

Regulation von Programmierem Zelltod  
in den NSM-Schwesterzellen im Nervensystem von  
*Caenorhabditis elegans*

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der  
Fakultät für Biologie der Ludwig-Maximilians-Universität München

Durchgeführt am Max-Planck-Institut für Neurobiologie  
in der Arbeitsgruppe Zelltodregulation

**Marion-Karin Thellmann**

München, November 2002

1. Gutachter: Prof. Dr. Charles N. David
2. Gutachter: Prof. Dr. Georg Dechant

eingereicht am: 23. November 2002

Tag der mündlichen Prüfung: 07. April 2003

---

<b>1</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>5</b>
<b>2</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>6</b>
<b>2.1</b>	<b>Programmierter Zelltod</b>	<b>6</b>
<b>2.2</b>	<b><i>Caenorhabditis elegans</i> als Modellorganismus</b>	<b>6</b>
<b>2.3</b>	<b>Programmierter Zelltod in <i>C. elegans</i></b>	<b>10</b>
2.3.1	Die zentrale Zelltodmaschinerie	10
2.3.2	Die zentrale Zelltodmaschinerie ist konserviert	12
2.3.3	Zelltypspezifische Regulation der Zelltodmaschinerie	13
<b>2.4</b>	<b>Zielsetzung der Arbeit</b>	<b>15</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>17</b>
<b>3.1</b>	<b>Materialien</b>	<b>17</b>
3.1.1	Chemikalien	17
3.1.2	Geräte	18
3.1.3	Verbrauchsmaterial	18
3.1.4	Enzyme, Antikörper und Standard	19
3.1.5	Kits	20
3.1.6	Oligonukleotide	20
3.1.7	Vektoren und Plasmide	21
3.1.8	Bakterienstämme	23
3.1.9	Hefestämme	23
3.1.10	<i>C. elegans</i> Stämme	23
3.1.11	Medien	27
<b>3.2</b>	<b>Molekularbiologische Methoden</b>	<b>28</b>
3.2.1	Isolierung von Plasmid-DNA	28
3.2.1.1	STET-Lyse	28
3.2.1.2	QIAGEN Midi-Prep	28
3.2.2	Reinigung und Fällung von DNA	28
3.2.2.1	Ethanol-fällung	28
3.2.2.2	Phenol/Chloroform-fällung	28
3.2.3	Agarose-Gelelektrophorese	29
3.2.4	DNA-Isolierung aus Agarosegelen	29
3.2.5	Konzentration und Reinheitsbestimmung von DNA	29
3.2.6	Enzymatische Reaktionen mit DNA	30
3.2.6.1	Restriktionsspaltung von DNA	30
3.2.6.2	Auffüllen von 5'-überhängenden DNA-Enden	30
3.2.6.3	Dephosphorylierung von DNA-Enden	30
3.2.6.4	Ligation	30
3.2.6.5	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	30
3.2.6.6	PCR-Mutagenese	31
3.2.7	Herstellung kompetenter Zellen	31
3.2.8	Transformation in Bakterien	32

---

3.2.9	Kultivierung und Konservierung von <i>E.coli</i> -Stämmen	32
<b>3.3</b>	<b>Proteinbiochemische Methoden</b>	<b>32</b>
3.3.1	<i>In vitro</i> Transkription und Translation von CES-1	32
3.3.2	Bakterielle Expression von GST-CES-1 Fusionsproteinen	32
3.3.3	Dialyse und Aufbewahrung von Proteinen	33
3.3.4	Proteinbestimmung nach Bradford	34
3.3.5	Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli	34
3.3.6	Proteinfärbung mit Coomassie Brilliant Blau	34
3.3.7	Gelretardierungsanalyse (EMSA)	35
3.3.7.1	PCR mit radioaktiv markierten dATPs	35
3.3.7.2	Reinigung und Isolierung von radioaktiv markierten PCR-Produkten	35
3.3.7.3	Protein-DNA-Bindung	36
<b>3.4</b>	<b>Immunologische Methoden</b>	<b>36</b>
3.4.1	Western Blot-Analyse	36
3.4.2	„Strippen“ von Western Blots	37
3.4.3	Immunofluoreszenz	37
3.4.3.1	Fixierung und Antikörperfärbung von <i>C. elegans</i> Embryonen nach Metzstein	37
3.4.3.2	Fixierung und Antikörperfärbung von <i>C. elegans</i> Embryonen nach Bossinger	39
<b>3.5</b>	<b>Methoden des Hefe-Expressionssystems</b>	<b>40</b>
3.5.1	Anzucht von <i>S. cerevisiae</i>	40
3.5.2	Lithiumacetat-Transformation von <i>S. cerevisiae</i>	40
3.5.3	„Yeast one-hybrid“-System	40
<b>3.6</b>	<b>Biologische Untersuchung von <i>C. elegans</i></b>	<b>41</b>
3.6.1	Kultivierung und Anzucht von <i>C. elegans</i>	41
3.6.2	Reinigung kontaminierter Tiere	41
3.6.3	Einfrieren / Auftauen	41
3.6.4	Induktion von Männchen durch Hitzeschock	42
3.6.5	Genetische Methoden	42
3.6.5.1	Kreuzungen	42
3.6.5.2	Transformation von <i>C. elegans</i> durch Mikroinjektion von DNA	43
3.6.5.3	Integration extrachromosomaler Elemente durch EMS-Mutagenese	43
3.6.5.4	Transformation von <i>C. elegans</i> durch „Microparticle Bombardment“	44
3.6.6	Mikroskopie lebender Tiere	45
3.6.7	Isolierung von DNA aus <i>C. elegans</i>	45
3.6.8	Herstellung von Embryo-Lysat für Western-Blot-Analysen	46
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>47</b>
<b>4.1</b>	<b>Der <i>Ptph-1::gfp</i>-Reporter wird in den NSM-Zellen und den „untoten“ NSM-Schwersterzellen exprimiert</b>	<b>47</b>
4.1.1	Injektion des <i>Ptph-1::gfp</i> -Reporters in <i>C. elegans</i>	47
4.1.2	Integration des <i>Ptph-1::gfp</i> -Reporters durch EMS-Mutagenese	48
4.1.3	Kopplungsanalysen	48
4.1.4	Expression des <i>Ptph-1::gfp</i> -Reporters in ausgewählten Mutanten	52

<b>4.2</b>	<b>CES-1-Expression in <i>C. elegans</i> Embryonen</b>	<b>53</b>
4.2.1	CES-1-Expressionsmuster in fixierten Embryonen	53
4.2.2	Kolokalisierung von CES-1 und <i>Pceh-2::gfp</i> in <i>C. elegans</i> Embryonen	54
<b>4.3</b>	<b>Region B im <i>egl-1</i>-Lokus ist für den programmierten Zelltod der NSM-Schwesterzellen erforderlich</b>	<b>56</b>
4.3.1	Injektion definierter Fragmente des <i>egl-1</i> -Lokus in <i>egl-1(lf)</i> -Tieren	56
4.3.2	Untersuchung der NSM-Zellen und der NSM-Schwesterzellen in transgenen <i>egl-1(lf)</i> -Tieren	58
4.3.3	Region B enthält vier Konsensus-Sequenzen für Snail-Bindeproteine	60
<b>4.4</b>	<b>CES-1 bindet <i>in vitro</i> spezifisch an Region B im <i>egl-1</i>-Lokus</b>	<b>61</b>
4.4.1	Amplifizierung der DNA-Proben	61
4.4.2	Ein GST-CES-1 Fusionsprotein bindet <i>in vitro</i> an die Snail-Bindestellen	62
4.4.3	CES-1-Bindung an Snail-Bindestellen im „Yeast one-hybrid“-System	65
4.4.4	CES-1 Bindung an den <i>egl-1</i> -Promotor in extrachromosomalen Elementen	67
<b>4.5</b>	<b>Funktionale Snail-Bindestellen in Region B sind für die Zelltodspezifizierung der NSM-Schwesterzellen notwendig</b>	<b>71</b>
4.5.1	Modell für die Zelltodspezifizierung der NSM-Schwesterzellen	71
4.5.2	Trennung der CES-1-Bindung und der bHLH-Bindung an die vier Snail/E-box-Bindestellen in Region B	73
4.5.3	Funktionale Untersuchung der Snail-Bindestellen in Region B <i>in vivo</i>	75
4.5.4	Transformation von <i>C. elegans</i> durch „Microparticle Bombardment“	77
<b>4.6</b>	<b>Programmierter Zelltod der NSM-Schwesterzellen wird durch CES-1 und HLH-2/HLH-3 über gemeinsame Bindestellen im <i>egl-1</i>-Lokus reguliert</b>	<b>79</b>
<b>5</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>82</b>
<b>5.1</b>	<b>Die <i>egl-1</i>-Expression wird in den NSM-Schwesterzellen transkriptional reguliert</b>	<b>82</b>
<b>5.2</b>	<b>Der <i>Ptp-1::gfp</i>-Reporter wird in den NSM-Zellen und den „untoten“ NSM-Schwesterzellen exprimiert</b>	<b>83</b>
<b>5.3</b>	<b>Die <i>egl-1</i>-Expression wird in den NSM-Schwesterzellen vom CES-1-Repressor transkriptional reguliert</b>	<b>84</b>
<b>5.4</b>	<b>HLH-2/HLH-3 ist ein potentieller Aktivator der <i>egl-1</i>-Transkription in den NSM-Schwesterzellen</b>	<b>86</b>
<b>5.5</b>	<b>Während der Regulation des programmierten Zelltods der NSM-Schwesterzellen konkurrieren CES-1 und HLH-2/HLH-3 für die gleichen Bindestellen im <i>egl-1</i>-Lokus</b>	<b>87</b>
<b>5.6</b>	<b>Die zelltypspezifischen Regulatoren des programmierten Zelltods in den NSM-Schwesterzellen sind zwischen <i>C. elegans</i> und höheren Organismen konserviert</b>	<b>89</b>

**6 LITERATURVERZEICHNIS**

**92**

# 1 Zusammenfassung

Programmierter Zelltod oder Apoptose ist ein physiologischer Vorgang, der im gesamten Tierreich von grundlegender Bedeutung ist, um überflüssige und potentiell schädliche Zellen während der Entwicklung vielzelliger Organismen zu entfernen. Studien am Nematoden *Caenorhabditis elegans* haben zur Identifizierung zahlreicher Gene beigetragen, die an der Regulation von programmiertem Zelltod beteiligt sind und zwischen Vertebraten und Invertebraten konserviert sind. Vier Gene, *egl-1*, *ced-9*, *ced-4* und *ced-3* codieren Komponenten der zentralen Zelltodmaschinerie, die bei der Aktivierung aller Zelltodereignisse während der Entwicklung von *C. elegans* eine Rolle spielen. Diese Arbeit zeigt Untersuchungen zur zelltypspezifischen Regulation von programmiertem Zelltod am Beispiel der NSM-Schwesterzellen, die während der Embryonalentwicklung im Pharynx von *C. elegans* gebildet werden und kurz darauf durch programmierten Zelltod sterben. „Gain-of-function“-Mutationen in *ces-1*, die wahrscheinlich zur Überexpression des Gens führen, blockieren dieses zelltypspezifische Zelltodereignis und führen zum Überleben der NSM-Schwesterzellen. Genetische Analysen haben gezeigt, dass *ces-1*, welches einen Snail-ähnlichen Transkriptionsfaktor codiert, genetisch vor dem zentralen Zelltodaktivator der Zelltodmaschinerie *egl-1* wirkt. Die Regulation von *egl-1*, welches einen „BH3-Only“-Zelltodaktivator codiert, erfolgt in den NSM-Zellen und den NSM-Schwesterzellen auf transkriptionaler Ebene. Es konnte gezeigt werden, dass eine zwischen *C. elegans* und *C. briggsae* konservierte Region in den *cis*-regulatorischen Sequenzen des *egl-1*-Lokus, der Region B, für die Zelltodspezifizierung der NSM-Schwesterzellen erforderlich ist. Darüber hinaus bindet CES-1 *in vitro* spezifisch an vier Konsensus-Sequenzen für Snail-Bindeteleproteine in Region B. Funktionale Snail-Bindestellen sind für die Reprimierung der *egl-1*-Expression durch CES-1 auch *in vivo* notwendig, was darauf hindeutet, dass CES-1 als direkter Repressor der *egl-1*-Transkription wirken kann. *In vivo*-Untersuchungen haben gezeigt, dass CES-1 die *egl-1*-Expression in den NSM-Schwesterzellen reprimiert, indem es die Bindestellen blockiert, durch die wahrscheinlich auch der potentielle *egl-1*-Aktivator HLH-2/HLH-3 wirkt. Es wird angenommen, dass dieser Kompetitionsmechanismus zwischen Repressor und Aktivator das Schicksal der NSM-Schwesterzellen reguliert.

## 2 Einleitung

### 2.1 Programmierter Zelltod

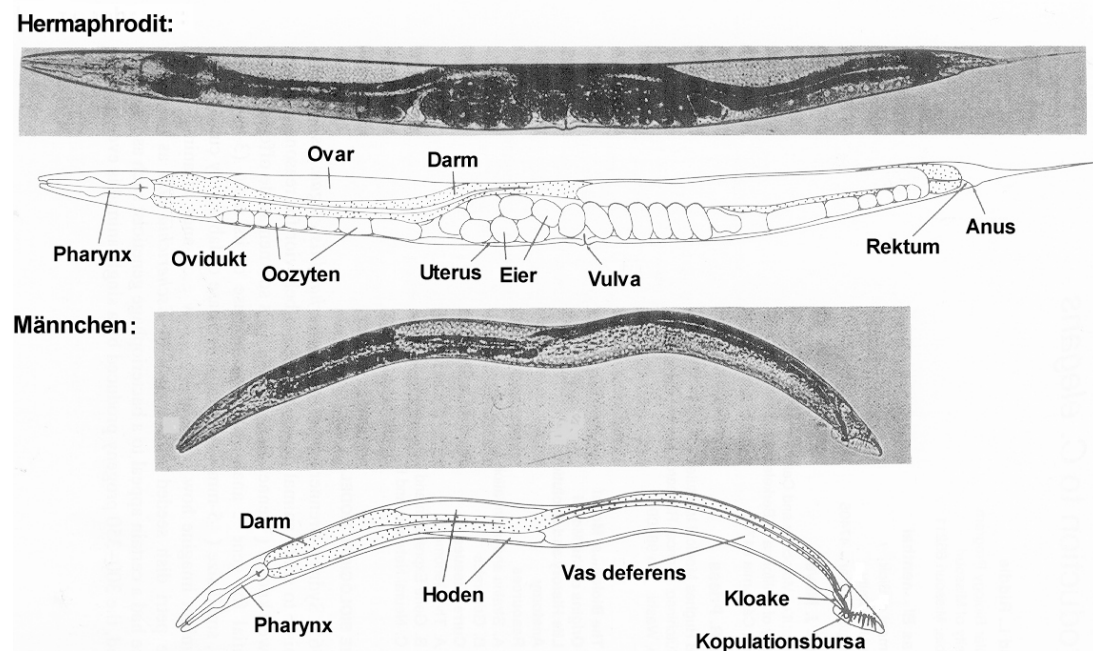
Programmierter Zelltod oder Apoptose ist ein physiologischer, genetisch determinierter Vorgang, der sich vom Zelltod aufgrund von pathologischen Veränderungen (Nekrose) grundlegend unterscheidet (Kerr *et al.*, 1972). Durch programmierten Zelltod werden überflüssige oder womöglich schädliche Körperzellen während der Entwicklung multizellulärer Organismen eliminiert (Jacobson *et al.*, 1997). Die Bedeutung dieses im Tierreich konservierten Prozesses wird dadurch verdeutlicht, dass Fehlregulationen zur Entstehung von zahlreichen Krankheiten beitragen. Im Nervensystem ist programmierter Zelltod notwendig, um die Größe neuronaler Populationen und die Selektion funktioneller Neuronen zu kontrollieren (Pettmann und Henderson, 1998). Ektopischer Zelltod führt beim Menschen unter anderem zu neurodegenerativen Erkrankungen wie z.B. Parkinson oder Alzheimer. Im Immunsystem ist Apoptose während der Reifung der Lymphozyten essentiell, nur funktionelle und nicht-autoreaktive Zellen werden so selektiert (Krammer, 2000). Mangelnde Aktivierung der Zelltodmaschinerie kann zu unkontrollierter Zellproliferation und folglich zur Entstehung von Krebskrankheiten wie z.B. Leukämie führen (Hemavathy *et al.*, 2000b; Rathmell und Thompson, 2002). Für die Ausführung von programmiertem Zelltod ist eine konservierte Maschinerie verantwortlich, die in vielen, wenn nicht sogar in allen Zellen des Organismus vorhanden ist. Die Aktivierung dieser Zelltodmaschinerie ist jedoch auf definierte Zellen beschränkt. Für die Untersuchung der Mechanismen die zum programmierten Zelltod führen, und deren Regulation, hat sich der Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* als geeigneter Modellorganismus herausgestellt (Brenner, 1974; Sulston und Horvitz, 1977).

### 2.2 *Caenorhabditis elegans* als Modellorganismus

Der Fadenwurm (Nematoda) *Caenorhabditis elegans* zählt zu den derzeit wichtigsten Modellorganismen für die Untersuchung biologischer Vorgänge (Abb. 2.1). Der 1 mm große Bodenbewohner wird im Labor auf Agarplatten kultiviert, wo er sich von Bakterien ernährt (Wood, 1988). Laborpopulationen bestehen unter Normalbedingungen (20°C) fast ausschließlich aus Hermaphroditen (Zwitter), die sich durch



Selbstbefruchtung vermehren. Hermaphroditen legen bei 20°C etwa 300 Eier, wodurch eine hohe Nachkommenzahl gewährleistet wird (Hodgkin, 1988). Während einer kurzen Generationszeit von etwa drei Tagen entwickelt sich aus einer befruchteten Eizelle über vier verschiedene Larvenstadien (L1-L4) ein erwachsenes Tier (Sulston und Horvitz, 1977; Sulston *et al.*, 1983). L1- und L2-Larven können in flüssigem Stickstoff oder auch bei -80°C eingefroren, und bei Bedarf wieder aufgetaut werden (Sulston und Hodgkin, 1988). Aufgrund der Transparenz von *C. elegans* kann dessen Entwicklung am Mikroskop auf Zellebene beobachtet werden. In einer *C. elegans*-Population sind lediglich 0.2 % der Tiere Männchen, die sich sexuell mit den Zwittern fortpflanzen können und demnach Kreuzungsexperimente ermöglichen (Sulston und Hodgkin, 1988).



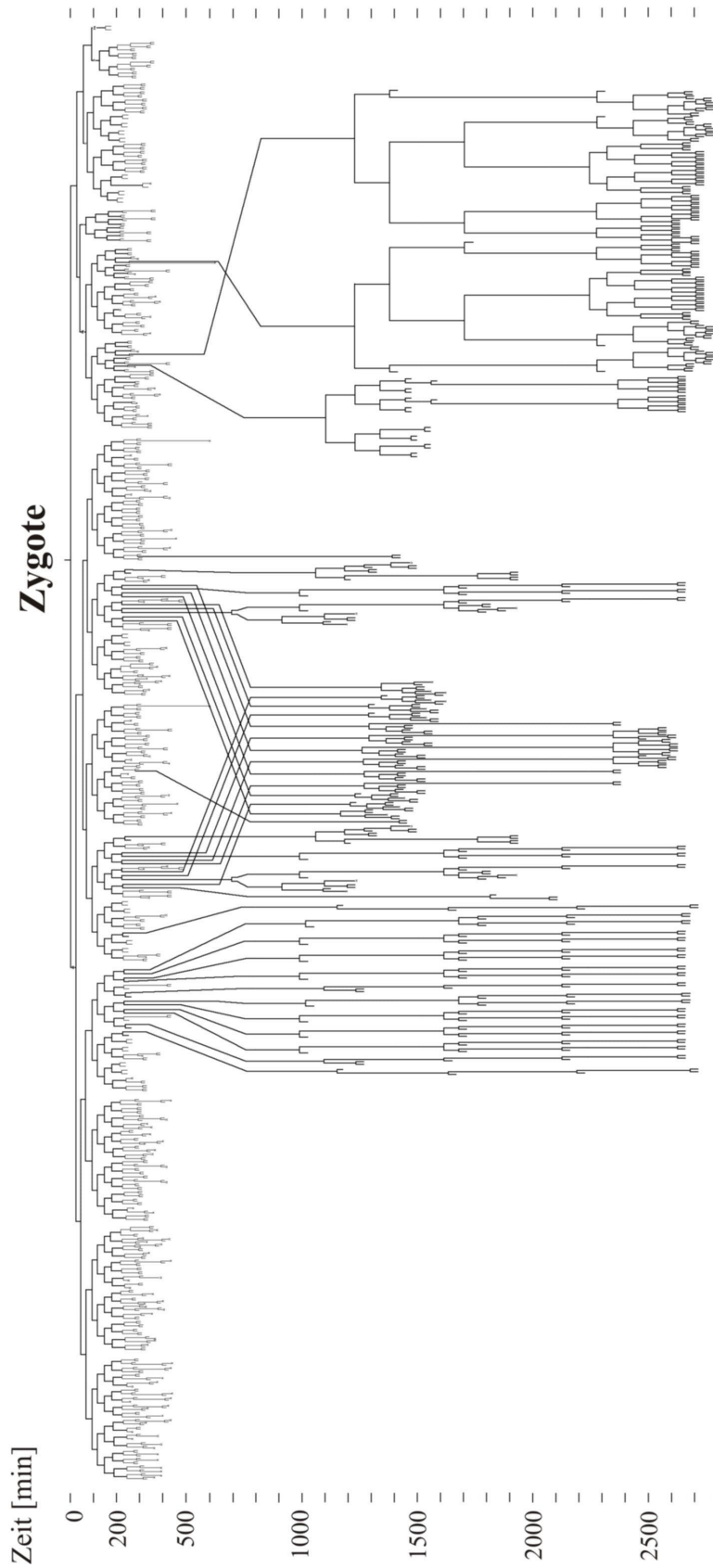
**Abbildung 2.1: Anatomie von *C. elegans* Hermaphroditen und Männchen**

Die Strukturen, die man in den durchsichtigen Tieren sehen kann, wurden schematisch dargestellt (Sulston und Horvitz, 1977).

Ein breites Spektrum molekularbiologischer Techniken, wie z.B. die Konstruktion transgener Tiere durch Mikroinjektion von DNA (Fire, 1986; Kimble *et al.*, 1982), die RNA-vermittelte Interferenz (RNAi)-Methode (Fire *et al.*, 1998) oder auch die chemische Mutagenese (Anderson und Brenner, 1984), wodurch die Isolation zahlreicher Mutanten ermöglicht wird, gehören zu den angewendeten Standardmethoden im Labor. Dadurch wurden bereits eine Vielzahl genetischer

Phänotypen charakterisiert (Hodgkin, 1997). *C. elegans* ist darüber hinaus der erste vielzellige Organismus, dessen Genom 1998 vollständig sequenziert wurde (Consortium, 1998).

Ein bedeutender Vorteil des Fadenwurms als Modellsystem ist das Phänomen der Zellkonstanz. Das Schicksal jeder einzelnen Zelle, von ihrer Entstehung bis hin zu ihrer Position im erwachsenen Tier ist zeitlich und räumlich festgelegt und kann am Mikroskop verfolgt werden (Sulston und Horvitz, 1977; Sulston *et al.*, 1983). Während der Entwicklung eines Hermaphroditen entstehen 1090 somatische Zellen, deren Herkunft aufgrund des konstanten Zellstammbaumes (Abb. 2.2) bis zu ihrem Ursprung zurückverfolgt werden kann. Genau 131 Zellen überwiegend neuronalen Ursprungs (105 Neuronen) sterben durch programmierten Zelltod (Horvitz *et al.*, 1982b). Dieses Zellsterben ist sowohl in Bezug auf den Zeitpunkt als auch in Bezug auf die Lage im Organismus reproduzierbar. Unter Laborbedingungen ist programmierter Zelltod für das Überleben von *C. elegans* allerdings nicht notwendig. Für genetische Studien des programmierten Zelltods hat sich *C. elegans* aufgrund dieser zahlreichen Vorteile als Modellorganismus etabliert.

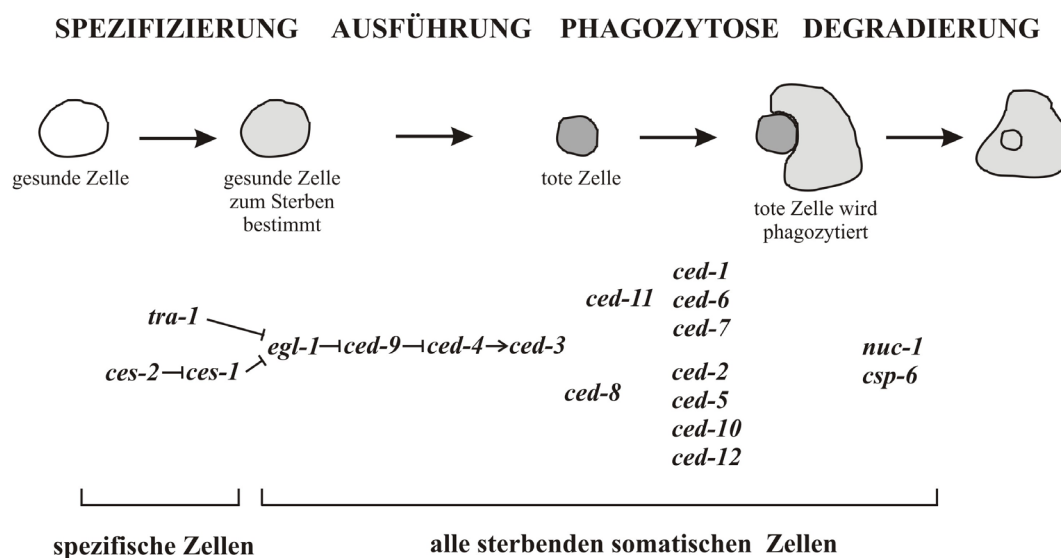


**Abbildung 2.2: Zellstammbaum eines *C. elegans* Hermaphroditen**

Darstellung des vollständigen Zellstammbaumes eines *C. elegans* Hermaphroditen. Während der Entwicklung werden 1090 somatische Zellen gebildet und genau 131 Zellen sterben durch programmierten Zelltod. Die Entwicklung und der programmierte Tod der Zellen werden anhand des Zellstammbaums dargestellt (Sulston und Horvitz, 1977; Sulston *et al.*, 1983).

## 2.3 Programmierter Zelltod in *C. elegans*

In *C. elegans* können Zellteilungen und Zelltod im lebenden Organismus beobachtet und untersucht werden. Genetische Analysen von Tieren mit Mutationen, die sich auf programmierten Zelltod auswirken, haben zur Identifizierung zahlreicher Gene geführt, die an der Regulation von programmiertem Zelltod beteiligt sind (Abb. 2.3) (Horvitz, 1999). Während der Spezifizierung legen zelltypspezifische Regulatoren fest, ob eine Zelle durch programmierten Zelltod sterben soll. Daraufhin wird die Zelltodmaschinerie aktiviert und der aktive Prozess des Zelltods wird ausgeführt. Anschließend werden die sterbenden Zellen von Nachbarzellen phagozytiert und letztlich verdaut. Zahlreiche Gene, die an den vier aufeinanderfolgenden Schritten des programmierten Zelltodes beteiligt sind, wurden in *C. elegans* sowohl genetisch als auch molekularbiologisch charakterisiert (Horvitz, 1999).



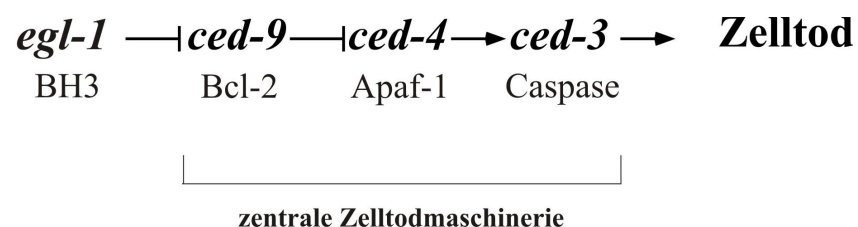
**Abbildung 2.3: Schematische Darstellung des Zelltod-Prozesses in *C. elegans***

Die Zelltodspezifizierung einer gesunden Zelle, die zum Sterben bestimmt ist, führt zur Aktivierung der Zelltodmaschinerie und zur Ausführung des Zelltods. Die tote Zelle wird von benachbarten Zellen phagozytiert und anschließend degeneriert. Zahlreiche Gene, die an den vier Abschnitten des Zelltodprozesses beteiligt sind, wurden charakterisiert (modifiziert nach Wittenburg, 2002).

### 2.3.1 Die zentrale Zelltodmaschinerie

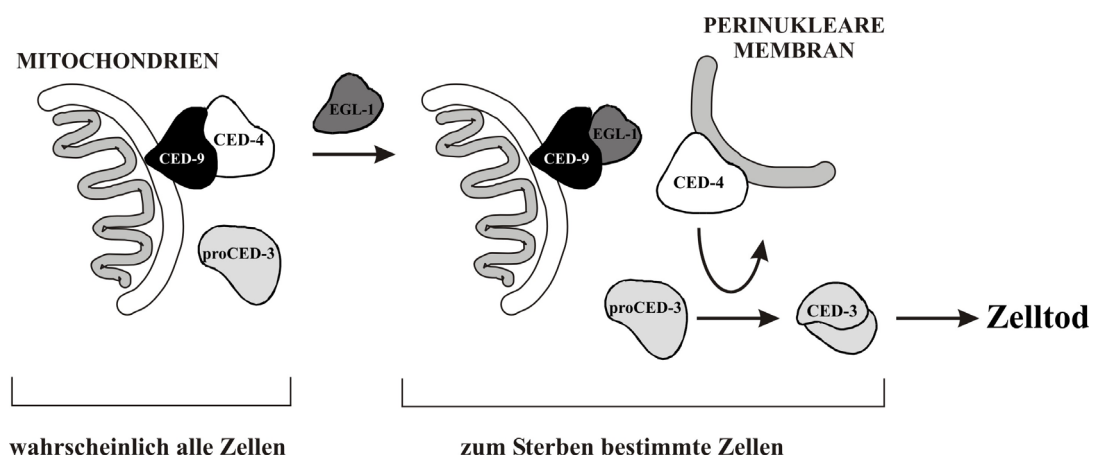
Drei Gene, *ced-9*, *ced-4* und *ced-3* (*ced*, cell-death abnormal) codieren die Komponenten der zentralen Zelltodmaschinerie (Abb. 2.4). Mutationen in diesen Genen führen zu einer generellen Blockierung des programmierten Zelltods und verursachen daher einen sogenannten Ced-Phänotyp. In Ced-Mutanten überleben

wahrscheinlich alle 131 Zellen, die in Wildtyp-Tieren durch programmierten Zelltod sterben (Horvitz, 1999; Metzstein *et al.*, 1998). Im Falle von *ced-4* und *ced-3* handelt es sich um Mutationen, die zum Funktionsverlust dieser Gene führen („loss-of-function“(lf)-Mutationen) (Ellis und Horvitz, 1986). *ced-4* und *ced-3* codieren Zelltodaktivatoren, die für die Exekution des Zelltods notwendig sind (Alnemri *et al.*, 1996; Thornberry und Lazebnik, 1998; Yuan und Horvitz, 1992; Yuan *et al.*, 1993). Mutationen in *ced-9* die zur Überaktivierung des Gens führen („gain-of-function“(gf)-Mutationen) blockieren ebenfalls programmierten Zelltod, *ced-9* codiert daher einen Zelltodinhibitor (Hengartner *et al.*, 1992; Hengartner und Horvitz, 1994; Xue und Horvitz, 1997). Tiere mit Mutationen in *ced-9*, die dessen Funktionsverlust zur Folge haben, sterben aufgrund von ektopischem Zelltod während der Embryonalentwicklung. Dieser Effekt ist von der Funktion der Gene *ced-4* und *ced-3* abhängig, die daher genetisch nach *ced-9* wirken. Die Überexpression von *ced-4* und *ced-3* führt aufgrund ihrer Funktionen als Zelltodaktivatoren ebenfalls zu ektopischem Zelltod (Shaham und Horvitz, 1996). Dabei ist der ektopische Zelltod, verursacht durch Überexpression von *ced-4*, von *ced-3* abhängig. Der Phänotyp von *ced-3*(lf)-Tieren ist unabhängig von *ced-4*. Diese genetischen Daten ergeben einen Regulationsweg, in dem *ced-9* die Funktion von *ced-4* negativ reguliert, *ced-4* hingegen *ced-3* aktiviert, dessen Funktion für programmierten Zelltod erforderlich ist (Metzstein *et al.*, 1998). Im Soma von *C. elegans* ist *egl-1* (*egl*, *egg laying defective*) der zentrale Regulator der Zelltodmaschinerie (Conradt und Horvitz, 1998; Trent *et al.*, 1983). Der Funktionsverlust von *egl-1* führt zur Blockierung des programmierten Zelltods. Ektopischer Zelltod, verursacht durch den Funktionsverlust von *ced-9*, ist unabhängig von *egl-1*. Die Ergebnisse dieser epistatischen Analysen zeigen, daß *egl-1* während der Ausführung des Zelltods vor *ced-9* wirkt.



**Abbildung 2.4: Genetische Regulation der zentralen Zelltodmaschinerie**  
*ced-9*, *ced-4*, und *ced-3* bilden die zentrale Zelltodmaschinerie, deren Regulation im Soma von *egl-1* abhängig ist. Die Gene der Exekutionsmaschinerie sind zwischen *C. elegans* und höheren Organismen konserviert.

Molekularbiologische Untersuchungen der Proteine EGL-1, CED-9, CED-4 und CED-3 haben zur Aufstellung eines Modells für die Aktivierung der zentralen Zelltodmaschinerie geführt (Metzstein *et al.*, 1998) (Abb. 2.5). In den meisten, wenn nicht sogar in allen Zellen scheinen die Proteine CED-9, CED-4 und pro-CED-3 vorhanden zu sein, damit besitzen diese Zellen das Potential zu sterben (Chen *et al.*, 2000; Metzstein *et al.*, 1998). CED-9 befindet sich wahrscheinlich an der Membran der Mitochondrien und bindet gleichzeitig CED-4 (Spector *et al.*, 1997; Vaux, 1997). Diese Interaktion blockiert die Funktion von CED-4, und die Zellen überleben. Nach der Aktivierung der Zelltodmaschinerie bindet EGL-1 das membran-assoziierte CED-9 und führt dadurch zur Translokation von CED-4 an die perinukleare Membran (Chen *et al.*, 2000). CED-4 aktiviert hier pro-CED-3, und aktives CED-3 führt zum Zelltod (Chinnaiyan *et al.*, 1997a; Chinnaiyan *et al.*, 1997b; Wu *et al.*, 1997a; Wu *et al.*, 1997b).



**Abbildung 2.5: Model für die Funktion der zentralen Zelltodmaschinerie**

Zum Sterben bestimmte Zellen exprimieren EGL-1, dessen Bindung an CED-9 zur Translokation von CED-4 an die perinukleare Membran führt. Folglich kann CED-4 pro-CED-3 in die aktive Form CED-3 überführen (modifiziert nach Metzstein *et al.* 1998).

### 2.3.2 Die zentrale Zelltodmaschinerie ist konserviert

Die Gene der zentralen Zelltodmaschinerie sind zwischen *C. elegans* und Säugetieren konserviert (Abb. 2.4). *ced-3* codiert eine Cystein-Protease, ein Homolog zum menschlichen Enzym ICE (ICE, interleukin-1 $\beta$ -converting enzyme), und ist ein Vertreter der Familie der Zelltod-Proteasen, die sogenannten Caspasen (caspase, cysteiny aspartate-specific proteinase) (Yuan *et al.*, 1993). Caspasen werden als

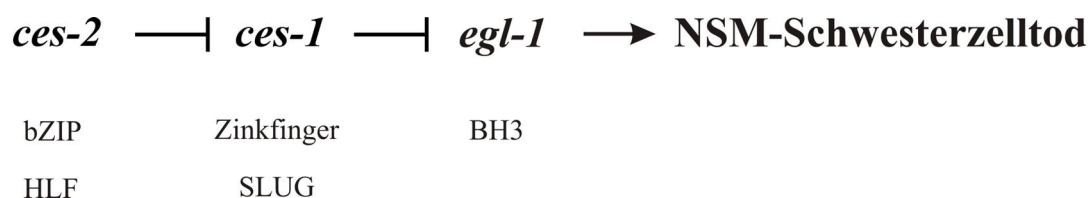
inaktive pro-Caspasen gebildet und durch proteolytische Spaltung aktiviert (Shi, 2002). Aktive Caspasen spalten zahlreiche Proteine, ein Prozess, der zur Zerstörung der Zelle führt (Cryns und Yuan, 1998; Thornberry und Lazebnik, 1998). *ced-4* codiert einen Aktivator für Caspase, ein Homolog zum humanen Apaf-1-Protein (Apaf-1, apoptotic protease activating factor 1) (Vaux, 1997; Zou *et al.*, 1997). CED-9 ist sowohl strukturell als auch funktionell homolog zum humanen Proto-Onkoprotein Bcl-2 (Bcl-2, B cell lymphoma gene 2) (Hengartner und Horvitz, 1994; Vaux *et al.*, 1988; Vaux *et al.*, 1992). Beide Proteine sind Vertreter der Zelltodinhhibitoren in der Familie der Bcl-2-Proteine (Chao und Korsmeyer, 1998; Cory und Adams, 2002). Zusammen mit den bisher zehn bekannten Homologen Bad (Yang *et al.*, 1995), Bid (Wang *et al.*, 1996), Bik/Nbk (Boyd *et al.*, 1995; Han *et al.*, 1996), Hrk/DP5 (Imaizumi *et al.*, 1997; Inohara *et al.*, 1997), Blk (Hegde *et al.*, 1998), Bim/Bod (Hsu *et al.*, 1998; O'Connor *et al.*, 1998), Bmf (Puthalakath *et al.*, 2001), Noxa (Oda *et al.*, 2000), Puma/Bbc3 (Han *et al.*, 2001; Nakano und Vousden, 2001; Yu *et al.*, 2001) und Bcl-G<sub>S</sub> (Guo *et al.*, 2001) in Maus bzw. im Menschen ist EGL-1 ein Vertreter einer Untergruppe der Bcl-2-Proteine, der sogenannten „BH3-only“-Proteine (BH3, Bcl-2 homology region 3) (Conradt und Horvitz, 1998). „BH3-only“-Proteine repräsentieren Zelltodaktivatoren, die mit den anti-apoptotischen Mitgliedern der Familie (z.B. Bcl-2, CED-9) interagieren und deren zelltodinhibitorischen Funktionen entgegenwirken (Cory und Adams, 2002; Huang und Strasser, 2000). Die Regulation dieser essentiellen Initiatoren des programmierten Zelltods unterliegt sowohl transkriptionalen als auch posttranskriptionalen Mechanismen (Puthalakath und Strasser, 2002).

