

INAUGURAL-DISSERTATION

zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Naturwissenschaftlichen-Mathematischen Gesamtfakultät
der
Ruprecht-Karls-Universität
Heidelberg

vorgelegt von

Diplom-Biologin
Christina S. Schmid

Tag der mündlichen Prüfung:

Thema:

Identifizierung und Charakterisierung von AST-1 in *C. elegans*,
einem ETS Transkriptionsfaktor, der die axonale Wegfindung reguliert

Betreuer: Dr. Harald Hutter
Max-Planck-Institut für medizinische Forschung
Jahnstraße 29
69120 Heidelberg

Gutachter: Prof. Dr. G. Elisabeth Pollerberg
Institut für Zoologie
Im Neuenheimer Feld 237
69120 Heidelberg

Prof. Dr. Peter H. Seeburg
Max-Planck-Institut für medizinische Forschung
Jahnstraße 29
69120 Heidelberg

Erklärung gemäß § 7 (3) b) und c) der Promotionsordnung:

Ich erkläre hiermit, daß ich die vorgelegte Dissertation selbst verfaßt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe. Desweiteren erkläre ich hiermit, daß ich an keiner anderen Stelle ein Prüfungsverfahren beantragt bzw. die Dissertation in dieser oder anderer Form bereits anderweitig als Prüfungsarbeit verwendet oder einer anderen Fakultät als Dissertation vorgelegt habe.

Heidelberg, den 23. August 2004

Inhaltsverzeichnis

ZUSAMMENFASSUNG	1
SUMMARY	2
1 EINLEITUNG	3
1.1 Neuronale Differenzierung	3
1.1.1 Spezifikation des Zellschicksals im frühen Embryo von <i>Caenorhabditis elegans</i>	4
1.1.2 Neuronale Differenzierung der Motoneuronen in Vertebraten	5
1.2 Zielgerichtetes Auswachsen von Axonen	7
1.3 Die Mechanismen der axonalen Wegfindung sind konserviert	8
1.3.1 Die Signalmoleküle Netrin, Slit, Semaphorin und Ephrin	9
1.3.2 Die Adhäsionsmoleküle	12
1.3.3 Die extrazelluläre Matrix	16
1.3.4 Die Morphogene Sonic hedgehog und BMPs	16
1.3.5 Intrazelluläre Signaltransduktion	17
1.4 Die Regulation von Signalmolekülen und Rezeptoren in der axonalen Wegfindung	17
1.5 <i>Caenorhabditis elegans</i> als Modellorganismus	19
1.5.1 Das Nervensystem in <i>C. elegans</i>	20
1.6 Vorarbeiten: Genetische Screens in <i>C. elegans</i>	21
1.7 Zielsetzung der Arbeit	22
2 ERGEBNISSE	23
2.1 Axonale Auswuchsdefekte in <i>ast-1</i> Mutanten	23
2.1.1 Die Interneurone in <i>ast-1(rh300)</i> und <i>ast-1(hd1)</i> Mutanten	23
2.1.2 Die Motoneurone in <i>ast-1(rh300)</i> Mutanten	26
2.1.3 Die sensorischen Neurone in <i>ast-1(rh300)</i> Mutanten	27
2.1.4 Das gesamte Nervensystem in <i>ast-1(rh300)</i> Mutanten	28
2.2 <i>Rh300</i> und <i>hd1</i> sind verschiedene Allele desselben Gens <i>ast-1</i>	28
2.3 Kartierung und Klonierung von <i>ast-1</i>	29
2.3.1 Kopplungsanalysen	29
2.3.2 Kartierung mittels der snip-SNP Methode	31
2.3.3 Kartierung mit Hilfe der Deletion <i>maDf4</i>	33

2.3.4 Rettungsexperimente	34
2.4 <i>Ast-1</i> kodiert für einen ETS Transkriptionsfaktor	39
2.4.1 Bestätigung der vorhergesagten Exon-Intron-Struktur von <i>ast-1</i>	41
2.5 <i>Ast-1(hd92)</i> Deletionsmutante	42
2.5.1 Isolation der <i>ast-1(hd92)</i> Deletionsmutante	42
2.5.2 Morphologische Untersuchung von <i>ast-1(hd92)</i>	45
2.5.3 Untersuchung der Interneurone von <i>ast-1(hd92)</i>	46
2.5.4 Expression von <i>ast-1(wt)</i> in der Deletionsmutante <i>ast-1(hd92)</i>	47
2.6 Expressionsanalyse von <i>ast-1</i>	48
2.6.1 Herstellung der <i>ast-1</i> Reporter-Konstrukte	48
2.6.2 Das Expressionsmuster des Promotor-Konstrukts	49
2.6.3 Das Expressionsmuster des Δ <i>ast-1</i> -Fusionskonstrukts	50
2.6.4 Das Expressionsmuster des <i>ast-1</i> -Fusionskonstrukts	51
2.6.5 Expression von <i>ast-1</i> in Wildtyptieren und <i>ast-1(rh300)</i> Mutanten	53
2.7 Interaktion von <i>ast-1</i> mit Genen, die am Auswachsen von Axonen beteiligt sind	55
2.7.1 <i>Ast-1</i> und die Transkriptionsfaktoren <i>zag-1</i> und <i>lin-11</i>	56
2.7.2 <i>Lin-11</i> - und <i>zag-1</i> -Reportergene in <i>ast-1(rh300)</i> Mutanten	57
2.7.3 <i>Ast-1</i> und die Mitglieder der Netrinfamilie	58
2.7.4 <i>Ast-1</i> und <i>sax-3</i> (Robo)	61
2.7.5 <i>Ast-1</i> und das Aktin-regulierende Protein UNC-34/ENA	62
2.7.7 <i>Ast-1</i> und Nidogen	63
3 DISKUSSION	65
3.1 AST-1 kontrolliert Aspekte der axonalen Wegfindung und der Pharynxentwicklung	65
3.1.1 Nervensystemdefekte in <i>ast-1</i> Mutanten	65
3.1.2 AST-1 reguliert die Differenzierung des Pharynx	67
3.2 AST-1 ist ein ETS Transkriptionsfaktor	68
3.2.1 Die Struktur der ETS DNS-Bindedomäne	69
3.2.2 AST-1 gehört zur Fli-1 Unterfamilie der ETS Transkriptionsfaktoren	70
3.2.3 Die ETS Genfamilie in <i>C. elegans</i>	71
3.3 AST-1 als Teil eines Transkriptionsfaktor-Netzwerks, das neuronale Differenzierung kontrolliert	72
3.3.1 <i>Ast-1</i> wird in Neuronen exprimiert, wenn Axone auswachsen	72

3.3.2 <i>Ast-1</i> interagiert genetisch mit den Transkriptionsfaktoren <i>lin-11</i> und <i>zag-1</i>	74
3.3.3 AST-1 Homologe in Vertebraten regulieren die Motoneurondifferenzierung	76
3.3.4 Modell zur Funktion von AST-1 in neuronaler Differenzierung	77
3.4 <i>Ast-1</i> interagiert mit bekannten Genen, die an axonaler Wegfindung beteiligt sind	79
3.4.1 <i>Ast-1</i> interagiert mit Komponenten des Netrin-Signalweges	79
3.4.2 <i>Ast-1</i> interagiert mit Nidogen	80
3.5 Ausblick	81
4 MATERIAL UND METHODEN	82
<hr/>	
4.1 Material	82
4.1.1 Geräte	82
4.1.2 Chemikalien	82
4.1.3 Verbrauchsmaterialien	83
4.1.4 Enzyme	83
4.1.5 Oligonukleotide	83
4.1.6 Plasmide	85
4.1.7 Cosmide und Yeast Artificial Chromosomes (YACs)	87
4.1.8 cDNAs	87
4.1.9 <i>E. coli</i> Stämme	87
4.1.10 Hefestämme	87
4.1.11 <i>C. elegans</i> Stämme	87
4.1.12 Puffer und Medien	89
4.2 Methoden	91
4.2.1 Aufreinigung von Cosmiden aus <i>E. coli</i>	91
4.2.2 Kultivierung und Aufreinigung von Yeast Artificial Chromosomes (YAC)	91
4.2.3 cDNS Isolierung aus einer Lambda Phagen-Bank	92
4.2.4 Biologische Untersuchung von <i>C. elegans</i>	92
4.2.4.1 Kultivierung und Anzucht von <i>C. elegans</i>	92
4.2.4.2 Einfrieren und Auftauen von <i>C. elegans</i>	92
4.2.4.3 Genetische Methoden	93
4.2.4.4 Isolierung von genomischer DNS aus <i>C. elegans</i>	95
4.2.5 Mikroskopie lebender Würmer	96
4.2.5.1 Dialkyl-Indocarbocyanin (DiI)-Färbung	96
4.2.5.2 Die Herstellung von mehrfarbigen <i>C. elegans</i> GFP Stämmen	96

4.2.5.3 Konfokale Mikroskopie	97
4.2.5.4 4D-Mikroskopie	97
4.2.6 Die Kartierungsmethode über snip-SNP-Marker	97
4.2.6.1 PCR und Verdau für die snip-SNP Kartierung	99
4.2.7 Isolierung einer <i>C. elegans</i> Deletionsmutante	99
5 ANHANG	101
<hr/>	
5.1 Abkürzungen	101
5.2 Einheiten	101
5.3 Vorsätze	102
5.4 <i>C. elegans</i> Gene und Phänotypen	102
5.5 Nukleotide	102
5.6 Aminosäuren-Nomenklatur nach IUPAC-IUB Vereinbarungen (1969)	102
6 LITERATUR	103
<hr/>	
7 DANKSAGUNG	115
<hr/>	

Zusammenfassung

Eine offene Frage in der Entwicklungsneurobiologie ist, wie Axone ihre synaptischen Partner finden. Ohne ein gerichtetes Auswachsen von Axonen kann sich kein funktionierendes Nervensystem bilden. Die Mechanismen mit denen Axone auf Signalmoleküle reagieren sind weitgehend unbekannt. Deshalb führten wir einen Screen in *C. elegans* durch mit Tieren, die GFP in den Kommandointerneuronen des Motorschaltkreises exprimierten. Wir isolierten zwei Allele mit Punktmutationen in dem bisher unbekanntem Gen *ast-1* (axonal steering). In Wildtyptieren verliefen die GFP exprimierenden Axone dicht gebündelt im rechten Ventralstrang. In *ast-1* Mutanten waren die Interneuronaxone im Ventralstrang defaszikuliert und kreuzten vom rechten in das linke Bündel oder erreichten den Ventralstrang gar nicht. Die VC Motoneurone hatten ähnliche Faszikulierungsdefekte. Die Mutanten konnten sich normal fortbewegen, trotz der Defekte in den Kommandointerneuronen des Motorschaltkreises. Demnach kann der Motorschaltkreis bis zu einem gewissen Grad gestört werden, ohne dass er seine Funktionalität verliert. Das zielgerichtete Auswachsen anderer Axone war nicht beeinträchtigt. Zellschicksal, Zellwanderung oder nicht-neuronale Gewebe waren unbeeinflusst. Allerdings zeigten *ast-1* Deletionsmutanten zusätzlich zu den neuronalen Defekten noch späte Differenzierungsdefekte des Pharynx.

Ast-1 kodiert für einen Transkriptionsfaktor mit einer ETS DNS-Bindedomäne und ist eng mit der Fli-1 Unterfamilie in Säugetieren verwandt. *Ast-1::YFP* Expression begann während der Embryonalentwicklung in sensorischen Neuronen und Interneuronen, genau zu dem Zeitpunkt wenn sich Neurone differenzieren. Anschließend wurde die Expression schwächer bis in adulten Tieren nur noch wenige Neurone *ast-1::YFP* exprimierten.

Wir konnten zeigen, dass *ast-1* genetisch mit den Transkriptionsfaktoren *zag-1* und *lin-11* interagiert. AST-1 ist demnach Teil eines transkriptionellen Netzwerkes, das neuronale Differenzierung kontrolliert. *Ast-1* interagiert zudem mit Genen, von denen bekannt ist, dass sie an axonaler Wegfindung beteiligt sind. Beispiele sind der UNC-6/Netrin Rezeptor UNC-40/DCC, das Aktin-modulierende Protein UNC-34/ENA und die extrazelluläre Matrixkomponente Nidogen. AST-1 könnte direkt die Expression von Genen steuern, die für Signalmoleküle oder Rezeptoren des axonalen Auswachsens kodieren, wobei die Zielgene bisher noch nicht identifiziert wurden.

AST-1 reguliert sowohl in der neuronalen Differenzierung als auch bei der Morphogenese des Pharynx einen späten Schritt. Bemerkenswert bei der neuronalen Differenzierung ist die Spezifität von AST-1. Es agiert nur in einer bestimmten kleinen Untergruppe von Neuronen, wo es wiederum nur einen Teilaspekt der neuronalen Differenzierung, nämlich das zielgerichtete Auswachsen von Axonen, kontrolliert.

Summary

One of the major unsolved problems in developmental neurobiology is the question of how axons find their way to their specific synaptic partners, which is crucial for the function of every nervous system. The mechanisms through which axons respond to guidance cues are poorly understood.

Therefore we performed a screen in *C. elegans* based on animals expressing GFP in the command interneurons of the motor circuit and recovered two alleles of the novel gene *ast-1* (axonal steering). In wildtype animals GFP labelled axons formed a tightly fasciculated subbundle within the right ventral cord. In *ast-1* mutants interneuron axons in the ventral cord were defasciculated and axons crossed from the right to the left bundle or occasionally did not even reach the ventral cord. Similar fasciculation defects were found in VC motoneurons. The mutants were able to move normally despite these defects in the command interneurons of the motorcircuit. This leads to the conclusion that the motorcircuit can be disturbed to a certain degree without abolishing its general functionality. There were no obvious defects in the navigation of other axons. Non-neuronal tissues and cell migration appeared unaffected in these mutants. However in *ast-1* deletion mutants late pharynx differentiation defects were found in addition to the neuronal defects. *Ast-1* codes for a novel transcription factor with an ETS DNA-binding domain and is closely related to the mammalian *fli-1* subfamily. *Ast-1::YFP* expression was dynamic in sensory neurons and interneurons and started during embryonic development when neurons differentiate and decreased afterwards till only few neurons expressed *ast-1* in adult animals. We showed that *ast-1* genetically interacts with the transcription factors *zag-1* and *lin-11*, suggesting that it is part of a transcriptional network controlling neuronal differentiation. In addition, *ast-1* interacts with genes known to play roles in axon guidance, for example the UNC-6/netrin receptor UNC-40/DCC, the actin-regulating protein UNC-34/ENA and the extracellular matrix component nidogen. AST-1 may directly modulate the expression of genes coding for axon guidance molecules or receptors, although target genes have not been identified so far.

AST-1 is acting at a very late step in neuronal differentiation and it also controls a late step in pharynx morphogenesis. In neurons AST-1 is specifically regulating one subaspect of neuronal differentiation, namely the axon outgrowth of only a distinct subset of neurons.

1 Einleitung

Genetische Variation führt zur Vielfalt biologischer Systeme, die durch eine Vielzahl individueller Zelltypen charakterisiert ist. Besonders das Nervensystem in Vertebraten enthält die wahrscheinlich reichhaltigste Auswahl an Zelltypen. Die ursprüngliche Schätzung von wenigen hundert Neuronenklassen in Säugetieren scheint sehr konservativ zu sein (Stevens, 1998). Diese vielen Neuronenklassen bilden ein komplexes Netzwerk, das für die Funktion des Nervensystems essentiell ist. Die Determinierung des neuronalen Zellschicksals sowie das zielgerichtete Auswachsen von Axonen sind dabei zwei Aspekte, die zur Zeit im Mittelpunkt des Interesses stehen. Die große Anzahl und Komplexität der neuronalen Zelltypen und synaptischen Verbindungen machen eine Untersuchung schwierig, weshalb sich einfachere Organismen als Modellsysteme sehr gut eignen. Vor allem weil die Mechanismen, die eingesetzt werden um die neuronale Zellvielfalt in Vertebraten zu generieren, häufig evolutionär konserviert sind.

1.1 Neuronale Differenzierung

In neueren Untersuchungen wurde eine Anzahl von Genen identifiziert, die die Differenzierung einzelner Zelltypen regulieren. Dies führte zur Erkenntnis, dass die neuronale Identität unter der Kontrolle eines komplexen Netzwerkes von Transkriptionsfaktoren steht, die gleichzeitig oder nacheinander ihre Funktion ausüben (Übersichtsartikel von Jurata et al. 2000; Lee und Pfaff, 2001). Die regulatorischen Transkriptionsfaktoren werden ihrerseits von Signalen kontrolliert, die von Nachbarzellen stammen können. Zwei wesentliche Mechanismen steuern die Zelldifferenzierung: die autonome Differenzierung und die Wechselwirkungen zwischen Zellen. Das Schicksal mancher Nervenzellen hängt ausschließlich vom Teilungsplan ab, dem die Zelle unterliegt. Dabei werden zytoplasmatische oder nukleäre Proteine an die Nachkommenschaft einer sich teilenden Vorläuferzelle weitergegeben, wodurch unterschiedliche Tochterzellen entstehen (Bardin et al., 2004). Die Differenzierung der meisten Nervenzellen hängt jedoch nicht nur von ihrem Zellstammbaum ab, sondern auch von Signalen anderer Zellen in ihrer Umgebung. Die Moleküle, die diese extrinsischen Signale vermitteln, können sezerniert werden oder Bestandteil der Zelloberfläche sein. Zahlreiche Rezeptoren übertragen das Signal über die Zellmembran hinweg und aktivieren in der Zelle sogenannte Second-

Messenger-Systeme, die direkt oder indirekt die Aktivität von Transkriptionsfaktoren regulieren. Andere Rezeptoren für diffusionsfähige Signale, wie zum Beispiel Steroidhormone, befinden sich im Zellkern und regulieren selbst die Gentranskription.

Von keinem einzigen Organismus haben wir bislang ein komplettes Bild von all den bekannten Signalmolekülen, die der neuronalen Entwicklung zugrunde liegen. Im Folgenden werden die unterschiedlichen Strategien beispielhaft erklärt.

1.1.1 Spezifikation des Zellschicksals im frühen Embryo von *Caenorhabditis elegans*

Der am besten untersuchte neurale Zellstammbaum ist der des Fadenwurms *Caenorhabditis elegans*. Die Teilungsfolge einer jeden Körperzelle ist bekannt und der Zellstammbaum ist invariant (Sulston und Horvitz, 1977; Kimble und Hirsh, 1979; Sulston, Schierenberg et al., 1983). Die Spezifikation des Zellstammbaums im *C. elegans* Embryo ist eng an das Muster der Zellteilungen geknüpft. Es illustriert die Verbindung zwischen zytoplasmatischen Unterschieden, die maternal festgelegt wurden, und lokalen Zell-Zell Interaktionen. Die erste Zellteilung verläuft asymmetrisch und es entstehen eine größere anteriore Somazelle (AB) und eine kleinere posteriore Keimbahnzelle (P1). In der Zygote sind das maternale Protein PAR-1 und die P-Granula im posterioren Teil der Zelle konzentriert, was eine Etablierung der anterior-posterioren Achse im Embryo zur Folge hat (Kemphues et al., 1988; Guo und Kemphues, 1995). Die gesamte P-Zelllinie differenziert sich zu Keimbahnzellen durch asymmetrische Teilungen, wobei die P-Granula unterschiedlich auf die Tochterzellen aufgeteilt sind (Strome und Wood, 1983). Im Vierzellstadium exprimieren zwei Zellen das Protein GLP-1. Aber nur eine Zelle ist benachbart mit einer APX-1 exprimierenden Zelle. APX-1 ist der Ligand, der den Rezeptor GLP-1 aktiviert (Mello et al., 1994). Die beiden Proteine ähneln den Vertebraten- und Insektenproteinen Notch und Delta. Somit wird nur eine GLP-1 exprimierende Zellen von APX-1 aktiviert und nimmt einen anderen Zellschicksal an. Auch wenn die Genprodukte während der ersten Teilungen asymmetrisch verteilt sind, ist das Zellschicksal im frühen Embryo doch entscheidend von lokalen Zell-Zell Interaktionen abhängig.

1.1.2 Neuronale Differenzierung der Motoneuronen in Vertebraten

Das Nervensystem der Vertebraten entsteht während der Embryonalentwicklung aus dem äußersten Keimblatt, dem Ektoderm. Durch Wechselwirkungen von Mesoderm und Ektoderm beginnt die neuronale Induktion, die zur Bildung der Neuralplatte führt. Diese faltet sich anschließend zum Neuralrohr, das sich schließt, und aus dem das Gehirn und auch das Rückenmark entstehen. Im sich entwickelnden Rückenmark findet man ein definiertes dorso-ventrales Muster an Neuroblasten. In der ventralen Region bilden sich zukünftige Motoneuronen während sich im Dorsalbereich Kommissurneuronen differenzieren, deren Axone die beiden Seiten des Rückenmarks miteinander verbinden. Die neuronale Differenzierung erfolgt in mehreren Entwicklungsschritten. Wenn Neuroblasten den Zellzyklus verlassen, dann sind sie bereits determiniert für eine bestimmte Neuronenklasse. Die weitere Differenzierung führt zu spezifischen Eigenschaften, wie zur Position des Somas, zum Muster der axonalen Projektionen, zur dendritischen Morphologie, zur Expression von Ionenkanälen und Rezeptoren für Neurotransmitter, sowie zur Produktion bestimmter Neurotransmitter. Viele dieser Merkmale sind koordiniert reguliert und werden während der Entwicklung ausgebildet (Übersichtsartikel von Edlund und Jessell, 1999; Jessell, 2000).

Während der frühen Entwicklung des Zentralnervensystems in Vertebraten nehmen Vorläuferzellen in der Ventrikularschicht regional unterschiedliche Eigenschaften an, die später den neuronalen Zelltyp ihrer Nachkommen bestimmen. Die Charakteristika der Vorläuferzellen werden durch sezernierte Moleküle bestimmt, die Gradienten bilden. Im dorsalen Teil des Rückenmarks werden beispielsweise BMPs („bone morphogenetic proteins“) von der Ektodermoberfläche und der Deckplatte produziert. Die BMPs kontrollieren die Entwicklung der dorsalen Zellklassen, wie sensorische Neuronen und Neuralleistenzellen (Übersichtsartikel von Lee und Jessell, 1999). Im ventralen Horn des Rückenmarks hingegen wird das Glykoprotein Sonic Hedgehog (Shh) vom Notochord und von der Bodenplatte sezerniert. Die Entstehung verschiedener Neuronenklassen, wie Motoneurone und ventrale Interneurone, wird über die Konzentration von Shh kontrolliert (Übersichtsartikel von Briscoe und Ericson, 2001). Die Vorläuferzellen reagieren auf den Shh-Gradienten, indem sie konzentrationsabhängig unterschiedliche Gruppen von Transkriptionsfaktoren exprimieren (Übersichtsartikel von Gurdon und Bourillot, 2001). Die kombinatorische Expression von Lim (*lin-11*, *islet* und *mec-3* waren die ersten

Vertreter dieser Klasse) und Hox („Homöobox“) Transkriptionsfaktoren unterteilt das ventrale Horn des Rückenmarks in fünf Vorläuferdomänen, die jeweils einen unterschiedlichen Neuronentyp hervorbringen (Briscoe et al., 2000). Die Transkriptionsfaktoren können anhand ihrer Reaktion auf Shh in zwei Klassen unterteilt werden. Die Klasse I Transkriptionsfaktoren werden von Shh reprimiert, während die Expression der Klasse II Transkriptionsfaktoren von Shh aktiviert wird (Briscoe et al., 2000; Mizuguchi et al., 2001; Novitsch et al., 2001; Vallstedt et al., 2001). Gegenseitige inhibitorische Wirkungen von benachbarten Transkriptionsfaktoren bilden scharfe Grenzen zwischen den Vorläuferdomänen (Briscoe et al., 2000).

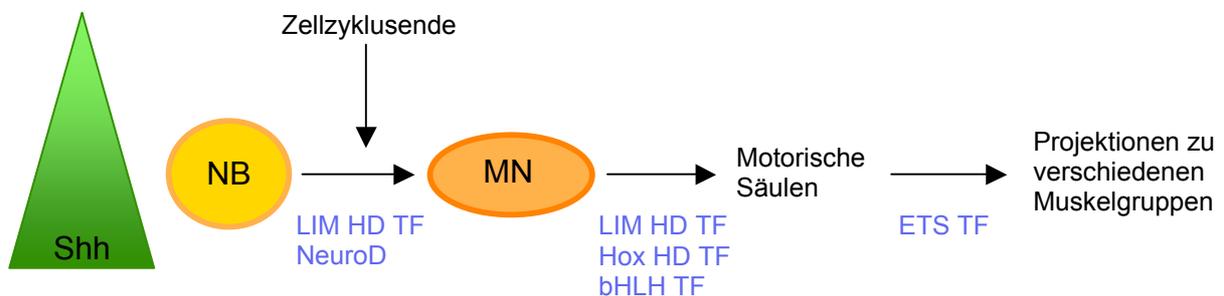


Abb.1: Differenzierung der Motoneurone in Vertebraten

Schematische Darstellung des Differenzierungsprozesses von Motoneuronen im Rückenmark. Verschiedene Kombinationen von Transkriptionsfaktoren (TF) steuern die einzelnen Schritte. Ein Gradient des Proteins Shh löst die kombinatorische Expression von Lim- und Hox-Homöodomäne (HD) Transkriptionsfaktoren aus, was wiederum die Entwicklung von Neuroblasten (NB) zu Motoneuronen (MN) steuert. Die Differenzierung zu motorischen Säulen wird zusätzlich von bHLH („basic Helix-Loop-Helix“) Transkriptionsfaktoren gesteuert. Einer der letzten Differenzierungsschritte, nämlich das Auswachsen der Nervenfortsätze zu den Zielmuskeln, wird von ETS Transkriptionsfaktoren reguliert.

Die postmitotischen Motoneurone bilden im nächsten Differenzierungsschritt motorische Säulen, die eine Funktionseinheit darstellen. Die Bildung dieser Säulen wird ebenfalls von Lim Transkriptionsfaktoren reguliert. Der Lim Code wird anhand der kombinatorischen und zeitlich genau regulierten Expression von Lim HD Transkriptionsfaktoren wie Isl1, Isl2, Lim1, Lim3, Lhx3 und Lhx4 etabliert. Die Gene des Lim Codes werden exprimiert lange bevor die Zielmuskeln erreicht und innerviert werden. In *C. elegans* besitzt das Gen *mec-3*, das ebenfalls zur Lim Familie gehört, eine wichtige Rolle in der Differenzierung von mechanosensorischen Neuronen (Duggan et al., 1998). Es agiert nicht in Kombination mit anderen Lim Transkriptionsfaktoren, sondern alleine. Ein Grund dafür könnte sein, dass in *C. elegans* weniger verschiedene Zelltypen vorhanden sind.

Die motorischen Säulen werden weiter unterteilt in Pools, die spezifische Muskeln innervieren. Diese Pools unterscheiden sich durch die Expression von unterschiedlichen

Mitgliedern der ETS- („E-twenty-six“) Transkriptionsfaktoren (Lin et al., 1998). Beispielsweise wird das ETS Gen *ER81* in Motoneuronen exprimiert, die den Extremitätenmuskel im Huhn innervieren, wohingegen ein zweites ETS Gen, *PEA3*, in einer zweiten Gruppe von Motoneuronen exprimiert wird.

Die Expression von LIM Homöobox Transkriptionsfaktoren ist beschränkt auf wenige Neuronenklassen, so dass damit die Entstehung von hunderten verschiedener Neuronenklassen nicht erklärt werden kann. In den letzten Jahren sind einige weitere Transkriptionsfaktoren identifiziert worden, die eine Rolle in der Differenzierung von neuronalen Subtypen spielen (Brunet und Pattyn, 2002; Dubois und Vincent, 2001; Lee und Pfaff, 2001; Marquardt und Pfaff, 2001). Dennoch ist die Anzahl der identifizierten Proteine, die in der neuronalen Differenzierung wichtig sind, zu klein um einen solch komplexen Vorgang zu regulieren. Vor allem die transkriptionelle Kontrolle der Differenzierungsgene ist weitgehend unbekannt.

1.2 Zielgerichtetes Auswachsen von Axonen

Das zielgerichtete Auswachsen von Axonen ist ein Schritt, der erst spät im Differenzierungsprozess von Neuronen stattfindet. Die neuronalen Netzwerke sind entscheidend für die Funktion eines jeden Nervensystems. Eine grundlegende Frage in der Entwicklungsneurobiologie ist, wie Nervenfortsätze ihr charakteristisches Muster an synaptischen Verbindungen ausbilden. Es gibt zwei Typen von Nervenfortsätzen: Dendriten sind der rezeptive Teil des Neurons, während das Axon für die Signalweitergabe verantwortlich ist. Einige Neurone besitzen kurze Axone, die ihren Partner in der direkten Umgebung finden. Andere Neurone senden ihre Axone zu weit entfernten zentralen oder peripheren Zielgebieten. Die Wachstumszone liegt am distalen Ende des Axons und wächst durch das Hinzufügen von Zytoskelettkomponenten. An der Spitze des auswachsenden Axons befindet sich eine spezialisierte Struktur, der Wachstumskegel (Landis, 1983). Im Wachstumskegel findet die Aufnahme und Integration von Signalen aus der Umgebung der Zelle statt. Der Wachstumskegel muss in der Lage sein, eine große Anzahl extrazellulärer Signale zu integrieren und in entsprechende Zytoskelettveränderungen umzusetzen, um das weitere Auswachsen des Axons zu steuern.

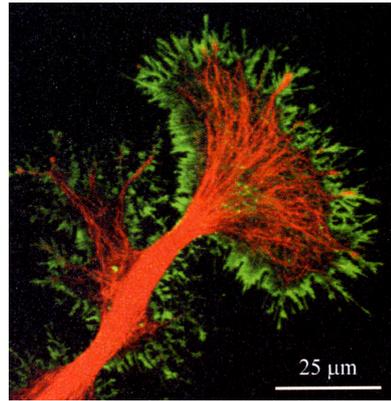


Abb.2: Der Wachstumskegel

An der Spitze des auswachsenden Axons befindet sich der Wachstumskegel, der hier aus dem Tabakswärmer *Manduca sexta* abgebildet ist. Aktin der Filopodien ist grün markiert mit fluoreszierendem Phalloidin und die Mikrotubuli sind rot markiert mit einem fluoreszierenden Antikörper gegen Tubulin. (von Levin und Luedemanan, aus *Developmental Biology*, Gilbert.)

Die axonale Wegfindung wird durch das koordinierte Agieren von verschiedenen Klassen von Signalmolekülen gesteuert. Diese Signalmoleküle können einen Wachstumskegel anziehen oder abstoßen. Sie können über kurze oder lange Distanzen wirken und sowohl membrangebunden wie auch löslich vorliegen. Diese Eigenschaften schließen sich nicht gegenseitig aus. Eher ist es so, dass Axone über mehrere verschiedene Mechanismen, die zusammen wirken, geführt werden. Die Signalmoleküle und ihre Rezeptoren werden zu verschiedenen Zeiten während der Entwicklung und oft noch später im adulten Gehirn exprimiert. Die transkriptionelle Regulation von Signalmolekülen und Rezeptoren beinhaltet sowohl räumliche wie auch zeitliche Kontrollen für das axonale Auswachsen.

1.3 Die Mechanismen der axonalen Wegfindung sind konserviert

Gerade in den letzten Jahren wurden eine Reihe von neuen Signalmolekülen und Rezeptoren an der Zelloberfläche identifiziert, die eine wichtige Rolle beim Auswachsen von Axonen spielen (Übersichtsartikel von Dickson, 2002; Yu und Bargmann, 2001; Araujo und Tear, 2003; Huber et al., 2003). Dies führte zu generellen Erkenntnissen über die Mechanismen der axonalen Wegfindung. Viele Signalmoleküle sind multifunktional und ziehen bestimmte Axone an während sie andere abstoßen. Verschiedene Axone können auf dasselbe Signalmolekül verschieden reagieren, entweder durch eine unterschiedliche Zusammensetzung ihrer Oberflächenrezeptoren oder aufgrund von Variationen in der Signalweitergabe ins Zellinnere. Viele Signalmoleküle sind zwischen Vertebraten und Invertebraten evolutionär konserviert und erfüllen ähnliche Aufgaben in der axonalen

Wegfindung. Höhere Vertebraten haben typischerweise mehrere Mitglieder einer Familie von Signalmolekülen, die oft überlappende Funktionen besitzen. In Invertebraten ist meist nur ein Vertreter der Familie vorhanden, der dann alle Aufgaben übernehmen kann.

1.3.1 Die Signalmoleküle Netrin, Slit, Semaphorin und Ephrin

Vier große Familien von Signalmolekülen spielen eine wichtige Rolle beim gerichteten Auswachsen von Axonen: Netrine, Slits, Semaphorine und Ephrine. Nachfolgend werden diese vier Familien kurz beschrieben.

Das Signalmolekül Netrin

Netrine sind Vertebraten-Homologe des Proteins UNC-6 aus *C. elegans*, eines der ersten Signalmoleküle, die aufgrund ihrer Funktion beim zielgerichteten Auswachsen von Axonen entdeckt wurden. Im Jahr 1985 identifizierten Hedgecock und Kollegen *unc-6* in *C. elegans* in einem Screen für Mutationen, die die axonale Wegfindung an der Mittellinie betrafen (Hedgecock et al., 1985). Der Name *unc* kommt von „uncoordinated“, was von der beeinträchtigten Bewegungsfähigkeit der Mutanten herrührt.

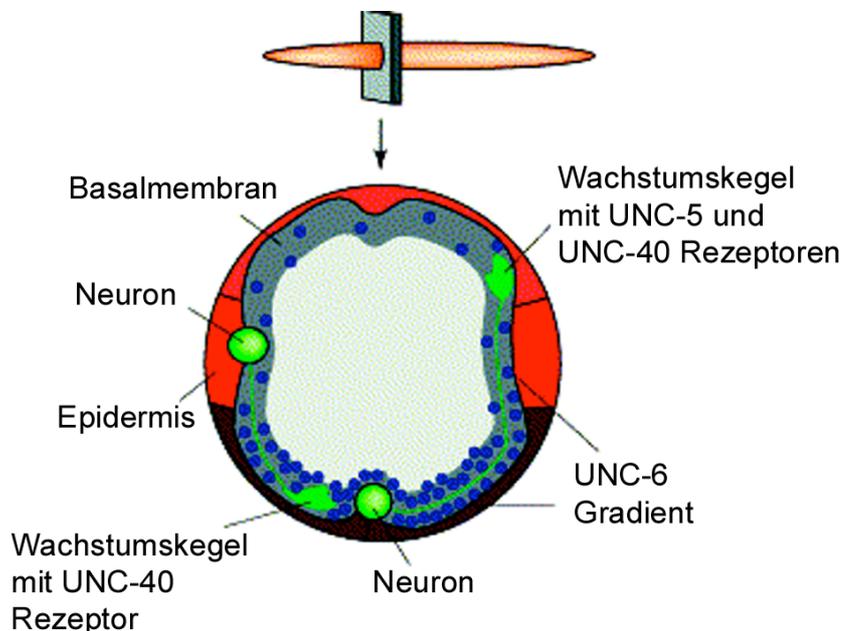


Abb.3: UNC-6 und axonales Auswachsen an der Mittellinie

Dieser Querschnitt von *C. elegans* zeigt wie UNC-6 das Auswachsen der Wachstumskegel steuert. Die UNC-6 Konzentration ist an der ventralen Mittellinie am höchsten. Die Wachstumskegel wandern entlang der Körperwand zwischen Epidermis und Basalmembran. Wachstumskegel, die UNC-40 exprimieren wachsen in Richtung ventral, während Wachstumskegel, die UNC-40 und UNC-5 exprimieren, nach dorsal auswachsen. (verändert nach Wadsworth, 2002.)

Das Gen *unc-6* kodiert für einen Liganden, der von den ventralen Epidermoblasten und Pionierneuronen sezerniert wird. UNC-6 ist wahrscheinlich in einem Gradienten verteilt, mit der höchsten Konzentration ventral und immer niedriger werdenden Konzentrationen Richtung dorsal (Abb.3). Die Reaktion auf UNC-6 hängt von den Rezeptoren ab, die von den Neuronen exprimiert werden (Wadsworth et al., 2002). Es sind zwei Rezeptoren für den Liganden UNC-6 bekannt: UNC-40 und UNC-5, die beide zur Immunglobulin-Familie gehören. Exprimiert der Wachstumskegel den Rezeptor UNC-40, dann wird er angezogen und wächst zur ventralen Mittellinie. Wird zusätzlich der Rezeptor UNC-5 exprimiert, dann wird der Wachstumskegel abgestoßen und wächst in die entgegengesetzte Richtung nach dorsal. UNC-6 ist somit ein bifunktionales Signal, das sowohl Anziehung als auch Abstoßung vermitteln kann. Entscheidend ist dabei die Expression der entsprechenden Rezeptoren im Wachstumskegel. In *D. melanogaster* sind Netrin-Homologe ebenfalls wichtig für die axonale Wegfindung zur Mittellinie. Die ersten Vertebraten-Netrine wurden als Proteine identifiziert, die eine wachstumsfördernde Aktivität für Axone im Rückenmark besitzen (Tessier-Lavigne et al., 1988; Serafini et al., 1994). In allen Organismen werden die positiven Effekte der Netrine auf Axone über Rezeptoren der DCC-Familie geleitet, während die negativen Effekte Rezeptoren der UNC-5-Familie benötigen (Chisholm und Tessier-Lavigne, 1999). Diese Erkenntnisse illustrieren sehr gut die beachtenswerte Konservierung von Mechanismen der axonalen Wegfindung in der Evolution.

Das Signalmolekül Slit

Slits sind große sekretorische Proteine, die eine Rolle bei der Abstoßung von Axonen spielen und in *D. melanogaster* entdeckt wurden (Kidd et al., 1999). In Vertebraten können sie auswachsende Axone abstoßen und zu einem Kollaps von Axonen führen. Die negative Wirkung der Slit Proteine wird durch Rezeptoren der Robo-Familie vermittelt, die Mitglieder der Immunglobulin-Superfamilie sind (Kidd et al., 1998). Zusätzlich zu den abstoßenden Eigenschaften gibt es in Säugetieren ein Slit Protein, das die Verzweigung von Axonen und Dendriten positiv regulieren kann (Wang et al., 1999). In dem Nematoden *C. elegans* gibt es ein SLIT Protein (SLT-1) und einen ROBO Rezeptor (SAX-3) (Zallen et al., 1998; Hao et al., 2001).

Die Semaphorin-Familie

Die Semaphorin-Familie besteht sowohl aus extrazellulären als auch membrangebundenen Mitgliedern, die wahrscheinlich in der direkten Umgebung der Zelle, die sie herstellt, ihre

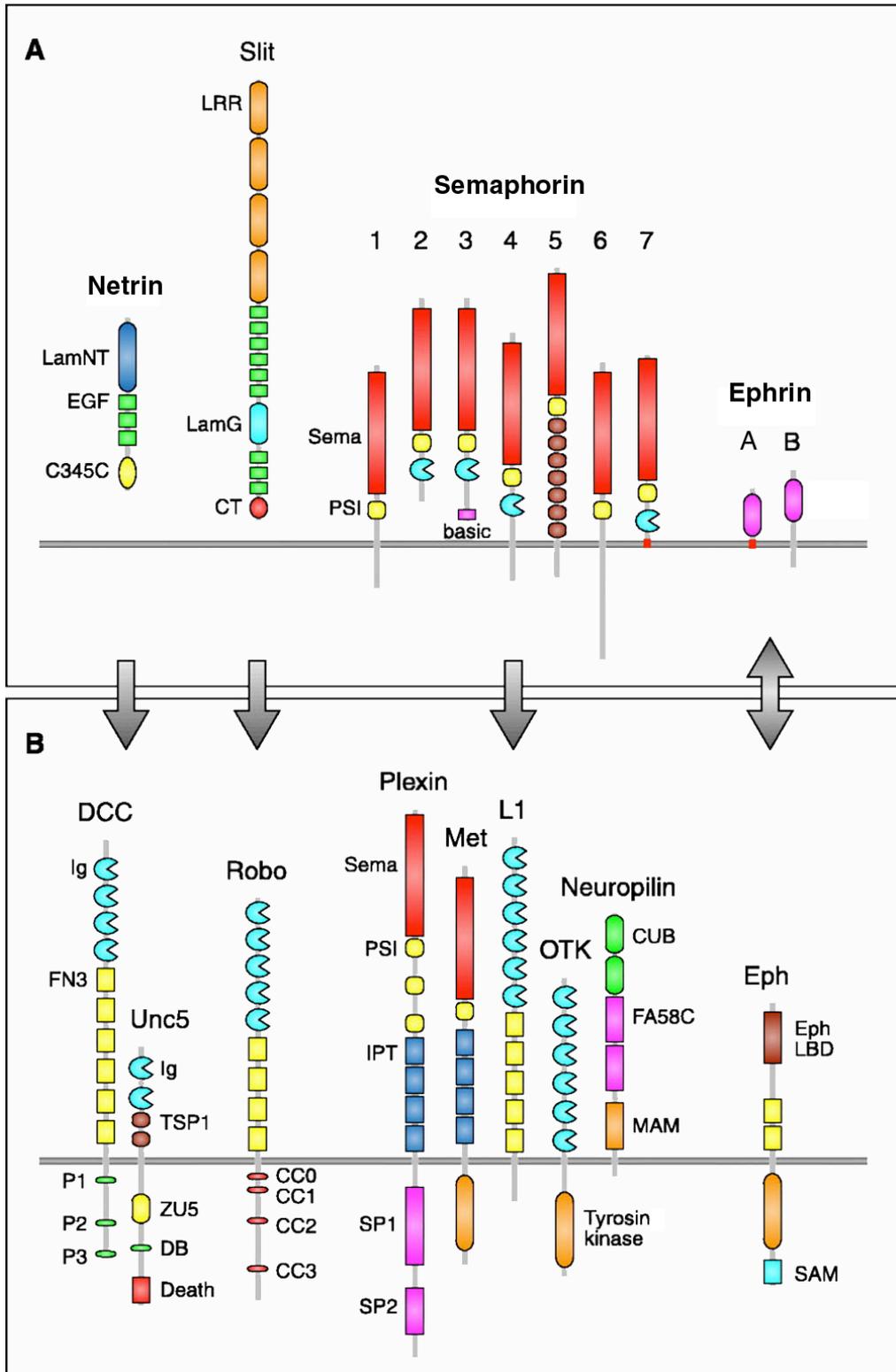


Abb.4: Konservierte Familien von Signalmolekülen und ihren Rezeptoren

A: Familien von Signalmolekülen, die sezerniert werden oder membrangebunden sind. B: entsprechende Rezeptoren, die transmembran oder in der Membran verankert sind. P1 bis P3, DB, CC0 bis CC3, SP1 und SP2 sind konservierte Regionen in den cytoplasmatischen Domänen der entsprechenden Rezeptoren DCC, UNC-5, Robo und Plexin Rezeptoren. (verändert nach Dickson, 2002.)

Funktion ausüben (Kolodkin et al., 1993; Kolodkin und Ginty, 1997; Raper, 2000). Das erste Semaphorin wurde in der Heuschrecke als Fasciclin IV (Semaphorin I) entdeckt (Kolodkin et al., 1992). In *Drosophila* beeinflusst SemaI die Faszikulierung von Axonen im Zentralnervensystem (Yu et al., 1998). Semaphorine wirken meist als negative Signale und führen zum Kollaps von Wachstumskegeln. Die erste Klasse ihrer Rezeptoren sind Mitglieder der Plexin-Familie. In Vertebraten binden sezernierte Semaphorine an eine zweite Rezeptorklasse, die Neuropiline, die wiederum mit Plexinen einen Komplex bilden. Plexine besitzen eine große intrazelluläre Domäne, die GTPasen der Rac/Rho Familie aktivieren kann (Übersichtsartikel von Whitford und Ghosh, 2001).

Die Ephrin-Familie

Ephrine sind Zelloberflächenproteine, die in vielen Entwicklungsprozessen eine wichtige Rolle spielen, so auch im gerichteten Auswachsen von Axonen (Übersichtsartikel von Holder und Klein, 1999). Ephrine können anhand ihrer Membranassoziiierung in zwei Klassen unterteilt werden: Ephrine der Klasse A sind über einen GPI-Anker an die Membran geheftet, während Ephrine der Klasse B Transmembranproteine sind, die eine intrazelluläre Domäne besitzen. Ihre Rezeptoren sind Eph-Transmembranproteine mit einer Tyrosinkinase-Domäne. Ephs wurden ursprünglich als Rezeptoren für die Ephrine definiert, allerdings ist die Signalweiterleitung wesentlich komplexer und Ephs können auch als Liganden für Ephrine agieren. Diese bidirektionale Signalweiterleitung ist ein interessantes Merkmal, das eine Anziehung oder Adhäsion vermittelt (Übersichtsartikel von Murai und Pasquale, 2003). Sonst wirken Ephrine als abstoßende Signale und sind zum Beispiel für die korrekte Ausbildung der topographischen Projektion der Retinalganglienzellen im Tektum wichtig (Orioli und Klein, 1997; Hansen et al., 2004). Hierbei bilden verschiedene Ephrine Gradienten im Tektum und EphA wird in der Retina in einem entsprechenden Gradienten exprimiert (Feldheim et al. 2000; Brown et al. 2000). In *C. elegans* gibt es vier Ephrine und einen Eph-Rezeptor, die für die Morphogenese der Epidermis wichtig sind (George et al. 1998; Chin-Sang et al. 1999; Wang et al., 1999), für die aber bisher noch keine Funktion im Nervensystem bei der axonalen Wegfindung gezeigt werden konnte.

1.3.2 Die Adhäsionsmoleküle

Für das heranreifende Nervensystem sind Adhäsionsproteine besonders wichtig und sie beeinflussen das Auswachsen des Wachstumskegels stark. Die auswachsenden

Nervenfortsätze können sich ohne diese Moleküle nicht an die Umgebung anheften und sich nicht vorwärts bewegen. Zelladhäsionsproteine bewirken zudem, dass die Zellmembran des Axons in engen Kontakt mit den Oberflächen umgebender Zellen kommt. Das Axon kann dann mit den Signalmolekülen interagieren, die ihm letztlich die Weg- und Zielfindung ermöglichen. Auch die Bündelung von Axonen wird über Adhäsionsmoleküle vermittelt. Zu den Adhäsionsmolekülen gehören Mitglieder der Immunglobulinfamilie, Cadherine und Integrine, die in den folgenden Abschnitten genauer beschrieben werden.

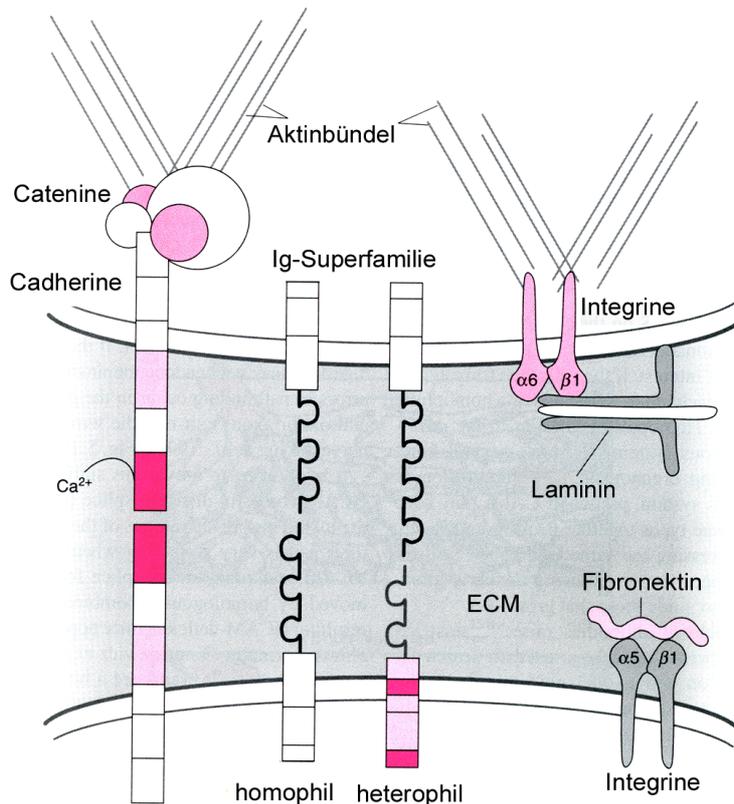


Abb.5: Adhäsionsmoleküle, die in einem Wachstumskegel exprimiert werden

Cadherine sind homophile Moleküle, die über Catenine mit dem Zytoskelett verbunden sind. Vertreter der Ig-Superfamilie können homophile oder heterophile Interaktionen eingehen. Integrine interagieren nicht nur mit Komponenten der extrazellulären Matrix, sondern sind auch über Proteinkomplexe mit dem Zytoskelett assoziiert. (verändert nach Sanes, Reh, Harris 2000.)

