Funktionelle Analyse der IgCAMs in der Nervensystementwicklung von *Caenorhabditis elegans*

Valentin Schwarz

Heidelberg 2005

INAUGURAL-DISSERTATION

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

Vorgelegt von

Diplom-Biologe Valentin Schwarz
aus Graz, Österreich

Tag der mündlichen Prüfung: 2. Mai 2005

Thema

Funktionelle Analyse der IgCAMs in der Nervensystementwicklung von *C. elegans*

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

INHALTSVERZEICHNIS

ZUSAMMENFASSUNG **4**

SUMMARY **5**

I. EINLEITUNG **6**

1.1 EVOLUTIONÄR KONSERVIERTE MOLEKÜLE DER AXONALEN WEGFINDUNG **8**

1.1.1 KLASSISCHE SIGNALMOLEKÜLE 8
1.1.1.1 Netrine *9*
1.1.1.2 Slits *9*
1.1.1.3 Semaphorine *10*
1.1.1.4 Ephrine *11*
1.1.2 ADHÄSIONSMOLEKÜLE 11
1.1.2.1 IgCAMs *12*
1.1.2.2 Cadherine *14*
1.1.2.3 Integrine *15*
1.1.3 MOLEKÜLE DER EXTRAZELLULÄREN MATRIX 15
1.1.4 ANDERE MOLEKÜLE DER AXONALEN WEGFINDUNG 16
1.1.4.1 TGFβ/BMP und Shh *16*
1.1.4.2 Wnt *16*
1.1.5 INTRAZELLULÄRE SIGNALTRANSDUKTION DER AXONALEN WEGFINDUNG 17

1.2 *CAENORHABDITIS ELEGANS* ALS MODELORGANISMUS **18**

1.2.1 DAS NERVENSYSTEM VON C. ELEGANS 19
1.2.2 DIE IGCAMS IN C. ELEGANS UND IHRE HOMOLOGE 20

1.3 ZIELSETZUNG DER ARBEIT **23**

II. ERGEBNISSE **24**

1. REVISION DER GENSTRUKTUR DER IGCAMS IN *C. ELEGANS* **24**

2. EXPRESSIONSANALYSE DER IGCAMS **28**

2.1 HERSTELLUNG VON GFP-REPORTER KONSTRUKTEN 28
2.2 EXPRESSIONSANALYSE DER IGCAMS 38
2.2.1 Rig-4 ..... *38*
2.2.2 Lad-2a/b *39*
2.2.3 Rig-6a *41*
2.2.4 Rig-6b/d *42*
2.2.5 Rig-6c *42*
2.2.6 Rig-1a *43*
2.2.7 Ncam-1a/b *44*
2.2.8 Ncam-1c *45*
2.2.9 Icam-1 ..... *45*
2.2.10 Icam-2 ..... *46*
2.2.11 Syg-2 ..... *47*
2.2.12 Wrk-1 ..... *48*
2.2.13 Rig-3 ..... *49*
2.2.14 Syg-1 ..... *50*
2.2.15 Icam-3 ..... *51*
2.2.16 Rig-5a/b 4.Intron *52*

3. DIE DELETIONSBANK **55**

3.1.DIE HERSTELLUNG DER DELETIONSBANK IM ÜBERBLICK 55
3.2 SCREENING NACH DELETIONSMUTANTEN 55

4. DIE DELETIONSMUTANTEN **58**

4.1 ANALYSE DER MUTANTEN 59
4.1.1 Wrk-1 (hd45) *60*
4.1.2 Wrk-1 (hd46) *61*
4.1.3 Rig-1 (hd15) *61*
4.1.4 Rig-5 (hd48) *62*
4.1.5 Lad-2 (hd31) *62*
4.1.6 Rig-3 (hd51) *63*
4.1.7 Syg-1 (hd18) *63*
4.1.8 Ncam-1 (hd49) *63*
4.1.9 Icam-2 (hd32) *64*
4.1.10 Rig-4 (hd47) *64*
4.1.11 Syg-2 (hd50) *64*
4.1.12 Analyse von Doppelmutanten *69*

III. DISKUSSION 71

1. FUNKTIONELLE ANALYSE DER IGCAMS IN *C. ELEGANS* 71

2. DIE EXPRESSION DER IGCAMS IM VERGLEICH 72

2.1 EXPRESSION VON IGCAMS IN MOTORNEURONEN 73
2.2 EXPRESSION VON IGCAMS IN INTERNEURONEN 75
2.3 EXPRESSION VON IGCAMS IN ANDEREN NEURONEN 77
2.4 EXPRESSION VON IGCAMS IN NICHT-NEURONALEM GEWEBE 77

3. DIE IGCAM DELETIONSMUTANTEN 78

3.1 DELETIONSMUTANTEN MIT VENTRALSTRANGDEFEKTEN 79
3.2 DELETIONSMUTANTEN MIT KOMMISSURDEFEKTEN 81
3.3 IGCAM DOPPELMUTANTEN 82

4. DIE DELETIONSBANK UND ANDERE METHODEN ZUR HERSTELLUNG VON MUTANTEN . 83

5. AUSBLICK 84

IV. MATERIAL UND METHODEN 86

1 MATERIAL 86

1.1 CHEMIKALIEN, ENZYME UND SONSTIGE VERBRAUCHSMATERIALIEN 86
1.2 PRIMER 86
1.3 PLASMIDE 86
1.4 COSMIDE UND YACS (*YEAST ARTIFICIAL CHROMOSOME*) 87
1.5 BAKTERIENSTÄMME 87
1.6 HEFESTÄMME 87
1.7 *C. ELEGANS* STÄMME 87
1.8 PUFFER UND MEDIEN 88

2 METHODEN 90

2.1 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN 90
2.1.1 Isolierung von genomischer DNA aus C. elegans *90*
2.1.2 Plasmid Minipräparation mit der CTAB-Methode *91*
2.1.3 PCR zur Amplifizierung von Promotorfragmenten für Klonierungen *91*
2.1.4 Klonierungen *92*
2.1.5 Fusions-PCR zur Herstellung von Promotor-GFP Konstrukten *92*
2.1.6 Präparation von Cosmiden aus E. coli *94*
2.1.7 Präparation von YACs aus Hefe *94*

3 DIE HERSTELLUNG DER DELETIONSBANK 95

3.1 PROTOKOLL ZUR HERSTELLUNG DER DELETIONSBANK 97
3.1.1 Teil I: Vorbereitung einer mutagenisierten C. elegans Kultur *97*
3.1.2 Teil II: Aufarbeitung der Flüssigkultur *100*
3.2 DAS ISOLIEREN VON DELETIONSMUTANTEN 102

4 ARBEITEN MIT *CAENORHABDITIS ELEGANS* 105

4.1 KULTIVIERUNG VON *C. ELEGANS* 105

4.1.1 Verpaarung von C. elegans *105*
4.2 MIKROINJEKTION ZUR HERSTELLUNG TRANSGENER *C. ELEGANS* STÄMME 106
4.3 BALLISTISCHE TRANSFORMATION VON *C. ELEGANS* 106
4.3.1 Vorbereitung von C. elegans *107*
4.3.2 Vorbereitung der DNA *107*
4.4 MIKROSKOPISCHE UNTERSUCHUNGEN VON *C. ELEGANS* MIT GFP 108
4.5 ZELLIDENTIFIZIERUNG IN *C. ELEGANS* 109

V. ANHANG 110

1.1 Abkürzungen *110*
1.2 Einheiten und Vorsätze: *111*
1.3 Primersequenzen *111*
1.4 C. elegans Stämme *113*
1.5 Die deletierten Bereiche der Mutanten *116*

VI. LITERATURVERZEICHNIS 117

DANKSAGUNG

ZUSAMMENFASSUNG

Das Nervensystem ist eines der komplexesten Organe und nimmt durch seine Funktionen, die beim Menschen als kognitive Leistungen zusammengefasst werden, eine besondere Stellung ein. Drei grundlegende Prozesse sind bei der Bildung des Nervensystems während der Entwicklung von entscheidender Bedeutung: Bildung von unterschiedlichen Neuronenklassen durch Zelldifferenzierung, Vernetzung der Nervenzellen durch zielgerichtetes axonales Auswachsen und Verschaltung durch Synapsenbildung.
Die Mechanismen zur korrekten Vernetzung, die eine unabdingbare Voraussetzung zur Etablierung der synaptischen Verschaltungen sind, sind nur ansatzweise bekannt. Bekannte Rezeptoren (*UNC-5*, *UNC-40/DCC*, und *SAX-3/Robo*), die für die axonale Wegfindung wichtig sind, gehören zu den Immunglobulin-Zelladhäsionsmolekülen (IgCAMs). Durch die Analyse des vollständig sequenzierten Genoms von *C.elegans* konnten die Mitglieder dieser Familie identifiziert werden. *C. elegans* besitzt 17 IgCAMs, die entweder aus Ig-Domänen oder aus Ig-Domänen und Fibronektin III Domänen bestehen. Durch den kurzen Generationszyklus und die Möglichkeit Deletionsmutanten herzustellen, eignet sich *C. elegans* sehr gut zur *in vivo* Analyse der kompletten Genfamilie. Für vier IgCAMs (*LAD-1, UNC-5*, *UNC-40*, und *SAX-3*) lagen zu Beginn dieser Arbeit schon funktionelle Untersuchungen vor. Für eine erste Abschätzung der Funktion der weiteren 13 IgCAMs wurde die Expression analysiert. Diese IgCAMs zeigen im Verlauf der Entwicklung eine dynamische Expression, die meist nicht auf ein einzelnes Gewebe beschränkt ist. Nur drei IgCAMs (*RIG-3*, *RIG-6b/d*, und *LAD-2*) sind ausschließlich neuronal exprimiert, alle weiteren zeigen neuronale und nicht neuronale Expression. Die neuronale Expression der Mehrzahl der IgCAMs beginnt bereits zum Zeitpunkt des axonalen Auswachsens, so dass eine Rolle bei der axonalen Wegfindung möglich ist.
Zur funktionellen Charakterisierung der IgCAMs wurde eine *C. elegans* Deletionsbank mit ca. 2 mio. mutagenisierten Genomen hergestellt und für zehn von 13 IgCAMs Deletionsmutanten isoliert. Die Deletionen führen überwiegend zu einem vorzeitigen Stopcodon, was einen Funktionsverlust zur Folge hat. In der Deletion von *SYG-2* bleibt das ursprüngliche Leseraster erhalten, allerdings fehlt die Fibronektin III Domäne. Die Analyse der Mutanten erfolgte hauptsächlich mit neuronalen Markern. Sieben der zehn Deletionsmutanten zeigen leichte bis mittelschwere Defekte im Nervensystem, die aber alle nicht zu einer Beeinträchtigung der Bewegung, der Nahrungsaufnahme und allgemein der Lebensfähigkeit von *C. elegans* führen. Die Defekte im Nervensystem betreffen Interneuronaxone, die zwischen den beiden Axonbündeln des Ventralstranges Überkreuzungen aufweisen. Außerdem wachsen in einigen Mutanten Kommissuren der DA/DB Motorneurone auf der falschen Seite Richtung Dorsalstrang. Das kann entweder auf ein Fehlen von IgCAM vermittelten Signalen für das axonale Auswachsen zurückgeführt werden, oder aus einer verminderten Adhäsion resultieren. Die neuronalen Defekte der Deletionsmutanten zeigen, dass IgCAMs zwar bei der Etablierung des Nervensystems beteiligt sind, aber im Einzelnen nur eine lokal begrenzte Funktion aufweisen. Vor allem *in vitro* Studien haben gezeigt, dass IgCAMs in funktionalen Komplexen zusammenwirken, so dass man davon ausgehen kann, dass Doppel- und Mehrfachmutanten stärkere Defekte zeigen. Durch die exemplarische Analyse von Doppelmutanten der in Motorneuronen exprimierten IgCAMs, konnte auf keine Interaktion dieser IgCAMs geschlossen werden. Allerdings wurden durch solche Untersuchungen Hinweise auf eine Interaktion von *rig-1* und *rig-3*, die beide in Interneuronen exprimiert sind, gefunden.
Die Expression der IgCAMs weist auf viele weitere mögliche Funktionen innerhalb des Nervensystems z.B. bei der Synapsenbildung, genauso wie in anderen Geweben wie z.B. in Muskel und in Hypodermis, hin. Die isolierten Deletionsmutanten bilden die Basis, diese möglichen Interaktionen in Zukunft mittels Doppel- und Mehrfachmutanten zu analysieren.

SUMMARY

The nervous system is one of the most complex organs that has evolved. Its outstanding role is emphasised by its function, which culminates in the capability of cognition. Three basic steps are important for the development and correct wiring of the nervous system: initially different classes of neurons are established during cell differentiation. In a second step axons have to grow out into their target area. This is a prerequisite for the final step, namely the formation of specific synaptic contacts.
The mechanisms of directed axonal outgrowth are only partially understood. Known receptor molecules like UNC-5, UNC-40/DCC and SAX-3/Robo belong to the immunoglobulin cell adhesion molecule family (IgCAMs). After the completion of sequencing and analysis of the *C.elegans* genome all members of this family were identified. *C. elegans* contains 17 IgCAMs, consisting either of Ig domains only or fibronectin III domains in addition. With a short generation cycle and the possibility to quickly generate deletion mutants, *C. elegan*s is perfectly suited for a functional analysis of the whole IgCAM family.
For four IgCAMs (LAD-1, UNC-5, UNC-40 and SAX-3) detailed analysis by other labs revealed their function in development and particularly in the nervous system. To get a first impression where the remaining 13 IgCAMs might function, their expression was examined. Transgenic animals were generated expressing promoter-GFP fusion constructs for individual IgCAMs. Expression typically is dynamic and not confined to a single tissue. Only three IgCAMs show exclusively neuronal expression, the others show predominantly expression in particular subsets of neurons as well as in non-neuronal tissue. The expression for most of them starts already during axon outgrowth, suggesting a role in axonal pathfinding.
For functional characterization a library of mutagenized worms was generated consisting of 2 mio. mutagenized genomes to isolate deletion alleles. For ten out of 13 IgCAMs a deletion mutant were isolated. The majority of the deletions produce a premature stop codon, likely to cause a complete loss of function. For *syg-2* only an in-frame deletion could be isolated, which takes out the fibronectin III domain. The analysis of the mutants was mainly carried out with neuronal markers. Seven out of ten mutants show weak to moderate defects in the nervous system. Defects were found in interneuron axons which cross erroneously to the contralateral axon bundle of the ventral cord and in commissures of the DA/DB motor neurons which grow out on the wrong side. All mutants are viable and healthy and show normal movement indicating that the motor circuit is functional. The observed defects are probably due to defective signal transduction or adhesion mediated by IgCAMs. These defects show that the analyzed IgCAMs do have a function in establishing the nervous system, but it is rather local and confined to certain neurons compared to UNC-5, UNC-40 or SAX-3, which act as more global guidance cues.
In vitro studies have shown that IgCAMs can form functional complexes and act in combination so that double mutants and even triple mutants could have a greater impact on nervous system development. To test this double mutants of IgCAMs expressed in motor neurons were generated, but gave no evidence for interaction. By contrast different defects compared to the single mutants were discovered with *rig-1*/*rig-3* double mutant suggesting an heterophilic interaction between these molecules.
The expression of the IgCAMs indicates a variety of possible interactions within the nervous system only, between the nervous system and other tissues, as well as among non-neuronal tissues. These putative interactions can be tested by further analysis of double as well as tripe mutants. The isolated deletion alleles provide a useful basis to explore these functional interactions in the future.