### 2.3.3 Zelltypspezifische Regulation der Zelltodmaschinerie

Im Vergleich zu den Ausführungsmechanismen des Zelltods, ist über die zelltypspezifische Regulation von programmiertem Zelltod nur wenig bekannt. Genetische Analysen haben zur Identifizierung von Genen geführt, die vor *egl-1* wirken und den Zelltod in spezifischen Zellen regulieren (Conradt und Horvitz, 1998; Ellis und Horvitz, 1991; Metzstein und Horvitz, 1999). Mutationen in den Genen *ces-2* und *ces-1* (*ces*, cell-death specification) blockieren programmierten Zelltod nur in spezifischen Neuronen im Pharynx, den NSM-Schwesterzellen (NSM, neurosecretory motoneurons) bzw. den NSM- und I2-Schwesterzellen (I2, interneurons 2) (Ellis und Horvitz, 1991). Die NSM-Zellen sind bilaterale neurosekretorische Motoneuronen,

die Serotonin produzieren, und die I2-Zellen sind Interneuronen (Sulston *et al.*, 1983). Ferner führt eine *gf*-Mutation in *tra-1* (*tra*, transformer) zum Überleben der HSN-Zellen (HSN, hermaphrodite-spezifische neurons) in Männchen (Conradt und Horvitz, 1999). Diese Hermaphroditen-spezifischen Neuronen sind für die Eiablage notwendig (Sulston und Horvitz, 1977; Sulston *et al.*, 1983). Sie werden sowohl in Hermaphroditen als auch in Männchen gebildet und sterben in Wildtyp-Männchen durch programmierten Zelltod. TRA-1A ist der terminale Regulator des Geschlechts, ein Zinkfinger-Transkriptionsfaktor, der in Hermaphroditen die Expression von *egl-1* in den HSN-Zellen blockiert, wodurch deren Zelltod verhindert wird (Conradt und Horvitz, 1999; Goodwin und Ellis, 2002; Hodgkin, 1999b). In Männchen wird *tra-1* nur in geringen Mengen exprimiert, so dass die Proteinmenge nicht ausreicht, um die *egl-1*-Expression in den HSN-Zellen zu blockieren, folglich sterben die Zellen (Hodgkin, 1999b). Die geschlechtsspezifische Genexpression von *tra-1* reguliert somit den programmierten Zelltod der HSN-Zellen.

Im Gegensatz zu den HSN-Zellen, sterben die NSM-Schwesterzellen in beiden Geschlechtern kurz nach ihrer Entsehung, etwa 420 min nach der ersten Zellteilung, im 1 ½-Faltenstadium während der Embryonalentwicklung (Sulston *et al.*, 1983). Mutationen, die zum Funktionsverlust von *ces-2* bzw. zur Überaktivierung von *ces-1* führen, blockieren den programmierten Zelltod der NSM-Schwesterzellen (Ellis und Horvitz, 1991). Mutationen, die zum Funktionsverlust von *ces-1* führen, haben jedoch keinen erkennbaren Phänotyp, die NSM-Schwesterzellen sterben. Im Gegensatz zu *ces-2* ist *ces-1* für programmierten Zelltod nicht notwendig, es kann den Zelltod-Defekt in *ces-2(lf)*-Tieren jedoch verhindern. Der *ces-2(lf)*-Phänotyp ist somit von einem funktionalen *ces-1*-Gen abhängig und *ces-2* wirkt daher genetisch vor *ces-1* (Abb. 2.6).



**Abbildung 2.6: Regulation des NSM-Schwesterzelltods**

In einem genetischen Weg wird *ces-1* durch *ces-2* negativ reguliert, und *egl-1* wird durch *ces-1* negativ reguliert. Diese zelltypspezifischen Transkriptionsfaktoren sind zwischen *C. elegans* und höheren Organismen konserviert.



CES-2 ist ein bZIP-Transkriptionsfaktor (bZIP, basic leucine-zipper) mit Sequenz- und Funktionshomologien zur Gruppe der PAR-Proteine (PAR, proline- and acid-rich) in Wirbeltieren, die als transkriptionale Repressoren fungieren (Capovilla *et al.*, 1992; Cowell *et al.*, 1992; Metzstein *et al.*, 1996). Regulatorische Sequenzen stromaufwärts vom *ces-1*-Transkriptionsstart enthalten eine CES-2-Bindestelle, somit ist eine direkte, transkriptionale Regulation durch CES-2 möglich. CES-1 ist ein Zinkfinger DNA-Bindeprotein der Snail-Proteinfamilie (Metzstein und Horvitz, 1999). Die zelltypspezifischen Gene *ces-1* und *ces-2* haben humane Homologe, die ebenfalls an der Regulation von programmiertem Zelltod beteiligt sind (Abb. 2.6). Ein humanes Homolog von CES-2 ist der transkriptionale Repressor HLF (HLF, human leukemia factor) (Inaba *et al.*, 1992). In Patienten mit einer chromosomalen Translokation bildet HLF mit der Aktivierungsdomäne des Transkriptionsfaktors E2A ein onkogenes Fusionsprotein. Der neu erschaffene Aktivator E2A-HLF blockiert programmierten Zelltod in pro-B-Zellen, wahrscheinlich durch die Aktivierung eines anti-apoptischen Faktors, und verursacht deren leukemische Transformation (Inaba *et al.*, 1996). Der postulierte anti-apoptische Faktor ist das humane Gen *SLUG* (Inukai *et al.*, 1999). Ebenso wie *ces-1* codiert es ein Transkriptionsfaktor der Snail-Proteinfamilie. Aufgrund dieser Ergebnisse nimmt man an, dass die Überexpression von *SLUG* durch E2A-HLF programmierten Zelltod in pro-B-Zellen blockiert und folglich lymphatische Leukämie verursacht.

## 2.4 Zielsetzung der Arbeit

Da Snail-Proteine überwiegend als transkriptionale Repressoren agieren (Hemavathy *et al.*, 2000a), wird das Schicksal der NSM-Schwesterzellen in *ces-1(gf)*-Tieren wahrscheinlich durch die transkriptionale Repression eines pro-apoptischen Gens kontrolliert und die NSM-Schwesterzellen überleben. Da das Zelltodaktivator-Gen *egl-1* genetisch nach *ces-1* wirkt (Conradt und Horvitz, 1998), ist es ein geeigneter Kandidat, in den NSM-Schwesterzellen auf transkriptionaler Ebene von CES-1 reguliert zu werden. Das Ziel dieser Arbeit war, zu analysieren, ob die *egl-1*-Transkription in den NSM-Schwesterzellen durch CES-1 direkt reguliert wird und ob weitere Faktoren für das Schicksal der NSM-Schwesterzellen von Bedeutung sind. Um die Identifizierung der NSM-Zellen und ihrer Schwesterzellen zu vereinfachen, und damit für die erforderlichen Experimente eine schnelle Erkennung der zu untersuchenden Zellen zu ermöglichen, sollte ein NSM-Reporter eingeführt

werden. Präzise Analysen des *egl-1*-Lokus sollten zeigen, ob definierte Regionen für den programmierten Zelltod der NSM-Schwesterzellen erforderlich sind. *In vivo*, mit Hilfe von Antikörpern, und *in vitro*, mit Hilfe von Gelretardierungsexperimenten, sollte gezeigt werden, ob CES-1 Sequenzen im *egl-1*-Lokus bindet. Diese molekularbiologischen Untersuchungen sollten durch genetische Analysen unterstützt werden.

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Materialien

#### 3.1.1 Chemikalien

<u>Chemikalie</u>	<u>Hersteller</u>
1,4-Dithiothreit (DTT)	Sigma
2-Mercaptoethanol	Sigma
2-Natriumhydrogenphosphat	Merck
2-Propanol	Merck
4',6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI)	Serva
5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- $\beta$ -D-Galaktosidase (X-Gal)	Roth
Acrylamid	Bio-Rad
Agar	Difco
Agarose NEEO	Roth
Ammoniumchlorid	Merck
Ampicillin	Fisher Scientific
Borsäure	Merck
Bovine Serum Albumin (BSA)	Sigma
Calciumchlorid Dihydrat	Sigma
Chloroform	Sigma
Cholesterol	Sigma
Coomassie Brilliant Blue R-250	GIBCO BRL
CrK(SO <sub>4</sub> )x2 12H <sub>2</sub> O (C-5926)	Sigma
Dimethylsulfat (DMSO)	Merck
Dimethylsulfoxid (DMF)	Merck
ddNTPs	GIBCO BRL
ECL-Entwicklerlösung	Amersham
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Sigma
Ethylenglyko-bis-(2-aminoyl)-tetraessigsäure(EGTA)	Sigma
Essigsäure (Eisessig)	Merck
Ethanol absolut	Riedel-de Haen
Ethidiumbromid	Sigma
Ethylmethansulfonat (EMS)	Sigma
Gelatine	Sigma
Glyzerin	Calbiochem
Glyzin	Merck
Halocarbonöl 700	Sigma
Hefe-Extract	Difco
HEPES	Roth
IGEPAL CA-360 (NP40-Ersatz)	Sigma
Imidazol	Qiagen
IPTG	Roth
Kaliumchlorid	Merck
Kaliumzitrat	Merck
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck
Kaliumhydroxid	Merck
Kanamycin	Fisher Scientific

<b><u>Chemikalie</u></b>	<b><u>Hersteller</u></b>
Lithiumacetat	Merck
Magnesiumchlorid Hexahydrat	Merck
Magnesiumsulfat Hexahydrat	Merck
Methanol	Merck
Milchpulver	Neuform
Mineralöl	Sigma
N-[2-Hydroxyethyl]piperazin-N´-[2-ethansulfonsäure] (HEPES)	Merck
Natriumazid	Merck
Natriumchlorid	Merck
Natriumdihydrogenphosphat Monohydrat	Merck
Natriumhydroxid	Merck
Natriumhypochlorid	Roth
Para-aminobenzolsäure (PABA)	Sigma
Paraformaldehyd (PFA)	Merck
Phenol	Eurobio
POLY(dI-dC):POLY(dI-dC)	Amersham
Polyethylenglykol	Sigma
PolyL-Lysin (P1524)	Sigma
Polyvinylpyrrolidon (PVP)	Bio Rad
Saccharose	Merck
SDS/Natriumlaurylsulfat	Roth
Spermidin	Sigma
N,N,N´,N´-Tetramethyldiamin (TEMED)	Eurobio
Tris-Base	Riedel-de Haen
Triton X 100	Roth
Trypton	Difco
Tween 20	Sigma
Xylene Cyanol	Fisher Scientific

### 3.1.2 Geräte

<b><u>Geräte</u></b>	<b><u>Hersteller</u></b>
CCD Kamera	Visitron
Fluoreszenz- und Durchlichtmikroskop, Axioskop 2, Axiovert S100	Carl Zeiss
Helios Gene Gun	Bio Rad
Mikromanipulator	Carl Zeiss
Mini Trans Blot	Bio Rad
Olympus-Stereomikroskop mit Auflichtfluoreszenzeinrichtung	Micro-Optic
Stereomikroskop MS5	Leica
Transjector 5246 basic	Eppendorf
Ultraschallgerät Sonifier W-450	Branson

### 3.1.3 Verbrauchsmaterial

<b><u>Verbrauchsmittel</u></b>	<b><u>Hersteller</u></b>
Deckgläser	Roth
Filter Papier Ø 82 mm	Schleicher und Schuell
GB002 Blotting Papier	Schleicher und Schuell
Gel Drying Kit	Promega

**Verbrauchsmittel**

Goldpartikel 1.0 Mikron  
 Kapillaren für Mikroinjektionen  
 Kodak X-Omat AR-5-film  
 Platindraht 0.25mm  
 Slide-A-Lyzer Dialysis Cassette Kit  
 PVDF-Membran (0.2 µm)

**Hersteller**

Bio Rad  
 World Precision Instruments  
 INTEGRA  
 Sigma  
 PIERCE  
 Schleicher und Schuell

**3.1.4 Enzyme, Antikörper und Standard****Enzyme**

Restriktionsenzyme  
*T4*-DNA-Ligase  
 Alkaline Phosphatase  
*Taq*-Polymerase  
 Herculase  
 Native *Pfu*-Polymerase  
*Pfu-Turbo* DNA Polymerase  
 Lysozym  
 RNase  
 Proteinase K  
 Protease-Inhibitoren

**Hersteller**

New England BioLabs  
 New England BioLabs  
 New England BioLabs  
 Promega  
 Stratagene  
 Stratagene  
 Stratagene  
 Fisher Scientific  
 Boehringer Mannheim  
 Boehringer Mannheim  
 Boehringer Mannheim

**Antikörper**

Kaninchen anti-CES-1 (94-105 AFF)  
 Kaninchen anti-CES-1-Peptid 1  
 (NH<sub>2</sub>-QKVPKLELENDEDVS-CONH<sub>2</sub>) (P1K)  
 Kaninchen anti-CES-1-Peptid 2  
 (NH<sub>2</sub>-LDSLQNLDRRSLNKK-CONH<sub>2</sub>) (P2K)  
 Meerschweinchen anti-CES-1-Peptid 1  
 (NH<sub>2</sub>-QKVPKLELENDEDVS-CONH<sub>2</sub>) (P1M)  
 Meerschweinchen anti-CES-1-Peptid 2  
 (NH<sub>2</sub>-LDSLQNLDRRSLNKK-CONH<sub>2</sub>) (P2M)  
 Maus anti-GFP  
 Ziege anti-Maus IgG FITC-Konjugate  
 Ziege anti-Kaninchen IgG-Texas Red-Konjugate  
 Ziege anti-Kaninchen IgG HRP-Konjugate  
 Ziege anti-Maus IgG HRP-Konjugate  
 Ziege anti-Kaninchen IgG Cy<sup>TM</sup>3-Konjugate  
 Esel anti-Meerschweinchen IgG Cy<sup>TM</sup>3-Konjugate

**Referenz**

(M. Metzstein, pers. Mitteilung)  
 Pineda  
 Pineda  
 Pineda  
 Pineda  
 Clontech  
 Dianova  
 Dianova  
 Bio Rad  
 Bio Rad  
 Dianova  
 Dianova

**Standards**

DNA-Standard 1kb DNA Ladder  
 Kaleidoscope Prestained Standard  
 Prestained SDS-PAGE Standards Broad Range

**Hersteller**

Gibco BRL  
 Bio Rad  
 Bio Rad

### 3.1.5 Kits

<u>Kit</u>	<u>Hersteller</u>
Plasmid Midi Kit	Qiagen
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen
Bio-Rad Protein Assay	Bio Rad
TNT T7 System	Promega

### 3.1.6 Oligonukleotide

Oligonukleotide wurden mit dem Programm Vector NTI erstellt und von der Firma Metabion bezogen.

<u>Bezeichnung</u>	<u>Sequenz (5'-3')</u>
<i>sense pegl-mut1</i>	gttactcaaccatataatgccaacacaatg
<i>antisense pegl-mut1</i>	cattgtgtggcatatagggtgagtaac
<i>sense pegl-mut2</i>	caaatgattagcatatattctggtctcgc
<i>antisense pegl-mut2</i>	gcgagaccagaaatataatgctaatcattg
<i>sense snail-mut</i>	tagtggatcctaataatgagaattcgat
<i>antisense snail-mut</i>	atcgaattctgcatatattaggatccacta
<i>pGEX seq. primer</i>	gggctggcaagccacggttggtg
<i>sense pegl-1/1</i>	tgtcaatattatggttactcaacc
<i>antisense pegl-1/1</i>	ccacaaatcacacaagtgttaa
<i>sense pegl-1/2</i>	ttgtccactcgttaccaca
<i>antisense pegl-1/2</i>	aatcttccaacaggacatcc
<i>CITE primer 1</i>	ggggacgtggttttccttg
<i>sense pegl-mut1E</i>	gttactcaaccatataatgccaacacaatg
<i>antisense pegl-mut1E</i>	cattgtgtggcatatagggtgagtaac
<i>sense pegl-mut2E</i>	caaatgattagcatatggttctggtctcgc
<i>antisense pegl-mut2E</i>	gcgagaccagaaacataatgctaatcattg
<i>sense pegl-mut3</i>	aagattgagttcatatattgtaattcatga
<i>antisense pegl-mut3</i>	tcatgaattacaataatgaactcaatctt
<i>sense pegl-mut 4</i>	agaatgacttacatataagggtggaggatt
<i>antisense pegl-mut4</i>	aatcctccacacctatataagtcattct
<i>CES-1tripF</i>	aattcatcgaAcaggtggccacaggtgtagcaggtgg
<i>CES-1tripR</i>	tcGaccacctgtaaacctgtggccacctgTatcga
<i>148rHpaI</i>	ctttctgaagtaactttactataa
<i>148rPstI</i>	cgggctgcagcatttcttctaat
<i>mut3s</i>	agattgagttcatatattgtaattc
<i>mut3as</i>	gaattacaataatgaactcaatct
<i>sense pegl-mut3E</i>	aagattgagttcatatggtgtaattcatga
<i>antisense pegl-mut3E</i>	tcatgaattacaacataatgaactcaatctt
<i>sense pegl-mut 4E</i>	agaatgacttacatataagggtggaggatt
<i>antisense pegl-mut4E</i>	aatcctccacacctatataagtcattct
<i>sense pegl-1/3</i>	ggatgtcctgttggagatt
<i>CES-1tripFmut</i>	aattcatcgatacatatagccacataatagcatatag
<i>CES-1tripRmut</i>	tcgactatataatataatggtgctatataatgatcga
<i>antisense pegl-1/3</i>	aactcatccacgtcaccaaa
<i>M13/Rev</i>	caggaaacagctatgacctg
<i>M13/20</i>	gtaaaacgacggccagtgagc

### 3.1.7 Vektoren und Plasmide

#### Vektoren

<u>Vektor</u>	<u>Referenz</u>	<u>Verwendung</u>
pBS KSII+	Clontech	Klonierungen
pCITE4a(+)	Promega	<i>In vivo</i> -Transkription und Translation von CES-1
pGAD424	Clontech	“Yeast one-hybrid“-System
pGAD-C1	Clontech	“Yeast one-hybrid“-System
pGEX-4T3	Pharmacia	Expression des GST-CES-1 Fusionsproteins
pLacZi	Clontech	“Yeast one-hybrid“-System

#### Konstruierte Plasmide

<u>Name</u>	<u>Vektor</u>	<u>Klonierung / Herkunft</u>
pBC116	pCITE4a(+)	<i>ces-1</i> cDNA ( <i>NheI/EcoRV</i> -Fragment) aus pMM#44 in pCITE4a(+) ( <i>HincII</i> ) kloniert
pBC117	pBS KSII+	Region B aus pBC08 amplifiziert (Primer <i>sense</i> und <i>antisense pegl-1/1</i> ), in pBS KSII+ ( <i>EcoRV</i> ) kloniert
pBC118	pGEX-4T3	<i>ces-1</i> Zinkfinger cDNA ( <i>ApoI/EcoRV</i> -Fragment) aus pMM#44 in pGEX-4T3 kloniert
pBC120	pBS KSII+	PCR-Mutagenese mit pMM#63 (Primer <i>sense</i> und <i>antisense Snail-mut</i> ); Snail-BS: <u>CATATA</u>
pBC121	pBS KSII+	PCR-Mutagenese mit pBC117 (Primer <i>sense</i> und <i>antisense pegl-mut1</i> ); Snail-BS I: <u>CATATA</u>
pBC122	pBS KSII+	PCR-Mutagenese mit pBC121 (Primer <i>sense</i> und <i>antisense pegl-mut2</i> ); Snail-BS I, II: <u>CATATA</u>
pBC144	pBS KSII+	PCR-Mutagenese mit pBC117 (Primer <i>sense</i> und <i>antisense pegl-mut1E</i> ); Snail-BS I: <u>CATATG</u>
pBC145	pBS KSII+	PCR-Mutagenese mit pBC144 (Primer <i>sense</i> und <i>antisense pegl-mutE2</i> ); Snail-BS I, II: <u>CATATG</u>
pBC149	pBS KSII+	Region B aus pBC08 ( <i>BsrGI/NdeI</i> -Fragment) in pBC11 ( <i>Clai</i> ) kloniert
pBC150	pBS KSII+	PCR-Mutagenese mit pBC148 (Primer <i>sense</i> und <i>antisense pegl-mut1</i> ); Snail-BS I: <u>CATATA</u>
pBC156	pBS KSII+	PCR-Mutagenese mit pBC150 (Primer <i>sense</i> und <i>antisense pegl-mut2</i> ); Snail-BS I, II: <u>CATATA</u>
pBC170	pBS KSII+	PCR-Mutagenese mit pBC122 (Primer <i>sense</i> und <i>antisense pegl-mut4</i> ); Snail-BS I, II, IV: <u>CATATA</u>
pBC171	pBS KSII+	PCR-Mutagenese mit pBC156 (Primer <i>sense</i> und <i>antisense pegl-mut4</i> ); Snail-BS I, II, IV: <u>CATATA</u>
pBC172	pBS KSII+	PCR-Mutagenese mit pBC148 (Primer <i>sense</i> und <i>antisense pegl-mut1E</i> ); Snail-BS I: <u>CATATG</u>
pBC173	pGAD-C1	<i>ces-1</i> cDNA ( <i>EcoRI/BglII</i> -Fragment) aus pBC116 in pGAD-C1
pBC174	pLacZi	Region B aus pBC08 amplifiziert (Primer <i>sense pegl-1/1</i> und <i>antisense pegl-1/1</i> ), in pLacZi ( <i>SmaI</i> )
pBC176	pBS KSII+	PCR-Mutagenese mit pBC172 (Primer <i>sense</i> und <i>antisense pegl-mutE2</i> ); Snail-BS I, II: <u>CATATG</u>

<u>Name</u>	<u>Vektor</u>	<u>Klonierung / Herkunft</u>
pBC177	pBS KSII+	PCR-Mutagenese mit pBC171 (Primer <i>sense</i> und <i>antisense pegl-mut3</i> ); Snail-BS I, II, III, IV: <u>CATATA</u>
pBC178	pBS KSII+	PCR-Mutagenese mit pBC176 (Primer <i>sense</i> und <i>antisense pegl-mutE4</i> ); Snail-BS I, II, IV: <u>CATATG</u>
pBC179	pLacZi	Region B mit mutierten Snail-Bindestellen aus pBC177 amplifiziert (Primer <i>sense pegl-1/2</i> und <i>antisense pegl-1/1</i> ), in pLacZi ( <i>SmaI</i> )
pBC180	pBS KSII+	PCR-Mutagenese mit pBC178 (Primer <i>sense</i> und <i>antisense pegl-mut3E</i> ); Snail-BS I, II, III, IV: <u>CATATG</u>
pBC181	pBS KSII+	<i>egl-1</i> -Lokus ( <i>HpaI/PstI</i> -Fragment) aus pBC177 in pBC08 ersetzt; Snail-BS I, II, III, IV: <u>CATATA</u>
pBC182	pBS KSII+	<i>egl-1</i> -Lokus ( <i>HpaI/PstI</i> -Fragment) aus pBC180 in pBC08 ersetzt; Snail-BS I, II, III, IV: <u>CATATG</u>
pBC185	pLacZi	<i>EcoRI/SalI</i> -Fragment mit drei Snail-BS aus den Oligonukleotiden <i>CES-ItripF</i> und <i>CES-ItripR</i> amplifiziert, in pLacZi kloniert
pBC186	pLacZi	302 bp-Fragment der Region B mit den Snail-BS I und II aus pBC08 amplifiziert (Oligonukleotide <i>sense pegl-1/2</i> und <i>antisense pegl-1/2</i> ), in pLacZi ( <i>SmaI</i> )
pBC187	pLacZi	163 bp-Fragment der Region B mit den Snail-BS III und IV aus pBC08 amplifiziert (Oligonukleotide <i>sense pegl-1/2</i> und <i>antisense pegl-1/2</i> ), in pLacZi ( <i>SmaI</i> )
pBC195	pLacZi	<i>EcoRI/SalI</i> -Fragment mit drei mutierten Snail-BS <u>CATATA</u> aus den Oligonukleotiden <i>CES-ItripFmut</i> und <i>CES-ItripRmut</i> amplifiziert, in pLacZi kloniert
pBC232	pGAD424	<i>ces-1</i> Zink-Finger cDNA ( <i>HindIII/EcoRV</i> -Fragment) aus pMM#44 in pGAD424 kloniert

#### Weitere verwendete Plasmide

<u>Name</u>	<u>Referenz</u>	<u>Eigenschaften</u>
pMM#44	(Metzstein und Horvitz, 1999)	<i>ces-1</i> cDNA
pMM#63	(Metzstein und Horvitz, 1999)	Konsensus Snail-BS
pMM#101	(Metzstein und Horvitz, 1999)	<i>ces-1</i> -Promotor
pSC38	(S. Cameron, pers. Mitteilung)	<i>egl-1</i> -Promotor
pSV-dhfr 8.32	(Carmi <i>et al.</i> , 1998)	32 <i>lacO</i> -Sequenzen
pHS/49.78:: <i>GFP-lacI</i>	(Carmi <i>et al.</i> , 1998)	<i>Phsp16-2::lacI-GFP</i>
pL15EK	(Ferguson und Horvitz, 1989)	<i>lin-15(+)</i>
pRF4	(Kramer <i>et al.</i> , 1990)	<i>rol-6(su1006dm)</i>
pBY668	(Rohrig <i>et al.</i> , 2000)	<i>Ptph-1::gfp</i> -Reporter
pTRB201	(G. Aspoeck, pers. Mitteilung)	<i>Pceh-2 gfp</i> -Reporter
pBC08A	(Conradt und Horvitz, 1998)	<i>egl-1</i> -Lokus (7.7 kb)
pBC11	(B. Conradt, pers. Mitteilung)	<i>egl-1</i> -Lokus (2.5 kb-Fragment)
pBC13	(B. Conradt, pers. Mitteilung)	<i>egl-1</i> -Lokus (2.9 kb-Fragment)
pBC119	(B. Conradt, pers. Mitteilung)	<i>egl-1</i> -Lokus (5.5 kb-Fragment)



<u>Name</u>	<u>Referenz</u>	<u>Eigenschaften</u>
pBC148	(P. Grote, pers. Mitteilung)	<i>PstI/XhoI</i> -Fragment des <i>egl-1</i> -Lokus in pBS KSII+
pBC165	(C. Huber, pers. Mitteilung)	<i>egl-1</i> -Lokus ohne Region B
pBC224	(P. Grote, pers. Mitteilung)	<i>egl-1</i> -Lokus und <i>unc-119(+)</i>

### 3.1.8 Bakterienstämme

<u>Stamm</u>	<u>Genotyp</u>	<u>Firma / Referenz</u>
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	B F <sup>-</sup> , <i>dcm</i> , <i>ompT</i> , <i>hsdS</i> ( <sub>r<sub>B</sub></sub> - <sub>m<sub>B</sub></sub> -), <i>gal l</i> (DE3)	Stratagene
<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$	F <sup>-</sup> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>hsdR17</i> ( <i>r<sub>K</sub></i> - <i>m<sub>K+</sub></i> ), <i>supE44</i> , <i>relA1</i> , $\phi$ 80d <i>lacZ</i> $\Delta$ M15, $\Delta$ ( <i>lacZYA-argF</i> ), U169	(Hanahan, 1985)
<i>E. coli</i> OP-50	<i>ura</i> <sup>-</sup>	(Brenner, 1974)
<i>E. coli</i> STBL2	F <sup>-</sup> , <i>mcrA</i> , $\Delta$ ( <i>mcrBC-hsdRMS-mrr</i> ), <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>lon</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>supE44</i> , <i>relA1</i> , $\lambda$ <sup>-</sup> , $\Delta$ ( <i>lac-proAB</i> )	Gibco BRL

### 3.1.9 Hefestämme

<u>Stamm</u>	<u>Genotyp</u>	<u>Firma / Referenz</u>
YM4217	<i>MAT<math>\alpha</math></i> , <i>ura3-52</i> , <i>his3-200</i> , <i>ade2-101</i> , <i>lys2-801</i> , <i>leu2-3</i> , <i>112</i> , <i>trp1-901</i> , <i>tyr1-501</i> , <i>gal4-<math>\Delta</math>512</i> , <i>gal80-<math>\Delta</math>538</i> , <i>ade5::hisG</i>	Clontech

### Konstruierte Hefestämme

<u>Stamm</u>	<u>Eigenschaft</u>
YM174	Plasmid pBC174 im Genom von YM4217 integriert
YM179	Plasmid pBC179 im Genom von YM4217 integriert
YM185	Plasmid pBC185 im Genom von YM4217 integriert
YM186	Plasmid pBC186 im Genom von YM4217 integriert
YM187	Plasmid pBC187 im Genom von YM4217 integriert
YM195	Plasmid pBC195 im Genom von YM4217 integriert

### 3.1.10 *C. elegans* Stämme

Alle *C. elegans* Stämme wurden entweder vom „*C. elegans* Genetic Center“ an der Universität von Minnesota (USA), bezogen, oder von dem Labor, das die Stämme generiert hatte, erhalten. Als Wildtyp-Stamm wurde N2 *var. Bristol* verwendet.

### Verwendete *C. elegans*-Stämme

<u>Stamm</u>	<u>Genotyp</u>	<u>Referenz / Bezugsquelle</u>
CB193	<i>unc-29(e193) I</i>	(Brenner, 1974)
CB2223	<i>dpy-20(e1282ts) unc-5(e53) IV</i>	(J. Hodgkin, pers. Mitteilung)
CB2306	<i>unc-30(e191) dpy-4(e1166sd) IV</i>	(J. Hodgkin, pers. Mitteilung)
MD420	<i>egl-1(n1084n3082) unc-76(e911) V; lin-</i>	(B. Conradt, pers. Mitteilung)

<b><u>Stamm</u></b>	<b><u>Genotyp</u></b>	<b><u>Referenz / Bezugsquelle</u></b>
MD645	<i>15(n765ts) bcIs24[lin-15(+), ptph-1::GFP] X unc-119(ed4) III; egl-1(n1084n3082) V; bcIs9[ppdk::GFP, lin-15(+)] lin-15(n765ts) X</i>	(P. Grote, pers. Mitteilung)
MT1506	<i>ces-1(n703sd) I</i>	(Ellis und Horvitz, 1991)
MT1642	<i>lin-15(n765ts) X</i>	(Ferguson und Horvitz, 1989)
MT2867	<i>unc-36(e251) III; unc-5(e53) IV; dpy-11(e224) V; lon-2(e678) lin-15(n765ts) X</i>	(B. Horvitz, pers. Mitteilung)
MT4557	<i>dpy-5(e61) I; unc-4(e120) II; lin-15(n765ts) X</i>	(B. Horvitz, pers. Mitteilung)
MT5044	<i>ces-2(n732ts) I</i>	(Ellis und Horvitz, 1991)
MT5053	<i>ces-3(n1952) IV</i>	(Ellis und Horvitz, 1991)
MT8738	<i>egl-1(n1084n3082) unc-76(e911) V</i>	(B. Conradt, pers. Mitteilung)
MT9830	<i>unc-36(e251) III; dpy-20(e1282ts) IV; lin-15(n765ts) X</i>	(B. Horvitz, pers. Mitteilung)

### In dieser Arbeit konstruierte *C. elegans*-Stämme

<b><u>Stamm</u></b>	<b><u>Genotyp</u></b>
MD169	<i>lin-15(n765ts) X; bcEx113[lin-15(+), ptph-1::GFP]</i>
MD170	<i>lin-15(n765ts) X; bcEx114[lin-15(+), ptph-1::GFP]</i>
MD185	<i>lin-15(n765ts) X; bcEx115[lin-15(+), pegl-1, lacI-GFP; lacO]</i>
MD189	<i>lin-15(n765ts) X; bcEx116[lin-15(+), pegl-1, lacI-GFP; lacO]</i>
MD193	<i>lin-15(n765ts) X; bcEx117[lin-15(+), pegl-1, lacI-GFP; lacO]</i>
MD386	<i>rol-6(su1006dm) II; bcEx154[rol-6 (+), pegl-1, lacI-GFP; lacO]</i>
MD387	<i>rol-6(su1006dm) II; bcEx155[rol-6 (+), pegl-1, lacI-GFP; lacO]</i>
MD388	<i>rol-6(su1006dm) II; bcEx156[rol-6 (+), pegl-1, lacI-GFP; lacO]</i>
MD389	<i>rol-6(su1006dm) II; bcEx157[rol-6 (+), pegl-1, lacI-GFP; lacO]</i>
MD390	<i>rol-6(su1006dm) II; bcEx158[rol-6 (+), pegl-1, lacI-GFP; lacO]</i>
MD391	<i>rol-6(su1006dm) II; bcEx159[rol-6 (+), pegl-1, lacI-GFP; lacO]</i>
MD343	<i>lin-15(n765ts) X; bcIs21[lin-15(+), ptph-1::GFP] III</i>
MD401	<i>lin-15(n765ts) X; bcIs22[lin-15(+), ptph-1::GFP] IV</i>
MD402	<i>lin-15(n765ts) bcIs23[lin-15(+), ptph-1::GFP] X</i>
MD403	<i>lin-15(n765ts) bcIs24[lin-15(+), ptph-1::GFP] X</i>
MD410	<i>lin-15(n765ts) X; bcIs25[lin-15(+), ptph-1::GFP]</i>
MD409	<i>lin-15(n765ts) X; bcIs26[lin-15(+), ptph-1::GFP]</i>
MD408	<i>lin-15(n765ts) X; bcIs27[lin-15(+), ptph-1::GFP]</i>
MD407	<i>lin-15(n765ts) bcIs28[lin-15(+), ptph-1::GFP] X</i>
MD406	<i>lin-15(n765ts) X; bcIs29[lin-15(+), ptph-1::GFP]</i>
MD405	<i>lin-15(n765ts) bcIs30[lin-15(+), ptph-1::GFP] X</i>
MD404	<i>lin-15(n765ts) X; bcIs31[lin-15(+), ptph-1::GFP]</i>
MD421	<i>bcIs22[lin-15(+), ptph-1::GFP] IV</i>
MD422	<i>bcIs25[lin-15(+), ptph-1::GFP] IV</i>
MD436	<i>lin-15(n765ts) bcIs30[lin-15(+), ptph-1::GFP] X</i>
MD447	<i>ces-1(n703sd) I; lin-15(n765ts) bcIs30[lin-15(+), ptph-1::GFP] X</i>
MD448	<i>ces-2(n732ts) I; lin-15(n765ts) bcIs30[lin-15(+), ptph-1::GFP] X</i>
MD449	<i>egl-1(n1084n3082) unc-76(e911) V; lin-15(n765ts) bcIs24[lin-15(+), ptph-1::GFP] X; bcEx167[pBC08]</i>
MD450	<i>egl-1(n1084n3082) unc-76(e911) V; lin-15(n765ts)bcIs24[lin-15(+), ptph-1::GFP] X; bcEx168[pBC08]</i>

<b>Stamm</b>	<b>Genotyp</b>
MD451	<i>egl-1(n1084n3082) unc-76(e911) V; lin-15(n765ts) bcIs24[lin-15(+), ptph-1::GFP] X; bcEx169[pBC119]</i>
MD452	<i>egl-1(n1084n3082) unc-76(e911) V; lin-15(n765ts) bcIs24[lin-15(+), ptph-1::GFP] X; bcEx170[pBC119]</i>
MD453	<i>egl-1(n1084n3082) unc-76(e911) V; lin-15(n765ts) bcIs24[lin-15(+), ptph-1::GFP] X; bcEx171[pBC13]</i>
MD454	<i>egl-1(n1084n3082) unc-76(e911) V; lin-15(n765ts) bcIs24[lin-15(+), ptph-1::GFP] X; bcEx172[pBC13]</i>
MD465	<i>unc-4(e120) II; bcIs25[lin-15(+), ptph-1::GFP] IV</i>
MD466	<i>dpy-20(e1282ts) bcIs25[lin-15(+), ptph-1::GFP] IV</i>
MD467	<i>bcIs25[lin-15(+), ptph-1::GFP] IV; lon-2(e678) lin-15(n765ts) X</i>
MD468	<i>dpy-5(e61) I; bcIs25[lin-15(+), ptph-1::GFP] IV</i>
MD469	<i>bcIs25[lin-15(+), ptph-1::GFP] IV; dpy-11(e224) V</i>
MD470	<i>unc-36(e251) III; bcIs25[lin-15(+), ptph-1::GFP] IV</i>
MD471	<i>unc-4(e120) II; bcIs21[lin-15(+), ptph-1::GFP] III; lin-15(n765ts) X</i>
MD472	<i>bcIs21[lin-15(+), ptph-1::GFP] III; dpy-11(e224) V; lin-15(n765ts) X</i>
MD473	<i>bcIs21[lin-15(+), ptph-1::GFP] III; dpy-20(e1282ts) IV; lin-15(n765ts) X</i>
MD474	<i>dpy-5(e61) I; bcIs21[lin-15(+), ptph-1::GFP] III; lin-15(n765ts) X</i>
MD475	<i>bcIs21[lin-15(+), ptph-1::GFP] III; lon-2(e678) lin-15(n765ts) X</i>
MD480	<i>egl-1(n1084n3082) unc-76(e911) V; lin-15(n765ts) bcIs24[lin-15(+), ptph-1::GFP] X; bcEx173[pBC11]</i>
MD481	<i>egl-1(n1084n3082) unc-76(e911) V; lin-15(n765ts) bcIs24[lin-15(+), ptph-1::GFP] X; bcEx174 [pBC11]</i>
MD493	<i>bcIs21[lin-15(+), ptph-1::GFP] III</i>
MD494	<i>ces-1(n703sd) I; bcIs25[lin-15(+), ptph-1::GFP] IV</i>
MD497	<i>ces-2(n732ts) I; bcIs25[lin-15(+), ptph-1::GFP] IV</i>
MD498	<i>unc-30(e191) bcIs25[lin-15(+), ptph-1::GFP] IV</i>
MD507	<i>dpy-4(e1166sd) bcIs25[lin-15(+), ptph-1::GFP] IV</i>
MD525	<i>ces-1(n703sd) I; bcIs25[lin-15(+), ptph-1::GFP] IV ; bcEx188[pBC117]</i>
MD526	<i>ces-1(n703sd) I; bcIs25[lin-15(+), ptph-1::GFP] IV; bcEx189[ pBC117]</i>
MD529	<i>ces-3(n1952) IV; lin-15(n765ts) bcIs30[lin-15(+), ptph-1::GFP] X</i>
MD535	<i>egl-1(n1084n3082) unc-76(e911) V; lin-15(n765ts) bcIs24[lin-15(+), ptph-1::GFP] X; bcEx190[pBC149]</i>
MD536	<i>egl-1(n1084n3082) unc-76(e911) V; lin-15(n765ts) bcIs24[lin-15(+), ptph-1::GFP] X; bcEx191[pBC149]</i>
MD615	<i>egl-1(n1084n3082) unc-76(e911) V; lin-15(n765ts) bcIs24[lin-15(+), ptph-1::GFP] X; bcEx194[pBC165]</i>
MD616	<i>egl-1(n1084n3082) unc-76(e911) V; lin-15(n765ts) bcIs24 X; bcEx195 [pBC165]</i>
MD618	<i>ces-1(n703sd) I; bcIs25[lin-15(+), ptph-1::GFP] IV; bcEx197[ceh-2::GFP]</i>
MD697	<i>egl-1(n1084n3082) unc-76(e911) V; lin-15(n765ts) bcIs24[lin-15(+), ptph-1::GFP] X; bcEx202[pBC181]</i>
MD696	<i>egl-1(n1084n3082) unc-76(e911) V; lin-15(n765ts) bcIs24[lin-15(+), ptph-1::GFP] X; bcEx201[pBC181]</i>
MD695	<i>egl-1(n1084n3082) unc-76(e911) V; lin-15(n765ts) bcIs24[lin-15(+), ptph-1::GFP] X; bcEx200[pBC181]</i>
MD709	<i>egl-1(n1084n3082) unc-76(e911) V; lin-15(n765ts) bcIs24[lin-15(+), ptph-1::GFP] X; bcEx203[pBC181]</i>

<b>Stamm</b>	<b>Genotyp</b>
MD710	<i>egl-1(n1084n3082) unc-76(e911) V; lin-15(n765ts) bcIs24[lin-15(+), ptph-1::GFP] X; bcEx204[pBC182]</i>
MD711	<i>egl-1(n1084n3082) unc-76(e911) V; lin-15(n765ts) bcIs24[lin-15(+), ptph-1::GFP] X; bcEx205[pBC182]</i>
MD712	<i>egl-1(n1084n3082) unc-76(e911) V; lin-15(n765ts) bcIs24[lin-15(+), ptph-1::GFP] X; bcEx206[pBC182]</i>
MD726	<i>unc-119(ed4) III; bcIs25[lin-15(+), ptph-1::GFP] IV; egl-1(n1084n3082) V</i>
MD740	<i>ces-2(n732ts) I; bcIs25[lin-15(+), ptph-1::GFP] IV; egl-1(n1084n3082) unc-76(e911) V</i>
MD770	<i>ces-2(n732ts) I; unc-119(ed4) III; bcIs25[lin-15(+), ptph-1::GFP] IV; egl-1(n1084n3082) V</i>
MD874	<i>egl-1(n1084n3082) unc-76(e911) V; lin-15(n765ts) bcIs24[lin-15(+), ptph-1::GFP] X; bcEx215[pBC08]</i>
MD882	<i>egl-1(n1084n3082) unc-76(e911) V; bcIs24[lin-15(+), ptph-1::GFP] X; bcEx216[pBC08]</i>
MD883	<i>ces-2(n732ts) I; bcIs25[lin-15(+), ptph-1::GFP] IV; egl-1(n1084n3082) unc-76(e911) V; bcEx217[pBC08]</i>
MD884	<i>ces-2(n732ts) I; bcIs25[lin-15(+), ptph-1::GFP] IV; egl-1(n1084n3082) unc-76(e911) V; bcEx218[pBC181]</i>
MD885	<i>ces-2(n732ts) I; bcIs25[lin-15(+), ptph-1::GFP] IV; egl-1(n1084n3082) unc-76(e911) V; bcEx219[pBC181]</i>
MD886	<i>ces-2(n732ts) I; bcIs25[lin-15(+), ptph-1::GFP] IV; egl-1(n1084n3082) unc-76(e911) V; bcEx220[pBC181]</i>
MD887	<i>unc-119(ed4) III; bcIs25[lin-15(+), ptph-1::GFP] IV; egl-1(n1084n3082) V; bcIs42[pMM051, pBC08]</i>
MD888	<i>unc-119(ed4) III; bcIs25[lin-15(+), ptph-1::GFP] IV; egl-1(n1084n3082) V; bcEx221[pMM051, pBC08]</i>
MD889	<i>unc-119(ed4) III; bcIs25[lin-15(+), ptph-1::GFP] IV; egl-1(n1084n3082) V; bcEx222[pMM051, pBC08]</i>
MD890	<i>unc-119(ed4) III; bcIs25[lin-15(+), ptph-1::GFP] IV; egl-1(n1084n3082) V; bcEx223[pMM051, pBC08]</i>
MD891	<i>unc-119(ed3) III; bcIs25[lin-15(+), ptph-1::GFP] IV; egl-1(n1084n3082) V; bcIs43[pMM051]</i>
MD892	<i>unc-119(ed3) III; bcIs25[lin-15(+), ptph-1::GFP] IV; egl-1(n1084n3082) V; bcIs44[pMM051]</i>
MD893	<i>unc-119(ed3) III; bcIs25[lin-15(+), ptph-1::GFP] IV; egl-1(n1084n3082) V; bcIs45[pMM051]</i>
MD920	<i>ces-2(n732ts) I; bcIs25[lin-15(+), ptph-1::GFP] IV; egl-1(n1084n3082) unc-76(e911) V; bcEx226[pBC08]</i>
MD921	<i>ces-2(n732ts) I; bcIs25[lin-15(+), ptph-1::GFP] IV; egl-1(n1084n3082) unc-76(e911) V; bcEx227[pBC08]</i>
MD923	<i>ces-2(n732ts) I; bcIs25[lin-15(+), ptph-1::GFP] IV; egl-1(n1084n3082) unc-76(e911) V; bcEx229[pBC182]</i>
MD924	<i>ces-2(n732ts) I; bcIs25[lin-15(+), ptph-1::GFP] IV; egl-1(n1084n3082) unc-76(e911) V; bcEx230[pBC182]</i>

### 3.1.11 Medien

#### Medien für Bakterien

##### LB-Medium

1 %	Bacto-Trypton	Antibiotikum:
0.5 %	Hefe-Extrakt	75 µg/ml Ampicillin bzw.
1 %	NaCl	50 µg/ml Kanamycin
	pH 7.5	

Dem LB-Medium wurde zur Verfestigung bei der Herstellung von Festmedien 17 g/l Agar zugesetzt.