Die Immunglobulin-Familie

Neben UNC-40/DCC, UNC-5 und ROBO, gehören weitere Oberflächenrezeptoren und Adhäsionsmoleküle, die eine wichtige Rolle im Nervensystem spielen, zur Immunglobulinsuperfamilie (IgSF). Sie besitzen eine Reihe von extrazellulären Ig-Domänen, die sich von denen der Antikörper unterscheiden. Sonderegger stellte exemplarisch frühere Untersuchungen über neuronale IgSF Proteine zusammen (Sonderegger, 1998). Die Gruppe der IgCAMs („immunoglobulin cell adhesion molecule“) ist auf der Zelloberfläche lokalisiert (Walsh und Doherty, 1997) und folgende Mitglieder

spielen eine Rolle im axonalen Auswachsen: L1/NgCAM (Brittis et al., 1995; Castellani et al., 2000), NCAM/FasII (Pollerberg und Beck-Sicking, 1993; Thanos et al., 1984), F3/Contactin (Falk et al., 2002), NrCAM (Stoeckli et al., 1997), Axonin/TAG1 (Perrin et al., 2001) und DM-GRASP/IrreC/SYG-1 (Burns et al., 1991; Tanaka et al., 1991; Ramos et al., 1993; Shen und Bargmann, 2003). Diese Adhäsionsmoleküle sind wichtig für das Auswachsen des Wachstumskegels entlang der Oberfläche anderer Zellen und Axone. Viele CAMs können heterophile und homophile Bindungen eingehen. Zum Beispiel rekrutiert eine homophile TAG-1-TAG-1 Bindung L1 in cis, das heißt auf der Oberfläche derselben Zelle (Malhotra et al., 1998). Ein Beispiel für eine heterophile Bindung ist die Interaktion zwischen NrCAM und Axonin-1 in trans, wobei die Proteine auf der Oberfläche von verschiedenen Zellen lokalisiert sind (Fitzli et al., 2000). Axone könnten so in einem Bündel auswachsen. Das zuerst auswachsende Axon würde dabei den nachfolgenden als Substrat dienen.

Erst kürzlich wurden einige neue Aspekte der IgSF Proteine entdeckt und in einem Übersichtsartikel von Rougon und Hobert dargestellt (Rougon und Hobert, 2003). Es wurde gezeigt, dass Mitglieder der IgSF durch alternatives Spleißen in sehr vielen verschiedenen Isoformen vorkommen können. Besonders DSCAM in *Drosophila* bildet eine enorme molekulare Vielfalt (Schmucker et al., 2000). Bisher sind verhältnismäßig wenige Moleküle bekannt, die eine Rolle in der neuronalen Differenzierung spielen, so dass die Entstehung von hunderten von verschiedenen Neuronentypen damit nicht erklärt werden kann. Die Existenz von sehr vielen Spleißvarianten eines einzigen Gens bietet die Möglichkeit, eine große Anzahl von verschiedenen Proteinen zu produzieren, die dann an unterschiedlichen Differenzierungsaspekten beteiligt sein könnten. IgSF Proteine sind nicht nur, wie beispielsweise FasII, wichtig für die Etablierung von Zell-Zell-Interaktionen, sondern wie Beat-1a auch für die Unterbrechung dieser Interaktionen an bestimmten Stellen und zu bestimmten Zeiten (Fambrough und Goodman 1996; Pipes et al., 2001). Neue Aspekte der Signalübertragung in das Zellinnere von bekannten IgSF Proteinen wurden bei NCAM („neural CAM“) entdeckt. Die Interaktion von NCAM mit dem FGF („fibroblast growth factor“) Rezeptor aktiviert eine Rezeptor-Tyrosin-Kinase, die dann wiederum PLC aktiviert, so dass Diacylglycerol und Arachidonsäure produziert wird (Übersichtsartikel von Doherty und Walsh, 1996). In einer anderen Studie wurde gezeigt, dass die Akkumulation von NCAM an der Zelloberfläche zu einer Phosphorylierung der Tyrosin-Kinase Fyn führt, die wiederum FAK („focal adhesion kinase“) rekrutiert (Beggs et al., 1997; Niethammer et al., 2002). Welcher der beiden Signalwege aktiviert wird, bestimmt wahrscheinlich die

Lokalisation von NCAM. Es konnte gezeigt werden, dass eine Isoform von NCAM außerhalb der sogenannten „lipid rafts“ den FGF Rezeptor-Signalweg aktiviert, während NCAM in „lipid rafts“ die Signaltransduktion über Fyn aktiviert.

Die Cadherin-Familie

Eine weitere gut untersuchte Familie von Zelladhäsionsmolekülen sind die Cadherine. Sie gehen homophile Interaktionen ein, die Kalzium-abhängig sind. Der zytoplasmatische Teil interagiert mit einem konservierten Set von zytoplasmatischen Proteinen, den Cateninen, die wiederum mit Aktinfilamenten verknüpft sind (Yap et al., 1997). Cadherine vermitteln durch spezifische Zelladhäsion eine Modulation des Wachstumskegels in auswachsenden Axonen (Inoue und Sanes, 1997; Riehl et al., 1996; Iwai et al., 1997; Lee et al., 2001). In *C. elegans* spielt *hmr-1* eine Rolle in der Bündelung von Axonen (Broadbent und Pettitt, 2002).

Die Integrin-Familie

Integrine gehören ebenfalls zu den Zelladhäsionsmolekülen. Sie binden an Komponenten der extrazellulären Matrix und sind über ihren zytoplasmatischen Teil mit dem Aktin-Zytoskelett verknüpft und an der Signalweiterleitung beteiligt. Jedes Integrin besteht aus zwei Untereinheiten (α und β), die gemeinsam die Bindeeigenschaften des Moleküls bestimmen. Jedes Integrin erkennt spezifische Liganden, die entweder zur extrazellulären Matrix (zum Beispiel Laminin, Fibronectin) gehören oder andere Mitglieder der Zelloberflächenrezeptoren darstellen, die zur Ig-Superfamilie gehören (zum Beispiel ICAM). Manche Integrine binden nur an einen Liganden, während andere an verschiedene Liganden binden. Dadurch entsteht eine große Vielfalt an Interaktionen, die dennoch sehr spezifisch sein können. Die Bindung von Komponenten der extrazellulären Matrix an verschiedene Integrine kann unterschiedliche intrazelluläre Antworten hervorrufen. In Vertebraten besitzen Integrine verschiedene Funktionen im Zentralnervensystem, beispielsweise bei der neuronalen Wanderung und der Synaptogenese (Emsley und Hagg, 2003; Nikonenko et al., 2003). Im sich entwickelnden Tektum in Huhn ist die neuronale Wanderung abhängig von $\beta 1$ und $\alpha 6$ Integrin-Untereinheiten (Gallileo et al., 1992; Zhang und Gallileo, 1998). In *C. elegans* gibt es zwei α - und zwei β -Integrine, von denen INA-1/ α -Integrin mit PAT-3/ β -Integrin interagiert und eine Rolle bei der Wegfindung von Axonen spielt (Poinat et al., 2002).

1.3.3 Die extrazelluläre Matrix

Extrazelluläre Matrixmoleküle bilden ein komplexes und dynamisches Netzwerk in der unmittelbaren Umgebung der Neurone und Nervenfortsätze. Einige der häufigsten Moleküle der extrazellulären Matrix, wie Laminin, Fibronectin und verschiedene Kollagene, wurden aufgrund ihrer Fähigkeit, das Wachstum von Neuriten in Zellkultur zu fördern, isoliert (Bixby und Harris, 1991). In Streifenassays, wo Retina-Axone ihr Substrat auf dem sie wachsen, aussuchen können, wachsen sie bevorzugt auf Laminin (Taylor et al., 1993). Spezifische Moleküle der extrazellulären Matrix fördern demnach das Auswachsen von bestimmten Axonen.

Folgende Mitglieder spielen in *C. elegans* eine Rolle für die Wegfindung der Axone: Laminin (Ishii et al., 1992), Kollagen XV/XVIII (Ackley et al., 2001), Nidogen (Kim und Wadsworth, 2000) und Fibronectin (KAL-1, Rugarli et al., 2002). Nidogen beispielsweise steuert longitudinale Axone in dorsoventraler Richtung und an der Mittellinie. Dabei bindet es an Laminin und Kollagen IV (Fox et al., 1991).

1.3.4 Die Morphogene Sonic hedgehog und BMPs

Es wurde erst vor kurzem gezeigt, dass die bekannten Morphogene Sonic hedgehog (Shh) und BMPs („bone morphogenetic protein“) in Vertebraten auch das gerichtete Auswachsen von Axonen regulieren. Diese Proteine haben, wie schon beschrieben, wichtige Funktionen in Entwicklungsprozessen, die dem Auswachsen von Axonen vorangehen. BMPs regulieren die frühe Entwicklung und Spezifizierung des Zelltyps. BMP7 wird im Rückenmark in einer Region exprimiert, die dorsal zu den Kommissuraxonen liegt und dort eine Abstoßung dieser Axone vermittelt (Augsburger et al., 1999; Butler und Dodd, 2003). Das *C. elegans* Protein UNC-129 ist nahe verwandt mit den BMPs und vermittelt eine Abstoßung beim Auswachsen von Pioniermotoraxonen entlang der dorsoventralen Achse (Colavita et al., 1998; Nash et al., 2000). Shh ist wichtig für die Anlage vieler Gewebe. Vor kurzem konnte gezeigt werden, dass es eine neue Funktion besitzt, nämlich dass es anziehend auf Kommissuraxone wirkt (Charron et al., 2003).

1.3.5 Intrazelluläre Signaltransduktion

Trotz großer Fortschritte bei der Identifizierung von Signalen und Rezeptoren für die axonale Wegfindung ist immer noch unklar, wie diese Signale im Neuron integriert werden und in Veränderungen des Zytoskelettes und damit zu Richtungsänderungen des Wachstumskegels umgesetzt werden. Nur in wenigen Fällen sind einzelne Komponenten des Signalübertragungsweges bekannt. Ephrinrezeptoren sind selbst Protein-Tyrosin-Kinasen (Drescher, 1997) und auch Protein-Tyrosin-Phosphatasen spielen eine Rolle bei Auswachs Vorgängen von Axonen (Stoker und Dutta, 1998). Häufig sind intrazelluläre Proteinkinasen an der Signalübertragung beteiligt, wie pp60 oder p59 bei den IgCAMs L1 und NCAM (Maness et al., 1996).

Die Rolle von GTPasen der Rho-Subfamilie bei der Modulation des Aktinskeletts ist vergleichsweise gut untersucht. Mitglieder der Rho-Subfamilie sind bei der Entstehung verschiedener Aktinstrukturen beteiligt. Vereinfacht dargestellt stimuliert Rho die Bildung von Lamellopodien, Rac die Entstehung von sogenannten „stress fibers“ und CDC42 die von Filopodien (Tapon und Hall, 1997). Im Wachstumskegel kann die selektive Stabilisierung einzelner Filopodien die Richtung des weiteren Auswachsens bestimmen, so dass über die Regulation der durch Rho, Rac und CDC42 induzierten Aktinstrukturen eine Steuerung des Wachstumskegels denkbar ist. In *C. elegans* wurde für ein Mitglied der Rho-Subfamilie gezeigt, dass es für das korrekte Auswachsen von Axonen und für Zellwanderungen gebraucht wird (Zipkin et al., 1997). Wie diese GTPasen die Aktinpolymerisation beeinflussen und wie Signale von ausserhalb der Zelle in diese Regulation eingebunden werden, ist noch weitgehend unbekannt. Insbesondere die intrazellulären Komponenten, die dabei beteiligt sind, sind nur unvollständig bekannt. Auch die Regulation der Expression von Signalmolekülen sowie die Verknüpfung unterschiedlicher Signalwege ist bisher nur unzureichend bekannt.

1.4 Die Regulation von Signalmolekülen und Rezeptoren in der axonalen Wegfindung

Die Expression von Signalmolekülen und ihren Rezeptoren ist räumlich und zeitlich reguliert. Transkriptionsfaktoren steuern die axonale Wegfindung indem sie die Expression von Genen aktivieren oder reprimieren. Komplexe Auswachsentscheidungen werden durch komplexe Expressionsmuster gelenkt. Einige Mutanten, deren Axone fehlerhaft auswachsen und die in genetischen Screens in *D. melanogaster*, *C. elegans* oder dem Huhn

identifiziert wurden, sind Mutationen in spezifischen Transkriptionsfaktoren (Lundgren et al. 1995; Thor und Thomas, 1997; Landgraf et al., 1999; Thor et al., 1999; Baran et al., 1999; Erkman et al., 2000; Wacker et al., 2003; Clark und Chiu, 2003; Thanos et al., 2003; Zhang et al., 2004).

Mutationen im LIM HD Gen *islet* in *Drosophila* führen zu Defekten im axonalen Auswachsen aber auch in der Dopamin- und Serotoninsynthese in Unterklassen von Inter- und Motoneuronen, wobei keine Zelltyptransformation stattfindet (Thor und Thomas, 1997). Die Neuronen entstehen und ihre Axone wachsen zum richtigen Zeitpunkt aus, können dann aber keine Bündel bilden. *Islet* steuert in einigen Interneuronen die Serotoninsynthese und in anderen die Dopamin-Synthese. Diese zweite Funktion von *Islet* ist zelltypabhängig je nachdem welche weiteren Transkriptionsfaktoren in einem einzelnen Neuron vorhanden sind. Das Gen *islet* kontrolliert demnach zwei Aspekte in der späten Stufe der neuronalen Differenzierung. In *C. elegans* gibt es ebenso mehrere Transkriptionsfaktoren, die zwei Aspekte der Differenzierung steuern. Die Transkriptionsfaktoren UNC-86, UNC-30 und SEM-4 beeinflussen die Synthese von Neurotransmittern und regulieren Aspekte des zielgerichteten Axonauswachsens (Desai et al. 1988; Jin et al., 1994; Basson und Horvitz, 1996).

Es stellt sich die Frage, wie die Transkriptionsfaktoren das gerichtete Auswachsen von Axonen regulieren. Viele der Transkriptionsfaktoren die für die neuronale Differenzierung wichtig sind, wirken früh in der Entwicklung von Neuroblasten. Deshalb ist es unwahrscheinlich, dass sie direkt die Expression der terminalen Differenzierungsgene kontrollieren. Allerdings gibt es auch einige Beispiele von Transkriptionsfaktoren, deren Expression auf postmitotische Neuronen beschränkt ist. Das Gen *apterous* ist in *Drosophila* in einem Teil der Interneurone exprimiert und kontrolliert deren axonales Auswachsen (Lundgren et al., 1995). In Bezug auf das axonale Auswachsen ist es durchaus denkbar, dass Transkriptionsfaktoren wie *Apterous* direkt die Expression von Zelloberflächenproteinen regulieren, die für die Axonbündelung notwendig sind.

Die meisten Transkriptionsfaktoren, die eine Rolle im Auswachsen von Axonen besitzen, haben noch weitere Funktionen in der Differenzierung, entweder in anderen Neuronen, zu einem anderen Zeitpunkt (Landgraf et al., 1999; Doe et al., 1988) oder in anderen Geweben (Lundgren et al. 1995). Wahrscheinlich sind die Transkriptionsfaktoren die spezifischen Regulatoren, welche die räumliche Expression der allgemeinen Signalmoleküle bestimmen. Aber nur selten wurden Zielgene der Transkriptionsfaktoren gefunden (Erkman et al.,

2000). Bisher ist kein Transkriptionsfaktor bekannt, der beispielsweise die Expression von UNC-6/Netrin und seinen Rezeptoren UNC-5 und UNC-40 steuert. Die ektopische Expression von *unc-5* in dem Druckrezeptor AVM in *C. elegans* verursacht dramatische Veränderungen im Auswachsen des AVM Axons. Normalerweise exprimiert das AVM Axon nur den UNC-40 Rezeptor und wächst in ventraler Richtung aus. Wird im Wachstumskegel zusätzlich *unc-5* exprimiert, wächst das Axon in die entgegengesetzte Richtung nach dorsal (Hamelin et al., 1993). Dieses Beispiel stellt eindeutig heraus, dass die Misexpression eines Rezeptors für ein Molekül, das am axonalen Auswachsen beteiligt ist, starke Fehler beim Auswachsen verursacht. Es bleibt die Frage offen, wie eine bestimmte Klasse von Neuronen das passende Set an Rezeptoren und Komponenten der Signaltransduktion exprimiert. Die Regulation der Expression von Signalmolekülen und Rezeptoren ist sehr wichtig für das Verständnis von axonaler Wegfindung.

1.5 *Caenorhabditis elegans* als Modellorganismus

Wie beschrieben sind für das zielgerichtete Auswachsen von Axonen konservierte Mechanismen verantwortlich, für deren Untersuchung sich der Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* als Modellorganismus sehr gut eignet (Brenner 1974). Er zählt zu den derzeit wichtigsten Modellorganismen für die Untersuchung von biologischen Entwicklungsvorgängen. Als adulter Wurm ist er ungefähr einen Millimeter lang und besitzt einen einfachen Körperaufbau mit einer niedrigen Zellanzahl von 959 somatischen Zellen. Der Bodenbewohner wird auf Agarplatten kultiviert, wo er sich von Bakterien ernährt (Wood 1988; Sulston und Horvitz, 1988). Unter Normalbedingungen bei 20°C dauert die Entwicklung vom Ei über vier Juvenilstadien, genannt L1 bis L4, zum fruchtbaren erwachsenen Tier nur drei und einen halben Tag (Sulston und Horvitz 1977; Sulston et al., 1983). Die Population besteht fast nur aus Hermaphroditen, die sich durch Selbstbefruchtung vermehren. Männchen treten in der Natur mit einer sehr niedrigen Häufigkeit von 0,2% auf. Die Stämme werden normal asexuell propagiert, so dass sie Klone bilden. Kreuzungsexperimente sind durch Verpaarung von Männchen mit Hermaphroditen möglich. Dadurch sind genetische Studien einfach und viele Mutanten konnten bisher untersucht werden. Bei 20°C legen die Hermaphroditen etwa 300 Eier, so dass eine hohe Nachkommenzahl gewährleistet wird (Hodgkin, 1988). 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; Kimble und Hirsh, 1979; Sulston et al., 1983).

1.5.1 Das Nervensystem in *C. elegans*

Das Nervensystem von *C. elegans* ist einfach und besteht aus 302 Zellen. Das gesamte Nervensystem eines adulten Hermaphroditen wurde von White und Kollegen anhand von Elektronenmikroskopaufnahmen von Serienschritten rekonstruiert und detailliert beschrieben (White et al. 1986). Die Entwicklung des Nervensystems und die Verschaltung der Neurone ist invariant, das heißt von Tier zu Tier nahezu identisch. Deshalb ist *C. elegans* besonders gut geeignet, um bisher unbekannte Gene zu identifizieren, die beim Auswachsen der Axone eine wichtige Rolle spielen. Sogar kleinere Abweichungen von der normalen Entwicklung können erkannt werden.

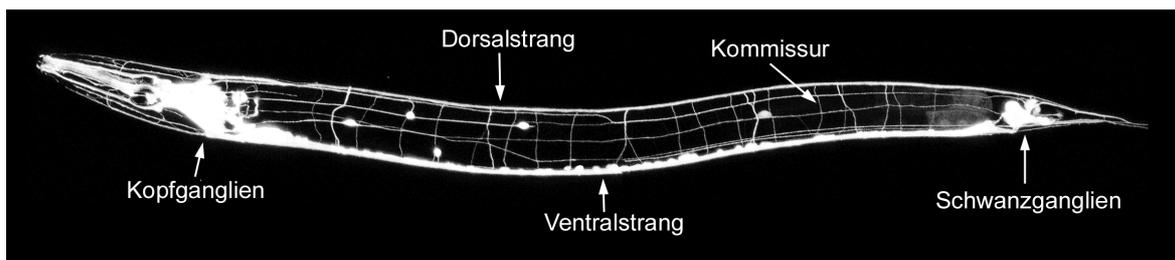


Abb.6: Das Nervensystem in *C. elegans*

Diese konfokale Aufnahme eines Tieres zeigt alle Nervenzellen. Sie sind mit GFP markiert, das unter der Kontrolle eines neuronenspezifischen Promotors exprimiert wurde.

In *C. elegans* liegen die meisten Zellkörper der Neurone in Kopf- und Schwanzganglien. Die meisten Axone sind Teil des Nervenringes. Zwei longitudinale Axonbündel bilden den Ventral- bzw. Dorsalstrang. Die Motoneuronenzellkörper liegen entlang des Ventralstranges verteilt und senden ihre Kommissuren direkt zum Dorsalstrang. Die Interneuronenzellkörper liegen in Kopf- und Schwanzganglien und senden ihre Axone in den Ventralstrang. Sensorische Neurone liegen in Kopfganglien und ihre Dendriten verlaufen zur Nasenspitze. Die Interneurone bilden das Zwischenglied der sensorischen Neuronen und Motoneuronen. Der Ventralstrang in *C. elegans* hat ein linkes und ein rechtes Bündel, die durch einen Epidermiswulst getrennt sind. Aber anders als in Vertebraten oder *Drosophila* ist der Ventralstrang in *C. elegans* asymmetrisch (White et al., 1986). Die meisten Neurone, die Axone in den Ventralstrang schicken, haben ihre Zellkörper in bilateralen Symmetriepaaren. Trotzdem beinhaltet der rechte Ventralstrang über 40 Axone, während der linke Ventralstrang nur aus vier Axonen besteht. Die meisten Neurone, deren Zellkörper links

liegen, haben Axone die am vorderen Ende des Ventralstranges auf die rechte Seite überkreuzen, während Axone von Zellkörpern auf der rechten Seite ipsilateral bleiben.

In *C. elegans* ist das Kreuzen der Mittellinie nur zu beobachten, wenn das Axon zuerst den Ventralstrang erreicht, was normaler Weise am anterioren oder posterioren Ende geschieht. Diese einfache Entscheidung, ob das Axon die Mittellinie kreuzt oder nicht, entwickelte sich zu einem grundlegenden Modell für das axonale Auswachsen. Es diente als Ausgangsbasis für mehrere genetische Screens in *C. elegans* und *D. melanogaster*, wobei einige Gene identifiziert wurden, die für das zielgerichtete Auswachsen der Axone notwendig sind.

Inzwischen ist die vollständige Sequenz des *C. elegans* Genoms bekannt (The *C. elegans* Sequencing Consortium, 1998), was die molekulare Identifizierung von Genen erleichtert. Aufgrund der Transparenz von *C. elegans* kann das Auswachsen der Axone im lebenden Organismus unter dem Mikroskop beobachtet werden. Über die Erzeugung zufälliger Mutationen wurde bereits eine Reihe von Genen identifiziert, die an verschiedenen Aspekten von Zell- und Axonwanderungen beteiligt sind.

1.6 Vorarbeiten: Genetische Screens in *C. elegans*

Die Ausgangsbasis dieser Arbeit waren genetische Screens in *C. elegans*, die durchgeführt wurden, um neue Gene zu identifizieren, die am zielgerichteten Auswachsen von Axonen beteiligt sind. In herkömmlichen Screens wurde nach Unc-Mutanten („uncoordinated“) vorselektioniert, die Bewegungsdefekte zeigten. Die Unc-Mutanten besaßen Defekte im neuromuskulären Schaltkreis, die in vier verschiedene Klassen unterteilt werden konnten: (1) Defekte in neuronalen Netzwerken, die von Fehlern beim Auswachsen der Axone verursacht wurden. (2) Defekte in der Neurotransmission, wobei Gene mutiert waren, die für die synaptische Weiterleitung oder für die Herstellung des Transmitters zuständig waren. (3) Defekte in der neuronalen Differenzierung. (4) Defekte in der Entwicklung und Funktion der Muskeln. In diesen Screens wurden demnach häufig Gene identifiziert, durch deren Mutation keine axonalen Defekte entstanden. Um dies zu umgehen haben wir die Vorteile von fluoreszierenden Proteinen, die man als spezifische Zellmarker verwenden kann, genutzt. Unser Untersuchungsobjekt waren Interneurone, die mit einem Marker sichtbar gemacht werden konnten, bei dem GFP unter der Kontrolle des Promotors des Glutamat-Rezeptorgens exprimiert wurde (*glr-1::GFP*). Tiere, die den Interneuron-Marker exprimierten, wurden mit Ethylmethansulfonat, das Punktmutationen verursacht,

mutagenisiert. Auf diese Weise konnten wir in den Screens direkt unter dem Mikroskop nach axonalen Auswuchsdefekten suchen. In der zweiten Generation wurden Tiere isoliert, die Defekte im Auswachsen der Interneuronaxone besaßen. Dabei konnten Mutanten isoliert werden, die nur geringfügige axonale Defekte aufweisen, ohne anderweitige sichtbare Defekte. Die Interneuronaxone verlaufen im Normalfall alle im linken Teil des Ventralstranges. Es wurden Mutanten identifiziert, deren Axon(e) fälschlicher Weise auf die rechte Seite wechselte(n). Auf diese Weise isolierten wir einige neue Gene, die wir *ast* („axonal steering“) nannten.

1.7 Zielsetzung der Arbeit

Das Auswachsen von Axonen ist ein sehr wichtiger Aspekt der neuronalen Differenzierung. Noch ist das Wissen über den gesamten Ablauf dieses komplexen Vorgangs lückenhaft. Ein besseres Verständnis der molekularen Abläufe sollte wichtige Einblicke in die Verknüpfung von neuronalen Verbindungen, die ganze Netzwerke ausbilden, liefern. Ziel dieser Arbeit ist die molekulare Charakterisierung der *ast-1* (axonal steering) Mutanten in *C.elegans*, die aus einem genetischen Screen nach Mutanten mit Defekten in der axonalen Wegfindung erhalten wurden. Im Fokus steht dabei die Identifizierung und Klonierung des von der Mutation betroffenen Gens. Um die Funktion des klonierten Gens möglichst vollständig zu studieren, ist es notwendig, das gesamte Spektrum der Defekte zu charakterisieren. Es soll festgestellt werden, ob außer den Interneuronen noch andere Klassen von Neuronen Defekte in der axonalen Wegfindung aufweisen. Darüber hinaus sollte der Phänotyp der isolierten Punktmutanten so wie der Deletionsmutanten, die Nullallele darstellen, hinsichtlich Differenzierung und Morphologie aller Organe untersucht werden. Um das zu charakterisierende Gen in einen funktionellen Kontext zu stellen, wird die genetische Interaktion mit anderen Genen, die beim Auswachsen von Axonen beteiligt sind, analysiert.

2 Ergebnisse

2.1 Axonale Auswachsdefekte in *ast-1* Mutanten

In dieser Arbeit wurde das Gen *ast-1* identifiziert und charakterisiert. Zwei Allele von *ast-1* wurden, wie in der Einleitung beschrieben, aus einem Screen isoliert, in dem nach Auswachsdefekten der Interneuronaxone gesucht worden war. Ein erster Schritt in der Untersuchung der Allele war die Charakterisierung der Defekte der Interneurone und die Überprüfung anderer Neuronenklassen auf fehlerhaftes Auswachsen von Axonen.

2.1.1 Die Interneurone in *ast-1(rh300)* und *ast-1(hd1)* Mutanten

Untersuchung der *glr-1::gfp* exprimierenden Interneurone

Anhand der Defekte in den Interneuronaxonen sind die beiden Mutanten *rh300* und *hd1* isoliert worden. Das Gen *glr-1* kodiert für eine Untereinheit des AMPA Glutamat-Rezeptors und wird in einigen Interneuronen exprimiert (Hart et al., 1995; Maricq et al., 1995). Zwei der mit GFP markierten Interneuronzellkörper (PVCL/R) liegen im Schwanz und drei im retrovesikulären Ganglion (AVG, RIGL/R). Die Zellkörper der Neuronenpaare AVA, AVB, AVD, AVE, AVJ, AIB, RIM, RIS, RME und RMD sind im Kopfganglion lokalisiert.

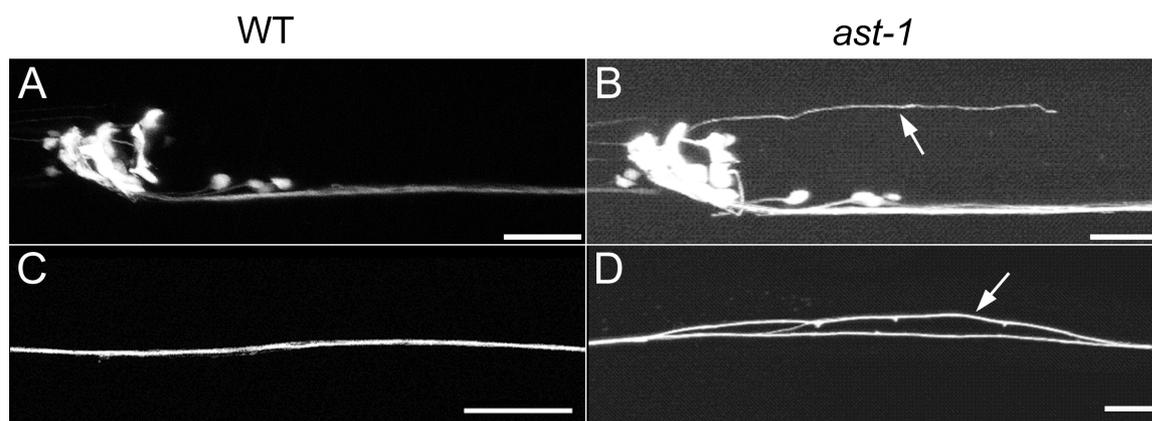


Abb.7: Auswachsdefekte der Interneuronaxone in *ast-1(rh300)*

A und B sind Seitenansichten, wobei sich anterior links und ventral unten befindet. A: Vom Kopfganglion aus wachsen alle Interneuronaxone durch einen Ausgang aus dem Nervenring als ein Bündel (Ventralstrang) in Richtung posterior. B: In *ast-1(rh300)* Mutanten finden manche Axone den Ausgang aus dem Nervenring nicht und verlaufen stattdessen in lateraler Position (Pfeil).

C und D: Der Ventralstrang ist hier in der Aufsicht zu sehen und anterior ist links. C: Im WT Wurm ist der Ventralstrang ein Bündel, das auf der rechten Seite verläuft. D: Hingegen ist in *ast-1(rh300)* Mutanten der Ventralstrang defaszikulierte, d.h. manche Interneuronaxone (Pfeil) kreuzen in das linke Bündel.

Die Balken stellen 20 μm dar.

Die Axone der Interneurone AVA, AVB, AVD und AVE verlassen in WT Tieren den Nervenring in ventraler Position und wachsen als Ventralstrang in Richtung posterior aus (Abb.7A). In *ast-1(rh300)* Mutanten hingegen erreichten einzelne Interneuronaxone den Ventralstrang nicht und verliefen stattdessen in einer lateralen Position (siehe Abb.7B). Während der Ventralstrang in WT Tieren dicht gebündelt war (Abb.7C), konnten in *rh300* und *hdl* Mutanten die Interneuronaxone defaszikulierte sein und vom rechten in das linke Bündel kreuzen (Abb.7D).

Die beiden Mutanten von *ast-1*, *rh300* und *hdl*, zeigten denselben axonalen Phänotyp, da die Qualität und Penetranz der Defekte sehr ähnlich war (Tab.1). Das Überwecheln im Ventralstrang vom rechten in das linke Bündel konnte in 35% der *rh300* Tiere und in 31% der *hdl* Tiere beobachtet werden. Ob die Axone einmal oder mehrmals die Mittellinie kreuzten, kam ebenfalls in beiden Allelen gleich häufig vor. Laterale Axone waren in 8% der *rh300* Tiere und in 12% der *hdl* Tiere zu erkennen.

	WT	<i>ast-1</i>	
		<i>rh300</i>	<i>hdl</i>
Interneuron-Defekte (<i>glr-1::gfp</i>) [%]			
Ventralstrang:			
einmal Überwecheln	1	19	17
mehrmals Überwecheln	0	16	14
lateral verlaufendes Axon:			
stoppt anterior der Vulva	0	1	6
stoppt posterior der Vulva	1	7	6
Gesamtzahl der Defekte	2	43	43
	n = 115	n = 144	n = 156

Tab.1: Axonale Defekte der Interneuronaxone in *ast-1* Mutanten

Es wurden L4 und adulte Tiere, bei denen *gfp* unter der Kontrolle des *glr-1* Promoters exprimiert wurde, mit einer 640 x Vergrößerung mikroskopiert. Dabei wurden die Interneuronaxone im Ventralstrang und lateral verlaufende Axone untersucht und ausgezählt. n = Gesamtzahl der untersuchten Tiere

Die AVA, AVD, AVE und PVC Interneurone

Um herauszufinden, welche Interneurone falsch auswachsen, wurden sie mit verschiedenen Markern in Untergruppen eingeteilt. Das Gen *nmr-1* kodiert für eine Glutamat-Rezeptoruntereinheit (N-methyl-D-aspartat, NMDA) und wird in AVA, AVD, AVE und PVC Interneuronen exprimiert (Penelope et al., 2001). Dadurch konnte in Tieren, die *glr-1::yfp* exprimierten, diese Interneuron-Subpopulation zusätzlich mit *nmr-1::DsRed*

markiert werden. In 75% der Fälle, in denen Interneuronaxone fehlerhaft links verliefen, waren Mitglieder der *nmr-1* Subpopulation dabei (n = 12). In 17% der Tiere verliefen nur Axone der *nmr-1* Population falsch. Demnach ist die *nmr-1* Untergruppe der Interneuronen häufig beteiligt am Kreuzen der Mittellinie.

Die AVE Interneurone

Die Axone der AVE Interneurone wurden mit *opt-3::GFP* markiert und kreuzen normal die Mittellinie zur kontralateralen Seite im Nervenring, wenden sich dann nach posterior und münden in den Ventralstrang. In 19% der *ast-1(rh300)* mutanten Würmer erreichten die AVE Axone nicht den Ventralstrang, sondern verliefen in einer lateralen Position (n = 85). Allerdings war dies auch in 11% der Tiere des Kontrollstammes, der nur *opt-3::GFP* besaß, der Fall (n = 63). Die Defekte in *ast-1(rh300)* waren gegenüber dem Kontrollstamm anhand des Chi-Quadrat-Tests nicht signifikant.

Die PVQ Interneurone

Das Gen *sra-6* kodiert für einen chemosensorischen Rezeptor (Serpentin-Rezeptor) und wird in dem Interneuronenpaar PVQL/R exprimiert. Der *sra-6::DsRed* Marker zeigt die PVQ Zellkörper, die in dem im Schwanz gelegenen Lumbar-Ganglion liegen und die Axone, die jeweils entsprechend der Position der Zellkörper im rechten oder linken Bündel des Ventralstranges bis in den Nervenring verlaufen. Die PVQ Axone verlaufen in der *ast-1(rh300)* Mutante ebenso (n = 50).

Die Interneuronaxone und der Pionier AVG

Das Interneuron AVG wurde als Pionier des rechten Axonbündels im Ventralstrang identifiziert (R. M. Durbin, PhD thesis, University of Cambridge, 1987). Die PVP Zellkörper liegen am posterioren Ende des Ventralstranges. Ihre Axone kreuzen die Mittellinie um im kontralateralen Axonbündel Richtung anterior auszuwachsen. Das PVPR Axon ist der Pionier des linken Axonbündels im Ventralstrang. Der Marker *odr-2::cfp* wird in den beiden Pionieren AVG und PVP exprimiert. Somit war es möglich im selben Tier die Interneurondefekte in Abhängigkeit der Pionieraxone zu untersuchen.

Es wurden Tiere analysiert, bei denen die Interneuronaxone fälschlicherweise vom linken in das rechte Bündel kreuzten. Anschließend wurde in denselben Tieren mit dem *odr-2::CFP* Marker der Verlauf der Pionieraxone untersucht. In der Mehrzahl der Tiere (70% bei n = 13) verliefen auch die Pionieraxone auf der falschen linken Seite.

2.1.2 Die Motoneurone in *ast-1(rh300)* Mutanten

Um herauszufinden, ob neben den Axonen der Interneuronen auch die der Motoneurone Auswuchsdefekte zeigen, wurden die VC, DA, DB und D-Typ Motoneuronklassen untersucht.

Die VC Motoneurone

Der Marker *nIs96*, der *gfp* unter der Kontrolle des *lin-11* Promotors exprimiert, markiert die VC Motoneurone (Hobert et al., 1998). Die Motoneuronzellkörper und ihre Axone liegen entlang des Ventralstrangs und werden von Interneuronen oder anderen Motoneuronen innerviert. Ihre Hauptfunktion ist die Innervierung der Vulvamuskeln und der ventralen Körpermuskeln. In WT Tieren besitzen die VC Motoneurone zwei Nervenfortsätze, die im Ventralstrang in Richtung anterior bzw. posterior verlaufen. In 33% der *ast-1* mutanten Würmer waren die Axone im Ventralstrang defaszikulierte und manche VC Zellkörper besaßen mehr als zwei Nervenfortsätze (Abb.8B).

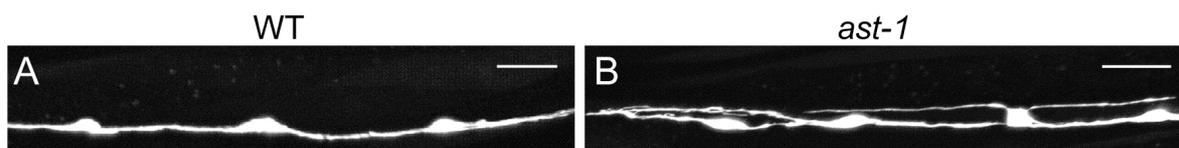


Abb.8: Auswuchsdefekte der Axone der VC Neuronen in *ast-1(rh300)*

Der Ventralstrang ist hier in der Aufsicht zu sehen und anterior ist links. A: In einem WT Tier verlaufen die Axone zwischen den VC-Zellkörpern in einem Bündel. B: Dieses Bündel ist in *ast-1(rh300)* defaszikulierte, d.h. manche Axone wachsen vom Zellkörper direkt in das linke Bündel des Ventralstranges aus oder kreuzen später vom rechten in das linke Bündel. Die Balken stellen 20 μm dar.

Die DA, DB und D-Typ Motoneurone

Mit Hilfe des Markers *hdIs22* (*unc-129::CFP*, *unc-47::DsRed2*) wurden die DA, DB und D-Typ Motoneurone der *ast-1(rh300)* Mutanten untersucht. Das Gen *unc-129*, das für TGFβ (Tumor Growth Factor) kodiert, wird in den DA und DB exzitatorischen Motoneuronen exprimiert (Colavita et al., 1998). Zur Analyse dieser Klassen von Motoneuronen wurde *cfp* unter der Kontrolle des *unc-129* Promotors exprimiert. In WT Tieren verlaufen die Kommissuren von den Zellkörpern DA2 und DB3 zusammen auf der rechten Seite zum Dorsalstrang. Die Kommissuren der nachfolgenden DA3, DB4, DA4, DB5 und DA5 Neurone wachsen auf der linken Seite zum Dorsalstrang. Veränderungen an diesem Muster sind einfach zu erkennen. Das Auswachsen der Axone in *ast-1(rh300)* Tieren verlief normal und die Kommissuren erreichten den Dorsalstrang in einer geraden Projektion auf der richtigen Seite. Das fluoreszierende Protein DsRed2 wurde unter der

Kontrolle des *unc-47* Promotors in den inhibitorischen D-Typ Motoneuronen exprimiert (McIntire et al., 1997). Sämtliche Kommissuren dieser Motoneurone verlaufen in Wildtyptieren von den Zellkörpern aus auf der rechten Seite zum Dorsalstrang. Dies war auch in *ast-1(rh300)* Mutanten so, wo alle Kommissuren den Dorsalstrang in einer geraden Projektion erreichten. Die DA, DB und D-Typ Motoneurone sind von der Mutation in *ast-1* nicht betroffen.

2.1.3 Die sensorischen Neurone in *ast-1(rh300)* Mutanten

Es wurden verschiedene sensorische Neurone mit Fluoreszenzmarkern oder durch Anfärbung mit einem lipophilen Farbstoff untersucht.

Die inneren Labialneurone IL2

Die inneren Labial-Neurone IL2, IL2V und IL2D konnten mit dem *odr-2::CFP* Marker analysiert werden. Die Zellkörper der drei Neuronenpaare liegen posterior des ersten Pharynx-Bulbus und ihre Endigungen penetrieren durch eine kleine Öffnung in der Kutikula. Die Axone verlaufen in WT Tieren und der *ast-1(rh300)* Mutante in derselben Weise.

Die Amphid- und Phasmid-Neurone

Mit dem lipophilen Farbstoff DiI können die sensorischen Neurone, die Öffnungen nach außen besitzen, angefärbt werden (Kapitel 4.2.5.1). Die vier Phasmid-Neurone PHAL/R und PHBL/R liegen im Schwanz und ihre Axone erreichen das präanale Ganglion und münden von dort aus in den Ventralstrang. Die sensorischen Endigungen hingegen liegen weiter hinten im Schwanz an der Kutikulaoberfläche und können Reize aus der Umgebung aufnehmen. In *ast-1(rh300)* Mutanten erreichen die Axone der Phasmid-Neurone den Ventralstrang ohne Ausnahme (n = 51). Das Wachstum der PHA und PHB Axone ist in *ast-1* Mutanten nicht beeinträchtigt.

Das chemosensorische Amphid-Neuronenpaar ASH wurden mit dem *sra-6::DsRed* Marker sichtbar gemacht. Die Zellkörper der beiden Amphid-Neuronen liegen im Kopfganglion und die Axone verlaufen im Nervenring. Die dendritischen Fortsätze erreichen die Nase, wo sie sensorische Reize aufnehmen können. Das Auswachsen dieser Nervenfortsätze ist in der *ast-1(rh300)* Mutante nicht beeinträchtigt (n = 50).

Die Druckrezeptoren

Die sechs Druckrezeptoren AVM, PVM, ALML/R und PLML/R wurden mit dem *mec-4::GFP* Reporter markiert. Die Druckrezeptoren reagieren auf Berührung mit einem feinen Haar. Die Axone dieser Nervenzellen verliefen in der *ast-1(rh300)* Mutante genauso wie in WT Tieren.

2.1.4 Das gesamte Nervensystem in *ast-1(rh300)* Mutanten

Mit dem panneuralen Marker *evIs111* wurden alle Nervenzellen markiert, wobei ein komplexes Expressionsmuster entstand, das einen allgemeinen Überblick lieferte. Es waren alle Kommissuren und lateral verlaufenden Axone sichtbar. Die Einzelauflösung geht allerdings verloren, so dass zur genaueren Untersuchung Einzelaspekte ausgewählt wurden. Der Dorsalstrang war in WT Tieren wie in *ast-1(rh300)* Mutanten dicht gebündelt. Die Axone der Neurone des PDE Clusters verliefen auch in der Mutante direkt zum Ventralstrang. Alle Kommissuren konnten untersucht werden und waren ohne Verzweigungen auf direktem Weg zum Dorsalstrang ausgewachsen. Die lateralen Axone verliefen wie in WT Tieren in einer geraden Projektion. Zusammenfassend war das Nervensystem intakt und die Auswachsdefekte der Axone der Interneurone und der VC Motoneurone sind die einzigen, sehr spezifischen Defekte in *ast-1(rh300)* Mutanten.

2.2 Rh300 und hdl sind verschiedene Allele desselben Gens ast-1

Die beiden Allele des Gens *ast-1* (axonal steering), *rh300* und *hdl*, wurden unabhängig voneinander aus genetischen Screens isoliert und zeigten sehr ähnliche Phänotypen. Desweiteren waren beide Mutationen an *rol-6(e187)* auf Chromosom II gekoppelt und wurden autosomal rezessiv vererbt. Dies legte die Vermutung nahe, dass es sich um zwei verschiedene Allele desselben Gens handelte. Anhand einer Komplementationskreuzung konnte dies untersucht werden. Zwei Gene komplementieren sich, wenn trans-heterozygote Tiere keine der charakteristischen Merkmale zeigen, die die Einzelmutanten ausweisen. Dies beweist dann, dass die Mutationen in unterschiedlichen Genen liegen.

Es war nützlich, die heterozygoten von den homozygoten Würmern unterscheiden zu können. Aus diesem Grund wurde *rh300* an *dpy-10(e128)* und *hdl* an *rol-6(e187)* gekoppelt in die Kreuzung eingesetzt. *Dpy-10* (dumpy) Würmer konnten leicht aufgrund ihrer kurzen und dicken Körperform erkannt werden. *Rol-6* Mutanten rollten im Kreis, was

ebenso einfach sichtbar war. *Rh300* und *hd1*, gekoppelt an ihren jeweiligen Marker, wurden in *trans* gebracht und die heterozygoten F1 Tiere, die keine Dpy- und keine Roller-Tiere waren, auf axonale Defekte untersucht. Da die heterozygoten Tiere Defekte im Auswachsen der Axone zeigten, war klar: *rh300* komplementierte *hd1* nicht und somit waren beide Allele desselben Gens *ast-1*.

2.3 Kartierung und Klonierung von *ast-1*

Um die Frage zu klären, welches Gen für das falsche Auswachsen der Axone verantwortlich ist, war es essentiell, die verantwortliche Mutation zu kartieren und das Gen *ast-1* zu klonieren. Zur Kartierung wurden sowohl genetische, sichtbare Marker wie auch polymorphe DNS Sequenzen eingesetzt.

2.3.1 Kopplungsanalysen

Die Kartierung eines Gens beginnt mit der Zuordnung des Gens zu einer Kopplungsgruppe (Chromosom). Das Auskreuzen (siehe Kapitel 4.2.4.3) der Mutante hatte gezeigt, dass *ast-1(rh300)* und *ast-1(hd1)* gekoppelt an *rol-6(e187)* auf Chromosom II und autosomal rezessiv vererbt wurden. Um die Position von *ast-1* auf Chromosom II zu verifizieren und zu verfeinern, wurden die folgenden Zwei- und Drei-Faktor-Kreuzungen durchgeführt. Die Bestimmung der Rekombinationshäufigkeit zwischen *ast-1* und einem oder zwei bekannten Markern erlaubt eine relativ genaue Positionierung auf der genetischen Karte.

Zwei-Faktor-Kreuzung mit *dpy-10*

Eine Zwei-Faktor-Analyse erlaubt es, den Abstand eines unbekanntes Gens zu einem bekannten Markergen zu bestimmen. Das Markergen *dpy-10(e128)* liegt genau im Zentrum von Chromosom II und homozygote *dpy-10* Tiere können leicht anhand ihres Dumpy-Aussehens erkannt werden (Dpy-Tiere). Durch Kreuzung wurden Tiere erzeugt, die den *dpy-10* Marker und *ast-1(rh300)* in *trans* trugen. In der nächsten Generation wurden 36 Dpy-Tiere vereinzelt und deren Nachkommen auf axonale Defekte untersucht. Die Nachkommen von vier Tieren zeigten fehlgeleitete Axone. Diese trugen also zusätzlich die *ast-1* Mutation und waren demzufolge Rekombinanten.

Die Rekombinationshäufigkeit ergibt sich nach folgender Formel:

$$\frac{B}{AB} + B = 2 \times \frac{p}{2} \times \frac{1-p}{2} \times 4$$

B: Anzahl der Rekombinanten

AB: Anzahl der Dpy-Tiere

$p = 0,01$ entspricht 1% Rekombinationswahrscheinlichkeit = 1 cM

Aus dieser Berechnung ergab sich, dass *ast-1* ungefähr 6 cM von *dpy-10* entfernt liegt.

Drei-Faktor-Kreuzung mit *unc-104 dpy-10*

Mit Hilfe einer Drei-Faktor-Kreuzung kann ein Gen im Verhältnis zu zwei bekannten Markern eingeordnet werden. Um herauszufinden, ob *ast-1* rechts oder links von *dpy-10* liegt, wurde eine Drei-Faktor-Kreuzung mit *unc-104(e1265) dpy-10(e128)* durchgeführt (siehe Abb.9). *Unc-104* (uncoordinated) Würmer sind leicht an ihrer Bewegungsunfähigkeit zu erkennen.