I. EINLEITUNG

Die Funktion des Nervensystems in Vertebraten wie auch in Invertebraten ist in hohem Maße von einer präzisen Vernetzung der Neurone abhängig. Nach der Etablierung von verschiedenen Neuronenklassen durch Zelldifferenzierung an spezifischen Stellen im Embryo ist zielgerichtetes Auswachsen von Axonen von fundamentaler Bedeutung. Das zielgerichtete Auswachsen ist Voraussetzung für die folgende Verschaltung durch Synapsenbildung. Ist das zielgerichtete Auswachsen gestört, hat das eine fehlerhafte Vernetzung zur Folge. Solche Fehler führen nicht nur zum Verlust von motorischen und sensorischen Leistungen, sondern beim Menschen auch oft zum Verlust der kognitiven Fähigkeiten (Barinaga 1996).

Betrachtet man die enorme Komplexität des Gehirns (2×10^{11} Neurone, jedes Neurone macht 1×10^{4} Synapsen) entsteht die Frage, welche koordinierten Interaktionen zwischen dem auswachsenden Axon und der zellulären Umgebung notwendig sind, um eine korrekte Verschaltung des Nervensystems zu gewährleisten.

Die Vorstellung, dass unspezifisches, ungerichtetes Auswachsen ausreichen könnte (P.Weiss 1936), wurde schon bald verworfen, nachdem Sperry Hinweise für Chemoaffinität von auswachsenden Axonen fand (Sperry 1963). Auch die Entdeckung aktivitätsabhängiger Neuanordnung von synaptischen Verbindungen widersprach nicht der Vorstellung von präzisen und koordinierten Interaktionen zwischen dem sich entwickelnden Axon und seiner Umgebung für die primäre Entwicklung des Nervensystems (siehe Übersichtsartikel Dodd and Jessell 1988). Axone benutzen aktivitätsunabhängige Prozesse am führenden Ende des auswachsenden Axons, dem Wachstumskegel, um Zielgewebe zu erreichen.

Mit Hilfe des Wachstumskegels findet die Aufnahme und Integration von Signalen aus der Umgebung statt. Die Umsetzung der Signale in gerichtetes Auswachsen erfolgt im Allgemeinen durch GTPasen vermittelte Kontrolle des Zytoskeletts (Guan and Rao 2003). Vier verschiedene Signaltypen bilden die Grundlage des zielgerichteten Auswachsens von Axonen (siehe Abb.1.1): kontaktabhängige Anziehung und Abstoßung sowie Chemoattraktion und – repulsion (Tessier-Lavigne and Goodman 1996). Sie werden folglich von Signalmolekülen vermittelt, die entweder membrangebunden oder sekretiert sind. Die Signalmoleküle leiten Axone über weite Distanzen (in Vertebraten bis zu mehreren Zentimetern). Um das zu bewältigen, sind Axonbahnen in Segmente unterteilt, die Zwischenziele darstellen und so das Navigieren erleichtern. Eine weitere Erleichterung ist die

schrittweise Entwickelung: Pionier-Axone legen Axonbahnen relativ früh in der Entwicklung fest und später auswachsende Axone können diesen Axonen dann folgen (Tessier-Lavigne and Goodman 1996; Hutter 2003).

Die spezifische Leitung von Axonen ist meist keine einfache bilateralen Rezeptor-Ligand-Interaktion, sondern wird erst durch entwicklungs- und gewebeabhängige Regulationsmechanismen erreicht. Die Regulation kann dabei auf verschiedenen Ebenen erfolgen: transkriptionelle und postranskriptionelle Regulation, Regulation über zellspezifische (autonome) Signale und über Rezeptoraktivierung durch Komplexierung (Yu and Bargmann 2001; Dickson 2002; Huber et al. 2003).

Zusammenfassend sind folgende Faktoren primär richtungsweisend für auswachsende Axone:

1. die molekularen Eigenschaften bzw. Ausstattung des Wachstumskegels
2. die molekulare Umgebung des auswachsenden Axons
3. die Regulationsmechanismen denen diese Signalmoleküle unterworfen sind

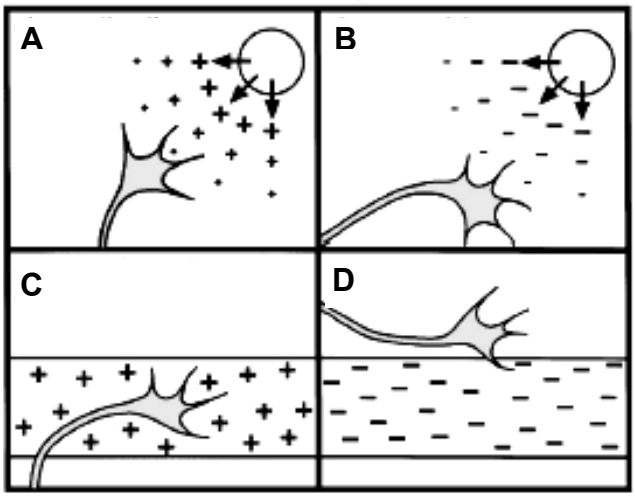


Abb. 1.1: Prinzipien der axonalen Wegfindung. **A** Chemoattraktion, **B** Chemorepulsion, **C** Kontakt-abhängige Anziehung, **D** Kontakt- abhängige Abstoßung. (Verändert nach Mueller, 1999).

1.1 Evolutionär konservierte Moleküle der axonalen Wegfindung

Signale und Signalwege der axonalen Wegfindung sind über die Artgrenzen hinweg konserviert und entstanden wahrscheinlich durch divergente Evolution aus einem ursprünglichen Metazoa. Vertebraten haben im Allgemeinen eine größere Zahl von Liganden und Rezeptoren, die auf Genomduplikationen zurück zu führen ist (Chisholm and Tessier-Lavigne 1999). Die Signale können wie folgt untergliedert werden: klassische Signalmoleküle (Netrine, Slits, Semaphorine, und Ephrine), Zelladhäsionsmoleküle (IgCAMs, Cadherine und Integrine), Moleküle der extrazellulären Matrix und andere Moleküle (Wnt, Shh und BMP). Die funktionalen Eigenschaften dieser Untergruppen sind oft überlappend und Mitglieder verschiedener Untergruppen wirken oft als heteromultimere Komplexe zusammen (Übersichtsarktikel Yu and Bargmann 2001; Araujo and Tear 2003; Guan and Rao 2003; Huber et al. 2003).

1.1.1 Klassische Signalmoleküle

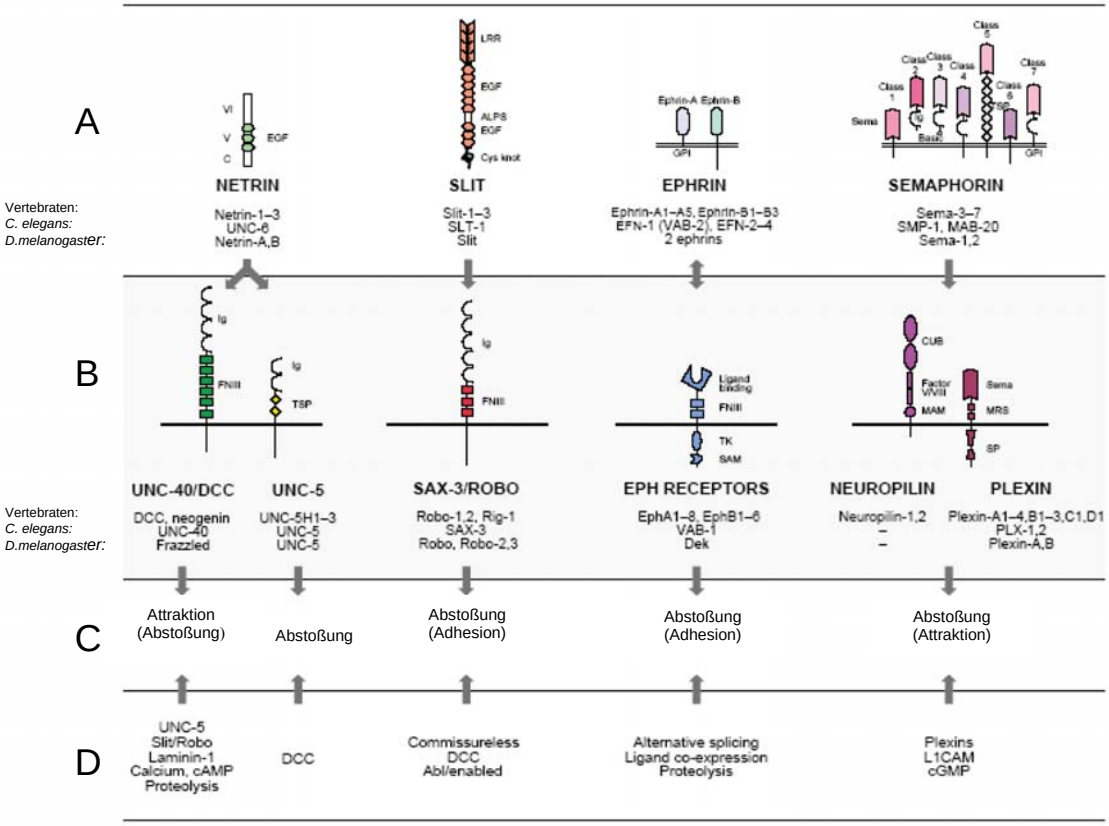


Abb.1.2: Die klassischen Signalmoleküle und ihre Rezeptoren. A: Signalmoleküle, die membrangebunden oder sekretiert sind, **B**: entsprechende Rezeptoren, **C**: Funktion/Auswirkung, in Klammern weitere Funktion, **D**: Modulatoren (verändert nach Yu, 2001).

1.1.1.1 Netrine

Die sekretierten Netrine haben Ähnlichkeit mit den Lamininen der Basalmembran. Sie waren die erste Familie von Signalmolekülen der axonalen Wegfindung, die entdeckt wurde (Hedgecock et al. 1990; Kennedy et al. 1994; Serafini et al. 1994). In *C. elegans* bildet das einzige Netrin Homolog UNC-6 einen Gradienten mit der höchsten Konzentration ventral und abnehmender Konzentration Richtung dorsal. Netrine können Anziehung oder Abstoßung vermitteln: UNC-40/DCC (*deleted in colorectal cancer*) und UNC-5, beide Mitglieder der Immunglobulin Superfamilie (IgSF), vermitteln Anziehung (UNC-40), bzw. Abstoßung (UNC-5) (Chan et al. 1996; Wadsworth 2002). Die Anziehung erfolgt durch Bindung von Netrin an ein UNC-40 Dimer. Die Abstoßung erfolgt entweder durch Bindung von Netrin an ein UNC-40/UNC-5 Dimer (Abstoßung über lange Distanzen) oder durch Bindung an UNC-5 (Abstoßung über kurze Distanzen) (Dickson and Keleman 2002). Die UNC-5 vermittelte Abstoßung kann durch MAX-1, ein Adapterprotein, moduliert werden (Huang et al. 2002). Des Weiteren kann die Anziehung vollständig unterdrückt werden, wenn das IgSF-Protein Robo an UNC-40/DCC bindet. Dabei wird Robo von Slit induziert (Stein and Tessier-Lavigne 2001). Neben der Modulation sind auch Faktoren des Signalweges, der zu Zytoskelettveränderungen führt, bekannt: UNC-34/Enabled, UNC-115 (Actin Bindeprotein), CED-10 (Rac Homolog) spielen dabei eine Rolle (Culotti and Merz 1998; Lundquist et al. 2001; Guan and Rao 2003).

1.1.1.2 Slits

Die Slits sind große sekretierte Moleküle mit EGF (*epidermal growth factor*) Domänen. Sie wurden in *D. melanogaster* entdeckt, wo sie Kommissuren, die Robo (*roundabout*) exprimieren abstoßen, so dass sie die Mittellinie nicht kreuzen. Kommissuren, die die Mittellinie kreuzen können, exprimieren Robo erst nach der Kreuzung. Das Robo Protein wird transient durch Comm (*commissureless*) unterdrückt, bis die Kommissuren die Mittellinie gekreuzt haben. Das heißt, wenn Comm ausgeschaltet ist, wird Robo nicht reprimiert und die Kommissuren kreuzen nie (Kidd et al. 1998; Kidd et al. 1999; Keleman et al. 2002). In *D. melanogaster* wird durch die kombinatorische Expression von Robo, Robo2 und Robo3 auf Axonen festgelegt, wie weit diese von der Mittellinie entfernt verlaufen (Rajagopalan et al. 2000; Yu and Bargmann 2001).

C. elegans besitzt ein Slit Homolog SLT-1 und ein Robo Homolog SAX-3. Comm ist in *C. elegans* nicht vorhanden (Zallen et al. 1998; Hao et al. 2001). Interessant ist, dass in *C. elegans* nicht alle Defekte der SAX-3/Robo Mutante auch in der SLT-1 Mutante zu sehen sind, was auf weitere Interaktionspartner hinweist (Hao et al. 2001).

1.1.1.3 Semaphorine

Die Semaphorine bestehen aus acht Unterfamilien sekretierter und Zelloberflächenmolekülen, die nicht nur bei der axonalen Wegfindung sondern auch im Immunsystem, der Organogenese, der Angiogenese und der Weiterentwicklung bestimmter Krebserkrankungen eine Rolle spielen. Alle besitzen die konservierte Semaphorin Domäne und einige interessanterweise eine Ig-Domäne (Committee 1999; He et al. 2002).
Das erste Semaphorin wurde in der Heuschrecke als Fasciclin IV (Semaphorin I) entdeckt und beeinflusst die Faszikulierung von Axonen (Kolodkin et al. 1992). In Vertebraten wurden die Semaphorine (Sema3A/Collapsin-1) als Faktoren identifiziert, die zum Kollaps des Wachstumskegels führen (Luo et al. 1993). Inzwischen ist aber bekannt, dass Semaphorine Abstoßung und Anziehung vermitteln können (Bagnard et al. 1998). Die Rezeptoren für Semaphorine sind Plexine, die eine große intrazelluläre Domäne besitzen, und die nur in Vertebraten vorhandenen Neuropiline (NP) (Chen et al. 1998). Die Plexine bilden vier Unterfamilien: PlexinA, -B, -C und D (Tamagnone et al. 1999; Nakamura et al. 2000). Die meisten Semphorine binden Plexine alleine, nur die Klasse 3 Semaphorine benötigen einen Komplex: Semaphorin 3A bindet den Komplex aus NP-1 und PlexinA und Semaphorin 3F bindet an NP-2 und PlexinA (Chen et al. 1997; Chen et al. 1998; Takahashi et al. 1999). Bei der Signalvermittlung, die schließlich zum Kollaps des Aktinskeletts und damit des Wachstumskegels führt, spielen Rac und Rho GTPasen sowie UNC-33/CRMP-62 (*collapsing response mediator protein*) eine Rolle (Übersichtsarktikel He et al. 2002).
Ein bemerkenswerter Punkt ist, dass Semaphorin 3A vermittelte Abstoßung in Vertebraten von dem IgSF Protein L1 abhängig ist. Dabei bilden die extrazellulären Domänen von NP-1 und L1 einen Komplex (Castellani et al. 2000).
In *C. elegans* kodieren 3 Gene Proteine mit einer Semaphorin Domäne und zwei Proteine mit Plexin- ähnlichen Domänen (Hutter et al. 2000). Für ein Semaphorin (MAB-20 = Semaphorin 2A) konnte eine Rolle bei der axonalen Wegfindung gezeigt werden. *C. elegans mab-20* Mutanten zeigen Defaszikulierung von Axonen (Roy et al. 2000).