##### B-Broth

1 %	Bacto-Trypton
0.5 %	NaCl

#### Medien für *S. cerevisiae*

##### YPD Medium

1 %	Hefe-Extrakt
2 %	Bactopepton
2 %	Glukose

##### 2x SC-Medium

1.24 g	Aminosäure-Mix
4.15 g	Yeast Nitrogen Base
300 ml	H <sub>2</sub> O
Zusätze nach dem Autoklavieren	
100x Ade:	40mM
100x Lys:	100 mM
200x His:	60 mM
100x Ura:	20 mM
60x Trp:	40 mM (sterilfiltriert)
40 %	Glukose (sterilfiltriert)

##### Aminosäure-Mix

jeweils 2 g:	
L-Ala, Arg, Asp,	
Asn, Cys, Gln, Gly,	
Met, Ile, Phe, Pro,	
Ser, Thr, Tyr, Val	
2 g	myo-Inositol
0.2 g	PABA

Den Grundmedien wurde zur Verfestigung bei der Herstellung von Festmedien 17 g/l Agar zugesetzt.

#### Medien für *C. elegans*

##### NGM-Medium

3 g/l	NaCl
2.5 g/l	Bacto-Pepton
17 g/l	Agar
nach dem Autoklavieren:	
1 ml/l	1 M CaCl <sub>2</sub>
1 ml/l	1 M MgSO <sub>4</sub>
1 ml/l	5 mg/ml Cholesterol in Ethanol
25 ml/l	1 M KPO <sub>4</sub> , pH 6.0

##### M9-Medium

5.8 g/l	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
3.0 g/l	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
0.5 g/l	NaCl
1 g/l	NH <sub>4</sub> Cl

## 3.2 Molekularbiologische Methoden

### 3.2.1 Isolierung von Plasmid-DNA

#### 3.2.1.1 STET-Lyse

Die Zellen einer 4 ml üN-Kultur wurden 4 min bei 13000 rpm sedimentiert. Das Zellpellet wurde in 200 µl STET-Puffer gelöst. Zur Suspension wurden 10 µl Lysozymbilösung (10 mg/ml) gegeben, gemischt und 1 min im Wasserbad gekocht. Nach 5 min Inkubation auf Eis, wurden die Zellen zentrifugiert (10 min, 13000 rpm) und das Sediment mit einem sterilen Zahnstocher entfernt. Zum Überstand wurden 200 µl Isopropanol gegeben und invertiert. Die DNA wurde 15 min bei 13000 rpm abzentrifugiert und anschließend mit eiskaltem 70 % und 100 % Ethanol gewaschen. Die Plasmid-DNA wurde in 30-50 µl TE-Puffer in 0.1 µg/ml RNase A aufgenommen.

<b>STET-Puffer</b>		<b>Lysozym</b>	<b>TE-Puffer</b>	
8 %	Saccharose	10 mg/ml	10 mM	Tris-HCl (pH 7.5)
5 %	Triton X-100		1 mM	EDTA (pH 8.0)
50 mM	EDTA			
50 mM	Tris-HCl (pH 8.0)			

#### 3.2.1.2 QIAgen Midi-Prep

Der Kit QIAgen Midi-Prep von Qiagen wurde verwendet, um größere Mengen Plasmid-DNA zu isolieren. Die DNA wurde nach Vorschrift des Herstellers gereinigt und deren Konzentration und Reinheit photometrisch bestimmt bzw. überprüft.

### 3.2.2 Reinigung und Fällung von DNA

#### 3.2.2.1 Ethanolfällung

Die DNA wurde durch Zugabe von 0.1 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 6.5) und 3 Volumen eiskaltem Ethanol gefällt. Nach Inkubation für 30 min bei  $-20^{\circ}\text{C}$  wurde das Pellet 30 min bei 13000 rpm abzentrifugiert. Das DNA-Pellet wurde mit 70 % Ethanol gewaschen, getrocknet und in sterilem Wasser oder in TE-Puffer gelöst.

#### 3.2.2.2 Phenol/Chloroformfällung

Mit dieser Methode wurden Proteine aus wässrigen DNA-Lösungen entfernt. Die DNA-Lösung wurde mit 1 Volumen TE gesättigtem Phenol gemischt und bei 13000 rpm abzentrifugiert. Der wässrige Überstand wurde mit Chloroform/Isomylalkohol

(24:1) extrahiert. Im Anschluss folgte eine Ethanolfällung der im Überstand vorhandenen DNA.

### 3.2.3 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Größen- und Konzentrationsabschätzung von DNA-Fragmenten sowie zur präparativen Auftrennung von Nukleinsäuren wurden Gelelektrophoresen durchgeführt (Sambrook *et al.*, 1989). Für Agarose-Gele wurde je nach Fragmentgröße eine Agarosekonzentration von 0.8 % bis 1.5 % in 1x TAE-Puffer verwendet. Nach dem Aufkochen und vor dem Gießen des Gels wurde Ethidiumbromid zugegeben. Als Laufpuffer diente 1x TAE, die angelegte Spannung lag bei 80–120 Volt. Die mit Ethidiumbromid gefärbte DNA wurde unter UV-Durchlicht sichtbar gemacht.

#### 20x TAE-Puffer

0.8 M	Tris-Base
0.4 M	Natriumacetat
25 mM	EDTA
	pH 8.5 (Essigsäure)

### 3.2.4 DNA-Isolierung aus Agarosegelen

Die DNA-Isolierung aus Agarosegelen wurde mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kits (Qiagen) nach Anleitung des Herstellers durchgeführt und mit 30-50 µl H<sub>2</sub>O eluiert.

### 3.2.5 Konzentration und Reinheitsbestimmung von DNA

Die Konzentration der Nukleinsäuren wurde, sofern in ausreichender Menge vorhanden, photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Dabei entspricht die Absorption bei 260 nm ( $A_{260}$ ) von 1.0 etwa 50 ng/µl DNA. Waren nur geringe Mengen an DNA vorhanden, wurde deren Konzentration durch Auftragung eines definierten Volumens auf einem Agarosegel, und Abschätzung der Konzentration im Vergleich zu verschiedenen DNA-Volumen mit bekannten Konzentrationen bestimmt.

### **3.2.6 Enzymatische Reaktionen mit DNA**

#### **3.2.6.1 Restriktionsspaltung von DNA**

Restriktionsspaltungen durch Endonukleasen wurden in einem Reaktionsvolumen von 20–50 µl und dem vom Hersteller (New England BioLabs) empfohlenen Puffersystem durchgeführt. Die Proben wurden bei der empfohlenen Temperatur 1 h bis üN inkubiert.

#### **3.2.6.2 Auffüllen von 5'-überhängenden DNA-Enden**

Liegen nach der Spaltung der DNA keine Ligations-kompatiblen Enden vor, so kann man 5'-überhängende Enden mit dem Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I zu glatten Enden auffüllen. Hierzu wurde der Restriktionsansatz nach Anleitung des Herstellers (New England BioLabs) etwa 15 min bei 25°C inkubiert.

#### **3.2.6.3 Dephosphorylierung von DNA-Enden**

Um die Rückligation eines linearisierten Vektors mit kompatiblen Enden zu verhindern, wurde die Phosphatgruppe an dessen 5'-Ende mit alkalischer Phosphatase (CIP) abgespalten. Hierzu wurde der Restriktionsansatz nach Anleitung des Herstellers (New England BioLabs) 1-2 h bei 37°C inkubiert.

#### **3.2.6.4 Ligation**

Sofern die Enden kompatibel sind, können DNA-Fragmente mit Hilfe der *T4*-DNA-Ligase kovalent verknüpft werden. Ligationen wurden in 20 µl Volumen nach Anleitung des Herstellers (New England BioLabs) durchgeführt. Der Ligationsansatz wurde bei RT 2-3 h oder bei 15°C üN inkubiert und anschließend wurde die DNA in Bakterien transformiert.

#### **3.2.6.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)**

Das Verfahren beruht auf der enzymatischen Vervielfältigung eines DNA-Fragments zwischen zwei, an Strang und Gegenstrang gebundenen DNA-Primern. Die Reaktionsfolge besteht aus wiederholter, hitzeinduzierter Strangtrennung der DNA, anschließender Primer-Hybridisierung und Polymerisierung. Durch die Verwendung von thermostabiler DNA-Polymerase (*Taq*, *Pfu*, etc.) wird das zu amplifizierende DNA-Fragment durch mehrfaches Erhitzen und Abkühlen der Ansätze vervielfältigt.



<b>50 µl PCR-Ansatz</b>		<b>Standard-PCR-Programm (25-30 Zyklen)</b>	
100 ng	DNA		2 min bei 95°C
50 µM	dNTP	Denaturierung	1 min bei 95°C
1 µM	„Primer sense“	Hybridisierung	1 min bei $T_m$
1 µM	„Primer antisense“	Polymerisierung	2 min bei 72°C
1x	Reaktionspuffer		2 min bei 72°C
0.5 - 1 µl	Polymerase (2.5 U/µl)		∞ 15°C

### 3.2.6.6 PCR-Mutagenese

Die PCR kann ebenfalls zur Einführung von Punktmutationen in DNA-Sequenzen verwendet werden. Für die sogenannte gerichtete Mutagenese wurden zwei zueinander komplementäre DNA-Oligonukleotide mit der eingeführten Punktmutation verwendet. Die Oligonukleotide, die ebenfalls zum jeweiligen Gegenstrang des Plasmids komplementär sind wurden während der Polymerisierung durch die *PfuTurbo* DNA Polymerase (Stratagene) nach Anleitung des Herstellers verlängert. Nach der PCR-Reaktion wurde die parentale DNA mit *DpnI* verdaut. Da aus *E. coli* isolierte DNA *dam*-methyliert ist, wird sie durch *DpnI* gespalten, und ausschließlich neu synthetisierte DNA wurde selektiert. Nach der Kontrolle des PCR-Produktes auf einem Agarosegel wurden 5 µl in *E. coli* DH5α transformiert. Die Region, in welcher die eingeführten Punktmutationen der neu konstruierten Plasmide liegen, wurde vor der Verwendung für weitere Experimente sequenziert und anschließend in das Ausgangsplasmid rückkloniert.

### 3.2.7 Herstellung kompetenter Zellen

*E. coli*-Zellen wurden nach der modifizierten Anleitung von Hanahan (Hanahan, 1985) kompetent gemacht. Dazu wurden die Zellen in 5 ml LB-Medium angeimpft und üN bei 37°C inkubiert. Aus dieser Vorkultur wurden 500 ml LB-Medium beimpft (1:100) und bei 37°C bis zu einer  $OD_{600}$  von 0.6 geschüttelt. Nach 10 min Eiskühlung wurden die Zellen durch Zentrifugation sedimentiert (10 min, 5000 rpm, 4°C) und in ½ Volumen eiskalter, steriler 0.1 M  $CaCl_2$ -Lösung gelöst. Nach weiteren 20 min auf Eis, wurden die Zellen erneut abzentrifugiert, in 1/10 des Ausgangsvolumens eiskalter 0.1 M  $CaCl_2$ -Lösung aufgenommen und mit Glycerin zu einer Endkonzentration von 15 % versetzt. Die kompetenten Zellen wurden portioniert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt.

### 3.2.8 Transformation in Bakterien

Die Transformation von *E.coli*-Zellen wurde nach einer modifizierten Anleitung von Hanahan (Hanahan, 1985) durchgeführt. Zu 1-10 µl DNA-Lösung oder zu Ligationsansätzen mit 5-100 ng DNA wurden 100 µl kompetenter Bakterien gegeben und 30 min auf Eis inkubiert.

Anschließend wurden sie 1 min bei 42°C hitzebehandelt, auf Eis abgekühlt und nach Zugabe von 1 ml LB-Medium 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Die transformierten Bakterien wurden auf LB-Platten mit Antibiotikum ausplattiert und üN bei 37°C inkubiert.

### 3.2.9 Kultivierung und Konservierung von *E.coli*-Stämmen

Transformanten und Stämme wurden als Glycerin-Kryokultur aufbewahrt. Dazu wurden üN-Kulturen aus Flüssigkulturen oder von Agarplatten geerntet und in LB-Medium, das 20 % Glycerin enthielt, aufgenommen. Die Zellsuspensionen wurden in flüssigem Stickstoff gefroren und bei -80°C gelagert.

## 3.3 Proteinbiochemische Methoden

### 3.3.1 *In vitro* Transkription und Translation von CES-1

*In vitro* Transkription/Translation von CES-1 mittels *T7*-Polymerase wurde in Retikulozyten-Lysat unter Verwendung des entsprechenden TNT Transkriptions- und Translations-Reaktionssystems (Promega) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Zur radioaktiven Markierung der *in vitro*-translatierten Proteine wurde pro Ansatz 40 µCi <sup>35</sup>S-Methionin zugesetzt. Die Proteine wurden auf einem SDS-PAGE-Gel und auf einem Autoradiographiefilm überprüft.

### 3.3.2 Bakterielle Expression von GST-CES-1 Fusionsproteinen

GST-CES-1-Fusionsproteine wurden in *E. coli* BL21(DE3) unter Verwendung des "GST Gene Fusion System" (Pharmacia) exprimiert. Um eine einfache Aufreinigung zu ermöglichen und gleichzeitig die Protein-Löslichkeit zu erhöhen, wurden die fünf Zink-Finger (AS 117 bis AS 270) von CES-1 als Fusionsprotein der 26 kDa großen Glutathion-S-Transferase (GST) exprimiert.

Eine 50 ml Bakterienkultur wurde mit einer üN-Kultur (1:10) angeimpft und bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0.6 bei 37°C geschüttelt. Die Proteinexpression wurde mit 0.5 mM

IPTG induziert, und die Bakterien nach 2.5 h geerntet. Die induzierten Bakterien wurden sedimentiert und in 1/50 Volumen Lysis-Puffer aufgenommen. Durch dreimaliges Einfrieren der Suspension in flüssigem Stickstoff (-196°C), anschließendem Auftauen im 37°C Wasserbad und durch Ultraschall (Sonifier W-450; Mikrospitze, Ø 3 mm; Puls 30 sek; bei „Output Control“ 4), wurden die Zellen aufgeschlossen. Nach Zugabe von 1/10 Volumen 5 M NaCl-Lösung wurden die Zellen auf Eis gelagert. Die Proteine wurden für 15 min bei 13000 rpm und 4°C sedimentiert und anschließend mit 1/10 Volumen Glutathion-Agarose-Perlen gut gemischt. Die Bindung der GST-CES-1 Proteine an die Perlen wurde für 1 h bei 4°C und schwachem Schütteln ermöglicht. Nach drei Waschschritten mit 20 Volumen Lysis-Puffer und einem Waschschriff mit 20 Volumen 50 mM Tris (pH 8), wurden die Fusionsproteine mit 1 Volumen 50 mM Tris (pH 8), 10 mM Glutathion üN bei 4°C von den Glutathion-Perlen eluiert. Nach jedem Schritt wurden Proben entnommen, die auf einem SDS-PAGE-Gel analysiert wurden.

**Lysis-Puffer**

25 mM	HEPES (pH 7.5)
20 mM	KCl
2.5 mM	EDTA
1 %	Triton X-100
1 mM	DTT
0.5 mM	AEBSF
1 µg/ml	Pepstatin
1 µg/ml	Leupeptin

**3.3.3 Dialyse und Aufbewahrung von Proteinen**

Um das Glutathion aus der Proteinlösung zu entfernen, wurde die Suspension in eine Slide-A-Lyzer- Dialyse-Kassette (Pierce) gegeben und gegen 250-faches Volumen des Dialyse-Puffers dialysiert. Es wurde dreimal (5 h, 10 h, 5 h) bei 4°C unter Rühren dialysiert.

**Dialyse-Puffer**

25 mM	HEPES (pH 7.5)
50 mM	KCl
1 mM	DTT
6 mM	MgCl <sub>2</sub>
10 %	Glyzerol
1 mM	EDTA

### 3.3.4 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Konzentration von Proteinlösungen wurde durch den Bradford-Test (Biorad) photometrisch bestimmt. 50 µl Probenlösung wurden mit 750 µl Reagenz (Protein-Assay-Farbstoffkonzentrat, 1:4 verdünnt) gemischt, und nach 5 min die OD<sub>595</sub> gemessen. Eine Standardkurve wurde mit bekannten Mengen BSA erstellt, indem die OD<sub>595</sub> gegen die bekannte Proteinmenge in µg aufgetragen wurde. Aus dieser Kurve wurde die Proteinmenge der zu testenden Lösung abgelesen.

### 3.3.5 Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli

Für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970) zur Auftrennung von denaturierten Proteinen nach ihrem Molekulargewicht wurden 10-15%-ige Trenngele jeweils mit 5%-igen Sammelgelen verwendet (Sambrook *et al.*, 1989). Die Proteinproben wurden vor dem Auftragen auf das Gel mit Protein-Probenpuffer versetzt und für 5 min im Wasserbad gekocht. Die Auftrennung erfolgte zusammen mit einem Molekulargewicht-Standard bei einer konstanten Spannung von 100-150 V.

	<b>Sammelgel (5%) (5 ml)</b>	<b>Trenngel (10%) (5 ml)</b>	<b>Trenngel (15%) (5 ml)</b>
H <sub>2</sub> O	3.7 ml	2.4 ml	1.8 ml
40 % Acrylamid-Lösung	630 µl	1.25 ml	1.9 ml
1 M Tris-HCl (pH 6.8)	630 µl	1.3 ml	1.3 ml
20 % SDS	25 µl	25 µl	25 µl
10 % APS	500 µl	500 µl	500 µl
TEMED	5 µl	5 µl	5 µl

<b>Protein-Probenpuffer (2x)</b>		<b>Protein-Gel-Laufpuffer (4 l)</b>	
100 mM	Tris-HCl (pH 6.8)	24 g	Tris-Base
2 %	SDS	115.2 g	Glyzin
5 %	2-Mercaptoethanol	20 ml	20 % SDS
15 %	Glyzerol		
	Bromophenolblau		

### 3.3.6 Proteinfärbung mit Coomassie Brilliant Blau

Die Methode der Proteinfärbung mit Coomassie Brilliant Blau ist zur Detektion relativ geringer Proteinmengen geeignet. Die Gele wurden etwa 30 min in Coomassie-Lösung gefärbt und anschließend in Entfärberlösung inkubiert.

**Coomassie-Lösung**

**Entfärber**

1 g	Coomassie brilliant blue R-250	10 %	Eisessig
50 ml	Eisessig	20 %	Methanol
500 ml	Methanol		
450 ml	H <sub>2</sub> O		

### 3.3.7 Gelretardierungsanalyse (EMSA)

Mit der Gelretardierungsmethode (EMSA, „electrophoretic mobility shift assay“) lassen sich DNA-bindende Proteine untersuchen. Im Vergleich zu freier DNA besitzen Protein-DNA-Komplexe eine geringere Mobilität in nativen Gelen.

#### 3.3.7.1 PCR mit radioaktiv markierten dATP

Für den Nachweis von DNA-bindenden Proteinen auf einem Autoradiographiefilm, wurden DNA-Proben radioaktiv markiert. Die DNA-Fragmente wurden mittels PCR amplifiziert und durch die Verwendung von dATP mit radioaktiv markierten  $\alpha^{32}\text{P}$ -Nukleotiden markiert. Parallel dazu wurde für die Konzentrationsbestimmung der DNA ein PCR-Ansatz ohne dATP mit  $\alpha^{32}\text{P}$ -Nukleotiden verwendet.

#### 50 $\mu\text{l}$ PCR-Ansatz

100 ng	DNA
50 $\mu\text{M}$	dNTP ohne ATP
20 $\mu\text{M}$	dATP
10 $\mu\text{Ci}$	dATP $\alpha^{32}\text{P}$
1 $\mu\text{M}$	„Primer sense“
1 $\mu\text{M}$	„Primer antisense“
5 $\mu\text{l}$	10x Reaktionspuffer
1.5 $\mu\text{l}$	MgCl <sub>2</sub> (50 mM)
0.25 $\mu\text{l}$	<i>Taq</i> -Polymerase (2.5 U/ $\mu\text{l}$ )

#### 3.3.7.2 Reinigung und Isolierung von radioaktiv markierten PCR-Produkten

Radioaktiv markierte PCR-Produkte wurden über ein 6 % Acrylamid/TBE-Gel gereinigt. Die Proben wurden in 1x TBE-Puffer 2 h bei 30 mA aufgetrennt.

Anschließend wurde die DNA auf einem Röntgenfilm sichtbar gemacht und das gewünschte Gelstück mit einem sterilen Skalpell ausgeschnitten. Die DNA wurde 4 h bei 37°C mit 2 Volumen Elutionspuffer (TE, 100 mM NaCl) eluiert. Die Lösung wurde mit Phenol/Chloroform extrahiert, mit Ethanol gefällt und in 50  $\mu\text{l}$  TE gelöst.

#### 5x TBE-Puffer (1 l)

54 g	Tris-Base
27.5 g	Borsäure
10 mM	EDTA (pH 8.0)

#### 6 % PAA-Gel (60 ml)

6 ml	40 % Acrylamid-Mix
8 ml	5x TBE
26 ml	H <sub>2</sub> O
400 $\mu\text{l}$	10 % APS
40 $\mu\text{l}$	TEMED

### 3.3.7.3 Protein-DNA-Bindung

Die Protein-DNA-Bindung erfolgte in einem 20- $\mu$ l-Reaktionsvolumen mit 4 ng radioaktiv markierten DNA-Fragmenten, 1x Reaktionspuffer und unterschiedlichen Proteinmengen. Für Kompetitions-Experimente wurden definierte Mengen an nicht radioaktiv markierten DNA-Fragmenten zu dem Reaktionspuffer mit markierten DNA-Fragmenten zugegeben und gemischt, bevor die Proteinlösung beigemischt wurde. Die Reaktionsansätze wurden 40 min bei RT inkubiert, auf einem 5 % TGE-Poyacrylamidgel aufgetragen und in TGE-Laufpuffer bei 4°C und 30 mA für etwa 2 h getrennt. Anschließend wurde das Gel vakuumgetrocknet, und bei -80°C wurden die radioaktiv markierten Banden für einige Stunden bzw. Tage auf einen Röntgenfilm übertragen.

#### 4x Reaktionspuffer

100 mM	HEPES (pH 7.5)
400 mM	KCl
40 %	Glyzerol
12 mM	MgCl <sub>2</sub>
4 mM	EDTA
0.2 %	IGEPAL

#### Protein-DNA-Bindungsreaktionsansatz

1x	Reaktionspuffer
10 $\mu$ g/ $\mu$ l	dIdC
20 $\mu$ g/ $\mu$ l	BSA
1 mM	DTT
5 ng	DNA-Probe
gewünschte Konz.	Proteinlösung

#### 1x TGE-Puffer

25 mM	Tris-Base
190 mM	Glyzin
1 mM	EDTA

#### 5 % TGE-Gel (60 ml)

7.5 ml	40 % Acrylamidmix (37:1)
2.5 ml	H <sub>2</sub> O
50 ml	1x TGE-Puffer
800 $\mu$ l	10 % APS
40 $\mu$ l	TEMED
add 60 ml	H <sub>2</sub> O

## 3.4 Immunologische Methoden

### 3.4.1 Western Blot-Analyse

Durch das Anlegen eines elektrischen Feldes wurden die Proteine aus einem SDS-PAGE-Gel auf eine PVDF-Membran in Richtung der Anode transferiert. Der Transfer erfolgte bei 100 V für 1 h. Um unspezifische Bindungen der Antikörper zu reduzieren bzw. zu vermeiden, wurde die Membran anschließend für 1 h bei RT in 5 % Magermilchpulver in 1x TBS-Puffer inkubiert. Danach wurde sie mit einer geeigneten Verdünnung des Primärantikörpers in 5 % Magermilchpulver-Lösung in 1x TBS-Puffer inkubiert. Alle nicht gebundenen Antikörper wurden durch dreimal zehnmütiges Waschen mit TBS-Puffer entfernt, und die PVDF-Membran dann mit dem sekundären Meerrettich-

Peroxidase-gekoppelten Antikörper in TBS-Puffer inkubiert. Die Membran wurde abermals dreimal gewaschen und dann mit Hilfe des ECL-Kits (Amersham Pharmacia) nach Anleitung des Herstellers behandelt.

<b>Transfer-Puffer (4 l)</b>		<b>1x TBS</b>	
57.6 g	Glyzin	20 mM	Tris-Base
12 g	Tris-Base	137 mM	NaCl
800 ml	Methanol	pH 7.6	mit HCl einstellen
0.1 %	SDS		
add 4 l	H <sub>2</sub> O		

### 3.4.2 „Strippen“ von Western Blots

Um bereits entwickelte Blots von den Antikörpern zu reinigen und nochmals mit Antikörper behandeln zu können, wurden die Membranen gewaschen. Dazu wurden sie für 30 min bei 50°C in „Stripping“-Puffer geschwenkt und anschließend zweimal für 10 min in TBS-Puffer gewaschen.

<b>„Stripping“-Puffer</b>	
62.5 mM	Tris-HCl (pH 6.7)
2 %	SDS
100 mM	2-Mercaptoethanol

### 3.4.3 Immunofluoreszenz

#### 3.4.3.1 Fixierung und Antikörperfärbung von *C. elegans* Embryonen nach Metzstein

Eine von Metzstein (Metzstein, 1998) beschriebene Methode, Embryonen zu fixieren und anschließend mit Antikörpern anzufärben, wurde angewendet. Erwachsene Würmer wurden bei 20°C in 10 cm Platten kultiviert. Die Würmer von vier bis sechs Kulturplatten wurden mit etwa 10 ml H<sub>2</sub>O gewaschen und in einem 15 ml Eppendorfgefäß bei 3000 rpm für 2 min sedimentiert. Nach weiteren zwei Waschschritten wurden die Tiere in Hypochlorid-Lösung für etwa 10 min leicht geschüttelt. Die dabei freiwerdenden Eier wurden dreimal mit je 10 ml H<sub>2</sub>O gewaschen und 2 min bei 2000 rpm zentrifugiert. Die Eier wurden in Fixierlösung 20 min auf Eis inkubiert und anschließend in flüssigem Stickstoff gefroren. In diesem Zustand kann man die Embryonen bei -80°C auf unbestimmte Zeit aufheben. Unter fließendem kaltem Wasser wurden die Eier wieder aufgetaut und 20 min leicht geschüttelt. Danach wurden sie für 1 min bei 2000 rpm sedimentiert, einmal in 1 ml Tris-Triton-Puffer

und einmal in 1 ml PBST-B-Puffer gewaschen. Anschließend wurden sie in 1 ml PBST-B-Puffer aufgenommen und 15 min geschüttelt. Bei 4°C können die fixierten Embryonen für eine unbestimmte Zeit aufgehoben werden.

Fixierte Embryonen wurden in 20 µl Primärantikörper in PBST-A-Puffer üN bei RT inkubiert. Anschließend wurde der Überstand abgenommen und das Pellet mit je 1 ml PBST-B-Puffer viermal je 25 min gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurde der Überstand abgenommen und die Embryonen mit je 20 µl Sekundärantikörper in PBST-A-Puffer für 2.5 h bei RT inkubiert. Anschließend wurde das Sediment wie bereits beschrieben gewaschen. Um die DNA in den Zellkernen der Embryonen anzufärben wurden diese für 5 min in 500 µl DAPI-Lösung (1 µg/ml DAPI in 1x PBS) geschüttelt und anschließend abzentrifugiert. 3 µl Antibleich-Lösung (Vectashield, Vector Laboratories) und 3 µl des Embryo-Sediments wurden auf einem Objektträger durch vorsichtiges auf- und abpipettieren vermischt und mit einem Deckglas bedeckt, deren Ränder mit Nagellack abgedichtet wurden.

#### **Hypochlorid-Lösung**

300 µl	10 N NaOH
250 µl	2 M NaOCl <sub>3</sub>
4.5 ml	H <sub>2</sub> O

#### **2x „Witche’s Brew“**

160 mM	KCl
40 mM	NaCl
20 mM	Na <sub>2</sub> EGTA
10 mM	Spermidin-HCl
30 mM	Na-PIPES (pH 7.4)
50 %	Methanol

#### **Tris-Triton-Puffer**

100 mM	Tris-HCl (pH 7.4)
1 %	Triton X-100
1 mM	EDTA

#### **PBST-A-Puffer**

1x	PBS-Puffer
1 %	BSA
0.5 %	Triton X-100
5 mM	Sodiumazid
1 mM	EDTA

#### **Fixierlösung**

610 µl	H <sub>2</sub> O
140 µl	2x „Witche’s Brew“
250 µl	4 % Paraformaldehyd
250 µl	90 % Methanol in 10 % EGTA

#### **10x PBS-Puffer (200 ml)**

16 g	NaCl
0.4 g	KCl
1.2 g	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (wasserfrei)
0.4 g	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>

#### **PBST-B-Puffer**

1x	PBS-Puffer
0.1 %	BSA
0.5 %	Triton X-100
5 mM	Natriumazid
1 mM	EDTA



### 3.4.3.2 Fixierung und Antikörperfärbung von *C. elegans* Embryonen nach Bossinger

Eine weitere Methode, Embryonen zu fixieren und anschließend mit Antikörpern anzufärben, beruht auf einem Protokoll von Olaf Bossinger (pers. Mitteilung). Dabei wird die Schale der Eier durch Einfrieren und anschließendes Auftauen der Embryonen für die Antikörper durchlässig gemacht. Objektträger wurden mit 5 µl PolyL-Lysin beschichtet und üN getrocknet. Anschließend wurden darauf zehn junge erwachsene Tiere in 10 µl Wasser gegeben. Damit sie die Embryonen frei geben, wurden die Tiere mit Hilfe zweier Kanülen jeweils zweigeteilt. Nach der Platzierung eines Deckglases wurden sie sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Das Deckglas wurde mit einem Skalpell entfernt, und die Eier für 20 min in -20°C kaltem Methanol inkubiert. Nach 10 min in -20°C kaltem 90 % Ethanol, 10 min in -20°C kaltem 60 % Ethanol und 10 min in 30 % Ethanol bei RT, wurden die Embryonen dreimal jeweils 10 min mit TBT-Puffer gewaschen. Die fixierten Embryonen wurden mit 5 µl Primärantikörper in Antikörper-Puffer für 3 h bei RT bzw. üN bei 4°C in einer feuchten Box inkubiert. Anschließend wurden sie wie bereits beschrieben dreimal gewaschen und mit dem Sekundärantikörper für 2 h bei RT inkubiert. Die Embryonen wurden viermal jeweils 15 min mit TBT-Puffer gewaschen und mit einer 1 µg/ml DAPI-Lösung in 1x PBS und Anitbleich-Lösung (Vectashield, Vector Laboratories) überschichtet. Anschließend wurden sie mit einem Deckglas bedeckt, deren Ränder mit Nagellack abgedichtet wurden.

#### PolyL-Lysin-Lösung

50 ml H<sub>2</sub>O wurden auf 60°C erhitzt. Dazu wurden 100 mg Gelatine gegeben und auf 40°C abgekühlt. Anschließend wurden 10 mg CrK(SO<sub>4</sub>)x2 12H<sub>2</sub>O zugegeben. 10 ml dieser Lösung wurden mit 10 mg PolyL-Lysin versetzt und bei 4°C für maximal 2 Monate aufbewahrt.

#### 10x TBS-Puffer

0.2 M	Tris-HCl (pH 8)
1.5 M	NaCl

#### TBT-Puffer

1x	TBS-Puffer
0.1 %	Triton X-100

#### Antikörper-Puffer

5 ml	1x TBT-Puffer
1 %	BSA
1 %	Milchpulver

### 3.5 Methoden des Hefe-Expressionssystems

#### 3.5.1 Anzucht von *S. cerevisiae*

Nicht transformierte Wildtypstämme wurden in YPD-Vollmedium oder auf YPD-Hefepplatten bei 30°C kultiviert. Hefestämme, die Plasmide tragen, wurden auf SC-Minimalmedium inkubiert, dem der auxotrophe Marker der Plasmide fehlt, um deren Expression zu gewährleisten.

#### 3.5.2 Lithiumacetat-Transformation von *S. cerevisiae*

Um Plasmide in Hefezellen einzubringen, wurde die Lithiumacetat-Transformation gewählt (Gietz *et al.*, 1995). Aus einer frischen Vorkultur wurden 50 ml YPD-Vollmedium mit Hefezellen angeimpft ( $\text{oD}_{600} \sim 0.2$ ) und bei 30°C inkubiert. Davon wurden 10 ml sedimentiert (5 min, 4000 rpm, RT), mit sterilem Wasser gewaschen, in 500  $\mu\text{l}$  einer 100 mM Lithiumacetat-Lösung aufgenommen und für 20 min bei 30°C inkubiert. 50  $\mu\text{l}$  dieser Zellsuspension wurden daraufhin zu der zu transformierenden DNA-Probe (ca. 1.5  $\mu\text{g}$ ) gegeben und dieser Ansatz mit 5  $\mu\text{l}$  denaturierter Heringssperma-DNA (Clontech) versetzt. Anschließend wurden 300  $\mu\text{l}$  40 % PEG 4000 in 100 mM Lithiumacetat zu jeder Probe pipettiert und 20 min bei 30°C inkubiert. Um die Transfektionseffizienz weiter zu erhöhen, wurde DMSO in einer Endkonzentration von maximal 10 % zu den Zellen gegeben, und diese einem 15-minütigen Hitzeschock bei 42°C unterzogen. Die Zellen wurden auf Selektionplatten ausplattiert und für etwa drei Tage bei 30°C inkubiert.

#### 3.5.3 „Yeast one-hybrid“-System

Das „yeast one-hybrid“-System ermöglicht den Nachweis von Protein-DNA-Interaktionen in *S. cerevisiae*. Die Methode wurde nach der Anleitung des Herstellers (Clontech) mit geringen Änderungen angewendet. Ein 82 mm Filterpapier (Schleicher und Schuell) wurde auf eine SC-Hefepplatte gelegt. Die zu untersuchenden Hefestämme wurden auf die Hefepplatte mit dem Filter übertragen und  $\mu\text{N}$  bei 30°C inkubiert. Der Filter mit den zu analysierenden Hefekolonien wurde anschließend 5–10 sek in flüssigen Stickstoff gelegt, um die Zellen permeabel zu machen. Ein weiterer Filter wurde in eine Petrischale gelegt und mit 2.5 ml Z-Puffer und 1 mg/ml X-Gal (in 100 mg/ml DMF gelöst) getränkt. Der Filter mit den Hefekolonien wurde auf den Filter mit dem Puffer gelegt und für 30 min bis zu 2 h bei 30°C inkubiert.