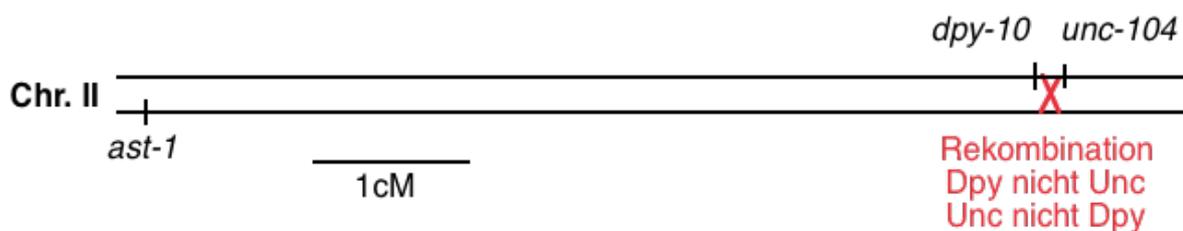


Abb.9: Schematische Darstellung von Chromosom II mit den Markergenen *dpy-10* und *unc-104*

In dieser Drei-Faktor-Kreuzung wurden Rekombinanten zwischen *dpy-10* und *unc-104* gesucht, die 0,2 cM auseinander lagen. Dpy nicht Unc Rekombinanten besaßen kein *ast-1(rh300)*, während die einzige Unc nicht Dpy Rekombinante *ast-1(rh300)* hatte. Entsprechend lag *ast-1* sehr wahrscheinlich links von *dpy-10*.

Dpy-10 unc-104 wurde in trans zu *ast-1* gebracht und unter den Nachkommen solche Würmer gesucht, die zwischen den beiden Markern rekombiniert hatten, die also Dpy nicht Unc oder Unc nicht Dpy waren. Diese seltenen Rekombinanten wurden vereinzelt und durch Selbstbefruchtung vermehrt, um sie auf axonale Defekte hin zu untersuchen. Welche der beiden Rekombinanten *ast-1(rh300)* besaß, gab die Richtung an in der *ast-1* lag (Abb.9). Nur die Unc nicht Dpy Rekombinante zeigte axonale Defekte und besaß demnach *ast-1(rh300)*. Somit konnte angenommen werden, dass *ast-1* links von *dpy-10* liegt.

2.3.2 Kartierung mittels der snip-SNP Methode

Um den Kartierungsbereich weiter einzuschränken, wurde im Folgenden die snip-SNP Kartierungsmethode angewendet, die in Kapitel 4.2.6 beschrieben ist. Dabei macht man sich zu nutze, dass sich zwei natürlich vorkommende *C. elegans* Isolate durch „single nucleotide polymorphisms“ (SNPs) unterscheiden. Eine grosse Anzahl von SNPs können, als Folge der Modifizierung einer Restriktionsschnittstelle, als „restriction fragment length polymorphism“ (RFLP) identifiziert werden. Da die Penetranz der axonalen Auswuchsdefekte im Ventralstrang 32% betrug und die Defekte meist geringfügig waren, war es zeitaufwendig, Würmer mit Mutationen in *ast-1* zu identifizieren. Wenn die Würmer als *ast-1* Mutanten identifiziert waren, hatte die snip-SNP Methode den Vorteil, dass man ohne weitere Mikroskopierschritte beliebig viele Marker testen und somit schnell eine relativ genaue Position auf der Genkarte erarbeiten konnte.

Die Mutationen *ast-1(rh300)* und *ast-1(hd1)* wurden in dem genetischen Hintergrund N2 Bristol generiert. Zur Kartierung von *ast-1* wurden die beiden mutanten Stämme mit CB4856 Hawaii gekreuzt, um Rekombinanten zwischen den beiden Isolaten zu finden, die Auskunft über den Locus von *ast-1* geben konnten. Von den Nachkommen wurden insgesamt 400 Roller vereinzelt und deren Nachkommen mit einem hochvergrößernden Fluoreszenzstereomikroskop anhand des GFP Markers auf axonale Defekte hin untersucht. Insgesamt wurden 49 Isolate gefunden, die axonale Defekte in den Interneuronen aufwiesen. Von diesen Isolaten wurden Lysate (#1 - #49) hergestellt, die für die snip-SNP Analyse verwendet wurden. Ähnlich wurde mit dem zweiten Allel *hd1* verfahren und die Lysate der rekombinanten Nachkommen #50 - #52 für dieses Experiment verwendet.

Mit den Lysaten aller 52 isolierten Kreuzungsnachkommen wurden im ersten Schritt snip-SNP Marker getestet, die das gesamte Chromosom II in grösseren Abständen abdeckten (SNP 1, 6, 9, 13, 18 und 19). Wie in Kapitel 4.2.6 beschrieben, wurden PCR Produkte hergestellt, die anschließend mit dem entsprechenden Restriktionsenzym verdaut wurden. Die PCR Produkte von einer N2 oder CB5648 Matrize ergaben unterschiedliche Verdaufragmente, anhand derer die Herkunft des Markers festgestellt wurde. Danach wurden die Lysate jener Rekombinanten, deren Rekombinationsort Aufschluß über die Position von *ast-1* gab, mit den Markern SNP 7, 8, 11 und 12 in engeren Abständen weiter getestet. Es zeichnete sich anhand des Rekombinationsortes der Klone #22, #23, #50, #51, #52 ab, dass *ast-1* zwischen den Markern SNP 9 und SNP 11 liegen musste (siehe Tab.2). Von den heterozygoten Klonen #22 und #23 wurden Würmer mit axonalen Defekten

subkloniert (#22a und #23a), damit *ast-1(rh300)* homozygot vorlag. Zwischen SNP 9 und SNP 11 lagen keine weiteren bestätigten SNP Marker vor, deshalb wurden die Marker SNP 22 bis 34 mit Hilfe der SNP Datenbank des Genome Sequencing Center in St. Louis, USA eigenständig erarbeitet.

Snip-SNP Marker	Klon Position Chr. II cM	#22a	#23a	#50	#51	#52
9	-6,25	HH	BB	HH	HH	HH
33	-5,92	BB	-	HH	HH	BB
34	-5,54	BB	-	BB	HH	BB
32	-5,46	BB	-	BB	HH	BB
22	-5,03	BB	BB	BB	BB	BB
23	-4,55	BB	BB	BB	BB	BB
24	-3,98	BB	HH	BB	BB	BB
27	-3,33	-	HH	BB	-	BB
28	-2,82	-	HH	-	-	-
11	-1,95	-	HH	BB	BB	-

Tab.2: Getestete snip-SNP Marker der Klone # 22a, 23a, 50, 51, 52 auf Chromosom II

Schematische Darstellung von 5 ausgewählten Klonen, deren Rekombinationspunkte die Position von *ast-1* eingrenzen. B = Bristol Marker, H = Hawaii Marker

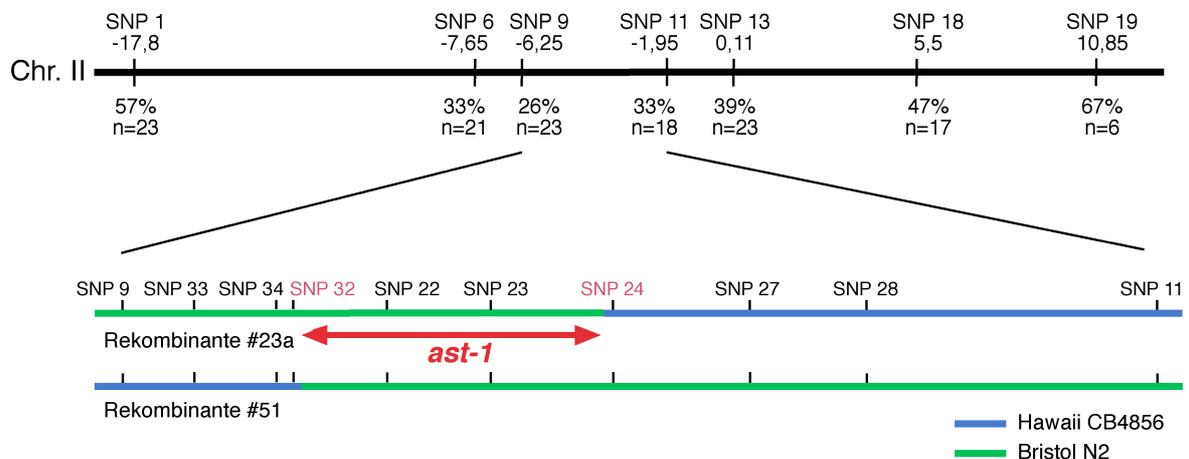


Abb.10: Analyse der snip-SNP Marker auf Chromosom II in *ast-1(rh300)* Rekombinanten

Die Häufigkeit der CB4856 Allele zu den N2 Allelen wurde für jeden Marker bestimmt und in Prozent angegeben. n = Anzahl der rekombinierten Chromosomen getestet mit dem entsprechenden Marker

Anhand der Analyse der Lysate von Wurm #23a und #51 mit den Markern SNP 33, 34, 32, 22, 23, 24, 27, 28 konnte der Locus von *ast-1* weiter eingegrenzt werden (siehe Abb.10). *ast-1* lag zwischen den Markern SNP 32 und 24, die einen Bereich von ungefähr 1,5 cM (-5,46 cM bis -3,98 cM) umschlossen.

2.3.3 Kartierung mit Hilfe der Deletion *maDf4*

Um den Kartierungsbereich weiter einzugrenzen, wurde parallel zur snip-SNP Kartierung eine Deletionskreuzung durchgeführt. Für Genkartierungen können Deletionen und Duplikationen benutzt werden, die einen großen Teil des *C. elegans* Genoms abdecken. Deletionen, die sich über mehrere cM erstrecken, erlauben eine Feinkartierung eines unbekanntes Genortes. Liegt das zu untersuchende, mutierte Gen im Bereich einer Deletion, so ist in heterozygoten Tieren nur die eine mutierte Genkopie vorhanden und es sollte der entsprechende Mutanten-Phänotyp zu sehen sein. Ist dies nicht der Fall, kann man annehmen, dass das Gen nicht im Bereich der Deletion liegt.

Heterozygote Tiere, die die Deletion *maDf4* in trans zu *ast-1(hd1)* besaßen, wurden auf axonale Auswuchsdefekte hin untersucht. Da die Tiere keine Defekte im Auswachsen der Axone besaßen (n = 58), lag *ast-1* nicht unter *maDf4*. Der Anfangs- und Endpunkt der Deletion waren angegeben mit -4,11 cM bis -0,45 cM, aber nicht genau bekannt. Es war sicher, dass *vab-1* am weitesten links unter der Defizienz lag und aus diesem Grund diente *vab-1* auf Cosmid M03A1 als rechte Grenze des Kartierungsbereiches von *ast-1*. Diese Position wurde zur gleichen Zeit von den Ergebnissen der snip-SNP Analyse bestätigt.



Abb.11: Vereinfachte Genkarte des Chromosoms II und der Defizienz *maDf4*

Die Defizienz *maDf4* (-4,11 cM bis -0,45 cM) wurde verwendet um die Position von *ast-1* auf Chromosom II zu bestimmen. Die Position von *ast-1* konnte auf einen Bereich zwischen *vab-1* bzw. SNP 24 auf Cosmid M03A1 und SNP 32 auf Cosmid F56D3 festgelegt werden.

Dies bedeutet auch, dass *vab-1 ast-1(hd1)* komplementiert, was hilfreich war um auszuschließen, dass es sich bei *ast-1(hd1)* um ein Allel von *vab-1* handelt. Denn *vab-1* ist das Gen des Ephrinrezeptors und mutante Tiere zeigen axonale Auswuchsdefekte und Faszikulierungsdefekte.

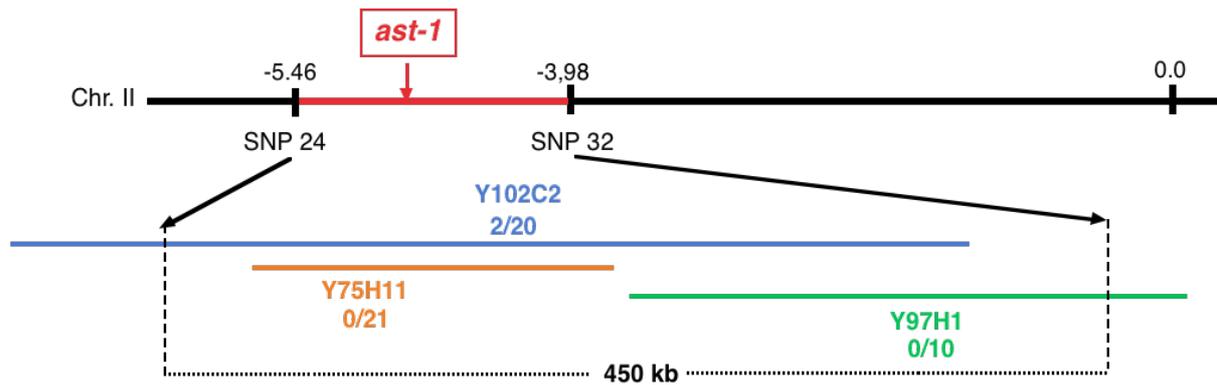
2.3.4 Rettungsexperimente

Um *ast-1* schließlich zu identifizieren, wurden sogenannte Rettungsexperimente durchgeführt. Mit der Injektion von Wildtyp-DNS-Kopien eines Gens kann der Phänotyp der Mutante wie z.B. axonale Defekte, in transgenen Linien gerettet werden. Für das gesamte *C. elegans* Genom ist ein überlappendender Satz von DNS Klonen, sogenannten Contigs, vorhanden. Diese Contigs liegen als Cosmide und künstlichen Hefechromosomen (Yeast Artificial Chromosomes = YACs) vor (Coulson et al., 1986). Die Cosmide tragen 20 bis 40 kb grosse Inserts, während YACs bis zu 400 kb grosse Inserts besitzen können. In den folgenden Experimenten wurden zuerst YACs und später die kleineren Cosmide verwendet, die genomische DNS aus dem bisher bekannten Kartierungsbereich von *ast-1* besaßen.

Wie die Klonierung anderer Gene in *C. elegans* zeigte, sind bei solchen Rettungsexperimenten nicht alle transgenen Linien gerettet. In einem extrachromosomalen DNS-Element ist die zu untersuchende DNS in mehreren Kopien vorhanden, so dass es zu Dosiseffekten kommen kann, d.h. durch eine vermehrte Kopienzahl des Gens grössere Mengen Protein hergestellt werden, die einen mutanten Phänotyp zur Folge haben können. Aus diesem Grund sollte die Injektions-DNS sehr niedrig konzentriert sein (ng/µl-Bereich). Dies hat zur Folge, dass nicht alle transgenen Linien, die das Markerplasmid als extrachromosomales DNS-Element besitzen, zugleich das Cosmid besitzen. Es gibt daher Linien, die zwar transgen (in diesem Fall Roller-Tiere) sind, aber keine Rettung des axonalen Phänotyps zeigen, da die genomische Sequenz des Cosmids nicht vorhanden ist. Es ist daher notwendig viele Linien zu generieren, um ein zuverlässiges Ergebnis zu erhalten.

Rettungsexperiment mit künstlichen Hefechromosomen

Die YACs Y102C2, Y75H11 und Y97H1 wurden aus Hefen mitsamt der genomischen Hefe-DNS isoliert (siehe Kapitel 4.2.2). *ast-1(rh300)* Tiere wurden mit dem entsprechenden YAC (40-75 ng/µl) und dem Markerplasmid pRF4 (*rol-6(su1006)*) (100 ng/µl) injiziert. Transgene Tiere, die den dominanten Roller Marker *rol-6(su1006)* auf extrachromosomalen DNS-Elementen hatten, konnten als Roller-Tiere identifiziert werden.



Injizierte YACs	P0	F1	Gerettete Linien /Transgene Linien
Y102C2	171	219	2/20
Y97H1	211	153	0/10
Y75H11	177	265	0/21

Abb.12: Rettungsexperiment mit YACs

A: Vereinfachte Darstellung von Chromosom II mit Positionsangabe der YACs und der snip-SNP Marker 24 und 32. Die gesamte Region zwischen den Markern 24 und 32 ist ungefähr 450 kb groß. Die Anzahl der geretteten im Verhältnis zu der Gesamtzahl der transgenen Linien ist jeweils angegeben.

B: In der Injektionslösung war das YAC in einer Konzentration von 40 - 75 ng/μl enthalten, sowie 100 ng/μl des Koinjektionsmarkers pRF4 (*rol-6(su1006)*). P0 ist die Anzahl der injizierten Tiere. F1 ist die Anzahl der transgenen Roller Nachkommen in der F1 Generation.

Die transgenen Roller-Linien wurden auf axonale Defekte der Interneurone (*glr-1::GFP*) hin untersucht. Um eine sichere Entscheidung treffen zu können, ob die Linie gerettet war oder nicht, wurden mindestens 50 Roller mikroskopiert. Die axonalen Defekte waren unverändert in den transgenen Tieren mit Y75H11 und Y97H1 zu erkennen. Die Injektion von 171 Tieren mit Y102C2 erbrachte 20 unabhängige Linien, wovon zwei eine wesentlich niedrigere Häufigkeit von fehlgeleiteten Interneuronaxonen zeigten. Hier hatten nur 8% bzw. 11% der Roller Auswuchsdefekte der Axone, während die Nicht-Roller und die nicht geretteten Linien durchschnittlich 49% Defekte hatten, vergleichbar mit *ast-1(rh300)*. Die Defekte wurden durch die extrachromosomalen Wildtyp-DNS-Kopien nicht vollständig aufgehoben, aber signifikant reduziert.

Diese erste Rettung des *ast-1(rh300)* Phänotyps bestätigte, dass *ast-1* in der mit snip-SNP Markern bestimmten Region lag. Zudem konnte der Beweis erbracht werden, dass sich der Phänotyp generell retten ließ. Damit konnten weitere Rettungsexperimente durchgeführt werden, die den Kartierungsbereich in kleinere Abschnitte unterteilten.

Rettungsexperiment mit Cosmiden

Da Cosmide um den Faktor zehn kleinere Inserts genomischer DNS tragen als YACs, wurden diese zur weiteren Eingrenzung des *ast-1* Lokus herangezogen. Sechs Mischungen aus 31 verschiedenen Cosmiden, die den gesamten Kartierungsbereich abdeckten, wurden injiziert. Die Cosmide wurden in einer Konzentration von je 1-2,3 ng/ μ l und dem Koinjektionsmarker pFR4 (*rol-6(su1006)*) (100 ng/ μ l) in *ast-1(rh300)* Tiere injiziert. Transgene Tiere konnten als Roller identifiziert werden.

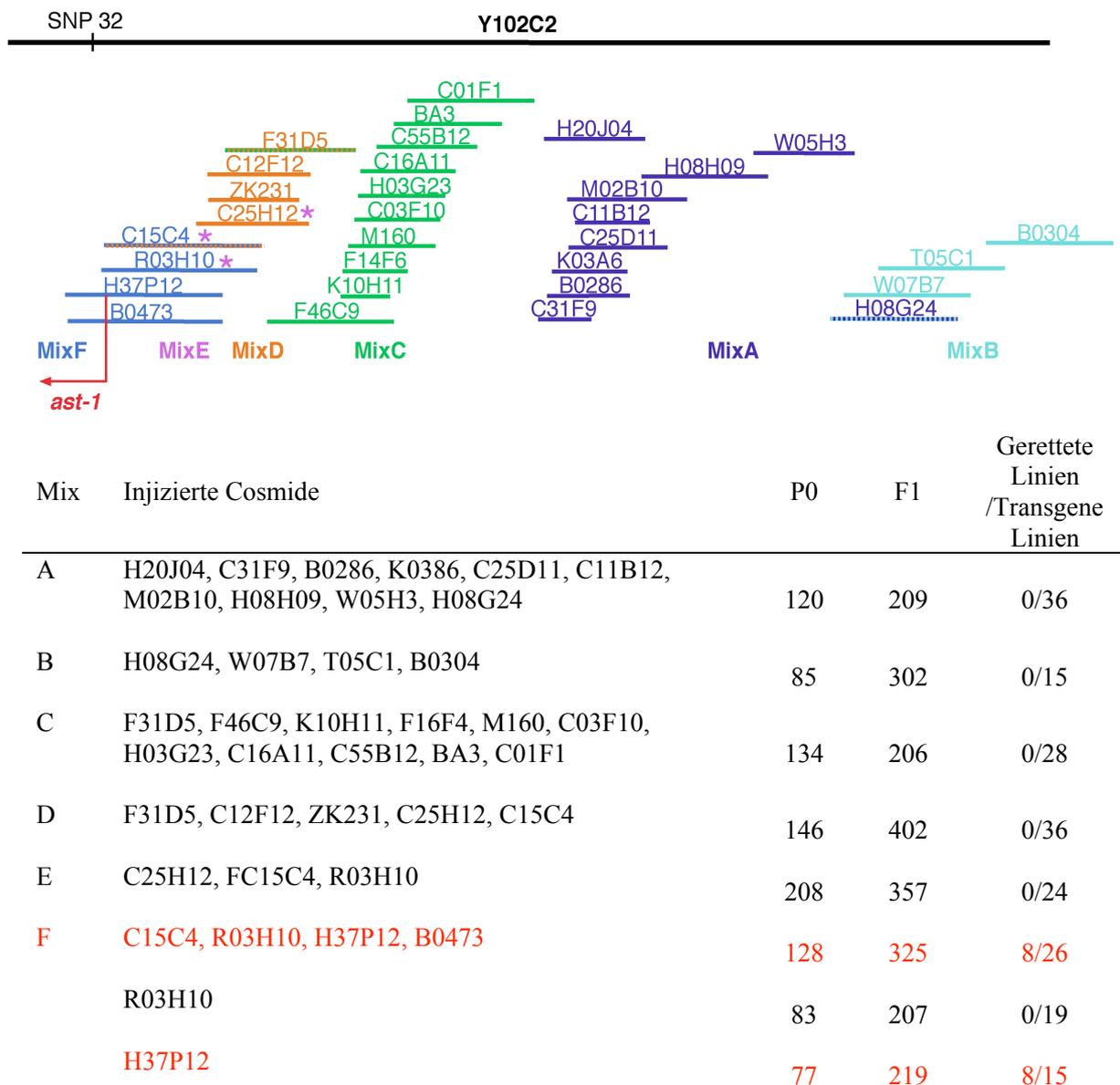


Abb.13: Rettungsexperiment mit Cosmid Mischungen

A: Schematische Darstellung der Position der Cosmide auf Chromosom II. Die jeweiligen Mischungen für die Injektion sind farblich markiert. Cosmide, die mit mehreren Farben markiert sind, waren in verschiedenen Mischungen enthalten (C15C4, F31D5, H08G24). B: In der Injektionslösung waren die Cosmide in einer jeweiligen Konzentration von 1-2,3 ng/ μ l enthalten, sowie 100 ng/ μ l des Koinjektionsmarkers pRF4 (*rol-6(su1006)*). P0 ist die Anzahl der injizierten Tiere. F1 ist die Anzahl der transgenen Nachkommen (Rol) in der F1 Generation.

Die 165 transgenen Linien wurden mikroskopisch auf axonale Defekte hin analysiert. Die Untersuchung der 26 transgenen Linien mit der Cosmid Mischung F ergab, dass acht davon einen schwächeren Phänotyp zeigten. Durchschnittlich waren nur 7% der Roller-Tiere defekt, im Gegensatz zu 38% bei Nicht-Roller-Tieren. Die Cosmid Mischung F enthielt die Cosmide C15C4 und R03H10, die annähernd dieselbe genomische Sequenz trugen, und H37P12 und B0473, die ebenfalls fast identisch waren. R03H10 war zudem in der Cosmid Mischung E vorhanden, die die axonalen Defekte nicht gerettet hatte. Es war also anzunehmen, dass die rettende Sequenz auf dem Cosmid H37P12 lag. Um dies zu bestätigen, wurden in weiteren Rettungsexperimenten die Cosmide R03H10 und H37P12 mit einer Konzentration von 1 bzw. 10 ng/µl einzeln injiziert. Dabei waren wie erwartet acht transgene Tiere von insgesamt 15, die H37P12 besaßen, gerettet. Transgene Tiere, die R03H10 besaßen, waren hingegen nicht gerettet. Da R03H10 den rechten Teil des Cosmids H37P12 abdeckte, lag *ast-1* demnach links auf Cosmid H37P12 und damit links von SNP 32. Dies war unerwartet, da SNP 32 die linke Grenze des Kartierungsbereichs darstellte. Eine Erklärung dafür, dass *ast-1* links vom SNP Marker lag, kann nicht eindeutig gegeben werden, da für eine Rekonstruktion der snip-SNP Daten die Tiere #51, die Aufschluß hätten geben können, nicht mehr vorhanden waren. Somit konnte nicht überprüft werden, ob diese Tiere tatsächlich mutant waren und *ast-1(hd1)* trugen oder ob sie die Mutation nur heterozygot trugen und somit die snip-SNP Daten nicht richtig interpretiert werden konnten.

Rettungsexperiment mit PCR Fragmenten

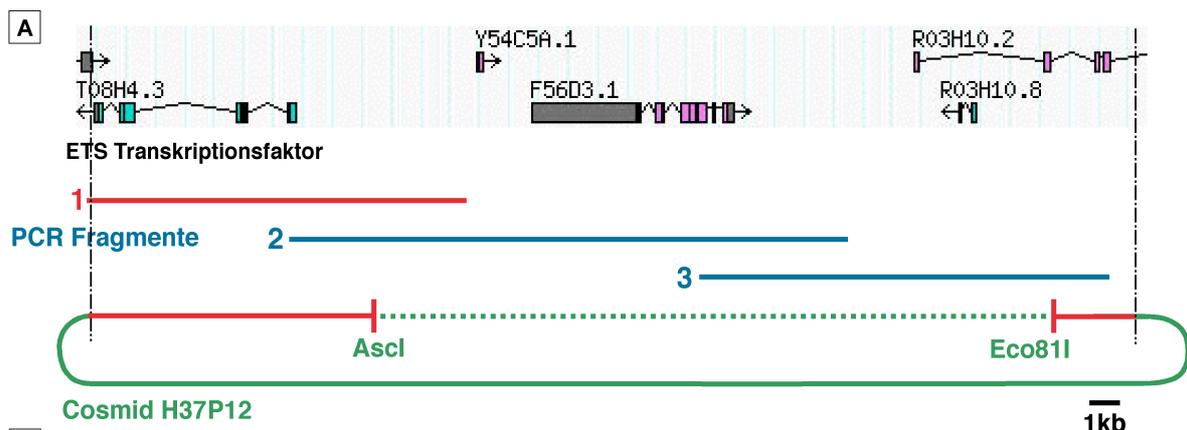
Die nächste Frage war, welches der Gene auf Cosmid H37P12 *ast-1* ist. Um dies zu beantworten, war es zuerst notwendig, die Endpunkte des genomischen Inserts in H37P12 zu bestimmen. Das Vektorrückgrat des Cosmids H37P12 war der Plasmidvektor pFOS1, der zwei Lambda *cos* Stellen zur Klonierung von großen DNS Fragmenten besaß. Der Primer pFOSseq2 hybridisierte an der ersten *cos* Stelle und der Primer pFOSseq3 hybridisierte 200 bp stromaufwärts der zweiten *cos* Stelle. Mit diesen beiden Primern wurde das Insert ansequenziert. Die amplifizierten Teile des Cosmids beinhalteten den Übergang von dem Vektorrückgrat in das Insert, anhand dessen die Grenzen des Inserts bestimmt werden konnten. Dabei ergab sich die linke Grenze des Inserts, die nur 30 bp in 5' Richtung des Stop-Codons von T08H4.3 lag. Die rechte Grenze des Inserts von H37P12 lag an der Position 13140 bp stromabwärts in der Sequenz des Cosmids R03H10, also im vierten Intron des vorhergesagten Gens R03H10.2. Damit war das genomische Insert in

H37P12 insgesamt 35,7 kb groß und kodierte für das vollständige offene Leseraster von vier vorhergesagten Genen. Drei überlappende PCR Fragmente, die diesen Bereich abdeckten, wurden mit Hilfe des Long Template PCR Systems (Roche) amplifiziert. Folgende Primerpaare wurden in der PCR Reaktion eingesetzt:

Fragment 1 (Länge: 14kb): pFos1seq2 / F56D3_2

Fragment 2 (Länge: 17,8 kb): Y54C5A_1 / R03H10seq4

Fragment 3 (Länge: 15,4 kb): F56D3_1 / pFos1seq1



B

Injizierte Fragmente	P0	F1	Gerettete Linien /Transgene Linien
Mischung der Fragmente 1-3	39	111	8/14
Fragment 1	34	62	3/5
Fragment 2	64	138	0/5
Fragment 3	49	124	0/13
H37P12 digest (23,5 kb)	53	224	4/16

Abb.14: Rettungsexperimente von *ast-1(rh300)* mit PCR Fragmenten und einem Cosmid Fragment

A: Schematische Darstellung der vorhergesagten offenen Leseraster, die auf Cosmid H37P12 liegen. Injiziert wurden die dargestellten PCR Fragmente und das Cosmid Fragment. Die rettenden Fragmente (rot) enthalten als einziges offenes Leseraster T08H4.3, einem vorhergesagten ETS-Domäne Transkriptionsfaktor.

B: In der Injektionslösung war das jeweilige Fragment in einer Konzentration von 1,7-2 ng/μl enthalten, sowie 100 ng/μl des Koinjektionsmarkers pRF4 (*rol-6(su1006)*). P0 ist die Anzahl der injizierten Tiere. F1 ist die Anzahl der transgenen Nachkommen (Rol) in der F1 Generation.

Die drei PCR Fragmente (je 2 ng/μl) wurden zusammen und einzeln in *ast-1(rh300)* Würmer injiziert und die transgenen Linien auf axonale Defekte untersucht. Von den 14 transgenen Linien, die die Mischung der drei Fragmente aufgenommen hatten, zeigten in vier Linien durchschnittlich nur 10% der Roller Auswuchsdefekte der Axone. Eines der drei Fragmente konnte demnach den Phänotyp retten. Das einzelne PCR Fragment 1 konnte in drei von fünf transgenen Linien die axonalen Defekte der Roller-Tiere auf 15% reduzieren.

Ast-1 lag demnach auf Fragment 1, welches das offene Leseraster für das Gen T08H4.3 trug.

Parallel dazu wurde das Cosmid H37P12 mit den einfach schneidenden Restriktionseindonukleasen *AscI* und *Eco8II* verdaut und mittels Gelelektrophorese in ein 19 kb und ein 23,5 kb großes Fragment aufgetrennt. Die Injektion von 1,7 ng/ μ l des 23,5 kb Fragmentes, das auch das Rückgrat des Cosmids enthielt, ergab in vier von 16 transgenen Linien eine Rettung des Phänotyps. Denn in den geretteten Linien zeigten nur 16% aller Roller fehlgeleitete Axone. Das 23,5 kb Fragment enthielt ebenfalls das offene Leseraster von T08H4.3, so dass dieses Experiment nochmals bestätigte, dass es sich bei *ast-1* um das Gen T08H4.3 handelt. *Ast-1* kodiert demnach für einen ETS Transkriptionsfaktor.

2.4 *Ast-1* kodiert für einen ETS Transkriptionsfaktor

Um zu bestätigen, dass tatsächlich Mutationen im Gen T08H4.3 den axonalen Phänotyp bewirken, wurde die DNS der beiden Allele von *ast-1*, *rh300* und *hdl*, sequenziert. Dazu wurden mit zehn Primerpaaren (CS_T08H4.3seq1-seq20) PCR Fragmente amplifiziert, die ungefähr 1 kb lang waren und zusammen eine Region von 100 bp stromaufwärts des Start-Codons bis zu 650 bp stromabwärts des Stop-Codons überlappend abdeckten. Diese Fragmente wurden aufgereinigt und zur Sequenzierung mit denselben Primern, die für die Amplifikation verwendet worden waren, eingesetzt. Die Sequenzierung ergab, dass in beiden Allelen eine Punktmutation vorliegt, in beiden Fällen in der vorhergesagten ETS-Domäne von T08H4.3 (siehe Abb.15). Somit war sichergestellt, dass es sich bei *ast-1* um T08H4.3 handelte und die axonalen Defekte auf der jeweiligen Punktmutation beruhten. Beide Mutationen waren Transitionen, die dazu führen, dass ein Purin ein anderes Purin oder ein Pyrimidin ein anderes Pyrimidin ersetzt. Dies war wie erwartet, da EMS zu Mutationen führt, in denen G/C durch A/T ersetzt wird. In *ast-1(rh300)* wurde das Purin Guanin durch Adenin ersetzt. Aus dem Triplett GGA wurde das Triplett AGA. Im translatierten Protein hatte dies zur Folge, dass das unpolare Glycin (G) durch die polare Aminosäure Arginin (R) ersetzt wurde. Im zweiten Allel von *ast-1*, *hdl*, ersetzt das Pyrimidin Thymin das Pyrimidin Cytosin und das Triplett GCT verändert sich zu GTT. Im Protein findet damit ein konservativer Aminosäure-Austausch statt: Alanin wird durch Valin ersetzt.

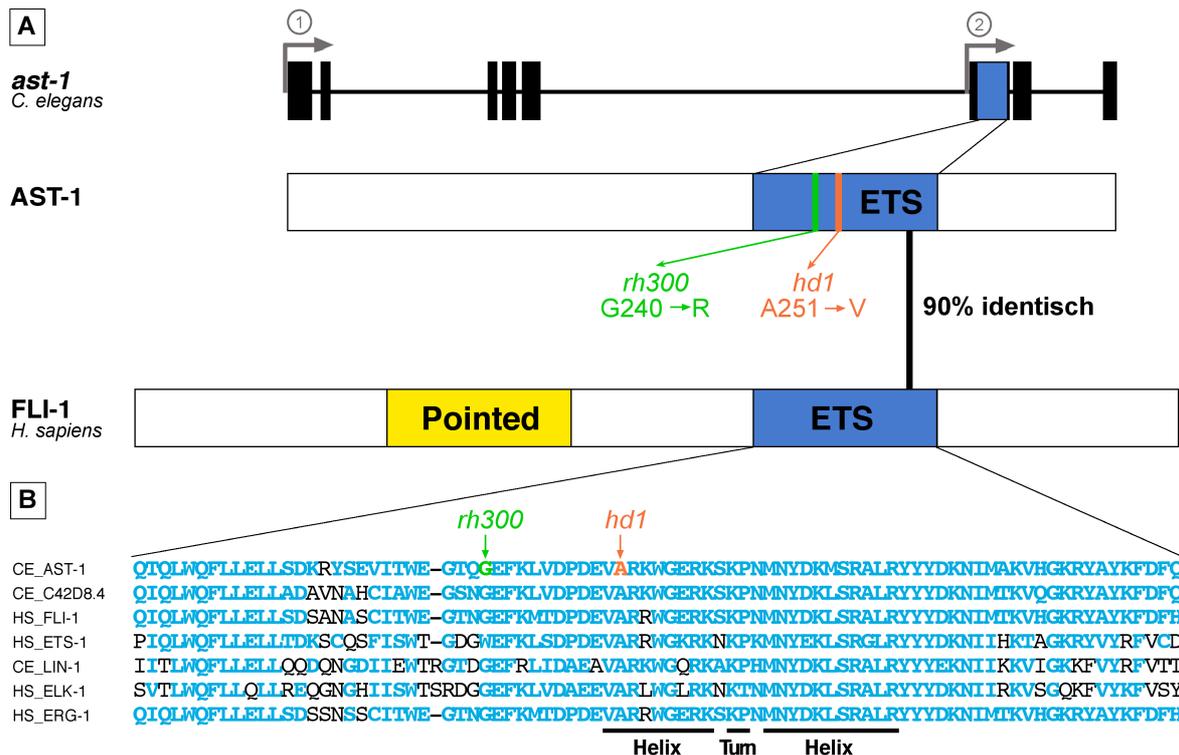


Abb.15: Die Exon-Intron-Struktur des Gens *ast-1* und der Sequenzvergleich der ETS-Domäne von AST-1 mit anderen Mitgliedern der ETS-Familie

A: Die ungespleißte Gensequenz ist 6929 bp lang und beinhaltet acht Exons. Exon 6 kodiert für die ETS-Domäne. ① kennzeichnet das Start-Codon von *ast-1*. ② markiert das Start-Codon der zweiten Spleißvariante an Position 3120 bp der ungespleißten DNS Sequenz innerhalb des fünften Exons. In der schematischen Darstellung des Proteins sind die Positionen der Punktmutationen in *rh300* und *hd1* gekennzeichnet. In *rh300* wurde Glyzin240 durch Arginin ersetzt. In *hd1* war Alanin251 zu Valin mutiert. Im Vergleich der Proteinsequenzen von AST-1 mit dem humanen Protein FLI-1 sind die ETS Domänen der beiden Proteine 90% identisch.

B: Die Aminosäuresequenzen der 84 Aminosäuren langen ETS Domäne unterschiedlicher Familienmitglieder sind gegenübergestellt. Die Aminosäuren, die das Helix-Turn-Helix DNS-Bindemotiv darstellen, sind unterstrichen. Die beiden Punktmutationen in den *ast-1* Allelen, *rh300* und *hd*, sind farblich markiert.

Prof. Dr. Y. Kohara (Japanese National Institute of Genetics, Mishima, Japan) hatte eine cDNS isoliert, die auf eine zweite Spleißvariante von *ast-1* hindeutet. Aufgrund von algorithmischen Auswertungen der *ast-1* Gensequenz war das Vorhandensein dieser alternativen Isoform von *ast-1* ebenfalls vorhergesagt. Dabei soll das Start-Codon an Position 3210 bp in der ungespleißten DNS Sequenz im fünften Exon liegen (② in Abb.15A) und das translatierte Protein besäße noch die ETS-Domäne.

Der nächste Verwandte von AST-1 in Vertebraten ist das humane Protein FLI-1. Die Aminosäuresequenzen der ETS Domänen dieser beiden Proteine sind zu 90% identisch. FLI-1 besitzt zusätzlich eine Pointed-Domäne, die nur in ETS Proteinen von Vertebraten zu finden ist. In Abbildung 15B wird die ETS Domäne weiterer Familienmitglieder mit der von AST-1 verglichen. Besonders das Helix-Turn-Helix-Motiv ist sehr stark konserviert.

2.4.1 Bestätigung der vorhergesagten Exon-Intron-Struktur von *ast-1*

Zur Überprüfung der vorhergesagten Exon-Intron-Struktur von *ast-1* wurden entsprechende cDNS sequenziert. Die Klone wurden uns von Prof. Dr. Y. Kohara (Japanese National Institute of Genetics, Mishima, Japan) aus seiner *C. elegans* cDNS Bank freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Für das Gen *ast-1* waren mehrere cDNS Klone vorhanden, von denen zwei zur genauen Analyse ausgewählt wurden. Der cDNS Klon yk533 beinhaltet die gesamte Gensequenz vom Start-Codon bis zur Poly-A Region. Yk339 deckte die gesamte Gensequenz bis auf fehlende 40 bp am 5'-Ende ab. Die erhaltene λ ZAPII Phagen-Suspension wurde wie in Kapitel 4.2.3 beschrieben zur Exzision und Isolierung der cDNS-Klone yk399 und yk533 eingesetzt. Die Sequenzierung der cDNS Klone yk399 und yk533 in den Plasmiden pVH14.18 bzw. pVH14.19 mit den Primern T3 und T7 bestätigte die vorhergesagte Exon-Intron-Struktur von *ast-1*, dargestellt in Abb.15. Die gesamte DNS Sequenz von *ast-1* ist 6929 bp lang und beinhaltet acht Exons. Die gespleißte Form ist 1134 bp lang und das Protein besteht entsprechend aus 377 Aminosäuren (Abb.16).

Die beiden Mutanten zeigen einen nahezu identischen axonalen Phänotyp. Dies ist nun leichter verständlich, da beide Mutationen nebeneinander, mit einem Abstand von nur 10 Aminosäuren, in dem DNS-Bindemotiv der ETS-Domäne liegen. Die Mutation in *rh300* liegt kurz vor der ersten Helix und das mutierte Alanin in *hdl* ist Teil der ersten Helix des Helix-Turn-Helix-DNS-Bindemotivs.

```

MQVVSSATLPPTVASADLAIVGGRSSDEDVIKYSAIQTIKQEQQQQQQQQSNTAL
PSYNFPFFNGMQNDFPPNRMLYNDNTMQKSENDHFTGMNLSTSASSSGNSTSS
KDQSRRFYTESSNSSGNGAAATSGSNGSSSSTESKSDVFNISMNAFAATPGSK
SEDHNIPSFNMLSSYYTGALKLSNSTSFANPDPYQILGPTSKNLAHSGSGQTQLW
QFLELLSDKRYSEVITWEGTQGEFKLVDPDEVARKWGERKSKPNMNYDKMSR
ALRYYYDKNIMAKVHGKRYAYKDFDQGIAQALQPPTASHPQDYFSHAMGRIAPD
FSSWTSANYRSLNIAGFNNGSTIFNPSVNYSAFGATGTSNLNSAARAFPLYR*

```

Abb.16: Die AST-1 Protein Sequenz

Das Protein AST-1 ist 377 Aminosäuren groß. Die ETS-Domäne ist dick markiert und die Punktmutationen in *rh300* (G→R) und *hdl* (A→V) sind unterstrichen und mit Pfeilen markiert. Im DNS-Bindemotiv sind die Helices rot und der Turn grün markiert.

2.5 *Ast-1(hd92)* Deletionsmutante

Die beiden Mutanten von *ast-1*, *rh300* und *hd1*, besitzen Punktmutationen, die zu keinem Stop-Codon führen. Deshalb lag der Verdacht nahe, dass es sich dabei nicht um Nullallele handelt. Aus diesem Grund wurde eine Deletionsmutante für *ast-1* isoliert. Um den totalen Funktionsverlust eines Gens zu erreichen, versucht man Deletionen zu generieren, die sich über mehrere hundert Basenpaare erstrecken. In unserem Labor wurde eine EMS-Deletionsbank hergestellt, in der bereits mehrere solcher Deletionen in Genen, die funktional untersucht werden sollten, gefunden worden sind.

2.5.1 Isolation der *ast-1(hd92)* Deletionsmutante

Die Primer zur Isolation der *ast-1* Deletionsmutante waren so gewählt, dass sie die ETS-Domäne flankieren und diese von der Deletion betroffen sein sollte. Die Identifizierung mittels der „poison primer PCR“ und die Isolierung einer Deletionsmutante ist in Kapitel 4.2.7 ausführlich beschrieben. Mit den entsprechenden Primerpaaren (siehe Kapitel 4.1.5) wurden elf 96-Loch-Platten getestet, wobei ein Loch eine Komplexität von 2000 Genomen enthielt. Mit einem der Lysate wurde in der PCR ein Deletionsprodukt erhalten. Das Deletionsprodukt war ungefähr 700 bp groß im Vergleich zu dem 1,6 kb großen WT-Produkt (siehe Abb.17). Nun wurden die 48 Einzellysate der entsprechenden Platte getestet. Dies ergab ein Deletionsprodukt in der PCR mit einem Einzellysat. Die Würmer dieses Röhrchens wurden aufgetaut und alle 450 Nachkommen vereinzelt. Mittels der „poison primer PCR“ wurden die Lysate der Nachkommen auf das Vorhandensein der Deletion geprüft. Dies war der Fall für die Lysate einiger Nachkommen, deren PCR sowohl die WT wie auch die Deletionsbande zeigten. Um Tiere zu erhalten, die homozygot für die Deletion sind, wurden von diesen Platten weitere Tiere vereinzelt. Doch PCRs mit Lysaten dieser Tiere zeigten wieder die WT und die Deletionsbande. Die Tiere waren heterozygot, was darauf hin deutete, dass die Deletion letal sein könnte und nur heterozygote Nachkommen überleben.

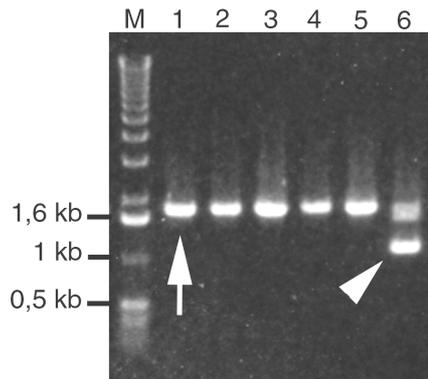


Abb.17: Die Deletions-PCR

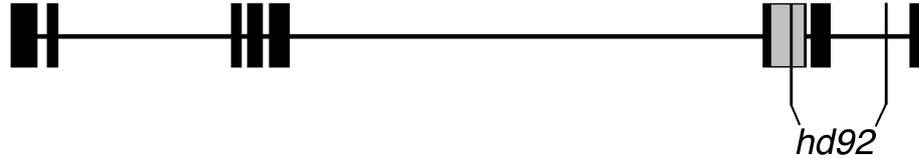
Dieses Agarosegel zeigt das Produkt der Deletions-PCR mit genomischer Wildtyp- und Mutanten-DNS als Matrize. In Reihe 1 bis 5 erkennt man eine DNS-Bande bei ungefähr 1,6 kb, was der Größe des Wildtypproduktes entspricht (Pfeil). In Reihe 6 ist die Deletionsbande zu erkennen mit einer Größe von 700 bp (Pfeilspitze). Die Würmer 1 bis 5 waren demnach Wildtyp und Wurm 6 besaß die Deletion im *ast-1* Gen.

Um zu überprüfen, ob die Deletion in *ast-1* letal war, wurden einzelne Tiere auf Platten ausgesetzt, nach wenigen Stunden immer wieder auf neue Platten transferiert und die gelegten Eier gezählt. Am folgenden Tag wurde die Anzahl der geschlüpften Tiere mit der Anzahl der gezählten Eier verglichen. War hier eine Differenz festzustellen, wurde auf der Platte nach toten Embryonen oder winzigen Larven gesucht. Es wurden sehr kleine und dünne Larven unter den Nachkommen gefunden, deren Elterntier die Deletion heterozygot besaß. Der Genotyp des Elterntieres wurde nach Ablage der Eier über eine PCR mit der DNS des Elterntieres als Matrize festgestellt. Es entwickelten sich wie erwartet 75% aller Nachkommen der heterozygoten Elterntiere normal. Die restlichen Nachkommen waren entsprechend homozygot für die Deletion, wobei nicht alle Larven gefunden werden konnten. Die winzigen Larven starben nach wenigen Tagen.

Elterntier <i>hd92/+</i>	Gesamtzahl der Nachkommen	Adulte [%]	Winzige Larven [%]
A	237	77 (182)	15 (36)
B	287	72 (206)	13 (37)
C	261	75 (196)	16 (42)

Tab.3: Die Nachkommen von *ast-1(hd92/+)* Elterntieren

Von drei für die Deletion heterozygoten Elterntieren A, B und C wurden die Nachkommen untersucht. Der Genotyp des Elterntieres wurde mittels PCR festgestellt. Durchschnittlich entwickelten sich erwartungsgemäß 75% aller Nachkommen normal, während zwischen 13 und 16% der Nachkommen winzige Larven waren. Die Zahlen in Klammern sind die gezählten Nachkommen.

A**ast-1****B**

244

AST-1 WT L V D P D E V A↓ R K W G E R K S K
 DNS Exon 6 ctt gtg gat ccg gat gaa gtg gct cga aaa tgg gga gaa aga aag tca aag
AST-1(HD92) L V D P D E V A R K W G E R K S K

AST-1 WT P N M N Y D K M S R R L R Y Y Y D
 DNS cca aac atg aa|t tat gat aag atg tcg aga gct ctt cgc tat tat tac gat
AST-1(HD92) P N M K

AST-1 WT K N I M A K V H G K R Y A Y K F D
 DNS aag aat ata atg gca aaa gtc cat ggg aag aga tat gcg tat aaa ttt gat
AST-1(HD92)

AST-1 WT F Q G I
 DNS ttt caa gg tttgtgatttctcgtgtaaacgaattttatcaatgcatagttatagg a atc
AST-1(HD92)

AST-1 WT A Q A L Q P P T A S H P Q D Y F S
 DNS Exon 7 gca cag gct ctc cag cct cca act gct tct cat cca cag gat tac ttt aat
AST-1(HD92)

AST-1 WT H A M G R I A P D F S S W T S A N
 DNS tct cat gcg atg ggg aga att gct cct gat ttc tca tcg tgg aca agt gca
AST-1(HD92)

AST-1 WT Y R E L N I A G F N N
 DNS aat tat cga tct ctg aat att gcc ggg ttt aat gtgagtttgaaattttatttatt
AST-1(HD92)

DNS tttgtaattttcataattttcaaccacaaatcagattttttttttcgagaatttgggcaaaattata
 DNS taaaaataggagggatactgtagttttttgtcaaatgtatttgaaaatacggtaaccagtcctcgacaa
 DNS acttttgttgaatgaaaatagggtgtgcgcctttaaagtgtactgtaatttcaaactttcgttgctgca
 DNS gatttttatagatttttcaatctcactattttgttaaaatttttagcatttcaataaataaataatatt
 DNS tttattacaaatttcaaaatttaggaacaattattaaacttacagtaactatttgaagggccttattt
 DNS tcaaacatttttaataagaagcaaatgtacgacttatacgttaaatataaaaaataatttttaggta

AST-1 WT
 DNS aaaaactgaa|g aaa ata aat gct cta aaa aac act ggc gga aat att ttt att
AST-1(HD92) K I N A L K N T G G N I F I

AST-1 WT
 DNS ttt tca aat tct aag aaa att tac att gaa aaa att act aaa aat atg cat
AST-1(HD92) F S N S K K I Y I E K I T K N M H

AST-1 WT G S
 DNS ttt ttt tct caa aac ctt tga atcgaaaattattttattttcttcaatttcag aac ggc
AST-1(HD92) F F S Q N L *

AST-1 WT T I E F N P S V N Y S A F G A T G
 DNS Exon 8 agc aca att ttc aac cca tca gtc aac tac agt gca ttt gga gcc acc ggc

AST-1 WT T S N N L S A A R A F P L Y R *
 DNS acc tcg aat aat ctc tcg gcg gca cga gca ttc cct ctt tat cga tag

Abb.18: Die AST-1(HD92) Aminosäuresequenz im Vergleich zu AST-1 WT

A: Schematische Darstellung der Exon-Intron-Struktur des Gens *ast-1*.