1.1.1.4 Ephrine

Die Ephrine sind eine Familie von Zelloberflächenmolekülen, die neben vielen anderen Funktionen auch eine Rolle bei der axonalen Wegfindung spielt. Sie werden anhand ihrer Membranverankerung in zwei Klassen unterteilt: A-Typ Ephrine (EphrinA) sind mittels eines GPI-Ankers an die Membran gebunden und B-Typ Ephrine (EphrinB) besitzen eine Transmembrandomäne mit einer anschließenden intrazellulären Domäne (Gale et al. 1996; Kullander and Klein 2002). Ephrine binden an die ebenfalls membranständigen Eph-RTKs (Ephrin-Rezeptor-Tyrosin-Kinase) und wirken im Nervesystem hauptsächlich durch kontaktabhängige Abstoßung und als Adhesionsmoleküle (Orioli and Klein 1997). Eine Besonderheit ist die bidirektionale Signalweiterleitung bei der axonalen Wegfindung. Einerseits kann der Eph-Rezeptor nach Bindung an EphrinB autophosphoryliert werden, was zu einer Signalweiterleitung in der Eph-Rezeptor-exprimierenden Zelle führt, andererseits wird auch der Ligand EphrinB phosphoryliert und induziert ebenfalls eine Signalkaskade (Bruckner et al. 1999; Murai and Pasquale 2003).
In *C. elegans* gibt es vier Ephrin Homologe (EFN-1-4) und ein Eph-Rezeptor Homolog (VAB-1) für die aber bisher keine Funktion bei der axonalen Wegfindung gezeigt werden konnte. Sie spielen bei Morphogenese und der Etablierung von Zellkontakten eine Rolle (Chin-Sang et al. 1999; Hahn and Emmons 2003).

1.1.2 Adhäsionsmoleküle

Die Zelladhäsion ist eine Funktion, die erst ab der Entstehung von Metazoa notwendig wurde und damit folgte auch die Entstehung von neuen Proteinen. Neben den IgCAMs, den Cadherinen und Integrinen fehlen in der einzelligen Hefe viele weitere Proteine, die eine Rolle bei Adhäsion von Zellen haben (C-Typ Lektine, Kollagene, Laminine). Die Entdeckung der Zelladhäsionsmoleküle erfolgte durch Antikörper, die gegen Zelloberflächenmoleküle gerichtet waren und Zelladhäsion inhibierten.
Die Ca^{2+}-abhängigen Cadherine und Ca^{2+} unabhängigen IgCAMs vermitteln primär Zelladhäsion und die Integrine hauptsächlich Bindung an Komponenten der extrazellulären Matrix (ECM).
Zelladhäsion ist während der Ontogenese von Bedeutung, um Zellen an bestimmte Nachbarzellen zu einem bestimmten Zeitpunkt zu binden. Diese dynamische Bindung muss einen Zelladhäsionsmolekül-vermittelten, von Innen nach Außen verlaufenden, Signalfluss

(*inside out signaling*) erlauben, zu dem noch wenig bekannt ist (Kamiguchi and Lemmon 2000). Selektive Adhäsion ist nicht nur für einwandernde Zellen wichtig, sondern auch für zielgerichtetes axonales Auswachsen. Zelladhäsionsmoleküle sind notwendig zur Anheftung des Wachstumskegels an seine Umgebung, um über Signalmoleküle interagieren zu können, damit die Zellmembran des Axons zur Synapsenbildung in engen Kontakt mit Zielzellen kommt und zur Bildung von Axonbündeln (Alberts et al. 1994). Im Folgenden werden die Zelladhäsionsmoleküle der Immuglobulin Superfamilie (IgSF), die so genannten IgCAMs ausführlich dargestellt und die Cadherine sowie Integrine beschrieben.

1.1.2.1 IgCAMs

Die IgCAMs (*Ig cell adhesion molecules*) gehören der Immunglobulin Superfamilie (IgSF) an, die eine der größten, ältesten und konserviertesten Genfamilien ist. Im Allgemeinen spielen IgSF Mitglieder eine wichtige Rolle bei der Zell-Zell Erkennung (Williams and Barclay 1988; Barclay 2003). Die IgCAMs sind in Zell-Zell Interaktion involviert, in der sie Zelladhäsion vermitteln oder als Rezeptoren der Signalweiterleitung dienen. Diese Funktionen werden durch Dimerbildung in *cis* (an derselben Membran) oder *trans* (zwischen zwei Membranen), sowie durch Komplexbildung, was zu so genannten *CAMisoms* führt, moduliert und ausgeführt (Sonderegger 1998; Kamiguchi and Lemmon 2000; Rutishauser 2000). Das gemeinsame Merkmal ist die Immunglobulin Domäne (Ig-Domäne, ca. 100 Aminosäuren lang), die durch die hohe Stabilität (sehr resistent gegen Proteolyse) und ihre hohe Toleranz gegenüber Variationen in der Primärsequenz im Laufe der Evolution stark expandieren konnte (Sonderegger 1998). Die IgCAMs bestehen meist aus mehreren Ig-Domänen und zusätzlich oft noch aus Fibronektin III Domänen (Walsh and Doherty 1997). Die Ig- sowie die Fibronektin III Domäne bildet eine Tertiärstruktur aus, die aus zwei β-Faltblatt Ebenen besteht, die als *sandwich* bzw. aufgrund der Anordnung der β- Stränge als *greek key superfold* bezeichnet wird und auch die Tertiärstruktur der Cadherine ist (Abb. 1.3). Für die Ig-Domäne sind zwei Cysteine charakteristisch, die die beiden Ebenen verbinden und sie stabilisieren (Williams and Barclay 1988; Vaughn and Bjorkman 1996).

Die Ig-Domäne wird in vier strukturell unterschiedliche Klassen (Sets) unterteilt. In jedem Set sind die meisten Mitglieder mehr als 70% identisch in ihrer Konformation, auch wenn die Primärsequenzen eher unähnlich sind (Teichmann and Chothia 2000).

Das C1-Set entspricht der konstanten Domäne von Molekülen des Immunsystems. Die Cysteine sind 55-60 Aminosäuren voneinander entfernt. Es werden 7-8 antiparallele β-

Faltblätter gebildet. Das V-Set hat Ähnlichkeit mit der variablen Domäne von Molekülen des Immunsystems. Die Cysteine sind 65-75 Aminosäuren voneinander entfernt. Es werden 9-10 antiparallele β-Faltblätter gebildet. Dieses Set kommt vor allem bei Vertebraten vor. Die Primärsequenz des C2-Sets ist sehr ähnlich zum V-Set, aber die Abstände der Cysteine entsprechen dem C1-Set. Es werden 9 antiparallele β-Faltblätter gebildet. Dieses Set ist das häufigste bei den IgCAMs (Williams and Barclay 1988; Salzer and Colman 1989). Das I-Set (I = Intermediär) verbindet Strukturen des V- und C1-Sets und wurde erst später entdeckt (Harpaz and Chothia 1994).

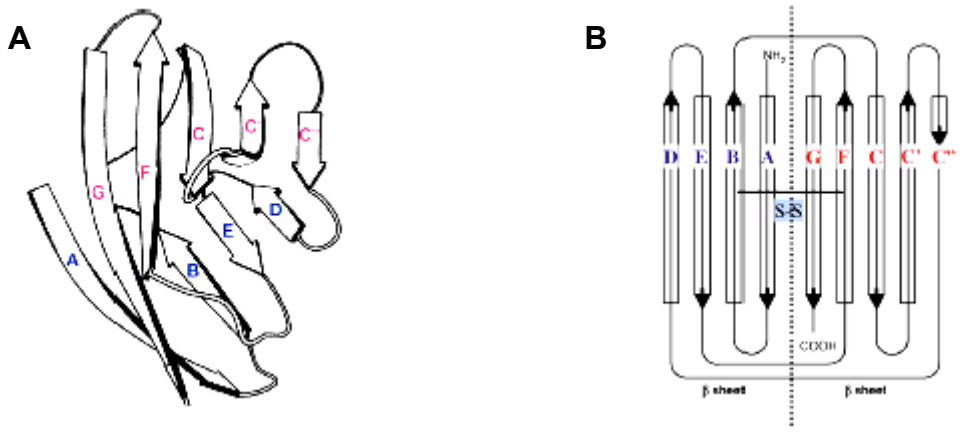


Abb. 1.3: Typische Konformation der Ig-Domäne (V-Set). **A** β-Stänge sind als Bänder, die Verbindungen als Linien dargestellt. **B** schematische Darstellung einer Ig Domäne des V-Sets. Beim C-Set fehlen C` und C``. S-S Disulfidbrücke. Verändert nach Barclay, 2003

Eine weitere Unterteilung kann anhand der Membranverankerung vorgenommen werden. IgCAMs besitzen entweder eine Transmembrandomäne oder einen GPI-Anker. Es gibt auch einige, die nur aus wenigen (ein oder zwei) Ig-Domänen bestehen und sekretiert sind (Rougon and Hobert 2003).

IgCAMs mit GPI-Anker können zwar keine Signale in die Zelle vermitteln, aber sie können durch PI-PLC (Phosphatidylinositol spezifische Phospholipase C) (Walter et al. 1990; Yoshihara et al. 1991) von der Zellmembran abgespalten werden, womit bestehende Zellkontakte gelöst werden könnten. Des Weiteren könnten sie als frei bewegliche Moleküle im extrazellulären Raum eine Funktion als Modulator von Zelladhäsion haben, oder sich in die ECM einlagern, um dort ein Substrat für spezifische Zelladhäsion zu bilden. Freigesetzte IgCAMs könnten Gradienten für auswachsende Axone ähnlich wie UNC-6 bilden (Furley et al. 1990).

Außerdem haben GPI verankerte Moleküle eine höhere laterale Mobilität was *cis* Interaktionen erleichtert (Dustin et al. 1987).
Für einige IgCAMs ist die Funktion bei der axonalen Zielfindung bereits gut untersucht (Rougon and Hobert 2003). Dazu zählen neben den weiter oben beschriebenen Molekülen UNC-40/DCC, UNC-5 und Robo/SAX-3, NCAM/FasII (Pollerberg and Beck-Sickinger 1993), L1/NgCAM/LAD-1 (Cohen et al. 1998; Chen et al. 2001), Axonin-1/TAG-1 (Falk et al. 2002), DM-GRASP/IrreC/SYG-1 (Burns et al. 1991; Avci et al. 2004; Shen 2004) und DSCAM (Schmucker et al. 2000). Ein interessanter Aspekt von IgCAMs bei der axonalen Zielfindung ist, dass sie nicht nur Zell-Zell Interaktionen, sondern auch deren Unterbrechung regulieren können. Fehlt beispielsweise das Beat-1a Genprodukt in *D. melanogaster,* ist die Defaszikulierung von Motorneuronen gestört. Durch die Verringerung von FasII/NCAM, welches Adhäsion vermittelt, kann dieser Defekt unterdrückt werden (Fambrough and Goodman 1996; Rougon and Hobert 2003).
Neben der Funktion bei der axonalen Zielfindung konnten durch *in vitro* Studien viele Aussagen über die Interaktionen zwischen gleichen (homophile Interaktion) und unterschiedlichen (heterophile Interaktion) IgCAMs gemacht werden (Kamiguchi and Lemmon 2000; Pavlou et al. 2002). In *C. elegans* sowie auch in Vertebraten ist zur Mehrzahl der IgCAMs, vor allem *in vivo,* noch wenig bekannt.

1.1.2.2 Cadherine

Cadherine (*calcium-dependent-adherent proteins*) spielen nicht nur eine wichtige Rolle während der Morphogenese, sondern auch während der Entwicklung des Nervensystems (Yap et al. 1997). Sie bilden eine Proteinfamilie mit mehreren Unterfamilien. Die am besten untersuchte Unterfamilie sind die klassischen Cadherine, (B-, E-, N-, P- und R-Cadherin) mit einer Transmembrandomäne und fünf extrazellulären Cadherin Domänen (EC1-EC5) (Übersichtsartikel Ranscht 2000). Die zytoplasmatische Domäne ist hoch konserviert und interagiert mit den Cateninen, welche die Cadherine mit dem Actin-Zytoskelett verbinden (Kemler 1993). Die klassischen Cadherine und vor allem N-Cadherin vermitteln Ca^{2+} abhängige, hauptsächlich homophile Zelladhäsion während dem axonalen Auswachsen (Riehl et al. 1996; Lee et al. 2001). Im Gegensatz dazu wirkt T-Cadherin abstoßend auf auswachsende Axone (Fredette and Ranscht 1994). Interessant ist, dass das IgCAM Robo N-Cadherin vermittelte Zelladhäsion lösen kann (Rhee et al. 2002).

In *C. elegans* gibt es 13 Cadherine und nur eines, HMR-1, welches eine cytoplasmatische Domäne homolog zu der von klassischen Cadherinen aufweist. Es werden zwei Isoformen gebildet (A und B). Die B-Isoform spielt eine Rolle bei der Bündelung von Axonen, die A-Isoform ist für die Morphogenese wichtig (Broadbent and Pettitt 2002).

1.1.2.3 Integrine

Integrine bestehen aus zwei Untereinheiten, die beide eine Transmembrandomäne besitzen: α- und β- Untereinheit. Die beiden Untereinheiten bilden nach ihrer Synthese im endoplasmatischen Retikulum eine stabile Einheit. Durch die Kombination von verschiedenen α- und β- Untereinheiten wird ein Set von unterschiedlichen Integrinen erzeugt, die eine Vielfalt an spezifischen Interaktionen ermöglicht. In Vertebraten spielen Integrine eine Rolle bei der Wanderung von Nervenzellen und bei der Synaptogenese (Emsley and Hagg 2003). Integrine werden in solche mit RGD Bindedomäne und andere mit Laminin Bindedomäne untergliedert. Integrine mit einer RGD Bindedomäne interagieren mit dem IgCAM L1. Allerdings ist diese Interaktion beschränkt auf die Wanderung von Melanomzellen (Brümmendorf 1995).
In *C. elegans* konnten drei Integrin Untereinheiten identifiziert werden: INA-1, PAT-2 (α-Integrine) und PAT-3 (β-Integerin). INA-1/PAT-3 entsprechen wahrscheinlich den Laminin-bindenden Integrinen und PAT-2/PAT-3 den Integrinen mit einer RGD bindedomäne. INA-1 *C. elegans* Mutanten zeigen axonale Defekte (Poinat et al. 2002).

1.1.3 Moleküle der extrazellulären Matrix

Die extrazelluläre Matrix (ECM) bildet die Basalmembran, die ein Substrat für auswachsende Axone ist. Sie wird vor allem aus fibrillären Molekülen wie Laminin, Fibronektin, Kollagenen und Proteoglycanen gebildet, die ein dichtes Netzwerk ausbilden und zu den ältesten und am besten konservierten Molekülen der ECM gehören (Kramer 1997). Einige dieser ECM-Moleküle fördern das Auswachsen, andere wirken hemmend (Bixby and Harris 1991). In *C. elegans* sind für das axonale Auswachsen vor allem Laminin (Ishii et al. 1992) und Kollagen XV/XVIII (Ackley et al. 2001) essentiell. Nidogen (Kim and Wadsworth 2000) und Fibronektin (KAL-1) (Hutter et al. 2000; Rugarli et al. 2002) hingegen sind keine Hauptbestandteile der ECM. Nidogen findet sich in *C. elegans* vor allem in der

Basalmembran an der Körperwand und steuert axonales Auswachsen entlang der Körperachse.