Zwischenzeitlich wurde die Blaufärbung der Hefestämme als Folge der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität und somit als Folge der Protein-DNA-Bindung über-prüft.

**Z-Puffer**

60 mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 7 H <sub>2</sub> O
40 mM	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O
10 mM	KCl
1 mM	MgSO <sub>4</sub> 7 H <sub>2</sub> O (pH 7)
nach dem Autoklavieren	
2.7 ml/l	2-Mercaptoethanol

**3.6 Biologische Untersuchung von *C. elegans*****3.6.1 Kultivierung und Anzucht von *C. elegans***

*C. elegans* wurde auf NGM-Platten verschiedener Größen (3.5 cm, 6 cm, 10 cm) gehalten, die mit einem Rasen von *E. coli* OP-50 beimpft wurden (Brenner, 1974). Die Tiere wurden bei 15°C, 20°C bzw. 25°C kultiviert.

**3.6.2 Reinigung kontaminierter Tiere**

Würmer wurden mit einem ausgeglühten Platin-Draht unter sterilen Bedingungen von Platte zu Platte transferiert. Kontaminierte Würmer wurden zur Reinigung in Hypochlorid-Lösung (3.4.3.1) gegeben. Dazu wurden ein paar Tropfen der Lösung an den Rand des Bakterienrasens pipettiert. Etwa 10 erwachsene Tiere mit Eiern in ihren Gonaden wurden zugegeben. Nur die Eier sind gegen diese Behandlung resistent, und nicht kontaminierte Larven konnten schlüpfen. Bei größeren Mengen zu reinigende Würmer wurden sie 5 min in Hypochlorid-Lösung bei RT inkubiert und anschließend 2 min bei 4000 rpm sedimentiert. Nach 3-6 Waschsritten in M9-Medium wurden die Eier auf frische Platten übertragen. Diese Methode wurde ebenfalls verwendet, um große Mengen, sich im gleichen Entwicklungsstadium befindliche Würmer zu kultivieren.

**3.6.3 Einfrieren / Auftauen**

*C. elegans* Tiere lassen sich für unbegrenzte Zeit bei -80°C bzw. in flüssigem Stickstoff (-196°C) einfrieren und wieder auftauen. Zum Einfrieren wurden gehungerte L1 und L2 Larven von zwei 6 cm-Kultruplatten mit M9-Medium abgewaschen und 1:2 mit Einfrierlösung versetzt. Die Tiere wurden in 1 ml Aliquots

auf 2 ml-Kryoröhrchen verteilt und zum gleichmäßigen Einfrieren für ein bis mehrere Tage in einer Styroporschachtel bei  $-80^{\circ}\text{C}$  inkubiert, bevor sie für die langfristige Lagerung in flüssigen Stickstoff transferiert wurden.

**Einfrierlösung**

20 ml 1 M NaCl  
10 ml 1 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (pH 6)  
60 ml 100 % Glyzerin  
110 ml  $\text{H}_2\text{O}$   
nach dem Autoklavieren  
0.6 ml 0.1 M  $\text{MgCl}_2$

**3.6.4 Induktion von Männchen durch Hitzeschock**

X0-Männchen treten in einer Population nur mit einer Frequenz von  $\sim 0.2\%$  spontan auf. Die Wahrscheinlichkeit von inkorrekten Chromosomensegregationen, die u.a. zur Entstehung von X0-Männchen führt, kann durch Hitzeschock erhöht werden. Dazu wurden L4-Hermaphroditen 4-6 h einem Hitzeschock von  $30^{\circ}\text{C}$  ausgesetzt und anschließend weiter bei  $20^{\circ}\text{C}$  kultiviert. In der folgenden Generation treten nun vermehrt (2-5 %) Männchen auf.

**3.6.5 Genetische Methoden****3.6.5.1 Kreuzungen**

Bei Kreuzungen zwischen Hermaphroditen und Männchen, werden männliche Spermien bei der Befruchtung der Oocyten gegenüber den Spermien der Hermaphroditen bevorzugt. Daher konnten Hermaphroditen mit Männchen gekreuzt werden, um heterozygote F1-Nachkommen zu erhalten. Kreuzungen von verschiedenen Stämmen wurden durchgeführt, indem man etwa 3 L4-Hermaphroditen eines Stammes zusammen mit etwa 5 Männchen eines anderen Stammes zusammensetzte. In der folgenden Generation wurden Nachkommen aus der Kreuzung und durch Selbstbefruchtung anhand geeigneter Marker identifiziert. So haben rezessive Mutationen in heterozygoten F1-Tieren keinen Phänotyp, dominante Marker, wie z.B. die Synthese von GFP, sind sichtbar. Etwa zehn F1-Nachkommen wurden vereinzelt und deren Nachkommen analysiert. Von der F2-Generation wurden ebenfalls etwa 10 Tiere klonal gepickt und untersucht.

### 3.6.5.2 Transformation von *C. elegans* durch Mikroinjektion von DNA

Die Transformation von *C. elegans* erfolgte mittels Mikroinjektion von DNA in die Gonaden von Hermaphroditen (Fire, 1986, Mello, 1991 #389). Zu transformierende Plasmid-DNA wurde zusammen mit dem Koinjektionsmarker und Injektionspuffer bei 4°C zentrifugiert, um Partikel, welche die Glasnadel verstopfen könnten, zu sedimentieren. Auf einen Objektträger wurde ein Tropfen 2 %-iger Agarose in H<sub>2</sub>O aufgetropft, flachgedrückt und üN getrocknet. Zur Injektion wurde auf ein beschichtetes Objektglas ein Tropfen Halocarbonöl oder Mineralöl gegeben. In diesem Öl wurden L4-Hermaphroditen oder junge Erwachsene auf der Agarose fixiert. Die Injektion der DNA-Lösung erfolgte in die Gonade(n) der Tiere. Die Tiere wurden anschließend mit M9-Puffer vom Deckglas gelöst und auf NGM-Platten transferiert. In der F1-Generation wurden diejenigen Tiere klonal isoliert, die den Koinjektionsmarker exprimierten. In einigen dieser Nachkommen bildet die injizierte DNA lange extrachromosomale DNA-Elemente (>700 kb), die in die F2-Generation weiter vererbt werden. Die Vererbung dieser DNA schwankt in den unabhängig etablierten Linien zwischen 10 % und 90 % (Mello und Fire, 1995).

#### **Injektionspuffer**

20 %	Polyethylenglykol
20 mM	Kaliumphosphat (pH 7.5)
30 mM	Kaliumzitrat (pH 7.5)

### 3.6.5.3 Integration extrachromosomaler Elemente durch EMS-Mutagenese

Eine Möglichkeit, extrachromosomale DNA in das Genom von *C. elegans* zu integrieren, ist die Ethylmethansulfonat (EMS)-Mutagenese (Hodgkin, 1999a). L4-Larven wurden mit M9-Medium von einer 10 cm-Platte abgewaschen, in einem 15 ml-Gefäß abzentrifugiert (1 min, 2000 rpm) und in 3 ml M9-Puffer aufgenommen. In einem weiteren 15-ml-Gefäß wurden 20 µl EMS (47 mM Endkonzentration) zu 1 ml M9-Puffer gegeben und gut gemischt, bevor die 3 ml-Wurmlösung zugegeben wurde und für 4 h bei 20°C auf einem Schüttler inkubiert wurde. Nach der Mutagenese wurden die Tiere bei 2000 rpm für 30 sek abzentrifugiert und zweimal mit 4 ml M9-Puffer gewaschen, bevor sie für 2 h auf einer frischen Kulturplatte inkubiert wurden. Danach wurden jeweils drei Tiere pro Kulturplatte vereinzelt und bei 25°C inkubiert, bis sie in der F2-Generation als L1-Larven verhungerten. Die L1-Tiere wurden mit einem Agarblock auf frische 10 cm-Kulturplatten gebracht und bei 25°C

inkubiert. Junge erwachsene transgene F2-Tiere (20-30 pro Platte) wurden klonal auf frische Kulturplatten übertragen. Falls 100 % der Nachkommen den genetischen Marker trugen, waren sie für das zu integrierende Element homozygot und wurden als integrierte Linien erhalten. Da die Linien durch Mutagenese generiert wurden, wurden sie viermal mit Wildtyp-Tieren rückgekreuzt, um etwaige unerwünschte Mutationen im Genom zu beseitigen. Um die Integration zu kartieren, wurden Standardmethoden, wie bereits beschrieben (Brenner, 1974, Sulston, 1988 #749), verwendet. Zwei-Faktor-Kreuzungen wurden für die Kartierung des Chromosoms, und Drei-Faktor-Kreuzungen für Kartierung einer chromosomalen Subregion durchgeführt (Sulston und Hodgkin, 1988).

#### **3.6.5.4 Transformation von *C. elegans* durch „Microparticle Bombardment“**

Eine weitere Möglichkeit zur Transformation von *C. elegans* ist die Beschießung der Würmer mit DNA-beschichteten Goldpartikeln (Jackstadt *et al.*, 1999, Praitis, 2001 #751). Mit dieser Methode ist es möglich, wenige oder sogar nur einzelne Kopien von Plasmiden ins Genom von *C. elegans* zu integrieren. Um die Goldpartikel mit Plasmid-DNA zu beschichten, wurden 100 µl 0.05 M Spermidin zu 25 mg Gold gegeben, gut gemischt und kurz ins Ultraschallbad gestellt, damit die Goldpartikel nicht verklumpen. Nach der Zugabe von 50 µg DNA wurde die Suspension gut geschüttelt und währenddessen 100 µl 1 M CaCl<sub>2</sub>-Lösung tropfenweise zugegeben. Nach 10 min Inkubationszeit bei RT wurde das Sediment drei mal mit 1 ml Ethanol gewaschen und in 3 ml Polyvinylpyrrolidon (PVP)-Lösung (0.05 mg PVP in 1 ml Ethanol) gelöst. Ein 10 mm dicker Schlauch (Bio Rad) wurde mit Ethanol gewaschen und getrocknet, bevor er mit der Gold-Lösung befüllt wurde. Nachdem sich die Partikel nach etwa 3 min abgesetzt hatten, wurde die Flüssigkeit mit einer Spritze wieder entfernt. Um die, an der Schlauchwand befestigten Goldpartikel zu trocknen, wurde für 3 min 0.35 l/min Stickstoff durch den Schlauch geblasen. Schließlich wurde der Schlauch in etwa 1 cm lange Patronen geschnitten und bei 4°C gelagert. Für dieses Verfahren ist es notwendig, eine große Anzahl an L4-Würmern zu kultivieren. Für einen Beschuß wurden etwa 10000 Tiere eingesetzt und für jedes DNA-Konstrukt wurden etwa 20 Schüsse abgefeuert. Um die Transformanten schnell zu erkennen, wurde eine Selektion, basierend auf die Komplementation des *unc-119(ed4)*-Phänotyps (Maduro und Pilgrim, 1995) angewendet. *unc-119(ed4)*-Tiere entwickeln kein Dauerlarven-Stadium und können somit auf Platten ohne Bakterien nicht

überleben. Etwa 10000 Würmer wurden auf eine 3.6 cm große Kulturplatte pipettiert und nach Anleitung des Herstellers mit der Helios Gene Gun (Bio Rad) bei einem Druck von 250-300 psi beschossen. Der optimale Abstand zwischen dem Revolver und der Kulturplatte lag bei 1.2 cm. Die Würmer wurden für 2 h bei 20°C inkubiert und anschließend mit M9-Medium abgewaschen, auf je zwei 10 cm Wurmplatten aufgeteilt und bei 20°C für etwa 10 Tage inkubiert. Nachdem die Bakterien verbraucht waren, konnten nur Transformanten, die den *unc-119(ed4)*-Phänotyp komplementierten und Dauerlarven bildeten, überleben.

### 3.6.6 Mikroskopie lebender Tiere

Die Strukturen und Zellen in den durchsichtigen Tieren können am Lichtmikroskop, mit differentialer Interferenz Kontrast (DIC) Mikroskopie (Nomarski Optik) (Sulston und Horvitz, 1977), analysiert werden. Die *gfp*-Expression in den NSMs und den NSM-Schwesterzellen wurde am Fluoreszenzmikroskop analysiert. Um die Identifizierung einzelner Zellen zu erleichtern, wurden vor allem L4-Tiere mit einer 60-100 mM Natriumazid-Lösung in M9-Puffer betäubt. Um die Anzahl überlebender NSM-Schwesterzellen zu bestimmen, wurden zwei Zellen (NSMs) von der Anzahl GFP-positiver Zellen im Pharynx subtrahiert. Überlebende NSM-Schwesterzellen wurden in % angegeben. „n“ repräsentiert die höchst mögliche Anzahl überlebender NSM-Schwesterzellen in einer bestimmten Anzahl von Tieren.

### 3.6.7 Isolierung von DNA aus *C. elegans*

Vor allem für die Überprüfung von Mutationen wurde DNA aus *C. elegans* isoliert, amplifiziert und anschließend sequenziert. Dafür wurden 4-5 µl Lysis-Puffer mit Proteinase K (1.2 µl 10 mg/ml Proteinase K pro 200 µl *C. elegans*-Lysis-Puffer) in den Deckel eines PCR-Reaktionsgefäßes gegeben. Eins bis zwei Tiere wurden hinzugefügt, die Reaktionsgefäße kurz zentrifugiert und bei -80°C mindestens 5 min eingefroren und wieder aufgetaut. Der Ansatz wurde mit Mineralöl überschichtet und 60 min bei 60°C und anschließend 20 min bei 95°C in einer PCR-Maschine inkubiert. 2 µl dieses Lysats wurden als Matrizen-DNA für eine PCR-Reaktion mit 50 µl Volumen verwendet werden.

#### *C. elegans*-Lysis-Puffer

50 mM	KCl
10 mM	Tris-HCl (pH 8.2)

2.5 mM	MgCl <sub>2</sub>
0.45 %	NP-40
0.45 %	Tween 20
0.01 %	Gelatine

### **3.6.8 Herstellung von Embryo-Lysat für Western-Blot-Analysen**

Für die Herstellung von Embryo-Lysaten für Western-Blots ist es notwendig, mindestens fünf 10 cm-Kulturplatten mit zahlreichen erwachsenen Tieren zu kultivieren. Die Tiere wurden mit M9-Medium von den Platten gewaschen, 1 min bei 2000 rpm sedimentiert und für 5-10 min in Hypochlorid-Lösung inkubiert, bis die Würmer zersetzt, und die Eier frei wurden. Nach sechs Waschschritten mit M9-Medium wurden die Eier durch fünfmaliges Einfrieren in flüssigem Stickstoff und anschließendem Auftauen im 37°C Wasserbad aufgebrochen. Das Embryo-Lysat wurde vor dem Auftragen auf ein SDS-PAGE-Gel in Protein-Probenpuffer (3.3.5) gelöst und für 5 min im Wasserbad gekocht.



## 4 Ergebnisse

### 4.1 Der *Ptph-1::gfp*-Reporter wird in den NSM-Zellen und den „untoten“ NSM-Schwesterzellen exprimiert

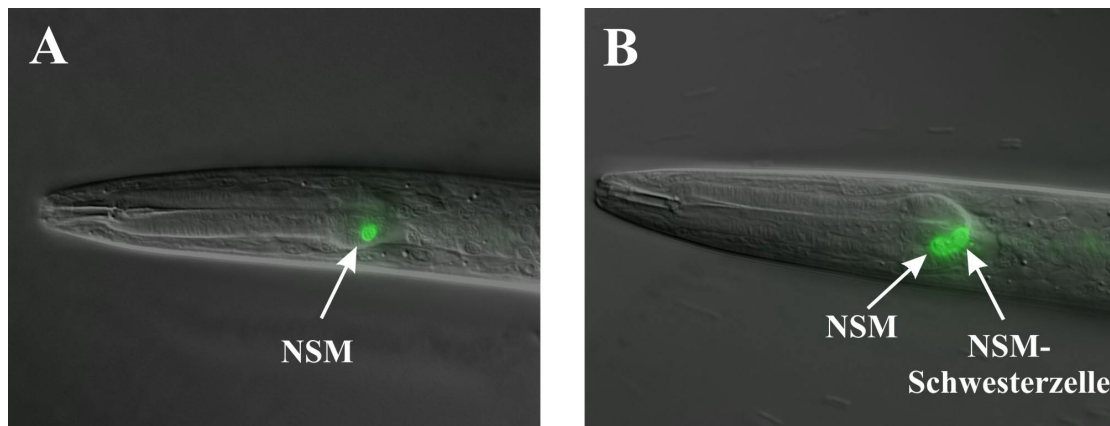
Die 28 Zellkerne im Pharynx von *C. elegans*, unter ihnen die der NSM-Zellen, nehmen definierte Positionen ein (Albertson und Thomson, 1976) und können daher in L4-Tieren (letztes Larvenstadium in der Entwicklung von *C. elegans*) mit Nomarski-Optik (3.6.6) (Sulston und Horvitz, 1977) identifiziert werden. Allerdings können sie nur aufgrund ihrer Position und Morphologie einer bestimmten Zellidentität zugeordnet werden. Überleben die NSM-Schwesterzellen, wie zum Beispiel in *ces-1(gf)*- oder in *ces-2(lf)*-Tieren, können die zwei zusätzlichen Zellkerne im Pharynx in unmittelbarer Nachbarschaft zu den NSM-Zellen identifiziert werden.

#### 4.1.1 Injektion des *Ptph-1::gfp*-Reporters in *C. elegans*

Um die Erkennung der NSM-Zellen und ihrer Schwesterzellen zu vereinfachen, wurde ein *gfp*-Reporter gen (*gfp*, green fluorescent protein) verwendet. Dabei wird *gfp* unter der Kontrolle des *tph-1*-Promotors (*tph*, tryptophan hydroxylase) exprimiert (*Ptph-1::gfp*). *tph-1* codiert eine Tryptophanhydroxylase, ein Schlüsselenzym der Serotoninsynthese, und wird ausschließlich in serotonergen Neuronen exprimiert, unter anderem in den NSM-Zellen (Sze *et al.*, 2000).

Zu diesem Zweck wurden *lin-15(n765ts)*-Tiere mit dem Plasmid pBY668 (*Ptph-1::gfp*) (Rohrig *et al.*, 2000) (50 ng/  $\mu$ l) und dem Koinjektionsmarker pL15EK (*lin-15(+)*) (Ferguson und Horvitz, 1989) (75 ng/  $\mu$ l) injiziert (3.6.5.2). *lin-15(lf ts)*-Tiere entwickeln bei 20°C bzw. bei 25°C einen sogenannten Muv-Phänotyp (*muv*, multi-yulva), der durch das Vorhandensein zahlreicher Vulven charakterisiert ist. Bei 15°C wird der Muv-Phänotyp nicht exprimiert. Transgene Tiere, die den *Ptph1::gfp*-Reporter und *lin-15(+)* in zahlreichen Kopien auf extrachromosomalen DNA-Elementen exprimieren, können bei 20°C bzw. bei 25°C selektiert werden. In fünf unabhängigen Linien wurde die extrachromosomale DNA mit einer Rate von 30 % bis 70 % an die Nachkommen vererbt. Die Expression des *Ptph-1::gfp*-Reporters wurde in zahlreichen transgenen Tieren jeder Linie untersucht. Im vorderen Bereich des Pharynx wurde GFP ausschließlich in zwei Zellen exprimiert (Abb. 4.1). Die

Position dieser Zellen wurde darüber hinaus mit Nomarski Optik überprüft, und es handelt sich um die NSM-Zellen.



**Abbildung 4.1: *Ptp-1::gfp*-Expression im Pharynx von *C. elegans***

Der *Ptp-1::gfp*-Reporter wird in Wildtyp-Tieren in den NSM-Zellen exprimiert (A), in *ces-1(gf)*-Tieren in den NSM-Zellen und ebenso in den überlebenden NSM-Schwesterzellen (B) (Hatzold, 2001). Genotypen der untersuchten Stämme: (A) MD422: *bcIs25* IV; (B) MD494: *ces-1(n703sd)* I; *bcIs25* IV.

#### 4.1.2 Integration des *Ptp-1::gfp*-Reporters durch EMS-Mutagenese

Die Vererbung extrachromosomaler DNA an die Nachkommen schwankt in unabhängig etablierten Linien zwischen 10 % und 90 % (Mello und Fire, 1995). Folglich erhält man eine mosaikartige Expression der injizierten Fremd-DNA. Um eine konstante Expression des *Ptp-1::gfp*-Reporters in allen Zellen, und somit in allen Nachkommen zu gewährleisten, ist es erforderlich, die transgene DNA stabil ins Genom zu integrieren. Zu diesem Zweck wurden transgene L4-Tiere mit dem Genotyp *lin-15(n765ts); bcEx113[Ptp-1::gfp, lin-15(+)]* mit EMS mutagenisiert (3.6.5.4). Transgene Nachkommen dieser Tiere (~70 %) haben bei 20°C bzw. bei 25°C keinen Muv-Phänotyp und exprimieren *gfp*. Mit Hilfe der EMS-Mutagenese wurden elf Stämme generiert (*bcIs21* bis einschließlich *bcIs31*), deren Nachkommen zu 100 % GFP-positiv waren und daher den *Ptp-1::gfp*-Reporter voraussichtlich stabil ins Genom integriert haben. Die vier Integrianten *bcIs21*, *bcIs22*, *bcIs25* bzw. *bcIs30* wurden jeweils viermal mit Wildtyp-Tieren rückgekreuzt, um etwaige, durch die Mutagenese entstandene Hintergrundmutationen, zu eliminieren.

#### 4.1.3 Kopplungsanalysen

Um zu bestimmen auf welchem Chromosom die DNA ins Genom integriert wurde, wurden Zwei-Faktor-Kreuzungen durchgeführt (Hodgkin, 1999a). Drei Integrianten,

*bcIs22*, *bcIs25* bzw. *bcIs21* wurden jeweils mit einem Stamm mit einfach phänotypisch erkennbaren Mutationen auf bestimmten Chromosomen gekreuzt. Falls der integrierte *gfp*-Reporter auf dem gleichen Chromosom liegt wie der Marker, werden sie, sofern keine Rekombination stattfindet, nicht gemeinsam in die nächste Generation vererbt. Die in Tabelle 4.1 dargestellten Stämme wurden für die Kreuzungen verwendet.

**Tabelle 4.1: Für Zwei-Faktor-Kreuzungen eingesetzte Stämme**

Stamm	Genotyp
MT2867	<i>unc-36(e251)</i> III; <i>unc-5(e53)</i> IV; <i>dpy-11(e224)</i> V; <i>lon-2(e678)</i> <i>lin-15(n765ts)</i> X
MT4557	<i>dpy-5(e61)</i> I; <i>unc-4(e120)</i> II; <i>lin-15(n765ts)</i> X
MT9830	<i>unc-36(e251)</i> III; <i>dpy-20(e1282ts)</i> IV; <i>lin-15(n765ts)</i> X
MT9831	<i>dpy-20(e1282ts)</i> IV; <i>unc-39(e257)</i> V; <i>lin-15(n765ts)</i> X

Die Integranten *bcIs21*, *bcIs22* und *bcIs25* wurden jeweils mit den Stämmen MT2867, MT4557, MT9830 und MT9831 gekreuzt (3.6.5.1), und in der F2-Generation wurde überprüft, welche Mutationen gemeinsam mit dem *gfp*-Reporter gen vererbt wurden. Die Kreuzungen und deren Ergebnisse sind in Tabelle 4.2 dargestellt.

**Tabelle 4.2: Kreuzungen und Phänotypen GFP-positiver F2-Nachkommen**

Kreuzung:	Integriert X Marker-Stamm	GFP-positive F2-Nachkommen
<i>bcIs22</i> X	<i>dpy-5(e61)</i> I; <i>unc-4(e120)</i> II; <i>lin-15(n765ts)</i> X	76 von 100 Dpy 60 von 81 Unc
<i>bcIs22</i> X	<i>unc-36(e251)</i> III; <i>dpy-20(e1282ts)</i> IV; <i>lin-15(n765ts)</i> X	<b>0 von 93 Dpy</b> 64 von 89 Unc
<i>bcIs22</i> X	<i>dpy-20(e1282ts)</i> IV; <i>unc-39(e257)</i> V; <i>lin-15(n765ts)</i> X	<b>0 von 44 Dpy</b> 39 von 39 Unc
<i>bcIs22</i> X	<i>unc-36(e251)</i> III; <i>unc-5(e53)</i> IV; <i>dpy-11(e224)</i> V; <i>lon-2(e678)</i> <i>lin-15(n765ts)</i> X	24 von 26 Dpy 13 von 14 Lon
<i>bcIs25</i> X		96 von 126 Dpy

<b>Kreuzung:</b>	<b>Integrand X Marker-Stamm</b>	<b>GFP-positive F2-Nachkommen</b>
	<i>dpy-5(e61)</i> I; <i>unc-4(e120)</i> II; <i>lin-15(n765ts)</i> X	57 von 94 Unc
	<i>bcIs25</i> X	<b>1 von 105 Dpy</b>
	<i>unc-36(e251)</i> III; <i>dpy-20(e1282ts)</i> IV; <i>lin-15(n765ts)</i> X	79 von 83 Unc
	<i>bcIs25</i> X	<b>0 von 45 Dpy</b>
	<i>dpy-20(e1282ts)</i> IV; <i>unc-39(e257)</i> V ; <i>lin-15(n765ts)</i> X	38 von 39 Unc
	<i>bcIs25</i> X	13 von 18 Dpy
	<i>unc-36(e251)</i> III; <i>unc-5(e53)</i> IV; <i>dpy-11(e224)</i> V; <i>lon-2(e678)</i> <i>lin-15(n765ts)</i> X	17 von 20 Lon
	<i>bcIs21</i> X	20 von 26 Dpy
	<i>dpy-5(e61)</i> I; <i>unc-4(e120)</i> II; <i>lin-15(n765ts)</i> X	24 von 26 Unc
	<i>bcIs21</i> X	4 von 5 Dpy
	<i>unc-36(e251)</i> III; <i>dpy-20(e1282ts)</i> IV; <i>lin-15(n765ts)</i> X	<b>0 von 18 Unc</b>
	<i>bcIs21</i> X	21 von 21 Dpy
	<i>unc-36(e251)</i> III; <i>unc-5(e53)</i> IV; <i>dpy-11(e224)</i> V; <i>lon-2(e678)</i> <i>lin-15(n765ts)</i> X	12 von 18 Lon

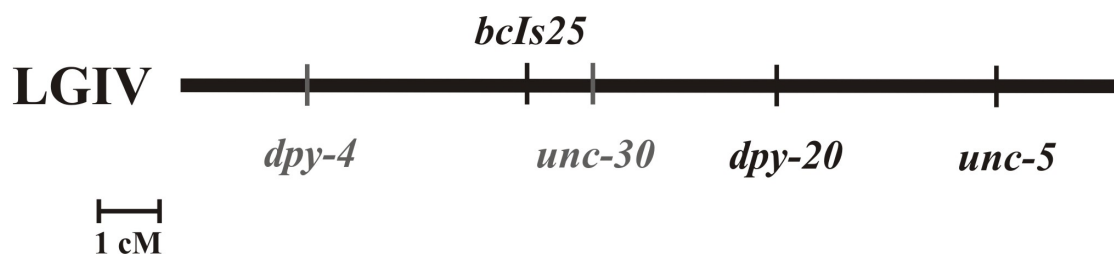
Da *bcIs22* nicht gemeinsam mit *dpy-20* in die F2-Generation vererbt wurde, befindet sich die Integrationen auf Chromosom IV. *bcIs25* wurde nur in einem von 105 Nachkommen gemeinsam mit *dpy-20* vererbt, vermutlich als Folge eines Rekombinationsereignisses. *bcIs25* befindet sich wahrscheinlich ebenso wie *bcIs22* auf Chromosom IV. *bcIs21* wurde nicht gemeinsam mit *unc-36* in die F2-Generation vererbt, die Integration liegt demnach auf Chromosom III.

Um die Position der Integration *bcIs25* auf Chromosom IV zu definieren, wurden Drei-Faktor-Kreuzungen durchgeführt (Hodgkin, 1999a). Die Anordnung der ausgewählten Genpaare (*dpy-4* und *unc-30* bzw. *dpy-20* und *unc-5*) auf Chromosom IV ist in Abbildung 4.2 vereinfacht dargestellt. Die *gfp*-Expression wurde in rekombinanten F3-Nachkommen analysiert (Tab 4.3).

**Tabelle 4.3: Drei-Faktor-Kreuzungen und Phänotypen GFP-positiver F3-Nachkommen**

Kreuzung:	Integrand X Marker-Stamm	GFP-positive F3-Nachkommen
<i>bcIs25</i> IV X		0 von 15 Dpy
<i>dpy-20(e1282ts) unc-5(e53)</i> IV		23 von 24 Unc
<i>bcIs25</i> IV X		2 von 15 Unc
<i>unc-30(e191) dpy-4(e1166sd)</i> IV		11 von 12 Dpy

Da im ersten Kreuzungsexperiment (*bcIs25* X *dpy-20(e1282ts) unc-5(e53)*) alle F3-Nachkommen mit dem Phänotyp Dpy, kein *gfp* exprimierten (0/15), liegt die Integration *bcIs25* links von *dpy-20* (Abb. 4.2). In diesem Fall müßten auch alle F3-Nachkommen mit einem Unc-Phänotyp ebenfalls *gfp* exprimieren. Ein F3-Nachkomme exprimiert jedoch kein *gfp*, vermutlich als Folge eines zusätzlichen Rekombinationsereignisses. Im zweiten Kreuzungsexperiment (*bcIs25* X *unc-30(e191) dpy-4(e1166sd)*) exprimierten zwei von 15 Unc-Nachkommen und elf von zwölf Dpy-Nachkommen *gfp*, die Integration *bcIs25* liegt somit zwischen *dpy-4* und *unc-30* (Abb. 4.2). Da *unc-30* und *bcIs25* mit einer Häufigkeit von nur 12 % gemeinsam an die F3-Nachkommen vererbt wurden und *dpy-4* und *bcIs25* mit einer weitaus höheren Häufigkeit von 88 % gemeinsam an die F3-Nachkommen vererbt wurden, liegt *bcIs25* in der Nähe von *unc-30*. Bei einem Abstand von 4.5 centi-Morgan (cM) zwischen *dpy-4* und *unc-30* ergibt sich ein Abstand von 4 cM zwischen *dpy-4* und *bcIs25* und ein Abstand von 0.5 cM zwischen *bcIs25* und *unc-30*.

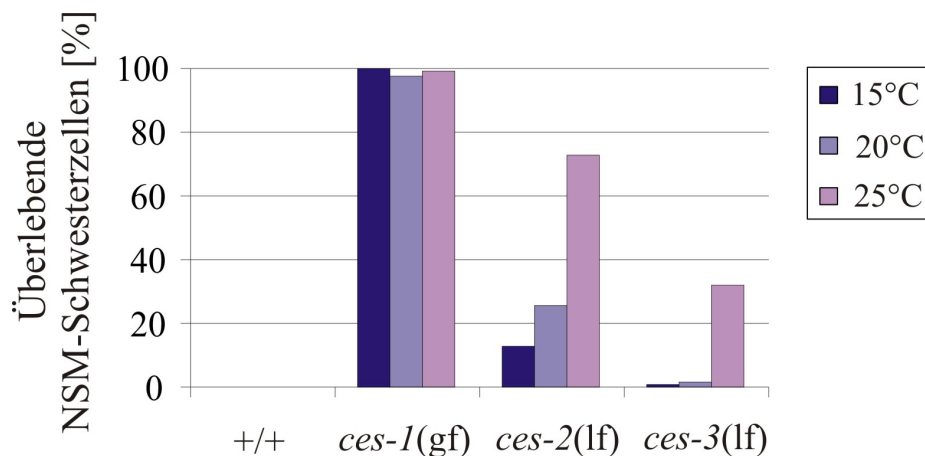


**Abbildung 4.2: Vereinfachte Genkarte des Chromosoms IV**

Die Genpaare *dpy-4* und *unc-30* mit 4.5 cM Abstand zueinander, bzw. *dpy-20* und *unc-5* mit 3.2 cM Abstand zueinander, wurden verwendet, um die Position der Integration *bcIs25* auf Chromosom IV zu bestimmen.

#### 4.1.4 Expression des *Ptph-1::gfp*-Reporters in ausgewählten Mutanten

Um zu überprüfen, ob der *Ptph-1::gfp*-Reporter neben den NSM-Zellen ebenfalls in den „untoten“ NSM-Schwesterzellen exprimiert wird, wurden Mutanten mit bekannten Phänotypen ausgewählt, und das Schicksal der NSM-Zellen und ihrer Schwesterzellen mit Hilfe des GFP-Reporters analysiert. Zu diesem Zweck wurden die Stämme MD494 (*ces-1(n703sd)* I; *bcIs25* IV), MD497 (*ces-2(n732ts)* I; *bcIs25* IV) und MD529 (*ces-3(n1952ts)* IV; *bcIs30 lin-15(n765ts)* X) konstruiert, und das Schicksal der NSM-Schwesterzellen analysiert (3.6.6). In *ces-1(gf)*-Tieren überlebten bei 15°C 100 %, bei 20°C 98 % und bei 25°C 99 % der NSM-Schwesterzellen (n = 76-82) (Abb. 4.3). In *ces-2(lf)*-Tieren überlebten bei 15°C 13 %, bei 20°C 26 % und bei 25°C 73 % der NSM-Schwesterzellen (n = 66-198). In *ces-3(lf)*-Tieren überlebten bei 15°C 1 %, bei 20°C 2 % und bei 25°C 32 % der NSM-Schwesterzellen (n = 78-140). Diese Daten wurden ebenso mit Nomarski Optik überprüft und bestätigt. Die Ergebnisse dieser Experimente stehen im Einklang mit den bekannten Zahlen für das Überleben der NSM-Schwesterzellen in den untersuchten Mutanten (Ellis und Horvitz, 1991; Metzstein und Horvitz, 1999). Der *Ptph-1::gfp*-Reporter wird sowohl in NSM-Zellen als auch in „untoten“ NSM-Schwesterzellen exprimiert und kann somit für die folgenden Experimente verwendet werden, um das Schicksal dieser Zellen zu analysieren (Abb. 4.1).



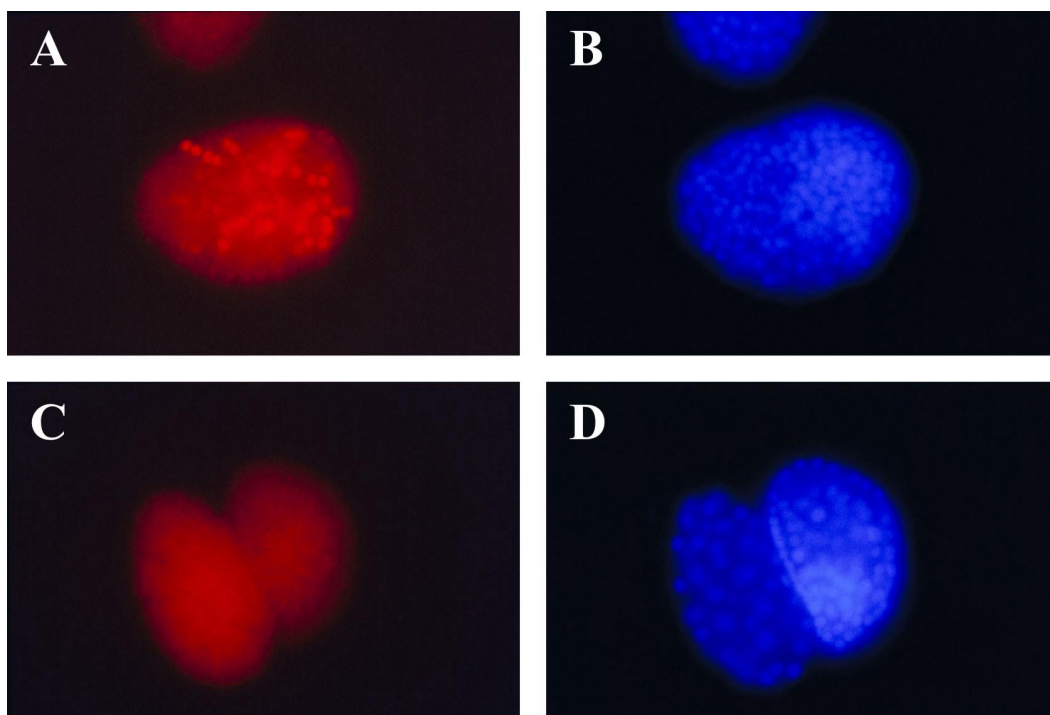
**Abbildung 4.3: Überlebensrate der NSM-Schwesterzellen in definierten Mutanten**

„Untote“ NSM-Schwesterzellen in Wildtyp-, *ces-1(gf)*-, *ces-2(lf)*- und *ces-3(lf)*-Tieren bei 15°C, 20°C und 25°C (n = 76 – 198). Genotypen der analysierten Stämme: MD422, *bcIs25* IV; MD494, *ces-1(n703sd)* I; *bcIs25* IV; MD497, *ces-2(n732ts)* I; *bcIs25* IV und MD529, *ces-3(n1952ts)* IV; *lin-15(n765ts)* *bcIs30* X.

## 4.2 CES-1-Expression in *C. elegans* Embryonen

### 4.2.1 CES-1-Expressionsmuster in fixierten Embryonen

Um die CES-1-Expression in *C. elegans* zu analysieren, wurden fixierte Embryonen mit CES-1-spezifischen Antikörpern (AK) gefärbt. Hierfür wurden affinitätsgereinigte, polyklonale AK gegen die 135 N-terminalen Aminosäuren des Proteins (94-105 AFF) aus Kaninchen verwendet (Metzstein, 1998). Mit diesem anti-CES-1-AK wurde das CES-1-Expressionsmuster in Embryonen analysiert. Neben den in Material und Methoden beschriebenen Protokollen zur Fixierung und AK-Färbung von *C. elegans* Embryonen nach Metzstein (3.4.3.1) und nach Bossinger (3.4.3.2), wurden zwei weitere Methoden nach Finney (Finney und Ruvkun, 1990) und nach Bettinger (Bettinger *et al.*, 1996) angewendet. Die AK-Färbungen wurden in N2-Embryonen und als Kontrolle ebenfalls in *ces-1(lf)*-Embryonen in unterschiedlichen Stadien der Embryonalentwicklung durchgeführt. Mit dem 94-105 AFF-AK wurde durch die Anwendung der Protokolle nach Metzstein (3.4.3.1) und nach Finney (Finney und Ruvkun, 1990) in N2-Embryonen eine zellkernspezifische Färbung beobachtet (Abb. 4.4A, 4.4B). In *ces-1(lf)*-Embryonen hingegen wurde keine CES-1-AK-Färbung sichtbar (Abb. 4.4C, 4.4D).



**Abbildung 4.4: CES-1-Antikörper-Färbung in *C. elegans* Embryonen**

Anti-CES-1-AK-Färbung in einem Wildtyp-Embryo (~ 400 Zellstadium) (A) und in *ces-1(lf)*-Embryonen (~ 400 bzw. ~ 200 Zellstadium) (C), und DAPI-Färbung in einem Wildtyp-Embryo (B) und in *ces-1(lf)*-Embryonen (D).