B: Die beiden Aminosäuresequenzen des AST-1 WT (blau) Proteins und des deletierten Proteins AST-1(HD92) (grün) werden ab Leucin244 verglichen. Die ETS-Domäne ist dick markiert und die Punktmutation in *hd1* (A→V) ist in der AST-1 WT Sequenz unterstrichen und mit einem Pfeil sichtbar gemacht. Die Exons sind rot und die Introns schwarz abgebildet. Die Deletion in *ast-1(hd92)* endet in einem Intron, welches dann stromabwärts als kodierende Sequenz verwendet wird bis ein Stop-Codon entsteht. Das Protein AST-1(HD92) ist 301 Aminosäuren groß.

Um das Deletionsallel zu sequenzieren, wurde die Deletionsbande der „poison primer PCR“ aus dem Gel isoliert und aufgereinigt. Die Deletion reicht von Nukleotidposition 5762 in Exon 6 bis zu Nukleotidposition 6485 in Intron 7 der ungespleißten Gensequenz und ist damit 724 bp groß (siehe Abb.18A). Die zweite Hälfte der ETS-Domäne wird eliminiert und in der Aminosäuresequenz entsteht ein Stop-Codon an Aminosäureposition 301 (siehe Abb.18B). Das Deletionsallel von *ast-1* wird *hd92* genannt.

2.5.2 Morphologische Untersuchung von *ast-1(hd92)*

Zur leichteren Identifikation der Deletionsmutanten war ein dominanter Marker auf Chromosom II, auf dem *ast-1* liegt, hilfreich. Ein solcher GFP-Marker ist *mIs12*, dessen Expression im 4-Zellstadium des Embryos beginnt und der sehr stark in den Muskelzellen des Pharynx exprimiert wird. Es wurden Tiere generiert, die *mIs12* in trans zu *hd92* trugen. Die Nachkommen eines solchen Elterntieres, die keine Pharynx-Expression zeigten, waren leicht zu erkennen und homozygot für die Deletion *hd92*. Auf diese Weise konnten die winzigen Krüppellarven leichter gefunden werden.

Die kleinen Larven sahen auf Platten mit ausreichend Nahrung ausgehungert aus. Die Tiere konnten entweder keine Nahrung aufnehmen oder diese nicht verdauen. Die Morphologie aller Organe außer dem Pharynx sah in den Deletionstieren normal aus. Unter dem Lichtmikroskop waren allerdings deutlich morphologische Defekte des Pharynx sichtbar (Abb.19). Im Gegensatz zu Wildtyptieren, waren weder Isthmus, Metakorpus noch Prokorpus ausgebildet. Nur eine verkümmerte Pharynxstruktur war vorhanden mit einem erkennbaren Mahlorgan, dem Grinder. Die Deletionsmutanten starben, da sie keinen Mund besaßen, mit dem sie Nahrung aufnehmen konnten.

Um herauszufinden, ab welchem Zeitpunkt die Pharynxdifferenzierung gestört war, wurde die Embryonalentwicklung der Deletionsmutanten mit Hilfe von 4D-Aufnahmen untersucht (Abb.20). Diese Aufnahmen über einen Zeitraum von ungefähr vier Stunden wurden wie in Kapitel 4.2.4.7.2 beschrieben durchgeführt. Dabei wurde ersichtlich, dass sich die Pharynxvorläuferzellen in den Deletionsmutanten bis zum Kommastadium normal entwickelten. Bis zur Entwicklung zum Zweifachstadium findet in Wildtyptieren eine Elongation der Vorläuferzellen statt, die sich in Richtung anterior ausrichten und eine Verbindung mit der sensorischen Vertiefung eingehen, welche später den Mund bildet. Diese Verlängerung und Differenzierung kann in Deletionsmutaten nicht beobachtet

werden. Hier bleiben die Vorläuferzellen an derselben Position. AST-1 reguliert demnach einen späten Schritt in der Pharynxdifferenzierung.

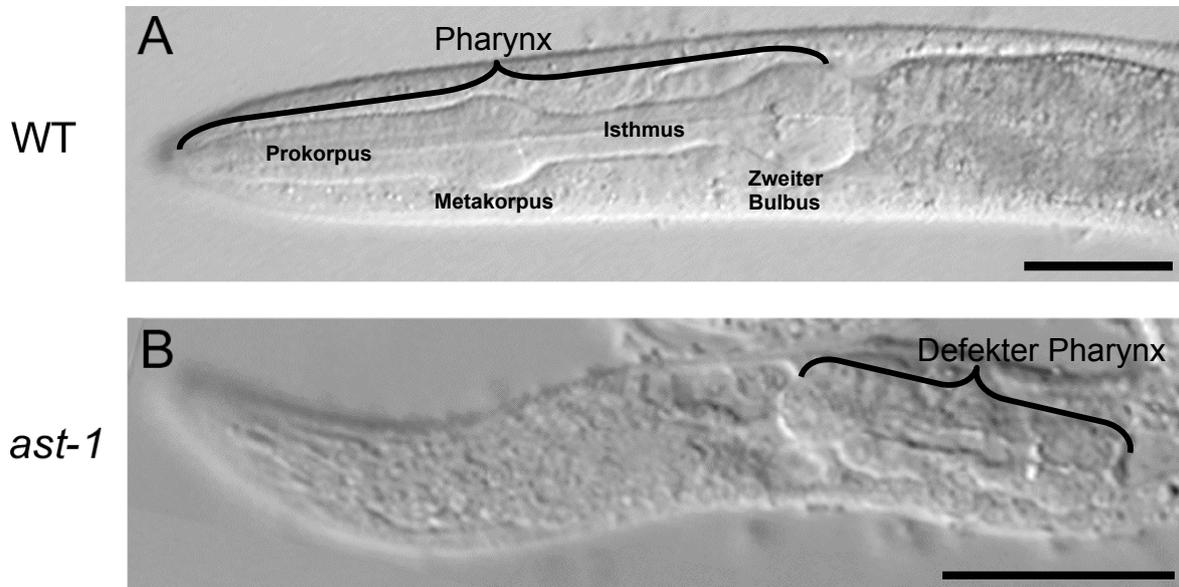


Abb.19: Pharynxdefekte der *ast-1(hd92)* Deletionsmutante

Der Pharynx in WT Tieren in Prokarpus, Metakarpus, Isthmus und Zweiten Bulbus strukturiert (A). Der Pharynx in *ast-1(hd92)* Tieren ist nicht ausgebildet (B). Die Klammer umschließt jeweils den Pharynx. Die Balken stellen 20µm dar.

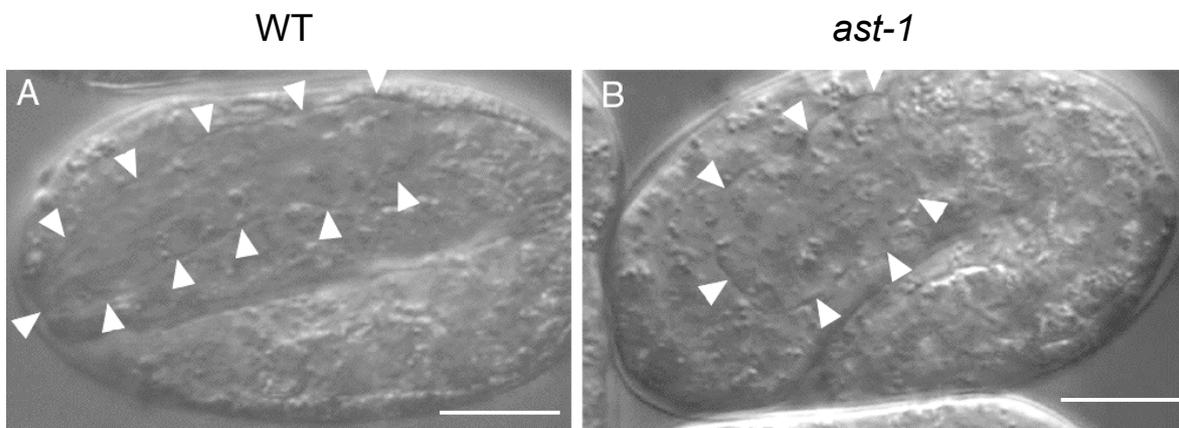


Abb.20: Zweifach-Stadium der *ast-1(hd92)* Deletionsmutante

Im Zweifach-Stadium ist der Pharynx eines Wildtypieres elongiert und bildet einen Mund (A). In *ast-1(hd92)* Tieren stoppt die Entwicklung des Pharynx in diesem Stadium (B). Die Pharynx-Vorläuferzellen wandern und differenzieren sich nicht weiter. Der Pharynx ist mit Pfeilspitzen markiert. Die Balken stellen 10 µm dar.

2.5.3 Untersuchung der Interneurone von *ast-1(hd92)*

Um die Interneurone des Motorschaltkreises untersuchen zu können, wurde der *glr-1::GFP* Marker in die heterozygoten Deletionstiere hineingekreuzt. Die Aufnahmen am konfokalen Mikroskop zeigen, dass in Wildtypieren die Zellkörper der Interneurone und der anderen

Kopfneurone um den Isthmus des Pharynx herum plaziert sind (Abb.21). Hingegen sind sie in *hd92* Mutanten in einem lockeren Verbund und wesentlich weiter anterior angesiedelt. Es fehlt der Nervenring, der aus den Axonen der Nervenzellen im Kopf besteht und normalerweise anterior zu den Interneuronzellkörpern liegt. Diese Mislokalisierung der Interneurone ist sehr wahrscheinlich auf das Fehlen eines normal differenzierten Pharynx zurückzuführen.

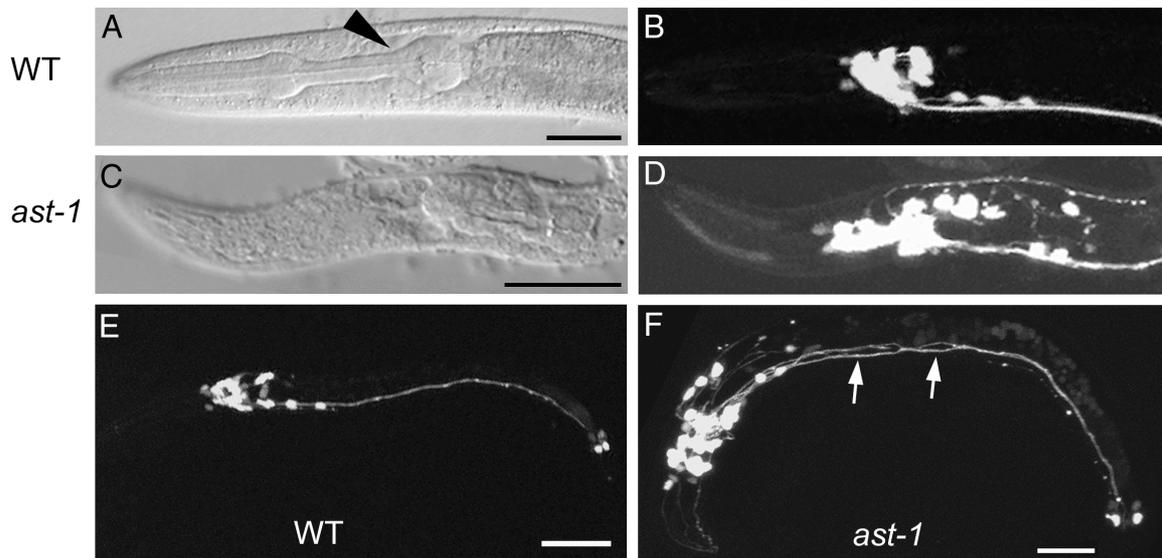


Abb.21: Die Interneurone in der *ast-1(hd92)* Deletionsmutante

Die *glr-1::gfp* exprimierenden Interneuronzellkörper liegen in WT Würmern anterior des zweiten Bulbus um den Isthmus (Pfeilspitze) herum (A, B). In der Deletionsmutante liegen diese Zellkörper ungeordnet weiter anterior (C, D). Der Ventralstrang stellt in L1 WT Tieren ein dichtes Bündel von Axonen dar (G), während in *ast-1(hd92)* Defaszikulierungen (Pfeile) zu sehen sind (H). Die Balken stellen 20 μ m dar.

Die meisten Axone erreichen in der Deletionsmutante dennoch den Ventralstrang und verlaufen in diesem bis in den Schwanz wie in WT Tieren. Das Nullallel, *ast-1(hd92)*, zeigt Auswuchsdefekte der Interneuronaxone, die vergleichbar sind mit denen in *ast-1(rh300)* Mutanten, die eine Punktmutation tragen. Sie kommen aber mit einer höheren Penetranz von 75% vor (n = 15), verglichen mit *ast-1(rh300)* Tiere (35%, n = 144). Die Fehlplatzierung der Zellkörper in der Deletionsmutante führt sicherlich zu einem zusätzlichen Problem für das gerichtete Auswachsen der Axone.

2.5.4 Expression von *ast-1(wt)* in der Deletionsmutante *ast-1(hd92)*

Das Einbringen einer Wildtyp *ast-1* DNS Kopie in die Deletionsmutante sollte erwartungsgemäß den larval-letalen Phänotyp retten. Das extrachromosomale DNS-Element *hdEx237* enthält das *ast-1(wt)* PCR Fragment I, das den Phänotyp in *ast-1(rh300)*

Mutanten gerettet hatte (siehe Kapitel 2.3.4). Dieses DNS-Element, das zusätzlich den *rol-6(su1006)* Marker trug, wurde in die Deletionsmutante gekreuzt und transgene Nachkommen konnten anhand der Roller-Tiere identifiziert werden. Roller-Tiere wurden vereinzelt und die Nachkommen derer, bei denen die Deletion anhand einer PCR nachgewiesen werden konnte, untersucht. Es gab Kulturplatten auf denen nur die transgenen Roller-Tiere gewachsen waren. Dies war zu erwarten bei Tieren, die die Deletion homozygot besaßen. Denn nur Roller-Tiere besaßen das rettende DNS-Element mit dem *ast-1(wt)* Gen. Nicht-Roller, ohne die *ast-1(wt)* DNS Kopie, starben als Larven. Die Axone der Roller waren normal ausgewachsen und zeigten keine Defekte (n = 60). Es konnte somit bestätigt werden, dass die Defekte in *ast-1(hd92)* Deletionsmutanten durch die Deletion in *ast-1* verursacht wurden.

2.6 Expressionsanalyse von *ast-1*

2.6.1 Herstellung der *ast-1* Reporter-Konstrukte

Es wurden verschiedene YFP-Reporter Konstrukte kloniert, um das Expressionsmuster von *ast-1* zu untersuchen. Als erstes wurde *yfp* unter die Kontrolle der putativen regulatorischen Region von *ast-1* gestellt. Die 2,5 kb große Promotorregion war in dem Rettungsexperiment mit dem Verdau-Fragment des Cosmids H37P12 ausreichend um den axonalen Phänotyp zu retten (s. Kapitel 2.2.4). Das zweite Expressionskonstrukt beinhaltete die gesamte genomische Gensequenz ab dem zweiten Intron, die C-terminal an *yfp* fusioniert wurde. Damit sollte überprüft werden, ob, wie es in Genen von Transkriptionsfaktoren häufig vorkommt, regulatorische Elemente in den Introns liegen. Zudem war eine zweite Spleißvariante vorhergesagt worden (Kapitel 2.4), deren Existenz festgestellt werden sollte. Als drittes wurde die Promotorregion und die gesamte genomische Region von *ast-1* in einen Vektor kloniert, wobei *yfp* an den C-Terminus von *ast-1* fusioniert war. Mit diesen Konstrukten wurden mehrere unabhängige transgene Linien hergestellt (Kapitel 4.2.4.3), die für die Expressionsanalyse verwendet wurden.

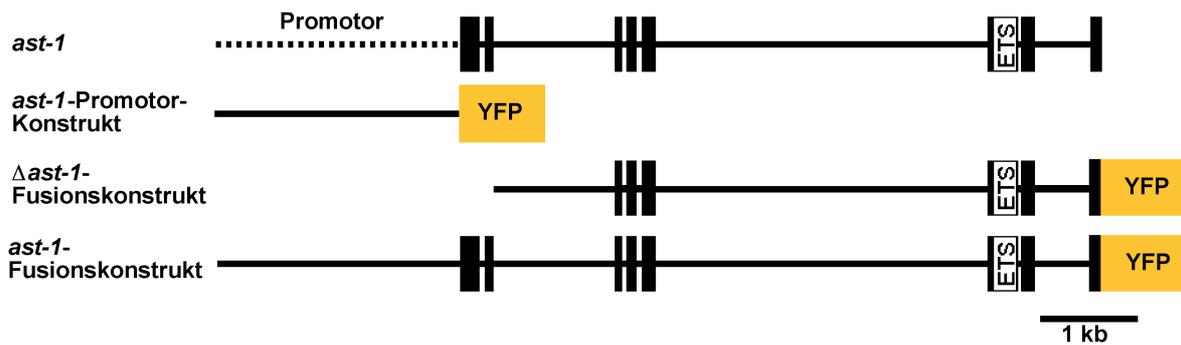


Abb.22: Expressionskonstrukte für *ast-1*

Schematische Darstellung des *ast-1* Genlokus, sowie der drei verschiedenen Reporterkonstrukte. Das Promotor::*yfp* Konstrukt enthält 2,5 kb Promotorregion. Das Δ *ast-1*-Fusionskonstrukt beginnt im zweiten Intron und das *yfp* wurde dem Leseraster entsprechend angeschlossen. Das *ast-1*-Fusionskonstrukt umfasst eine 2,5 kb Promotorregion, gefolgt von der genomischen Sequenz von *ast-1* fusioniert an *yfp*.

2.6.2 Das Expressionsmuster des Promotor-Konstrukts

Die Expression des Reportergens *yfp* beginnt im Komma-Stadium in den sensorischen Neuronen im Kopf (Abb.23A). Diese bilden Fortsätze in Richtung anterior aus, um später als Sensilla an der vorderen Spitze des Kopfes zu funktionieren. Sie besitzen ihre Endigung am Mund, wo sie sensorische Reize aufnehmen und an andere Neurone (vor allem Interneurone) weitergeben. Im Querschnitt zeigen die Zellen eine 6-fache Symmetrie-Anordnung, die darauf hindeutet, dass es sich um die inneren Labial-Neuronen handelt. Diese sind als einzige radial in sechs Zellpaaren angeordnet. Das während des 1,5-fach Stadiums beobachtete Signal von *yfp* exprimierenden Zellen wurde mit elektronenmikroskopischen Aufnahmen von Sulston et al. (1983) verglichen. Dieser Vergleich bestärkt die Annahme, dass es sich bei den *yfp* exprimierenden Zellen um die inneren Labial-Neuronen handelt. Die *yfp* Expression in den sensorischen Neuronen hält bis zum 3-fach Stadium an. Die Expression wird während der weiteren Embryonalentwicklung schwächer und ist in den Larven nur noch in einem einzigen Neuronenpaar zu beobachten, wobei sich die Zellkörper jeweils rechts und links neben dem Isthmus des Pharynx befinden (Abb.23C). Im adulten Tier ist keine Expression mehr zu entdecken.

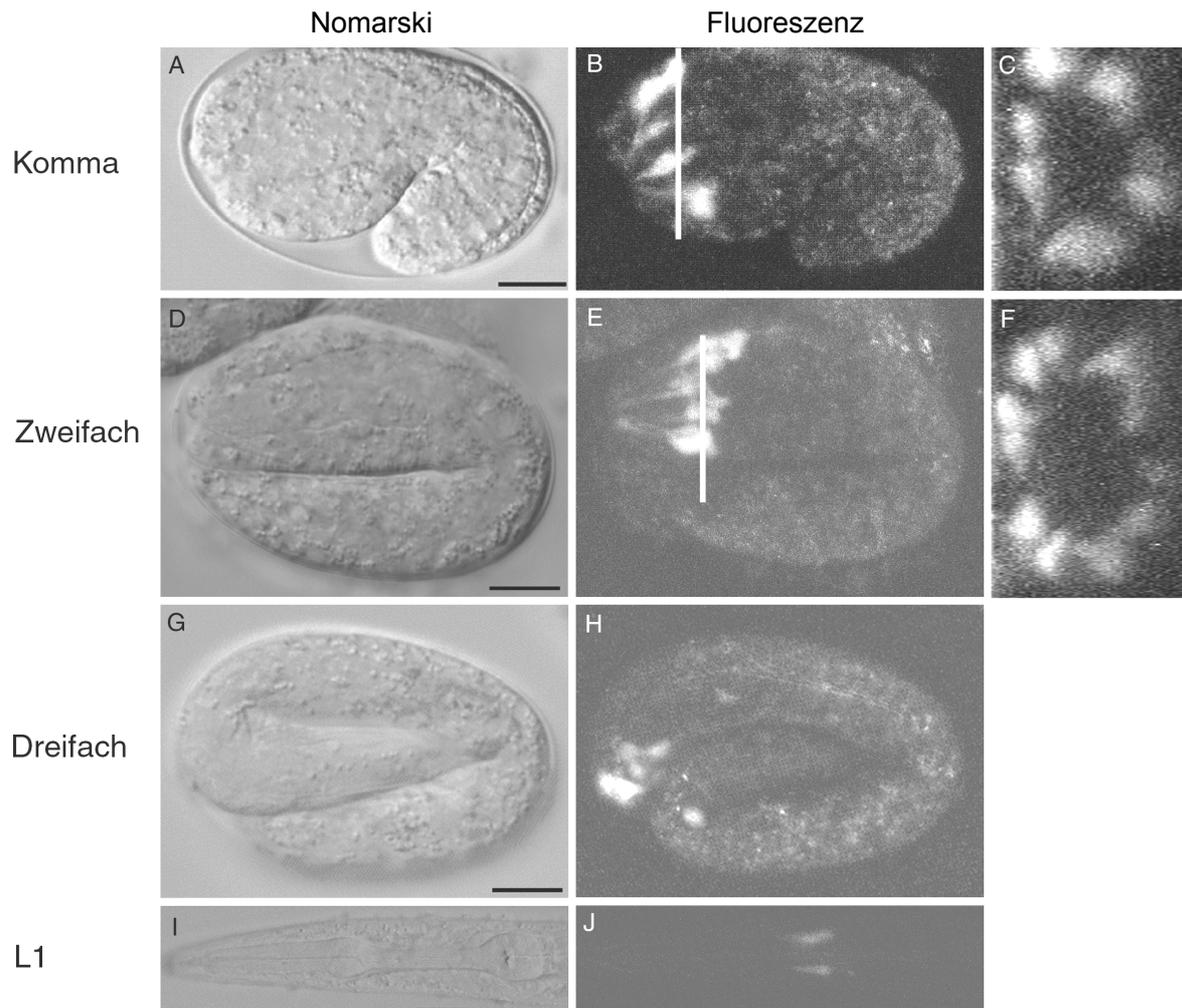


Abb.23: Expression des Promotor::*yfp* Reportergens

Die Expression beginnt in den sensorischen Neuronen im Komma-Stadium (A,B). Ein Querschnitt zeigt die sechsfache Symmetrie der inneren Labialneurone (C). Im Zweifach-Stadium sind die Fortsätze der sensorischen Neurone zur Nase hin erkennbar (D,E). Im Querschnitt sind die einzelnen Zellen der sechs Labialneuronenpaare zu sehen (F). Die Expression in den sensorischen Neuronen hält an bis zum Dreifach-Stadium (G,H) und nimmt dann ab. In L1 Larven exprimieren nur noch zwei Neurone im Kopf *yfp* (I,J). Der Balken stellt 10 μm dar.

2.6.3 Das Expressionsmuster des $\Delta\text{ast-1}::yfp$ -Fusionskonstrukts

Die Expression des $\Delta\text{ast-1}::yfp$ beginnt ebenfalls im Komma-Stadium, allerdings punktiert und wesentlich schwächer als in Tieren, die das Promotor-Konstrukt besitzen (Abb.24A). Die markierten Zellen liegen anterior in der Kopfregion und besitzen Fortsätze, die in Richtung der Kopfspitze verlaufen. Dies spricht dafür, dass es sich auch hier um sensorische Neurone handelt. Die *yfp* Expression nimmt während der Entwicklung zu. Im Dreifach-Stadium exprimieren einige Neurone in der Kopfregion *yfp* (Abb.24B). Die stärkste Expression ist hier und in frisch geschlüpften L1 Larven sichtbar (Abb.24C). Die exprimierenden Zellen liegen in den Larven in dem Bereich, wo die Nervenzellkörper der

Kopfganglien liegen. Innerhalb der Nervenzelle zeigt YFP eine punktierte, ungleichmäßige Verteilung. Die subzelluläre Lokalisation dieses Proteins ist unklar.

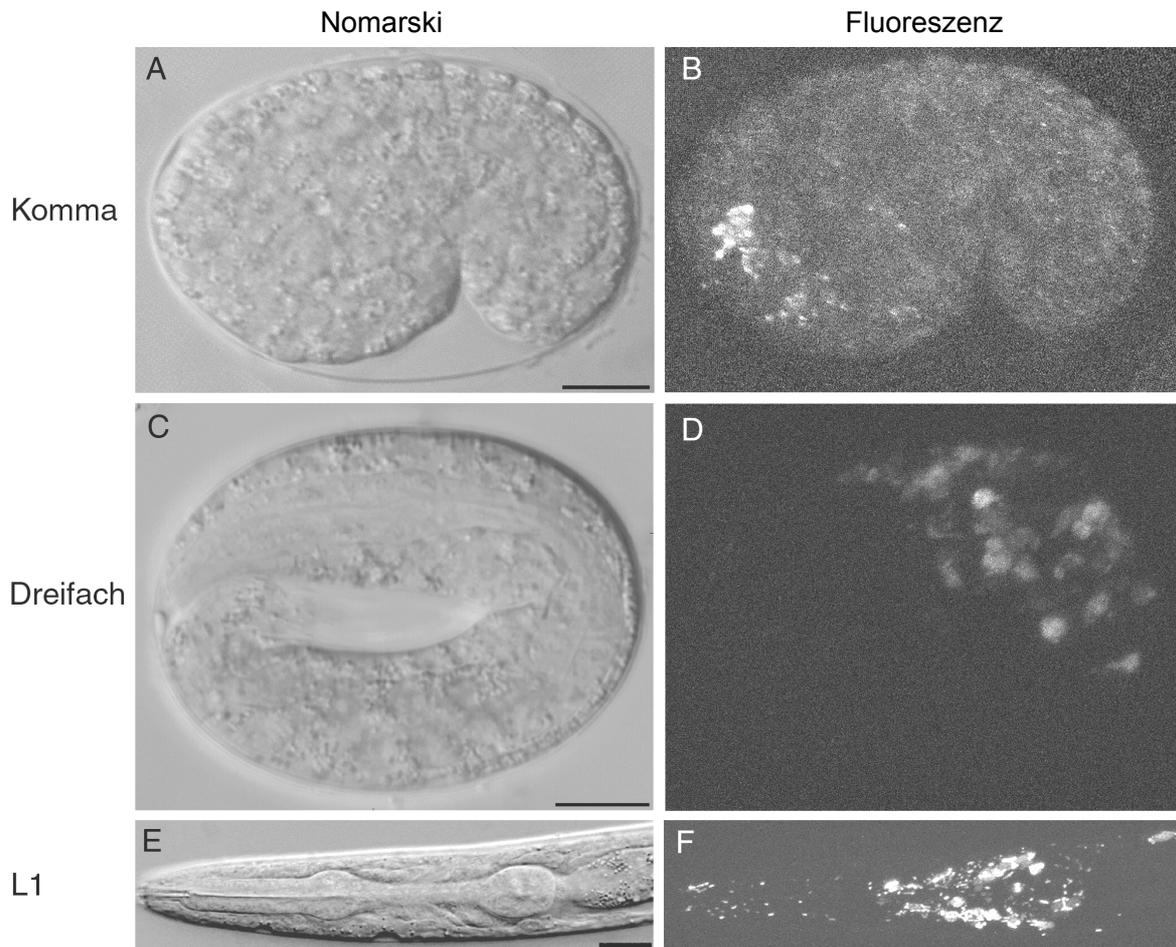


Abb.24: Expression des $\Delta ast-1$ -Fusionskonstrukts

Im Komma-Stadium zeigt die Expression in den sensorischen Neuronen ein punktiertes YFP Signal (A,B). Im Dreifach-Stadium wird das Fusionsprotein in vielen Kopfneuronen synthetisiert (C,D). L1 Larven exprimieren das $\Delta ast-1$ Reporterkonstrukt in einer Vielzahl von Kopfneuronen, wo jeweils einzelne Punkte in den Nervenfortsätzen zu erkennen sind (E,F). Der Balken stellt 10 μm dar.

2.6.4 Das Expressionsmuster des *ast-1*-Fusionskonstrukts

Die Expression des Promotor-*ast-1::yfp* beginnt früher als mit den anderen Reporterkonstrukten in der zweiten Hälfte der Embryogenese mit dem Beginn der Elongation (Abb.25B). *ast-1* wird in den sensorischen Neuronen exprimiert, wie auch mit den anderen beiden Reportern beobachtet. Aber es exprimieren zudem Interneurone *ast-1::yfp*. Dieses Ergebnis paßt sehr gut zu den Interneuronddefekten in den *ast-1* Mutanten. *ast-1::yfp* ist besonders stark in den Zellkernen lokalisiert, was dafür spricht, dass *ast-1* als transkriptioneller Regulator agiert. Interessanterweise verändert sich die Lokalisation des Fusionsproteins während der Entwicklung. Es kann mit zunehmender Entwicklung mehr

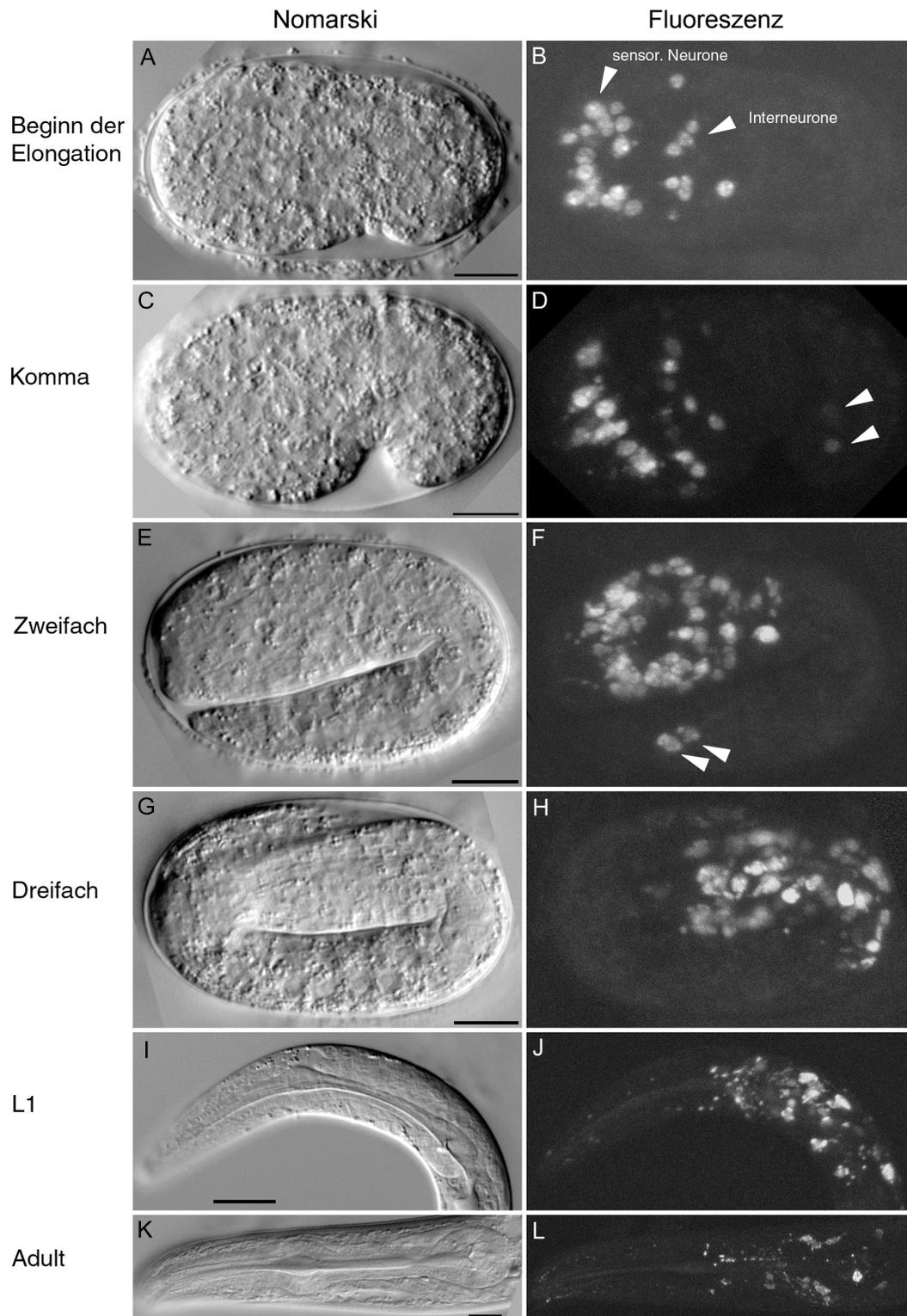


Abb.25: Expression des Promotor-*ast-1*-Fusionskonstrukts

Die Expression beginnt während der Elongation in sensorischen Neuronen und Interneuronen (A,B Pfeilspitzen). Das Fusionsprotein liegt im Kern vor, wie für einen Transkriptionsfaktor erwartet. Im Komma-Stadium beginnt zusätzlich die Expression in zwei Neuronen im Schwanz (C,D Pfeilspitzen). Die Anzahl der Kopfneurone, die das Reporter gen exprimieren, steigt in der weiteren Entwicklung zum Zweifach-Stadium (E,F) und Dreifach-Stadium (G,H). Anschließend sinkt die Anzahl der exprimierenden Neurone. In L1 Larven exprimieren einige Neurone im Kopfganglion und im Pharynx das Fusionsprotein (I,J), während in adulten Tieren nur noch wenige Neurone exprimieren (K,L). Ab dem Dreifach-Stadium ist mehr und mehr Fusionsprotein außerhalb des Zellkern in einem punktierten Muster zu sehen. Der Balken stellt 10 μ m dar.

Signal ausserhalb des Zellkerns erkannt werden. Aus welchen Gründen die Lokalisation nicht auf den Zellkern beschränkt ist, ist nicht klar. Bemerkenswert ist in diesem Zusammenhang, dass *ast-1* keine typische NLS (Kalderon et al., 1983) in seiner Primärsequenz besitzt.

Während die Entwicklung des Embryos fortschreitet, wird *ast-1* in einer zunehmenden Anzahl von Nervenzellen exprimiert (Abb.25F, H). Im Komma- und Zweifach-Stadium wird *ast-1* transient in einem Zellpaar im Schwanz exprimiert. Im Dreifach-Stadium ist *ast-1* in einer Vielzahl von Neuronen im Kopfganglion sichtbar. Die Expression wird kontinuierlich schwächer während der Entwicklung vom L1 zum L3 Larvenstadium. Die *ast-1* Expression konnte in wenigen Neuronen in Kopf und Pharynx durch den gesamten Lebenszyklus hindurch festgestellt werden.

Das Promotor-*ast-1*-Fusionskonstrukt wird wie erwartet am frühesten exprimiert und beinhaltet die meisten Zellen im Vergleich zu den beiden anderen Konstrukten. Es zeigt ein komplettes Expressionsmuster und vereinigt dabei die Expressionsmuster des Promotor-Konstrukts und des Δ *ast-1*-Fusionskonstrukts. Daraus lässt sich schließen, dass regulatorische Elemente in den Introns des *ast-1* Genlokus vorhanden sind.

Im Vergleich der drei *ast-1*-Expressionskonstrukte zeigte das Promotor-Konstrukt eine frühe Expression, während das Δ *ast-1::yfp*-Konstrukt für eine spätere Expression in den Neuronen verantwortlich war. Der Bereich stromaufwärts des Start-ATG besitzt demnach regulatorischen Elemente für die frühe Expression in sensorischen Neuronen, während die Introns regulatorische Elemente besitzen, die zur späteren Expression von *ast-1* in Interneuronen beitragen.

2.6.5 Expression von *ast-1* in Wildtyptieren und *ast-1(rh300)* Mutanten

In den folgenden Experimenten wurden die drei Reportergene und eine Cosmid-Mischung sowohl in Wildtyptieren, wie auch in *ast-1(rh300)* Mutanten exprimiert. Dabei wurden die Interneurone mit dem *glr-1::GFP* Marker auf axonale Defekte untersucht.

Die Expression des *ast-1*-Promotorkonstruktes verursacht erwartungsgemäß keine axonalen Defekte in Wildtyptieren und führt zu keiner Reduzierung der axonalen Auswuchsdefekte in der *ast-1(rh300)* Mutante (Tab.4). Hingegen verursacht die Expression des Δ *ast-1*-Fusionsgens axonale Defekte. In 18% der Tiere sind Axone im Ventralstrang nicht faszikuliert. Die Expression des *ast-1*-Fusionsgens führt ebenfalls zu sogar noch stärkeren

Defekten in Wildtyptieren. Dies bedeutet, dass eine Überexpression des Transkriptionsfaktors AST-1 zu einem axonalen Phänotyp führt, der mit dem in *ast-1* Punktmutanten vergleichbar ist. Die Cosmid-Mischung F enthält die Sequenz des *ast-1* Gens und hat in den Kartierungsexperimenten den axonalen Phänotyp der *ast-1(rh300)* Mutante gerettet (Tab.4). Die Expression dieser Cosmide in Wildtyptieren führt zu keinen signifikanten Fehlern beim Auswachsen der Interneuronaxone, im Gegensatz zur Expression des *ast-1*-Fusionsgens. In den transgenen Cosmid-Linien ist die Anzahl der *ast-1* Genkopien sehr wahrscheinlich niedriger, als in den transgenen Linien, die das *ast-1*-Fusionsgen besitzen. In der Injektionslösung der Cosmid-Mischung (2 ng/μl) lagen 22 mal weniger *ast-1* Genkopien vor, verglichen mit der Injektionslösung des *ast-1*-Fusionsgens (8 ng/μl). Man kann zwar nicht mit Gewißheit sagen, aus wievielen Kopien sich das transgene DNS-Element zusammensetzt, aber es ist legitim eine Tendenz anzunehmen. Die Gendosis spielt demnach, wie man für einen Transkriptionsfaktor erwarten kann, eine wichtige Rolle. Die Expression der Δ *ast-1*- und *ast-1*-Fusionsgene in *ast-1(rh300)* Mutanten führt zu keiner wesentlichen Reduzierung der Anzahl an Tieren mit fehlerhaft auswachsenden Axonen. Die Ursache dafür ist wahrscheinlich eine Überexpression der Fusionsgene.

	WT		<i>ast-1(rh300)</i>	
	Defaszikulierung im Ventralstrang [%]	lateral verlaufendes Axon [%]	Defaszikulierung im Ventralstrang [%]	lateral verlaufendes Axon [%]
<i>ast-1</i> -Promotor	1 n = 69	1	36 n = 75	14
Δ <i>ast-1</i> -Fusion	18 n = 98	4	28 n = 70	25
<i>ast-1</i> - Fusion	29 n = 65	9	24 n = 97	13
Cosmid Mischung F	6 n = 123	3	9 n = 56	5

Tab.4: Axonale Defekte in transgenen Linien, die *ast-1* exprimieren

Die *ast-1* Reportergene und die Cosmid-Mischung F wurden in Wildtyptieren und in *ast-1(rh300)* Mutanten exprimiert. In den transgenen Tieren wurden die Interneurone mit dem *glr-1::gfp* Marker auf axonale Defekte untersucht. n ist die Gesamtzahl der analysierten Tiere.

2.7 Interaktion von *ast-1* mit Genen, die am Auswachsen von Axonen beteiligt sind

Ob *ast-1* zusammen mit bereits bekannten Genen in einen gemeinsamen funktionellen Weg einmündet, ließ sich durch das Studium von Doppelmutanten ermitteln. Dabei stellte sich die Frage, ob die Doppelmutanten additive Defekte aufweisen, ob sich die Defekte verstärken oder ob qualitativ andere Defekte auftreten. Entsprechend konnten Rückschlüsse gezogen werden, ob die Gene bei einem Aspekt der axonalen Wegfindung zusammen oder unabhängig voneinander wirken. In diesem Zusammenhang waren Kombinationen mit Mutanten in Signalmolekülen wie UNC-6/Netrin und in deren Rezeptoren wie UNC-5 und UNC-40/DCC von Interesse. Es wurden Mitglieder der Netrin-Familie, der Slit-Familie und Nidogen in Doppelmutantenanalysen untersucht. Zudem waren Kombinationen mit putativen Mediatoren zum Zytoskelett wie das Aktin regulierende Protein UNC-34/ENA, aber auch Kombinationen mit anderen Transkriptionsfaktoren wie ZAG-1 und LIN-11, die in der Regulation des Auswachsens der Axone eine wichtige Rolle spielen, untersuchenswert.

Um Doppelmutanten herzustellen, wurde *ast-1* an *rol-6(e187)* gekoppelt mit der jeweiligen Mutante gekreuzt. So war es möglich zuerst nach Rollern zu selektieren, die leicht zu identifizieren waren und erst anschließend nach axonalen Defekten zu suchen um *ast-1(rh300)* zu bestätigen. In der F1 Generation waren die vereinzelt Tiere heterozygot für beide Mutationen. In der F2 Generation wurde dann nach Rollern gesucht, die ebenfalls die zweite Mutation besaßen. Viele der getesteten Mutanten zeigten wie *ast-1(rh300)* Ventralstrangdefaszikulierung, weshalb es notwendig war, einen für die zweite Mutation ganz spezifischen Aspekt des Phänotyps zu finden, der in *ast-1* Mutanten nicht vorkam. Bei manchen Mutationen, beispielsweise *unc-6*, war dies einfach, denn die bewegungseingeschränkten Würmer waren leicht zu identifizieren. Die Deletion in *slt-1* Mutanten wurde über eine PCR nachgewiesen. Zur vergleichbaren Analyse der Interneurone besaßen alle Einzel- und Doppelmutanten *glr-1::gfp*, sowie den Roller-Maker *rol-4(e187)*.

Wenn zwei Gene ausschließlich im selben Signalweg agieren, sollte die Doppelmutante einen ähnlichen Phänotyp besitzen wie die stärkste Einzelmutante. Ist der Phänotyp in der Doppelmutante wesentlich stärker als für eine unabhängige Aktion erwartet, dann wirken die getesteten Gene synergistisch. Eine genauere Beschreibung der statistischen Auswertung befindet sich im Methodenkapitel 4.2.4.3.

2.7.1 *Ast-1* und die Transkriptionsfaktoren ZAG-1 und LIN-11

Es wurde beschrieben, dass ETS Transkriptionsfaktoren mit einer Reihe von anderen Transkriptionsfaktoren interagieren um die Expression von Genen zu regulieren. Deshalb waren Transkriptionsfaktoren, deren Mutanten ähnliche Phänotypen wie *ast-1* zeigten, besonders interessant für die Analyse von Doppelmutanten. Neben *ast-1* wurden in unserem Screen Mutanten für zwei weitere Transkriptionsfaktoren isoliert, und zwar *lin-11* und *zag-1*. Der LIM-Homeobox-Transkriptionsfaktor LIN-11 kontrolliert Aspekte der neuronalen Differenzierung (Hobert et al., 1998; Sarafi-Reinach et al., 2001). Besonders hervorzuheben ist hierbei, dass *lin-11* für die Differenzierung des AVG Neurons notwendig ist, dessen Axon als Pionier in den Ventralstrang auswächst. ZAG-1 ist ein Zink-Finger-Homeobox-Transkriptionsfaktor und spielt ebenfalls bei der neuronalen Differenzierung eine wichtige Rolle, zudem beim gerichteten Auswachsen von Axonen (Wacker et al., 2003; Clark und Chiu, 2003).

Die Zahl der Tiere, bei denen Axone die Mittellinie kreuzten, war in der *ast-1(rh300); zag-1(rh315)* Doppelmutante genauso hoch wie in der *zag-1* Mutante alleine (Abb.26). Die Penetranz der Defekte in der Doppelmutante war also vergleichbar mit den Defekten in der stärkeren Mutante. Dementsprechend agieren *ast-1* und *zag-1* abhängig voneinander. Entweder regulieren sich die beiden Gene direkt gegenseitig, oder sie regulieren gemeinsam die Expression von Zielgenen.

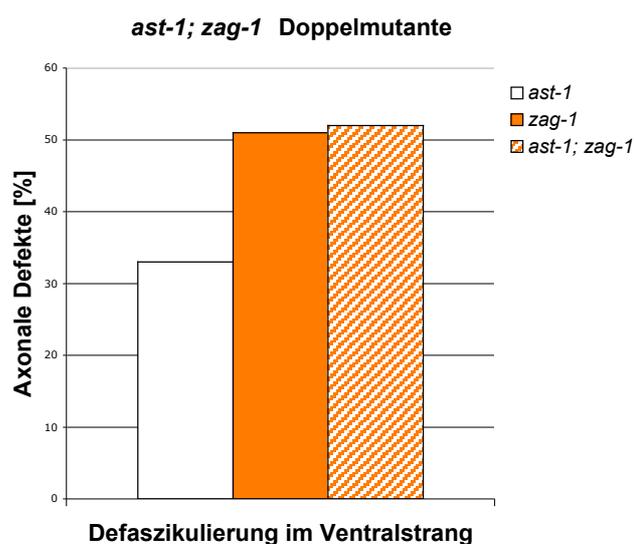


Abb.26: Auswuchsdefekte der Interneuronaxone in der *ast-1(rh300); zag-1(rh315)* Doppelmutante
Tiere mit dem *glr-1::gfp* Reportergen wurden auf axonale Defekte hin untersucht. Die Anzahl der analysierten Tiere war n. n(*ast-1*) = 67; n(*zag-1*) = 73; n(*ast-1; zag-1*) = 75

Lin-11 Mutanten zeigten stärkere axonale Defekte als *ast-1(rh300)*, d. h. es waren in 62% aller Tiere die Interneuronaxone betroffen und oft verliefen mehrere Axone falsch (Abb.27). In der Doppelmutante waren die axonalen Defekte der Interneurone kaum höher. Eine Defaszikulierung des Ventralstranges wurde in 66% der *lin-11; ast-1* Doppelmutanten beobachtet. Die Anzahl der Tiere mit einem fehlerhaften lateral verlaufenden Axon bewegte sich in den Einzel- und Doppelmutanten im selben Bereich zwischen 6% und 10%. Der Phänotyp der Doppelmutante entsprach also dem der stärkeren *lin-11* Mutante. Die beiden Transkriptionsfaktoren *ast-1* und *lin-11* regulieren sich entweder direkt oder sie steuern zusammen die Expression von Genen, die am gerichteten Auswachsen von Axonen beteiligt sind.