1.1.4 Andere Moleküle der axonalen Wegfindung

Zu diesen Molekülen zählen die Morphogene TGFβ/BMP (*transforming growth factor/bone morphogenic protein*) und Shh (*sonic hedgehog*) sowie Mitglieder der Wnt-Familie.

1.1.4.1 TGFβ/BMP und Shh

BMPs gehören zur TGFβ Superfamilie. Sie spielen allgemein in der frühen Entwicklung und der Zelltypspezifikation eine Rolle, die dem axonalen Auswachsen vorangeht (Hogan 1996). BMP7, welches von der dorsalen Seite des Rückenmarks exprimiert wird, stößt Kommissuren im Rückenmark ab, die Richtung dorsal wachsen (Dodd and Jessell 1988; Augsburger et al. 1999). In *C. elegans* ist ein nah verwandtes TGFβ Protein (UNC-129) bekannt, welches die Kommissuren entlang der dorso-ventralen Achse leitet. Es hat eine ähnlich abstoßende Wirkung wie UNC-6 (Colavita et al. 1998; Nash et al. 2000).
Shh spielt vor allem bei der Musterbildung verschiedener Gewebe und bei der Zelltypspezifikation eine Rolle. In Vertebraten wirkt es als chemoattrativer Faktor, der in derselben Region vorhanden ist wie Netrin-1 (siehe Übersichtsartikel Osterfield et al. 2003). In *C. elegans* gibt es kein Homolog, allerdings sind zehn Gene bekannt, die Sequenzähnlichkeit mit dem C-Terminus von Hedghog aufweisen. Der N-Terminus dieser Gene kodiert allerdings für neue Module, die als *wart* bzw. *ground* bezeichnet wurden. Diese Genfamilie wurde dem entsprechend in *C. elegan*s als *warthog* (*wrt*) und *groundhog* (*grd*) benannt (Aspock et al. 1999).

1.1.4.2 Wnt

Die Mitglieder dieser Familie sind sekretiert und sind bekannt für ihre Rolle bei der Musterbildung (Moon et al. 2002).
Es konnte gezeigt werden, dass Wnt auch für zielgerichtetes Auswachsen von Kommissuren entlang der Längsachse in *D. melanogaster* und der Maus notwendig ist (Lyuksyutova et al. 2003; Yoshikawa and Thomas 2004). In *C. elegans* gibt es fünf Wnt Homologe, die alle in der

Entwicklung und Migration von Neuronen eine Rolle spielen, aber bis jetzt keine bekannte Funktion bei der axonalen Wegfindung haben (Maloof et al. 1999; Whangbo and Kenyon 1999). Vor kurzem konnte aber in unserem Labor in einem RNAi *screen* für *pry-1*, welches mit dem Wnt Signalweg intergagiert, eine Funktion bei der axonalen Zielfindung gezeigt werden.

1.1.5 Intrazelluläre Signaltransduktion der axonalen Wegfindung

Die Richtungsänderung eines Wachstumskegels wird durch das Aktinskelett erreicht und durch Mikrotubuli stabilisiert. Signale müssen für zielgerichtetes Auswachsen an das Aktinskelett und die Mikrotubuli vermittelt werden.

Der Aktinskelett Aufbau wird von Profilin und Arp2/3 (*actin-related protein 2/3*) reguliert. In Zellkultur ist die Verbindung dieser Moleküle mit Integrin sehr gut untersucht. Dabei werden zwischen der ECM und der Zelle fokusierte Adhesionskomplexe (*focal adhesion complex*) bestehend aus Integrin gebildet. Außerdem sind an diesem Komplex auch Proteine der Signaltransduktion, wie FAK (*focal adhesion kinase*) und Mitglieder der Rho GTPasen Familie beteiligt (Burridge and Chrzanowska-Wodnicka 1996; Suter and Forscher 1998).

Letztere ist eine wichtige Molekülfamilie bei der Signaltransduktion im Wachstumskegel. Zu ihr gehören Rho, Rac und Cdc42 (Gallo and Letourneau 1998; Lundquist et al. 2001). Sie werden über GEFs (*guanin exchange factor*) und GAPs (*GTPase activating factor*) gesteuert und modulieren Aktinpolymerisation über N-WASP und den Arp2/3 Komplex. Signalmoleküle für axonales Auswachsen sind nun direkt oder indirekt mit GEFs oder GAPs verbunden und regulieren so die Aktivität der GTPasen (Huber et al. 2003).

Aktinpolymerisation wird auch durch das Profilin bindende Protein Ena/*UNC-34* gesteuert. Eine direkte Interaktion von Ena/UNC-34 mit Signalmolekülen der axonalen Wegfindung ist noch nicht bekannt, obwohl gezeigt ist, dass Ena/UNC-34-Funktionsverslust zu Auswachsdefekten führt. Ena/UNC-34 ist ein Substrat für die Tyrosin Kinase Abl/UNC-115 (Abelson) und ist bei der SLT-1/SAX-3 vermittelten Abstoßung von Bedeutung (Yu et al. 2002).

Die Interaktion zwischen IgCAMs und dem Aktinskelett sind noch weitgehend unerforscht. Nur für L1/LAD-1 ist eine Interaktion über Ankyrin und Spektrin mit dem Zytoskelett bekannt (Bennett and Chen 2001). Im Gegensatz dazu ist schon einiges über die von IgCAM-Interaktionen ausgelöste Signalkaskade bekannt (Doherty and Walsh 1996; Saffell et al. 1997). Die homophile Bindung in *trans* von NCAM oder L1 (oder auch N-Cadherin) führt zu

einer Phosphorylierung der FGF-Rezeptor-Tyrosinkinase, die PLCγ (Phospholipase Cγ) aktiviert. Im Folgenden wird DAG-Lipase (Diacylglycerol-Lipase) und Produktion von Arachidonsäure gesteuert, was zu einer Steigerung der intrazellulären Ca^{2+} Konzentration führt. Dadurch wird der MAPK Signalweg ausgelöst (Skaper et al. 2001). NCAM kann aber auch eine FGF-Rezeptor unabhängige Signalkaskade über die Tyrosinkinase Fyn und FAK (*focal adhesion kinase*) auslösen, die ebenfalls im Ras-MAPK Signalweg einmündet und den Transkriptionsfaktor CREB (*cAMP-response element binding proteine*) aktiviert (Übersichtsartikel Huber et al. 2003).

1.2 *Caenorhabditis elegans* als Modelorganismus

In der freien Natur ist *C. elegans* ein Bodenbewohner und ernährt sich von den dort vorkommenden Bakterien. Seine einfache Anatomie sowie die einfache Kultivierung machen ihn zu einem geeigneten Untersuchungsobjekt für die Entwicklungsbiologie. Unter Laborbedingungen wird er entweder auf Agarplatten oder in Flüssigmedium kultiviert. Bei einer Temperatur von 20°C dauert sein Entwicklungszyklus etwas länger als 4 Tage. Stämme können zur Aufbewahrung bei -80°C eingefroren werden. Ein Hermaphrodit produziert etwa 300 Eier. Nach dem Schlüpfen durchläuft das Tier vier Larvenstadien (L1-L4), die sich hauptsächlich in der Größe unterscheiden. Die Population besteht fast nur aus Hermaphroditen. Männchen treten mit einer Häufigkeit von ca. 0,2% auf, so dass Kreuzungsexperimente und genetische Untersuchungen möglich sind.

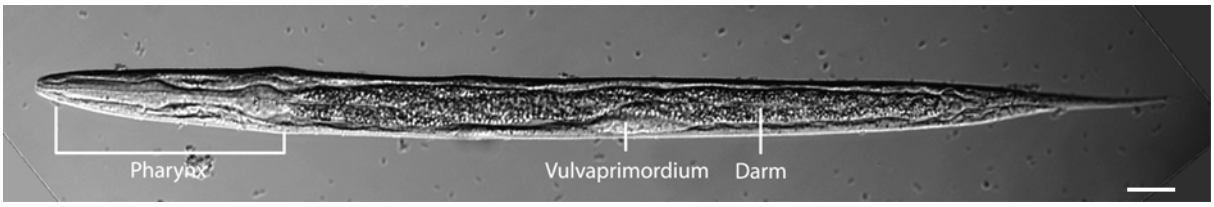


Abb.1.4: *Caenorhabiditis elegans* Larve (L4 Stadium). Der Pharynx besteht aus einem anterioren Bulbus, der durch den Isthmus vom posterioren Bulbus getrennt ist. Balken 20µm

Unter ungünstigen Umweltbedingungen entwickeln sich aus L2 Larven Dauerlarven, die sich zu L4 Larven weiter entwickeln, sobald günstigere Bedingungen eintreten. Das adulte Tier ist ungefähr einen Millimeter lang und besteht aus 959 somatischen Zellen. Die somatische Zelllinie ist invariant, so dass jedes Tier die gleiche Anzahl von Zellen mit identischer

Zellposition besitzt und dadurch auch kleine Abweichungen, z.B. in Mutanten, leicht erkannt werden können (Sulston and Horvitz 1977; Sulston et al. 1983; Sulston and Hodgkin 1988).
Das Genom von *C. elegans* ist sequenziert (Consortium 1998) und enthält ca. 19000 Gene, wovon ca. 30 % Homologe in Vertebraten haben.
Unter *www.wormbase.org* sind die vollständige Sequenz, sowie Daten zu den einzelnen Genen, genetischen Marken und Mutanten abrufbar. Außerdem steht ein Anatomieatlas zur Zellidentifizierung zur Verfügung (*www.wormatlas.org*).

1.2.1 Das Nervensystem von C. elegans

Das einfache Nervensystem von *C. elegans* wird aus 302 Zellen gebildet, die meist unverzweigte Axone und Kommissuren ausbilden. Es besteht aus einem Kopfganglion, von dem aus sensorische Neurone Axone in die Nasenspitze und Interneurone Axone in den Ventralstrang senden. Die meisten Axone des Kopfganglions wachsen zuerst entlang des Nervenringes, der zwischen den zwei Bulben des Pharynx verläuft. Der Ventralstrang besteht, anders als bei anderen Organismen, aus zwei asymmetrischen Axonbündeln. Das rechte Bündel umfasst über 40 Axone, das linke nur vier. Beide Bündel sind durch einen Epidermiswulst getrennt. Entlang des Ventralstranges liegen Motorneuronzellkörper mit Axonen im Ventralstrang. Einige Motorneuronklassen bilden Kommissuren aus, die Richtung dorsal wachsen und in den Dorsalstrang einmünden. Am hinteren Ende des Tieres befindet sich das Schwanzganglion, von dem aus Interneurone Axone in Richtung Kopf senden. Neben dem Ventral- und Dorsalstrang wachsen einige Axone auch in lateraler Position entlang der Körperachse.

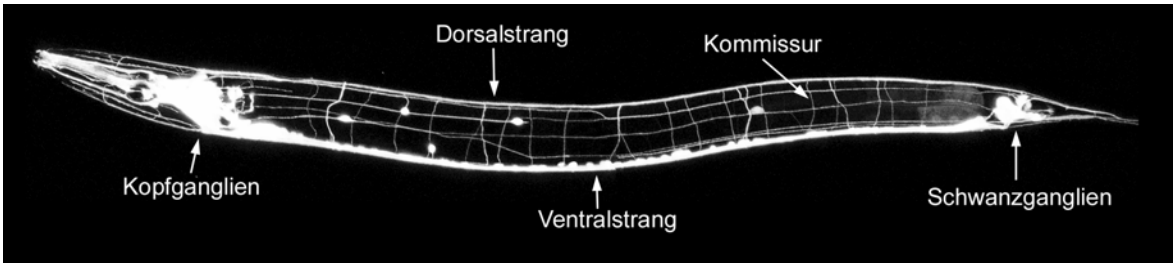


Abb.1.5: Das Nervensystem von *C. elegans*. Konfokale Aufnahme eines Tieres in dem das gesamte Nervensystem GFP exprimiert.

Aufgrund der Transparenz von *C. elegans* kann der Verlauf der Axone im lebenden Organismus unter dem Mikroskop verfolgt werden.

Das gesamte Nervensystem eines adulten Hermaphroditen ist anhand von Elektronenmikroskopaufnahmen (Serienschnitte) von White und Kollegen rekonstruiert und detailliert beschrieben worden (White et al. 1986). Diese Beschreibung wird ergänzt durch die Arbeit von Durbin zur Entwicklung und Organisation des Nervensystems (Durbin 1987).

1.2.2 Die IgCAMs in *C. elegans* und ihre Homologe

Durch die vollständige Sequenzierung des Genoms von *C. elegans* im Jahr 1998 (The *C elegans* Sequencing Consortium 1998) wurde es möglich neue Genfamilien zu finden, sowie bekannte zu vervollständigen. Alle Gene der IgSF wurden beschrieben und ihre Domänenstruktur analysiert (Hutter et al. 2000; Teichmann and Chothia 2000; Aurelio et al. 2002; Vogel et al. 2003). Die IgSF ist in *C. elegans* mit 80 Mitglieder im Gegensatz zu *D. melanogaster* (142) (Vogel et al. 2003) und Mensch (865) (Thiery 2003) relativ klein. Von den 80 Molekülen, die mindestens eine Ig-Domäne besitzen, können nur 17 zu den eigentlichen IgCAMs, die entweder nur aus Ig-Domänen bzw. aus Ig-Domänen und Fibronektin III Domänen zusammengesetzt sind, gezählt werden. Die restlichen Moleküle der IgSF besitzen zusätzlich noch andere Domänen. Eine Ausnahme hiervon bildet *UNC-5*, da es neben zwei Ig Domänen noch zwei Thrombospondin-Domänen besitzt aber traditionell zu den IgCAMs gezählt wird. Von den IgCAMs im engeren Sinne sind die sekretierten *oig*- und *zig* Gene bestehend aus ein oder zwei Ig Domänen ausgeschlossen (Aurelio et al. 2002; Rougon and Hobert 2003).

Für sechs IgCAMs waren in *C. elegans* schon Funktionen bekannt bzw. erschienen kürzlich Veröffentlichungen. *Syg-1* und *syg-2* spielen eine Rolle bei der Spezifizierung von Synapsen (Shen and Bargmann 2003; Shen 2004; Shen et al. 2004). *Lad-1*/L1 spielt eine Rolle bei der Morphogenese des Embryos und der Gonaden sowie der Keimzellenentwicklung (Chen et al. 2001). Kürzlich wurde gezeigt, das LAD-1 auch bei der Aufrecherhaltung der Position von Neuronen eine Rolle spielt (Sasakura et al. 2005). *Sax-3*/robo, *unc-40*/DCC und *unc-5* spielen eine wichtige Rolle bei der axonalen Wegfindung (Chan et al. 1996; Zallen et al. 1998).