Metzstein *et al.* (Metzstein, 1998) haben gezeigt, dass CES-1 embryonal vor und während der Morphogenese bis zum 1 1/2-Falten-Stadium (etwa 420 min nach der ersten Zellteilung) in einer großen Anzahl von Zellkernen exprimiert wird. Bis zum 2-Falten-Stadium nimmt die Expression immer mehr ab, so dass etwa 450 min nach der ersten Zellteilung keine CES-1-Färbung mehr erkennbar ist. Die Identität der CES-1-exprimierenden Zellen konnte infolge des komplexen CES-1-Expressionsmusters und der schwachen Immunreaktivität mit dem 94-105 AFF-AK nicht bestimmt werden. Das CES-1-Expressionsmuster gleicht allerdings dem beschriebenen Expressionsmuster für UNC-86 (UNC, uncoordinated), welches in einer großen Anzahl von Zellkernen neuronalen Ursprungs exprimiert wird (Finney und Ruvkun, 1990). Daher ist es wahrscheinlich, dass *ces-1* vorwiegend in Zellen neuronaler Herkunft exprimiert wird (Metzstein, 1998).

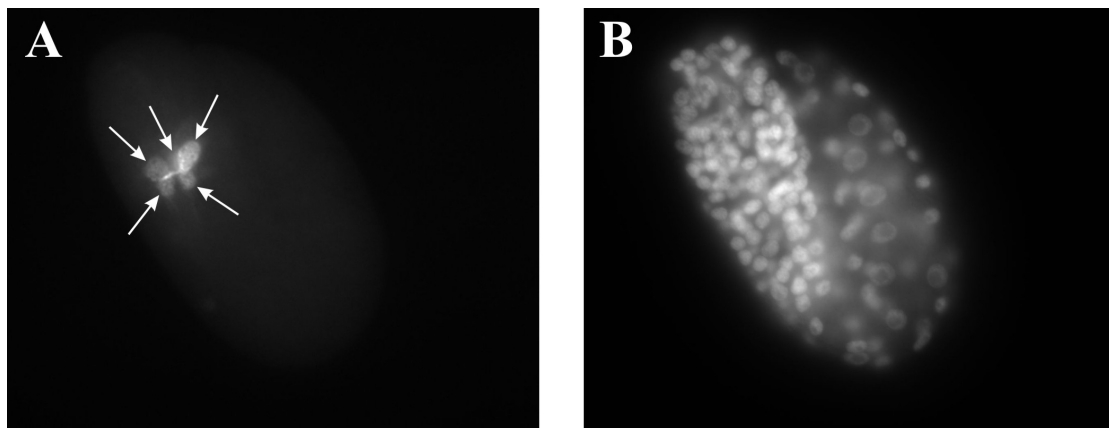
Gegen zwei verschiedene CES-1-Peptide (P1, P2) wurden anti-CES-1-AK aus Kaninchen (P1K, P2K) bzw. Meerschweinchen (P1M, P2M) von der Firma Pineda hergestellt (3.1.4). Mit den anti-CES-1-AK P1M und P2M bzw. P1K und P2K konnte während der Embryonalentwicklung keine CES-1-Expression in fixierten Tieren nachgewiesen werden. Zudem konnte mit Hilfe von Western-Blot-Analysen (3.4.1) aus *C.elegans* Embryo-Lysaten (3.6.8) mit keinem der von Pineda hergestellten AK CES-1-Protein nachgewiesen werden.

#### 4.2.2 Kolokalisierung von CES-1 und *Pceh-2::gfp* in *C. elegans* Embryonen

Infolge des komplexen CES-1-Expressionsmusters konnte mit Hilfe der AK-Färbungen nicht gezeigt werden, ob CES-1 in den NSM-Zellen und deren Schwesterzellen exprimiert wird. Mit einem embryonal exprimierten NSM-spezifischen Marker wäre es möglich zu überprüfen, ob CES-1 mit diesem Marker kolokalisiert und daher in den NSM-Zellen exprimiert wird. Das Gen *ceh-2* (*ceh*, *C. elegans* homeobox) wird während der Embryonalentwicklung kurz vor der Pharynx-Morphogenese in wenigen Zellen des Pharynx exprimiert (Burglin *et al.*, 1989) und stellt daher ein potentielles Reporter-gen für die NSM-Zellen dar. Das *gfp*-Reporter-gen *Pceh-2::gfp* wird in Wildtyp-Tieren in fünf Zellen des Pharynx exprimiert, und zwar in den I3- (Interneuronen), den M3L- und M3R-Zellen (linke und rechte Motoneuronen), und wahrscheinlich auch in den NSM-Zellen (G. Aspöck, pers. Mitteilung). Der Stamm TB250 mit dem Genotyp



*chEx250[Pceh-2::*gfp*, *rol-6(su1006dm)*]* trägt den *Pceh-2::*gfp**-Reporter als extrachromosomale DNA (G. Aspoeck, pers. Mitteilung). In lebenden Embryonen wurde am Fluoreszenzmikroskop nur eine sehr schwache *gfp*-Expression ab dem 2-Falten-Stadium der Embryonalentwicklung (etwa 460 min nach der ersten Zellteilung) beobachtet, so dass die Anzahl und die Identität der GFP-positiven Zellen nicht zuverlässig bestimmt werden konnte. Daher wurden Embryonen in verschiedenen Stadien der Entwicklung nach dem Metzstein-Protokoll (3.4.3.1) fixiert und mit anti-GFP-AK (3.1.4) gefärbt. In Embryonen im 2-Falten-Stadium der Entwicklung wurden fünf GFP-positive Zellen im vorderen Bereich des Pharynx sichtbar (Abb. 4.5). Aufgrund ihrer Position handelt es sich wahrscheinlich um die beschriebenen Zellen I3, M3R/L und NSMR/L.

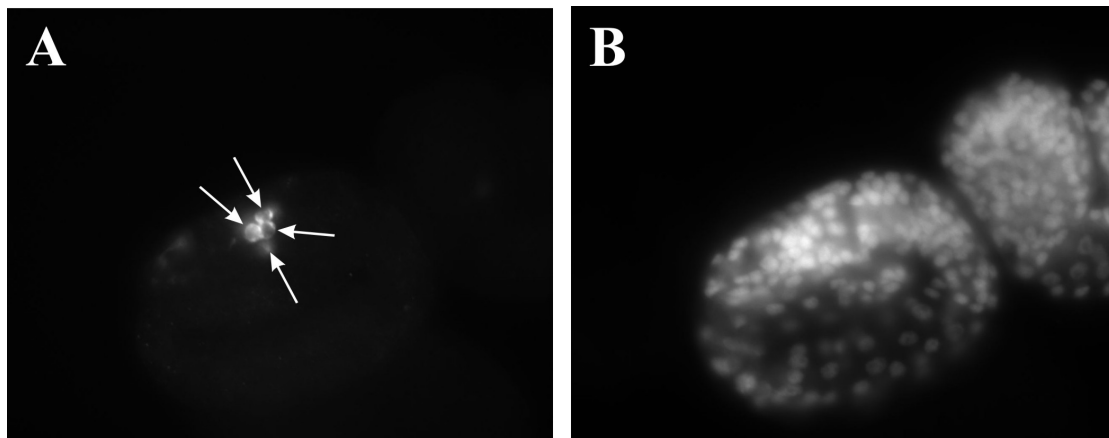


**Abbildung 4.5: *Pceh-2::gfp*-Expression in fixierten *C. elegans* Embryonen**

Antikörper-Färbung eines transgenen Embryonen mit anti-GFP-AK (~ 450 Zellstadium). Fünf GFP-positive Zellen (weiße Pfeile) sind am Fluoreszenzmikroskop sichtbar (A). DAPI-Färbung des gleichen Embryonen (B). Genotyp der Tiere: *chEx250[Pceh-2::*gfp*, *rol-6(su1006dm)*]*.

Um festzustellen ob der Reporter in den NSM-Zellen und ihren Schwesterzellen tatsächlich exprimiert wird, sollte dessen Expression in *ces-1(gf)*-Tieren analysiert werden, in denen die NSM-Schwesterzellen überleben. Falls hier der GFP-Reporter in den NSMs und den überlebenden NSM-Schwesterzellen exprimiert wird, würde man nicht nur fünf, sondern sieben GFP-positive Zellen erwarten. Zu diesem Zweck wurde das Plasmid pTRB201 (*Pceh-2::*gfp**) mit pRF4 (*rol-6(su1006dm)*) als Koinjektionsmarker in *ces-1(gf)*-Tiere injiziert und transgene Linien etabliert. Nach der Fixierung und der AK-Färbung wurden in transgenen *ces-1(gf)*-Embryonen im 2 ½-Falten-Stadium sieben GFP-positive Zellen im Pharynx gezählt (Abb. 4.6). Aufgrund der

Position der GFP-positiven Zellen im Embryo handelt es sich wahrscheinlich um die erwarteten Zellen I3, M3L/R, NSML/R und NSML/R-Schwesterzellen.



**Abbildung 4.6: *Pceh-2::gfp*-Expression in fixierten *ces-1(gf)*-Embryonen**

Antikörper-Färbung transgener Embryonen mit anti-GFP-AK. Vier GFP-positive Zellen sind in der eingestellten Brennebene sichtbar (~ 500 Zellstadium) (A). DAPI-Färbung transgener Embryonen (B). Genotyp der Tiere: *ces-1(n703sd) I*; *bcls25 IV*; *bcEx197[Pceh-2::gfp, rol-6(su1006dm)]*.

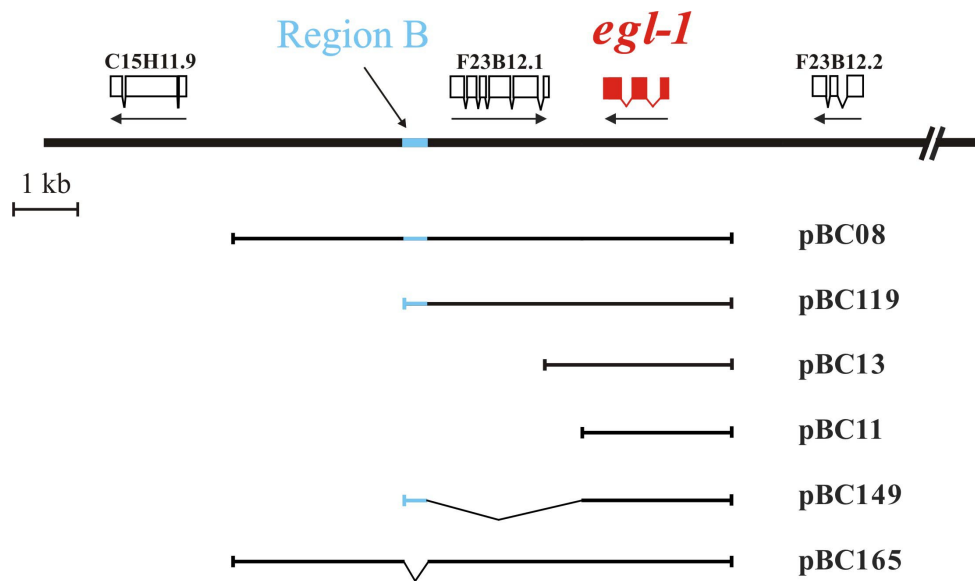
Um eine Kolokalisation zwischen CES-1 und GFP zu analysieren, wurden fixierte Embryonen mit anti-CES-1-AK und anti-GFP-AK gefärbt. In Embryonen mit GFP-positiven Zellen im Pharynx (*ceh-2::gfp*) konnte jedoch keine spezifische CES-1-Färbung beobachtet werden. Die *ceh-2::gfp*-Expression wurde erst ab dem 2-Falten Stadium sichtbar, die *ces-1*-Expression nimmt jedoch bis zum 2-Falten-Stadium ab (4.4.1) (Metzstein, 1998). Zum Zeitpunkt der *gfp*-Expression wurde CES-1 wahrscheinlich nicht mehr exprimiert. Mit dem *ceh-2::gfp*-Reporter war es somit nicht möglich, eine Kolokalisation zwischen anti-CES-1-AK und anti-GFP-AK nachzuweisen.

### 4.3 Region B im *egl-1*-Lokus ist für den programmierten Zelltod der NSM-Schwesterzellen erforderlich

#### 4.3.1 Injektion definierter Fragmente des *egl-1*-Lokus in *egl-1(lf)*-Tieren

*egl-1(n1084n3082)*-Tiere tragen eine Mutation im *egl-1*-Gen, die zum Funktionsverlust des Gens führt (Conradt und Horvitz, 1998). Folglich ist programmierter Zelltod in somatischen Geweben generell blockiert, einschließlich der Tod der NSM-Schwesterzellen. Untersuchungen der *gfp*-Expression unter der Kontrolle des *egl-1*-Promotors (*Pegl-1::gfp*) haben gezeigt, dass *gfp* ausschließlich in

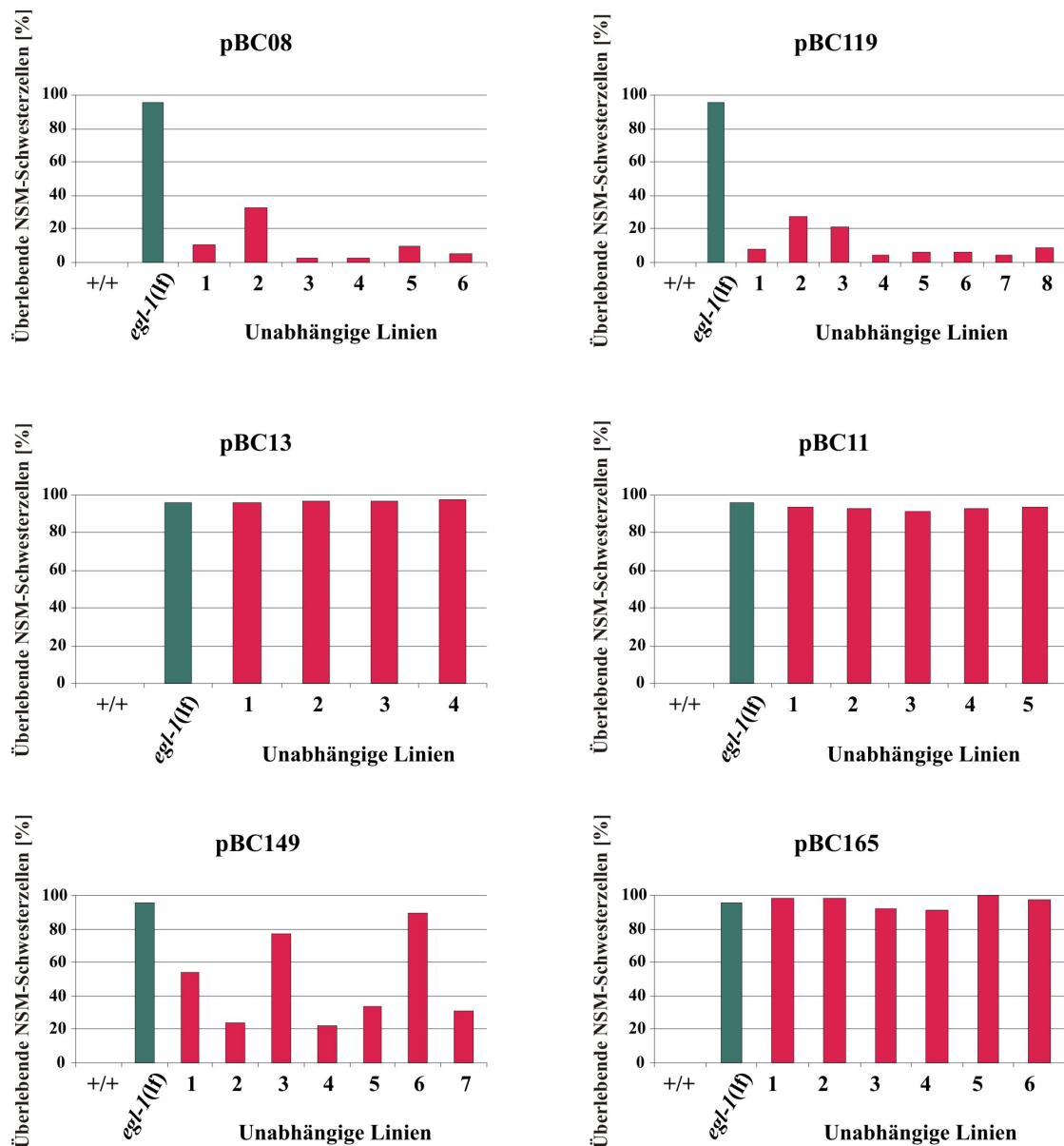
den NSM-Schwesterzellen, nicht aber in den NSM-Zellen exprimiert wird (J. Hatzold, pers. Mitteilung). Um die *gfp*-Expression in den „untoten“ NSM-Schwesterzellen analysieren zu können, wurde der Tod der Zellen durch eine *ced-3(lf)*-Mutation verhindert. Der Funktionsverlust der Caspase CED-3 hat keine Auswirkung auf die zelltypspezifische Regulation von *egl-1*. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen zeigen, dass *egl-1* in den zum sterben bestimmten NSM-Schwesterzellen exprimiert wird. Mit Hilfe des *Ptph-1::gfp*-Reporters wurde in *egl-1(lf)*-Tieren bei 20°C eine Überlebensrate der NSM-Schwesterzellen von 96 % gezählt. Injiziert man ein 7.6 kb genomisches Fragment (pBC08), welches die *egl-1*-Transkriptionseinheit einschließlich flankierender Sequenzen enthält (1036 bp stromaufwärts von *egl-1* und 5575 bp stromabwärts von *egl-1*), in *egl-1(lf)*-Tiere, wird der Phänotyp komplementiert (Conradt und Horvitz, 1998). Das Plasmid pBC08 trägt daher alle notwendigen Informationen, um *egl-1* in den NSM-Schwesterzellen zu exprimieren. Um nun *in vivo* zu analysieren, ob eine spezifische Region in den regulatorischen Sequenzen des *egl-1*-Lokus für die Zelltdspezifizierung der NSM-Schwesterzellen erforderlich ist, wurden Fragmente des *egl-1*-Lokus in *egl-1(lf)*-Tiere injiziert (Abb. 4.7). Diese Fragmente tragen die *egl-1*-Transkriptionseinheit mit den flankierenden 1036 bp stromaufwärts vom *egl-1* Start-Codon und definierten Sequenzen stromabwärts von *egl-1*. Somit wurden ausschließlich regulatorische Sequenzen des *egl-1*-Lokus in den verschiedenen Fragmenten verändert. Plasmid pBC119 enthält 3447 bp, pBC13 806 bp und pBC11 377 bp stromabwärts von *egl-1*. pBC149 enthält 377 bp stromabwärts von *egl-1*, an welche die sogenannte Region B, ein 350 bp-Fragment, etwa 3500 bp stromabwärts von *egl-1*, ligiert wurde. pBC165 enthält den *egl-1*-Lokus ohne Region B. Junge Erwachsene mit dem Genotyp *egl-1(n1084n3082) unc-76(e911); lin-15(n765ts) bcIs24* wurden jeweils mit pBC08 (2 ng/μl), pBC119 (1.5 ng/μl), pBC13 (1.1 ng/μl), pBC11 (1.1 ng/μl), pBC149 (1.1 ng/μl) und pBC165 (2 ng/μl) injiziert (3.6.5.3). Als Koinjektionsmarker diente p76-16B (75 ng/μl) (Ferguson und Horvitz, 1989), welches den *unc-76(lf)*-Phänotyp (unkoordinierte Fortbewegung) komplementiert und daher transgene Tiere kennzeichnet. Dabei wurden fünf Linien mit pBC08, acht Linien mit pBC119, vier Linien mit pBC13, fünf Linien mit pBC11, sieben Linien mit pBC149 und sechs Linien mit pBC165 als extrachromosomale DNA konstruiert.



**Abbildung 4.7: Schematische Darstellung des *egl-1*-Lokus und ausgewählte Fragmente.** Schematische Darstellung des *egl-1*-Lokus auf Chromosom V (Linkage Group (LG) V). pBC08 enthält die *egl-1*-Transkriptionseinheit, einschließlich 1036 bp stromaufwärts und 5575 bp stromabwärts angrenzende Sequenzen. pBC119 (3447 bp stromabwärts), pBC13 (806 bp stromabwärts), pBC11 (377 bp stromabwärts), pBC149 (Region B an pBC11 ligiert) und pBC165 (pBC08 ohne Region B) sind Fragmente des Plasmids pBC08.

#### 4.3.2 Untersuchung der NSM-Zellen und der NSM-Schwesterzellen in transgenen *egl-1(lf)*-Tieren

Die NSM-Zellen und ihre Schwesterzellen wurden in L4-Larven mit dem Genotyp *egl-1(n1084n3082) unc-76(e911); lin-15(n765ts) bcIs24[Ptph-1::gfp]* als GFP-positive Zellen im vorderen Bereich des Pharynx am Fluoreszenzmikroskop analysiert. Die Tiere exprimieren kein funktionales *egl-1*-Gen, programmierter Zelltod ist generell blockiert, und die NSM-Schwesterzellen überleben. Des Weiteren exprimieren sie den *gfp*-Marker unter anderem in den NSM-Zellen und ihren Schwesterzellen. Wie bereits beschrieben überleben in diesen Tieren 96 % der NSM-Schwesterzellen (Abb. 4.8). Im Vergleich dazu wurden *egl-1(lf)*-Tiere, welche die verschiedenen Fragmente des *egl-1*-Lokus (Abb. 4.7) als transgene DNA enthalten, analysiert. Eine Überlebensrate der NSM-Schwesterzellen von 50 % wurde als Schwelle für die Komplementation des Zelltod-Defekts festgelegt.



**Abbildung 4.8: Region B des *egl-1*-Lokus ist notwendig für die Zelltodspezifizierung der NSM-Schwesterzellen**

Die Plasmide pBC08, pBC119, pBC13, pBC11, pBC149 bzw. pBC165 wurden in *egl-1(lf)*-Tiere injiziert. Das Schicksal der NSM-Schwesterzellen wurde in zahlreichen unabhängigen Linien (4-8) untersucht (n = 100-240) und die Überlebensrate in % berechnet. Genotyp injizierter Tiere: *egl-1(n1084n3082) unc-76(e911) V; lin-15(n765ts) bclIs24 X*.

In transgenen *egl-1(lf)*-Tieren, die pBC08 als extrachromosomale DNA enthalten, überlebten die NSM-Schwesterzellen mit einer Rate zwischen 3 % und 33 % (6/6 Linien) (Abb. 4.8). pBC08 enthält somit die notwendigen Informationen, um *egl-1* in den NSM-Schwesterzellen zu exprimieren und den Zelltod-Defekt zu komplementieren. pBC119 und pBC149 komplementierten ebenfalls den Zelltod-Defekt von *egl-1(lf)*-Tieren (8/8 Linien und 4/7 Linien) (Abb. 4.8). Beide Plasmide tragen Sequenzen stromabwärts von *egl-1*, die ein etwa 350-bp-Fragment, die sogenannte

Region B, beinhalten (Abb. 4.7). Im Gegensatz dazu überlebten die NSM-Schwesterzellen in *egl-1(lf)*-Tieren, die pBC13, pBC11 oder pBC165 enthalten (4/4 Linien, 5/5 Linien und 6/6 Linien). Diese Plasmide verfügen nicht über die erforderlichen Informationen, um *egl-1* in den NSM-Schwesterzellen zu exprimieren. Die Ergebnisse dieser Experimente zeigen, dass Region B im *egl-1*-Lokus notwendig ist, um den Zelltod-Defekt der NSM-Schwesterzellen in *egl-1(lf)*-Tieren zu komplementieren. Es ist anzunehmen, dass Region B die *cis*-regulatorischen Sequenzen enthält, die für die *egl-1*-Expression in den NSM-Schwesterzellen notwendig sind.

#### 4.3.3 Region B enthält vier Konsensus-Sequenzen für Snail-Bindeproteine

Ein Vergleich der Sequenzen des *egl-1*-Lokus von *C. elegans* und *C. briggsae* hat umfangreiche Sequenz-Homologien in der Region B gezeigt (Abb. 4.9). In der etwa 350 bp-langen Region B sind 76 % der Nukleotide identisch. Es wurde bereits gezeigt, dass Sequenz-Homologien zwischen diesen zwei *Caenorhabditis*-Arten einen ersten Hinweis für funktional relevante regulatorische Bereiche darstellen (Heschl und Baillie, 1990). Nach einer genaueren Prüfung der Sequenzen wurde festgestellt, dass Region B vier Konsensus-Sequenzen für Snail-Bindeproteine (5'-CACCTG-3') enthält (Mauhin *et al.*, 1993). Die Bindestellen I, II und IV sind zwischen *C. elegans* und *C. briggsae* vollständig konserviert, sechs von sechs Basen sind identisch. Die Bindestelle III hat fünf konservierte Nukleotide. Die Bindestellen I und II sind identisch mit der Konsensus-Sequenz für Snail-Proteine (5'-CACCTG-5'), während die Bindestellen III und IV jeweils eine Abweichung von der Konsensus-Sequenz aufweisen (5'-CATTCTG-3' bzw. 5'-CAGGCTG-3'). CES-1 gehört zur Snail-Familie von Zinkfinger-Transkriptionsfaktoren, und es wurde bereits gezeigt, dass CES-1 *in vitro* an die Konsensus-Sequenzen für Snail-Proteine bindet (Metzstein und Horvitz, 1999). Darüber hinaus befinden sich die genannten Bindestellen in einer konservierten Region und sind daher wahrscheinlich funktional relevant.

```

1
C. elegans ATCATC----CCAATATTTATGTACATATTGTCAA--TATTATGGTTACTCAA
C. briggsae ATCAACGCTTCCACTATTTATGTACATATTGTCAAATATTATGGTTACTCAA

I
C. elegans CCCACCTGTGCCAACACAAATGTTTCCCTAGCTGTCACCTAAACTTGAATTTAG
C. briggsae CCCACCTGTGCCAACAAAATGTTTCCGTAGCTGTCACCTAACCCCGTTCTCAG

C. elegans GTGGTGTTTGTTATGTTTACACAACTCCCCCTCCGATCATCCGCTTAATTAGT
C. briggsae T-----TTTGTATGTTTACTCAA-----CTCCGATCATCCGCTTAATTAGT

C. elegans C-AAGTGAATAGGGGGAGAATGGAAGGAGAAGCTGGGTGGTAGAACAA--ATG
C. briggsae TGAATTGAGGAAGGAGAAGCTGGTTCTATGGTTGTGTACTACTACTACAATG

II
C. elegans ATTAGCACCTGTTTCTGGTCTCGCGCAATACTAATTGACACTGGATTCCCGGA
C. briggsae ATTAGCACCTGTTTCT-----CGCGCAATCCTAATTGAC-----CTCCGGA

III
C. elegans TCGGATGCCTGTTGGAAGATTGAGTTCATCTGTTGTAATTCATGATATTTGA
C. briggsae TCGGATGCCTG-----GGGTGGAGAACATCCGTTGTAATTTACGACATTTGA

IV
C. elegans TACGAACA-GAGAATG-----ACTTACAGCTGGGTGT--GGAGGATTTGGT
C. briggsae TATTTTATGTGTGTATTTTACTTACAGCTGGGTGTAAGGATAGGTGGGA
352

```

**Abbildung 4.9: Region B enthält vier zwischen *C. elegans* und *C. briggsae* konservierte Snail-Bindestellen**

Die zwischen *C. elegans* und *C. briggsae* homologen Sequenzen in Region B sind grau unterlegt. Die vier konservierten Snail-Bindestellen sind durch Kästen markiert.

#### 4.4 CES-1 bindet *in vitro* spezifisch an Region B im *egl-1*-Lokus

Um festzustellen ob CES-1 die *egl-1*-Transkription direkt, durch dessen Bindung an den *egl-1*-Promotor, blockiert, wurden Gelretardierungsexperimente (3.3.7) mit CES-1 und verschiedenen DNA-Proben durchgeführt.

##### 4.4.1 Amplifizierung der DNA-Proben

Plasmid pBC08 wurde als Matrize verwendet, um die Region B (350 bp), mit allen vier Snail-Bindestellen, mit den Oligonukleotiden *sense pegl-1/2* und *antisense pegl-1/3* zu amplifizieren. Ein 302-bp-Fragment der Region B, mit nur zwei Snail-Bindestellen (Bindestellen I und II), wurde mit den Oligonukleotiden *sense pegl-1/2* und *antisense pegl-1/2* amplifiziert. Eine zwischen *C. elegans* und *C. briggsae* konservierte Region des *ces-1*-Promotors enthält ebenfalls vier Snail-Bindestellen, an die CES-1 *in vitro* bindet (Metzstein und Horvitz, 1999). Die konservierte Region wurde mit den Oligonukleotiden *M13/Rev* und *M13/20* aus Plasmid pMM#101 (Metzstein und Horvitz, 1999) amplifiziert.

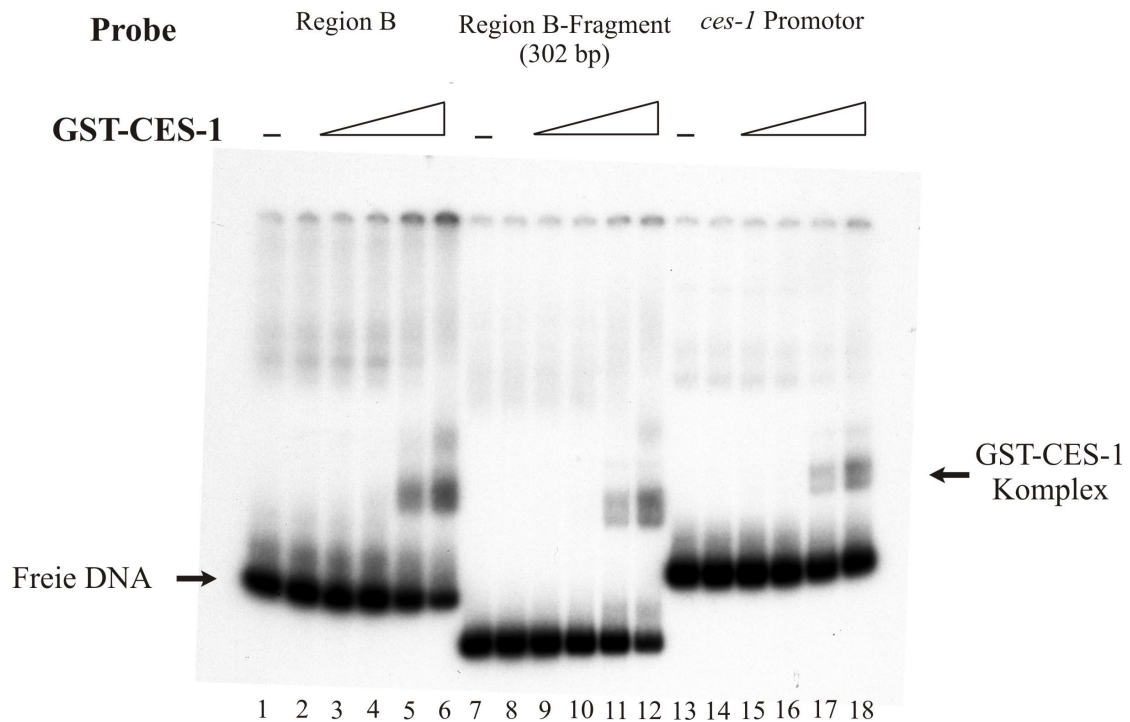
Um die Spezifität der DNA-Bindung zu prüfen, wurden die Snail-Bindestellen im *egl-1*-Lokus mittels PCR-Mutagenese (3.2.3.6) schrittweise mutiert. Mit den Oligonukleotiden *sense* und *antisense pegl-mut1* für die Bindestelle I, *sense* und

*antisense pegl-mut2* für die Bindestelle II, *sense* und *antisense pegl-mut3* für die Bindestelle III und *sense* und *antisense pegl-mut4* für die Bindestelle IV wurden alle vier Snail-Bindestellen schrittweise zu 5'-CATATA-3' mutiert. Plasmid pBC181, mit vier mutierten Snail-Bindestellen 5'-CATATA-3' in Region B, wurde als Matrize verwendet, um Region B bzw. das 302 bp-Fragment der Region B mit den beschriebenen Oligonukleotiden zu amplifizieren.

#### 4.4.2 Ein GST-CES-1 Fusionsprotein bindet *in vitro* an die Snail-Bindestellen

GST-CES-1-Fusionsproteine wurden in *E. coli* BL21(DE3) exprimiert und aufgereinigt (3.3.2). Die Konzentration der Proteinlösung wurde durch den Bradford-Test (Biorad) photometrisch bestimmt (3.3.4), und der GST-CES-1-Anteil auf einem SDS-Gel evaluiert. Die DNA-Proben (4.3.1) wurden mittels PCR mit  $\alpha^{32}\text{P}$ -markiertem dATP amplifiziert und anschließend auf einem 6 %-igen PAA-Gel getrennt und gereinigt (3.3.7.2). GST-CES-1 wurde in verschiedenen Verdünnungen mit einer konstanten Menge (5 ng) radioaktiv markierter DNA inkubiert und anschließend durch Gelelektrophorese auf einem 5 %-igen TGE-Gel aufgetrennt (3.3.7.3). Es konnte gezeigt werden, dass GST-CES-1 ab einer Proteinmenge von etwa 70 ng an Region B, an das Fragment der Region B mit nur zwei Snail-Bindestellen und an den *ces-1*-Promotor bindet (Abb. 4.10). Mit geringeren Proteinkonzentrationen wurde kein GST-CES-1-Komplex sichtbar. Des Weiteren ist die DNA-Bindung des GST-CES-1-Fusionsproteins spezifisch für CES-1, da GST bei einer Proteinmenge von etwa 140 ng an keine der analysierten DNA-Proben bindet.

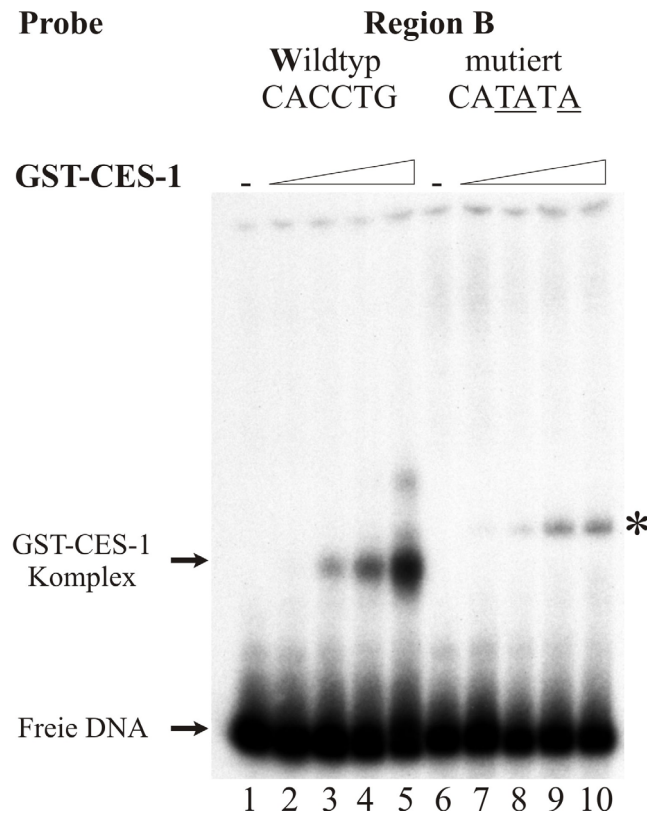




**Abbildung 4.10: GST-CES-1 bindet an DNA-Fragmente mit Snail-Bindestellen**

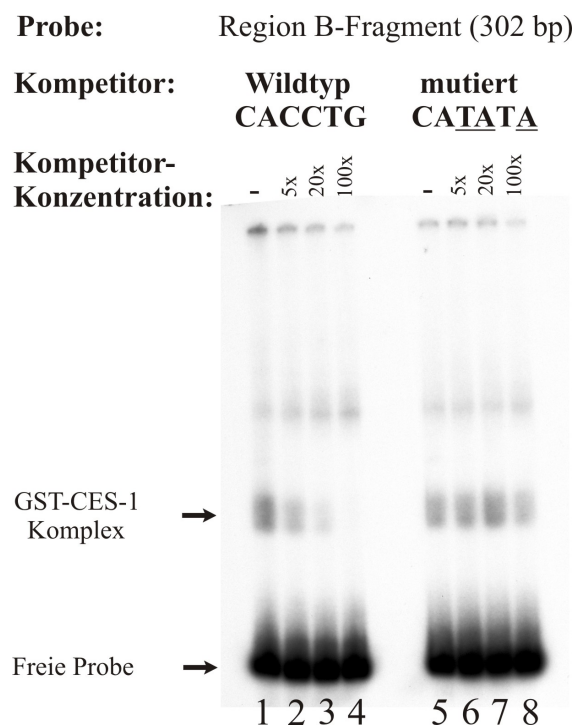
Steigende Proteinkonzentrationen des GST-CES-1-Fusionsproteins (0 ng [Bande 1, 7 und 13], 14 ng [Bande 3, 9 und 15], 28 ng [Bande 4, 10 und 16], 70 ng [Bande 5, 11 und 17], 140 ng [Bande 6, 12 und 18]) und 140 ng GST [Bande 2, 8 und 14] wurden mit je 5 ng radioaktiv markierter DNA (Region B mit vier Snail-Bindestellen [Bande 1 bis 6], Region B-Fragment mit zwei Snail-Bindestellen [Bande 7 bis 8] oder *ces-1*-Promotor mit vier Snail-Bindestellen [Bande 13 bis 18]) inkubiert.

Anschließend wurde überprüft, ob GST-CES-1 spezifisch an die vier Snail-Bindestellen bindet. Zu diesem Zweck wurde Region B mit den mutierten Bindestellen 5'-CATATA-3' in einem weiteren Experiment als Probe eingesetzt. Es konnte gezeigt werden, dass GST-CES-1 ab einer Proteinmenge von etwa 65 ng an Region B mit Wildtyp-Sequenzen bindet, jedoch nicht an Region B mit mutierten Snail-Bindestellen (Abb. 4.11).



**Abbildung 4.11: GST-CES-1 bindet *in vitro* spezifisch an die vier Snail-Bindestellen in Region B**  
 Steigende Konzentrationen des GST-CES-1-Fusionsproteins (0 ng [Bande 1 und 6], 43 ng [Bande 2 und 7], 65 ng [Bande 3 und 8], 86 ng [Bande 4 und 9], 108 ng [Bande 5 und 10]) wurden mit 5 ng radioaktiv markierter DNA (Region B mit vier Wildtyp-Snail-Bindestellen [Bande 1 bis 5] oder mit vier mutierten Snail-Bindestellen [Bande 6 bis 10]) inkubiert. \* markiert einen unspezifischen Komplex.