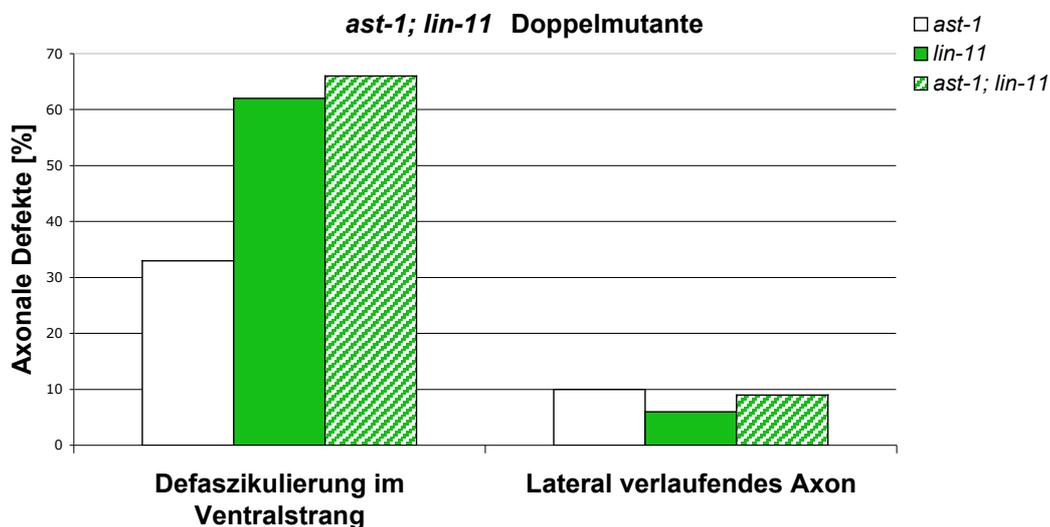


Abb.27: Auswachsdefekte der Interneuronaxone in der *ast-1(rh300); lin-11(n389)* Doppelmutante
Tiere mit dem *glr-1::gfp* Reportergen wurden auf axonale Defekte hin untersucht. In den Einzel- und Doppelmutanten wurden Faszikulierungsdefekte im Ventralstrang und lateral verlaufende Axone ausgezählt. Die Anzahl der analysierten Tiere war n. n(*ast-1*) = 67; n(*lin-11*) = 47; n(*ast-1; lin-11*) = 56

2.7.2 *Lin-11*- und *zag-1*-Reportergene in *ast-1(rh300)* Mutanten

Wie die Doppelmutanten-Untersuchung von *ast-1* sowohl mit *lin-11* als auch mit *zag-1* zeigte, interagiert *ast-1* mit den beiden Genen. Eine Expressionsanalyse der *lin-11* und *zag-1*-Reporter in *ast-1(rh300)* Mutanten kann Aufschluß darüber geben, ob *ast-1* die Expression von *lin-11* bzw. *zag-1* steuert.

Das *zag-1*-Promotor-*yfp*-Konstrukt *hdIs21* wird besonders stark während der Embryonalentwicklung in Kopf- und Schwanzneuronen exprimiert (Wacker et al., 2003). Einfach analysierbare Aspekte dieses komplexen Expressionsmusters waren in *ast-1(rh300)*

Mutanten nicht verändert. Daher kann man annehmen, dass *ast-1* nicht die Expression von *zag-1* reguliert.

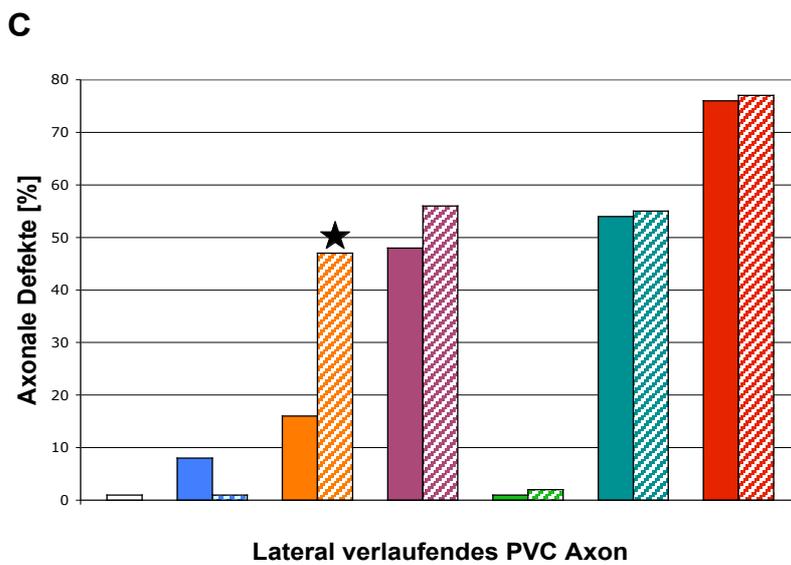
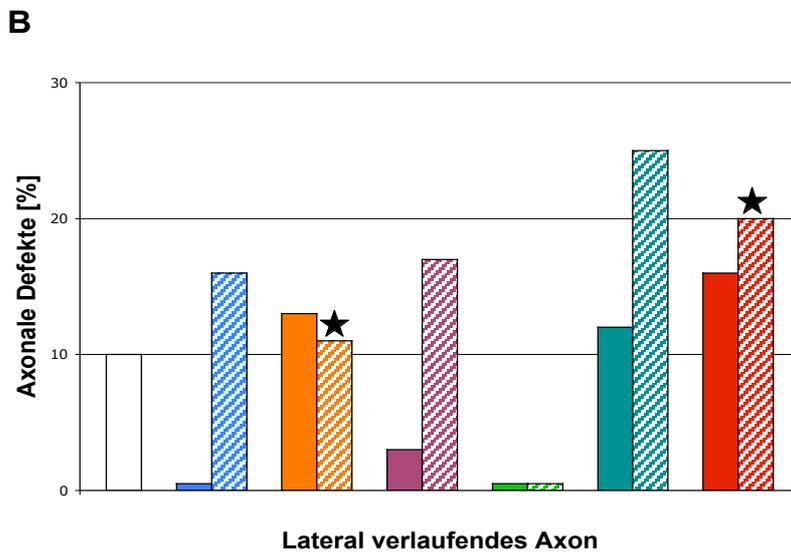
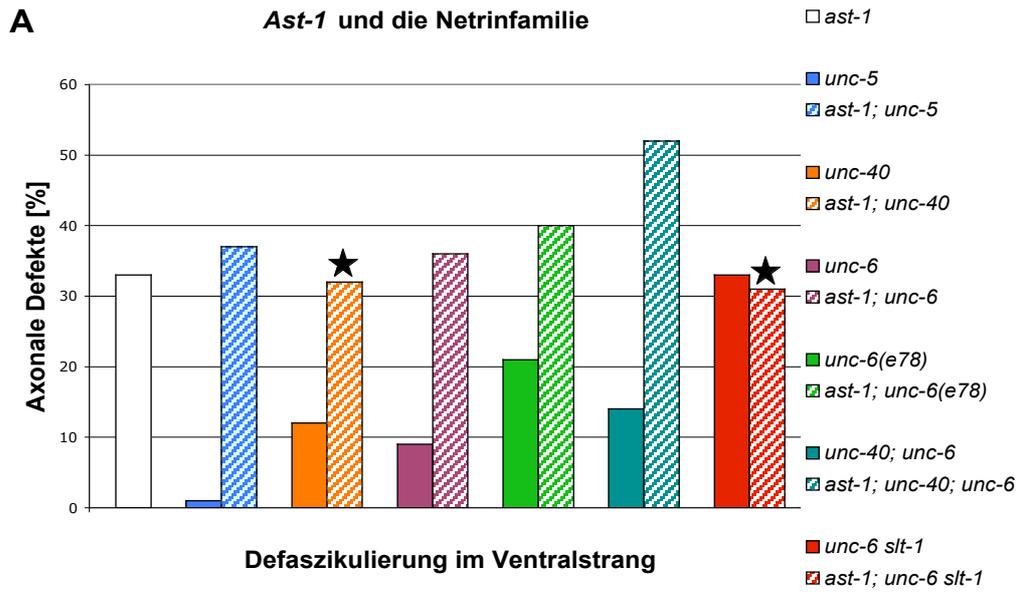
Es wurden mehrere *lin-11::gfp* Reportergene untersucht, die verschiedene Anteile der regulatorischen Sequenzen des *lin-11* Gens enthalten (Hobert et al., 1998). Der Marker *nIs96* (*plin-11::gfp*) wurde in der phänotypischen Analyse von *ast-1* Mutanten bereits beschrieben (Kapitel 2.). Mit diesem Konstrukt erhält man einen Ausschnitt des gesamten *lin-11*-Expressionsmusters, nämlich in der Vulva und den VC Motoneuronen. Das komplette Expressionsmuster erhält man mit Hilfe des Markers *mgIs21* (*plin-11ABCDE::gfp*). Der Marker *oyIs32* enthält alle regulatorischen Elemente, die für die neuronale Expression notwendig sind. Für keinen der drei Marker war die Expression in *ast-1*(*rh300*) Tieren verändert. Es konnte weder eine ektopische noch eine verringerte Expression beobachtet werden. *Ast-1* steuert demnach nicht die Expression von *lin-11*.

2.7.3 *Ast-1* und die Mitglieder der Netrinfamilie

Das sezernierte Protein UNC-6/Netrin und seine beiden Rezeptoren UNC-5 und UNC-40/DCC wurden als erste Moleküle, die das Auswachsen der Axone an der Mittellinie beeinflussen, genau beschrieben (Hedgecock et al., 1990). Es ist die Aufgabe von UNC-6, das Axonwachsen im Bezug auf die Mittellinie zu dirigieren (Wadsworth 2002). Abhängig von den Rezeptoren, die die auswachsenden Zellen und Axone besitzen, werden sie entweder von Netrin angezogen oder abgestoßen.

Abb.28: Auswuchsdefekte der Interneuronaxone (siehe Seite 59)

Um die Doppelmutanten mit *ast-1*(*rh300*) zu generieren, wurden nur Nullallele eingesetzt, außer der Allelname ist extra vermerkt (wie bei *unc-6*(*e78*)). Die *glr-1::gfp* exprimierenden Interneurone wurden auf axonale Defekte hin untersucht. In den Einzel- und Doppelmutanten wurden Faszikulierungsdefekte im Ventralstrang und lateral verlaufende Axone ausgezählt. Zudem wurden die PVC Axone gezählt, die fälschlicherweise lateral verliefen anstatt in den Ventralstrang einzumünden. Die Anzahl der analysierten Tiere war n. n(*ast-1*) = 67; n(*unc-6*(*ev400*)) = 65; n(*ast-1*; *unc-6*(*ev400*)) = 64; n(*unc-6*(*e78*)) = 58; n(*ast-1*; *unc-6*(*e78*)) = 87; n(*unc-5*(*e53*)) = 60; n(*ast-1*; *unc-5*(*e53*)) = 109; n(*unc-40*(*e271*)) = 67; n(*ast-1*; *unc-40*(*e271*)) = 144; n(*unc-40*(*e271*); *unc-6*(*ev400*)) = 153; n(*ast-1*; *unc-40*(*e271*); *unc-6*(*ev400*)) = 126; n(*unc-6*(*ev400*) *slt-1*(*eh15*)) = 76; n(*ast-1*; *unc-6*(*ev400*) *slt-1*(*eh15*)) = 87



★ = genetische Interaktion

Mit dem Netrin Rezeptor UNC-5 konnte keine Interaktion beobachtet werden. Aber der zweite Rezeptor UNC-40/DCC interagiert genetisch mit *ast-1*. In 12% der *unc-40(e271)* Mutanten kreuzten die Interneurone die Mittellinie (Abb.28A.). In der Doppelmutante waren es 32% und somit genauso viele wie in der *ast-1* Einzelmutante. Auch die Anzahl der Tiere, die ein lateral verlaufendes Axon besaßen, blieb in der Doppelmutante genauso hoch, wie in den *unc-40* und *ast-1* Einzelmutanten. Dieser epistatische Effekt zeigte, dass *ast-1* und *unc-40* abhängig voneinander agieren und in einem gemeinsamen Signalweg liegen. In 16% der *unc-40* Mutanten war das PVC Axon lateral ausgewachsen, anstatt in den Ventralstrang zu münden (Abb.28C). In der *ast-1; unc-40* Doppelmutante war die Häufigkeit dieser Defekte auf 47% erhöht (Erwartung: 16%), obwohl *ast-1* Mutanten alleine keinerlei Auswachs-defekte der PVC Axone zeigten.

UNC-6/Netrin ist der Ligand für den Rezeptor UNC-40. Es wurden das Nullallel *unc-6(ev400)* und das hypomorphe Allel *unc-6(e78)* untersucht, wobei in Bezug auf die Faszikulierungsdefekte im Ventralstrang das hypomorphe Allel mehr Defekte zeigte. Die Analyse der beiden Doppelmutanten läßt keinen eindeutigen Rückschluß zu, ob *ast-1* und *unc-6* interagieren. In allen analysierten Aspekten konnten weder signifikante synergistische noch epistatische Effekte gefunden werden.

In der *ast-1(rh300); unc-40(e271); unc-6(ev400)* Tripelmutante sind die axonalen Defekte ungefähr additiv. Dies zeigt, dass *ast-1* im Bezug auf die Defekte der Faszikulierung des Ventralstranges und der lateral verlaufenden Axone unabhängig von *unc-40; unc-6* agiert. In der *unc-40(e271); unc-6(ev400)* Doppelmutante verliefen in gleich viel Tieren eines oder beide PVC Axone lateral wie in der Tripelmutante (Abb.28C). Die Mutation in *ast-1(rh300)* hat hier die axonalen Defekte des PVC Axons nicht weiter verstärkt, im Gegensatz zur *ast-1; unc-40* Mutante.

Das Signalmolekül SLT-1 vermittelt eine Abstoßung der Axone von dorsal über den SAX-3/ROBO Rezeptor (Hao et al., 2001). SLT-1 und UNC-6 sind zwei der wichtigsten sezernierten Proteine für das axonale Auswachsen und wurden gleichzeitig ausgeschaltet. Sowohl in der *ast-1* Einzelmutante, wie auch in der *unc-6(ev400); slt-1(eh15)* Doppelmutante und der Tripelmutante, kreuzten in ungefähr 30% der Tiere Axone im Ventralstrang die Mittellinie (Abb.28A). Die Penetranz der lateral verlaufenden Interneurone war ebenfalls in allen drei Mutanten ungefähr gleich groß. Dies könnte bedeuten, dass *ast-1* mit einem der beiden Signalmoleküle im selben Signalweg agiert.

2.7.4 *Ast-1* und *sax-3*

In *C. elegans* ist SAX-3/ROBO der Rezeptor für den Liganden SLIT. Mutationen in *sax-3* führen dazu, dass Axone im Ventralstrang die Mittellinie kreuzen (Zallen et al. 1998). Außerdem wachsen manche Axone fälschlicher Weise in einer lateralen Position aus. Die Analyse der Axone ergab in der *sax-3(ky123)* Mutante 24% Tiere, bei denen der Ventralstrang defaszikuliert war. In *ast-1(hd1)* Mutanten sind es 33% der Tiere und in der Doppelmutante 52%. Die Defekte der Einzelmutanten und der Doppelmutante sind genau so, wie für eine unabhängige Funktion zu erwarten wäre (46% - 52% in der Doppelmutante). Entgegen unseren Erwartungen agieren die beiden Gene *ast-1* und *sax-3* unabhängig voneinander.

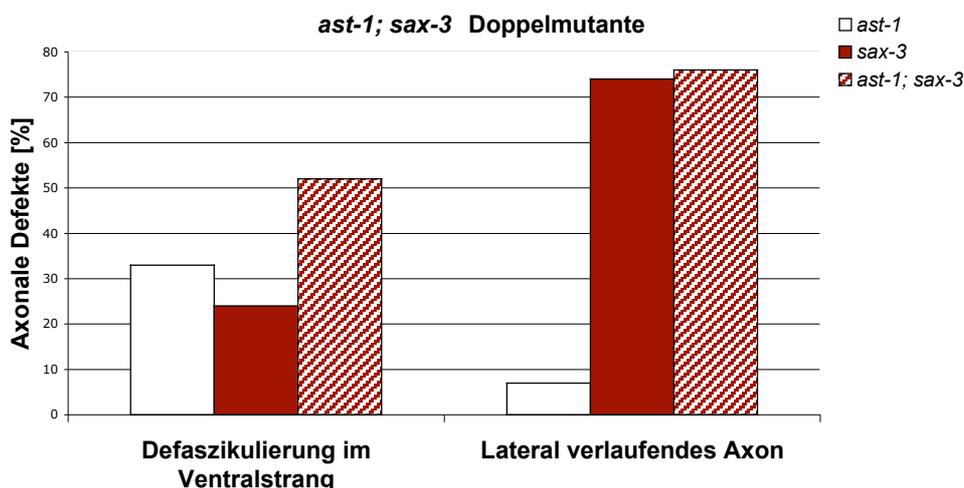


Abb.29: Auswuchsdefekte der Interneuronaxone in der *ast-1(hd1); sax-3(ky123)* Doppelmutante

Tiere mit dem *glr-1::gfp* Reportergen wurden auf axonale Defekte untersucht. Die Anzahl der analysierten Tiere war n. n(*ast-1*) = 67; n(*sax-3*) = 91; n(*ast-1; sax-3*) = 50

In einem weiteren Experiment wurde untersucht, ob *ast-1(hd1)* die embryonale Letalität von *sax-3(ky123)* erhöht. Dazu wurden von den Einzel- und Doppelmutanten jeweils die Nachkommen von acht L4 Larven untersucht. In *sax-3(ky123)* Mutanten starben 53% der Nachkommen im Embryonalstadium und 42% als Larven. In der Doppelmutante waren diese Werte entsprechend 50% und 42%. *ast-1* beeinflusst die embryonale Letalität von *sax-3* demnach nicht. Dies unterstützt die Aussage, dass beide Gene unabhängig voneinander wirken.

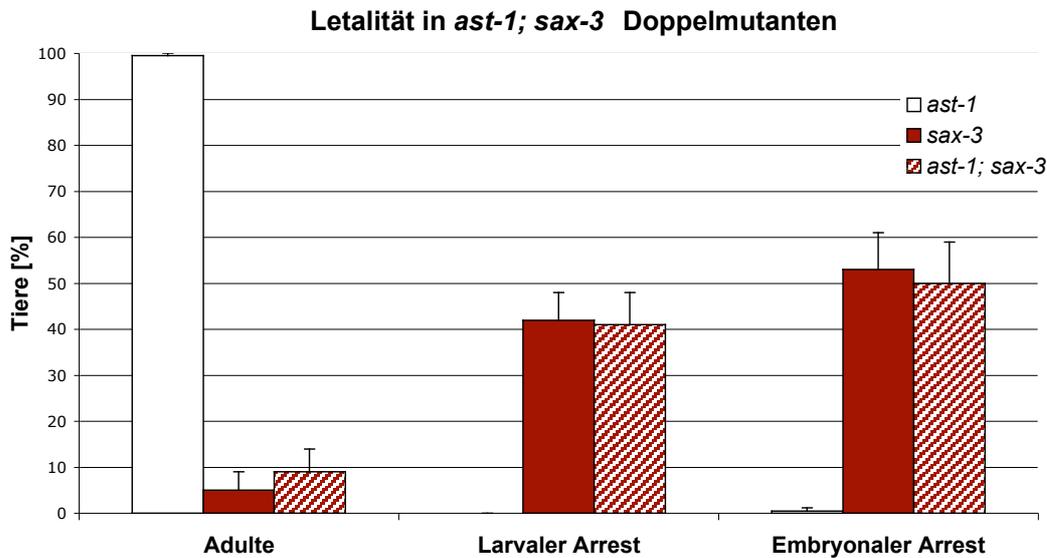


Abb.30: Embryonale Letalität der *ast-1(hd1)*; *sax-3(ky123)* Doppelmutante

Die Penetranz der mutanten Phänotypen wurde durch Vereinzeln von acht L4 Tieren des jeweiligen Stammes bestimmt. Die Tiere wurden jeden Tag auf neue Platten umgesetzt. Eier, die nach 48 Stunden noch nicht geschlüpft waren, wurden als embryonaler Arrest gezählt. Larven, die sich nach 72 Stunden noch nicht ins adulte Stadium entwickelt hatten, wurden als larvaler Arrest gezählt. Der prozentuale Anteil aller Nachkommen (n) an Adulten, verkrüppelten Larven und toten Embryonen wurde für jedes klonierte Individuum berechnet. Der Mittelwert aus den Einzelwerten aller zehn Elterntiere wird in dieser Graphik dargestellt (Fehlerbalken = Standardabweichung). Die durchschnittliche Anzahl der analysierten Nachkommen war n : $n(ast-1) = 210$; $n(sax-3) = 180$; $n(ast-1; sax-3) = 162$

2.7.5 *Ast-1* und das Aktin-regulierende Protein UNC-34/ENA

Die Proteine UNC-34 und das Drosophila Homolog ENABLED regulieren die Elongation der Aktinfilamente. Sie sind an der Abstoßung von auswachsenden Axonen durch Slits und Netrin beteiligt. Es wurde gezeigt, dass UNC-34 in der Signalweiterleitung unterhalb des Rezeptors für Netrin (UNC-40) und auch in Kooperation mit dem Rezeptor für SLIT (SAX-3) seine Funktion ausübt (Yu et al., 2002). Da *ast-1* wahrscheinlich in den Netrin-Signalweg eingreift (siehe letzter Abschnitt 2.7.3), war es interessant zu untersuchen, ob dies auch für *unc-34* der Fall ist. Die Defaszikulierungsdefekte im Ventralstrang waren in 26% der *unc-34* Mutanten vorhanden und in 33% der *ast-1(rh300)* Mutante. In der Doppelmutante hingegen kreuzte bei 79% der Tiere mindestens ein Axon in das linke Bündel des Ventralstranges. Dieser Wert liegt signifikant höher als für ein unabhängiges Agieren der beiden Gene voneinander erwartet werden konnte (50% in der Doppelmutante). In einem Drittel der *unc-34* Mutanten verliefen ein oder zwei Interneuronaxone lateral. In der *ast-1; unc-34* Doppelmutante war diese Zahl mit 71%

wesentlich höher als erwartet für ein unabhängiges Wirken (42% in der Doppelmutante). *Ast-1* und *unc-34* agieren demnach synergistisch in der Regulation des Auswachsens von Axonen.

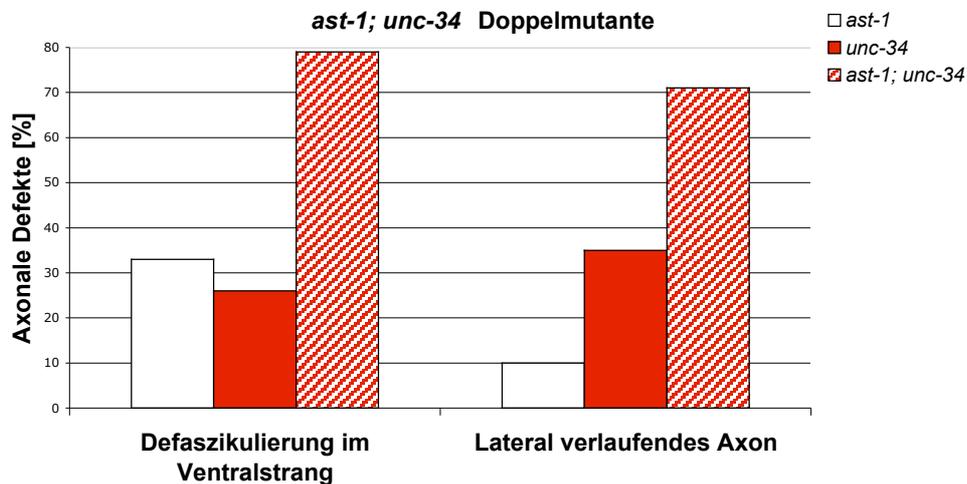


Abb.31: Auswachsdefekte der Interneuronaxone in der *ast-1(rh300); unc-34(e566)* Doppelmutante
Tiere mit dem *glr-1::gfp* Reportergen wurden auf axonale Defekte hin untersucht. In den Einzel- und Doppelmutanten wurden Faszikulierungsdefekte im Ventralstrang und lateral verlaufende Axone ausgezählt. Die Anzahl der analysierten Tiere war n. n(*ast-1*) = 67; n(*unc-34*) = 86; n(*ast-1; unc-34*) = 110

2.7.7 *Ast-1* und Nidogen

Nidogen ist eine strukturelle Komponente der Basalmembran und in *C. elegans* notwendig für die Führung von Axonen zur Mittellinie (Kim and Wadsworth, 2000). In 29% der *nid-1(ur41)* Mutanten kreuzten Axone die Mittellinie, vergleichbar mit *ast-1(rh300)* Mutanten. In 42% der Doppelmutanten war der Ventralstrang defaszikuliert. Für eine unabhängige Funktion der beiden Gene hätte die Penetranz zwischen 49% und 56% liegen müssen. Dies läßt darauf schliessen, dass *ast-1* und *nid-1* genetisch zusammen wirken.

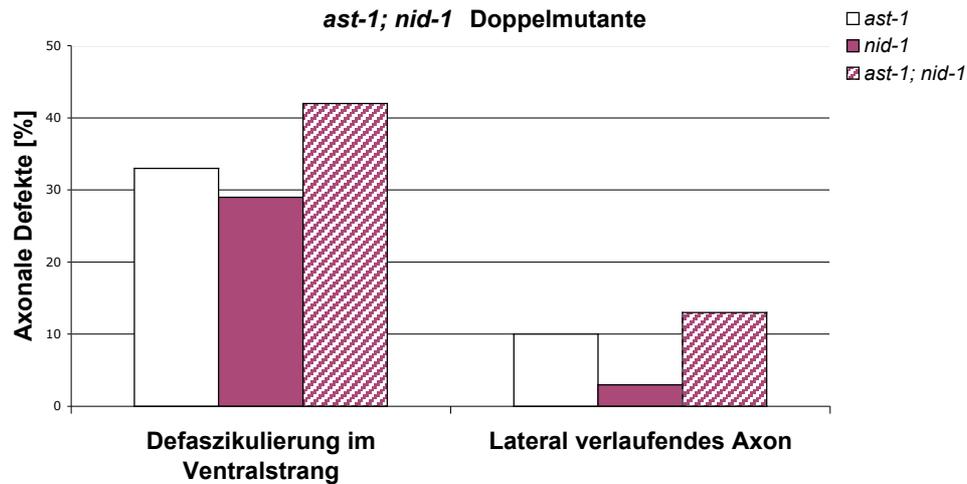


Abb.32: Auswuchsdefekte der Interneuronaxone in der *ast-1(rh300); nid-1(ur41)* Doppelmutante

Tiere mit dem *glr-1::gfp* Reportergen wurden auf axonale Defekte untersucht. In den Einzel- und Doppelmutanten wurden Faszikulierungsdefekte im Ventralstrang und lateral verlaufende Axone ausgezählt. Die Anzahl der analysierten Tiere war n. n(*ast-1*) = 67; n(*nid-1*) = 63; n(*ast-1; nid-1*) = 128

Zusammenfassend kann an dieser Stelle festgehalten werden, dass *ast-1* mit den beiden Transkriptionsfaktoren *zag-1* und *lin-11* genetisch interagiert. Zudem konnte gezeigt werden, dass *ast-1* synergistisch agiert mit *unc-40* (kodiert für einen Rezeptor für UNC-6/Netrin) und mit *unc-34*, das für ein Aktin-regulierendes Protein kodiert. Auch das extrazelluläre Matrixprotein Nidogen interagiert genetisch mit *ast-1*. Somit wurden einige Anhaltspunkte über die Funktion von *ast-1* erhalten, die in der Diskussion weiter ausgearbeitet werden.

3 Diskussion

3.1 AST-1 kontrolliert Aspekte der axonalen Wegfindung und der Pharynxentwicklung

3.1.1 Nervensystemdefekte in *ast-1* Mutanten

Die Axone der Interneurone und VC Motoneurone wachsen in *ast-1* Mutanten fehlerhaft aus

Der Ventralstrang in *C. elegans* ist asymmetrisch mit der Mehrzahl der Axone im rechten Axonbündel. Fast alle Interneuronaxone, die den Nervenring auf der linken Seite verlassen, kreuzen am Anfang des Ventralstranges nach rechts über und verlaufen im rechten Axonbündel. *Ast-1* Mutanten zeigten charakteristische Defekte in der axonalen Wegfindung. Eine Untergruppe von Interneuronen, die *glr-1* exprimierten, hatten Defekte beim Navigieren vom Nervenring in den Ventralstrang und Faszikulierungsdefekte innerhalb des Ventralstrangs. Axone kreuzten in den linken Ventralstrang über und meistens wieder zurück. Zu den *glr-1* exprimierenden Interneuronen, deren Axone im Ventralstrang laufen, gehören: AVA, AVB, AVD, AVE, AVJ und PVC. Die Neurone waren unterschiedlich stark betroffen. Die Axone der AVE Neurone wuchsen fehlerfrei aus. Die *nmr-1* exprimierende Subpopulation, zu der AVA, AVD und PVC gehören, war in stärkerem Maße betroffen als AVB und AVJ. Dies zeigt, dass AST-1 nicht für das zielgerichtete Auswachsen aller Interneuronaxone notwendig ist. In den Neuronen, deren Axone fehlerhaft auswachsen, könnte die Expression von extrazellulären Signalmolekülen, die normalerweise die Axone entlang ihres Weges leiten, inhibiert sein. Andere Interneurone, deren Axone normal auswachsen, könnten Rezeptoren benötigen, deren Expression nicht von AST-1 reguliert wird. Es wurde in unserem Labor gezeigt, dass verschiedene Gruppen von Neuronen, deren axonale Wegfindung von extrazellulären Signalmolekülen abhängt, unterschiedliche Kombinationen an Signalmolekülen benutzen (Hutter, 2003). Eine zweite Ursache der Defekte könnte sein, dass manche Interneurone ein intrinsisches Problem haben und nicht entsprechend auf Signalmoleküle reagieren können. Das Neuron AVG interessiert uns besonders, da sein Axon als erstes im rechten Ventralstrangbündel auswächst und eine Funktion als Pionier für später auswachsende

Axone im Ventralstrang besitzt (R. M. Durbin, Doktorarbeit, Universität Cambridge, 1987). Diese Idee wurde zuerst von Richard Durbin getestet, indem er AVG mit Laserablation eliminierte und die Axone im Ventralstrang eines Tieres mit Hilfe von elektronenmikroskopischen Rekonstruktionen sehr genau untersuchte (R. M. Durbin, Doktorarbeit, Universität Cambridge, 1987). Dabei fand er heraus, dass zwar immer noch die Mehrzahl der Axone im rechten Ventralstrangbündel ausgewachsen waren, aber die Axone gelegentlich die Mittellinie in das linke Bündel überkreuzten. Um die Funktion von AVG als Pionieraxon genauer zu bestimmen, wurden in unserem Labor Untersuchungen durchgeführt. In weiteren AVG Ablationsexperimenten konnten wir zeigen, dass in ungefähr 40% der Tiere das Auswachsen von Axonen im Ventralstrang wesentlich beeinträchtigt war (Hutter, 2003). Der Pionier stellt demnach eine wichtige Informationsquelle für die später auswachsenden Axone im Ventralstrang dar, aber er ist nicht absolut notwendig.

In einem Viertel der *ast-1* Mutanten verlief AVG im falschen Bündel im Ventralstrang und dies verdeutlicht, dass *ast-1* das Auswachsen des Pionieraxons AVG beeinflusst. Bis jetzt war keine *ast-1* Expression in AVG nachweisbar. Entweder lag das YFP-Signal unterhalb der Detektionsgrenze oder *ast-1* wurde tatsächlich nicht in AVG exprimiert. Bisher ist kein Molekül bekannt, welches das Auswachsen von AVG beeinflusst. Die Identifikation von Genen, die von AST-1 reguliert werden, könnte darüber Aufschluß geben.

Ast-1 Mutanten zeigten Auswachsdefekte in den Interneuronaxonen im Ventralstrang, die gelegentlich die Mittellinie kreuzten, wobei AVG ebenfalls in den meisten Fällen (70%) fehlerhaft in das linke Bündel kreuzte. In weiteren Experimenten konnten wir zeigen, dass in einigen anderen *ast* Mutanten die Defekte der Interneuronaxone ebenfalls zu 52 – 93% von AVG abhängen (Hutter et al., Manuskript in Vorbereitung). Ein Teil der Interneuronddefekte sind demnach das Ergebnis eines fehlgeleiteten AVG Axons. *ast-1* spielt dennoch eine wichtige Rolle in der axonalen Wegfindung von Interneuronen, da ein Teil der falsch ausgewachsenen Interneuronaxone (30%) unabhängig von AVG auf der falschen Seite verlief.

Außer den Interneuronen waren in *ast-1* Mutanten als einzige weitere Neuronenklasse die VC Motoneurone betroffen. Deren Axone kreuzten in ähnlicher Weise wie die Interneuronaxone die Mittellinie. Bemerkenswert ist, dass die Ventralstrangdefekte der Motoneuronaxone genauso häufig wie die Defekte der Interneuronaxone (33% bzw. 35%) vorkommen. Somit könnte das fehlerhafte Auswachsen der Interneuronaxone das spätere Auswachsen der Axone der VC Motoneurone beeinflussen. Ob eine solche Abhängigkeit

besteht, wird momentan in weiteren Experimenten untersucht, in denen die Interneurone und die VC Motoneurone im selben Tier analysiert werden.

AST-1 verändert die neuronale Identität nicht

Zelltypspezifische Marker, wie Gene für Neurotransmitter (*glr-1*) oder für chemosensorische Rezeptoren (*sra-6*), waren in *ast-1* Mutanten richtig exprimiert. Diese Gene kodieren für terminale Differenzierungsprodukte, die charakteristisch für bestimmte Neuronentypen sind. Dies bedeutet, dass in *ast-1* Mutanten die neuronale Identität nicht verändert ist. In *C. elegans* sind nur sehr wenige Transkriptionsfaktoren bekannt, die ausschließlich in einem späten Schritt der neuronalen Differenzierung agieren, wie beispielsweise UNC-4 (Miller und Niemeyer, 1995). UNC-4 kontrolliert die synaptische Verschaltung von bestimmten Motoneuronen mit Interneuronen, wobei die Axone in *unc-4* Mutanten normal auswachsen. Im Gegensatz dazu sind einige Transkriptionsfaktoren bekannt, die frühere Schritte der neuronalen Differenzierung steuern, zum Beispiel UNC-30 und UNC-3. Beide Faktoren steuern die Differenzierung von Motoneuronen. UNC-30 ist notwendig und ausreichend für die Spezifizierung des Zellschicksals der GABAergen D-Typ Motoneurone (Jin et al., 1994; Hobert et al., 1999). UNC-30 reguliert direkt die Expression der Gene *unc-25/GAD* (Glutamatdecarboxylase) und *unc-47/VGAT* (GABA Transporter) (Eastman et al., 1999). Zudem kontrolliert es weitere Aspekte der neuronalen Differenzierung wie das axonale Auswachsen und die Synapsenbildung (Jin et al., 1994). UNC-3 reguliert das axonale Auswachsen von Motoneuronen und die Differenzierung von sensorischen Neuronen (Prasad et al., 1998). UNC-30 und UNC-3 sind typische Beispiele für Transkriptionsfaktoren, die neuronale Differenzierungsvorgänge regulieren, weil sie nicht nur einen sondern verschiedene Aspekte, entweder in einem Neuronentyp oder sogar in unterschiedlichen Neuronentypen, steuern. *Ast-1* hingegen reguliert nur einen Aspekt der neuronalen Differenzierung, nämlich das zielgerichtete Auswachsen von Axonen.

3.1.2 AST-1 reguliert die Differenzierung des Pharynx

AST-1 besitzt eine essentielle Funktion in der Pharynxdifferenzierung, denn *ast-1* Deletionsmutanten besaßen keinen vollständig ausgebildeten Pharynx und konnten deshalb keine Nahrung aufnehmen. Die Morphogenese des Pharynx kann in drei Phasen eingeteilt werden, die zwischen dem Komma-Stadium und dem Zweifach-Stadium in der

Embryonalentwicklung stattfinden (Portereiko und Mango, 2001). In der ersten Phase kommt es zu einer Reorientierung der Pharynxvorläuferzellen, wobei das Pharynxlumen verlängert wird. In der zweiten Phase bildet sich ein Epithel, das den Pharynx an die anterior liegende Epidermis knüpft. Die dritte Phase wird Kontraktion genannt, denn der Pharynx und die Epidermis (Mund) bewegen sich aufeinander zu und der Mund öffnet sich zur Außenwelt. In *ast-1* Deletionsmutanten sah der sich entwickelnde Pharynx zunächst genauso wie in Wildtyptieren aus und bildete ein normales Primordium, das durch eine Basalmembran vom restlichen Embryo abgetrennt war. In der nachfolgenden Verlängerungsphase differenzierten sich die Vorläuferzellen nicht normal weiter und bildeten keinen Mund. In den Larven war lediglich ein ausgebildetes Mahlorgan („Grinder“) vorhanden, jedoch keine weiteren Pharynxstrukturen wie Prokorporus, Isthmus oder Metakorporus.

Der vordere und hintere Teil des Pharynx entwickelt sich aus Zellen, die aus verschiedenen Gründerzellen hervor gehen (Sulston et al., 1983; Granato et al., 1994; Kalb et al., 1998). Es gibt Mutanten in *C. elegans*, in denen der vordere Teil des Pharynx fehlt, beispielsweise wenn die beiden T-Box Transkriptionsfaktoren *tbx-37* und *tbx-38* mutiert sind (Good et al., 2004), wobei die Ursache ein Defekt im Zellstammbaum ist. Bisher ist keine Mutante bekannt, die einen Pharynxdefekt wie *ast-1(hd92)* aufweist, der nicht die Folge eines Defektes im Zellstammbaum ist. Die Zielgene von *ast-1* könnten Aufschluß über bisher unbekannte Moleküle geben, die an der Differenzierung des Pharynx beteiligt sind. AST-1 reguliert hier, genau wie in der neuronalen Differenzierung, späte Entwicklungsschritte und keine frühen Zellschicksalsentscheidungen.

3.2 AST-1 ist ein ETS Transkriptionsfaktor

AST-1 gehört zur großen Familie der ETS Transkriptionsfaktoren (Übersichtsartikel von Sharrocks 2001; Oikawa und Yamada, 2002). Das erste Mitglied der *ets* (E-ttwenty-six) Genfamilie, *v-ets*, wurde ursprünglich identifiziert als ein *gag-myb-ets* Fusionsonkogen des Retrovirus E26. Dieses Virus verursacht sowohl Erythroleukämie als auch myeloische Leukämie im Huhn (Leprince et al., 1983). Anschließend wurden zahlreiche Homologe im Menschen, in *D. melanogaster* (Hsu und Schulz, 2000) und in *C. elegans* (Hart et al., 2000) isoliert. In Säugetieren wurden bisher über 30 Mitglieder gefunden (Remy und Baltzinger, 2000; Maroulakou und Bowe, 2000; Bartel et al., 2000). ETS Gene sind sogar in den einfachsten mehrzelligen Tieren vorhanden, zum Beispiel in dem Schwamm *T. aurantia*

(Degnan et al., 1993). Allerdings besitzen einzellige Organismen wie Hefe keine ETS Gene. Daher ist es möglich, dass die ersten ETS Proteine für mehrzelliges Leben notwendige Prozesse regulierten, zum Beispiel zelluläre Differenzierung.

ETS Proteine aktivieren oder reprimieren die Transkription in Kooperation mit anderen Transkriptionsfaktoren und Kofaktoren. Sie spielen wichtige Rollen in der Regulation verschiedener zellulärer Funktionen, wie zum Beispiel Differenzierung, Wachstum, Apoptose, Entwicklung und onkogene Transformation (Bassuk und Leiden, 1997; Dittmer und Nordheim, 1998; Graves und Petersen, 1998; Sharrocks et al., 1997; Wasylyk et al., 1998).

3.2.1 Die Struktur der ETS DNS-Bindedomäne

Die charakteristische Eigenschaft dieser Transkriptionsfaktor-Familie ist, dass jedes Mitglied eine ETS Domäne besitzt, die während der Evolution konserviert wurde. Diese ETS Domäne ist 85 Aminosäuren lang und vermittelt eine Bindung an Purin-reiche DNS-Sequenzen mit einem zentralen GGAA/T Konsensus-Motiv und zusätzlichen flankierenden Nukleotiden (Graves und Petersen, 1998). Die Struktur der ETS Domäne wurde mittels NMR untersucht. Sie besteht aus drei α -Helices und vier β -Faltblättern, die in der Reihenfolge $\alpha 1$ - $\beta 1$ - $\beta 2$ - $\alpha 2$ - $\alpha 3$ - $\beta 3$ - $\beta 4$ angeordnet sind, um eine flügelförmige Helix-Turn-Helix Struktur zu bilden (Kodandapani, 1996; Donaldson et al., 1996). Die dritte Helix ist für die DNS-Bindung verantwortlich. Die verschiedenen Mitglieder der ETS Familie zeigen unterschiedliche DNS-Bindungsspezifitäten, die von der ETS Domäne und den flankierenden Sequenzen beeinflusst werden (Graves und Petersen, 1998).

Die beiden *ast-1* Mutanten, *rh300* und *hd1*, besitzen eine Punktmutation in der ETS-Domäne, wobei jeweils eine stark konservierte Aminosäure verändert wurde (siehe Abb.15 in Kapitel 2.4). Die Mutation in *ast-1(rh300)* ist Teil eines Faltblattes, das vor der ersten Helix liegt. Die Mutation in *hd1* ist mitten in der ersten Helix lokalisiert. Es wurde von Mo und Kollegen gezeigt (2000), dass der Austausch einer einzigen Aminosäure in der ETS-Domäne ausreichen kann, um die Bindung des ETS Proteins an eine bestimmte Promotorsequenz zu verhindern. In den *rh300* und *hd1* Mutanten kann dies bedeuten, dass die jeweilige Punktmutation die Bindungsspezifität der ETS Domäne stark beeinflusst, aber nicht zu einem kompletten Funktionsverlust führt. Das zielgerichtete Auswachsen von Axonen ist in den Punktmutanten gestört und es ist vorstellbar, dass dabei die Bindung von AST-1 an Promotoren mit bestimmten Sequenzmerkmalen verändert ist. AST-1 könnte

spezifisch die Fähigkeit verloren haben, die Expression der Zielgene zu steuern, die für das axonale Auswachsen wichtig sind. In der Deletionsmutante fehlt im translatierten Protein die zweite Hälfte der ETS Domäne. Da in AST-1 die N-terminale Sequenz vor der ETS Domäne keine vorhergesagte Domäne besitzt, läßt sich daraus schließen, dass die Deletionsmutante eine komplette Funktionsverlustmutante ist. In den Mutanten ist zusätzlich zu den neuronalen Defekten die Pharynxdifferenzierung beeinträchtigt. Die Bindungseigenschaften von AST-1, die notwendig für die Expression der Gene in der Pharynxdifferenzierung sind, scheinen von den Punktmutationen *rh300* und *hd1* nicht betroffen zu sein.

Ast-1 Punktmutanten zeigen keinerlei Auffälligkeiten im Gegensatz zu anderen Transkriptionsfaktor-Mutanten, die oft in ihrem Bewegungsablauf gestört sind wie UNC-86 und UNC-4 (Chalfie et al., 1981; Miller und Niemeyer, 1995). Die Zahl der Nachkommen ist in *ast-1* Punktmutanten normal und ebenso bewegen sich die Tiere trotz der axonalen Defekte im Motorschaltkreis normal. Dies bedeutet, dass die synaptischen Verbindungen im Motorschaltkreis bis zu einem gewissen Grad gestört werden können, ohne dass dabei die gesamte Funktionalität beeinträchtigt wird. Der Schaltkreis ist demnach teilweise redundant organisiert.

In Bezug auf die axonalen Defekte verhalten sich die beiden Allele mit Punktmutationen wie Nullallele, denn in der Deletionsmutante sind die Interneurone in derselben Art und Weise betroffen. Die neuronale Identität ist auch in der Deletionsmutante nicht betroffen, denn der *glr-1::GFP* Interneuronmarker wird in den Punktmutanten wie auch in Deletionsmutanten unverändert im Vergleich zu Wildtyp exprimiert.

3.2.2 AST-1 gehört zur Fli-1 Unterfamilie der ETS Transkriptionsfaktoren

Das *C. elegans* Gen C42D8.4 ist der nächste Verwandte von *ast-1* und gehört, wie *ast-1*, zur Fli-1 Unterfamilie. Das Expressionsmuster von C42D8.4 wurde mit Hilfe eines Promotor-*gfp* Reportergens untersucht. *Gfp* wurde während der Entwicklung und im adulten Wurm in sensorischen Neuronen exprimiert (Hart et al., 2000). *Ast-1* wird ebenfalls in sensorischen Neuronen exprimiert und beide Gene besitzen eine Funktion im Nervensystem. Der nächste Verwandte von AST-1 in Vertebraten ist das Protein FLI-1. Die ETS-Domänen der beiden Proteine sind auf Aminosäureebene zu 90% identisch (Abb.15 in Kapitel 2.4). Im Vergleich der ETS Domänen anderer Familienmitglieder ergibt sich eine nicht ganz so hohe Ähnlichkeit von ungefähr 80%.

In Säugetieren gehören die beiden ETS Proteine FLI-1 und ERG zur Fli-1 Familie. Transkriptionelle Aktivierung von *fli-1* durch Chromosomentranslokation oder durch provirale Insertion führt zu Ewings-Sarkoma in Menschen (Delattre et al., 1992). Die biologischen Funktionen von *fli-1* und *erg* wurden anhand von Funktionsgewinn- und Funktionsverlustmutationen in Zellkultur und im Mausmodell untersucht. Die Überexpression von ERG in NIH3T3 Zellen induziert Proliferation und die Entstehung von Tumoren (Hart et al., 1995). Wird *fli-1* cDNA unter der Kontrolle des H-2K Promotors in transgenen Mäusen exprimiert, entsteht eine schwere Autoimmunkrankheit, die zu Nierenentzündung führt (Zhang et al., 1995). Transgene Mäuse mit Mutationen in *fli-1* zeigen tödliche Blutungen (Spyropoulos et al., 2000) als Folge von Defekten in der Endothel- und Megakaryozytenentwicklung (Hart et al., 2000). Beide Proteine sind sehr wichtig für die Entwicklung von vertebratenspezifischen Geweben. Die Funktion der ETS Proteine ist daher innerhalb der Fli-1 Familie nicht konserviert, jedoch sind sie in lebenswichtige Prozesse involviert.

Es gibt aber ETS Proteine, die ähnliche Funktionen besitzen wie AST-1, zum Beispiel ER81 und PEA3, die eine wichtige Rolle in der späten Differenzierung von Motoneuronen in Vertebraten spielen (Lin et al., 1998). Er81 und Pea3 werden in verschiedenen Gruppen von Motoneuronen und sensorischen Neuronen exprimiert und regulieren deren synaptische Verbindungen (Lin et al., 1998; Arber et al., 2000; Livet et al., 2002). In einem späteren Abschnitt (3.3.3) erläutere ich diese Beispiele genauer.

3.2.3 Die ETS Genfamilie in *C. elegans*

In *C. elegans* wurden anhand von Sequenzanalysen zehn ETS Gene identifiziert (Hart et al., 2000). Dies weist auf eine frühe Duplikation und Verbreitung dieser Genfamilie während der Evolution der Metazoa hin. Das einzige bisher klonierte ETS Gen in *C. elegans* war *lin-1*, das als Inhibitor des Vulva-Zellschicksals agiert (Beitel et al., 1995). Weitere Funktionen sind die Regulation der Entwicklung des exkretorischen Systems, des Schwanzes in Männchen und des posterioren Ektoderms (Ferguson und Horvitz, 1985; Han und Sternberg, 1990). LIN-1 wird dabei über den MAP Kinase Signalweg aktiviert. Außer *ast-1* gibt es also in *C. elegans* weitere ETS Gene, die zum Teil im Nervensystem exprimiert werden und deren Aufgaben weitere interessante Einblicke in die Funktion des Nervensystems liefern könnten. Das ETS Gen C33A11.4 wird in Motoneuronen und im Ventralstrang von *C. elegans* exprimiert (Hart et al., 2000). Ein weiteres ETS Gen wird

außerhalb des Nervensystems exprimiert und für die restlichen sind bisher keine Expressionsanalysen vorhanden (Hart et al., 2000).