Für 13 IgCAMs gibt es in *C. elegans* keine funktionellen Untersuchungen, allerdings sind Funktionen für einige Homologe bekannt. *Sdk* (*sidkick*) ist homolog zu *rig-4* und vermittelt homophile Adhäsion. Sdks sind in Vertebraten im synaptischen Spalt lokalisiert und wahrscheinlich für die Verbindung von pre- und postsynaptischer Membran verantwortlich (Yamagata et al. 2002; Shen 2004). In *D. melanogaster* ist *sdk* an der Musterbildung der Facettenaugen beteiligt (Nguyen et al. 1997). *Rig-6* ist homolog zu Axonin-1/Contactin/TAG-

1, welche mit L1 und NrCAM interagieren können (Fitzli et al. 2000). *In vivo* wurde gezeigt, dass F3/Contactin an der Morphogenese des Cerebellum beteiligt ist und axonale Auswachsdefekte verursacht (Falk et al. 2002). Für *rig-1* gibt es in *D. melanogaster* und Vertebraten (Maus und Mensch) je ein struktur-homologes Gen. Die Homologen in Maus und Mensch (Igsf9 und IGSF9) sind neben dem Nervensystem noch in einer Vielzahl von anderen Geweben exprimiert (Doudney et al. 2002). Im Gegensatz dazu ist das *tutl* (*turtle*) Gen in *D. melanogaster* von der Embryogenese bis zum adulten Tier ausschließlich im Nervensystem exprimiert. *Tutl* Mutanten sind im späten Puppenstadium letal. Tiere mit einem schwachen Allel überleben, zeigen aber schwere Bewegungsdefekte. Erstaunlicher weise wurden keine axonalen Auswachsdefekte oder andere neuronale Defekte gefunden (Bodily et al. 2001). *Ncam-1* in *C. elegans* ist das Strukturhomolog für das prototypische IgCAM NCAM bzw. Fasciclin II in *D. melanogaster*, wo es für die Faszikulierung von Axonen in längs gerichtete Axonbündel verantwortlich ist (Lin et al. 1994). Eine NCAM Mausmutante zeigte trotz der starken Expression von NCAM im Nervensystem nur schwache Defekte (Cremer et al. 1994). Für *icam-1* wurde ein einziges Homolog in *D. melanogaster* gefunden: *Echinoid* (*Ed*). *Ed* Null-Mutanten sind embryonal letal. Es wurde gezeigt, dass *Ed* für die Augen- und Flügelentwicklung essentiell ist. *Ed* Mutanten zeigen neuronale Hyperplasie, die schon mit einer vermehrten Anzahl von neuronalen Vorläuferzellen beginnt. Die Vergrößerung des zentralen Nervensystems (ZNS) geht mit einem Verlust an Epithel einher (Kutikuladefekte). Diese Phänotypen entsprechen Defekten, die bei Funktionsverlust des Notch-Signatransduktionsweges auftreten. Die verstärkte Differenzierung in neuronales Gewebe in *Ed* Mutanten kann durch Überexpression von Notch aufgehoben werden (Ahmed et al. 2003).

	C. elegans Gen	*D. melanogaster*	Vertebraten
1	*rig-4*	Sidekick *(sdk)*	Sdk
2	*unc-40*	frazzled	DCC, neogenin
3	*lad-1/lad2*	neuroglian	L1CAM, CHL1, NrCAM, NgCAM, neurofascin
4	*rig-6*	Dcontactin	contactin/F3/F11, TAG-1/axonin-1
5	*sax-3*	robo 1-3	Robo 1-4
6	*rig-1*	Turtle (*tutl*)*	igsf9*, IGSF9*(KIAA1355)
7	*ncam-1*	fasciclin II (fas II)*	NCAM*
8	*icam-1*	Echinoid (*ed*) *	-
9	*icam-2*	-	-
10	*syg-2*	Hibris *(hbs)*, Stiks-and-stones *(sns)* **	Nephrin*
11	*wrk-1*	wrapper, klingon (*klg*)	-
12	*rig-3*	-	-
13	*syg-1*	IrreC, Kirre, (*sidestep*)	DM-GRASP/SC1, gicerin, ALCAM
14	*icam-3*	-	-
15	*rig-5*	-	-
16	*unc-5*	Dunc-5	Unc5h1-4,

Tab. 1.1: Übersicht der IgCAMs in *C. elegans* und Homologe in *D. melanogaster* und Vertebraten. * Die Tertiärstrukturen von Homologen IgCAMs sind besser konserviert während der Evolution als Primärsequenzen, (Blundell et al. 1987) so dass für manche IgCAMs nur ein Strukturhomolog gefunden werden kann**. ** *** *sns* besitzt eine zusätzlich Ig-Domäne (9 Ig, 1 F3).

Homologe von *syg-2* sind in *D. melanogaster hibris* und *sns* (*sticks-and-stones*), sowie in Vertebraten Nephrin (Shen et al. 2004). *Sns* ist im Mesoderm exprimiert und spielt eine wichtige Rolle bei der Fusion von Myoblasten zu Muskelfasern (Bour et al. 2000).

Syg-1 ist homolog zu IrreC/Kirre und SC1. In *C. elegans* ist *syg-1* der Bindungspartner von *syg-2* bei der Spezifizierung von Synapsen (Shen and Bargmann 2003; Shen 2004). IrreC/Kirre ist einerseits wichtig für die Interaktion bei der Muskelfaserentwicklung zusammen mit *sns* (*sns* und Kirre) und andererseits für das zielgerichtete axonale Auswachsen (*sns* und IrreC) (Boschert et al. 1990; Schneider et al. 1995; Strukelnberg et al. 2001). Axonale Auswachsdefekete wurden auch in DM-GRASP/SC1 in Retina-Ganglien-Zellen im Hühnerembryo gefunden (Pollerberg and Mack 1994; Avci et al. 2004).

Für ein weiteres Gen in *C. elegans*, *wrk-1*, gibt es Homologe in *D. melanogaster*: Klingon (*klg*) und Wrapper. Klingon ist für die Entwicklung des R7 Photorezeptor Neurons wichtig (Butler et al. 1997). Wrapper wird auf der Oberfläche von Gliazellen auf der Mittellinie

während der Entwicklung der Kommissuren exprimiert. Funktionsverslust von Wrapper führt zu fehlgeleiteten Axonen, sowie zum Absterben von Glia (Noordermeer et al. 1998).

1.3 Zielsetzung der Arbeit

Die axonale Zielfindung spielt eine Schlüsselrolle bei der Entwicklung des Nervensystems. Der Vergleich der Komplexität des Vorganges der axonalen Zielfindung mit der verhältnismäßig geringen Zahl an bekannten axonalen Zielfindungssignalen deutet darauf hin, dass noch weitere Faktoren für diesen Entwicklungsprozess vorhanden sein müssen. Einige Mitglieder der Immunglobulin-Zelladhäsionsmolekül Familie (IgCAM-Familie) spielen eine bedeutende Rolle bei der Entwicklung des Nervensystems (UNC-5, UNC-40/DCC, SAX-3/Robo). Nach der Sequenzierung und Analyse des Genoms von *C. elegans* (Hutter et al. 2000) lag eine vollständige Liste der IgCAMs vor. Vorarbeiten von S. Voltmer (Voltmer 2001) zur Expression einiger IgCAMs zeigten vor allem neuronale Expression. Als Zelladhäsionsmoleküle eignen sie sich besonders gut für die bei der axonalen Zielfindung notwendige Etablierung von Zell-Zell Kontakten.

Daraus ergibt sich die Frage, ob die evolutiv alte Familie der IgCAMs generell wichtige Funktionen während der Entwicklung des Nervensystems hat. Ziel der Arbeit war einerseits die Beschreibung der Expression aller IgCAMs in *C. elegans*, und andererseits die Analyse von IgCAM Deletionsmutanten. Die Expressionsanalyse zeigte, dass IgCAMs neben anderen Geweben häufig im Nervensystem lokalisiert sind. Durch die Erstellung einer *C. elegans* Deletionsbank wurde die Grundlage geschaffen, die Funktion der IgCAMs im Nervensystem *in vivo* zu untersuchen.

II. ERGEBNISSE

In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression der Immunglobulin Zelladhäsionsmoleküle (IgCAMs) mit GFP Reporter-Konstrukten analysiert, um einen ersten Eindruck der Lokalisation zu bekommen. Zur weiteren Analyse dieser Gene wurde eine Deletionsbank aufgebaut und Deletionsmutanten isoliert. Die Deletionsmutanten wurden mit verschiedenen neuronal exprimierten GFP Markern versehen und auf Defekte der axonalen Wegfindung hin untersucht.

1. Revision der Genstruktur der IgCAMs in *C. elegans*

Da sich die vorhergesagten Gensequenzen von *C. elegans* im Laufe dieser Arbeit und folglich die abgeleiteten Proteinsequenzen durch verbesserte Vorhersagealgorythemen veränderten, wurde eine abschließende Analyse der Domänenstruktur und der Phylogenie mit den Daten aus *wormbase 13*3 (Ausgabe 133) durchgeführt. Folgende Programme wurden verwendet: SMART (*http://smart.embl-heidelberg.de*), InterPro (*http://www.ebi.ac.uk/InterProScan/*), und Pfam (*http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/search .shtml*). Für alle diese Gene konnte mit den Programmen TMPRED (*http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html*) bzw. GPI Modification Site Prediction (*http://mendel.imp.univie.ac.at/sat/gpi/gpi_server.html*) eine Transmembrandomäne oder ein GPI-Anker vorhergesagt werden.

Eine abschließende Aussage war für elf IgCAMs nicht möglich, da ihre Exon-Intron Struktur noch nicht vollständig durch cDNA-Analyse verifiziert sind (siehe Tab. 2.1), so dass keine endgültige Aussage zu ihrer Exon - Intron -Struktur gemacht werden kann. Durch das *C. elegans* EST-Projekt (Yuji Kohara, *http://www.ddbj.nig.ac.jp*) ist jedoch gezeigt, dass es sich nicht um Pseudogene handelt, da für alle ESTs gefunden wurden.

Dabei stellte sich heraus, dass RIG-6 wahrscheinlich, wie auch das homologe Protein in *D. melanogaster* (Contactin), N- terminal eine CTL-Domäne (*C-typ lectin like*) besitzt und somit das strikte Kriterium der IgCAMs, die nur Ig bzw. Ig und Fibronektin III Domänen aufweisen, nicht mehr erfüllt wäre (siehe auch Vogel et al. 2003). Drei IgCAMs (RIG-1, RIG-5 und ICAM-3) wiesen danach noch längere Abschnitte auf, denen keine Domäne zugewiesen werden konnte. Um zu klären, ob es sich hierbei um eine noch unbeschriebene Proteinsequenz oder um eine nicht stark konservierte Ig-Domäne handelt, wurde eine BLAST Suche durchgeführt und der Sequenzvergleich (*alignment*) per Auge auf Übereinstimmungen hin überprüft. Für Ig-Domänen

ist das im Allgemeinen gut möglich, da die Konsensussequenz im Bereich des zweiten Cysteins zwar vorhanden, aber oft stark abgewandelt ist.

In den meisten Fällen konnten dadurch Proteinsequenzen eindeutig als Ig-Domänen identifiziert werden. Nur bei RIG-1 (K09E2.4a) ist die 5. Ig-Domäne so schwach konserviert, dass keine eindeutige Zuordnung gemacht werden kann. RIG-1 weist vor der Transmembrandomäne einen weiteren Bereich von 130 AS auf, dem keine Domäne zugeordnet werden konnte. Entweder handelt es sich um eine sehr stark abgewandelte, bereits bekannte Domäne oder um ein noch nicht beschriebenes Modul.

Die beiden nur-Ig-Proteine ICAM-3 sowie RIG-5 weisen N-terminal 160 bzw. 90 AS ohne Übereinstimmung zu bekannten Modulen auf. RIG-5 besitzt noch zwei weitere solche Abschnitte, die die zwei Ig-Domänen voneinander trennen.

Die BLAST Suche wurde auch verwendet, um heraus zu finden, ob die *C. elegans* IgCAMs über die Artgrenze hinaus konserviert sind. Für die meisten kann eindeutig ein Homolog aufgrund der primären Proteinsequenz in anderen Modellorganismen gefunden werden. Für RIG-1, NCAM-1, ICAM-1 und RIG-3 kann nur anhand der Anzahl und Anordnung vorhandener Domänen, jedoch nicht anhand der primären Proteinsequenz von verwandten Proteinen gesprochen werden. ICAM-2, ICAM-3 und RIG-5 scheinen Nematoden-spezifische IgCAMs zu sein, da sie außer in *C. briggsae* in keinem anderen Organismus gefunden werden konnten. Die Ergebnisse der Analyse der Domänenstruktur und der Phylogenie sind in Abb. 2.1 sowie Tab. 2.1 zusammengefasst.

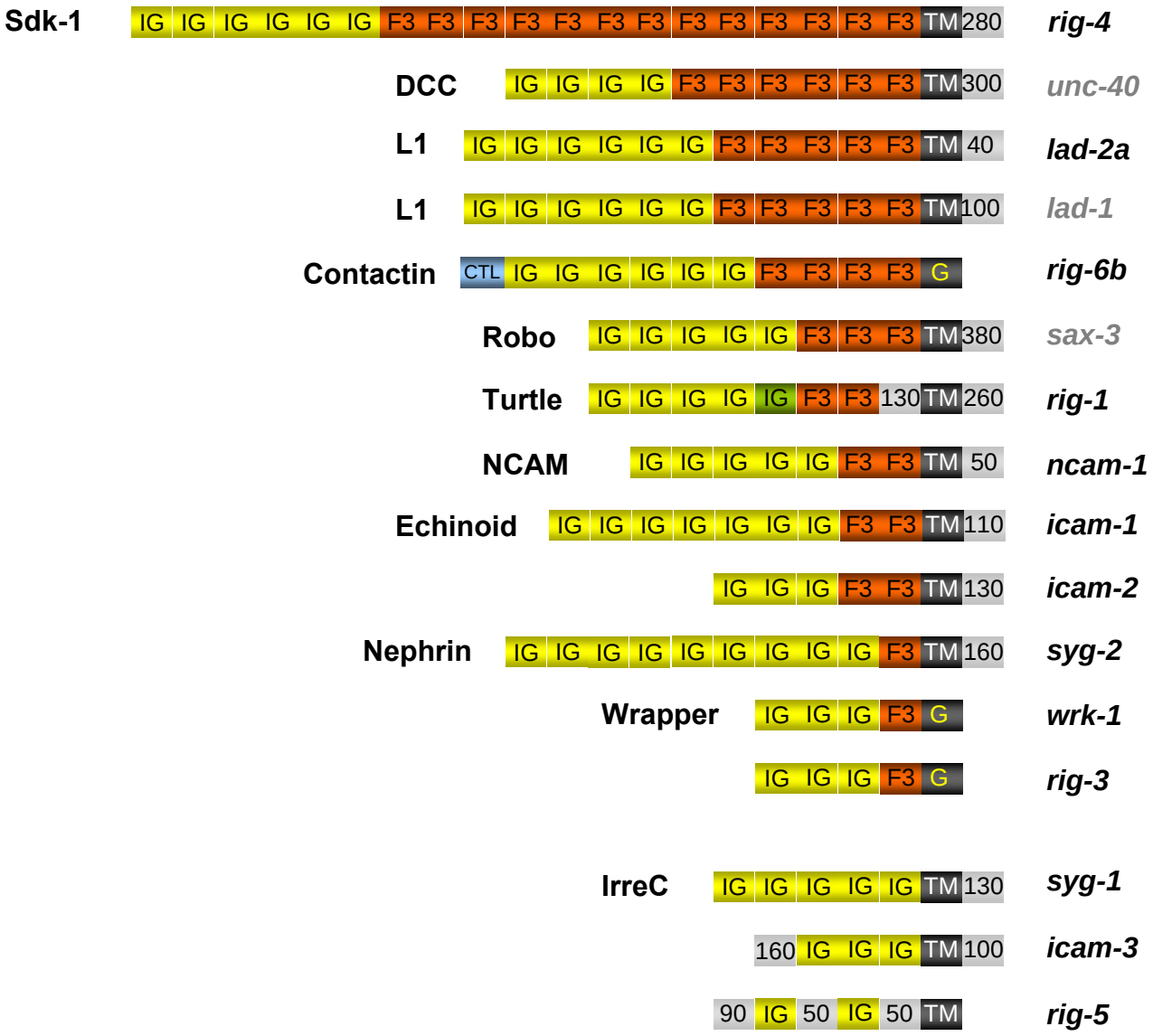


Abb.: 2.1 Domänenstruktur ausgewählter IgCAMs sowie der bereits untersuchten Gene *unc-40, lad-1* und *sax-3*. Links sind homologe Proteine aus anderen Organismen aufgelistet, rechts die Gennamen von *C. elegans*. **IG**: Immunglobulin Domäne; **F3**: Fibronektin III Domäne, **TM**: Transmembran Domäne, **G**: GPI-Anker. Die grün hinterlegte, 5. IG Domäne von RIG-1 konnte nicht eindeutig gezeigt werden. RIG-6 besitzt im Vergleich zu älteren Analysen wahrscheinlich eine **CTL**-Domäne (*C-type lectin like*), die im *D. melanogaster* Homolog *Axonin*/*contactin* konserviert ist.

