
GAAATGAGCGATGAGTTGGCGAACAAAGGATCGTAAAGTTACATCTTTGGAATCGAAGCTTCTGAAAGCTTATCAAAGAAT  
TGAACGACTGAACGAGGAGTACGACGGAAAAATAAAAAATCTGATGTATGACAGTGAACGTGCTCGCGACGATCTCACT  
CGATGTGTTGATAAGATTAGCAATTGGAAAACGAACTTGATGAGACACGAGCTGCAGTACAAAATGGAGATCATGCAA  
ATGAACAGGAATATCATGAGTTACGAGATAAGATCTGGAAAACAAGAACGTGAACTCAAGAGAGTCGTACGTTGCTTACT  
CGTTTTCGAGAAAAAGCAGAAATTTGAGAGAATGCGATCAGAGAAAAGGATATCTTGAGTTGAAGAATGAGAATCTCA  
ACAAGAAATTGGAAGCGAAAAAGCGAGCAGTTGAAGAACTCGAAAGAAGTGTTCGACTTTCGATTGGAGCAAACCTAT  
TTGCCAGCAATCATGCTCATCTGGATCAACACCGCTTGCTGATGAGATGGAGATTATGTCAGATATCCGACCATCACTCGC  
CAGACCATACACCAAGGTAAGTATTTATTAATTTTACACTTCTAGTGAAATCTATTGAAAGATTAACCTTTGAAATGGACA  
ACTACAAAAAATTATCAGAAATTAGAAGTACGAGAAAAGTCGATCTGAAAGTGTTCATCCCATCAGTAAAAAATTGCTT  
TGAAA

## Danksagung

Hiermit möchte ich allen meinen aufrichtigen Dank und Wertschätzung für die viele Zeit und Energie ausdrücken, welche für die Entstehung dieser Arbeit investiert wurden.

Herrn Dr. Olaf Bossinger danke ich an erster Stelle ganz herzlich für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, die Bereitstellung dieses interessanten Themas, und besonders seine fortwährende Unterstützung. Ich habe von den vielen Stunden, in denen er mir mit viel Geduld konstruktives Feedback und wertvolle Hilfe erwiesen hat, sehr profitiert.

Herrn Prof. Dr. Martin Scaal und Herrn Dr. Michael Kroiher danke ich vor allem für ihre hilfreichen Anregungen als Tutoren und die Bereitschaft auch das Gutachten zu übernehmen.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) möchte ich meinen großen Dank für die Unterstützung im Rahmen einer Sachbeihilfe aussprechen.

Ebenfalls möchte ich Herrn Prof. Dr. Andreas Wodarz, Institutsleiter der AG Molekulare Zellbiologie, für seine Unterstützung danken.

Außerdem sage ich allen gegenwärtigen und ehemaligen Mitgliedern der AG Molekulare Zellbiologie für die freundliche Zusammenarbeit und die Weitergabe ihres Fachwissens herzlich Danke.

Dr. Julia Camps danke ich für ihr außerordentlich großes Engagement. Ich habe bei ihr immer ein offenes Ohr und wertvolle Hilfe gefunden.

Dr. Theresa Vogt danke ich für die umfangreiche Einarbeitung in die Welt von *C. elegans*, sowie Rat und Tat inner- und außerhalb des Labors.

Jolanta Kozlowski möchte ich (in Anlehnung an unsere Gespräche über Sprichwörter) ein Kränzchen winden für ihre Hilfe und Unterstützung bei der Vorbereitung unzähliger RNAi-Platten. Vielen Dank für die lustigen Gespräche und den kulinarischen Austausch!

Außerdem danke ich Julia, Irina und Maggy, Katja und Theresa für die herzliche Aufnahme, den Zuspruch im Labor sowie den großen Spaß bei mancher außerwissenschaftlichen Aktivität.

Mein herzlicher Dank gilt meiner Familie, insbesondere meiner Mutter, die immer tröstende Worte fand.

Meinen wunderbaren Freunden danke ich ganz besonders. Jeder einzelne war stets am Fortschritt dieser Arbeit interessiert und hat mich motiviert.

Ganz besonders danke ich Julia, Irina und Maggy für ihre fortwährende Unterstützung über meine Zeit im Labor hinaus, insbesondere das Korrekturlesen.

Danke sagen möchte ich auch allen anderen, die sich als Unterstützer in den Zeiten, als „der Wurm drin war“, wiedererkennen.

Stefan danke ich für seinen alles andere als selbstverständlichen, grenzenlosen Beistand auf allen denkbaren Ebenen. Es war eine herausfordernde Zeit und ich danke dir ganz besonders für deine verständnisvolle Haltung, deine Geduld und den in besonders schwierigen Zeiten liebevollen Rückhalt.

## Erklärung

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbstständig 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 dieser Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Herrn Dr. rer. nat. habil. Olaf Bossinger betreut worden.

Ich versichere, dass ich alle Angaben wahrheitsgemäß nach bestem Wissen und Gewissen gemacht habe und verpflichte mich, jedmögliche, die obigen Angaben betreffenden Veränderungen, dem Promotionsausschuss unverzüglich mitzuteilen.

27.09.2024

Datum

.....

Stephanie Adler

## **Lebenslauf**

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.