3.3 AST-1 als Teil eines Transkriptionsfaktor-Netzwerks, das neuronale Differenzierung kontrolliert

3.3.1 *Ast-1* wird in Neuronen exprimiert, wenn Axone auswachsen

Das *ast-1::YFP*-Fusionsgen wurde ausschließlich im Nervensystem exprimiert. Die Expression begann, nachdem die Neurogenese abgeschlossen war und sich die Neuronen differenzierten und ihre Axone auswachsen. Die Expression nahm mit fortschreitender Entwicklung ab und war im adulten Stadium nur in wenigen Neuronen erhalten. Die Expression von *ast-1* war dynamisch und trat nur in zwei Neuronenklassen auf, in manchen Interneuronen und in sensorischen Neuronen.

Die Expression von *ast-1* in den Interneuronen paßt zu den Auswachsdefekten der Interneuronaxone, die unabhängig vom Pionieraxon AVG die Mittellinie kreuzen. In diesen Neuronen kann *ast-1* die Expression von Genen, die wichtig für das axonale Auswachsen sind, regulieren. Dies ist das einzige Beispiel, wo AST-1 in den Zellen vorhanden ist, in denen es direkt das axonale Auswachsen steuert. AST-1 kann dabei direkt oder mit Hilfe zusätzlicher Transkriptionsfaktoren die Transkription von Genen regulieren, die für Rezeptoren oder Signalmoleküle kodieren.

Ast-1 wird aber auch in sich differenzierenden sensorischen Neuronen im Kopf exprimiert, wobei bisher dort keine Defekte gefunden wurden. Die Neurone nahmen ihre normale Position ein und ihre Axone und Dendriten waren ohne Fehler ausgewachsen. *Ast-1* wurde beispielsweise in den inneren Labialneuronen exprimiert, die jedoch keinerlei morphologische Defekte zeigten. Es ist demnach möglich, dass die Neurone nicht voll funktionsfähig sind und die Expression einzelner Rezeptoren oder Molekülen der Signaltransduktion betroffen ist. Die Expression später Differenzierungsgene wie chemosensorische Rezeptoren in den inneren Labialneuronen muss noch untersucht werden. Verhaltenstests, wie die Untersuchung von Chemotaxis, Osmotaxis und Thermotaxis werden Aufschluss über die Funktionalität der sensorischen Neurone geben. Die ETS Gene *Er81* und *Pea3* sind unter anderem ebenfalls in sensorischen Neuronen exprimiert, die sich in der späten Differenzierungsphase im Rückenmark befinden (Lin et al., 1998).

In den VC Motoneuronen, die in der *ast-1* Mutante axonale Defekte aufweisen, ist kein *ast-1::YFP* Protein sichtbar. Dies kann bedeuten, dass die Expression unterhalb des Detektionslevels ist oder dass *ast-1* nicht in den VC Motoneuronen exprimiert wird. Es sind bisher keinerlei Faktoren bekannt, die das Auswachsen der VC Motoneurone beeinflussen und deshalb kann AST-1 und die Identifikation seiner Zielgene dabei helfen, solche Faktoren zu finden. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass es sich dabei wie vorher beschrieben um einen sekundären Effekt der Interneuronddefekte handelt.

Die AST-1::YFP-Proteine waren im Zellkern lokalisiert, was bestätigt, dass AST-1 eine Rolle in der transkriptionellen Regulation besitzt. Die Lokalisation des AST-1::YFP-Fusionsproteins war bemerkenswerterweise in der späteren Embryonalentwicklung nicht mehr nur auf den Zellkern beschränkt. Da AST-1 keine klassische NLS besitzt (Kalderon et al., 1984; Lanford und Butel, 1984), wird es wahrscheinlich nicht über die Transportproteine Importin α/β in den Kern transportiert. Die Transportsignale können in ihrer Größe und Struktur sehr unterschiedlich sein und es ist deshalb schwierig nur anhand der Sequenz vorherzusagen, ob ein Protein aktiv in den Kern importiert wird. Es wurde gezeigt, dass Proteine, die keine NLS besitzen, direkt ohne Importin α an Importin β binden können (Henderson und Percipalle, 1997; Truant und Cullen, 1999; Palmeri und Malim, 1999; Jäkel und Görlich, 1998; Lam et al., 1999). Auf diese Weise könnte AST-1 auch ohne NLS zusammen mit einem Transporter in den Kern gelangen. Bei einer *ast-1* Überexpression könnte es sein, dass durch die Limitierung der Anzahl der Transporter nicht alle AST-1 Proteine in den Zellkern gelangen, sondern im Zytoplasma verbleiben.

Die Expression des $\Delta ast-1::YFP$ -Fusionsgens, das nur Intronsequenzen und das 3'-Ende der kodierenden Sequenz enthält, zeigte erstaunlicherweise einen Großteil des *ast-1::YFP* Expressionsmusters, wobei es ebenfalls im Zellkern lokalisiert war. Das *ast-1*-Promotorkonstrukt zeigte im Gegensatz dazu hauptsächlich eine Expression in den sensorischen Neuronen, aber nur in sehr wenigen Interneuronen. Dies beweist, dass sich in den Introns regulatorische Elemente befinden, die die Expression aktivieren. In *C. elegans* sind die Introns häufig klein und größere Introns, wie in *ast-1*, können regulatorische Elemente enthalten. Zum Beispiel wird die neuronale Expression von *lin-11* nur von regulatorischen Sequenzen, die in Introns liegen, gesteuert (Hobert et al., 1998).

Die Überexpression sowohl des *ast-1*- als auch des Δ *ast-1*-Fusionsgens führt zu Fehlern im Auswachsen von Axonen in Wildtyptieren. Die Interneuronaxone sind in ähnlicher Weise betroffen, wie in den beiden *ast-1* Punktmutanten. Zudem konnten die axonalen Defekte in den Mutanten mit der Expression der Fusionsgene nicht gerettet werden. Die Ursache könnte ein Gendosiseffekt sein. Die Überexpression von *ast-1* in Wildtyptieren könnte zu einer erhöhten Anzahl von AST-1 Proteinen im Nukleus führen und dies könnte die Expression von Zielgenen beeinflussen. Es wurde gezeigt, dass die Überexpression eines Transkriptionsfaktors einen mutanten Phänotyp zur Folge hat (Wacker et al., 2003). Die Molekülanzahl eines Transkriptionsfaktors im Kern ist streng limitiert und ein Verschieben dieses Gleichgewichts kann dramatische Folgen haben. Dass die Expression von Δ *ast-1::yfp* zu Defekten im gerichteten Auswachsen von Axonen führt, könnte zwei Ursachen haben: Erstens selbst wenn Δ AST-1 kein funktionelles Protein wäre, könnte es dennoch mit dem AST-1 Wildtypprotein um die Bindung an Promotoren konkurrieren und dadurch die Funktion von AST-1 behindern. Zweitens könnte ein funktionelles Protein entstehen, welches die Expression bestimmter Zielgene beeinflusst. Das würde die Hypothese bestätigen, dass eine zweite Spleißvariante von *ast-1* vorkommt, deren ATG in Intron 5 lokalisiert ist (Kapitel 2.4). Eine entsprechende cDNS, die von Prof. Dr. Y. Kohara aus seiner cDNS-Bank isoliert wurde, unterstützt diese Hypothese (Japanese National Institute of Genetics, Mishima, Japan). Es sind für viele Transkriptionsfaktoren, die eine wichtige Rolle in Entwicklungsprozessen spielen, mehrere Isoformen nachgewiesen worden, die durch alternatives Spleißen generiert wurden (Übersichtsartikel von López, 1995). Von den beiden ETS-Genen *E-74* und *pointed* in *Drosophila* wurden beispielsweise mehrere Spleißvarianten gefunden (Burtis et al., 1990; Scholz et al., 1993). Es konnten zwei Isoformen des Gens *pointed* nachgewiesen werden, von denen eine die Pointed-Domäne nicht mehr besitzt. Die DNS-Bindeaffinität oder die Eigenschaften zur Dimerisierung können dadurch moduliert werden. Somit besitzen Isoformen eines Gens unterschiedliche Funktionen und regulieren verschiedene Prozesse (Burtis und Baker, 1989; Coschigano und Wensink, 1993). Experimente in dieser Richtung sollen in Zukunft klären, ob zwei Spleißvarianten von *ast-1* mit unterschiedlichen Funktionen existieren.

3.3.2 *Ast-1* interagiert genetisch mit den Transkriptionsfaktoren *lin-11* und *zag-1*

In Doppelmutantenanalysen konnte ich zeigen, dass *ast-1* mit den beiden Transkriptionsfaktoren *lin-11* und *zag-1* genetisch interagiert. ZAG-1 ist ein Zinkfinger-

Transkriptionsfaktor, der wie AST-1 das Auswachsen von Axonen reguliert (Wacker et al., 2003). LIN-11 gehört zur Familie der LIM Transkriptionsfaktoren und spielt unter anderem beim axonalen Auswachsen eine wichtige Rolle (Hobert et al., 1998; Sarafi-Reinach et al., 2001). Es wurde in der vorliegenden Arbeit gezeigt, dass *ast-1* weder die Expression von *lin-11* noch die von *zag-1* steuert. Vielmehr reguliert entweder LIN-11 die Expression von *ast-1* oder AST-1 kontrolliert zusammen mit LIN-11 die Expression von Zielgenen. Dasselbe gilt für ZAG-1. Eine Analyse der *ast-1* Expression in *zag-1* und *lin-11* Mutanten wird Aufschluß geben, ob die eine oder andere Möglichkeit zutrifft.

Es ist bekannt, dass ETS Transkriptionsfaktoren mit einer Reihe von verschiedenen Transkriptionsfaktoren interagieren. Allerdings gibt es in der Literatur bisher keine Daten, die eine kooperative Interaktion zwischen einem ETS Transkriptionsfaktor und einem LIM Transkriptionsfaktor belegen. Die Gene, deren Expression LIN-11 reguliert, sind bisher nicht bekannt. *Lin-11* wird in mehreren Interneuronen, sensorischen Neuronen und in der Vulva exprimiert (Hobert et al., 1998; Sarafi-Reinach et al., 2001). Dieses Expressionsmuster überlappt zum Teil mit dem von *ast-1*. So wäre es denkbar, dass *ast-1* ein Zielgen von LIN-11 ist und dessen Expression in sensorischen Neuronen und wenigen Interneuronen (AVA, AVE) von LIN-11 gesteuert wird.

Es gibt hingegen mehrere Beispiele in Vertebraten, wo ETS Transkriptionsfaktoren mit Zinkfinger-Transkriptionsfaktoren zusammen die Expression von Genen regulieren. Es wurde beispielsweise gezeigt, dass das ETS Protein FLI-1 mit dem Zinkfinger-Protein GATA-1 interagiert und dadurch die Expression bestimmter Gene aktiviert wird (Eisbacher et al., 2003). Die beiden Proteine wirken synergistisch zusammen, wobei die ETS-Domäne direkt an die Zinkfinger bindet. Im Gegensatz dazu wurde vorher schon beschrieben, dass GATA-1 mit einem anderen ETS Protein, genannt PU.1, interagiert, was allerdings zur Repression der Expression führt (Nerlov et al., 2000; Rekhtman et al., 1999; Zhang et al., 1999; Zhang et al., 2000). Die beiden Proteine blockieren gegenseitig ihre Aktivität. Für das Vertebratenhomolog von ZAG-1 (ZEB) wurde gezeigt, dass es die Aktivität von bestimmten ETS Proteinen hemmen kann (Postigo et al., 1997). Dies geschieht dadurch, dass ZEB an eine benachbarte Bindestelle im selben Promotor bindet und dabei das ETS Protein in seiner Aktivität blockiert. Das ETS Protein kann diese Repression überwinden indem es an einen anderen Transkriptionsfaktor (c-Myb) bindet. Diese Ergebnisse geben Anhaltspunkte dafür, dass *ast-1* und *zag-1* in *C. elegans* zusammen an Promotoren von Genen agieren könnten, die am Prozeß des zielgerichteten Auswachsens von Axonen beteiligt sind. Es wäre sogar vorstellbar, dass AST-1 und ZAG-1 direkt miteinander

interagieren. Dies wird in naher Zukunft durch biochemische Untersuchungen überprüft. Somit ist *ast-1* Teil eines transkriptionellen Netzwerkes, das die Expression von Genen, die an Differenzierungsprozessen beteiligt sind, steuert.

3.3.3 AST-1 Homologe in Vertebraten regulieren die Motoneurondifferenzierung

ETS Proteine besitzen in Vertebraten zahlreiche Funktionen in der Entwicklung und Differenzierung (Wasylyk et al., 1998). Im Nervensystem steuern sie beispielsweise die Differenzierung der Motoneurone zusammen mit vielen anderen Transkriptionsfaktoren (Übersichtsartikel von Edlund und Jessell, 1999; Jessell, 2000; siehe auch Kapitel 1.1.2). Ein spezieller Aspekt dieser Differenzierung wird von ETS Transkriptionsfaktoren reguliert: die Ausbildung von synaptischen Verbindung zwischen sensorischen afferenten Fasern und Motoneuronen (Lin et al., 1998; Arber et al., 2000; Livet et al., 2002). Der motorische Reflexbogen besteht aus einem sensorischen afferenten Neuron mit einem Dehnungsrezeptor am Muskel und einem Axon, das mit einem Motoneuron verbunden ist, das zum selben Muskel zurückprojiziert. Zuerst werden die beiden ETS Gene *Er81* und *Pea3* in allen propriozeptiven Neuronen exprimiert (Lin et al., 1998). Aber bald teilt sich die Expression der beiden Gene auf unterschiedliche Untergruppen auf. Zu dem Zeitpunkt, wo sensorisch-motorische Verbindungen etabliert werden, exprimieren individuelle Motoneuronuntergruppen entweder *Er81* oder *Pea3* und werden bevorzugt von propriozeptiven afferenten Fasern innerviert, die dasselbe ETS Gen exprimieren (Lin et al., 1998). *ER81* knock-out-Mäuse zeigen schwere Defizite in der Bewegungskoordination, obwohl die Spezifizierung der Motoneurone und die Induktion der Muskelspindeln normal verläuft (Arber et al., 2000). Die Bewegungsdefekte resultieren daraus, dass eine Gruppe von propriozeptiven afferenten Fasern ihre Terminationszone im Rückenmark nicht ausbilden kann. Das anfängliche Auswachsen der Axone verläuft normal, aber nahe ihrer Zielregion enden sie frühzeitig und können keine Verbindungen zu den Motoneuronen bilden (Arber et al., 2000). *ER81* steuert also die terminale Zielfindung der Motoneuronaxone. In *PEA3* mutanten Mäusen sind die Motoneuronzellkörper nicht am richtigen Ort im Rückenmark lokalisiert und die Axone von spezifischen Motoneurongruppen verzweigen sich nicht in der Region ihrer Zielmuskeln (Livet et al., 2002). GDNF ("glial cell-line derived neurotrophic factor") stellt das periphere Signal dar, das die *PEA3* Expression in spezifischen Motoneurongruppen induziert und reguliert damit die Zellposition und Muskelinnervierung (Haase et al., 2002). Es wurde zudem gezeigt,

dass NT3 (“neurotrophin-3”) die Bildung von sensorisch-motorischen Verbindungen über eine Regulation von ER81 steuert (Patel et al., 2003)

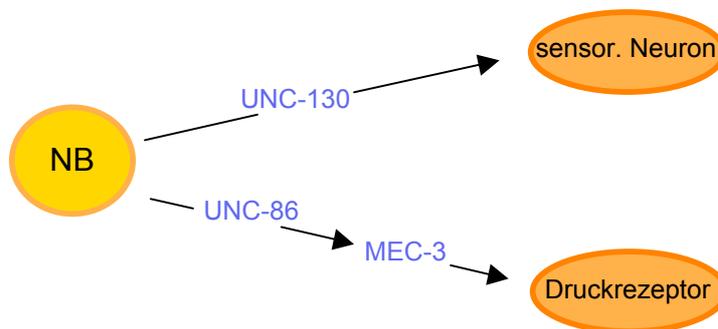
3.3.4 Modell zur Funktion von AST-1 in neuronaler Differenzierung

In dem vorher beschriebenen Beispiel in Vertebraten kontrollieren ETS Transkriptionsfaktoren die synaptischen Verbindungen zwischen sensorischen Neuronen und Motoneuronen. AST-1 kontrolliert ebenfalls einen späten Schritt der neuronalen Differenzierung und steuert ähnlich wie ER81 die Projektion von Axonen. Die Beobachtungen in dieser Arbeit gaben keinerlei Hinweise dafür, dass AST-1 zusätzliche Schritte in der neuronalen Differenzierung reguliert, wie beispielsweise die Expression von Genen, die für Neurotransmitter oder Ionenkanalproteine kodieren. Dies ist ein besonderes Merkmal von AST-1, denn im Gegensatz dazu gibt es eine Vielzahl von Transkriptionsfaktoren, die mehrere Schritte der neuronalen Differenzierung oft auch zu früheren Zeitpunkten steuern.

Unc-86 wird beispielsweise vorübergehend in Druckrezeptoren exprimiert und ist essentiell für deren Differenzierung (Chalfie et al., 1981; Horvitz et al., 1983). *Unc-86* kodiert für einen POU Transkriptionsfaktor und aktiviert die Expression von *mec-3*, das für einen LIM Transkriptionsfaktor kodiert (Xue et al., 1992). In der *mec-3* Mutante entstehen Neurone, aber sie differenzieren sich nicht zu Druckrezeptoren, sondern zu Interneuronen (Way und Chalfie, 1988). UNC-86 und MEC-3 interagieren dann direkt miteinander und steuern die Expression von Genen, die für terminale Differenzierungsprodukte kodieren (Duggan et al., 1998). MEC-3 und UNC-86 regulieren die Differenzierung zu einem neuronalen Subtyp. Im HSN Neuron besitzt UNC-86 überraschenderweise eine ganz andere Rolle. Hier reguliert es nicht das Zellschicksal, sondern direkt die Neurotransmitterexpression und axonales Auswachsen (Desai et al., 1988). UNC-86 steuert in verschiedenen Neurontypen entweder frühe oder späte Differenzierungsschritte. Der Transkriptionsfaktor UNC-130 besitzt auch zwei Funktionen in der neuronalen Differenzierung. Er steuert das Zellschicksal von chemosensorischen Neuronen (Sarafi-Reinach und Sengupta, 2000) und inhibiert die Expression von *unc-129/TGF- β* in ventralen Muskelzellen (Nash et al., 2000). *Unc-129* wird somit nur dorsal exprimiert, wo es notwendig ist um Axone in Richtung dorsal zu führen. Der Transkriptionsfaktor UNC-130 dient dazu die Expression von *unc-129*, das als Signalmolekül für auswachsende Axone dient, auf bestimmte Zellen zu beschränken.

Anhand dieser Beispiele von Transkriptionsfaktoren in *C. elegans* wird deutlich, dass sie alle mehrere Aspekte der neuronalen Differenzierung steuern. Entweder regulieren sie sowohl das Zellschicksal wie auch späte neuronale Differenzierungsgene, oder sie regulieren verschiedene Teilaspekte der Differenzierung in unterschiedlichen Neuronentypen. AST-1 bildet hier eine Ausnahme und kontrolliert hingegen in der neuronalen Differenzierung nur einen Aspekt, das zielgerichtete Auswachsen von Axonen und dies wiederum nur in einer spezifischen Untergruppe von Interneuronen und einer Gruppe von Motoneuronen.

A



B

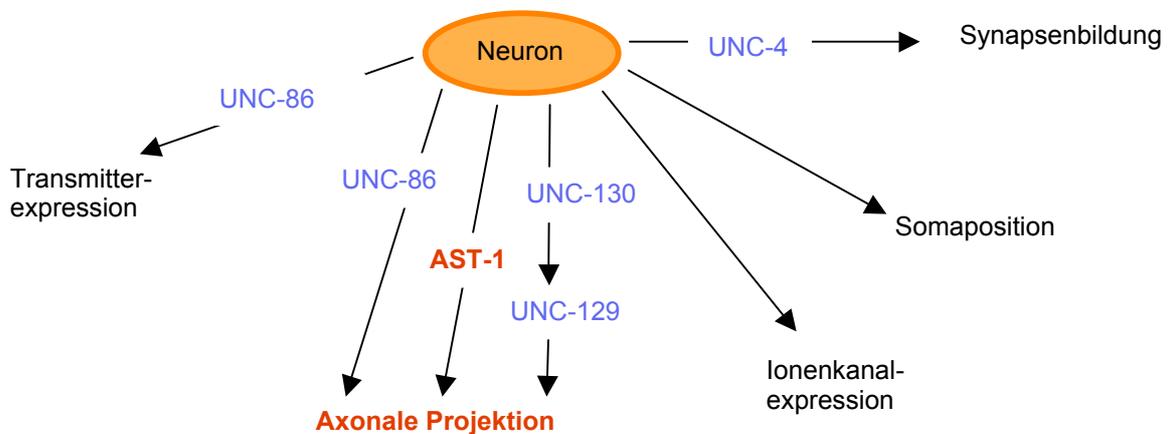


Abb.33: Modell zur Funktion von AST-1 in neuronaler Differenzierung

Schematische Abbildung des neuronalen Differenzierungsprozesses in *C. elegans*. A: Der Neuroblast (NB) wird durch die Expression einer bestimmten Anzahl von Transkriptionsfaktoren zu einem bestimmten Neuronentyp. In dieser Abbildung sind nur wenige ausgewählte Transkriptionsfaktoren dargestellt, die bei der Bestimmung des Zellschicksals eine Rolle spielen. B: Wenn die Zellidentität festgelegt ist, werden einzelne Aspekte, wie Neurotransmitterexpression und axonales Auswachsen, spezifisch bis zur vollständigen Reife des Neurons reguliert. Bisher sind außer AST-1 und UNC-4 keine Transkriptionsfaktoren bekannt, die ausschließlich späte Schritte der neuronalen Differenzierung steuern. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass AST-1 nur die Ausbildung der korrekten axonalen Projektionen steuert.

AST-1 ist demnach ein Transkriptionsfaktor, der einen bestimmten Teilaspekt der neuronalen Differenzierung reguliert und nicht die gesamte neuronale Identität beeinflusst. Da *ast-1* eine sehr spezifische Funktion besitzt, reguliert es wahrscheinlich direkt die Expression von Genen, die an der axonalen Wegfindung beteiligt sind. Allerdings wird *ast-1* nicht in allen Neuronen, die in der Mutante axonale Defekte zeigten, exprimiert. Dies deutet darauf hin, dass es auch Komponenten der Signalwege reguliert, die nicht zellautonom agieren. AST-1 kontrolliert spezifisch einen Teilschritt der neuronalen Differenzierung und steuert zudem einen gleichfalls späten Abschnitt der Differenzierung eines anderen Gewebes (Pharynx). Die Analyse von AST-1 zeigt, dass es spezifische Transkriptionsfaktoren gibt, die in ganz bestimmten Neuronen nur das axonale Auswachsen regulieren ohne in andere Prozesse einzugreifen. Damit ist vorstellbar, dass AST-1 an der Feinregulation von Entwicklungsprozessen des Nervensystems beteiligt ist.

3.4 *Ast-1* interagiert mit bekannten Genen, die an axonaler Wegfindung beteiligt sind

3.4.1 *Ast-1* interagiert mit Komponenten des Netrin-Signalweges

Die Gene, deren Expression AST-1 reguliert, sind bisher unbekannt. Aber durch genetische Experimente wurden Anhaltspunkte dafür gefunden, bei welchen Mechanismen der axonalen Wegfindung *ast-1* eine Rolle spielt. In *C. elegans* sind viele Mutanten mit Defekten im zielgerichteten Auswachsen von Axonen bekannt. Durch das Studium von Doppelmutanten konnten Gene identifiziert werden, die mit *ast-1* in einem gemeinsamen funktionellen Weg liegen.

Es konnte eine genetische Interaktion zwischen *ast-1* und *unc-40*, das für einen Rezeptor von UNC-6/Netrin kodiert, nachgewiesen werden. Die Faszikulierungsdefekte der Interneurone im Ventralstrang zeigten einen epistatischen Effekt, d. h. die Anzahl der Tiere mit Defekten war in der Doppelmutante genauso hoch wie in der stärkeren *ast-1* Einzelmutante. Der synergistische Effekt beim Auswachsen der PVC Axone zeigt, dass das Zusammenspiel von *ast-1* und *unc-40* hier besonders wichtig ist. Überraschender Weise zeigt *ast-1* jedoch keinen synergistischen Effekt mit dem bisher einzigen bekannten Liganden des UNC-40/DCC Rezeptors, *unc-6*. Dieses Ergebnis läßt den Schluß zu, dass *ast-1* unabhängig von *unc-6* mit *unc-40* interagiert. UNC-40/DCC besitzt auch von UNC-6/Netrin unabhängige Funktionen im Auswachsprozeß von Axonen und in der

Zellwanderung (Hedgecock et al., 1987; Hedgecock et al., 1990; Kim et al., 1999; Honigberg und Kenyon, 2000).

Das Aktin regulierende Protein UNC-34/ENA ist Teil der Signalweiterleitung in das Zellinnere sowohl über UNC-40/DCC als auch über SAX-3/Robo (Yu et al., 2002). Wie erwartet, da *ast-1* mit *unc-40* im selben Signalweg liegt, konnte in der *ast-1; unc-34* Doppelmutante im Auswachsen von Interneuronaxonen eine synergistische Interaktion nachgewiesen werden. UNC-34 spielt wie sein Homolog Enabled in *D. melanogaster* eine Rolle in der Aktinpolymerisation und ist wahrscheinlich die Verbindung zum Zytoskelett. Dazu gibt es allerdings bisher keine weiterführenden Daten. UNC-34 könnte in der Signalweitergabe von UNC-40 zu Veränderungen des Zytoskeletts und somit zu einer Richtungsänderung des auswachsenden Wachstumskegels führen.

3.4.2 *Ast-1* interagiert mit Nidogen

Es konnte gezeigt werden, dass *ast-1* genetisch mit *nid-1* interagiert. Die Anzahl der Tiere mit Faszikulierungsdefekten im Ventralstrang war in den beiden Einzelmutanten und in der *ast-1; nid-1* Doppelmutante ungefähr gleich hoch (35%). Nidogen Mutanten besitzen starke axonale Defekte im Ventralstrang (Kim und Wadsworth, 2000). Nidogen wird überwiegend von Muskelzellen exprimiert und ist eine Komponente der Basalmembran von Muskelzellen, die Axone an der Mittellinie leitet. Anhand von Defekten im gerichteten Auswachsen des SDQR Axons wurde gezeigt, dass *nid-1* mit *unc-40* in einem Signalweg liegt (Kim und Wadsworth, 2000).

Alle drei Komponenten (*unc-34*, *unc-40* und *nid-1*) können in einen einzigen Signalweg eingeordnet werden, der von AST-1 reguliert wird. Man kann sich vorstellen, dass NID-1 als extrazelluläre Matrixkomponente mit dem UNC-40 Rezeptor direkt oder über andere Moleküle interagiert. UNC-40 leitet das Signal weiter in das Zellinnere zu dem Aktin-modulierenden Protein UNC-34. Dies könnte in einem letzten Schritt zur Richtungsänderung des Wachstumskegels führen. Bisher sind keine regulatorischen Moleküle bekannt, die die Expression von UNC-40 und UNC-34 steuern. AST-1 könnte die Expression von einer oder allen drei Komponenten kontrollieren.

Der Phänotyp der *ast-1* Mutante unterscheidet sich von dem der *unc-40* oder *unc-34* Mutante. Dies macht es unwahrscheinlich, dass AST-1 für die gesamte Expression von einem der Gene zuständig ist. AST-1 reguliert deren Expression vielleicht nur in einer

Untergruppe von Neuronen. Vorstellbar wäre auch, dass AST-1 Komponenten des Signalweges reguliert, die noch unbekannt sind und die Bestimmung der Zielgene zu einer Identifizierung von neuen Signalmolekülen führt.

3.5 Ausblick

Viele Beispiele belegen die bisherige Annahme, dass ein Transkriptionsfaktor in einem bestimmten Neuron mehrere wenn nicht alle Aspekte der Differenzierung reguliert (Wacker et al., 2003; Sarafi-Reinach und Sengupta, 2000; Way und Chalfie, 1988; Desai et al., 1988; Baran et al., 1999; Jin et al., 1994; Hobert et al., 1999; Lundgren et al., 1995; Landgraf et al., 1999; Doe et al., 1988). Die Analyse von AST-1 hat einen neuen Aspekt der Regulation der Differenzierung gezeigt. Nach den bisherigen Ergebnissen besitzt AST-1 eine hohe funktionelle Spezifität und stellt damit eine Ausnahme unter den Transkriptionsfaktoren dar. Es reguliert nur einen Teilaspekt der neuronalen Differenzierung, nämlich das zielgerichtete Auswachsen von Axonen, und das auch nur in einer bestimmten kleinen Untergruppe von Neuronen. Es gibt demnach Transkriptionsfaktoren, die ausschließlich zur Feineinstellung eingesetzt werden.

Ziel unseres Screens war, neue Rezeptoren oder extrazelluläre Signalmoleküle zu isolieren, die das zielgerichtete Auswachsen von Axonen steuern. Wir haben mehrere Transkriptionsfaktoren und intrazelluläre Komponenten von Signalkaskaden isoliert (Hutter et al., Manuskript in Vorbereitung). Vergleichbare Ergebnisse lieferten Screens anderer Forschungsgruppen (persönliche Mitteilung von S. Clark, G. Garriga). Dies legt die Vermutung nahe, dass die Mehrzahl der Rezeptoren und extrazellulären Signalmoleküle, die am Prozess der axonalen Wegfindung beteiligt sind, bereits identifiziert sein könnten. Der Fokus läge dann vielmehr auf der stringenten Regulation einer relativ geringen Anzahl von Rezeptoren und Signalmolekülen. Die Regulation würde damit eine weitaus größere Rolle als bisher angenommen spielen und die große Vielfalt des axonalen Auswachsens erst möglich machen.

Zukünftige Experimente werden zeigen, ob AST-1 der erste Vertreter einer Anzahl spezifischer Transkriptionsfaktoren ist und ob sie ein generelles Prinzip in der Regulation von Differenzierungsprozessen darstellen.

4 Material und Methoden

4.1 Material

4.1.1 Geräte

Lichtmikroskop MZ6	Leica, Solms
Axioskop	Zeiss, Oberkochen
Axioplan2	Zeiss, Oberkochen
Axiovert100	Zeiss, Oberkochen
Videokamera am Axioskop	Hamamatsu, Japan
Gekühlte CCD Camera Controller C5985	Hamamatsu, Japan
Mikromanipulator	Luigs & Neumann
pco. sensicam	PCO, Kehlheim
Julabo F12	Julabo, Seelbach

4.1.2 Chemikalien

Agar	Difco Labs, Detroit, USA
Agarose	Gibco BRL, Eggenstein
Aminosäuren	Sigma, Deisenhofen
Ampizillin	AppliChem, Leopoldshöhe
Bacto-Pepton	Difco Labs, Detroit, USA
Borsäure	Merck, Darmstadt
Chloramphenikol	Sigma, Deisenhofen
Chloroform	J.T.Baker, Holland
Desoxynukleotide	Roche, Mannheim
DiI	Molecular Probes, Holland
DMSO	Serva, Heidelberg
EDTA	Sigma, Deisenhofen
Ethylmethansulfonat (EMS)	Sigma, Deisenhofen
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethanol	J.T.Baker, Holland
Ethidiumbromid	Serva, Heidelberg
Glukosemonohydrat	Roth, Karlsruhe
Glyzerin	Roth, Karlsruhe
Glyzin	Serva, Heidelberg
Isopropanol	J.T.Baker, Holland
Levamisol	Sigma, Deisenhofen
L-Glutamin	Gibco BRL, Eggstein
Kanamycin	Sigma, Deisenhofen
Methanol	J.T.Baker, Holland
Natriumazid	Merck, Darmstadt

NP-40	Sigma, Deisenhofen
Phenol	J.T.Baker, Holland
Salzsäure	Serva, Heidelberg
SDS	Sigma, Deisenhofen
Tris	Serva, Heidelberg
Triton X-100	BioMol, Hamburg
Tween 20	Serva, Heidelberg
Hefestickstoffbasis	Difco Labs, Detroit, USA
Hefeextrakt („Select yeast extract“)	Difco Labs, Detroit, USA

4.1.3 Verbrauchsmaterialien

DNA Standard 1kb DNA Ladder	Gibco BRL
DNA Standard 100bp Ladder	New England Biolabs
DNA Standard λ DNA/HindIII Fragmente	Gibco BRL
DNA Standard Smart Ladder	Eurogentech, Belgien
Glaskapillare (Filament-Borosilicatglas-Mikroelektrode)	Hilgenberg
Plasmid Mini Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
DNA Säulen Qiagen-tip 20	Qiagen, Hilden
Genomic DNA Kit	Qiagen, Hilden
Platindraht	Goodfellow, England

4.1.4 Enzyme

Expand Long Template PCR System	Roche, Mannheim
SAP (Shrimp alkalische Phosphatase)	Roche, Mannheim
T4 DNA-Ligase	Roche, Mannheim
<i>Pfx</i> -DNA-Polymerase	Gibco BRL, Eggenstein
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase	Gibco BRL, Eggenstein
Restriktionsendonukleasen	Roche, Mannheim
	New England BioLabs, Schwalbach
RNase A	Roche, Mannheim
Proteinase K	Gibco BRL, Eggenstein
Gateway BP und LR Clonase Enzym Mix	Gibco BRL, Eggenstein
Lyticase	Sigma, Deisenhofen
ExAssist Interference-Resistant Helper Phage #200253	Stratagene

4.1.5 Oligonukleotide

In der Regel liegen die Startermoleküle bei einer Endung mit ungerader Zahl auf dem Sinnstrang, bzw. bei einer Endung mit gerader Zahl auf dem Gegensinnstrang. Alle Oligonukleotide sind von 5' in Richtung 3' angeben.

Oligonukleotide zur Sequenzierung von Plasmiden

HH_SEPR1	atggctgaaatcactcacaacg
HH_SEPR8	gccctattattttgacacc
CS_T3.25	cgcgcaattaaccctcactaaaggg
CS_T7.24	cgtaatacactcactataggggg

Oligonukleotide für Klonierungen

HH_DsRed_1	atgacatgattacgccaagc
HH_DsRed_2	caccatctgttccttagcggcaattgaataat
HH_unc47_1	aaactgcagggctaacccggggcacaataca
HH_unc47_2	gcctctagagcctcgatcgcaagagttat
HH_unc129_1	ggctctagattggcacaagttgatccgaatc
HH_unc129_2	cgcggatcctttctgtctcttccaat
HH_odr2_1	aatactgcagcagcattcacctgattcttgc
HH_odr2_2	ttatggatccctcgacaatggaaggtgcattc
CS_ast-1cDNAfusion_kpn_2	ggtacctagctgggtatcgataaagagggaatgctcg
CS_ast-1_sal_2	gatgaaatccattacctgatcc
CS_ast-1_sal-3	tgacgcgtcgactgaccaagttgcagaattgcc
CS_attB1promoter1	ggggacaagttgtacaaaaagcaggctgcctgtccgcctacaaaagctggcc
CS_attB2promoter1	ggggaccactttgtacaagaagctgggtccgctcctttctgtatctg
CS_attB1promoter3	ggggacaagttgtacaaaaagcaggctggttaagattcttcagaggctc
CS_attB2gene	ggggaccactttgtacaagaagctgggtatcgataaagagggaatgctcgt

Oligonukleotide zur Sequenzierung der genomischen *ast-1* Sequenz

CS_T08H4.3seq1	ggagtgttaaggagatttagatggc
CS_T08H4.3seq2	cttccttccaaccaatgagccg
CS_T08H4.3seq3	gctgcaatgcggtttagggc
CS_T08H4.3seq4	ctgctgattccgccgatgattcggc
CS_T08H4.3seq5	caacaaaagttgtcgagactggg
CS_T08H4.3seq6	cgaagtgttaaatagtatacggg
CS_T08H4.3seq7	ccaccaaattgattccgtgccc
CS_T08H4.3seq8	gaagcaaattgacgactatac
CS_T08H4.3seq9	gtacaactcaggagactagatgg
CS_T08H4.3seq10	gcatagttataggaatcgcacaggg
CS_T08H4.3seq11	ggtagtgtgtagacaagtagaaagc
CS_T08H4.3seq12	agggttgaacacaagtgatgagcc
CS_T08H4.3seq13	atcagtgcgcaattgtttctgcc
CS_T08H4.3seq14	gaaattgaaacatggtgcaacgc
CS_T08H4.3seq15	ggttactgtggtactacagtc
CS_T08H4.3seq16	gttacttgagtattctcactgc
CS_T08H4.3seq17	ctggaaggatccgtgaccaatgg
CS_T08H4.3seq18	ctagattctctgtcacacttccg
CS_T08H4.3seq19	gcgagatatggtcagtcgagcc
CS_T08H4.3seq20	gaatttatgctagactagttagtg

Oligonukleotide für die Isolierung der *ast-1(hd92)* Deletionsmutante

CS_T08H4.3_dx3	aacacctgctcattctccatt
CS_T08H4.3_dx4	agaaatcccgtcacttcaaaa
CS_T08H4.3_dx5	agccaagcctaagtctaagaac
CS_T08H4.3_dx6	atgggtgaaaattgtgctgccg
CS_T08H4.3_di3	tgttcgagcagagcatctaatt
CS_T08H4.3_di4	gcactgtagttgactgatgggt
CS_T08H4.3_dp3	tgaatattgccgggttaatgt

Oligonukleotide für die snip-SNP Kartierung auf Chromosom II

Positon	Name LG2-SNP	Sequenz	Produkt- größe in bp	Enzym	Verdau-Fragmente in bp N2 CB4856
-17,86	1_1 1_2	aagaggtgttcttctgcagc accatccacgcagttcattc	619	<i>DraI</i>	402, 172, 44 574, 44
-7,65	6_1 6_2	tgaactgtccatcaccatctc ttctcccctcattctgtcttc	697	<i>DraI</i>	511, 174, 12 265, 246, 174, 12
-6,95	7_1 7_2	tccaagaaggctcaaacactc tcaccgactttttgtctcc	794	<i>DraI</i>	306, 286, 202 488, 306
-6,47	8_1 8_2	ctgcccctatcatttttgc ctcccctcattctgtctcatg	234	<i>Tsp509I</i>	197, 37 115, 82, 37
-6,25	9_1 9_2	ttgagtctcaaatggcgctg gggtgtctttgccatggttg	450	<i>DraI</i>	450 253, 196
-5,92	33_1 33_2	cggcattgggggagcaatgattac cgactagctgatcgcctttgaggc	405	<i>BstEII</i>	405 240, 165
-5,54	34_1 34_2	ggaagaatgagcaggtgttgag gggttgaacacaagtgatgagc	436	<i>XmnI</i>	224, 212 436
-5,46	32_1 32_2	gcttcacaatttcagacgtcgg ggtctgacgaatggaatcgttcgg	347	<i>KpnI</i>	227, 120 347
-5,03	22_1 22_2	gcgtgtttttccgtcgtatcg cagcgtccagactggtttgg	674	<i>HaeII</i>	460, 215 675
-4,55	23_1 23_2	gcatttctcagcacaccgg ctgttacaanaaccactcaaatc	573	<i>LweI</i>	--- 295, 278
-3,98	24_1 24_2	gttgagttcaccacttcagcgg ctgtcaggttcgatcgtc	519	<i>AhdI</i>	291, 228 ---
-3,33	27_1 27_2	ctcgacatcgcatgttgag gtctcagtagatgggaagcc	542	<i>NdeI</i>	--- 271, 271
-2,82	28_1 28_2	gctgacgcacagcgtatgac ccacaagaggccgcttgatatctc	457	<i>SfiI</i>	--- 279, 178
-1,95	11_1 11_2	gtgtgttcagtttgtgtcg aatatgctgtgtgacttgc	256	<i>NlaIII</i>	128, 128 256
-0,30	12_1 12_2	atcgtggagaacctgtaagtg cgtccactcatcaaatgag	882	<i>NspI</i>	634, 247 882
0,11	13_1 13_2	tccacactattccctcgtg gagcaatcaagaaccggatc	495	<i>DraI</i>	299, 125, 70] 369, 125
8,20	18_1 18_2	ctccttcagtaccatattggctc tcgggtctctccaaaactc	666	<i>EcoRI</i>	666 391, 274
13,66	19_1 19_2	taggaaagtgtgtccactgg tgatgactccttctcagctgc	449	<i>HlnI</i>	449 288, 160

Oligonukleotide zur Sequenzierung und Amplifizierung von Fragmenten vom Cosmid H37P12

CS_pFos1seq1	aggccagaagcataactggc
CS_pFos1seq2	cgatttaggtgacactatagg
CS_pFos1seq3	gagactacgattccatcaatgcc
CS_F56D3_2	gacaatgtgagaagaagaatgcgg
CS_Y54C5A_1	gttatagctttctgtgaagattgagc
CS_R03H10seq4	atctagagcttggtaattcc
CS_F56D3_1	gctggaagacgaccattccgtgg

4.1.6 Plasmide

Name	Eigenschaften	Referenz
pBS SKII+	Prokaryontischer Klonierungsvektor mit Blau-Weiss-Selektion (α -Komplementierung)	Stratagene
pDsRed	Prokaryontischer Expressionsvektor, der für das rote FP (DsRed) kodiert	Clontech
pDsRed2-N1	Prokaryontischer Expressionsvektor, der für eine Variante des roten FPs (DsRed2) kodiert	Clontech
pVH10.10	<i>C. elegans</i> CFP-Vektor ohne Promotor	H. Hutter

Name	Eigenschaften	Referenz
pVH20.01	<i>C. elegans</i> YFP-Vektor ohne Promotor	H. Hutter
pG75#KP6	5,3 kb <i>glr-1</i> -Promotorregion stromaufwärts von GFP aus <i>C. elegans</i>	A. Fire
pDONR201	GATEWAY Donorvektor	Gibco BRL
pVH12.09	<i>C. elegans</i> Vektor pVH20.01 mit RfcC-Stelle für GATEWAY - Klonierungen	S. Voltmer (2001)

In dieser Arbeit konstruierte Plasmide

Name	Klonierung	Eigenschaften
GFP- Reporter in <i>C. elegans</i>		
pVHDsRed	RFP cDNS mit PCR aus pDsRed amplifiziert (Primer: HH_pDsRed_1/HH_pDsRed_2), mit <i>AgeI/MfeI</i> verdaut und in pVH20.01 (<i>AgeI/EcoRI</i>) kloniert	DsRed ohne Promotor
pVH14.01	5,3 kb <i>glr-1</i> -Promotor Region aus pG46#KP6 (<i>PstI/BamHI</i>) isoliert und in pVHDsRed (<i>PstI/BamHI</i>) kloniert	<i>glr-1</i> ::DsRed
pVH14.02	1,5 kb <i>unc-47</i> -Promotor Region mit PCR aus genomischer <i>C. elegans</i> DNS amplifiziert (Primer: HH_unc47_1/HH_unc47_2), mit <i>PstI/XbaI</i> verdaut und in pVH20.01 (<i>PstI/XbaI</i>) kloniert	<i>unc-47</i> ::YFP
pVH14.03	2,6 kb <i>unc-129</i> -Promotor Region mit PCR aus genomischer <i>C. elegans</i> DNS amplifiziert (Primer: HH_unc129_1/HH_unc129_2), mit <i>XbaI/BamHI</i> verdaut und in pVH10.10 (<i>XbaI/BamHI</i>) kloniert	<i>unc-129</i> ::CFP
pVH14.04	2,7 kb <i>odr-2</i> -Promotor Region mit PCR aus genomischer <i>C. elegans</i> DNS amplifiziert (Primer: HH_odr2_1/HH_odr2_2), mit <i>BamHI/PstI</i> verdaut und in pPD95.75 (<i>BamHI/PstI</i>) kloniert	<i>odr-2</i> ::GFP
pVH14.05	RFP2 cDNS aus pDsRed2-N1 (<i>AgeI/MfeI</i>) isoliert und in pVH20.01 (<i>AgeI/EcoRI</i>) kloniert	DsRed2 ohne Promotor

***ast-1* Reporter-Konstrukte**

pVH14.06	GATEWAY Entry Vector: <i>ast-1</i> 2,5 kb Promotorregion mit PCR aus dem Cosmid H37P12 amplifiziert (Primer: attB1promoter1 [startet 2,5 kb stromaufwärts des Start-Codons von <i>ast-1</i>] / attB2promoter1 [startet 6 bp stromaufwärts des Start-Codons von <i>ast-1</i>]) und mittels einer BP Reaktion in pDONR201 rekombiniert	Promotor
pVH14.07	GATEWAY Expression Vector: <i>ast-1</i> 2,5 kb Promotorregion in pVH14.06 mittels einer LR Reaktion mit pVH12.09 rekombiniert	Promotor::YFP
pVH14.10	GATEWAY Entry Vector: Δ <i>ast-1</i> 6,5 kb genomische Region mit PCR aus dem Cosmid H37P12 amplifiziert (Primer: attB1promoter3 [startet an Position 341 der ungespleißten DNS Sequenz]/ attB2gene [startet am Stop-Codon mutiert]) und mittels einer BP Reaktion in pDONR201 rekombiniert	Δ <i>ast-1</i>
pVH14.11	GATEWAY Expression Vector: Δ <i>ast-1</i> 6,5 kb genomische Region in pVH14.10 mittels einer LR Reaktion mit pVH12.09 rekombiniert	Δ <i>ast-1</i> ::YFP-Fusion
pVH14.12	7,1 kb Δ <i>ast-1</i> genomische Region (ab dem zweiten Intron bis zum mutierten Stop-Codon) fusioniert an YFP aus pVH14.11 (<i>SalI/EagI</i>) isoliert und in pBS SK- (<i>SalI/EagI</i>) kloniert	Δ <i>ast-1</i> ::YFP-Fusion
pVH14.13	4,2 kb <i>ast-1</i> genomische Region (Promotorregion bis zum zweiten Intron) mit <i>SalI</i> aus pVH14.14 isoliert und in pVH14.12 (<i>SalI</i>) kloniert	Promotor- <i>ast-1</i> -YFP-Fusion
pVH14.14	4,2 kb <i>ast-1</i> genomische Region (2,5 kb Promotor bis zum Ende von Exon 3 Position 1588) mit PCR aus H37P12 amplifiziert (Primer: CS_ast-1_sal_3/CS_ast-1_sal_2), mit <i>SalI</i> verdaut und in pBS SK- (<i>SalI</i>) kloniert	

***ast-1* cDNS Konstrukte**

pVH14.15	<i>ast-1</i> cDNS yk533 mit PCR aus pVH14.19 amplifiziert (Primer: CS_T3.25/CS_ast-1cDNAfusion_kpn_2; Stop Codon mutiert), mit <i>KpnI/XmaI</i> verdaut und in pBS SK+ (<i>KpnI/XmaI</i>) kloniert	<i>ast-1</i> cDNS Stop*
pVH14.16	<i>ast-1</i> cDNS yk533 mit <i>KpnI/XmaI</i> aus pVH14.15 isoliert und in pVH20.01 (<i>KpnI/XmaI</i>) kloniert	<i>ast-1</i> cDNS::YFP-Fusion

Name	Eigenschaften	Referenz
pVH14.17	<i>ast-1</i> cDNS yk533 mit <i>KpnI/XmaI</i> aus pVH14.15 isoliert und in pG75#KP6 (<i>KpnI/XmaI</i>) kloniert	<i>glr-1::ast-1</i> cDNS::GFP-Fusion
pVH14.18	<i>ast-1</i> cDNS (yk399) aus einem Phagemid stammend wurde in pBS SK- kloniert	<i>ast-1</i> cDNS
pVH14.19	<i>ast-1</i> cDNS (yk533) aus einem Phagemid stammend wurde in pBS SK- kloniert	<i>ast-1</i> cDNS

4.1.7 Cosmide und Yeast Artificial Chromosomes (YACs)

Die folgenden Cosmide und YACs wurden vom Sanger Center, Hinxton Hall, Cambridge von Dr. A. Coulson erhalten. Die Cosmide und YACs wurden überwiegend für Rettungsexperimente und als Matrize zur Amplifizierung von Genen verwendet.

Cosmide: C33F10, F26G1, C27D9, F41C3, F10G7, F35D11, M03A1, K07E1, CB3, B0304, T05C1, W06B4

YACs: Y102C2, Y97H1, Y75H11 in dem Wirtstamm AB1380

4.1.8 cDNAs

Die cDNA Klone yk399 und yk533 wurden vom Japanese National Institute of Genetics, Mishima, Japan von Prof. Dr. Y. Kohara erhalten.