Um die Spezifität der beobachteten Bindungen zu untermauern, wurden ferner Kompetitionsanalysen mit unmarkierter DNA durchgeführt. Dabei wurden eine gleichbleibende Menge markierter DNA sowie Protein, und zudem steigende Konzentrationen unmarkierter DNA eingesetzt (Abb. 4.12). Falls unmarkierte DNA mit markierter DNA um die Protein-Bindung erfolgreich konkurriert, ist der Protein-DNA-Komplex auf einem Röntgenfilm nicht sichtbar. Unmarkierte Kompetitor-DNA mit intakten Snail-Bindestellen konkurriert mit der äquivalenten markierten Kompetitor-DNA bereits bei einem 5-fachen Überschuss (Abb. 4.12). Bei einem 100-fachen Überschuss an Kompetitor-DNA wurde die Bindung des Proteins an die markierte DNA ganz aufgehoben. Kompetitor-DNA mit mutierten Snail-Bindestellen führte erst bei einem 100-fachen Überschuss im Vergleich zur markierten Wildtyp-DNA-Probe zu einer schwachen Abnahme der GST-CES-1-Bindung. Die Ergebnisse dieser Experimente zeigen, dass bakteriell exprimierte CES-1-Proteine *in vitro* spezifisch an die Snail-Bindestellen in Region B binden.

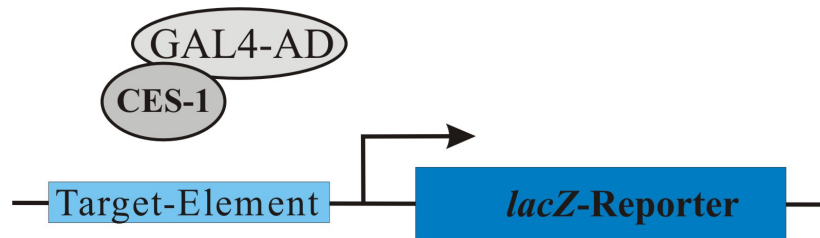


**Abbildung 4.12: Kompetitionsanalyse mit verschiedenen Fragmenten der Region B**

Konstante Mengen GST-CES-1 (70 ng) wurden mit 5 ng radioaktiv markierter DNA (Region B-Fragment mit zwei Wildtyp-Snail-Bindestellen) inkubiert. Unmarkierte Region B-Fragmente mit zwei Wildtyp-Snail-Bindestellen (Bande 1 bis 4 [0x, 10x, 20x, 100x]) bzw. mit mutierten Snail-Bindestellen (Bande 5 bis 8 [0x, 10x, 20x, 100x]) dienen als Kompetitor-DNA.

#### 4.4.3 CES-1-Bindung an Snail-Bindestellen im „Yeast one-hybrid“-System

Eine weitere Methode, die Interaktion zwischen CES-1 und den Snail-Bindestellen in Region B nachzuweisen, ist das „Yeast one-hybrid“-System (3.5.3) (Abb. 4.13). Die Expression eines Reportergens wie z. B. der  $\beta$ -Galaktosidase (*lacZ*) wird mit Hilfe von *cis*-regulatorischen Sequenzen wie z.B. Promotoren oder Protein-Bindestellen reguliert. Bindet ein Fusionsprotein, bestehend aus der GAL4-Aktivierungsdomäne (GAL4-AD) und einem DNA-Bindeprotein (z.B. CES-1), an die *cis*-regulatorischen Sequenzen (Target-Element), wird die *lacZ*-Expression aktiviert. Die Aktivität der  $\beta$ -Galaktosidase kann durch Zugabe des synthetischen Substrats X-Gal nachgewiesen werden. Das Enzym spaltet das X-Gal zu einem unlöslichen blauen Farbstoff.



**Abbildung 4.13: Nachweis von DNA-Protein-Interaktionen mit Hilfe des „Yeast one-hybrid“-Systems**

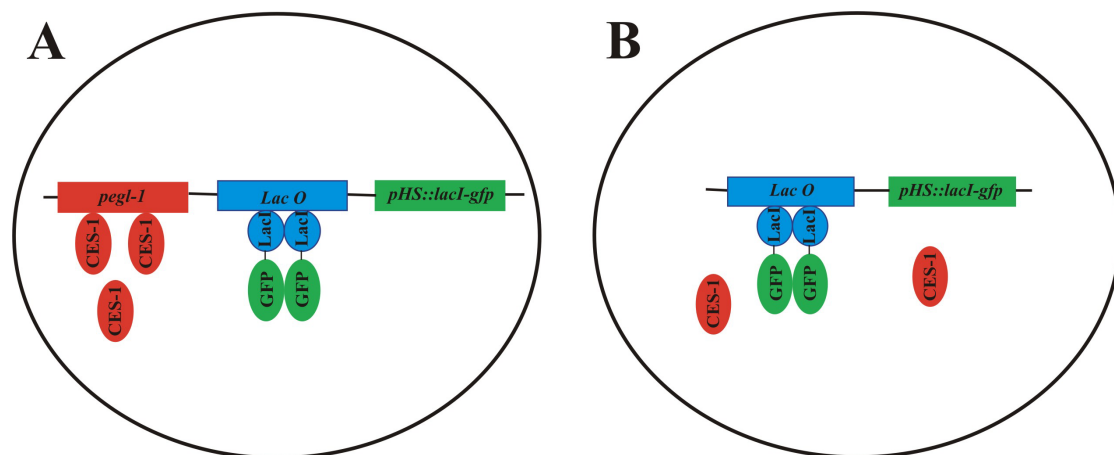
Ein Fusionsprotein, bestehend aus der GAL4-Aktivierungsdomäne und der CES-1 DNA-Bindedomäne (CES-1-GAL4-AD), aktiviert nach dessen Target-DNA-Bindung die Expression des *lacZ*-Reportergens.

Die konstruierten *lacZ*-Reporterplasmide pBC174, pBC179, pBC185, pBC195, pBC186 und pBC187 (3.1.7) enthalten unterschiedliche Target-Elemente: Region B (pBC174), Region B mit mutierten (5'-CATATA-3') Snail-Bindestellen (pBC179), ein Triplet aufeinander folgender Snail-Bindestellen (pBC185), ein Triplet aufeinander folgender mutierter (5'-CATATA-3') Snail-Bindestellen (pBC195), ein 302 bp-Fragment der Region B mit den Snail-Bindestellen I und II (pBC186) und ein 163 bp-Fragment der Region B mit den Snail-Bindestellen III und IV (pBC187). Nach Linearisierung der Plasmide wurden sie mittels LiAc-Transformation (3.5.2) in das Genom des Hefestammes YM4271 integriert. Die Integration dieser Plasmide stellte den mutierten *URA3*-Lokus (Integrationsmarker) im Hefegenom infolge homologer Rekombination mit dem intakten *URA3*-Lokus des *lacZ*-Reporterplasmids wieder her. Auf Minimalmedium (3.1.11) ohne Uracil kann nach Integranten selektiert werden. Die generierten Stämme YM174 (pBC174), YM179 (pBC179), YM185 (pBC185), YM195 (pBC195), YM186 (pBC186) und YM187 (pBC187) haben die entsprechenden Plasmide ins Hefegenom integriert und wurden auf Selektionsmedium bei 30°C kultiviert. Die Expressionsplasmide für das *ces-1*-Gen pBC173 (*ces-1* cDNA) und pBC232 (*ces-1* Zinkfinger cDNA) exprimieren CES-1 als Fusionsprotein mit GAL4-AD und *LEU2* als Selektionmarker. Sie wurden in die konstruierten Hefestämme transformiert und auf Minimalmedium ohne Uracil und Leucin kultiviert. Anschließend wurde die Aktivierung der  $\beta$ -Galaktosidase, als Folge der Protein-DNA-Interaktion, untersucht. Es konnte jedoch nicht nachgewiesen werden ob CES-1 oder die CES-1-Zinkfinger alleine an Region B, an das 302 bp-Fragment der Region B mit den Snail-Bindestellen I und II oder an das 163 bp-Fragment der Region B mit den Snail-Bindestellen III und IV binden. Es wurde keine  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität nachgewiesen. Allerdings zeigte der Hefestamm YM185,

mit einem Tripletts aufeinander folgender Snail-Bindestellen als Target-Element, nach der Induktion mit X-Gal sogar ohne CES-1-GAL4-AD eine Blaufärbung.

#### 4.4.4 CES-1 Bindung an den *egl-1*-Promotor in extrachromosomalen Elementen

Um die CES-1-Bindung an den *egl-1*-Promotor *in vivo* mit Antikörpern darzustellen, wurde eine von Carmi *et al.* beschriebene Methode verwendet (Carmi *et al.*, 1998). Nach dieser Methode (Abb. 4.14A) konstruiert man transgene Tiere, die den *egl-1*-Promotor, 32 aufeinander folgende DNA-Bindestellen (*lacO*-Sequenzen) für den Lac-Repressor (LacI) und das *lacI-gfp*-Fusionsgen unter der Kontrolle eines hitze-induzierbaren Promotors (*pHS::lacI-gfp*) auf extrachromosomalen Elementen tragen. Wird die Expression des LacI-GFP-Fusionsproteins induziert, bindet es an die *lacO*-Sequenzen der extrachromosomalen Elemente. Falls nun endogenes CES-1-Protein an die *egl-1*-Promotor-Sequenzen der zahlreichen extrachromosomalen Elemente bindet, kann dies durch Kolokalisation von anti-CES-1-AK und anti-GFP-AK in fixierten Embryonen gezeigt werden. In transgenen Tieren, denen der *egl-1*-Promotor fehlt, und die nur die *lacO*-Sequenzen und *pHS::lacI-gfp* exprimieren (Abb. 4.14B), wird keine Kolokalisation von anti-CES-1-AK und anti-GFP-AK erwartet.

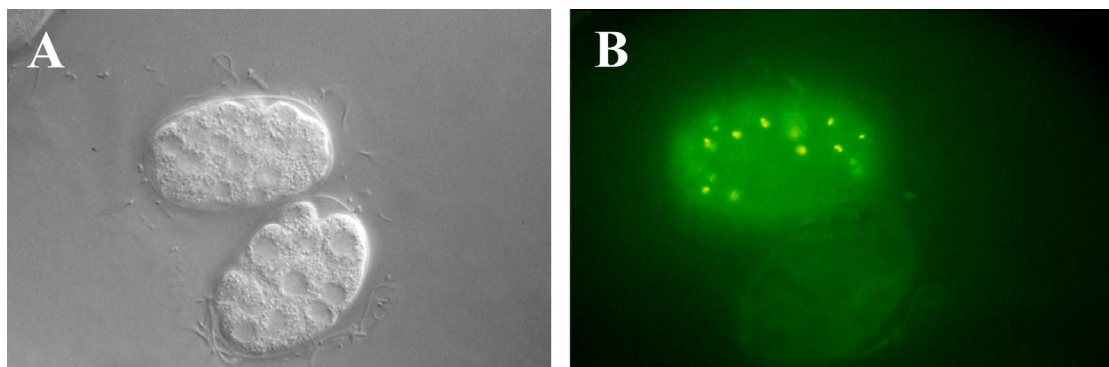


**Abbildung 4.14: Modell-Experiment für die CES-1-Bindung an den *egl-1*-Promotor**

Extrachromosomale Elemente in den Zellkernen transgener Tiere tragen den *egl-1*-Promotor, 32 aufeinander folgende DNA-Bindestellen (*lacO*-Sequenzen) für den Lac-Repressor (LacI) und das *lacI-gfp*-Fusionsgen unter der Kontrolle eines hitzeinduzierbaren Promotors (*pHS::lacI-gfp*). Die Bindung des LacI-GFP-Fusionsproteins an die *lacO*-Sequenzen der extrachromosomalen Elemente wird mit anti-GFP-AK gezeigt. Falls endogenes CES-1-Protein an den *egl-1*-Promotor der extrachromosomalen Elemente bindet, kann dies durch Kolokalisation von anti-CES-1-AK und anti-GFP-AK gezeigt werden (A). Ist der *egl-1*-Promotor nicht auf extrachromosomalen Elementen enthalten (B), werden anti-CES-1-AK und anti-GFP-AK nicht kolokalisieren.

Zuerst wurden durch Injektion von DNA (3.6.5.2) transgene Tiere konstruiert, welche die Plasmide pHS49.78::GFP-lacI (*pHS::lacI-gfp*), pSV-dhfr 8.32 (*lacO*-Sequenzen), pSC38 (*egl-1*-Promotor) und pRF-4 (*rol-6(su1006dm)*) als Koinjektionsmarker (Kramer *et al.*, 1990) auf extrachromosomalen Elementen enthalten. Dabei wurden zehn unabhängige Linien erhalten. Als Kontrolle wurden transgene Tiere für *pHS::lacI-gfp*, *lacO*-Sequenzen, *rol-6(su1006dm)* ohne den *egl-1*-Promotor generiert. Dabei wurden elf unabhängige Linien erhalten.

Durch Inkubation transgener Tiere bei 27°C bis 30°C (Hitze-Schock) wurde die Expression des LacI-GFP-Fusionsproteins induziert. Da die extrachromosomalen Elemente zahlreiche Kopien der injizierten Plasmide tragen, wurden die LacI-GFP-Proteine, die an die *lacO*-Sequenzen binden, in lebenden Embryonen als intensiv fluoreszierende Punkte beobachtet (Abb. 4.15). Auf diese Weise wurde die extrachromosomale DNA mit GFP markiert.



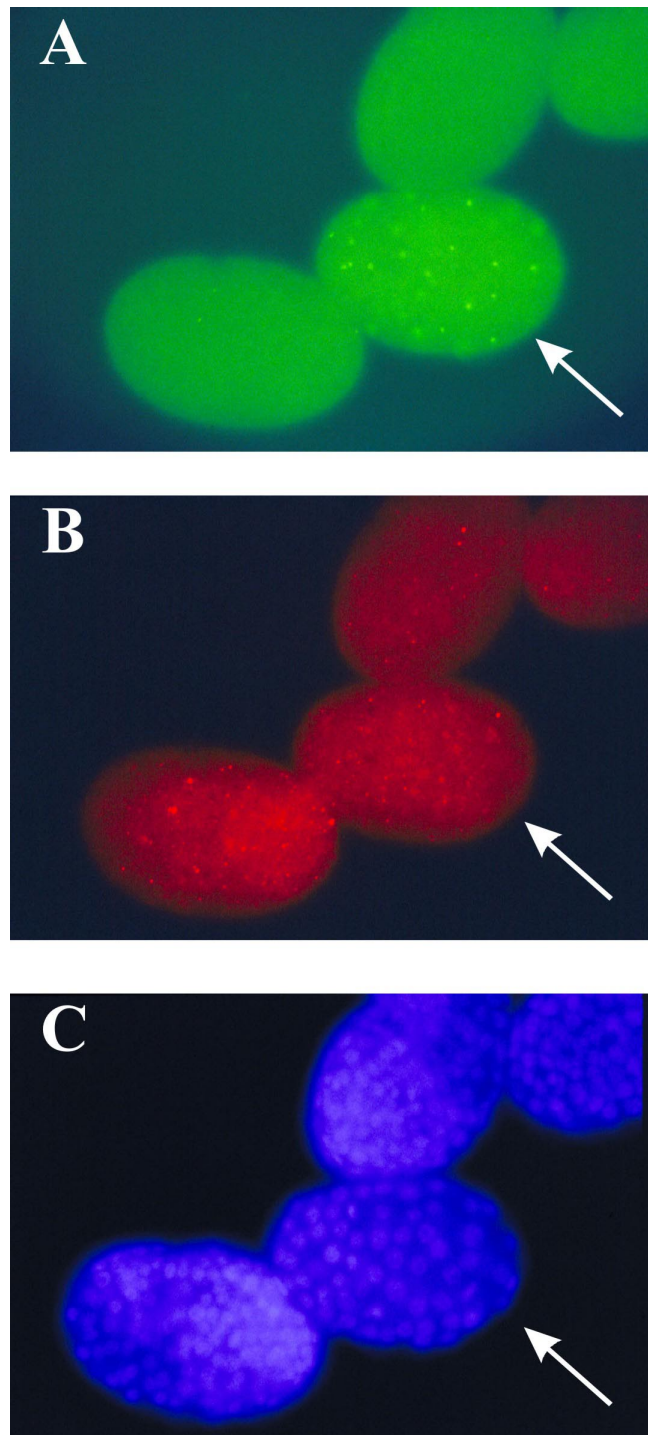
**Abbildung 4.15: Extrachromosomale Elemente in Zellkernen lebender Embryonen**

Aufnahmen lebender Embryonen, welche das *lacI-gfp*-Gen exprimieren. Nomarski-Aufnahme (A) und Fluoreszenzmikroskopie (B) eines transgenen und eines nicht-transgenen Embryonen. Die Bindung der Fusionsproteine an die *lacO*-Sequenzen extrachromosomaler Elemente ist in den transgenen Embryonen als fluoreszierende Punkte erkennbar.

Um die Bindung endogenen CES-1-Proteins an den *egl-1*-Promotor und dessen Kolokalisation mit LacI-GFP zu überprüfen, wurden transgene Tiere fixiert und mit anti-CES-1-AK und anti-GFP-AK gefärbt (3.1.4, 3.4.3.1). Die Bindung der LacI-GFP-Fusionsproteine an die *lacO*-Sequenzen der extrachromosomalen DNA wurde in den transgenen Embryonen als fluoreszierende Punkte deutlich erkennbar (Abb. 4.16A). Die CES-1-Färbung zeigte ein gepunktetes Muster, mit vielen, verschieden intensiv fluoreszierenden Punkten (Abb. 4.16B), welches bei den Färbungen von Wildtyp-Tieren mit CES-1-AK nicht beobachtet wurde (4.2.1, Abb. 4.4). Bei den Doppelmarkierungen mit anti-CES-1-AK und anti-GFP-AK konnte

---

keine Kollokalisierung beobachtet werden. Beim Vergleich der CES-1-Färbung in transgenen Embryonen mit bzw. ohne *egl-1*-Promotor auf extrachromosomalen Elementen konnte kein Unterschied festgestellt werden. Es besteht daher die Möglichkeit, dass es sich bei der beobachteten „punktierten“ CES-1-Färbung um eine unspezifische Markierung handelt. Während eines weiteren Versuchs mit transgenen Linien, die in gleicher Weise, mit den Plasmiden pHS49.78::GFP-lacI (*pHS::lacI-gfp*), pSV-dhfr 8.32 (*lacO*-Sequenzen), mit bzw. ohne pSC38 (*egl-1*-Promotor), und an Stelle von pRF-4 (*rol-6(su1006dm)*) mit pL15EK (*lin-15(+)*) (Ferguson und Horvitz, 1989) als Koinjektionsmarker konstruiert wurden, wurde bei der CES-1-Färbung ebenfalls das oben beschriebene gepunktete Muster beobachtet (Ergebnisse nicht gezeigt). Mit dieser Methode konnte *in vivo* nicht gezeigt werden, ob CES-1 an Sequenzen im *egl-1*-Lokus bindet.



**Abbildung 4.16: Lokalisation von anti-GFP-AK und anti-CES-1-AK in transgenen Embryonen**  
AK-Färbungen fixierter Embryonen. Weißer Pfeil markiert einen Embryo (~ 350 Zellstadium), der für die Plasmide pHS49.78::GFP-lacI (*pHS::lacI-gfp*), pSV-dhfr 8.32 (*lacO*-Sequenzen), pRF-4 (*rol-6(su1006dm)*) und pSC38 (*egl-1*-Promotor) transgen ist. Anti-GFP-AK-Färbung (A), anti-CES-1-AK-Färbung (B) und DAPI-Färbung (C) fixierter Embryonen. Die Bindung der LacI-GFP-Fusionsproteine an die *lacO*-Sequenzen extrachromosomaler Elemente ist in den transgenen Embryonen als fluoreszierende Punkte erkennbar (A).



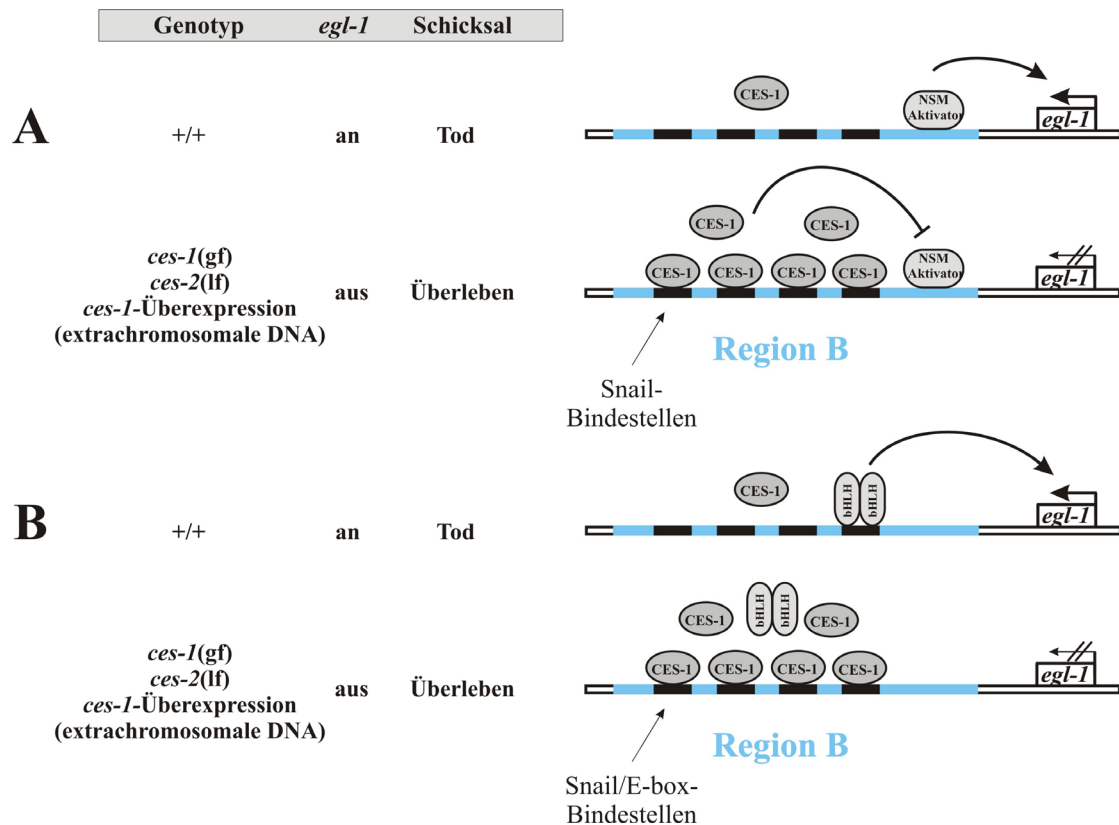
## 4.5 Funktionale Snail-Bindestellen in Region B sind für die Zelltodspezifizierung der NSM-Schwesterzellen notwendig

### 4.5.1 Modell für die Zelltodspezifizierung der NSM-Schwesterzellen

Es wurde *in vivo* gezeigt, dass Region B im *egl-1*-Lokus für die *egl-1*-Expression in den NSM-Schwesterzellen notwendig ist (4.3.2). Darüber hinaus bindet CES-1 *in vitro* spezifisch an die vier Snail-Bindestellen in Region B (4.4.2). Eine *ces-1(lf)*-Mutation ruft jedoch keinen erkennbaren Phänotyp hervor (Ellis und Horvitz, 1991; Metzstein und Horvitz, 1999). Überexpression des Proteins als Folge einer *ces-1(n703sd)*-Mutation führt zum Überleben der NSM-Schwesterzellen und der I2-Schwesterzellen, die *ces-1(gf)*-Mutation hat aber keine erkennbaren Auswirkungen in den übrigen CES-1-exprimierenden Zellen (Ellis und Horvitz, 1991). Infolge dieser Ergebnisse stellte sich die Frage nach weiteren Faktoren, die für die Aktivierung des programmierten Zelltods der NSM-Schwesterzellen notwendig sind und ebenfalls durch Region B wirken. Basierend auf den bisherigen Daten wurde ein Modell aufgestellt (Abb. 4.17A), wonach in Wildtyp-Tieren in den NSM-Schwesterzellen ein spezifischer Aktivator an Region B bindet, welcher die *egl-1*-Expression aktiviert und zum Tod der NSM-Schwesterzellen führt. Eine *ces-1(gf)*-Mutation oder eine *ces-2(lf)*-Mutation führten zum Überleben der NSM-Schwesterzellen, ebenso wie die Überexpression von *ces-1* durch dessen Expression auf extrachromosomalen Elementen, unter der Kontrolle des endogenen Promotors (Ellis und Horvitz, 1991; Metzstein und Horvitz, 1999) (4.1.4). Erhöhte CES-1-Proteinmenge, aufgrund einer *ces-1(gf)*-Mutation, einer *ces-2(lf)*-Mutation oder der Überexpression von *ces-1*, führt in den NSM-Schwesterzellen, gemäß dem Modell, zur CES-1-Bindung an die Snail-Bindestellen in Region B und zur Blockierung eines NSM-spezifischen Aktivators. Folglich wird *egl-1* nicht exprimiert, und die NSM-Schwesterzellen überleben.

Die Snail-Bindestellen 5'-CACCTG-3' in Region B repräsentieren sogenannte E-box-Motive (5'-CANNTG-3') (Mauhin *et al.*, 1993). Diese DNA-Bindemotive sind Konsensus-Bindestellen für "basic helix-loop-helix" (bHLH)-Transkriptionsfaktoren (Villares und Cabrera, 1987), die vor allem als Aktivatoren fungieren (Massari und Murre, 2000). bHLH-Proteine bilden funktionale Homo- oder Heterodimere und haben regulatorische Funktionen in der Determinierung und Differenzierung

verschiedener Zelltypen, unter anderem auch in neuronalen Vorläuferzellen und Neuronen. Des Weiteren wurde *in vitro* gezeigt, dass Snail-Transkriptionsfaktoren antagonistisch zu bHLH-Proteinen wirken, besonders zu Daughterless/Achaete-Scute-Heterodimeren, eine Untergruppe der bHLH-Proteine, indem sie um die gemeinsamen Bindestellen konkurrieren (Fuse *et al.*, 1994), (Fuse *et al.*, 1999), (Kataoka *et al.*, 2000). Somit ist es möglich, dass bHLH-Proteine an der Spezifikation des Zelltods der NSM-Schwesterzellen mitwirken. Es wurde daher analysiert, ob *C. elegans* bHLH-Proteine der Gruppe Daughterless und Achaete-Scute bei der Regulierung des Zelltods der NSM-Schwesterzellen eine Rolle spielen (J. Hatzold). Es wurde gezeigt, dass die bHLH-Gene *hlh-2* (Daughterless-ähnlich) und *hlh-3* (Achaete-Scute-ähnlich) für den programmierten Zelltod der NSM-Schwesterzellen notwendig sind, und dass sie genetisch nach *ces-1* wirken (J. Hatzold, pers. Mitteilung). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass HLH-2/HLH-3-Heterodimere *in vitro* spezifisch an die Snail-Bindestellen in Region B binden (J. Hatzold, pers. Mitteilung). HLH-2 und HLH-3 agieren möglicherweise als direkte Aktivatoren der *egl-1*-Transkription und führen durch deren Bindung an die Snail/E-box-Bindestellen in Region B zum Tod der NSM-Schwesterzellen (Abb. 4.17B). Infolge der *ces-1*-Überexpression in *ces-1(gf)*-Tieren bzw. in *ces-2(lf)*-Tieren konkurriert der Repressor CES-1 möglicherweise mit dem potentiellen Aktivator HLH-2/HLH-3 um die Bindung an die Snail/E-box-Bindestellen in Region B und blockiert dadurch die *egl-1*-Expression in diesen Mutanten. Mit den folgenden Experimenten soll dieses Modell der Zelltodspezifizierung der NSM-Schwesterzellen analysiert werden.



**Abbildung 4.17: Model der Zelltodspezifizierung der NSM-Schwesterzellen**

In Wildtyp-Tieren (+/+) wird CES-1 in den NSM-Schwesterzellen nur in geringen Mengen exprimiert. Eine *ces-1(gf)*-Mutation, eine *ces-2(lf)*-Mutation oder *ces-1*-Expression auf extrachromosomalen DNA-Elementen, unter der Kontrolle des endogenen Promotors, führen zur Überexpression des Proteins, unter anderem in den NSM-Schwesterzellen.

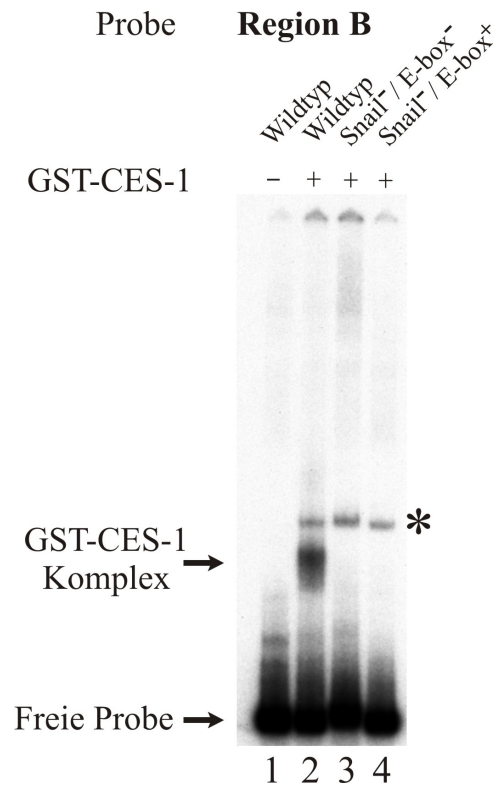
(A) In Wildtyp-Tieren bindet ein NSM-spezifischer Aktivator an Region B, aktiviert die *egl-1*-Expression und führt zum Tod der Zellen. Aufgrund der *ces-1*-Überexpression wird der NSM-spezifische Aktivator durch CES-1-Bindung an die Snail-Bindestellen blockiert, woraufhin *egl-1* nicht aktiviert werden kann, und die Zellen überleben.

(B) In Wildtyp-Tieren bindet HLH-2/HLH-3 an die Snail/E-box-Bindestellen in Region B, aktiviert die *egl-1*-Expression und führt zum Tod der Zellen. Aufgrund der *ces-1*-Überexpression konkurriert CES-1 erfolgreich mit dem Aktivator HLH-2/HLH-3 um die Bindung an die gemeinsamen Bindestellen in Region B und blockiert dadurch die *egl-1*-Expression. Die NSM-Schwesterzellen überleben.

#### 4.5.2 Trennung der CES-1-Bindung und der bHLH-Bindung an die vier Snail/E-box-Bindestellen in Region B

Basierend auf bisherigen Ergebnissen wird vermutet, dass CES-1 als Repressor und HLH-2/HLH-3 als Aktivator der *egl-1*-Transkription wirkt, und zwar durch die Bindung an die gleichen Bindestellen in Region B des *egl-1*-Lokus. Um den Effekt der bHLH-Bindung an die vier Bindestellen in Region B in Abwesenheit der CES-1-Bindung zu untersuchen, wurden alle vier Snail-Bindestellen in pBC08 von 5'-CACCTG-3' zu 5'-CATATG-3' mittels PCR-Mutagenese (3.2.6.6) mutiert. Die Snail-Bindestellen, nicht aber die E-box-Motive 5'-CANNTG-3' wurden dadurch

unterbrochen. Mit den Oligonukleotiden *sense* und *antisense pegl-mutE1* für die Bindestelle I, *sense* und *antisense pegl-mutE2* für die Bindestelle II, *sense* und *antisense pegl-mutE3* für die Bindestelle III und *sense* und *antisense pegl-mutE4* für die Bindestelle IV wurden alle vier Snail-Bindestellen schrittweise zu 5'-CATATG-3' mutiert. Plamid pBC182 enthält demnach vier mutierte Snail-Bindestellen 5'-CATATG-3' in Region B. Für die folgenden Experimente wurden drei Variationen der Region B verwendet, und zwar die Wildtyp-Sequenz 5'-CACCTG-3' (Snail<sup>+</sup>/E-box<sup>+</sup>) und die mutierten Sequenzen 5'-CATATA-3' (Snail<sup>-</sup>/E-box<sup>-</sup>) (4.4.1) bzw. 5'-CATATG-3' (Snail<sup>-</sup>/E-box<sup>+</sup>). Wie bereits gezeigt bindet CES-1 *in vitro* an die Wildtyp-Sequenzen, nicht jedoch an die Snail<sup>-</sup>/E-box<sup>-</sup>-Sequenzen (4.3.2). Dasselbe gilt für HLH-2/HLH-3 (J. Hatzold, pers. Mitteilung). Es sollte *in vitro* untersucht werden, ob CES-1 an die mutierten Snail<sup>-</sup>/E-box<sup>+</sup>-Bindestellen bindet. Plasmide pBC08, pBC181 bzw. pBC182 wurden als Matrize verwendet, um die drei Varianten der Region B mit den Oligonukleotiden *sense pegl-1/2* und *antisense pegl-1/3* zu amplifizieren. In EMSAs konnte gezeigt werden, dass CES-1 *in vitro* ausschließlich an die Snail<sup>+</sup>/E-box<sup>+</sup>-Bindestellen 5'-CACCTG-3' bindet (Abb. 4.18). HLH-2/HLH-3-Heterodimere binden ausserdem ebenfalls an die Snail<sup>-</sup>/E-box<sup>+</sup>-Bindestellen, allerdings mit geringerer Affinität, im Vergleich zur Bindung an die Snail<sup>+</sup>/E-box<sup>+</sup>-Bindestellen (J. Hatzold, pers. Mitteilung). Somit wurde es möglich, die Snail-Bindestellen in Region B so zu verändern, dass *in vitro* nur HLH-2/HLH-3, nicht aber CES-1 an Region B bindet.



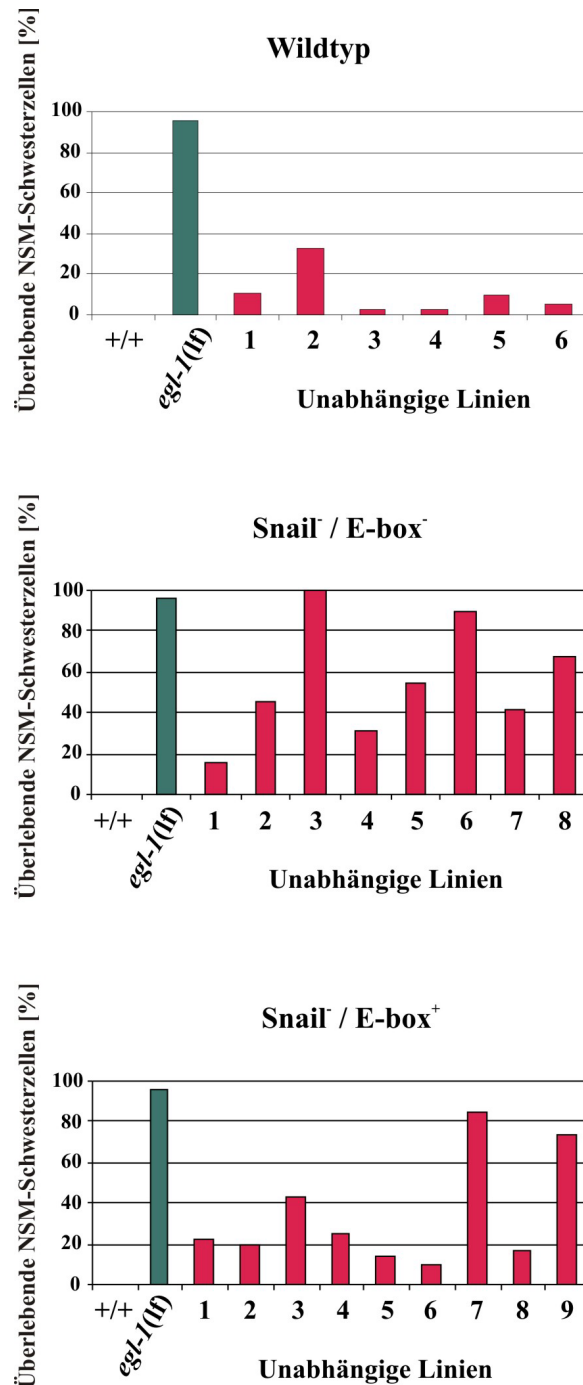
**Abbildung 4.18: GST-CES-1-Bindung an Region B mit ausgewählten Mutationen in den vier Snail-Bindestellen**

GST-CES-1-Fusionsproteine (0 ng [Bande 1], 86 ng [Banden 2-4]) wurden mit 5 ng radioaktiv markierter DNA (Region B mit vier Snail<sup>+</sup>/E-box<sup>+</sup>-Bindestellen 5'-CACCTG-3' [Bande 1 und 2], Region B mit vier Snail<sup>-</sup>/E-box<sup>-</sup>-Bindestellen 5'-CATATA-3' [Bande 3] bzw. Region B mit vier Snail<sup>-</sup>/E-box<sup>+</sup>-Bindestellen 5'-CATATG-3' [Bande 4]) inkubiert. \* markiert einen unspezifischen Komplex.

### 4.5.3 Funktionale Untersuchung der Snail-Bindestellen in Region B *in vivo*

Um die Funktion der Snail-Bindestellen in Region B *in vivo* zu analysieren, wurden *egl-1(lf)*-Tiere mit den Plasmiden pBC08, pBC181 bzw. pBC182 injiziert (3.6.5.2) und untersucht, ob der *egl-1(lf)*-Phänotyp komplementiert wird (Abb. 4.19). Eine Überlebensrate der NSM-Schwesterzellen von 50 % wurde als Schwelle für die Komplementation des Zelltod-Defekts festgelegt. In transgenen *egl-1(lf)*-Tieren, die pBC08 mit den Wildtyp Snail-Bindestellen als extrachromosomale DNA tragen, überlebten die NSM-Schwesterzellen in sechs von sechs unabhängigen Linien mit einer Rate zwischen 3 % und 33 % (4.3.2). Mit pBC181, welches den *egl-1*-Lokus mit vier Snail<sup>-</sup>/E-box<sup>-</sup>-Bindestellen in Region B enthält, wurden acht unabhängige Linien etabliert. Mit pBC182, welches den *egl-1*-Lokus mit vier Snail<sup>-</sup>/E-box<sup>+</sup>-Bindestellen in Region B enthält, wurden neun unabhängige Linien etabliert. In transgenen Tieren, die pBC181 als extrachromosomale DNA tragen, überlebten die

NSM-Schwesterzellen in vier von acht Linien mit einer Rate zwischen 16 % und 45 %. In weiteren vier Linien lag die Überlebensrate zwischen 54 % und 100 % (Abb. 4.19). *In vitro* bindet HLH-2/HLH-3 nicht an diese Bindestellen (J. Hatzold, pers. Mitteilung). Die Aktivierung der *egl-1*-Expression und somit der Tod der NSM-Schwesterzellen wurde nicht erwartet, falls HLH-2/HLH-3 *in vivo* auch nicht an die Snail/E-box<sup>-</sup>- Bindestellen bindet. In transgenen Tieren, die pBC182 als extrachromosomale DNA tragen, überlebten die NSM-Schwesterzellen in zwei Linien mit einer Rate von 73 % und 85 %, in den übrigen sieben Linien wurde der *egl-1(lf)*-Phänotyp komplementiert (Überlebensrate zwischen 10 % und 43 %) (Abb. 4.19). *In vitro* bindet HLH-2/HLH-3 an diese Bindestellen, wenn auch mit geringerer Affinität als an die Wildtyp-Bindestellen (J. Hatzold, pers. Mitteilung). Die Aktivierung der *egl-1*-Expression und somit der Tod der NSM-Schwesterzellen wurde erwartet, falls HLH-2/HLH-3 auch *in vivo* an die Snail/E-box<sup>+</sup>-Bindestellen bindet. Ein möglicher Grund dafür, dass sich die unabhängigen Linien so unterschiedlich verhalten, ist die Kopiezahl des *egl-1*-Lokus auf extrachromosomalen Elementen. Transgene Tiere tragen zahlreiche Kopien der injizierten Plasmide, und die Aktivierung eines einzigen *egl-1*-Gens würde für die Aktivierung der Zelltodmaschinerie bereits ausreichen. Mit dieser Methode, der Injektion von DNA in die Gonaden der Tiere (3.6.5.2), kann man die Anzahl der Kopien, die in transgenen Tieren enthalten sind, nicht beeinflussen.