Gen	Spleiß-Varianten	Chromosom Position	Domänen	gesamt AA	cDNA Status
rig-4	Y42H9B.2	IV 3,59	SS: 1-27 6Ig: 43-393 471-640 13Fn3: 643-1995 TM: 2019-2041	2325aa	teilweise bestätigt
lad-2	Y54G2A.25a	IV -6,68	SS: 1-17 6Ig: 44-609 5Fn3: 612-1099 TM: 1125-1147	1187aa	bestätigt
	b		SS: 1-17 5Ig: 44-476	496aa	bestätigt
	c		Fn3: 1-55 TM: 81-103	143aa	bestätigt
rig-6	C33F10.5a	II -3,27	SS: 1-35 4Ig: 131-501 4Fn3: 502-923 TM: GPI	964aa	teilweise bestätigt
	b		CTL: 55-154 6Ig: 191-762 4Fn3: 765-1186 TM: GPI	1227aa	vorhergesagt
	c		3Ig: 31-309 4Fn3: 312-733 TM: GPI	774aa	teilweise bestätigt
	d		SS: 1-20 CTL: 4-103 6Ig: 160-731 4Fn3: 734-1155 TM: GPI	1196	teilweise bestätigt
rig-1	K09E2.4a	X 0,24	SS: 1-19 5* Ig: 43-544 2Fn3: 580-769 TM: 898-920	1177aa	teilweise bestätigt
	b		SS: 1-44	300aa	bestätigt
ncam-1	F02G3.1a	X -14,53	SS: 1-17 5Ig: 35-560 2Fn3: 574-837 TM: 861-883	928aa	bestätigt
	b		SS: 1-17 5Ig: 35-560 2Fn3: 574-837 TM: 861-883	913aa	bestätigt
	c		SS: 1-49 5Ig: 62-587 2Fn3: 601-864 TM: 888-910	955aa	bestätigt
icam-1	F39H12.4	X -19,49	SS: 1-21 7 Ig: 33-719 2 Fn3: 733-925 TM: 942-964	1073aa	teilweise bestätigt
icam-2	SSSD1.1	X -2,91	3 Ig: 54-277 2 Fn3: 292-480 TM: 487-509	636aa	teilweise bestätigt
syg-2	C26G2.1	X 19,37	SS: 1-18 9 Ig: 31-960 Fn3: 974-1052 TM: 1084-1106	1270aa	teilweise bestätigt (bestätigt*)
wrk-1	F41D9.3a	X -0,17	SS: 1-19 3 Ig: 30-295 1 Fn3: 304-349 TM: GPI	436aa	bestätigt
	b		SS: 1-19 3 Ig: 30-303 1 Fn3: 312-402 TM: GPI	444aa	bestätigt
	c		SS: 1-19 2 Ig: 30-194 1 Fn3: 213-303 TM: GPI	345aa	bestätigt
	d		SS: 1-19 1 Ig: 20-89 TM: GPI	119aa	bestätigt
	e		SS: 1-19 3 Ig: 30-311 1 Fn3: 320-410	452aa	bestätigt

			TM:	GPI		
rig-3	C53B7.1	X -2,31	SS: 3 Ig: 1 Fn3: TM:	1-24 46-343 346-4 GPI	487aa	teilweise bestätigt
syg-1	K02E10.8	X -14,80	SS: 5 Ig: TM:	1-19 35-526 552-574	703aa	teilweise bestätigt (bestätigt*)
icam-3	T02C5.3	X -13,88	SS: 3Ig: TM:	1-19 178-490 507-529	589aa	teilweise bestätigt
rig-5	C36F7.4a	I 3,80	2 Ig:	1-98, 150-239	280aa	teilweise bestätigt
	b		2 Ig: TM:	91-188, 240-329 383-400	402aa	teilweise bestätigt

Tab.: 2.1 Beschreibung der Domänenstruktur und Status der cDNA. SS: Signalsequenz, Ig: Immunglobulin Domäne, Fn3: Fibrnektin III Domäne, TM: Transmembrandomäne, CTL: C-Typ Lectin ähnliche Domäne. Bestätigt: cDNA sequenziert, teilweise bestätigt: ESTs vorhanden. (bestätigt*): siehe (Shen and Bargmann 2003; Shen et al. 2004). Stand von *wormbase 133*.

2. Expressionsanalyse der IgCAMs

Die Analyse der *in vivo* Expression der IgCAMs für erste Aussagen zur Funktion wurde mit Hilfe von Promoter-GFP-Reportern durchgeführt. Dazu wurde mittels PCR ein Fragment des stromaufwärts liegenden Bereichs eines Gens amplifiziert. Dieses Fragment wurde entweder vor den GFP codierenden Bereich in einen Vektor kloniert oder in einer weiteren PCR mit einem GFP PCR Fragment fusioniert.

Vier Reporter Konstrukte wurden von S. Voltmer in ihrer Diplomarbeit (Voltmer 2001) entweder mittels klassischer Klonierung oder mit Hilfe des GATWAY *Cloning System* von Gibco Life Technologies hergestellt. Außerdem wurden mir dankenswerter Weise von O. Hobert Stämme zur Analyse mit Reporter-Konstrukten für folgende IgCAMs zur Verfügung gestellt: *Lad-2* (Y54G2A.25a), *rig-6b* (C3F10.5b) und *rig-5* (C36F7.4) (siehe Tab.: 2.2).

2.1 Herstellung von GFP-Reporter Konstrukten

Die GFP-Reporter Konstrukte für *syg-1*, *rig-3* und *rig-4* wurden mittels klassischer Klonierung hergestellt. Der *syg-1* Promotor wurde über Pst I und Bam HI Schnittstellen in den YFP-Vektor pVH20.01 kloniert. Der *rig-3* Promotor wurde über Bam HI und Sph I Schnittstellen ebenfalls in pVH20.01 kloniert. Der *rig-4* Promotor wurde über eine Kpn I Schnittstelle in den DsRed2 Vekor pVH14.05 kloniert. Als eine effiziente Alternative erwies sich die Fusions-PCR, (Hobert 2002) mit der acht Konstrukte hergestellt wurden. Das GFP PCR Fragment wurde mit den

Primern HH_GFPfu_2/3 aus dem Vektor pPD95.77 (Fire Lab Vector Kit) hergestellt. Der Promotorbereich der IgCAMs wurde aus genomischer DNA amplifiziert. In einer zweiten PCR wurde der Promotor mit dem GFP fusioniert. Die so entstandenen Promotor-GFP Fragmente wurden, wie auch die Plasmide, zur Herstellung transgener Wurmstämme verwendet (siehe Mat. und Meth. 2.1.5). Für *icam-3* wurde mit den Primern T02C5.3 upper/lower_primer der Promotor sowie Bereiche der kodierenden Sequenz amplifiziert und in den Vektor pVH21.01 kloniert. Da das GFP in diesem Vektor nicht im Leseraster ist, wurde der Vektor mit den Primern HHpVH21.01_pr1 und HH_T02C5.3_pr2 amplifiziert, wobei der letzte Primer eine Kpn I Schnittstelle einfügt. Danach wurde dieses PCR Fragment mit Kpn I verdaut. Da stromaufwärts von HHpVH21.01 ebenfalls eine Kpn I Schnittstelle vorhanden ist, konnte das Fragment mit sich selbst zu einem neuen Vektor (pVH10.45) ligiert werden.

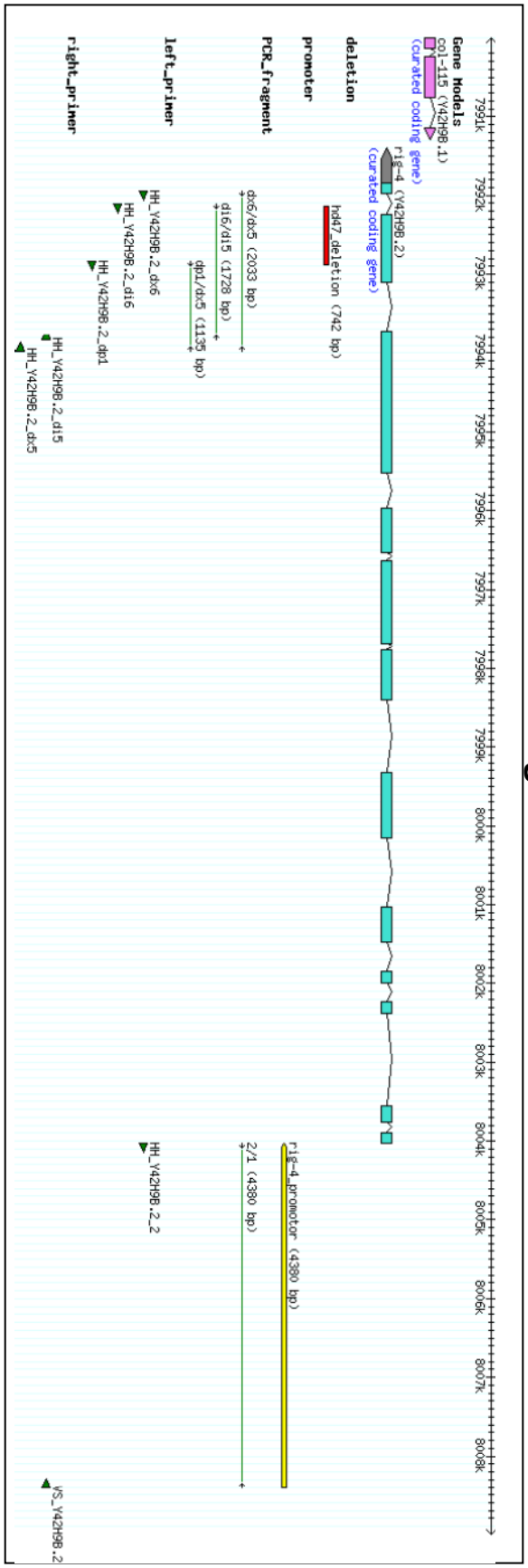
Für einige IgCAMs wurden aufgrund der Genstruktur oder der Spleißvarianten auch Intronsequenzen bzw. unterschiedliche 5`- UTRs als Promotorsequenz verwendet und untersucht. *Icam-2* ist mit ca. 5300bp ein kleines Gen, dessen 5`- UTR lediglich 800bp umfasst. Deshalb wurde ein Fusionsprotein als Reporter hergestellt, welches den Promotorbereich und die kodierende Sequenz umfaßt.

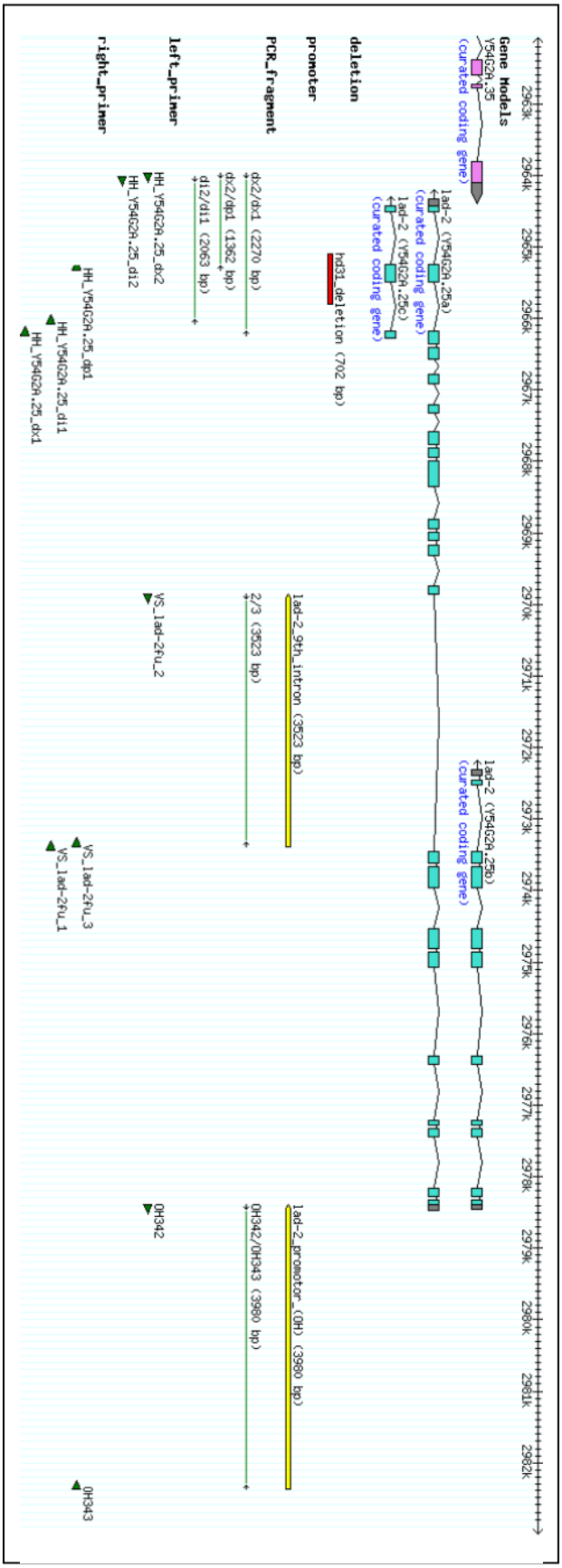
Die Beschreibung der verschiedenen Reporterkonstrukte ist in Tabelle 2.2 zusammengefasst und in Abbildng 2.2 für jedes Gen dargestellt.