4.1.9 *E. coli* Stämme

Name	Genotyp	Referenz
OP50	ura-	(Brenner, 1974)
Subcloning Efficiency DH5a Chemically Competent Cells	F'f80 <i>lacZDM15</i> , D(<i>lacZYA-argF</i>)U169, <i>deoR</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> (<i>r_K⁻, m_K⁺</i>), <i>phoA</i> , <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> , <i>gyrA46</i> , <i>relA1</i> , λ	Invitrogen
SOLR™	e14(McrA ⁻) D(<i>mcrCB-hsdSMR-mrr</i>)171 <i>sbC recB rec J uvrC umuC::Tn5(Kan^r) lac gyrA96 relA1 thi-1 endA1</i> λ R {F' <i>proAB lacI^dZDM15</i> } ^c Su ⁻	Stratagene
XL1-Blue MRF'	D(<i>mcrA</i>)183 D(<i>mcrCB-hsdSMR-mrr</i>)173 <i>endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac</i> {F' <i>proAB lacI^dZDM15 Tn10(Tet^r)</i> } ^c	Stratagene

4.1.10 Hefestämme

AB1380 ura- (Burke et al., 1987)

4.1.11 *C. elegans* Stämme

Alle *C. elegans* Stämme wurden entweder vom „*C. elegans* Genetic Center“ (CGC) an der Universität von Minnesota (USA), bezogen oder von dem Labor, das die Stämme generiert hatte, erhalten. Die Stämme, die mit VH beginnen, wurden in unserem Labor generiert. Als Wildtypstamm wurde N2 var. *Bristol* verwendet.

Stamm	Genotyp	Referenz
CB53	<i>unc-5(e53) IV</i>	E. Hedgecock
CB96	<i>efn-1(e96) IV</i>	CGC
CB128	<i>dpy-10(e128) II</i>	CGC
CB271	<i>unc-40(e271)I</i>	CGC
CB4856	Hawaii	CGC
CB5584	<i>mIs12 II[myo-2::<i>GFP</i>, pes-10::<i>GFP</i>, gut::<i>GFP</i>]</i>	J. Hodgkin
CX3198	<i>sax-3(ky123) X</i>	C. Bargmann
CX5315	<i>unc-6(ev400) slt-1(eh15) X; kyIs104</i>	C. Bargmann
EW23	<i>unc-104(e1265) rol-6(e187) II</i>	CGC
IM324	<i>nid-1(ur41) V</i>	W. Wadsworth
KM173	<i>Ex{opt-3::<i>GFP</i>, rol-6(su1006)}</i>	D. Miller
NW434	<i>unc-6(ev400) X</i>	E. Hedgecock
NW1229	<i>Is[F25B3.3::<i>GFP</i>]</i>	CGC
MT633	<i>lin-11(n389) I; him-5(e1467) V</i>	CGC
MT9495	<i>nIs96 V</i>	B. Horvitz
OH103	<i>mgIs21(pIIn-11ABCDE::<i>GFP</i>)</i>	CGC
VH4	<i>rhIs4 III; zag-1(rh315) IV</i>	
VH338	<i>hdIs12</i>	
VH230	<i>hdIs4 (glr-1::snb-1::<i>YFP</i>)</i>	
VH15	<i>rhIs4 II</i>	
VH17	<i>ast-1(rh300) II; rhIs4 III</i>	
VH28	<i>unc-40(e271) I; rhIs4 III</i>	
VH56	<i>dpy-10(e128) ast-1(rh300) II; rhIs4 II</i>	
VH58	<i>rol-6(e187) II; rhIs4 III</i>	
VH89	<i>rhIs4 III; sax-3(ky123) X</i>	
VH94	<i>rhIs16 X</i>	
VH141	<i>ast-1(hd1) rol-6 (e187) II; rhIs4 III</i>	
VH318	<i>hdIs10</i>	
VH454	<i>unc-34(e566) hdIs10 V</i>	
VH497	<i>oyIs32</i>	P. Sengupta
VH507	<i>hdIs21 X</i>	
VH540	<i>nid-1(ur41); hdIs11</i>	
VH577	<i>hdIs22</i>	
VH616	<i>rhIs4; hdIs22</i>	
VH684	<i>hdIs26</i>	
SP300	<i>unc-6(e78) X; mnDp30(X;f)</i>	CGC
VT454	<i>maDf4/ dpy-10(e128) unc-104(e1265) II</i>	CGC
ZB137	<i>nIs83{mec-4p::<i>GFP</i>, rol-6(su1006)} V</i>	CGC

In dieser Arbeit konstruierte *C. elegans* Stämme:

Stamm	Genotyp
VH 177	<i>ast-1(rh300) unc-104(e1265) II; rhIs4 III</i>
VH 181	<i>ast-1(rh300) rol-6 (e187) II; rhIs4 III</i>
VH320	<i>ast-1(hd1) rol-6(e187) II; rhIs4 III; sax-3 (ky123) X</i>
VH321	<i>rol-6 (e187) II; rhIs4 III; sax-3 (ky123) X</i>
VH377	<i>ast-1(rh300) rol-6(e187) II; rhIs16 X</i>
VH399	<i>ast-1(rh300) rol-6(e187) II; rhIs16 X; Is[F25]3.3::<i>GFP</i>]</i>
VH445	<i>ast-1(rh300) rol-6(e187) II; rhIs16 X; hdIs4</i>
VH456	<i>ast-1(rh300) II; rhIs4 III; hdEx195{ast-1(+), rol-6(su1006)}</i>
VH478	<i>rh300 rol-6(e187) II; hdIs12</i>
VH527	<i>ast-1(rh300) II; rhIs4 III; hdEx202{ast-1(+), rol-6(su1006)}</i>
VH546	<i>rol-6(e187) II; rhIs4 III ; zag-1(rh315) IV</i>
VH547	<i>rh300 rol-6(e187) II; rhIs4 III ; zag-1(rh315) IV</i>
VH548	<i>rol-6(e187) II; rhIs4 III ; efn-1(e96) IV</i>
VH549	<i>rh300 rol-6(e187) II; rhIs4 III ; efn-1(e96) IV</i>
VH550	<i>unc-40(e271) I; rol-6(e187) II; rhIs4 III</i>
VH551	<i>unc-40(e271) I; rh300 rol-6(e187) II; rhIs4 III</i>
VH553	<i>rol-6(e187) II; rhIs4 III ; unc-5(e53) IV</i>
VH554	<i>rh300 rol-6(e187) II; rhIs4 III ; unc-5(e53) IV</i>
VH555	<i>rol-6(e187) II; rhIs4 III ; unc-6(ev400) X</i>
VH556	<i>rh300 rol-6(e187) II; rhIs4 III ; unc-6(ev400) X</i>

Stamm	Genotyp
VH557	<i>lin-11(n389) I; rol-6(e187) II; rhIs4 III</i>
VH558	<i>lin-11(n389) I; rh300 rol-6(e187) II; rhIs4 III</i>
VH590	<i>rh300 rol-6(e187) II; opt-3::GFP rol-6(su1006); rhIs16 X</i>
VH591	<i>rh300 rol-6(e187) II; hdIs10 V</i>
VH626	<i>rh300 rol-6(e187) II; nid-1(nr41); hdIs11</i>
VH627	<i>unc-6(ev400) X; opt-3::GFP rol-6(su1006)</i>
VH628	<i>rh300 rol-6(e187) II; nIs96; rhIs16 X</i>
VH629	<i>rh300 rol-6(e187) II; hdIs22; rhIs4 III</i>
VH657	<i>rol-6(e187) II; unc-34(e566); hdIs10 V</i>
VH658	<i>rh300 rol-6(e187) II; unc-34(e566); hdIs10 V</i>
VH702	<i>ast-1(rh300) II; rhIs4 III; hdEx221{ast-1(+), rol-6(su1006)}</i>
VH704	<i>ast-1(rh300) II; rhIs4 III; hdEx222{ast-1(+), rol-6(su1006)}</i>
VH740	<i>rhIs4 III; hdEx221 {ast-1(+), rol-6(su1006)}</i>
VH751	<i>unc-6(e78)X</i>
VH752	<i>ast-1(rh300) rol-6(e187) II; hdIs26</i>
VH777	<i>ast-1(rh300) II; rhIs4 III; hdEx234{ast-1(+), rol-6(su1006)}</i>
VH779	<i>ast-1(rh300) II; rhIs4 III; hdEx236{ast-1(+), rol-6(su1006)}</i>
VH781	<i>rh300 rol-6(e187) II; hdIs26 III; rhIs5 X</i>
VH836	<i>rol-6(e187) II; rhIs4 III; unc-6(e78) X</i>
VH837	<i>rh300 rol-6(e187) II; rhIs4 III; unc-6(e78) X</i>
VH838	<i>rol-6(e187) II; rhIs4 III; unc-6(ev400) slt-1(eh15) X</i>
VH839	<i>rh300 rol-6(e187) II; rhIs4 III; unc-6(ex400) slt-1(eh15) X</i>
VH840	<i>rh300 II; rhIs16 X</i>
VH872	<i>rh300 II; hdIs30</i>
VH873	<i>rh300 rol-6(e187) II; hdIs30</i>
VH896	<i>hdEx251{ast-1p1::YFP, rol-6(su1006)}</i>
VH898	<i>hdEx253{ast-1p3::YFP, rol-6(su1006)}</i>
VH900	<i>ast-1(rh300) II; rhIs4 III; hdEx255{ast-1p1::YFP, rol-6(su1006)}</i>
VH902	<i>ast-1(rh300) II; rhIs4 III; hdEx257{ast-1p3::YFP, rol-6(su1006)}</i>
VH961	<i>ast-1(rh300) rol-6(e187) II; hdIs30; mgIs21 {plin-11ABCDE::GFP}</i>
VH962	<i>ast-1(rh300) rol-6(e187) II; hdIs30; oyls31 {lin-11::GFP}</i>
VH963	<i>ast-1(rh300) II; hdIs32; hdIs20 {pzag-1::YFP}</i>
VH973	<i>hdIs30; oyls31 {lin-11::GFP}</i>
VH976	<i>hdIs30; mgIs21 {plin-11ABCDE::GFP}</i>
VH1046	<i>unc-40(e271)I; rol-6(e187)II; rhIs4III; unc-6(ev400)X</i>
VH1047	<i>unc-40(e271)I; rh300 rol-6(e187)II; rhIs4III; unc-6(ev400)X</i>
VH1059	<i>ast-1(rh300) II; hdIs34; nIs83 V</i>
VH1099	<i>ast-1(hd92)/+ II; rhIs4III</i>
VH1100	<i>ast-1(hd92)/mIs12 II; rhIs4III</i>
VH1156	<i>hdEx313{p1:ast-1::YFP, rol-6(su1006)}</i>
VH1160	<i>ast-1(hd92) II; rhIs4 III; hdEx237[ast-1(+), rol-6(su1006)]</i>
VH1162	<i>ast-1(rh300) II; rhIs4 III; hdEx313{p1:ast-1::YFP, rol-6(su1006)}</i>
VH1180	<i>rhIs4 III; hdEx251{ast-1p::YFP; rol-6(su1006)}</i>
VH1181	<i>rhIs4 III; hdEx253{ast-1p3::YFP; rol-6(su1006)}</i>

4.1.12 Puffer und Medien

Medien für Bakterien

Ampizillin	100 µg/ml
Chloramphenicol	20 µg/ml für Plasmide; 50 µg/ml für Cosmide
Kanamycin	10 µg/ml
Tetrazyklin	12,5 µg/ml
LB-Medium	1% Bacto-Trypton; 0,5% Hefeextrakt; 1,0% NaCl
LB-Platten	LB-Medium; 1.2% Bacto-Agar

Medien für *S. cerevisiae*

YPD Medium	10 g Hefeextrakt 20 g Bacto-Pepton ad 900 ml deionisiertes H ₂ O, autoklavieren 100 ml 20% Glukosemonohydrat zugeben, separat autoklaviert
10 x Aminosäure Stammlösung	0,3 g Isoleucin 1 g Valin 0,2 g Adenin 0,2 g Methionin 0,5 g Phenylalanin 2 g Threonin 0,3 g Tyrosin 0,2 g Arginin ad 1 l deionisiertes H ₂ O, autoklavieren
Synthetisches Uracil-Mangelmedium	6,7 g Hefe Stickstoffbasis 100 ml 10 x Aminosäure Stammlösung (siehe oben) 0,1 g Leucin 0,02 g Histidin 0,03 g Lysin 0,02 g Tryptophan 2% Glukosemonohydrat ad 1 l deionisiertes H ₂ O
Hefe-Platten	entsprechendes Medium; 2% Bacto-Agar
Lyticase-Stammlösung	1000 u/ml

Medien für *C. elegans*

2x Einfrierpuffer	100 mM NaCl 50 mM KH ₂ PO ₄ 30% Glycerol mit 1 M NaOH neutralisieren 0,3 mM MgSO ₄ (nach dem Autoklavieren zugeben)
NGM Agar	3 g NaCl 17 g Agar 2,5 g Pepton 1 ml Cholesterol (5 mg/ml in EtOH)
Nach dem Autoklavieren zugeben:	1 ml 1M CaCl ₂ 1 ml 1M MgSO ₄ 25 ml 1M K ₂ HPO ₄ /KH ₂ PO ₄ pH 6
2x Lysepuffer	20 mM Tris/HCl, pH 8,3 100 mM KCl 10 mM EDTA 0,9% Tween20 0,9% NP40 + 0,2 mg/ml Proteinase K
M9 Puffer	22 mM KH ₂ PO ₄ 42 mM Na ₂ HPO ₄ 86 mM NaCl 1 mM MgSO ₄ (erst nach dem Autoklavieren zugeben)
Dil Stammlösung	10 mg/ml gelöst in EtOH, dunkel aufbewahren bei -20°C

4.2 Methoden

Die Standard-Methoden zu DNS Klonierung, Kultivierung von Bakterien, Transformationsverfahren mit kompetenten *E. coli* Zellen, Gelelektrophorese und PCR Techniken wurden aus den Protokollen der folgenden Laborhandbücher abgeleitet:

J. Sambrook, E.F. Fritsch, T. Maniatis; Molecular Cloning, A Laboratory Manual; Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989

F.M Ausubel, R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.G. Seidman, J.A. Smith, K. Struhl; Current Protocols in Molecular Biology; John Wiley & Sons, Inc., 1989

Die Anwendung spezieller molekularbiologischer Techniken, wie beispielsweise die Aufreinigung von Cosmiden und Yeast Artificial Chromosomes (YACs) oder die snip-SNP-Methode zur Kartierung von Mutationen, wird in den nachfolgenden Kapiteln genau beschrieben.

4.2.1 Aufreinigung von Cosmiden aus *E.coli*

Die Cosmide von Dr. Coulson (Sanger Center, Hinxton Hall, Cambridge) basieren auf dem Vektorrückgrat pFOS1 (Coulson et al., 1986). Da dieser Plasmidvektor zwei Lambda *cos* Stellen besitzt, wird er in *E. coli* nicht stabil propagiert.

Die präparative Aufreinigung von Cosmid-DNS aus Bakterienkulturen erfolgt nach einem modifizierten Protokoll von Birnboim und Doly (1979) in Kombination mit einer Säulenchromatographie. Die Cosmidaufreinigung wurde wie folgt durchgeführt:

20 ml ÜN-Kultur werden für 10 min bei 4000 g in einer Kühlzentrifuge abzentrifugiert. Das Bakteriensediment wird in 1,2 ml Puffer P1 resuspendiert und auf zwei 2 ml Eppendorfgefäße aufgeteilt. Nach der Zugabe von 600 µl Puffer P2 werden die Lösungen vorsichtig durch Invertieren der Gefäße gemischt und 5 min bei RT inkubiert. Es werden 600 µl gekühlter Puffer P3 zugegeben, sofort gemischt und 5 min bei 4°C inkubiert. Die Zelltrümmer, denaturierte Proteine und chromosomale DNS werden bei 4°C für 10 min und 13000 g sedimentiert. Der Überstand enthält die Cosmid-DNS und beide Ansätze werden auf eine mit 1 ml Puffer QBT äquilibrierte Qiagen-tip 20-Säule geladen. Nach Durchlauf des Bakterienlysates wird die Säule mit 4 ml Puffer QC gewaschen. Die DNS wird anschließend mit 0,8 ml Puffer QF (auf 65°C vorgewärmt) eluiert. Durch Zugabe von einem 0,7-fachen Volumen Isopropanol wird die DNS ausgefällt und durch Zentrifugation bei 10000 UpM für 30 min bei RT gesammelt, anschließend mit 80% Ethanol gewaschen und 10 min wie oben beschrieben zentrifugiert. Die DNS wird im Vakuum-Konzentrator getrocknet und in 50 µl TE-Puffer gelöst. Von der aufgereinigten DNS wird 1 µl unverdaut und 1 µl nach einem ÜN Verdau mit einem geeigneten Restriktionsenzym auf ein 0,5%-iges Agarosegel aufgetragen und analysiert.

4.2.2 Kultivierung und Aufreinigung von Yeast Artificial Chromosomes (YAC)

Die Hefezellen wurden unter Standardbedingungen genau nach dem Clontech Yeast Protocol Handbuch (PT3024-1, Clontech, Palo Alto, CA, USA) kultiviert.

Die YAC Hefestämme von Dr. Coulson (Sanger Center, Hinxton Hall, Cambridge) wurden als Schrägagarkulturen geliefert, wovon sofort ein Glycerin-Vorrat angelegt wurde. Dazu werden mit der Impföse

Hefezellen aus der Schrägagarkultur in die Einfrierlösung, bestehend aus 100 µl 50% Glycerin und 100 µl Uracil-Mangelmedium, übertragen.

Von den Schrägagarkulturen werden Hefezellen auf selektiven Hefe-Platten ohne Uracil (SD_{-ura}) ausgestrichen und bei 30°C inkubiert. Nach drei Tagen Inkubation können jeweils 20 ml YPD-Flüssigkulturen mit Einzelkolonien angeimpft werden. Diese Flüssigkultur wird auf einem Schüttler bei 30°C bis zu einer Zelldichte von $3 \cdot 10^8$ Zellen/ml inkubiert. Die Zelldichte wird mit einer Neubauer-Zählkammer ermittelt.

Die Aufreinigung erfolgt mittels des Genomic DNA Kits von Qiagen wie im Handbuch beschrieben. Die Gesamtkapazität der verwendeten Qiagen Genomic tips 100/G ist maximal $7 \cdot 10^9$ Zellen. Die Inkubationszeiten in der Lyticase- und Proteinase K-Lösung sind jeweils 1 Stunde 30 min. Zudem wird ein zusätzlicher Zentrifugationsschritt durchgeführt, bevor die Lösung auf die Säule geladen wird, da sonst die Säule verstopft. Das Pellet wird in 150 µl TE pH 7,4 resuspendiert und für zwei Stunden bei 55°C inkubiert. Von der aufgereinigten DNS wird 1 µl unverdaut auf ein 0,5%-iges Agarosegel aufgetragen und die DNS-Menge bestimmt. Da das YAC nicht von der genomischen Hefe-DNS zu unterscheiden ist, ist es notwendig zu kontrollieren, ob das entsprechende YAC vorhanden ist. Daher wird das YAC in der aufgereinigten DNS mit Hilfe einer PCR-Reaktion mit spezifischen Primern für die YAC-Sequenz nachgewiesen.

4.2.3 cDNS Isolierung aus einer Lambda Phagen-Bank

Die cDNS Klone wurden in Form einer 10 µl λ ZAPII Phagen-Suspension von Prof. Dr. Y. Kohara (Japanese National Institute of Genetics, Mishima, Japan) zur Verfügung gestellt. Die cDNS Klone waren hergestellt worden durch oligo-dT Priming unter Verwendung des Lambda UniZAP® II Library Kits von Stratagene. Die Exzision und Isolierung der cDNS Klone erfolgte genau nach der Anleitung zum ExAssist Interference-Resistant Helper Phage® Kit von Stratagene. Die cDNS wurden anschließend mit geeigneten Restriktionsenzymen verdaut und mit den Primern CS_T3.25 und CS_T7.24 sequenziert.

4.2.4 Biologische Untersuchung von *C. elegans*

4.2.4.1 Kultivierung und Anzucht von *C. elegans*

Die *C. elegans* Stämme wurden unter den üblichen Bedingungen kultiviert (Brenner, 1974; Wood, 1988). Die Tiere wachsen auf NGM-Platten mit einem Durchmesser von 3,5 cm, 5 cm oder 9 cm, die mit *E. coli* OP-50 beimpft sind. Die Tiere werden bei 15°C, 20°C oder 25°C inkubiert. Würmer werden mit einem ausgeglühten Platindraht unter sterilen Bedingungen von Platte zu Platte transferiert. Um eine größere Anzahl von Würmern zu transferieren, wird mit einem ausgeglühten Skalpell ein kleines Rechteck aus der besiedelten Platte ausgeschnitten und kopfüber auf eine neue Platte gelegt.

4.2.4.2 Einfrieren und Auftauen von *C. elegans*

Bei -80°C oder in flüssigem Stickstoff (-196°C) lassen sich die Tiere für längere Zeit einfrieren und wieder auftauen. Gehungerte L1 und L2 Larven werden von zwei grossen Kulturplatten mit 3 ml M9 Puffer ab gespült und dann für 10 min stehen gelassen, bis sich die Würmer abgesetzt haben. 1,5 ml Überstand wird abgenommen und 1,5 ml Einfrierlösung zur Wurm suspension zugegeben. Diese Lösung wird in 0,6 ml

Aliquots in Kryoröhrchen aufgeteilt. Zum gleichmässigen Einfrieren werden die Kryoröhrchen in einer Styroporschachtel mindestens einen Tag bei -80°C inkubiert, bevor sie für die langfristige Lagerung in flüssigen Stickstoff transferiert werden. Zur Kontrolle wird ein Röhrchen bei RT aufgetaut und auf eine Kulturplatte gekippt. Nach einer Inkubation von 30 min bei RT wird die Platte bei der entsprechenden Wachstumstemperatur der Würmer zwei Tage lang inkubiert. Dann sollten sich die Larven zu adulten Tieren entwickelt haben und die Platte dicht besiedelt sein.

4.2.4.3 Genetische Methoden

Kreuzungen

Spermien, die von einem Männchen stammen, werden bei der Befruchtung der Oocyten gegenüber den Spermien der Hermaphroditen bevorzugt. Daher können Hermaphroditen mit Männchen gekreuzt werden, um heterozygote F1 Nachkommen zu erhalten. Die Kreuzungen werden durchgeführt, indem vier L4 Hermaphroditen eines Stammes mit zehn Männchen des anderen Stammes zusammen auf eine Platte gesetzt werden. Wenn möglich werden Selbstnachkommen der Hermaphroditen anhand genetischer Marker von den Kreuzungsnachkommen unterschieden. Dominante Marker, wie beispielsweise die Synthese von GFP sind in heterozygoten F1 Tieren sichtbar, während rezessive Marker unerkant bleiben. Es wird eine entsprechende Anzahl von F1 und danach F2 Tieren vereinzelt und ihre Nachkommen analysiert. In der F1 Generation liegen die beiden Ausgangschromosomen der Elterntiere in *trans* zueinander, d.h. die Gene des männlichen Chromosoms liegen gegenüber den Genen des weiblichen Chromosoms. Zu diesem Zeitpunkt kann eine homologe Rekombination zwischen den beiden Chromosomen stattfinden. Je weiter zwei Gene auseinanderliegen umso häufiger findet eine Rekombination zwischen den beiden Genen statt. Dieses Ereignis macht man sich in Zwei- oder Drei-Faktor-Kreuzungen zunutze um den Abstand zwischen Genen zu bestimmen.

Auskreuzen von *C. elegans* Mutanten:

Mutanten, die aus einem EMS-Mutagenese-Screen isoliert werden, können neben der Mutation, die den gewünschten Phänotyp hervorruft, noch zusätzliche Mutationen besitzen. Es kann auch der Fall sein, daß der Phänotyp auf der Kombination von zwei verschiedenen Mutationen beruht. Um dies zu verhindern, werden die Mutanten vier Mal mit Würmern des WT Stammes N2 ausgekreuzt. Das heißt, es wird mit N2 Männchen in die Mutante gekreuzt, die heterozygoten F1 Männchen nochmals mit N2 Hermaphroditen gekreuzt und unter deren Nachkommen wieder Mutanten isoliert. Dieser Vorgang wird noch einmal wiederholt, um vierfach ausgekreuzte Stämme zu erhalten. An diesem Punkt sollten über 90% des Genoms der Mutante durch WT DNS ausgetauscht worden sein, so dass es sehr unwahrscheinlich ist, dass noch eine zusätzliche Mutation vorliegt.

Transformation von *C. elegans* durch Mikroinjektion von DNS

Mittels Mikroinjektion von DNS in die Gonaden von Hermaphroditen werden transgene *C. elegans* Stämme hergestellt (Fire, 1986; Mello, 1991). Zu transformierende DNS wird zusammen mit dem Koinjektionsmarker 3 min bei 13000 g zentrifugiert, um Partikel, welche die Glasnadel verstopfen könnten, zu sedimentieren. Auf

ein grosses Deckglas wird ein Tropfen 2%-iger Agarose in H₂O aufgetropft und mit einem Deckglas flachgedrückt. Nach dem Erstarren wird das obere Deckglas abgenommen und das untere Deckglas mit dem Agarosekissen 1 Stunde bei 80°C getrocknet. Zur Injektion werden die L4 Hermaphroditen oder jungen Erwachsenen auf dem Agarosekissen fixiert und um eine schnelle Dehydrierung zu vermeiden wird darauf ein Tropfen Paraffinöl gegeben. Die Injektionsnadel wird aus einer Glaskapillare hergestellt, die in dem Mikropipette-Puller auseinander gezogen wird (Parameter: heat=610, pull=100, vel=50, del=100). Die Nadel wird mit einer Pipette mit Geloader-Spitzen beladen. Die Injektion der DNS erfolgt in die Gonade der Tiere. Die Tiere werden anschliessend mit M9 Puffer vom Objektträger gelöst und auf Kulturplatten transferiert. In der F1-Generation werden diejenigen Tiere klonal isoliert, die den Koinjektionsmarker exprimieren. In einigen dieser Tiere bildet die DNS lange extrachromosomale DNS-Elemente (>700 kb), die in die F2-Generation weiter vererbt werden. Die Vererbungsrate dieser DNS-Elemente liegt in unabhängigen Linien zwischen 10% und 90% (Mello und Fire, 1995).

Für die Herstellung von transgenen Stämmen wurden meist folgende DNS Konzentrationen eingesetzt:

	YAC	Cosmid	PCR Fragmente
	75 ng/μl	2 ng/μl	2 ng/μl
pRF4 (<i>rol-6(su1006)</i>)	100 ng/μl	100 ng/μl	100 ng/μl

Wenn ein Mix aus verschiedenen DNS injiziert wurde, ist von jeder DNS die oben genannte Konzentration eingesetzt worden. Konnte von einer DNS nicht die entsprechende Konzentration erreicht werden, wurden auch niedrigere Konzentrationen injiziert.

Analyse von *C. elegans* Doppelmutanten

Wenn zwei Gene ausschließlich im selben Signalweg agieren, sollte die Doppelmutante einen ähnlichen Phänotyp besitzen wie die stärkste Einzelmutante. Ist der Phänotyp in der Doppelmutante wesentlich stärker als für eine unabhängige Aktion erwartete, dann wirken die getesteten Gene synergistisch. Der Wert für ein voneinander unabhängiges Agieren von zwei Genen, kann mittels folgender Gleichung berechnet werden:

$$(1 - pA) \cdot (1 - pB) = 1 - pAB$$

pA = Anteil der Tiere mit entsprechendem Phänotyp in der Einzelmutante A

pB = Anteil der Tiere mit entsprechendem Phänotyp in der Einzelmutante B

pAB = Anteil der Tiere mit entsprechendem Phänotyp in der Doppelmutante AB

Stimmt die tatsächliche Anzahl der Tiere, die den untersuchten Phänotyp zeigen, mit der theoretisch berechneten Anzahl überein, dann agieren die beiden Gene unabhängig voneinander. In die Berechnung wird jeweils der SEM Wert („standard error of the mean“) miteinbezogen.

4.2.4.4 Isolierung von genomischer DNS aus *C. elegans*

Standardmethode der DNS Aufreinigung aus *C. elegans*

Zur Isolierung genomischer DNS aus Würmern, werden ungefähr 10 große, dicht bewachsene Platten benötigt. Die Würmer einer Platte werden mit 3 ml M9 Puffer abgespült und in ein 15 ml Falcon Röhrchen überführt. Um die Würmer zu sedimentieren, werden sie 3 min bei 5000 g und 4°C zentrifugiert. Die Würmer bilden ein loses Pellet, so dass der Überstand vorsichtig abgenommen werden sollte. Die Würmer werden mit 10 ml NTE Puffer gewaschen, der Überstand bis auf einen ml abgenommen und das Pellet in ein 2 ml Eppendorfggefäß überführt. Nach einem Zentrifugationsschritt von 3 min bei 13000 g wird der Überstand abgenommen und das Pellet, das 200 µl Volumen nicht überschreiten sollte, auf 2 ml Eppendorfggefäße aufgeteilt. Diese Ansätze werden dann eingefroren. Die Wurmpelets werden langsam aufgetaut und je 500 µl Proteinase K Lösung (0,5 mg in 900 µl NTE Puffer und 100 µl 10% SDS) zugegeben. Der Ansatz wird 1 h bei 65°C im Wasserbad inkubiert. Es werden 200 µl NTE Puffer und 500 µl Phenol zugegeben und der Ansatz mit einem Vortexer durchmischt. Nach einer Zentrifugation für 5 min bei 13000 g wird der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Diese Phenolextraktion wird nochmals mit 900 µl Phenol wiederholt. Dann wird zwei Mal mit 900 µl des Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Gemisches (25:24:1) extrahiert. Zum Überstand werden nun 1,6 ml EtOH abs., gekühlt auf 4°C, zugegeben und der Ansatz für 10 min bei 13000 g und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wird nochmals mit gekühltem 70% EtOH gewaschen. Die Zentrifugationsdauer beträgt dabei 5 min. Der Überstand wird verworfen und das Pellet ungefähr 10 min getrocknet. Nachdem das Pellet in 400 µl TE Puffer gelöst ist, werden 10 µl RNase-Lösung (20 µg/ml) zugegeben und der Ansatz 30 min bei 37°C inkubiert. Es werden 500 µl des Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Gemisches zugegeben, der Ansatz stark gemischt und 2 min bei 13000 g zentrifugiert. Die obere Phase wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt und 1 ml kaltes EtOH zugegeben. Nun sollte ein weißes Präzipitat zu sehen sein. Nachdem der Ansatz vorsichtig gemischt wurde, wird er 10 min bei 13000 g und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wird nochmals gewaschen und der Überstand abgekippt. Wenn das Pellet nach 5 min getrocknet ist, wird es in 50 µl TE Puffer gelöst.

Schnellaufschlussmethode zur Freisetzung von DNS aus *C. elegans*

Vor allem für die snip-SNP Kartierung und zur Überprüfung von Mutationen wurde DNS aus *C. elegans* isoliert, amplifiziert und anschliessend evtl. sequenziert. Hierfür wird folgende grobe Aufschlussmethode verwendet.

Einzelwurm-Lysate:

Dafür werden 10 µl M9 Puffer und 10 µl Lysepuffer mit Proteinase K (0,2 mg/ml) in einem PCR Reaktionsgefäß vorgelegt und ein einzelner Wurm hinzugegeben. Der Ansatz wird für mindestens 10 min bei -80°C eingefroren und wieder aufgetaut. Durch diesen Gefrier-Auftauprozess werden die Zellen aufgeschlossen. In einer PCR Maschine wird der Ansatz dann 60 min bei 65°C und anschliessend 15 min bei 95°C inkubiert. Als Matrizen-DNS für eine PCR-Reaktion mit 50 µl Volumen werden 2 µl dieses Lysates eingesetzt. Die Lysate können bei -20°C aufbewahrt werden.

Populations-Lysate:

Von einer kleinen Platte, die fast leergefressen ist, werden die Würmer mit 1 ml TE ab gespült und in ein Eppendorfgefäß überführt. Wenn sich die Tiere abgesetzt haben, wird der Überstand abgenommen und das Pellet zwei Mal mit 1 ml TE gewaschen. Das 50 µl Pellet wird in einen 8er-Streifen PCR Reaktionsgefäße überführt in dem 50 µl Lysepuffer mit Proteinase K vorliegen. Der Ansatz wird mindestens 10 min bei -80°C eingefroren und wieder aufgetaut. In einer PCR Maschine wird der Ansatz dann 60 min bei 65°C und anschliessend 15 min bei 95°C inkubiert. Dieses Lysat wird 1:10 mit H_2O verdünnt und davon 2 µl als Matrizen-DNS für eine PCR-Reaktion mit 25 µl oder 50 µl Volumen eingesetzt.

4.2.5 Mikroskopie lebender Würmer

Die Würmer wurden bei 20°C kultiviert und als Embryonen, frisch geschlüpfte L1 Larven oder adulte Tiere von einer wachsenden Kultur analysiert. Um Bilder aufzunehmen, wurden die Tiere in 100 mM Natriumazid in M9 Puffer für eine Stunde inkubiert und dann auf Agarpads gelegt. Die Mehrzahl der Würmer lagen nach dieser Behandlung mit dem Bauch nach unten auf dem Objektträger. Dies war hinderlich, da der Ventralstrang untersucht werden sollte, der so nicht sichtbar war. Deshalb wurden meist Würmer generiert, die zusätzlich *rol-6(e187)* besaßen. Weil der Körper helikal verdreht war, wurde es einfacher Tiere zu finden, die mit dem Bauch nach oben lagen und deren Ventralstrang in der gesamten Länge eingesehen werden konnte.

Die axonalen Defekte wurden an einem Zeiss Axioplan Mikroskop unter Verwendung eines 40x Objektivs analysiert. Um die verschiedenen Farbvarianten zu trennen wurden enge Bandpassfilter eingesetzt (CFP: D436/20, 455DCLP und D480/40; GFP: HQ480/20, Q495LP und HQ510/20; YFP: HQ500/20, Q515LP und HQ535/30; DsRed: HQ565/30, Q585LP und HQ620/60).

4.2.5.1 Dialkyl-Indocarbocyanin (DiI)-Färbung

DiI ist ein lipophiler Farbstoff, der die sensorischen Neurone im Kopf- und Schwanzbereich von *C. elegans* rot anfärbt. Würmer werden mit 1 ml M9 Puffer von der Platte ab gespült und in ein Reaktionsgefäß überführt. Sind die Würmer sedimentiert, wird der Überstand abgenommen und 500 µl DiI-Lösung (1 µg/ml in M9 Puffer) zugegeben. Nach 2 Stunden Inkubation bei RT werden die Würmer zweimal mit je 1 ml M9 Puffer gewaschen und auf eine Kulturplatte pipettiert. Da der Farbstoff auch in den Darm aufgenommen wird und dieser somit stark angefärbt ist, werden die Würmer 2 Stunden zur Futteraufnahme auf der Platte inkubiert. Nachdem die Darmfärbung verschwunden ist, werden die Würmer auf einen Objektträger gesetzt und mikroskopiert.

4.2.5.2 Die Herstellung von mehrfarbigen *C. elegans* GFP Stämmen

Das grünfluoreszierende Protein GFP der Qualle *Aequoria victoria* und die anderen farblichen Varianten CFP und YFP, die durch Mutationen in *gfp* entstanden sind, wurden als Marker verwendet. Folgende Promotoren dienten dazu die *gfp* Expression in Nervenzellpopulationen mit Axonen im Ventralstrang zu steuern:

Interneurone: *glr-1* (Hart et al., 1995; Maricq et al., 1995)

D-Typ Motoneurone: *unc-47* (McIntire et al., 1997)

DA/DB Motoneurone: *unc-129* (Colavita et al., 1998)

PVQ Neuron: *sra-6* (Troemel et al., 1995)

AVG und PVP Neurons: *odr-2* (Chou et al., 2001)

Die GFP-Sequenz im Originalkonstrukt wurde oft durch eine der folgenden GFP-Varianten (A. Fire Vector Kit) oder DsRed (Clontech) ersetzt:

CFP: Y66W, N1461, M153T, V163A

YFP: S65G, V68A, S72A, T203Y

DsRed: Insert aus dem Clontech Vektor pDsRed

DsRed2: Insert aus dem Clontech Vektor pDsRed2

Diese Vektorkonstrukte wurden dann alleine oder in Kombination von mehreren Konstrukten in die Würmer injiziert. Das DNS-Array in transgenen Linien wurde ins Genom integriert und wir erhielten beispielsweise Würmer, die drei verschiedene FP-Marker besitzen (Hutter, 2000; Hutter, 2004). So wurde zum Beispiel folgender Stamm hergestellt: VH616: *rhIs4* (*glr-1::GFP*); *hdIs22* (*unc-129::CFP*; *unc-47::DsRed2*)

4.2.5.3 Konfokale Mikroskopie

Die DIC- und Fluoreszenz-Aufnahmen wurden an dem Leica SP2 konfokalen Mikroskop aufgenommen. Die Exzitation bei 457 nm (CFP), 488 nm (GFP), 514 nm (YFP) und 543 nm (DsRed) wurde erhalten anhand von Argon- und Helium-Lasern. Zur klaren Trennung der Kanäle war es ausreichend die Daten der verschiedenen Kanäle nacheinander aufzunehmen. Das Fenster der Emission war jeweils: 463-493 nm (CFP), 520-540 nm (YFP), 580-640 (DsRed) und 719-778 (GFP). Stapel von konfokalen Bildern wurden jeweils mit einem Abstand von 0,3-0,4 µm zwischen den einzelnen Aufnahmeebenen aufgenommen. Maximale Intensitätsprojektionen von allen Bildern eines Tieres wurden mit der Image J Software generiert.

4.2.5.4 4D-Mikroskopie

Um die Entwicklung von *C. elegans* Embryonen zeitlich verfolgen zu können, wurden vierdimensionale Aufnahmen gemacht. Der Versuchsaufbau erfolgte in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. R. Schnabel (Schnabel, 1997). Mit einem automatischen Fokus und Zeitrafferaufnahmen wurden eine Vielzahl von Ebenen des Embryonen in bestimmten Zeitintervallen dokumentiert. Es erlaubt die Beobachtung aller Zellen sowohl räumlich wie auch zeitlich. Die Durchführung der Aufnahmen erfolgte wie beschrieben in Schnabel, 1997.

4.2.6 Die Kartierungsmethode über snip-SNP Marker

Das *C. elegans* Genom ist seit 1998 vollständig sequenziert (The *C. elegans* Sequencing Consortium, 1998). Es gibt verschiedene natürliche Isolate von *C. elegans* Stämmen, z. B. N2 Bristol und CB4856 Hawaii, die sich durch sehr viele „single nucleotide polymorphisms“ (SNPs) unterscheiden. Eine grosse Anzahl von SNPs können als „restriction fragment length polymorphism“ (RFLP) identifiziert werden, als Folge einer Modifizierung einer Restriktionsenzymsschnittstelle (Wicks *et al.*, 2001). Dies kann zur schnellen Kartierung von Genen in *C. elegans* verwendet werden. Das zu kartierende Gen ist dabei an den Marker gekoppelt, in dessen genetischem Hintergrund die Mutagenese erfolgte. Wicks und Kollegen haben snip-SNPs identifiziert

und ein Protokoll zur Anwendung ausgearbeitet. Dieses Protokoll diente als Vorlage und wurde für diese Arbeit leicht abgeändert. Mutanten, die aus einem Screen stammen, der mit N2 Tieren durchgeführt wurde, werden mit CB4856 gekreuzt. In den F1 Tieren liegen die beiden Chromosomen von N2 und CB4856 in *trans* zueinander. In der F2 Generation werden wieder Mutanten isoliert, die durch Rekombination in der F1 Generation nun Teile des Hawaii Chromosomes besitzen.

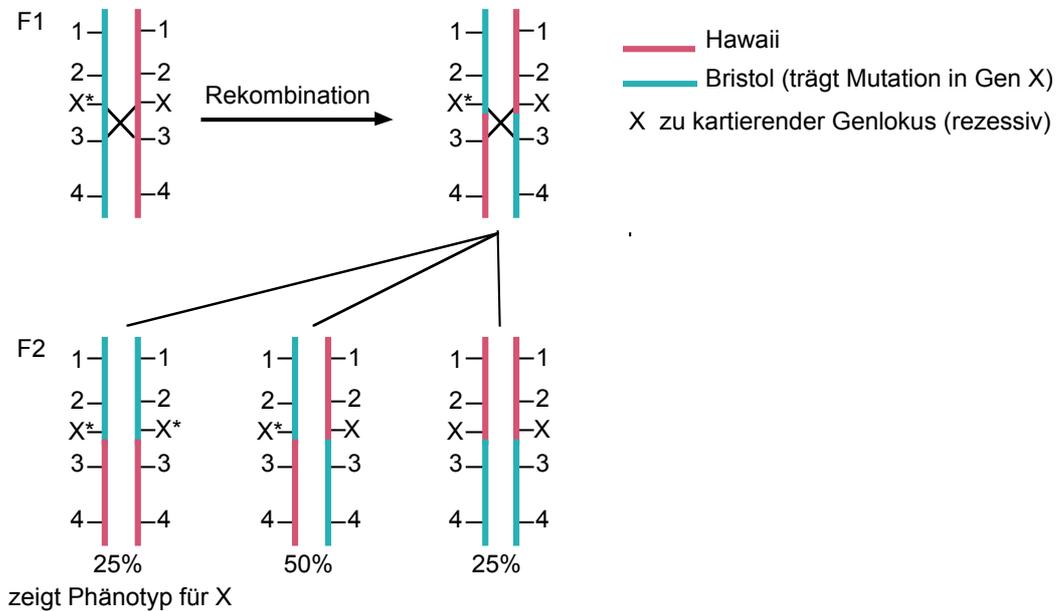


Abb.34: Die snip-SNP Kreuzung

Für die snip-SNP Kartierung werden Würmer aus zwei verschiedenen Isolaten miteinander gekreuzt, wobei ein Wurm die zu kartierende Mutation besitzt. In der F1 Generation werden die Gene in *trans* gebracht, damit eine Rekombination stattfinden kann. In der F2 Generation werden wieder Mutanten isoliert, die dann Teile ihres Chromosomes gegen CB5648 ausgetauscht haben.

* mutierter Genlokus

Von diesen Tieren werden Lysate hergestellt wie in Kapitel 4.2.4.4 beschrieben. Es werden snip-SNP Marker ausgewählt und getestet. Der Bereich, in dem der snip-SNP liegt, wird mit PCR amplifiziert. Als Matrize dienen dabei die Wurmlysate der zu testenden Kreuzungsnachkommen. Zudem werden Lysate von N2 und CB4856 Würmern als Kontrolle verwendet. Das PCR Produkt wird anschliessend mit dem entsprechenden Restriktionsenzym verdaut und in einem Gel aufgetrennt. Die Erkennungssequenz für das Restriktionsenzym ist in einem Allel vorhanden und in dem anderen nicht. Zum Beispiel wird das PCR Produkt in N2 nicht geschnitten, aber in CB4856 wird es einmal geschnitten. Anhand des Verdauemusters kann man erkennen, ob an diesem Marker CB4856 aufgenommen wurde, oder ob N2 vorhanden ist. Am folgenden Beispiel mit dem Marker LGII-SNP 23 soll dies illustriert werden:

Erkennungssequenz für LweI: GCATC

N2 tgctTCATCctca keine Schnittstelle

CB4856 tgctGCATCctca Schnittstelle vorhanden

Mit spezifischen Primern wird ein 601 bp großes DNS-Fragment amplifiziert. Der Verdau mit LweI ergibt:

N2 601 bp

CB4856 300 bp und 301 bp

Die Anzahl der CB4856 Allele zu den N2 Allelen wird für jeden Marker bestimmt und ergibt die Rekombinationswahrscheinlichkeit. Das zu kartierende Gen liegt in dem Bereich, in dem diese Rekombination

binationswahrscheinlichkeit am niedrigsten ist, und wo kein CB4856 Marker aufgenommen wurde. Mit dieser Methode kann die Kopplung an ein Chromosom festgestellt werden, sowie die Lokalisation eines Gens auf einem Chromosom bis auf einen kleinen Bereich von 0,5 cM oder kleiner eingegrenzt werden.

4.2.6.1 PCR und Verdau für die snip-SNP Kartierung

25 µl PCR Ansatz:

2 µl DNS (Wurmlysat 1:10 verdünnt)

0,2 mM dNTPs

1,5 mM MgCl₂

0,4 nM Primermix

75 mM Tris-HCl

20 mM (NH₄)SO₄

0,01% Tween

} 10 x Puffer

0,5 Units *Taq*-DNS-Polymerase

Zu Beginn wird der Ansatz für 5 min bei 95°C inkubiert um die Zellen aufzuschliessen. Die thermische Denaturierung der DNS findet für 40 s bei 95°C statt, die Hybridisierung der Startermoleküle für 40 s bei 58°C und die Elongation der DNS für 40 s bei 72°C. Insgesamt werden 35 Zyklen durchlaufen. Anschließend werden 12,5 µl des PCR Ansatzes mit 3 Einheiten des entsprechenden Enzyms und RNase (Endkonzentration: 100 µg/ml) im Gesamtvolumen von 20 µl für mindestens 2 Stunden verdaut. Der Verdau wird dann gelelektrophoretisch in einem 2%-igen Agarosegel für 1,5 Stunden bei 120 V aufgetrennt und analysiert.

Die SNP Datenbank des Genome Sequencing Centers, St. Louis, USA wurde verwendet zur Erarbeitung der snip-SNP Marker 22 bis 34, die auf Chromosom II zwischen der Position -6,2 cM und -2,0 cM lagen. In dieser Datenbank wurden SNPs in N2 und CB4856 gesucht, die in einem der Isolate eine Restriktionsschnittstelle modifizierten. Primer wurden entworfen, die ungefähr 500 bp große Fragmente amplifizieren, in deren Mitte die modifizierte Restriktionsschnittstelle lag. Diese Marker wurden verwendet wie oben beschrieben.

4.2.7 Isolierung einer *C. elegans* Deletionsmutante

In unserem Labor wurde eine Deletionsbank hergestellt, die aus drei Teilen besteht: vereinigte DNS-Lösungen, Populationslysate und eingefrorene Würmer. Eine Ausgangspopulation Po wurde mit EMS mutagenisiert und die F1 Nachkommen synchronisiert. Je 20 F1 Würmer wurden in einer Schale mit Flüssigmedium kultiviert. Das ergab eine F2 Population von ungefähr 2000 Wümmern. Von einem Viertel der F2 Population wurde mittels Phenol/Chloroform-Extraktion genomische DNS isoliert. Die genomische DNS aus 48 Röhren wurde vereinigt und bei -20°C eingefroren. Ein weiteres Viertel der Würmer wurde lysiert und diese Wurmlysate einzeln bei -20°C eingefroren. Die Hälfte der F2 Population wurde bei -80°C eingefroren. Die Deletionsbank besteht insgesamt aus $2,2 \cdot 10^6$ Genomen.

Das Durchsuchen der Deletionsbank wird mit der „Poison Primer PCR“ durchgeführt (Edgley et al., 2002). Die „Poison Primer PCR“ ist eine Variante der nested PCR, bei der in einem initialen Amplifikationsschritt mit Hilfe von zwei die Deletion flankierenden, externen Startermolekülen ein PCR Produkt erzeugt wird. Zugleich wird im selben Reaktionsschritt ein zusätzliches Startermolekül, der sogenannte Poison Primer, eingesetzt. Dieser führt bei der Vervielfältigung zu einem im Vergleich mit den externen Startermolekülen kürzeren Amplifikat. Dieses kürzere Amplifikat wird aufgrund seiner geringeren Größe bevorzugt gebildet. Im zweiten Schritt der Deletionsfindung wird das im ersten PCR Durchgang erhaltene Produkt-Gemisch als Matrize verwendet. Dabei werden nun interne Startermoleküle verwendet, die innerhalb der externen Primer hybridisieren. Dadurch vervielfältigt sich jene Matrize bevorzugt, die die Deletion trägt, da sie kleiner ist. Somit kann im weiteren Verlauf die Auffindung einer Deletion durch eine Gelelektrophorese erfolgen.

Das Screening der Deletionsbank erfolgt in zwei Stufen: im ersten Schritt wird die vereinigte DNS als Matrize für die oben beschriebene PCR verwendet. Wird eine Deletionsbande gefunden, so wird diese DNS ein zweites Mal getestet. Wurde das Ergebnis bestätigt, werden die entsprechenden 48 Einzellysate getestet. Das dem positiven Einzellysat entsprechende Röhrchen mit den eingefrorenen Würmern wird aufgetaut und die Würmer vereinzelt. Ein Teil jeder F1 Population wird lysiert und mittels PCR der für die Deletion positive Wurm identifiziert. Liegt die Deletion homozygot vor, kann die genomische DNS sequenziert werden.