**Abbildung 4.19: Komplementation des *egl-1(lf)*-Phänotyps mit pBC08, pBC181 bzw. pBC182**  
 Die Plasmide pBC08 (Wildtyp-Bindestellen) pBC181 (Snail/E-box<sup>-</sup>-Bindestellen) und pBC182 (Snail/E-box<sup>+</sup>-Bindestellen) wurden in *egl-1(lf)*-Tiere injiziert. Das Schicksal der NSM-Schwesterzellen wurde in zahlreichen unabhängigen Linien untersucht und die Überlebensrate in % berechnet (n = 100-128). Genotyp injizierter Tiere: *egl-1(n1084n3082) unc-76(e911) V; lin-15(n765ts) bclIs24 X*.

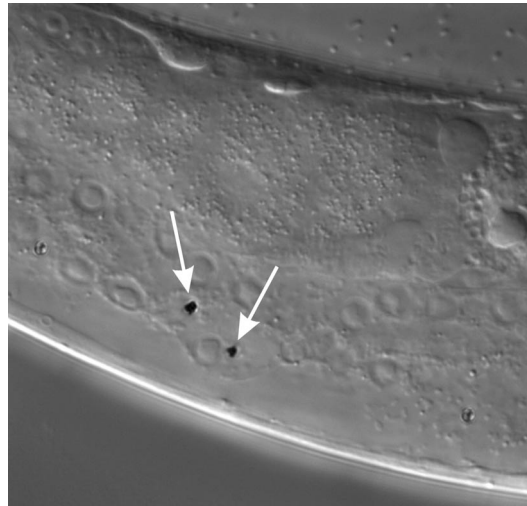
#### 4.5.4 Transformation von *C. elegans* durch „Microparticle Bombardment“

Die Transformation von *C. elegans* durch dessen Beschießung mit DNA-beschichteten Goldpartikeln („microparticle bombardment“) (3.6.5.4) hat zur Folge, dass wenige

oder sogar nur einzelne Plasmide ins Genom von *C. elegans* integriert werden (Praitis *et al.*, 2001). Damit kann man unerwünschte Effekte, aufgrund der Überexpression injizierter DNA, verringern bzw. eliminieren. Um diese Methode zu etablieren wurden *unc-119(lf)*-Tiere wie beschrieben (3.6.5.4) mit 1 µg/µl pMM#051 (*unc-119(+)*) beschossen. *unc-119(lf)*-Tiere entwickeln kein Dauerlarven-Stadium und können daher auf Platten ohne Bakterien nicht überleben (Maduro und Pilgrim, 1995). Es sollte analysiert werden, ob der *unc-119(lf)*-Phänotyp mit pMM#051 komplementiert werden kann. Insgesamt 30 Platten mit jeweils etwa 10.000 L4-Hermaphroditen wurden mit dem Marker-Plasmid pMM#051 beschossen (Abb. 4.20). Nach etwa 10 Tagen Inkubation bei 20°C waren die Kulturplatten frei von Bakterien und die Würmer verhungert. Nur transgene F1-Tiere, die den *unc-119(lf)*-Phänotyp komplementierten, überlebten und wurden einzeln auf frische Kulturplatten transferiert. Von insgesamt etwa 300.000 beschossenen Hermaphroditen wurden sieben unabhängige Linien erhalten. In drei von sieben Linien wurde das Plasmid wahrscheinlich ins Genom integriert, da 100 % der Nachkommen den *unc-119(lf)*-Phänotyp komplementierten. Diese Methode sollte nun dafür verwendet werden, um wenige bzw. nur eine Kopie des *egl-1*-Lokus ins Genom von *egl-1(lf)*-Tieren zu integrieren. Zu diesem Zweck sollte das Plasmid pBC224, welches sowohl den *egl-1*-Lokus als auch *unc-119(+)* enthält, mittels „microparticle bombardment“ in *unc-119(lf); egl-1(lf)*-Tiere transformiert werden. Während zahlreichen Versuchen wurde von insgesamt etwa 600.000 beschossenen Tieren keine Linie erhalten, die den *unc-119(lf)*-Phänotyp komplementierte. Daraufhin wurden Goldpartikel mit einer DNA-Lösung aus pMM#051 (*unc-119(+)*) und pBC08 (*egl-1*-Lokus) beschichtet, und etwa 320.000 Hermaphroditen damit beschossen. Vier unabhängige Linien wurden etabliert (MD887, MD888, MD889 und MD890), die den *unc-119(lf)*-Phänotyp komplementierten. In MD887 waren 100 % der Nachkommen nicht-Unc, pMM#051 wurde vermutlich ins Genom integriert. Die Überlebensrate der NSM-Schwesterzellen lag bei 6 %, der *egl-1(lf)*-Phänotyp wurde somit ebenfalls komplementiert. In MD888 waren etwa 70 % der Nachkommen nicht-Unc, die Überlebensrate der NSM-Schwesterzellen lag ebenfalls bei 6 %, der *egl-1(lf)*-Phänotyp wurde daher komplementiert. In MD889 waren nur etwa 30 % der Nachkommen nicht-Unc, die Überlebensrate der NSM-Schwesterzellen lag bei 3 %, der *egl-1(lf)*-Phänotyp wurde komplementiert. In MD890 waren etwa 60 % der Nachkommen nicht-Unc, die Überlebensrate der NSM-Schwesterzellen lag bei 94 %, der *egl-1(lf)*-Phänotyp wurde



nicht komplementiert, das Plasmid pBC08 wurde daher wahrscheinlich nicht transformiert. Mittels Kopplungsanalysen können die vier konstruierten Linien daraufhin analysiert werden, ob beide Plasmide ins Genom der Tiere integriert wurden und auf welches Chromosom sie integriert wurden.

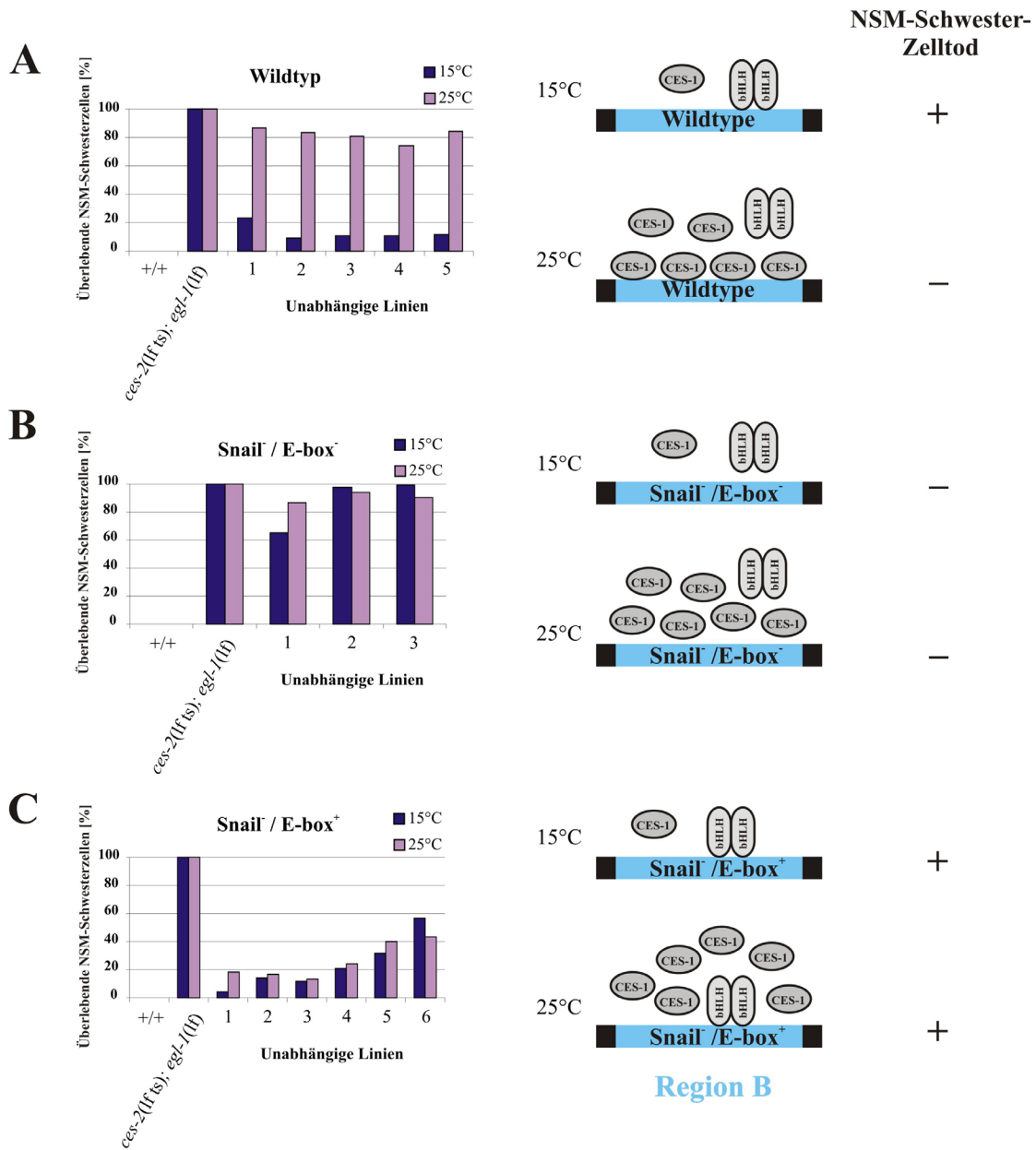


**Abbildung 4.20: Beschuss von *C. elegans* mit DNA-beschichteten Goldpartikeln**  
Goldpartikel in der Gonade von lebenden L4-Hermaphroditen (weiße Pfeile), etwa zwei Stunden nach deren Beschuss. Genotyp der Tiere: *unc-119(ed4)* III; *bcls25* IV; *egl-1(n1084n3082)* V.

#### 4.6 Programmierter Zelltod der NSM-Schwesterzellen wird durch CES-1 und HLH-2/HLH-3 über gemeinsame Bindestellen im *egl-1*-Lokus reguliert

Um die Funktion der Snail-Bindestellen in Region B *in vivo* ausführlicher zu untersuchen, wurden die Plasmide pBC08, pBC181 und pBC182 in *ces-2(n732ts)*; *egl-1(n1084n3082)*-Tiere injiziert (3.6.5.2), und anschließend wurde das Schicksal der NSM-Schwesterzellen in zahlreichen unabhängigen Linien untersucht (Abb. 4.21). Die *ces-2(n732ts)*-Mutation ist temperaturabhängig (Ellis und Horvitz, 1991; Metzstein, 1998), bei 15°C überlebten nur 13 % und bei 25°C 73 % der NSM-Schwesterzellen (Abb. 4.3). Bei 25°C führt die *ces-2(n732ts)*-Mutation nahezu zum Funktionsverlust des Gens, daher kann *ces-2* die *ces-1*-Expression nicht mehr negativ regulieren. Infolgedessen wird *ces-1* wahrscheinlich überexprimiert (Ellis und Horvitz, 1991; Metzstein, 1998). Kultiviert man nun transgene *ces-2(lf ts)*; *egl-1(lf)*-Tiere bei 15°C bzw. bei 25°C, kann der Effekt von Mutationen im *egl-1*-Lokus auf das Schicksal der NSM-Schwesterzellen bei unterschiedlichen

CES-1-Proteinmengen untersucht werden. Bei 15°C ist die CES-1-Expression wahrscheinlich nur gering beeinträchtigt, da die NSM-Schwesterzellen mit einer Rate von nur 13 % überleben (4.1.4). Die Auswirkungen der Mutationen in den Snail-Bindestellen der Region B auf das Schicksal der NSM-Schwesterzellen werden daher bezüglich der CES-1-Expression wahrscheinlich in einer Wildtyp-ähnlichen Situation untersucht. Bei 25°C hingegen wurde der Effekt der Wildtyp-Bindestellen (Snail<sup>+</sup>/E-box<sup>+</sup>) und der mutierten Bindestellen (Snail<sup>-</sup>/E-box<sup>-</sup> bzw. Snail<sup>-</sup>/E-box<sup>+</sup>) in Region B bei erhöhter CES-1-Konzentration analysiert, da die *ces-2(lf ts)*-Mutation bei 25°C nahezu zum Funktionsverlust des Gens führt. In transgenen *ces-2(lf ts); egl-1(lf)*-Tieren, die pBC08 mit den Snail<sup>+</sup>/E-box<sup>+</sup>-Bindestellen (wt) enthalten, wurde der durch die *egl-1(lf)*-Mutation verursachte Zelltod-Defekt bei 15°C in fünf von fünf unabhängigen Linien komplementiert (Überlebensrate 9 % - 23 %). Bei 25°C wurde der Zelltod-Defekt nicht komplementiert, die NSM-Schwesterzellen überlebten (74 % - 87 %) infolge der *ces-2(lf ts)*-Mutation, die bei 25°C zum programmierten Zelltod der NSM-Schwesterzellen führt. In transgenen *ces-2(lf ts); egl-1(lf)*-Tieren, die pBC181 mit den Snail<sup>-</sup>/E-box<sup>-</sup>-Bindestellen enthalten, wurde der Zelltod-Defekt in drei von drei Linien nicht komplementiert, die NSM-Schwesterzellen überlebten sowohl bei 15°C (65 % - 99 %) als auch bei 25°C (87 % - 94 %). Die *egl-1(lf)*-Mutation wurde weder bei 15°C noch bei 25°C komplementiert. Für die Aktivierung der *egl-1*-Transkription und der daraus folgenden Ausführung des programmierten Zelltods der NSM-Schwesterzellen sind daher funktionale Snail/E-box-Bindestellen notwendig. In transgenen *ces-2(lf ts); egl-1(lf)*-Tieren, die pBC182 mit den Snail<sup>-</sup>/E-box<sup>+</sup>-Bindestellen enthalten, wurde der Zelltod-Defekt in sechs von sechs Linien komplementiert, die NSM-Schwesterzellen starben sowohl bei 15°C (Überlebensrate 4 % - 57 %) als auch bei 25°C (Überlebensrate 18 % - 43 %). Die *egl-1(lf)*-Mutation wurde sowohl bei 15°C als auch bei 25°C komplementiert. Funktionale E-box-Bindestellen, die möglicherweise durch den Aktivator HLH-2/HLH-3 gebunden werden, nicht aber Snail-Bindestellen, sind für die Aktivierung der *egl-1*-Transkription und folglich den Zelltod der NSM-Schwesterzellen notwendig (Abb. 4.21). Für die Repression der *egl-1*-Transkription, wahrscheinlich durch erhöhte CES-1-Proteinmengen in einem *ces-2(lf ts)*-Hintergrund bei 25°C, sind funktionale Snail-Bindestellen notwendig, die wahrscheinlich durch den Repressor CES-1 gebunden werden.



**Abbildung 4.21: Funktionale E-box-Motive in Region B sind für die Aktivierung der *egl-1*-Expression notwendig**

Die Plasmide pBC08 (Snail<sup>+</sup>/E-box<sup>+</sup>-Bindestellen, wt) (A), pBC181 (Snail<sup>-</sup>/E-box<sup>-</sup>-Bindestellen) (B) und pBC182 (Snail/E-box<sup>+</sup>-Bindestellen) (C) wurden in *ces-2(lf ts); egl-1(lf)*-Tiere injiziert. Das Schicksal der NSM-Schwesterzellen wurde bei 15°C und bei 25°C in drei bis sechs unabhängigen Linien untersucht und die Überlebensrate in % berechnet (n = 60-222). Die Modelle verdeutlichen die zum Überleben oder Tod der NSM-Schwesterzellen führende Ereignisse. Genotyp injizierter Tiere: *ces-2(n732ts)* I; *bcIs25* IV; *egl-1(n1084n3082)* *unc-76(e911)* V.

## 5 Diskussion

### 5.1 Die *egl-1*-Expression wird in den NSM-Schwesterzellen transkriptional reguliert

Genetische und molekulare Untersuchungen haben gezeigt, dass *ces-1* und *ces-2* den programmierten Zelltod der NSM-Schwesterzellen kontrollieren (Ellis und Horvitz, 1991; Metzstein *et al.*, 1996; Metzstein und Horvitz, 1999). In einem für die NSM-Schwesterzellen zelltypspezifischen Regulationsweg für programmierten Zelltod wird *ces-1* durch *ces-2* negativ reguliert. *ces-1* hingegen blockiert die Funktion von *egl-1*, dem Gen, welches den zentralen Regulator der Zelltodmaschinerie codiert (Abb. 2.6), ein „BH3-only“-Zelltodaktivator der Bcl-2-Proteinfamilie (Chao und Korsmeyer, 1998; Conradt und Horvitz, 1998; Cory und Adams, 2002; Metzstein *et al.*, 1996; Metzstein und Horvitz, 1999). Die pro-apoptotische Funktion von „BH3-only“-Proteinen in verschiedenen Organismen wird durch transkriptionale und post-transkriptionale Mechanismen reguliert (Puthalakath und Strasser, 2002). EGL-1, das erste genetisch charakterisierte Mitglied dieser Familie, wird in den geschlechtsspezifischen HSN-Zellen transkriptional reguliert (Conradt und Horvitz, 1999). In Zellkultur wird die Expression der Säugetier-Gene *hrk/dp5* und *bim* aufgrund eines Mangels am Wachstumsfaktor NGF (NGF, nerve growth factor) wahrscheinlich durch die JNK-Kinase (JNK, c-jun N-terminal kinase) aktiviert (Bozyczko-Coyne *et al.*, 2001; Harris und Johnson, 2001). In sympathischen Neuronen führt die JNK-abhängige Aktivierung der *bim*-Expression zur Apoptose (Putcha *et al.*, 2001; Whitfield *et al.*, 2001). In Thymozyten und Fibroblasten wird infolge von DNA-Schäden die *Puma/Bbc3*- und die *Noxa*-Expression durch den Tumor-Suppressor p53 aktiviert (Han *et al.*, 2001; Nakano und Vousden, 2001; Oda *et al.*, 2000; Yu *et al.*, 2001). In *C. elegans* haben Untersuchungen der *gfp*-Expression unter der Kontrolle des *egl-1*-Promotors (*Pegl-1::gfp*) gezeigt, dass *gfp* ausschließlich in den NSM-Schwesterzellen, nicht aber in den NSM-Zellen exprimiert wird (J. Hatzold, pers. Mitteilung). Um die *gfp*-Expression in den „untoten“ NSM-Schwesterzellen analysieren zu können, wurde der Tod der Zellen durch eine *ced-3(lf)*-Mutation verhindert. Der Funktionsverlust der Caspase CED-3 hat keine Auswirkung auf die zelltypspezifische Regulation von *egl-1*. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen zeigen, dass die Expression von *egl-1* in den NSM-Schwesterzellen

wahrscheinlich auf transkriptionaler Ebene aktiviert wird und zum programmierten Zelltod führt.

## **5.2 Der *Ptph-1::gfp*-Reporter wird in den NSM-Zellen und den „untoten“ NSM-Schwesterzellen exprimiert**

Im Pharynx von Wildtyp-Tieren wurden die NSM-Zellen, zwei bilateral symmetrische Neuronen, identifiziert, die den Neurotransmitter Serotonin enthalten (Horvitz *et al.*, 1982a). In *ces-1(n703sd)*- bzw. in *ces-2(n732ts)*-Mutanten wurden in unmittelbarer Nachbarschaft zu den NSM-Zellen zwei weitere serotonerge Zellen identifiziert, die NSM-Schwesterzellen (Trent, 1982). Um die Erkennung der NSM-Zellen und der „untoten“ NSM-Schwesterzellen zu vereinfachen, wurde der *Ptph-1::gfp*-Reporter verwendet (4.1) (Sze *et al.*, 2000). *tph-1* ist das einzige Gen in *C. elegans*, welches für eine Tryptophan-Hydroxylase codiert. Das Enzym katalysiert die Synthese von Serotonin aus Tryptophan. Der *Ptph-1::gfp*-Reporter wird ausschließlich in serotonergen Neuronen exprimiert, den NSM-Zellen, den ADF-Zellen, zwei Amphid-Neuronen, den Hermaphroditen-spezifischen HSN-Zellen und selten in den Interneuronen AIM und RIH. Damit war schnelle Identifizierung der bilateralen NSM-Zellen, die im vorderen Bulbus des Pharynx liegen, möglich (Abb. 4.1). Aufgrund der Identifizierung der NSM-Schwesterzellen in *ces-1(n703sd)*- bzw. in *ces-2(n732ts)*-Mutanten als serotonerge Zellen, wird der *Ptph-1::gfp*-Reporter in diesen Neuronen wahrscheinlich ebenfalls exprimiert. Da in *ces-1(n703sd)*- und in *ces-2(n732ts)*-Mutanten zwei weitere GFP-positive Zellen, posterior zu den NSM-Zellen, gefunden wurden, wurde davon ausgegangen, dass es sich dabei um die „untoten“ NSM-Schwesterzellen handelt. Die Überlebensrate der NSM-Schwesterzellen wurde mit Hilfe des *Ptph-1::gfp*-Reporters in verschiedenen *ces*-Mutanten analysiert (4.1.4). In *ces-2(lf ts)*-Tieren z.B. überlebten 13 % der NSM-Schwesterzellen bei 15°C, 26 % bei 20°C und 73 % bei 25°C (Abb. 4.3). Die Überlebensraten der NSM-Schwesterzellen in den analysierten Mutanten wurden mit bereits veröffentlichten Daten verglichen. Ellis *et al.* (Ellis und Horvitz, 1991) zeigten eine mit Nomarski Optik identifizierte Überlebensrate der NSM-Schwesterzellen von 10 % bei 15°C, 10 % bei 20°C und 55 % bei 25°C. Metzstein *et al.* (Metzstein, 1998) hatten gleichermaßen mit Nomarski Optik bei 15°C 10 %, bei 20°C 8 % und bei 25°C 45 % „untote“ NSM-Schwesterzellen identifiziert. Diese Ergebnisse zeigen, dass der

*Ptph-1::gfp*-Reporter sowohl in NSM-Zellen als auch in „untoten“ NSM-Schwesterzellen exprimiert wird.

### 5.3 Die *egl-1*-Expression wird in den NSM-Schwesterzellen vom CES-1-Repressor transkriptional reguliert

Das *ces-1*-Gen codiert einen Transkriptionsfaktor der Snail-Proteinfamilie (Metzstein und Horvitz, 1999). Die Familie der Snail-Transkriptionsfaktoren wird durch das *Drosophila*-Gen *Snail* definiert (Boulay *et al.*, 1987) und umfasst zahlreiche Vertreter sowohl in Invertebraten als auch in Vertebraten, die überwiegend als transkriptionale Repressoren agieren (Hemavathy *et al.*, 2000a). Darüber hinaus wirkt *ces-1* genetisch vor *egl-1* (Conradt und Horvitz, 1998), folglich ist das CES-1-Protein ein geeigneter Kandidat, *egl-1* in den NSM-Schwesterzellen auf transkriptionaler Ebene zu regulieren. Untersuchungen der *gfp*-Expression unter der Kontrolle des *egl-1*-Promotors (*Pegl-1::gfp*) haben gezeigt, dass *gfp* ausschließlich in den NSM-Schwesterzellen exprimiert wird (J. Hatzold, pers. Mitteilung) (5.1). In *ces-1(gf)*-Tieren hingegen, wird *Pegl-1::gfp* in den NSM-Schwesterzellen nicht exprimiert. Die *ces-1(gf)*-Mutation führt wahrscheinlich zur Überexpression des Proteins (Ellis und Horvitz, 1991; Metzstein und Horvitz, 1999), woraufhin der potentielle Repressor CES-1 die *egl-1*-Expression auf transkriptionaler Ebene blockiert und dadurch den Tod der NSM-Schwesterzellen verhindert. Der *egl-1*-Lokus, ein 7.6-kb genomisches Fragment, welches die *egl-1*-Transkriptionseinheit einschließlich flankierender Sequenzen exprimiert, enthält alle Informationen, die für wahrscheinlich alle 131 Zelltodereignisse während der Entwicklung von *C. elegans* notwendig sind, einschließlich den der NSM-Schwesterzellen (4.3.2). Neben der *egl-1*-Transkriptionseinheit sind zahlreiche Sequenzen des *egl-1*-Lokus zwischen *C. elegans* und *C. briggsae* konserviert (Conradt und Horvitz, 1999). Homologe Bereiche zwischen diesen zwei Spezies stellen funktional relevante regulatorische Regionen dar (Heschl und Baillie, 1990). Es konnte gezeigt werden, dass eine 350-bp lange Region (Region B) im *egl-1*-Lokus für den programmierten Zelltod der NSM-Schwesterzellen notwendig ist (4.3.2). Darüber hinaus enthält Region B vier DNA-Bindemotive für Zinkfinger-Transkriptionfaktoren der Snail-Proteinfamilie (4.3.3) (Mauhin *et al.*, 1993). Die funktionale Bedeutung dieser Bindestellen für die Regulation der *egl-1*-Expression wird dadurch deutlich, dass CES-1 als ein Vertreter

der Snail-Transkriptionsfaktoren, *in vitro* (EMSA) spezifisch an die vier Snail-Bindestellen bindet (4.4). Die DNA-Bindung erfolgt durch C-terminale Zinkfinger des Typs  $C_2H_2$ , die aus jeweils zwei konservierten Aminosäuren Cystein und Histidin gebildet werden (Nieto, 2002). Mitglieder der Snail-Proteinfamilie agieren in vielen Organismen, von *C. elegans* bis hin zum Menschen, überwiegend als transkriptionale Repressoren (Hemavathy *et al.*, 2000a). Sie haben vielfache Funktionen in unterschiedlichen Entwicklungsstadien und Geweben der Tiere. Für die Funktion der Proteine als Repressoren der Transkription sind unterschiedliche Mechanismen verantwortlich. In Vertebraten ist die SNAG-Domäne (SNAG, Snail/Gfi) im N-Terminus des Proteins für die Repression verantwortlich (Grimes *et al.*, 1996). Die Funktion der Snail-Proteine als Repressoren wird in *Drosophila* durch die Interaktion mit dem Co-Repressor CtBP (CtBP, carboxy-terminal binding protein) gewährleistet (Nibu *et al.*, 1998). Abgesehen von den fünf konservierten Zinkfinger im C-Terminus von CES-1 sind im N-Terminus keine weiteren Sequenzen, die mit anderen Snail-Proteinen homolog sind, wie z.B. die SNAG-Domäne oder ein CtBP-Bindemotiv. Die Funktion von CES-1 als Repressor der *egl-1*-Transkription unterliegt daher nicht den für Snail-Proteine bekannten Mechanismen. Die Ergebnisse der durchgeführten Experimente zeigen vielmehr, dass CES-1 die *egl-1*-Transkription blockiert, indem es wahrscheinlich mit einem Aktivator um die gleichen Bindestellen im *egl-1*-Lokus konkurriert und die Bindestellen für den Aktivator blockiert (4.6). *In vivo* wurde bereits gezeigt, dass mSna, ein Snail-Protein aus der Maus, mit einem Homodimer des bHLH-Proteins E47 (Daughterless-ähnlich) bzw. mit einem Heterodimer aus E47 und MASH-2 (Achaete-Scute-ähnlich) um die Bindung an E-box-Motive konkurriert (Nakayama *et al.*, 1998). In einem Transfektions-Assay wird die E-box-abhängige transkriptionale Aktivierung eines Reportergens durch *MASH-2*, aufgrund der Überexpression von *mSna* blockiert. Die Wirkung des mSna-Proteins als Repressor der Transkription ist unabhängig von der N-terminalen SNAG-Domäne. Diese Erkenntnisse zeigen, dass die Funktion von Snail-Proteinen als transkriptionale Repressoren unter anderem durch die Verdrängung eines Aktivators von den gemeinsamen Bindestellen gewährleistet werden kann. Deshalb scheint es sehr wahrscheinlich zu sein, dass CES-1 die *egl-1*-Expression in *ces-1(gf)*- und in *ces-2(lf)*-Mutanten durch Blockierung der Bindestellen, die für die Aktivierung notwendig sind, reprimiert.

## 5.4 HLH-2/HLH-3 ist ein potentieller Aktivator der *egl-1*-Transkription in den NSM-Schwesterzellen

Es wurde *in vivo* gezeigt, dass Region B im *egl-1*-Lokus für programmierten Zelltod der NSM-Schwesterzellen notwendig ist (4.3.2). Da programmierter Zelltod der NSM-Schwesterzellen von der *egl-1*-Expression abhängig ist (5.1), enthält Region B wahrscheinlich alle *cis*-regulatorischen Sequenzen, die für die *egl-1*-Transkription in diesen Zellen erforderlich sind. Eine *ces-1(lf)*-Mutation hat keinen erkennbaren Phänotyp zur Folge (Ellis und Horvitz, 1991; Metzstein und Horvitz, 1999), daher ist CES-1 für den Tod der NSM-Schwesterzellen und somit für die Aktivierung von *egl-1* nicht erforderlich. Vielmehr können *gf*-Mutationen in *ces-1* und *lf*-Mutationen in *ces-2* den Zelltod der NSM-Schwesterzellen verhindern. Zudem blockieren die *ces-2(lf)*- bzw. *ces-1(gf)*-Mutation programmierten Zelltod nur in wenigen Neuronen, nämlich den NSM-Schwesterzellen bzw. den NSM-Schwesterzellen und den I2-Schwesterzellen (Ellis und Horvitz, 1991; Metzstein und Horvitz, 1999). Das bedeutet, dass Faktoren an der Aktivierung des programmierten Zelltods der NSM-Schwesterzellen beteiligt sind, die ebenfalls durch Region B agieren und die *egl-1*-Expression gezielt in diesen Zellen aktivieren. Die vier Snail-Bindestellen 5'-CACCTG-3' in Region B überlappen mit DNA-Bindemotiven für bHLH-Transkriptionsfaktoren, den sogenannten E-box-Motiven 5'-CANNTG-3' (Mauhin *et al.*, 1993). bHLH-Proteine sind in zahlreichen Organismen für die Determinierung und Differenzierung verschiedener Zelltypen entscheidend, unter anderem in neuronalen Vorläuferzellen und Neuronen (Guillemot *et al.*, 1999; Lee, 1997; Massari und Murre, 2000). Daughterless-ähnliche Proteine, eine Untergruppe der bHLH-Proteine, zeigen ein sehr umfangreiches Expressionsmuster und bilden sowohl Homo- als auch Heterodimere. Eine weitere Untergruppe, mit Vertretern der Atonal-ähnlichen und der Achaete-Scute-ähnlichen Proteine, wird in spezifischen neuronalen Zellen exprimiert. Diese Proteine bilden Heterodimere mit Daughterless-ähnlichen Proteinen. Heterodimere der Achaete-Scute-ähnlichen und Daughterless-ähnlichen Proteine aus *Drosophila* binden *in vitro* an die E-box-Motive 5'-CANNTG-3' und agieren als transkriptionale Aktivatoren (Cabrera und Alonso, 1991). Das einzige *daughterless*-ähnliche Gen in *C. elegans* ist *hlh-2*. Es wird sehr früh während der Embryogenese exprimiert und ist zusammen mit *lin-32* (*lin*, lineage abnormal), einem Atonal-ähnlichen *bHLH*-Gen, für die Etablierung spezifischer



neuronaler Zelllinien im Schweif der Männchen verantwortlich (Portman und Emmons, 2000). LIN-32/HLH-2-Heterodimere binden *in vitro* an E-box-Motive und agieren wahrscheinlich während der Differenzierung neuronaler Vorläuferzellen als Aktivatoren der Genexpression. HLH-3, ein Achaete-Scute-ähnliches bHLH-Protein bildet ebenfalls Heterodimere mit HLH-2, die *in vitro* an E-box-Motive binden (Krause *et al.*, 1997). Das *hlh-3*-Gen wird ebenso wie *hlh-2* in Neuronen während der Embryogenese exprimiert und ist wahrscheinlich für die Neurogenese von Bedeutung (Krause *et al.*, 1997). Es wurde gezeigt, dass *hlh-2* und *hlh-3* auch für programmierten Zelltod der NSM-Schwesterzellen notwendig sind, und dass sie genetisch nach *ces-1* wirken (J. Hatzold, pers. Mitteilung). Darüber hinaus binden HLH-2/HLH-3-Heterodimere *in vitro* spezifisch an die Snail-Bindestellen in Region B (J. Hatzold, pers. Mitteilung). HLH-2/HLH-3-Heterodimere sind somit geeignete Kandidaten für die Aktivierung der *egl-1*-Expression in den NSM-Schwesterzellen. Es ist von Bedeutung, in zukünftigen Experimenten sowohl die *hlh-2*- und *hlh-3*-Expression als auch die *ces-1*-Expression in den NSM-Zellen und den NSM-Schwesterzellen zu analysieren.

### **5.5 Während der Regulation des programmierten Zelltods der NSM-Schwesterzellen konkurrieren CES-1 und HLH-2/HLH-3 für die gleichen Bindestellen im *egl-1*-Lokus**

Region B des *egl-1*-Lokus umfasst alle *cis*-regulatorischen Sequenzen, die für die Spezifizierung des programmierten Zelltods der NSM-Schwesterzellen notwendig sind (4.3.2). Region B enthält vier Konsensus-Sequenzen für Snail-Bindeproteine (4.3.3), die mit den Bindestellen für bHLH-Proteine, den E-box-Motiven überlappen (Mauhin *et al.*, 1993). Darüber hinaus bindet sowohl CES-1 als auch ein Heterodimer aus HLH-2 und HLH-3 *in vitro* spezifisch an die Snail-Bindestellen in Region B (4.4.2) (J. Hatzold, pers. Mitteilung). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass *hlh-2* und *hlh-3* für den programmierten Zelltod der NSM-Schwesterzellen notwendig sind. In *ces-1(gf)*- bzw. in *ces-2(lf)*-Tieren wird die *egl-1*-Expression in den NSM-Schwesterzellen möglicherweise durch den Repressor CES-1 und den potentiellen Aktivator HLH-2/HLH-3 transkriptional reguliert. Es wurde bereits mehrmals gezeigt, dass Snail-Transkriptionsfaktoren antagonistisch zu bHLH-Proteinen wirken, besonders zu Daughterless/Achaete-Scute-Heterodimeren, indem sie um

die gemeinsamen Bindestellen konkurrieren (Fuse *et al.*, 1994; Nakakura *et al.*, 2001; Nakayama *et al.*, 1998; Perez-Moreno *et al.*, 2001). In einem Transfektions-Assay wird die E-box-abhängige transkriptionale Aktivierung eines Reportergens mittels den bHLH-Proteinen Daughterless und Scute aus *Drosophila*, durch den Snail-Transkriptionsfaktor Escargot, blockiert (Fuse *et al.*, 1994). Die E-box-abhängige Aktivierung eines Reportergens durch bHLH-Heterodimere aus hASH1 (hASH1, human achaete-scute homologue-1) und E12 (Daughterless-ähnliche) wird durch das CES-1-Homolog hScrt (hScrt, human scratch) blockiert (Nakakura *et al.*, 2001). Ein vergleichbarer Mechanismus scheint auch bei der Regulation des programmierten Zelltods der NSM-Schwesterzellen eine Rolle zu spielen. Der Phänotyp einer *ces-2(lf)*-Mutation ist von einem funktionalen *ces-1*-Gen abhängig und hat wahrscheinlich die Überexpression von *ces-1* zur Folge (Ellis und Horvitz, 1991; Metzstein und Horvitz, 1999). Aufgrund der daraus resultierenden erhöhten CES-1-Konzentrationen kann CES-1 in den NSM-Schwesterzellen mit HLH-2/HLH-3 um dessen Bindung an die Snail-Bindestellen (5'-CAGGTG-3') im *egl-1*-Lokus erfolgreich konkurrieren und verhindert dadurch die Aktivierung der *egl-1*-Expression, woraufhin die NSM-Schwesterzellen überleben (4.6). Verhindert man nur die CES-1-Bindung an den *egl-1*-Lokus durch Mutationen in den Snail-Bindestellen (5'-CATATG-3'), kann der Aktivator HLH-2/HLH-3 trotz erhöhter CES-1-Menge die Snail/E-box<sup>+</sup>-Bindestellen binden, die *egl-1*-Expression aktivieren und den Tod der Zellen einleiten. Mutationen in Region B die sowohl die CES-1-Bindung als auch die HLH-2/HLH-3-Bindung unterbinden (Snail/E-box<sup>-</sup>-Bindestellen, 5'-CATATA-3'), verhindern den Tod der NSM-Schwesterzellen, da die *egl-1*-Expression nicht aktiviert wird. Obwohl die Ergebnisse der durchgeführten Experimente (4.6) mit diesem Modell übereinstimmen, sind für die Aufklärung der Regulationsmechanismen, die zum Tod der NSM-Schwesterzellen führen, weitere Analysen notwendig. Wie bereits erwähnt, ist es erforderlich, sowohl die Expression von *hlh-2* und *hlh-3* als auch die *ces-1*-Expression in den NSM-Zellen und den NSM-Schwesterzellen zu analysieren. Eine asymmetrische Verteilung der Proteine HLH-2, HLH-3 und CES-1 bei der Teilung der NSM-Mutterzelle in eine NSM-Zelle und eine zum Sterben bestimmte NSM-Schwesterzelle kann möglicherweise das Schicksal dieser Zellen bestimmen. Zahlreiche Untersuchungen in *Drosophila* haben gezeigt, dass asymmetrische Zellteilungen für die Differenzierung des Nervensystems von Bedeutung sind (Lu *et al.*, 2000). Genprodukte neuronaler Vorläuferzellen, die zur Differenzierung und

Determinierung verschiedener Zelltypen beitragen, werden dabei asymmetrisch an die Tochterzellen weiter gegeben. In neuronalen Vorläuferzellen in *C.elegans*, unter anderem in den Vorläuferzellen der HSN-Zellen, wird *ham-1* (*ham*, HSN abnormal migration) exprimiert (Guenther und Garriga, 1996). Man nimmt an, dass die asymmetrische Verteilung von HAM-1 in Vorläuferzellen, den Tochterzellen ermöglicht, ein bestimmtes Schicksal anzunehmen. Da sich das Schicksal der NSM-Zellen von dem ihrer Schwesterzellen unterscheidet, und die NSM-Schwesterzellen bereits kurz nach ihrer Entstehung (15-20 min) sterben (Sulston *et al.*, 1983), ist es sehr wahrscheinlich, dass Faktoren wie HLH-2/HLH-3 bzw. CES-1, die dieses Schicksal bestimmen, bei der Teilung der Mutterzelle asymmetrisch auf die Tochterzellen verteilt werden.