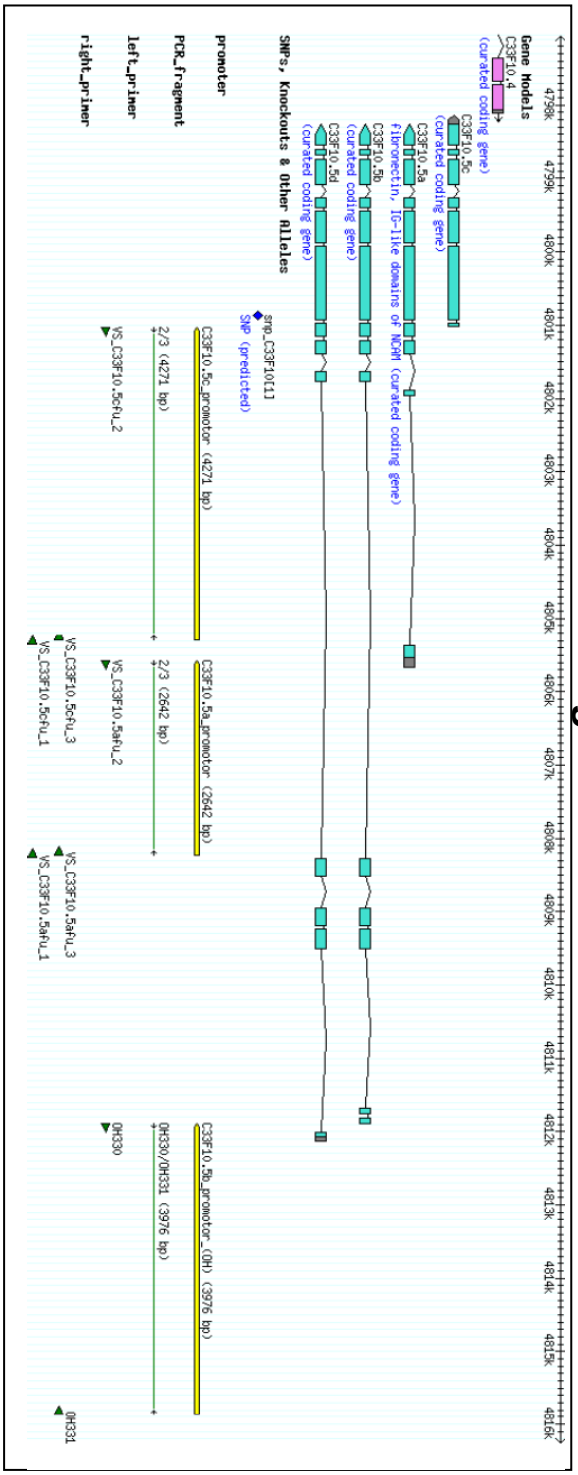
WormBase Name	Gen	Promotor-Bereich	Plasmid/ Fusion	GFP-Variante	Primer	Stämme
Y42H9B.2	*rig-4*	4,4kb	pVH16.11	DsRed2	VS_Y42H9B.2_1 HH_Y42H9B.2_2	VH985-987
Y54G2A.25a	*lad-2*	3,5kb (9. Intron) (4,0kb**)	Fusion	GFP	VS_lad-2fu_1/2/3	VH1228 OH2301
b						VH1228 VH1229 OH2301
c						
C33F10.5a	*rig-6*	2,6kb	Fusion	GFP	VS_C33F10.5afu_1/2/3	VH1224 VH1225
b		(4,0kb**)				OH2303
c		4,3kb	Fusion	GFP	VS_C33F10.5cfu_1/2/3	VH1250 VH1251
d						OH2303
K09E2.4a	*rig-1*	4,8kb	pVH12.06*	YFP	sv_K09E2.4_1/2	VH278
b						
F02G3.1a	*ncam-1*	4,0kb	Fusion	GFP	VS_F02G.1_1 VS_F02G.1afu_2 VS_F02G3.1fu_3	VH1226 VH1227
b		4,0kb	Fusion	GFP	wie oben	VH1226 VH1227
c		6,1kb	Fusion	GFP	VS_F02G.1_1 VS_F02G.1cfu_2 VS_F02G3.1fu_3	VH1248 VH1249
F39H12.4	*icam-1*	4,4kb	Fusion	GFP	VS_F39H12.4_1 VS_F39H12.4_2/3	VH1246
SSSD1.1	*icam-2*	6,0kb§	Fusion	GFP	VS_SSSD1.1_1 VS_SSSD1.1fu_2/3	VH1230 VH1231
C26G2.1	*syg-2*	3,5kb	pVH13.01*	YFP	Ce_neph_pr1/2	VH1164 VH1165
F41D9.3a	*wrk-1*	4,7kb	pVH12.05*	YFP	sv_F41D9.3_1/2	VH274
b						VH274
c						VH274
d						VH274
e						VH274
C53B7.1	*rig-3*	4,3kb	pVH16.10 pVH16.13	DsRed2 YFP	VS_C53B7.1_1/2	VH795 VH1166 VH1167
K02E10.8	*syg-1*	3,5kb	pVH13.04	YFP	K02E10.8_aag_1/2	VH697
T02C5.3	*icam-3*	5,7kb	pVH10.45	YFP		VH1092
C36F7.4a	*rig-5*					
b		3,7kb (4. Intron) (0,4kb**)	Fusion	GFP	VS_rig-5fu1/2/3	VH1223 VH1247 OH2302

Tab.: 2.2 Die Reporterkonstrukte für die IgCAMs. * aus Diplomarbeit Susanne Voltmer, ** Promotorbereich im Expressionsstamm von O. Hobert, § Promotor + Gen + GFP,

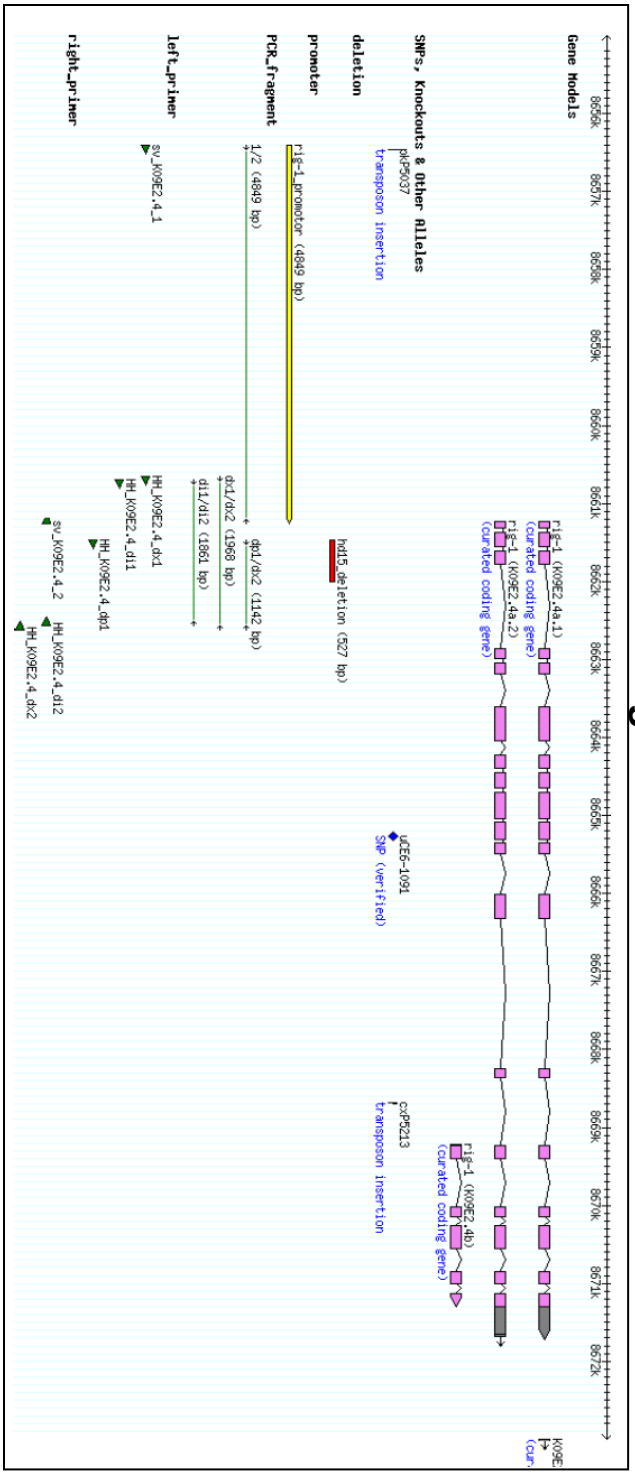
Abb.: 2.2: **Genstruktur der IgCAMs** (folgende Seiten). Die Gene sind, je nachdem ob sie auf dem minus (türkis) oder plus (rosa) Strang kodiert sind von rechts nach links oder umgekehrt dargestellt. Die zur Expressionsanalyse verwendeten Promotorbereiche sind als gelbe Balken mit Spitze in Leserichtung dargestellt. Promotoren in Stämmen von O. Hobert sind mit OH gekennzeichnet. Für *icam-1* sind die Primer des *knock-out*- Konsortiums angegeben (*ok*). Die von mir isolierten Deletionen sind als rote Balken dargestellt und im Gegensatz zu Deletionen aus anderen Labors mit einer hd# (Allel) versehen. Grüne Linien bezeichnen PCR Fragmente und sind mit den Endungen der Primer (Primer #) und der Fragmentlänge gekennzeichnet. Die Primer sind als grüne Dreiecke dargestellt und mit der Primerbezeichnung versehen.


Rig-4
Gene Models
col-115 (Y42H9B.1)
(curated coding gene)
rig-4 (Y42H9B.2)
(curated coding gene)
deletion
hd47_deletion (742 bp)
promoter
rig-4_promotor (4380 bp)
PCR_fragment
dx6/dx5 (2033 bp)
di6/di5 (1728 bp)
dp1/dx5 (1135 bp)
2/1 (4380 bp)
left_primer
HH_Y42H9B.2_dx6
HH_Y42H9B.2_di6
HH_Y42H9B.2_dp1
HH_Y42H9B.2_2
right_primer
HH_Y42H9B.2_di5
HH_Y42H9B.2_dx5
VS_Y42H9B.2

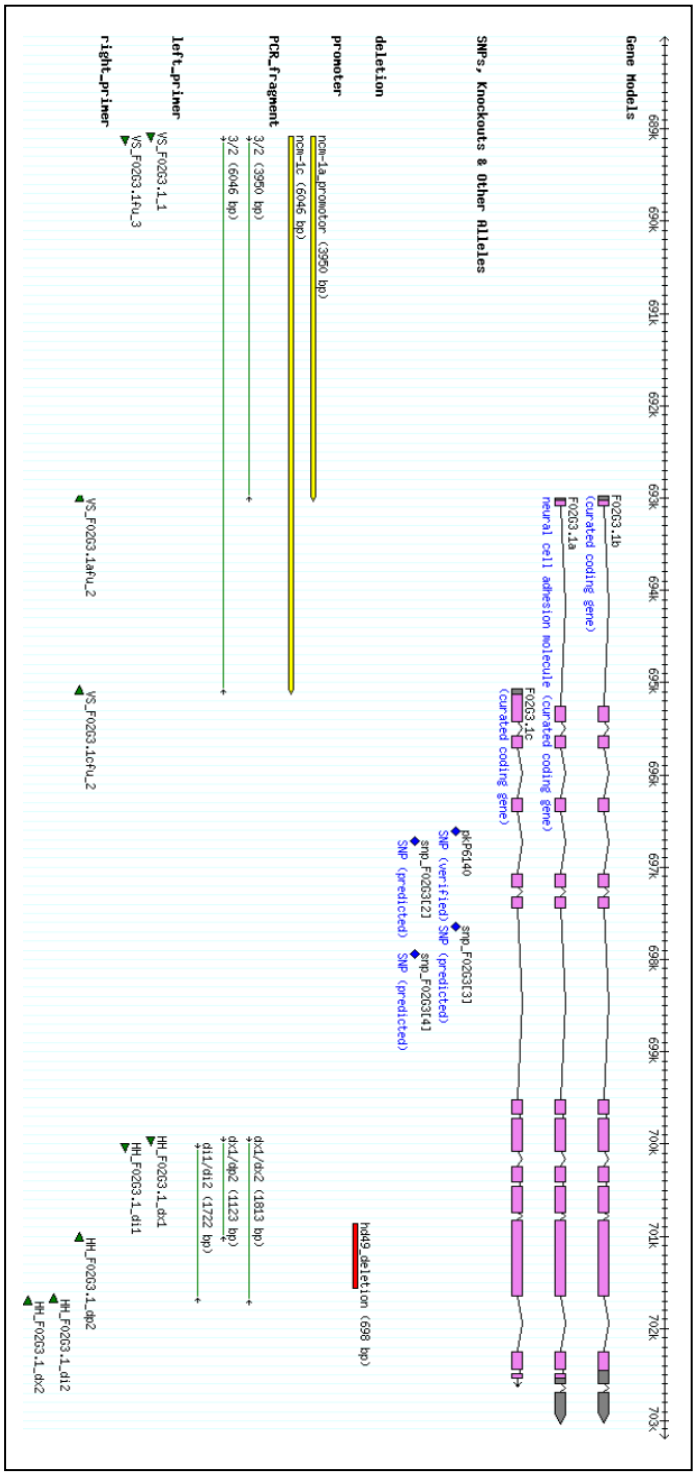

Lad-2
Gene Models
Y54G2A.35
(curated coding gene)
lad-2 (Y54G2A.25a)
(curated coding gene)
lad-2 (Y54G2A.25c)
(curated coding gene)
lad-2 (Y54G2A.25b)
(curated coding gene)
deletion
hd31_deletion (702 bp)
promoter
lad-2_9th_intron (3523 bp)
lad-2_promotor_(OH) (3960 bp)
PCR_fragment
dx2/dx1 (2270 bp)
dx2/dp1 (1362 bp)
di2/di1 (2063 bp)
2/3 (3523 bp)
OH342/OH343 (3960 bp)
left_primer
HH_Y54G2A.25_dx2
HH_Y54G2A.25_di2
VS_lad-2fu_2
OH342
right_primer
HH_Y54G2A.25_dp1
HH_Y54G2A.25_di1
HH_Y54G2A.25_dx1
VS_lad-2fu_3
VS_lad-2fu_1
OH343

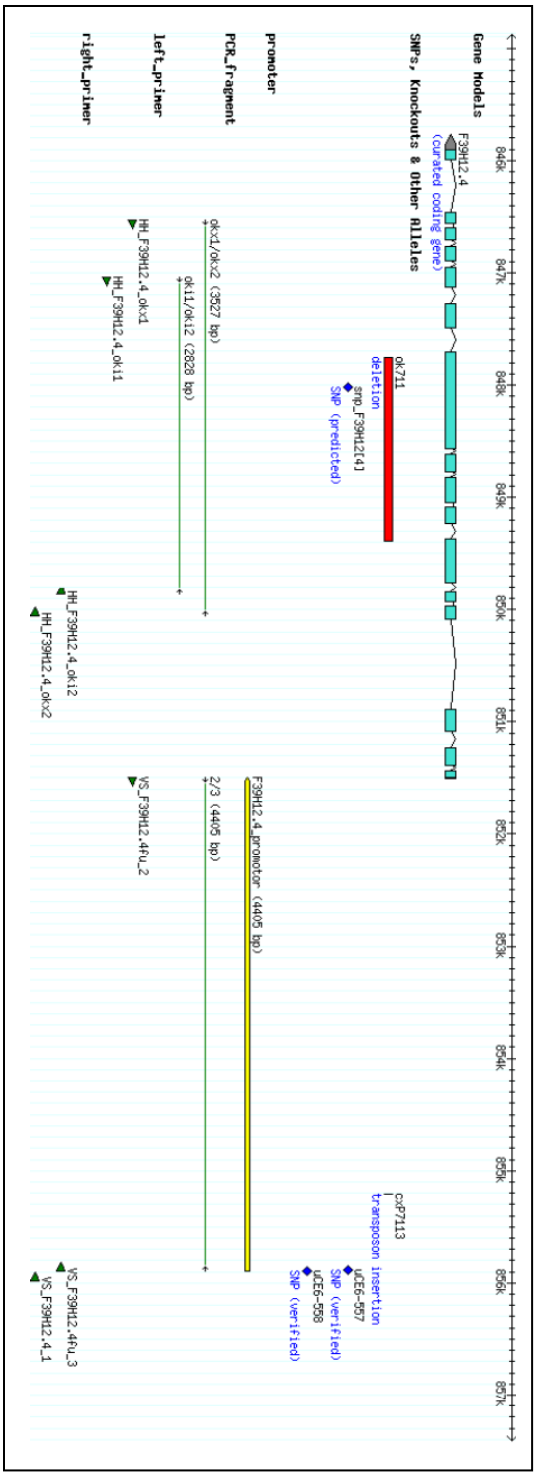

Gene Models
C33F10.4
(curated coding gene)
C33F10.5c
(curated coding gene)
C33F10.5a
fibronectin, IG-like domains of NCAM (curated coding gene)
C33F10.5b
(curated coding gene)
C33F10.5d
(curated coding gene)
SNPs, Knockouts & Other Alleles
snp_C33F10[1]
SNP (predicted)
promoter
C33F10.5c_promotor (4271 bp)
C33F10.5a_promotor (2642 bp)
C33F10.5b_promotor_(OH) (3976 bp)
PCR_fragment
2/3 (4271 bp)
2/3 (2642 bp)
OH330/OH331 (3976 bp)
left_primer
VS_C33F10.5cFu_2
VS_C33F10.5aFu_2
OH330
right_primer
VS_C33F10.5cFu_3
VS_C33F10.5cFu_1
VS_C33F10.5aFu_3
VS_C33F10.5aFu_1
OH331