Externe PCR mit gemischten Populationslysaten:

13.7 µl	H ₂ O	PCR Programm:
2.5 µl	10x Puffer (MBI mit (NH ₄) ₂ SO ₄)	
2.5 µl	dNTPs (2 mM)	
2.0 µl	MgCl ₂ (25 mM)	
0.3 µl	Taq-DNS-Polymerase (MBI Fermentas, 5 U/µl)	
1.5 µl	Primermix (ext. vorwärts und rückwärts, poison, 5 pmol jeder)	
<u>2.5 µl</u>	Matrizen-DNS (Lysat 1:10 verdünnt)	
25 µl		
		94°C 30 s
		94°C 30 s
		61°C 30 s
		72°C 30 s
		4°C
		} 34 Zyklen
		insgesamt

Interne PCR mit gemischten Populationslysaten:

14.7 µl	H ₂ O	PCR Programm:
2.5 µl	10x Puffer (MBI mit (NH ₄) ₂ SO ₄)	
2.5 µl	dNTPs (2 mM)	
2.0 µl	MgCl ₂ (25 mM)	
0.3 µl	Taq-DNS-Polymerase (MBI Fermentas, 5 U/µl)	
2.0 µl	Primermix (int. vorwärts und rückwärts, 10 pmol jeder)	
<u>1.0 µl</u>	Matrizen-DNS (externer PCR Ansatz)	
25 µl		
		94°C 30 s
		94°C 30 s
		61°C 30 s
		72°C 60 s
		4°C
		} 34 Zyklen
		insgesamt

Externe PCR mit Populationslysaten:

31.4 µl	H ₂ O	PCR Programm:
5.0 µl	10x Puffer (MBI mit (NH ₄) ₂ SO ₄)	
5.0 µl	dNTPs (2 mM)	
4.0 µl	MgCl ₂ (25 mM)	
0.6 µl	Taq-DNS-Polymerase (MBI Fermentas, 5 U/µl)	
3.0 µl	Primermix (ext. vorwärts und rückwärts, poison, 10 pmol jeder)	
<u>1.0 µl</u>	Matrizen-DNS (Populationslysat)	
50 µl		
		94°C 30 s
		94°C 30 s
		61°C 30 s
		72°C 30 s
		4°C
		} 34 Zyklen
		insgesamt

Die interne PCR mit Populationslysaten als Matrize wird durchgeführt wie die interne PCR mit gemischten Populationslysaten.

5 Anhang

5.1 Abkürzungen

A	Adenin
Abb.	Abbildung
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
<i>cfp</i>	cyan fluoreszierendes Protein
Chr.	Chromosom
DIC	differentiale Interferenz Kontrast
dsRed	rot fluoreszierendes Protein
Amp	Ampizillin
DNS	Desoxyribonukleinsäure
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiaminetetraessigsäure
EMS	Ethylmethansulfonat
EtOH	Etanol
FP	fluoreszierendes Protein
<i>gfp</i>	grün fluoreszierendes Protein
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazin-ethansulfonsäure
IPTG	Isopropylthio- β -D-Galaktosid
L1-L4	Larvenstadien in der <i>C. elegans</i> Entwicklung
LG	Kopplungsgruppe; engl. linkage group
LB	Nährmedium für Bakterien; "Luria Broth"
M9	<i>C. elegans</i> Puffer
NGM	<i>C. elegans</i> Medium
OD	optische Dichte
p	Promotor
PCR	Polymerasekettenreaktion
pH	negativer dekadischer Logarithmus der H^+ -Ionenkonzentration
Poly(A)	Polyadenylierungssignal
RFLP	Restriktionsfragment Längen Polymorphismus
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
SAP	Phosphatase; engl. shrimp alkaline phosphatase
SC	Hefeminimalmedium
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat ; engl. sodium dodecyl sulfate
Snip-SNP	SNP charakterisiert durch RFLP
SNP	Einzelnukleotid Polymorphismus; engl. single nucleotide polymorphism
TE	Tris-EDTA
Tris	Tris-Hydroxymethylaminomethan
ÜN	über Nacht
ÜNK	Über-Nacht-Kultur
ura	Uracil
UV	Ultraviolettes Licht
WT	Wildtyp
X-Gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-Galaktopyranosid
YAC	künstliche Hefechromosom; engl. yeast artificial chromosome
<i>yfp</i>	gelb fluoreszierendes Protein
YPD	Hefevollmedium; engl. yeast extract, peptone, dextrose

5.2 Einheiten

A	Ampère
bp	Basenpaar(e)
°C	Grad Celsius
cM	centi-Morgan
g	Gramm / Erdanziehungskraft
h	Stunde(n)
l	Liter
m	Meter
M	molar (mol/l)

min	Minute(n)
Mol	ca. $6,023 \times 10^{23}$ Moleküle
s	Sekunde(n)
u	Einheit der Enzymaktivität ("Unit")
V	Volt

5.3 Vorsätze

k	kilo	10^3
m	milli	10^{-3}
μ	mikro	10^{-6}
n	nano	10^{-9}
p	piko	10^{-12}
f	femto	10^{-15}

5.4 *C. elegans* Gene und Phänotypen

<i>ast</i>	„axonal steering“
<i>dpy</i>	„dumpy“
<i>efn</i>	„efrin“
<i>egl</i>	„egg laying defective“
<i>lin</i>	„lineage defective“
<i>rol</i>	„rolling“
<i>sax</i>	„sensory axon guidance“
<i>unc</i>	„uncoordinated“
<i>zag</i>	„zinc finger in axon guidance“

5.5 Nukleotide

A	Adenosin
C	Cytosin
G	Guanosin
T	Thymidin
U	Uridin

5.6 Aminosäuren-Nomenklatur nach IUPAC-IUB Vereinbarungen (1969)

Ala	A	Alanin
Arg	R	Arginin
Asn	N	Asparagin
Asp	D	Asparaginsäure
Cys	C	Cystein
Gln	Q	Glutamin
Glu	E	Glutaminsäure
Gly	G	Glyzin
His	H	Histidin
Ile	I	Isoleuzin
Leu	L	Leucin
Lys	K	Lysin
Met	M	Methionin
Phe	F	Phenylalanin
Pro	P	Prolin
Ser	S	Serin
Thr	T	Threonin
Trp	W	Tryptophan
Tyr	Y	Tyrosin
Val	V	Valin

6 Literatur

- Ackley, B. D., J. R. Crew, et al. (2001). "The NC1/endostatin domain of *Caenorhabditis elegans* type XVIII collagen affects cell migration and axon guidance." J Cell Biol. **152**: 1219-1232.
- Araujo, S. J. and G. Tear (2003). "Axon guidance mechanisms and molecules: lessons from invertebrates." Nat Rev Neurosci **4**: 910-921.
- Arber, S., D. R. Ladle, et al. (2000). "ETS gene *Er81* controls the formation of functional connections between group Ia sensory afferents and motor neurons." Cell **101**: 485-498.
- Augsburger, A., A. Schuchardt, et al. (1999). "BMPs as mediators of roof plate repulsion of commissural neurons." Neuron **24**: 127-141.
- Ausubel, F. M., R. Brent, et al. (1989). Current protocols in molecular biology, John Wiley & Sons, Inc.
- Baran, R., R. Aronoff, et al. (1999). "The *C. elegans* homeodomain gene *unc-42* regulates chemosensory and glutamate receptor expression." Development **126**(10): 2241-51.
- Bardin, A. J., R. Le Borgne, et al. (2004). "Asymmetric localization and function of cell-fate determinants: a fly's view." Curr Opin Neurobiol **14**(1): 6-14.
- Bartel, F. O., T. Higuchi, et al. (2000). "Mouse models in the study of the Ets family of transcription factors." Oncogene **19**: 6443-6454.
- Basson, M. and H. R. Horvitz (1996). "The *Caenorhabditis elegans* gene *sem-4* controls neuronal and mesodermal cell development and encodes a zinc finger protein." Genes Dev **10**: 1953-1965.
- Bassuk, A. G. and J. M. Leiden (1997). "The role of Ets transcription factors in the development and function of the mammalian immune system." Adv Immunol. **64**: 65-104.
- Beggs, H. E., S. C. Baragona, et al. (1997). "NCAM140 interacts with the focal adhesion kinase p125(fak) and the SRC-related tyrosine kinase p59(fyn)." J Biol Chem **272**: 8310-8319.
- Beitel, G. J., S. Tuck, et al. (1995). "The *Caenorhabditis elegans* gene *lin-1* encodes an ETS-domain protein and defines a branch of the vulval induction pathway." Genes Dev **9**(24): 3149-62.
- Birboim, H. C. D., J. (1979). "A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA." Nucleic Acids Res **7**: 1513-1523.
- Bixby, J. L. and W. A. Harris (1991). "Molecular mechanisms of axon growth and guidance." Annu Rev Cell Biol **7**: 117-159.
- Boulukos, K. E., P. Pognonec, et al. (1988). "Identification in chickens of an evolutionarily conserved cellular *ets-2* gene (*c-ets-2*) encoding nuclear proteins related to the products in the *c-ets* proto-oncogene." EMBO Journal **7**: 697-705.
- Brenner, S. (1974). "The Genetics of *Caenorhabditis elegans*." Genetics **77**: 71-94.
- Briscoe, J. and J. Ericson (2001). "Specification of neuronal fates in the ventral neural tube." Curr Opin Neurobiol **11**: 43-49.
- Briscoe, J., A. Pierani, et al. (2000). "A homeodomain protein code specifies progenitor cell identity and neuronal fate in the ventral neural tube." Cell **101**: 435-445.
- Brittis, P. A., V. Lemmon, et al. (1995). "Unique changes of ganglion cell growth cone behavior following cell adhesion molecule perturbations: a time-lapse study of the living retina." Mol Cell Neurosci **6**(5): 433-49.

- Broadbent, I. D. and J. Pettitt (2002). "The *C. elegans* *hmr-1* gene can encode a neuronal classic cadherin involved in the regulation of axon fasciculation." Curr Biol **12**: 59-63.
- Brown, A., P. A. Yates, et al. (2000). "Topographic mapping from the retina to the midbrain is controlled by relative but not absolute levels of EphA receptor signaling." Cell **102**: 77-88.
- Brümmendorf, T. and F. G. Rathjen (1996). "Structure/function relationships of axon-associated adhesion receptors of the immunoglobulin superfamily." Curr Opin Neurosci **12**: 532-541.
- Brunet, J. F. and A. Pattyn (2002). "Phox2 genes - from patterning to connectivity." Curr Opin Genet Dev **12**: 435-440.
- Burke, D. T., G. F. Carle, et al. (1987). "Cloning of large segments of exogenous DNA into yeast by means of artificial chromosome vectors." Science **236**(4803): 806-12.
- Burns, F. R., S. von Kannen, et al. (1991). "DM-GRASP, a novel immunoglobulin superfamily axonal surface protein that supports neurite extension." Neuron **7**: 209-220.
- Burtis, K. C. and B. S. Baker (1989). "Drosophila doublesex gene controls somitic sexual differentiation by producing alternatively spliced mRNAs encoding related sex-specific polypeptides." Cell **56**: 997-1010.
- Burtis, K. C., C. S. Thummel, et al. (1990). "The Drosophila 74EF early puff contains E74, a complex acetylene-inducible gene that encodes two ets-related proteins." Cell **61**: 85-99.
- Butler, S. J. and J. Dodd (2003). "A role for BMP heterodimers in roof plate-mediated repulsion of commissural axons." Neuron **38**: 389-401.
- Castellani, V., A. Chedotal, et al. (2000). "Analysis of the L1-deficient mouse phenotype reveals cross-talk between Sema3A and L1 signaling pathways in axonal guidance." Neuron **27**(2): 237-49.
- Chalfie, M., H. R. Horvitz, et al. (1981). "Mutations that lead to reiterations in the cell lineages of *C. elegans*." Cell **24**(1): 59-69.
- Chan, S. S.-Y., H. Zheng, et al. (1996). "UNC-40, a *C. elegans* homolog of DCC (Deleted in Colorectal Cancer), is required in motile cells responding to UNC-6 Netrin cues." Cell **87**: 187-195.
- Charron, F., E. Stein, et al. (2003). "The morphogen sonic hedgehog is an axonal chemoattractant that collaborates with netrin-1 in midline axon guidance." Cell **113**: 11-23.
- Chin-Sang, I. D., S. E. George, et al. (1999). "The ephrin VAB-2/EFN-1 functions in neuronal signaling to regulate epidermal morphogenesis in *C. elegans*." Cell **99**: 781-790.
- Chisholm, A. and M. Tessier-Lavigne (1999). "Conservation and divergence of axon guidance mechanisms." Curr Opin Neurobiol **9**: 603 - 615.
- Chou, J. H., C. I. Bargmann, et al. (2001). "The *Caenorhabditis elegans* *odr-2* gene encodes a novel Ly-6-related protein required for olfaction." Genetics **157**: 211-224.
- Clark, S. G. and C. Chiu (2003). "*C. elegans* ZAG-1, a Zn-finger-homeodomain protein, regulates axonal development and neuronal differentiation." Development **130**: 3781-3794.
- Colavita, A., S. Krishna, et al. (1998). "Pioneer Axon Guidance by UNC-129, a *C. elegans* TGF-beta." Science **281**: 706 - 709.
- 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.
- Coschigano, K. T. and P. C. Wensink (1993). "Sex-specific transcriptional regulation by the male and female doublesex proteins of *Drosophila*." Genes Dev **7**: 42-54.

- Coulson, A., J. Sulston, et al. (1986). "Toward a physical map of the genome of the nematode *Caenorhabditis elegans*." Proc Natl Acad Sci USA **83**: 7821 - 7825.
- Degnan, B. M., S. M. Degnan, et al. (1993). "The ets multigene family is conserved throughout the Metazoa." Nucleic Acids Res **21**(15): 3479-84.
- Delattre, O., J. Zucman, et al. (1992). "Gene fusion with an ETS DNA-binding domain caused by chromosome translocation in human tumours." Nature **359**(6391): 162-5.
- Desai, C., G. Garriga, et al. (1988). "A genetic pathway for the development of the *Caenorhabditis elegans* HSN motor neurons." Nature **336**: 638-646.
- Dickson, B. J. (2002). "Molecular mechanisms of axon guidance." Science **298**: 1959-1964.
- Dittmer, J. and A. Nordheim (1998). "Ets transcription factors and human disease." Biochem Biophys Acta **1377**: F1-F11.
- Doe, C. Q., Y. Hiromi, et al. (1988). "Expression and function of the segmentation gene *fushi tarazu* during *Drosophila* neurogenesis." Science **239**: 170-175.
- Doherty, P. and F. S. Walsh (1996). "CAM-FGF receptor interactions: a model for axonal growth." Mol Cell Neurosci **8**(2-3): 99-111.
- Donaldson, L. W., J. M. Petersen, et al. (1996). "Solution structure of the ETS domain from murine Ets-1: a winged helix-turn-helix DNA binding motif." EMBO Journal **15**: 125-134.
- Drescher, U. (1997). "The Eph family in the patterning of neural development." Current Biology **7**: R799 - R807.
- Dubois, L. and A. Vincent (2001). "The COE-Collier/Olf1/EBF-transcription factors: structural conservation and diversity of developmental functions." Mech Dev **108**: 3-12.
- Duggan, A., C. Ma, et al. (1998). "Regulation of touch receptor differentiation by the *Caenorhabditis elegans* *mec-3* and *unc-86* genes." Development **125**: 4107-4119.
- Durbin, R. M. (1987). Studies on the development and organisation of the nervous system of *Caenorhabditis elegans*, Cambridge.
- Eastman, C., H. R. Horvitz, et al. (1999). "Coordinated transcriptional regulation of the *unc-25* glutamic acid decarboxylase and the *unc-47* GABA vesicular transporter by the *Caenorhabditis elegans* UNC-30 homeodomain protein." J Neurosci **19**(15): 6225-34.
- Edgley, M., A. D'Souza, et al. (2002). "Improved detection of small deletions in complex pools of DNA." Nucleic Acids Res **30**: e52.
- Edlund, T. and T. M. Jessel (1999). "Progression from extrinsic to intrinsic signaling in cell fate specification: a view from the nervous system." Cell **96**: 211-224.
- Eisbacher, M., M. L. Holmes, et al. (2003). "Protein-protein interaction between Fli-1 and GATA-1 mediates synergistic expression of megakaryocyte-specific genes through cooperative DNA binding." Mol Cell Biol **23**(10): 3427-41.
- Emsley, J. G. and T. Hagg (2003). "alpha6beta1 integrin directs migration of neuronal precursors in adult mouse forebrain." Exp Neurol **183**(2): 273-85.
- Erkman, L., P. A. Yates, et al. (2000). "A POU domain transcription factor-dependent program regulates axon pathfinding in the vertebrate visual system." Neuron **28**: 779-792.
- Falk, J., C. Bonnon, et al. (2002). "F3/contactin, a neuronal cell adhesion molecule implicated in axogenesis and myelination." Biol Cell **94**(6): 327-34.

- Fambrough, D. and C. S. Goodman (1996). "Drosophila beaten path gene encodes a novel secreted protein that regulates defasciculation at motor axon choice points." Cell **87**: 1049-1058.
- Feldheim, D. A., Y. I. Kim, et al. (2000). "Genetic analysis of ephrin-A2 and ephrin-A5 shows their requirement in multiple aspects of retinocollicular mapping." Neuron **25**: 563-574.
- Ferguson, E. L. and H. R. Horvitz (1985). "Identification and characterization of 22 genes that affect the vulval cell lineages of the nematode *Caenorhabditis elegans*." Genetics **110**: 17-72.
- Fire, A. (1986). "Integrative transformation of *Caenorhabditis elegans*." EMBO Journal **5**(10): 2673 - 2680.
- Fitzli, D., E. T. Stoeckli, et al. (2000). "A direct interaction of Axonin-1 with NrCAM results in guidance, but not growth of commissural axons." J Cell Biol **149**: 951-968.
- Fox, J. W., U. Mayer, et al. (1991). "Recombinant nidogen consists of three globular domains and mediates binding of laminin to collagen type IV." EMBO Journal **10**(11): 3137-46.
- Galileo, D. S., J. Majors, et al. (1992). "Retrovirally introduced antisense integrin RNA inhibits neuroblast migration in vivo." Neuron **9**(6): 1117-31.
- George, S. E., K. Simokat, et al. (1998). "The VAB-1 Eph receptor tyrosine kinase functions in neural and epithelial morphogenesis in *C. elegans*." Cell **92**: 633-643.
- Gilbert, S. T. (2000). *Developmental biology*. Sunderland, Massachusetts, Sinauer Associates, Inc.
- Good, K., R. Ciosk, et al. (2004). "The T-box transcription factors TBX-37 and TBX-38 link GLP-1/Notch signaling to mesoderm induction in *C. elegans* embryos." Development **131**: 1967-1978.
- Granato, M., H. Schnabel, et al. (1994). "Genesis of an organ: molecular analysis of the pha-1 gene." Development **120**(10): 3005-17.
- Graves, B. J. and J. M. Petersen (1998). "Specificity within the ets family of transcription factors." Adv Cancer Res **75**: 1-55.
- Guo, S. and K. J. Kemphues (1995). "par-1, a gene required for establishing polarity in *C. elegans* embryos, encodes a putative Ser/Thr kinase that is asymmetrically distributed." Cell **81**(4): 611-20.
- Gurdon, J. B. and P.-Y. Bourillot (2001). "Morphogen gradient interpretation." Nature **413**: 797-803.
- Haase, G., E. Dessaud, et al. (2002). "GDNF acts through PEA3 to regulate cell body positioning and muscle innervation of specific motor neuron pools." Neuron **35**(5): 893-905.
- Hamelin, M., Y. Zhou, et al. (1993). "Expression of the UNC-5 guidance receptor in the touch neurons of *C. elegans* steers their axons dorsally." Nature **364**: 327-330.
- Han, M. and P. W. Sternberg (1990). Cell **63**: 921-931.
- Hansen, M. J., G. E. Dallal, et al. (2004). "Retinal axon response to ephrin-as shows a graded, concentration-dependent transition from growth promotion to inhibition." Neuron **42**: 717-730.
- Hao, J. C., T. W. Yu, et al. (2001). "*C. elegans* slit acts in midline, dorsal-ventral, and anterior-posterior guidance via the SAX-3/Robo receptor." Neuron **32**(1): 25-38.
- Hart, A., F. Melet, et al. (2000). "Fli-1 is required for murine vascular and megakaryocytic development and is hemizygotously deleted in patients with thrombocytopenia." Immunity **13**(2): 167-77.
- Hart, A. C., S. Sims, et al. (1995). "Synaptic code for sensory modalities revealed by *C. elegans* glr-1 glutamate receptor." Nature **378**: 82 - 85.

- Hart, A. H., R. Reventar, et al. (2000). "Genetic analysis of ETS genes in *C. elegans*." *Oncogene* **19**: 6400-6408.
- Hedgecock, E. M., J. G. Culotti, et al. (1990). "The *unc-5*, *unc-6*, and *unc-40* genes guide circumferential migrations of pioneer axons and mesodermal cells on the epidermis in *C. elegans*." *Neuron* **2**: 61 - 85.
- Hedgecock, E. M., J. G. Culotti, et al. (1987). "Genetics of cell and axons migrations in *Caenorhabditis elegans*." *Development* **100**: 365-382.
- Hedgecock, E. M., J. G. Culotti, et al. (1985). "Axonal guidance mutants of *Caenorhabditis elegans* identified by filling sensory neurons with fluorescein dyes." *Dev Biol* **111**(1): 158-70.
- Henderson, B. R. and P. Percipalle (1997). "Interactions between HIV Rev and nuclear import and export factors: the Rev nuclear localisation signal mediates specific binding to human importin-beta." *J. Mol Biol* **274**: 693-707.
- Hobert, O., T. D'Alberti, et al. (1998). "Control of neural development and function in a thermoregulatory network by the LIM homeobox gene *lin-11*." *J Neurosci* **18**: 2084-2096.
- Hobert, O., D. G. Moerman, et al. (1999). "A conserved LIM protein that affects muscular adherens junction integrity and mechanosensory function in *Caenorhabditis elegans*." *J Cell Biol* **144**(1): 45-57.
- Hodgkin, J. (1988). "The nematode *C. elegans*." Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- Holder, N. and R. Klein (1999). "Eph receptors and ephrins: effectors of morphogenesis." *Development* **126**: 2033-2044.
- Holder, N. and R. Klein (1999). "Eph receptors and ephrins: effectors of morphogenesis." *Development* **126**(10): 2033-44.
- Honigberg, L. and C. J. Kenyon (2000). "Establishment of left/right asymmetry in neuroblast migration by *UNC-40/DCC*, *UNC-73/Trio* and *DPY-19* proteins in *C. elegans*." *Development* **127**: 4655-4668.
- Horvitz, H. R., P. W. Sternberg, et al. (1983). "Mutations that affect neural cell lineages and cell fates during the development of the nematode *Caenorhabditis elegans*." *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **48 Pt 2**: 453-63.
- Hsu, T. and R. A. Schulz (2000). "Sequence and functional properties of Ets genes in the model organism *Drosophila*." *Oncogene* **19**: 1409-1416.
- Huber, A. B., A. L. Kolodkin, et al. (2003). "Signaling at the growth cone: ligand-receptor complexes and the control of axon growth and guidance." *Annu Rev Neurosci* **26**: 509-563.
- Hutter, H. (2000). "New ways to look at axons in *Caenorhabditis elegans*." *Micros Res Tech* **48**: 47-54.
- Hutter, H. (2003). "Extracellular cues and pioneers act together to guide axons in the ventral cord of *C. elegans*." *Development* **130**: 5307-5318.
- Hutter, H. (2004). "Five-colour in vivo imaging of neurons in *Caenorhabditis elegans*." *J Microsc* **215**(Pt 2): 213-8.
- Hutter, H., I. Wacker, et al.. "Genes controlling axon guidance in the ventral cord of *C. elegans*." Manuskript in Vorbereitung
- Inoue, A. and J. R. Sanes (1997). "Lamina-specific connectivity in the brain: regulation by N-cadherin, neurotrophins, and glycoconjugates." *Science* **276**: 1428-1431.
- Ishii, N., W. G. Wadsworth, et al. (1992). "*UNC-6*, a laminin-related protein, guides cell and pioneer axon migrations in *C. elegans*." *Neuron* **9**: 873-881.

- Iwai, Y., T. Usui, et al. (1997). "Axon patterning requires DN-cadherin, a novel neuronal adhesion receptor, in the *Drosophila* embryonic CNS." Neuron **19**: 77-89.
- Jäkel, S. and D. Görlich (1998). "Importin beta, transportin, RanBP5 and RanBP7 mediate nuclear import of ribosomal proteins in mammalian cells." EMBO Journal **17**: 4491-4502.
- Jessel, T. M. (2000). "Neuronal specification in the spinal cord: inductive signals and transcriptional codes." Nat Rev Genet **1**: 20-29.
- Jin, Y., R. Hoskins, et al. (1994). "Control of type-D GABAergic neuron differentiation by *C. elegans* UNC-30 homeodomain protein." Nature **372**: 780-783.
- Jurata, L. W., J. B. Thomas, et al. (2000). "Transcriptional mechanisms in the development of motor control." Curr Opin Neurobiol **10**: 72-79.
- Kalb, J. M., K. K. Lau, et al. (1998). "pha-4 is Ce-fkh-1, a fork head/HNF-3alpha,beta,gamma homolog that functions in organogenesis of the *C. elegans* pharynx." Development **125**(12): 2171-80.
- Kalderon, D., W. D. Richardson, et al. (1984). "Sequence requirements for nuclear location of Simian Virus 40 large T antigen." Nature **311**: 33-38.
- Kemphues, K. J., J. R. Priess, et al. (1988). "Identification of genes required for cytoplasmic localization in early *C. elegans* embryos." Cell **52**(3): 311-20.
- Kidd, T., K. S. Bland, et al. (1999). "Slit is the midline repellent for the robo receptor in *Drosophila*." Cell **96**(6): 785-94.
- Kidd, T., K. Brose, et al. (1998). "Roundabout Controls Axon Crossing of the CNS Midline and Defines a Novel Subfamily of Evolutionarily Conserved Guidance Receptors." Cell **92**: 205 - 215.
- Kim, S., X. C. Ren, et al. (1999). "SDQR migrations in *Caenorhabditis elegans* are controlled by multiple guidance cues and changing responses to netrin UNC-6." Development **126**: 3881-3890.
- Kim, S. and W. G. Wadsworth (2000). "Positioning of longitudinal nerves in *C. elegans* by nidogen." Science **288**(5463): 150-4.
- Kimble, J. E. and D. Hirsh (1979). "The Post-embryonic cell lineages of the hermaphrodite and male gonads in *C. elegans*." Dev Biol **70**: 396 - 417.
- Kodandapani, R. (1996). "A new pattern for helix-turn-helix recognition revealed by the PU.1 ETS domain DNA complex." Nature **380**: 456-460.
- Kolodkin, A. L. and D. D. Ginty (1997). "Steering clear of semaphorins: neuropilins sound the retreat." Neuron **19**: 1159-1162.
- Kolodkin, A. L., D. J. Matthes, et al. (1993). "The semaphorin genes encode a family of transmembrane and secreted growth cone guidance molecules." Cell **75**: 1389-1399.
- Kolodkin, A. L., D. J. Matthes, et al. (1992). "Fasciclin IV: sequence, expression, and function during growth cone guidance in the grasshopper embryo." Neuron **9**(5): 831-45.
- Lam, M. H., L. J. Briggs, et al. (1999). "Importin beta recognizes parathyroid hormone-related protein with high affinity and mediates its nuclear import in the absence of importin alpha." J Biol Chem **274**: 7391-7398.
- Landgraf, M., S. Roy, et al. (1999). "even-skipped determines the dorsal growth of motor axons in *Drosophila*." Neuron **22**: 43-52.
- Landis, S. C. (1983). "Neuronal growth cones." Annu Rev Physiol **45**: 567-80.

- Lanford, R. E. and J. S. Butel (1984). "Construction and characterization of an SV40 mutant defective in nuclear transport of T antigen." Cell **37**: 801-813.
- Lee, C.-H., T. Herman, et al. (2001). "N-cadherin regulates target specificity in the Drosophila visual system." Neuron **30**: 437-450.
- Lee, K. J. and T. M. Jessel (1999). "The specification of dorsal cell fates in the vertebrate central nervous system." Annu Rev Neurosci **22**: 261-294.
- Lee, S.-K. and S. L. Pfaff (2001). "Transcriptional networks regulating neuronal identity in the developing spinal cord." Nat Neurosci **4**: 1183-91.
- Leprince, D., A. Gegonne, et al. (1983). "A putative second cell-derived oncogene of avian leukaemia retrovirus E26." Nature **306**: 395-397.
- Li, R., H. Pei, et al. (2000). "Regulation of Ets function by protein-protein interactions." Oncogene **19**: 6514-6523.
- Lin, J. H., T. Saito, et al. (1998). "Functionally related motor neuron pool and muscle sensory afferent subtypes defined by coordinate ETS gene expression." Cell **95**: 393-407.
- Livet, J., M. Sigrist, et al. (2002). "ETS gene Pea3 controls the central position and terminal arborization of specific motor neuron pools." Neuron **35**: 877-892.
- López, A. J. (1995). "Developmental role of transcription factor isoforms generated by alternative splicing." Dev Biol **172**: 396-411.
- Lundgren, S. E., C. A. Callahan, et al. (1995). "Control of neuronal pathway selection by the Drosophila homeodomain gene apterous." Development **121**: 1769-1773.
- Malhotra, J. D., P. Tsiotra, et al. (1998). "Cis-activation of L1-mediated ankyrin recruitment by TAG-1 homophilic cell adhesion." J. Biol. Chem. **273**: 33354-33359.
- Maness, P., H. Beggs, et al. (1996). "Selective neural cell adhesion molecule signaling by Src family tyrosine kinases and tyrosine phosphatases." Perspect Dev Neurobiol **4**: 169-81.
- Maricq, A. V., E. Peckol, et al. (1995). "Mechanosensory signalling in *C. elegans* mediated by the GLR-1 glutamate receptor." Nature **378**(6552): 78-81.
- Maroulakou, I. G. and D. B. Bowe (2000). "Expression and function of Ets transcription factors in mammalian development: a regulatory network." Oncogene **19**: 6432-6442.
- Marquardt, T. and S. L. Pfaff (2001). "Cracking the transcriptional code for cell specification in the neural tube." Cell **106**: 651-654.
- McIntire, S. L., R. J. Reimer, et al. (1997). "Identification and characterization of the vesicular GABA transporter." Nature **389**: 870-876.
- Mello, C. and A. Fire (1995). DNA Transformation. *Caenorhabditis elegans: Modern biological analysis of an organism.* H. Epstein and D. Shakes. San Diego, Academic Press. **48**: 452-82.
- Mello, C. C., B. W. Draper, et al. (1994). "The maternal genes *apx-1* and *glp-1* and establishment of dorsal-ventral polarity in the early *C. elegans* embryo." Cell **77**(1): 95-106.
- Mello, C. C., J. M. Kramer, et al. (1991). "Efficient gene transfer in *C. elegans*: extrachromosomal maintenance and integration of transforming sequences." EMBO Journal **10**(12): 3959 - 3970.
- Miller, D. M., 3rd and C. J. Niemeyer (1995). "Expression of the *unc-4* homeoprotein in *Caenorhabditis elegans* motor neurons specifies presynaptic input." Development **121**(9): 2877-86.

- Missler, M. and T. C. Sudhof (1998). "Neurexins: three genes and 1001 products." Trends Genet **14**: 20-26.
- Mizuguchi, R., M. Sugimori, et al. (2001). "Combinatorial roles of Olig2 and Neurogenin2 in the coordinated induction of pan-neuronal and subtype-specific properties of motoneurons." Neuron **31**: 757-771.
- Mo, Y., B. Vaessen, et al. (2000). "Structure of the Elk-1-DNA complex reveals how DNA-distal residues affect ETS domain recognition of DNA." Nat.Struct Biol **7**: 292-297.
- Murai, K. K. and E. B. Pasquale (2003). "Eph´ective signaling: forward, reverse and crosstalk." J Cell Sci **116**: 2823-2832.
- Nash, B., A. Colavita, et al. (2000). "The forkhead transcription factor UNC-130 is required for the graded spatial expression of the UNC-129 TGF-beta guidance factor in *C. elegans*." Genes Dev **14**: 2486-2500.
- Nerlov, C., E. Querfurth, et al. (2000). "GATA-1 interacts with the myeloid PU.1 transcription factor and represses PU.1-dependent transcription." Blood **95**: 2543-2551.
- Niethammer, P., M. Delling, et al. (2002). "Cosignaling of NCAM via lipid rafts and the FGF receptor is required for neuritogenesis." J Cell Biol **157**: 521-532.
- Nikonenko, I., N. Toni, et al. (2003). "Integrins are involved in synaptogenesis, cell spreading, and adhesion in the postnatal brain." Brain Res Dev Brain Res **140**(2): 185-94.
- Novitsch, B. G., A. I. Chen, et al. (2001). "Coordinate regulation of motor neuron subtype identity and pan-neuronal properties by the bHLH repressor Olig2." Neuron **31**: 773-789.
- Oikawa, T. and T. Yamada (2003). "Molecular biology of the ETS family of transcription factors." Gene **303**: 11-34.
- Orioli, D. and R. Klein (1997). "The Eph receptor family: axonal guidance by contact repulsion." Trends Genet **13**: 354-359.
- Palmeri, D. and M. H. Malim (1999). "Importin beta can mediate the nuclear import of an arginine-rich nuclear localization signal in the absence of importin alpha." Mol Cell Biol **19**: 1218-1225.
- Patel, T. D., I. Kramer, et al. (2003). "Peripheral NT3 signaling is required for ETS protein expression and central patterning of proprioceptive sensory afferents." Neuron **38**(3): 403-16.
- Penelope, J. B., D. M. Madsen, et al. (2001). "Differential expression of glutamate receptor subunits in the nervous system of *Caenorhabditis elegans* and their regulation by the homeodomain protein UNC-42." J Neuroscience **21**: 1510-1522.
- Perrin, F. E., F. G. Rathjen, et al. (2001). "Distinct subpopulations of sensory afferents require F11 or axonin-1 for growth to their target layers within the spinal cord of the chick." Neuron **30**(3): 707-23.
- Pipes, G. C., Q. Lin, et al. (2001). "The beat generation: a multigene family encoding IgSF proteins related to the Beat axon guidance molecule in *Drosophila*." Development **128**: 4545-4552.
- Poinat, P., A. De Arcangelis, et al. (2002). "A conserved interaction between beta1 integrin/PAT-3 and Nck-interacting kinase/MIG-15 that mediates commissural axon navigation in *C. elegans*." Curr Biol **12**(8): 622-31.
- Pollerberg, G. E. and A. Beck-Sickinger (1993). "A functional role for the middle extracellular region of the neural cell adhesion molecule (NCAM) in axonal fasciculation and orientation." Dev Biol **156**(2): 324-40.
- Portereiko, M. F. and S. E. Mango (2001). "Early morphogenesis of the *Caenorhabditis elegans* pharynx." Dev Biol **233**: 482-494.

- Postigo, A. A., A. M. Sheppard, et al. (1997). "c-Myb and Ets proteins synergize to overcome transcriptional repression by ZEB." EMBO Journal **16**: 3924-3934.
- Prasad, B. C., B. Ye, et al. (1998). "unc-3, a gene required for axonal guidance in *Caenorhabditis elegans*, encodes a member of the O/E family of transcription factors." Development **125**(8): 1561-8.
- Ramos, R. G., G. L. Igloi, et al. (1993). "The irregular chiasm C-roughest locus of *Drosophila*, which affects axonal projections and programmed cell death, encodes a novel immunoglobulin-like protein." Genes Dev **7**(12B): 2533-47.
- Raper, J. A. (2000). "Semaphorins and their receptors in vertebrates and invertebrates." Curr Opin Neurobiol **10**: 88-94.
- Rekhtman, N., F. Radparvar, et al. (1999). "Direct interaction of hematopoietic transcription factors PU.1 and GATA-1: functional antagonism in erythroid cells." Genes Dev **13**: 1398-1411.
- Remy, P. and M. Baltzinger (2000). "The Ets-transcription factor family in embryonic development: lessons from the amphibian and bird." Oncogene **19**: 6417-6431.
- Riehl, R., K. Johnson, et al. (1996). "Cadherin function is required for axon outgrowth in retinal ganglion cells in vivo." Neuron **17**: 837-848.
- Rougon, G. and O. Hobert (2003). "New insights into the diversity and function of neuronal immunoglobulin superfamily molecules." Annu Rev Neurosci (26): 207-238.
- Rugarli, E. I., E. Di Schiavi, et al. (2002). "The kallmann syndrome gene homolog in *C. elegans* is involved in epidermal morphogenesis and neurite branching." Development **129**: 1283-1294.
- Sambrook, E. F., T. Fritsch, et al. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanes, D. H., T. A. Reh, et al. (2000). *Development of the nervous system*. San Diego, Academic Press.
- Sarafí-Reinach, T. R., T. Melkman, et al. (2001). "The lin-11 LIM homeobox gene specifies olfactory and chemosensory neuron fates in *C. elegans*." Development **128**: 3269-3281.
- Sarafí-Reinach, T. R. and P. Sengupta (2000). "The forkhead domain gene unc-130 generates chemosensory neuron diversity in *C. elegans*." Genes Dev **14**(19): 2472-85.
- Schmucker, D., J. C. Clemens, et al. (2000). "*Drosophila* Dscam is an axon guidance receptor exhibiting extraordinary molecular diversity." Cell **101**: 671-684.
- Schnabel, R., H. Hutter, et al. (1997). "Assessing normal embryogenesis in *Caenorhabditis elegans* using a 4D microscope: variability of development und regional specification." Dev Biol **184**: 234-265.
- Scholz, H., J. Deatrck, et al. (1993). "Genetic dissection of pointed, a *Drosophila* gene encoding two ETS-related proteins." Genetics **135**: 455-468.
- Serafini, T., T. E. Kennedy, et al. (1994). "The netrins define a family of axon outgrowth-promoting proteins homologous to *C. elegans* UNC-6." Cell **78**: 409-24.
- Sharrocks, A. D. (2001). "The ETS-domain transcription factor family." Nat Rev Mol Cell Biol **2**: 827-837.
- Sharrocks, A. D., A. L. Brown, et al. (1997). "The ETS-domain transcription factor family." Int J Biochem Cell Biol **29**: 1371-1387.
- Shen, K. and C. I. Bargmann (2003). "The immunoglobulin superfamily protein SYG-1 determines the location of specific synapses in *C. elegans*." Cell **112**(5): 619-30.

- Sonderegger, P. e. (1998). Ig superfamily molecules in the nervous system. Amsterdam, Harwood Academic publishers.
- Spyropoulos, D. D., P. N. Pharr, et al. (2000). "Hemorrhage, impaired hematopoiesis, and lethality in mouse embryos carrying a targeted disruption of the Fli1 transcription factor." Mol Cell Biol **20**(15): 5643-52.
- Stevens, C. F. (1998). "Neuronal diversity: too many cell types for comfort?" Curr Biol **8**(20): R708-10.
- Stoeckli, E. T., P. Sonderegger, et al. (1997). "Interference with axonin-1 and NrCAM interactions unmasks a floor-plate activity inhibitory for commissural axons." Neuron **18**(2): 209-21.
- Stoker, A. and R. Dutta (1998). "Protein tyrosine phosphatases and neural development." BioEssays **20**: 463 - 472.
- Strome, S. and W. B. Wood (1983). "Generation of asymmetry and segregation of germ-line granules in early *C. elegans* embryos." Cell **35**(1): 15-25.
- Sulston, J. and J. Hodgkin (1988). Methods. The Nematode *Caenorhabditis elegans*. W. B. Wood. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press: 587-606.
- Sulston, J. E. and H. R. Horvitz (1977). "Post-embryonic cell lineages of the nematode, *Caenorhabditis elegans*." Dev Biol **56**: 110 - 156.
- Sulston, J. E., E. Schierenberg, et al. (1983). "The embryonic cell lineage of the nematode *Caenorhabditis elegans*." Dev Biol **100**: 64 - 119.
- Sulston, J. E. u. H. J. (1988). "The nematode *C. elegans*." Cold Spring Habor Laboratory, Cold Spring Habor, NY.
- Tanaka, H., T. Matsui, et al. (1991). "Molecular cloning and expression of a novel adhesion molecule, SC1." Neuron **7**(4): 535-45.
- Tapon, N. and A. Hall (1997). "Rho, Rac and Cdc42 GTPases regulate the organization of the actin cytoskeleton." Curr Opin Cell Biol **9**: 86 - 92.
- Taylor, J., P. Pesheva, et al. (1993). "Influence of janusin and tenascin on growth cone behavior in vitro." J Neurosci Res **35**(4): 347-62.
- Tessier-Lavigne, M., M. Placzek, et al. (1988). "Chemotropic guidance of developing axons in the mammalian central nervous system." Nature **336**(6201): 775-8.
- Thanos, S., F. Bonhoeffer, et al. (1984). "Fiber-fiber interaction and tectal cues influence the development of the chicken retinotectal projection." Proc Natl Acad Sci USA **81**: 1906-1910.
- Thanos, S., S. Püttmann, et al. (2003). "Potential role of pax-2 in retinal axon navigation through the chick optic nerve stalk and optic chiasm." Neurobiol **59**: 8-23.
- Thor, S., S. G. E. Anderson, et al. (1999). "A LIM-homeodomain combinatorial code for motoneuron pathway selection." Nature **397**: 76-80.
- Thor, S. and J. B. Thomas (1997). "The *Drosophila* islet gene governs axon pathfinding and neurotransmitter identity." Neuron **18**: 397-409.
- Troemel, E. R., J. H. Chou, et al. (1995). "Divergent seven transmembrane receptors are candidate chemosensory receptors in *C. elegans*." Cell **83**: 207 - 218.
- Truant, R. and B. R. Cullen (1999). "The arginine-rich domains present in human immunodeficiency virus type 1 tat and rev function as direct importin beta-dependent nuclear localization signals." Mol Cell Biol **19**: 1210-1217.

- Vallstedt, A., J. Muhr, et al. (2001). "Different levels of repressor activity assign redundant and specific roles to Nkx6 genes in motor neuron and interneurons specification." Neuron **31**: 743-755.
- Wacker, I., V. Schwarz, et al. (2003). "zag-1, a Zn-finger homodomain transcription factor controlling neuronal differentiation and axon outgrowth in *C. elegans*." Development **130**: 3795-3805.
- Wadsworth, W. G. (2002). "Moving around in a worm: netrin UNC-6 and circumferential axon guidance in *C. elegans*." Trends Neurosci **25**(8): 423-9.
- Walsh, F. S. and P. Doherty (1997). "Neural cell adhesion molecules of the immunoglobulin superfamily: role in axon growth and guidance." Annu Rev Cell Dev Biol **13**: 425-456.
- Wang, X., P. J. Roy, et al. (1999). "Multiple ephrins control cell organization in *C. elegans* using kinase-dependent and -independent functions of the VAB-1 Eph receptor." Mol Cell **4**(6): 903-13.
- Wasylyk, B., J. Hagman, et al. (1998). "Ets transcription factors: nuclear effectors of Ras-MAP kinase signaling pathway." Trend Biochem Sci **23**: 213-216.
- Way, J. C. and M. Chalfie (1988). "mec-3, a homeobox-containing gene that specifies differentiation of the touch receptor neurons in *C. elegans*." Cell **54**(1): 5-16.
- White, J., E. Southgate, et al. (1986). "The structure of the nervous system of the nematode *Caenorhabditis elegans*." Phil Trans Royal Soc London B **314**: 1-340.
- Whitford, K. L. and A. Ghosh (2001). "Plexin signaling via off-track and rho family GTPases." Neuron **32**: 1-3.
- Wicks, S. R., R. T. Yeh, et al. (2001). "Rapid gene mapping in *Caenorhabditis elegans* using a high density polymorphism map." Nat Genet **28**(2): 160-4.
- Wood, W. B. (1988). "The nematode *C. elegans*." Cold Spring Harbour Laboratory, Cold Spring Harbour, NY.
- Wu, Q. and T. Maniatis (1999). "A striking organization of a large family of human neural cadherin-like cell adhesion genes." Cell **97**: 779-790.
- Xue, D., M. Finney, et al. (1992). "Regulation of the mec-3 gene by the *C. elegans* homeoproteins UNC-86 and MEC-3." EMBO Journal **11**(13): 4969-79.
- Yap, A. S., W. M. Briehner, et al. (1997). "Molecular and functional analysis of cadherin-based adherens junctions." Annu Rev Cell Dev Biol **13**: 119-146.
- Yu, H. H., H. H. Aranj, et al. (1998). "The transmembrane Semaphorin Sema I is required in *Drosophila* for embryonic motor and CNS axon guidance." Neuron **20**(2): 207-20.
- Yu, T. W. and C. I. Bargmann (2001). "Dynamic regulation of axon guidance." Nat Neurosci **4**: 1169-1176.
- Yu, T. W., J. C. Hao, et al. (2002). "Shared receptors in axon guidance: SAX-3/Robo signals via UNC-34/Enabled and a Netrin-independent UNC-40/DCC function." Nat Neurosci **5**(11): 1147-54.
- Zallen, J. A., B. A. Yi, et al. (1998). "The conserved immunoglobulin superfamily member SAX-3/Robo directs multiple aspects of axon guidance in *C. elegans*." Cell **92**(2): 217-27.
- Zhang, J., Z. Jin, et al. (2004). "Disruption of gradient expression of Zic3 resulted in abnormal intraretinal axon projection." Development **131**: 1553-1562.
- Zhang, L., A. Eddy, et al. (1995). "An immunological renal disease in transgenic mice that overexpress Fli-1, a member of the ets family of transcription factor genes." Mol Cell Biol **15**(12): 6961-70.
- Zhang, P., G. Behre, et al. (1999). "Negative cross-talk between hematopoietic regulators: GATA proteins repress PU.1." Proc Natl Acad Sci USA **96**: 8705-8710.

- Zhang, P., Z. X., et al. (2000). "PU.1 inhibits GATA-1 function and erythroid differentiation by blocking GATA-1 DNA binding." Blood **96**: 2641–2648.
- Zhang, Z. and D. S. Galileo (1998). "Retroviral transfer of antisense integrin alpha6 or alpha8 sequences results in laminar redistribution or clonal cell death in developing brain." J Neurosci **18**(17): 6928-38.
- Zipkin, I. D., R. M. Kindt, et al. (1997). "Role of a New Rho Family Member in Cell Migration and Axon Guidance in *C. elegans*." Cell **90**: 883 - 894.

Danksagung

Am Ende meiner Arbeit bedanke ich mich bei all denjenigen herzlich, die mich bei meiner Doktorarbeit unterstützt haben:

An erster Stelle sei hier Dr. Harald Hutter genannt, der mich freundlich in seine Arbeitsgruppe aufgenommen hat und mir Arbeitsraum und Projekte zur Verfügung stellte. Er hatte immer ein offenes Ohr für Fragen, stand mir mit gutem Rat zur Seite und ließ mir viele „schöpferische“ Freiheiten.

Professor Dr. Pollerberg und Professor Dr. Seeburg danke ich für ihre Bereitschaft diese Arbeit zu begutachten.

Allen Mitgliedern des Labors danke ich für die angenehme Arbeitsatmosphäre und die gute Zusammenarbeit. Besonders hervorzuheben sind dabei Dr. Irene Wacker für ihre Anregungen und die bereitwillige Weitergabe ihres umfangreichen Wissens und Caroline Schmitz für ihre zahlreichen fachlichen und freundschaftlichen Diskussionen. Valentin Schwarz danke ich besonders für die Bereitstellung der Deletionsbank. Ilse Wunderlich danke ich herzlich für ihre kompetente technische Hilfe und dafür, dass sie der ruhende Pol des Labors war. Ich danke auch allen anderen Labormitgliedern für ihre Hilfe und moralische Unterstützung an verschiedenen Punkten dieser Arbeit. Diese Arbeit wurde unterstützt von verschiedenen Serviceeinrichtungen am Max-Planck-Institut für medizinische Forschung, denen ich danke.

Meinen Eltern und meiner Schwester Manuela gilt ein besonderes Dankeschön für ihre tolle Unterstützung und ihr Interesse an meiner Arbeit. Danken möchte ich auch meinen Freunden, die immer ein offenes Ohr für mich hatten und für einen tollen Ausgleich in der Freizeit gesorgt haben.

Zuletzt gilt mein Dank einer ganz besonderen Person, Dr. Torsten Schulz, für so viele Dinge, die ich hier nicht alle erwähnen möchte.