### **5.6 Die zelltypspezifischen Regulatoren des programmierten Zelltods in den NSM-Schwesterzellen sind zwischen *C. elegans* und höheren Organismen konserviert**

Der zelltypspezifische Regulationsweg für programmierten Zelltod der NSM-Schwesterzellen mit den Genen *ces-1* und *ces-2* ist ebenso wie die zentrale Zelltodmaschinerie (Abb. 2.4) zwischen *C. elegans* und höheren Organismen, wie z.B. Säugetieren, konserviert. Die DNA-Bindesepezifität des bZIP-Transkriptionsfaktors CES-2 ist homolog zum HLF-Protein (Metzstein *et al.*, 1996). HLF ist für die Funktion differenzierter Neuronen sowohl während der Entwicklung, als auch in erwachsenen Mäusen von Bedeutung (Hitzler *et al.*, 1999). Die onkogene Form von HLF, das E2A-HLF-Fusionsprotein, wird aufgrund einer chromosomalen Translokation (t(17;19) q(22;13)) in akut lymphatischer Leukämie (ALL) gebildet. Dabei wird die Transaktivator-Domäne des bHLH-Proteins E2A und die DNA-Bindedomäne von HLF fusioniert (Inaba *et al.*, 1996; Inaba *et al.*, 1992). Der chimäre Transkriptionsfaktor E2A-HLF wird in pro-B-Zellen exprimiert und ist wahrscheinlich für das unkontrollierte Überleben der pro-B-Zellen verantwortlich. Der bZIP-Transkriptionsfaktor NFIL3 (NFIL3, nuclear factor regulated by IL-3) wird in pro-B-Zellen exprimiert und durch Interleukin 3 (IL-3) reguliert (Ikushima *et al.*, 1997). Aufgrund der konstitutiven Expression von E2A-HLF in pro-B-Zellen ersetzt dieses Onkoprotein wahrscheinlich NFIL3 in einem IL-3-abhängigen Regulationsweg für das Überleben der pro-B-Zellen. E2A-HLF blockiert programmierten Zelltod in

pro-B-Zellen, wahrscheinlich durch die Aktivierung eines anti-apoptischen Faktors, und verursacht dadurch deren leukämische Transformation (Inaba *et al.*, 1996). Auf der Suche nach diesem postulierten anti-apoptischen, durch E2A-HLF regulierten Faktor, wurde das humane Gen *SLUG* identifiziert (Inukai *et al.*, 1999). Das SLUG-Protein ist ebenso wie CES-1 ein Transkriptionsfaktor der Snail-Proteinfamilie. Die Zinkfinger beider Proteine haben eine Sequenzähnlichkeit von 50 % und binden *in vitro* die Konsensus-Sequenzen für Snail-Proteine 5'-CACCTG-3'. In humanen lymphatischen Vorläuferzellen hat SLUG eine Funktion als anti-apoptischer Faktor (Inukai *et al.*, 1999). Es wurde ein Modell aufgestellt, wonach *SLUG* durch die Funktion von E2A-HLF in lymphatischer Leukämie überexprimiert wird und möglicherweise programmierten Zelltod in pro-B-Zellen, durch einen Regulationsweg, der mit dem zelltypspezifischen Regulationsweg in den NSM-Schwesterzellen von *C. elegans* vergleichbar ist, blockiert (Inukai *et al.*, 1999). Mutationen, die in der Maus zum Funktionsverlust von SLUG führen, haben eine erhöhte Anzahl hämatopoetischer Zellen im Blutkreislauf zur Folge und zeigen eine erhöhte Empfindlichkeit auf  $\gamma$ -Strahlung (Inoue *et al.*, 2002). Bisher wurden jedoch weder im Menschen, noch im Mausmodell Gene analysiert, die durch SLUG reguliert werden.

Homologe des HLH-2-Proteins sind nicht nur für die Determinierung und Differenzierung neuronaler Vorläuferzellen und Neuronen von Bedeutung, sie sind ebenfalls an der Regulation von Apoptose beteiligt. Das menschliche Gen *E2A* codiert für zwei Daughterless-ähnliche bHLH-Proteine, E12 und E47, die homolog zu HLH-2 und während der Entwicklung von B- und T-Zellen von Bedeutung sind (Herblot *et al.*, 2002; Pan *et al.*, 2002). Mäuse mit Mutationen die zum Funktionsverlust der *E2A*-Gene führen, sind für die Entwicklung von Lymphomen im Thymus dieser Tiere sehr anfällig. Die Überexpression des Gens in abgeleiteten Zelllinien dieser Lymphome, führt zur Aktivierung von programmiertem Zelltod (Engel und Murre, 1999). *In vitro* wurde bereits gezeigt, dass E12 bzw. E47 mit den HLH-3-Homologen hASH1 bzw. MASH-2 Heterodimere bilden, und mit den CES-1-Homologen hScrt bzw. mSna um gemeinsame Bindestellen konkurrieren (Nakakura *et al.*, 2001; Nakayama *et al.*, 1998). Im Humansystem werden sowohl hASH1 als auch hScrt in Krebszelllinien aus der Lunge exprimiert, wobei hScrt die Wirkung bzw. die Funktion von hASH1 während der Differenzierung der Tastsinneszellen in der Lunge

möglicherweise moduliert und dadurch Lungenkrebs verursacht (Nakakura *et al.*, 2001). Die mögliche Funktion von bHLH-Proteinen und Snail-Proteinen während der Regulation von programmiertem Zelltod in einem gemeinsamen genetischen Weg konnte bisher *in vivo* nicht gezeigt werden.

## 6 Literaturverzeichnis

**Albertson, D. G. und Thomson, J. N.** (1976). The Pharynx of *Caenorhabditis elegans*. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* **275**, 300-325.

**Alnemri, E. S., Livingston, D. J., Nicholson, D. W., Salvesen, G., Thornberry, N. A., Wong, W. W. und Yuan, J.** (1996). Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell* **87**, 171.

**Anderson, P. und Brenner, S.** (1984). A selection for myosin heavy chain mutants in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**, 4470-4474.

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

**Boulay, J. L., Dennefeld, C. und Alberga, A.** (1987). The *Drosophila* developmental gene *snail* encodes a protein with nucleic acid binding fingers. *Nature* **330**, 395-398.

**Boyd, J. M., Gallo, G. J., Elangovan, B., Houghton, A. B., Malstrom, S., Avery, B. J., Ebb, R. G., Subramanian, T., Chittenden, T., Lutz, R. J. et al.** (1995). Bik, a novel death-inducing protein shares a distinct sequence motif with Bcl-2 family proteins and interacts with viral and cellular survival-promoting proteins. *Oncogene* **11**, 1921-1928.

**Bozyczko-Coyne, D., O'Kane, T. M., Wu, Z. L., Dobrzanski, P., Murthy, S., Vaught, J. L. und Scott, R. W.** (2001). CEP-1347/KT-7515, an inhibitor of SAPK/JNK pathway activation, promotes survival and blocks multiple events associated with Abeta-induced cortical neuron apoptosis. *J Neurochem* **77**, 849-863.

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

**Burglin, T. R., Finney, M., Coulson, A. und Ruvkun, G.** (1989). *Caenorhabditis elegans* has scores of homoeobox-containing genes. *Nature* **341**, 239-243.

**Cabrera, C. V. und Alonso, M. C.** (1991). Transcriptional activation by heterodimers of the achaete-scute and daughterless gene products of *Drosophila*. *Embo J* **10**, 2965-2973.

**Capovilla, M., Eldon, E. D. und Pirrotta, V.** (1992). The giant gene of *Drosophila* encodes a b-ZIP DNA-binding protein that regulates the expression of other segmentation gap genes. *Development* **114**, 99-112.

**Carmi, I., Kopczynski, J. B. und Meyer, B. J.** (1998). The nuclear hormone receptor SEX-1 is an X-chromosome signal that determines nematode sex. *Nature* **396**, 168-173.

**Chao, D. T. und Korsmeyer, S. J.** (1998). BCL-2 family: regulators of cell death. *Annu Rev Immunol* **16**, 395-419.

**Chen, F., Hersh, B. M., Conradt, B., Zhou, Z., Riemer, D., Gruenbaum, Y. und Horvitz, H. R.** (2000). Translocation of *C. elegans* CED-4 to nuclear membranes during programmed cell death. *Science* **287**, 1485-1489.

**Chinnaiyan, A. M., Chaudhary, D., O'Rourke, K., Koonin, E. V. und Dixit, V. M.** (1997a). Role of CED-4 in the activation of CED-3. *Nature* **388**, 728-729.

**Chinnaiyan, A. M., O'Rourke, K., Lane, B. R. und Dixit, V. M.** (1997b). Interaction of CED-4 with CED-3 and CED-9: a molecular framework for cell death. *Science* **275**, 1122-1126.

**Conradt, B. und Horvitz, H. R.** (1998). The *C. elegans* protein EGL-1 is required for programmed cell death and interacts with the Bcl-2-like protein CED-9. *Cell* **93**, 519-529.

**Conradt, B. und Horvitz, H. R.** (1999). The TRA-1A sex determination protein of *C. elegans* regulates sexually dimorphic cell deaths by repressing the *egl-1* cell death activator gene [see comments]. *Cell* **98**, 317-327.

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

**Cory, S. und Adams, J. M.** (2002). The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer* **2**, 647-656.

**Cowell, I. G., Skinner, A. und Hurst, H. C.** (1992). Transcriptional repression by a novel member of the bZIP family of transcription factors. *Mol Cell Biol* **12**, 3070-3077.

**Cryns, V. und Yuan, J.** (1998). Proteases to die for. *Genes Dev* **12**, 1551-1570.

**Ellis, H. M. und Horvitz, H. R.** (1986). Genetic Control of Programmed Cell Death in the Nematode *C. elegans*. *Cell* **44**, 817-826.

**Ellis, R. E. und Horvitz, H. R.** (1991). Two *C. elegans* genes control the programmed deaths of specific cells in the pharynx. *Development* **112**, 591-603.

**Engel, I. und Murre, C.** (1999). Ectopic expression of E47 or E12 promotes the death of E2A-deficient lymphomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 996-1001.

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

**Finney, M. und Ruvkun, G.** (1990). The *unc-86* Gene Product Couples Cell Lineage and Cell Identity in *C. elegans*. *Cell* **63**, 895-905.

**Fire, A.** (1986). Integrative transformation of *Caenorhabditis elegans*. *Embo J.* **5**, 10.

**Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E. und Mello, C. C.** (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **391**, 806-811.

**Fuse, N., Hirose, S. und Hayashi, S.** (1994). Diploidy of *Drosophila* imaginal cells is maintained by a transcriptional repressor encoded by *escargot*. *Genes Dev* **8**, 2270-2281.

**Fuse, N., Matakatsu, H., Taniguchi, M. und Hayashi, S.** (1999). Snail-type zinc finger proteins prevent neurogenesis in *Scutoid* and transgenic animals of *Drosophila*. *Dev Genes Evol* **209**, 573-580.

**Gietz, R. D., Schiestl, R. H., Willems, A. R. und Woods, R. A.** (1995). Studies on the transformation of intact yeast cells by the LiAc/SS-DNA/PEG procedure. *Yeast* **11**, 355-60.

**Goodwin, E. B. und Ellis, R. E.** (2002). Turning clustering loops: sex determination in *Caenorhabditis elegans*. *Curr Biol* **12**, R111-R120.

**Grimes, H. L., Chan, T. O., Zweidler-McKay, P. A., Tong, B. und Tschlis, P. N.** (1996). The Gfi-1 proto-oncoprotein contains a novel transcriptional repressor domain, SNAG, and inhibits G1 arrest induced by interleukin-2 withdrawal. *Mol Cell Biol* **16**, 6263-6272.

**Guenther, C. und Garriga, G.** (1996). Asymmetric distribution of the *C. elegans* HAM-1 protein in neuroblasts enables daughter cells to adopt distinct fates. *Development* **122**, 3509-3518.

**Guillemot, F., Auffray, C. und Devignes, M. D.** (1999). Detailed transcript map of a 810-kb region at 11p14 involving identification of 10 novel human 3' exons. *Eur J Hum Genet* **7**, 487-495.

**Guo, B., Godzik, A. und Reed, J. C.** (2001). Bcl-G, a novel pro-apoptotic member of the Bcl-2 family. *J Biol Chem* **276**, 2780-2785.

**Han, J., Flemington, C., Houghton, A. B., Gu, Z., Zambetti, G. P., Lutz, R. J., Zhu, L. und Chittenden, T.** (2001). Expression of *bbc3*, a pro-apoptotic BH3-only gene, is regulated by diverse cell death and survival signals. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 11318-11323.

**Han, J., Sabbatini, P. und White, E.** (1996). Induction of apoptosis by human Nbk/Bik, a BH3-containing protein that interacts with E1B 19K. *Mol Cell Biol* **16**, 5857-5864.

**Hanahan, D.** (1985). Techniques for transforming *E. coli*.

**Harris, C. A. und Johnson, E. M., Jr.** (2001). BH3-only Bcl-2 family members are coordinately regulated by the JNK pathway and require Bax to induce apoptosis in neurons. *J Biol Chem* **276**, 37754-37760.



**Hatzold, J.** (2001). Untersuchungen zur Zelltodregulation in den NSMs und den NSM-Schwesterzellen im Nervensystem von *C. elegans*. In *Max-Planck-Institut für Neurobiologie*, (ed. München: TU München).

**Hegde, R., Srinivasula, S. M., Ahmad, M., Fernandes-Alnemri, T. und Alnemri, E. S.** (1998). Blk, a BH3-containing mouse protein that interacts with Bcl-2 and Bcl-xL, is a potent death agonist. *J Biol Chem* **273**, 7783-7786.

**Hemavathy, K., Ashraf, S. I. und Ip, Y. T.** (2000a). Snail/slug family of repressors: slowly going into the fast lane of development and cancer. *Gene* **257**, 1-12.

**Hemavathy, K., Guru, S. C., Harris, J., Chen, J. D. und Ip, Y. T.** (2000b). Human Slug is a repressor that localizes to sites of active transcription. *Mol Cell Biol* **20**, 5087-95.

**Hengartner, M. O., Ellis, R. E. und Horvitz, H. R.** (1992). *Caenorhabditis elegans* gene *ced-9* protects cells from programmed cell death. *Nature* **356**, 494-499.

**Hengartner, M. O. und Horvitz, H. R.** (1994). *C. elegans* Cell Survival Gene *ced-9* Encodes a Functional Homolog of the Mammalian Proto-Oncogene *bcl-2*. *Cell* **76**, 665-676.

**Herblot, S., Aplan, P. D. und Hoang, T.** (2002). Gradient of E2A activity in B-cell development. *Mol Cell Biol* **22**, 886-900.

**Heschl, M. F. und Baillie, D. L.** (1990). Functional elements and domains inferred from sequence comparisons of a heat shock gene in two nematodes. *J Mol Evol* **31**, 3-9.

**Hitzler, J. K., Soares, H. D., Drolet, D. W., Inaba, T., O'Connell, S., Rosenfeld, M. G., Morgan, J. I. und Look, A. T.** (1999). Expression patterns of the hepatic leukemia factor gene in the nervous system of developing and adult mice. *Brain Res* **820**, 1-11.

**Hodgkin, J.** (1988). The nematode *C. elegans*: Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.

**Hodgkin, J.** (1997). Genetics: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

**Hodgkin, J.** (1999a). *C. elegans*. A Practical Approach: Oxford University Press.

**Hodgkin, J.** (1999b). Sex, cell death, and the genome of *C. elegans*. *Cell* **98**, 277-280.

**Horvitz, H. R.** (1999). Genetic control of programmed cell death in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Cancer Res* **59**, 1701s-1706s.

**Horvitz, H. R., Chalfie, M., Trent, C., Sulston, J. E. und Evans, P.** (1982a). Serotonin and Octopamine in the Nematode *Caenorhabditis elegans*. *Science* **216**, 1012-1014.

**Horvitz, H. R., Ellis, H. M. und Sternberg, P. W.** (1982b). Programmed cell death in nematode development. *Neuroscience Commentaries* **1**, 56-65.

**Hsu, S. Y., Lin, P. und Hsueh, A. J.** (1998). BOD (Bcl-2-related ovarian death gene) is an ovarian BH3 domain-containing proapoptotic Bcl-2 protein capable of dimerization with diverse antiapoptotic Bcl-2 members. *Mol Endocrinol* **12**, 1432-1440.

**Huang, D. C. und Strasser, A.** (2000). BH3-Only proteins-essential initiators of apoptotic cell death. *Cell* **103**, 839-842.

**Ikushima, S., Inukai, T., Inaba, T., Nimer, S. D., Cleveland, J. L. und Look, A. T.** (1997). Pivotal role for the NFIL3/E4BP4 transcription factor in interleukin 3-mediated survival of pro-B lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 2609-2614.

**Imaizumi, K., Tsuda, M., Imai, Y., Wanaka, A., Takagi, T. und Tohyama, M.** (1997). Molecular cloning of a novel polypeptide, DP5, induced during programmed neuronal death. *J Biol Chem* **272**, 18842-18848.

**Inaba, T., Inukai, T., Yoshihara, T., Seyschab, H., Ashmun, R. A., Canman, C. E., Laken, S. J., Kastan, M. B. und Look, A. T.** (1996). Reversal of apoptosis by the leukaemia-associated E2A-HLF chimaeric transcription factor. *Nature* **382**, 541-544.

**Inaba, T., Roberts, W. M., Shapiro, L. H., Jolly, K. W., Raimondi, S. C., Smith, S. D. und Look, A. T.** (1992). Fusion of the leucine zipper gene HLF to the E2A gene in human acute B-lineage leukemia. *Science* **257**, 531-534.

**Inohara, N., Ding, L., Chen, S. und Nunez, G.** (1997). *harakiri*, a novel regulator of cell death, encodes a protein that activates apoptosis and interacts selectively with survival-promoting proteins Bcl-2 and Bcl-X(L). *Embo J* **16**, 1686-1694.

**Inoue, A., Seidel, M. G., Wu, W., Kamizono, S., Ferrando, A. A., Bronson, R. T., Iwasaki, H., Akashi, K., Morimoto, A., Hitzler, J. K. et al.** (2002). Slug, a highly conserved zinc finger transcriptional repressor, protects hematopoietic progenitor cells from radiation-induced apoptosis in vivo. *Cancer Cell* **2**, 279-288.

**Inukai, T., Inoue, A., Kurosawa, H., Goi, K., Shinjyo, T., Ozawa, K., Mao, M., Inaba, T. und Look, A. T.** (1999). *SLUG*, a *ces-1*-related zinc finger transcription factor gene with antiapoptotic activity, is a downstream target of the E2A-HLF oncoprotein. *Mol Cell* **4**, 343-352.

**Jackstadt, P., Wilm, T. P., Zahner, H. und Hobom, G.** (1999). Transformation of nematodes via ballistic DNA transfer. *Mol Biochem Parasitol* **103**, 261-266.

**Jacobson, M. D., Weil, M. und Raff, M. C.** (1997). Programmed cell death in animal development. *Cell* **88**, 347-354.

**Kataoka, H., Murayama, T., Yokode, M., Mori, S., Sano, H., Ozaki, H., Yokota, Y., Nishikawa, S. und Kita, T.** (2000). A novel snail-related transcription factor Smuc regulates basic helix-loop-helix transcription factor activities via specific E-box motifs. *Nucleic Acids Res* **28**, 626-633.

**Kerr, J. F., Wyllie, A. H. und Currie, A. R.** (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* **26**, 239-257.

**Kimble, J., Hodgkin, J., Smith, T. und Smith, J.** (1982). Suppression of an amber mutation by microinjection of suppressor tRNA in *C. elegans*. *Nature* **299**, 456-458.

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

**Krammer, P. H.** (2000). CD95's deadly mission in the immune system. *Nature* **407**, 789-795.

**Krause, M., Park, M., Zhang, J. M., Yuan, J., Harfe, B., Xu, S. Q., Greenwald, I., Cole, M., Paterson, B. und Fire, A.** (1997). A *C. elegans* E/Daughterless bHLH protein marks neuronal but not striated muscle development. *Development* **124**, 2179-2189.

**Laemmli, U. K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.

**Lee, J. E.** (1997). Basic helix-loop-helix genes in neural development. *Curr Opin Neurobiol* **7**, 13-20.

**Lu, B., Jan, L. und Jan, Y. N.** (2000). Control of cell divisions in the nervous system: symmetry and asymmetry. *Annu Rev Neurosci* **23**, 531-556.

**Maduro, M. und Pilgrim, D.** (1995). Identification and Cloning of *unc-119*, a Gene Expressed in the *Caenorhabditis elegans* Nervous System. *Genetics* **141**, 977-988.

**Massari, M. E. und Murre, C.** (2000). Helix-loop-helix proteins: regulators of transcription in eucaryotic organisms. *Mol Cell Biol* **20**, 429-440.

**Mauhin, V., Lutz, Y., Dennefeld, C. und Alberga, A.** (1993). Definition of the DNA-binding site repertoire for the *Drosophila* transcription factor SNAIL. *Nucleic Acids Res* **21**, 3951-3957.

**Mello, C. und Fire, A.** (1995). DNA transformation. *Methods Cell Biol* **48**, 451-482.

**Metzstein, M. M.** (1998). Analysis of genes involved in cell-specific control of programmed cell death in *Caenorhabditis elegans*. In *M.I.T. Department of Biology*, ed. Cambridge: Cambridge University.

- Metzstein, M. M., Hengartner, M. O., Tsung, N., Ellis, R. E. und Horvitz, H. R.** (1996). Transcriptional regulator of programmed cell death encoded by *Caenorhabditis elegans* gene *ces-2*. *Nature* **382**, 545-547.
- Metzstein, M. M. und Horvitz, H. R.** (1999). The *C. elegans* cell death specification gene *ces-1* encodes a snail family zinc finger protein. *Mol Cell* **4**, 309-319.
- Metzstein, M. M., Stanfield, G. M. und Horvitz, H. R.** (1998). Genetics of programmed cell death in *C. elegans*: past, present and future. *Trends Genet* **14**, 410-416.
- Nakakura, E. K., Watkins, D. N., Schuebel, K. E., Sriuranpong, V., Borges, M. W., Nelkin, B. D. und Ball, D. W.** (2001). Mammalian Scratch: a neural-specific Snail family transcriptional repressor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 4010-4015.
- Nakano, K. und Vousden, K. H.** (2001). PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53. *Mol Cell* **7**, 683-694.
- Nakayama, H., Scott, I. C. und Cross, J. C.** (1998). The transition to endoreduplication in trophoblast giant cells is regulated by the mSNA zinc finger transcription factor. *Dev Biol* **199**, 150-163.
- Nibu, Y., Zhang, H., Bajor, E., Barolo, S., Small, S. und Levine, M.** (1998). dCtBP mediates transcriptional repression by Knirps, Kruppel and Snail in the *Drosophila* embryo. *Embo J* **17**, 7009-7020.
- Nieto, M. A.** (2002). The snail superfamily of zinc-finger transcription factors. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**, 155-166.
- O'Connor, L., Strasser, A., O'Reilly, L. A., Hausmann, G., Adams, J. M., Cory, S. und Huang, D. C.** (1998). Bim: a novel member of the Bcl-2 family that promotes apoptosis. *Embo J* **17**, 384-395.
- Oda, E., Ohki, R., Murasawa, H., Nemoto, J., Shibue, T., Yamashita, T., Tokino, T., Taniguchi, T. und Tanaka, N.** (2000). Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. *Science* **288**, 1053-1058.
- Pan, L., Hanrahan, J., Li, J., Hale, L. P. und Zhuang, Y.** (2002). An analysis of T cell intrinsic roles of E2A by conditional gene disruption in the thymus. *J Immunol* **168**, 3923-3932.
- Perez-Moreno, M. A., Locascio, A., Rodrigo, I., Dhondt, G., Portillo, F., Nieto, M. A. und Cano, A.** (2001). A new role for E12/E47 in the repression of E-cadherin expression and epithelial-mesenchymal transitions. *J Biol Chem* **276**, 27424-27431.
- Pettmann, B. und Henderson, C. E.** (1998). Neuronal cell death. *Neuron* **20**, 633-647.

**Portman, D. S. und Emmons, S. W.** (2000). The basic helix-loop-helix transcription factors LIN-32 and HLH-2 function together in multiple steps of a *C. elegans* neuronal sublineage. *Development* **127**, 5415-5426.

**Praitis, V., Casey, E., Collar, D. und Austin, J.** (2001). Creation of low-copy integrated transgenic lines in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* **157**, 1217-1226.

**Putcha, G. V., Moulder, K. L., Golden, J. P., Bouillet, P., Adams, J. A., Strasser, A. und Johnson, E. M.** (2001). Induction of BIM, a proapoptotic BH3-only BCL-2 family member, is critical for neuronal apoptosis. *Neuron* **29**, 615-628.

**Puthalakath, H. und Strasser, A.** (2002). Keeping killers on a tight leash: transcriptional and post-translational control of the pro-apoptotic activity of BH3-only proteins. *Cell Death Differ* **9**, 505-512.

**Puthalakath, H., Villunger, A., O'Reilly, L. A., Beaumont, J. G., Coultas, L., Cheney, R. E., Huang, D. C. und Strasser, A.** (2001). Bmf: a proapoptotic BH3-only protein regulated by interaction with the myosin V actin motor complex, activated by anoikis. *Science* **293**, 1829-1832.

**Rathmell, J. C. und Thompson, C. B.** (2002). Pathways of apoptosis in lymphocyte development, homeostasis, and disease. *Cell* **109 Suppl**, S97-107.

**Rohrig, S., Rockelein, I., Donhauser, R. und Baumeister, R.** (2000). Protein interaction surface of the POU transcription factor UNC-86 selectively used in touch neurons. *Embo J* **19**, 3694-3703.

**Sambrook, J., Fritsch, E. F. und Maniatis, T.** (1989). Molecular cloning. A laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.

**Shaham, S. und Horvitz, H. R.** (1996). Developing *Caenorhabditis elegans* neurons may contain both cell-death protective and killer activities. *Genes Dev* **10**, 578-591.

**Shi, Y.** (2002). Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis. *Mol Cell* **9**, 459-470.

**Spector, M. S., Desnoyers, S., Hoepfner, D. J. und Hengartner, M. O.** (1997). Interaction between the *C. elegans* cell-death regulators CED-9 and CED-4. *Nature* **385**, 653-656.

**Sulston, J. und Hodgkin, J.** (1988). The nematode *C. elegans*: Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.

**Sulston, J. E. und Horvitz, H. R.** (1977). Post-embryonic cell lineages of the nematode, *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol* **56**, 110-156.

**Sulston, J. E., Schierenberg, E., White, J. G. und Thomson, J. N.** (1983). The Embryonic Cell Lineage of the Nematode *Caenorhabditis elegans*. *Dev. Biol.* **100**, 64-119.

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

**Thornberry, N. A. und Lazebnik, Y.** (1998). Caspases: enemies within. *Science* **281**, 1312-1316.

**Trent, C.** (1982). "Genetic and behavioral studies of the egg-laying system of *Caenorhabditis elegans*." *Ph.D. thesis. Massachusetts, Institute of Technology, Cambridge, MA.*

**Trent, C., Tsung, N. und Horvitz, H. R.** (1983). Egg-laying defective mutants of the nematode *C. elegans*. *Genetics* **104**, 619-647.

**Vaux, D. L.** (1997). CED-4--the third horseman of apoptosis. *Cell* **90**, 389-390.

**Vaux, D. L., Cory, S. und Adams, J. M.** (1988). Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature* **335**, 440-442.

**Vaux, D. L., Weissman, I. L. und Kim, S. K.** (1992). Prevention of programmed cell death in *Caenorhabditis elegans* by human *bcl-2*. *Science* **258**, 1955-1979.

**Villares, R. und Cabrera, C. V.** (1987). The *achaete-scute* gene complex of *D. melanogaster*: conserved domains in a subset of genes required for neurogenesis and their homology to myc. *Cell* **50**, 415-424.

**Wang, K., Yin, X. M., Chao, D. T., Milliman, C. L. und Korsmeyer, S. J.** (1996). BID: a novel BH3 domain-only death agonist. *Genes Dev* **10**, 2859-2869.

**Whitfield, J., Neame, S. J., Paquet, L., Bernard, O. und Ham, J.** (2001). Dominant-negative c-Jun promotes neuronal survival by reducing BIM expression and inhibiting mitochondrial cytochrome c release. *Neuron* **29**, 629-643.

**Wittenburg, N. a. C. B.** (2002). Tot oder Lebendig-Studien zum programmierten Zelltod in *C. elegans*. *Bio Spektrum* **2**.

**Wood, W. B.** (1988). The nematode *C. elegans*: Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.

**Wu, D., Wallen, H. D., Inohara, N. und Nunez, G.** (1997a). Interaction and regulation of the *Caenorhabditis elegans* death protease CED-3 by CED-4 and CED-9. *J Biol Chem* **272**, 21449-21454.

**Wu, D., Wallen, H. D. und Nunez, G.** (1997b). Interaction and regulation of subcellular localization of CED-4 by CED-9. *Science* **275**, 1126-1129.

**Xue, D. und Horvitz, H. R.** (1997). *Caenorhabditis elegans* CED-9 protein is a bifunctional cell-death inhibitor. *Nature* **390**, 305-308.

**Yang, E., Zha, J., Jockel, J., Boise, L. H., Thompson, C. B. und Korsmeyer, S. J.** (1995). Bad, a heterodimeric partner for Bcl-XL and Bcl-2, displaces Bax and promotes cell death. *Cell* **80**, 285-291.

**Yu, J., Zhang, L., Hwang, P. M., Kinzler, K. W. und Vogelstein, B.** (2001). PUMA induces the rapid apoptosis of colorectal cancer cells. *Mol Cell* **7**, 673-82.

**Yuan, J. und Horvitz, H. R.** (1992). The *Caenorhabditis elegans* cell death gene *ced-4* encodes a novel protein and is expressed during the period of extensive programmed cell death. *Development* **116**, 309-320.

**Yuan, J., Shaham, S., Ledoux, S., Ellis, H. M. und Horvitz, H. R.** (1993). The *C. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. *Cell* **75**, 641-652.

**Zou, H., Henzel, W. J., Liu, X., Lutschg, A. und Wang, X.** (1997). Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell* **90**, 405-413.

---

**Abkürzungsverzeichnis**

Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
ALL	akut lymphatische Leukämie
Apaf-1	“apoptotic protease activating factor 1”
APS	Ammoniumperoxidsulfat
Bcl-2	“B cell lymphoma gene 2”
BH3	“Bcl-2 homology region 3”
BS	Bindestellen
BSA	Bovin Serum Albumin
bZIP	“basic leucine-zipper”
bzw.	beziehungsweise
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
Caspase	„cysteinyll aspartate-specific proteinase“
CtBP	„carboxy-terminal binding protein“
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
DIC	differentialer Interferenz Kontrast Mikroskopie
dI-dC	POLY(dI-dC)POLY
DMF	Dimethylsulfoxid
DMSO	Dimethylsulfat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreiol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EMS	Ethylmethansulfonat
EMSA	„electrophoretic mobility shift assay“
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglyko-bis-(2-aminoyl)-tetraessigsäure
<i>gfp</i>	„green fluorescent protein“
GST	Glutathion-S-Transferase
hASH1	„human achaete-scute homologue-1“
HEPES	N-[2-Hydroxyethyl]piperazin-N'-[2-ethansulfonsäure]
HLF	“hepatic leukemia factor”
HSN	Hermaphroditen-spezifisches Neuron
hScrt	„human scratch“
I2	Interneuronen 2
ICE	„interleukin-1 $\beta$ -converting enzyme“
IPTG	Isopropylthiogalactosid
JNK	„c-jun N-terminal kinase“
L1 bis L4	Larvenstadien
LacI	Laktose-Repressor
<i>lacO</i>	Laktose-Operator-Sequenzen
LB	Luria-Broth
LEU	Leucin
lf	“loss-of-function”
LG	“Linkage Group” (Chromosom)
M3R/L	linkes und rechtes Motoneuron 3



---

M9	<i>C. elegans</i> -Puffer
n	die höchst mögliche Anzahl überlebender NSM-Schwesterzellen in einer bestimmten Anzahl von Tieren
NFIL3	„nuclear factor regulated by IL-3“
NGF	„nerve growth factor“
NGM	<i>C. elegans</i> -Medium
NSML/R	linkes und rechtes neurosekretorisches Motoneuron
OD	optische Dichte
P1K	Kaninchen anti-CES-1-Peptid 1
P2K	Kaninchen anti-CES-1-Peptid 2
P1M	Meerschweinchen anti-CES-1-Peptid 1
P2M	Meerschweinchen anti-CES-1-Peptid 2
PAA	Polyacrylamid
PABA	Para-aminobenzolsäure
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAR	„proline- and acid-rich“
PCR	Polymerasekettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
pHS	Hitzeinduzierbarer Promotor
<i>Pceh-2::gfp</i>	genetische Fusion des <i>ceh-2</i> Promotors mit der codierenden Region von <i>gfp</i>
<i>Ptph-1::gfp</i>	genetische Fusion des <i>tph-1</i> Promotors mit der codierenden Region von <i>gfp</i>
PVP	Polyvinylpyrrolidon
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-vermittelte Interferenz
RT	Raumtemperatur
SC	Hefe-Minimalmedium
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
sd	„semi dominant“
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SNAG	„Snail/Gfi“
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
T <sub>m</sub>	Schmelztemperatur
<i>tph</i>	Tryptophan Hydroxylase
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
ts	Temperatursensitiv
ün	Übernachtkultur
URA	Uracil
UV	Ultraviolettes Licht
wt	Wildtyp
YPD	Hefe-Vollmedium

**Einheiten**

A	Amper
bp	Basenpaar
°C	Grad Celsius
cM	centi-Morgan
g	Gramm
h	Stunde
kb	Kilobase
l	Liter
m	Meter
M	molar (M/l)
mol	Mol
min	Minute
rpm	Umdrehungen pro Minute („rounds per minute“)
T <sub>m</sub>	Schmelztemperatur („melting temperature“)
V	Volt

**Vorsätze**

k	kilo	10 <sup>3</sup>
m	milli	10 <sup>-3</sup>
μ	mikro	10 <sup>-6</sup>
n	nano	10 <sup>-9</sup>

***C. elegans* Gene und Phänotypen**

<i>ceh</i>	„ <i>C. elegans</i> <u>h</u> omeobox“-Gen
<i>ced</i>	„ <u>c</u> ell- <u>d</u> eath abnormal“-Gen
<i>ces</i>	„ <u>c</u> ell- <u>d</u> eath <u>s</u> pecification“-Gen
Dpy	„ <u>d</u> umpy“-Phänotyp
<i>egl</i>	„ <u>e</u> gg <u>l</u> aying defective“-Gen
<i>lin</i>	„ <u>l</u> ineage abnormal“-Gen
<i>lon</i>	„ <u>l</u> ong“-Gen
Muv	„ <u>m</u> ulti <u>v</u> ulva“-Phänotyp (Mehrere Vulvastrukturen)
<i>rol</i>	„ <u>r</u> oller“-Gen
<i>tra</i>	„ <u>t</u> ransformer“-Gen
Unc	„ <u>u</u> n <u>c</u> oordinated“-Phänotyp (Unkoordinierte Bewegung)
<i>ham</i>	„ <u>H</u> SN <u>a</u> bnormal <u>m</u> igration“-Gen

## **Danksagung**

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Charles N. David für die Gelegenheit, diese Promotion am Max-Planck-Institut für Neurobiologie anzufertigen, für seine Diskussionsbereitschaft und für sein Interesse am Fortgang meiner Arbeit.

Prof. Tobias Bonhoeffer möchte ich sehr herzlich danken, für seine weitreichende Unterstützung während meiner Doktorarbeit.

Dr. Barbara Conradt danke ich für die Überlassung des interessanten Themas, aber auch für die intensive wissenschaftliche Betreuung, die ständige Diskussionsbereitschaft, ihre Begeisterungsfähigkeit und die Korrektur dieser Arbeit.

Dr. Georg Dechant möchte ich für die Erstellung des Zweitgutachtens und für seine Hilfsbereitschaft ganz herzlich danken.

Prof. Yves-Alain Barde möchte ich für seine Unterstützung und seine Diskussionsbereitschaft, vor allem zu Beginn meiner Doktorarbeit, ganz herzlich danken.

Allen Mitgliedern des Labors danke ich für die ausgezeichnete Arbeitsatmosphäre und die gute Zusammenarbeit im Labor. Besonders hervorzuheben sind dabei Julia Hatzold, vor allem für die zahlreichen fachlichen und freundschaftlichen Diskussionen, Cinthia Briseno für die nie endende Unterstützung, für Ihr Vertrauen, ihre Freundschaft und vieles mehr, Nicole Wittenburg für Ihre weitreichende und selbstlose Hilfe sowohl im Labor als auch privat, Phillip Grote für seine unbeschreibliche Einzigartigkeit, Hilfsbereitschaft und Freundschaft, Pamela Opitz für viele hilfreiche Gespräche und Claudia Huber für viele Dinge, die das Leben im Labor vereinfachen. Sibylle Jäger möchte ich ganz herzlich dafür danken, daß sie mich während den zwei gemeinsamen Jahren im Labor so sehr zu meinem Vorteil geprägt hat. Ich danke Euch allen dafür, daß Ihr meine Arbeitskollegen ward und nun meine Freunde seid.

Allen anderen Mitgliedern des Instituts danke ich für die vielen kleinen und großen Dinge.

Mein persönlicher und herzlicher Dank gilt meinen Eltern Karin und Michael, die mich stets mit viel Vertrauen über all die Jahre unterstützt haben, mir viel Freiraum für die Umsetzung meiner Ziele gegeben haben und immer bereit waren meine Begeisterungsfähigkeit zu teilen.

Bettina Kalischko danke ich für so viele Dinge, die den Rahmen einer Danksagung sprängen würden, aber vor allem dafür, daß unsere Freundschaft auch die sehr streßvollen und arbeitsintensiven Phasen meiner Doktorarbeit durchgehalten hat.

Kerstin Grabe und Uschi Sußner danke ich für sehr viele hilfreiche Gespräche und dafür, daß sie mich immer wieder auf den Boden der Tatsachen zurückgeholt haben.

And finally I want to thank somebody very special, Miguel Vaz Afonso, for so many things I don't want to mention here.

# Lebenslauf

## Persönliche Daten

Name: Marion-Karin Thellmann  
Geburtsdatum: 16. Mai 1973  
Geburtsort: Schäßburg, Siebenbürgen (Rumänien)  
Staatsangehörigkeit: deutsch

## Schulausbildung

1979 bis 1983 Volksschule in Arkeden, Rumänien  
1983 bis 1984 Gesamtschule in Schäßburg, Rumänien  
1984 bis 1994 Christoph-Scheiner-Gymnasium in Ingolstadt  
06/1994 Allgemeine Hochschulreife

## Studium

11/1994-09/1999 Studium der Biologie an der FAU Erlangen-Nürnberg  
11/1996 Diplom-Vorprüfung  
11/1998 Diplom-Hauptprüfung  
12/1998 Diplomarbeit bei Prof. Dr. W. Hillen am Institut für  
Mikrobiologie, Biochemie und Genetik  
Thema: Konstruktion von neuartigen reversen  
TetR-VP16 Transaktivatoren  
09/1999 Diplom-Biologin Univ.

## Promotion

Seit 1. November 1999 Doktorarbeit am Max-Planck-Institut für Neurobiologie  
in Martinsried  
Arbeitsgruppe Dr. Barbara Conradt

## **Erklärung**

Hiermit versichere ich, Marion-Karin Thellmann, geboren am 16. Mai 1973 in Schäßburg, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfaßt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.