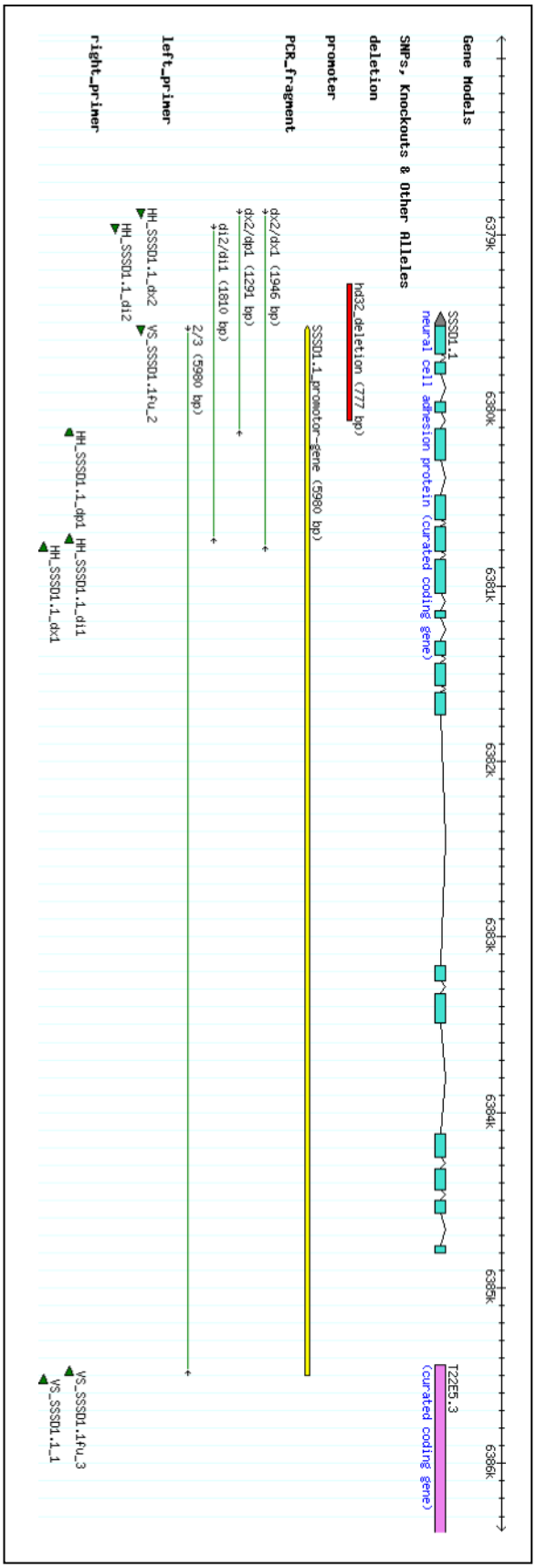
Rig-6

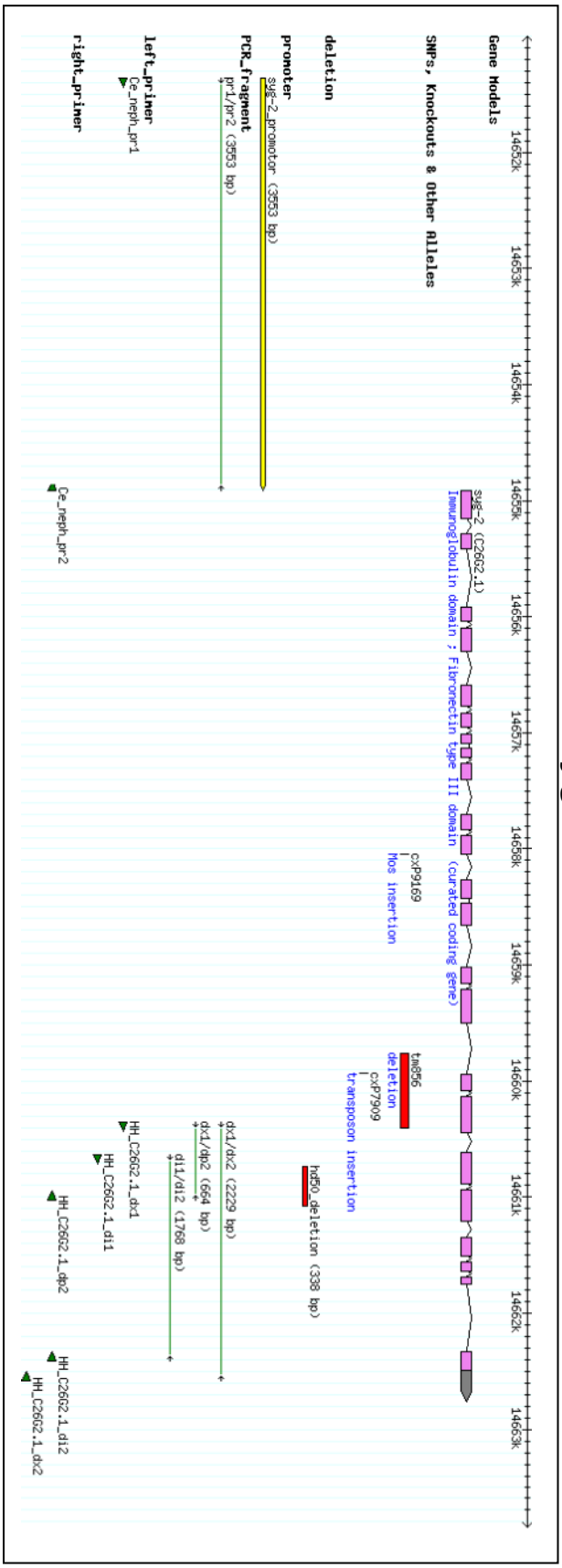

Gene Models
rig-1 (K09E2.4a.1)
(curated coding gene)
rig-1 (K09E2.4a.2)
(curated coding gene)
rig-1 (K09E2.4b)
(curated coding gene)
uCE6-1091
SNP (verified)
cxP5213
transposon insertion
SNPs, Knockouts & Other Alleles
pkP5037
transposon insertion
hd15_deletion (527 bp)
deletion
promoter
rig-1_promotor (4849 bp)
PCR_fragment
1/2 (4849 bp)
dp1/dx2 (1968 bp)
dp1/dx2 (1142 bp)
di1/di2 (1861 bp)
left_primer
sv_K09E2.4_1
HH_K09E2.4_dx1
HH_K09E2.4_di1
HH_K09E2.4_dp1
right_primer
sv_K09E2.4_2
HH_K09E2.4_di2
HH_K09E2.4_dx2

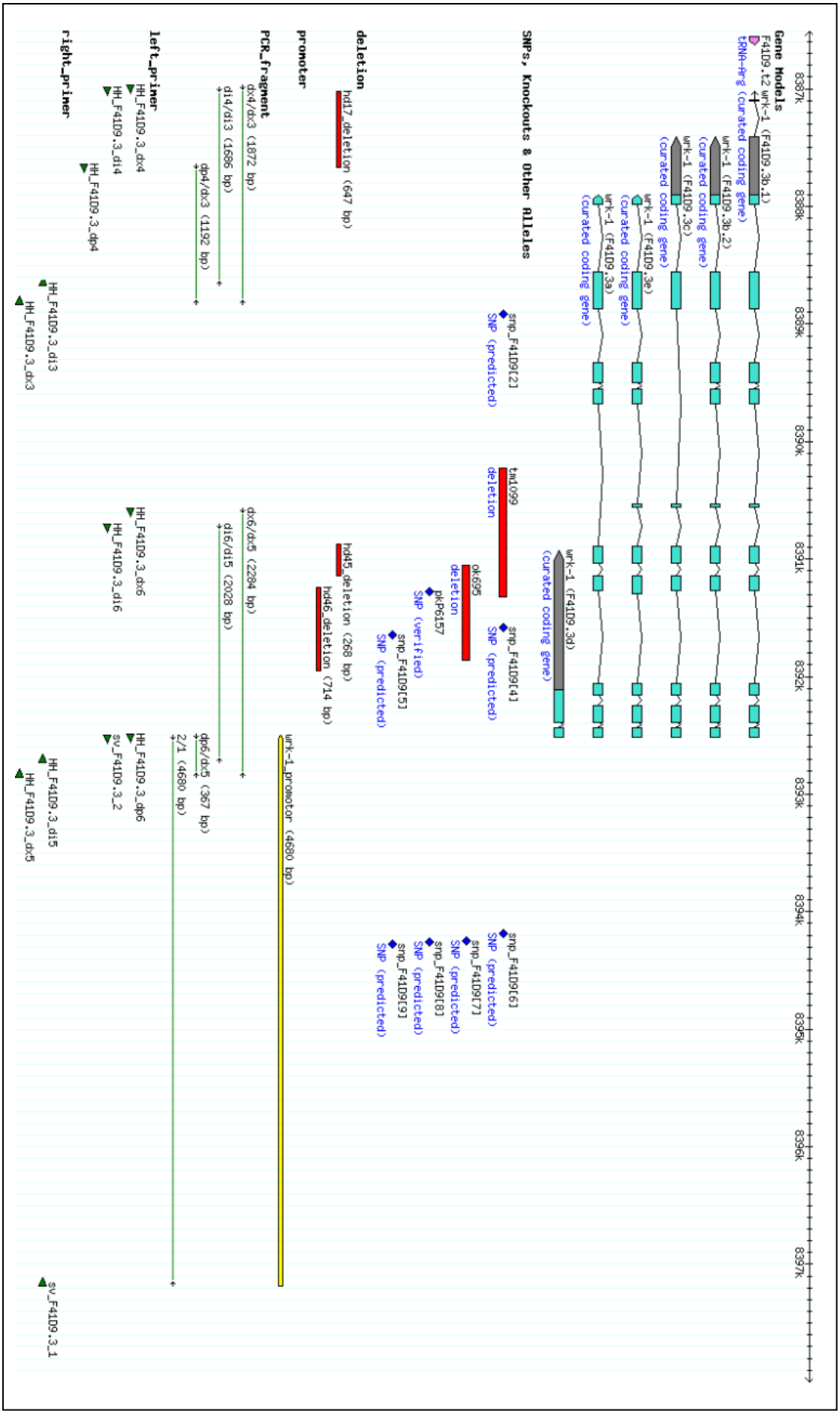
Rig-1

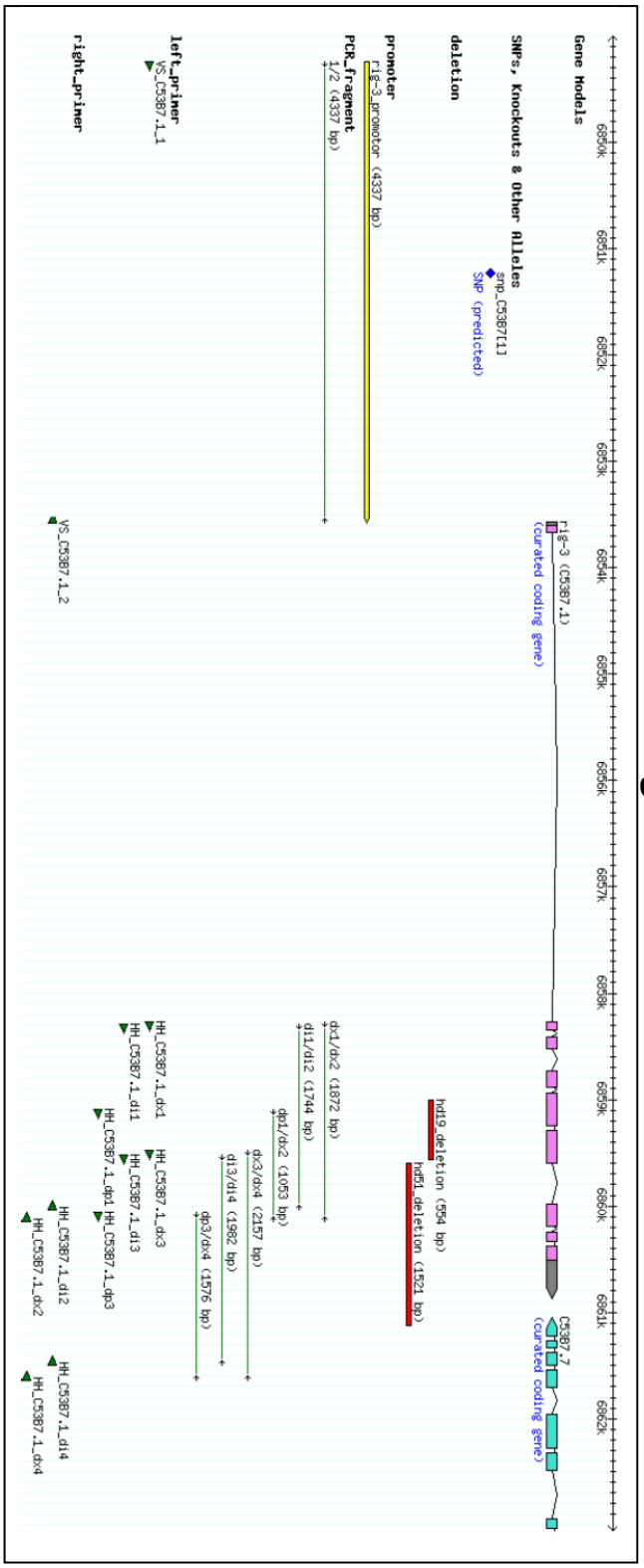

Ncam-1
Gene Models
F02G3.1b
(curated coding gene)
F02G3.1a
neural cell adhesion molecule (curated coding gene)
F02G3.1c
(curated coding gene)
SNPs, Knockouts & Other Alleles
pkP6140
SNP (verified)
snp_F02G3[3]
SNP (predicted)
snp_F02G3[2]
SNP (predicted)
snp_F02G3[4]
SNP (predicted)
deletion
hd49_deletion (698 bp)
promoter
ncm-1a_promoter (3950 bp)
ncm-1c (6046 bp)
PCR_fragment
3/2 (3950 bp)
3/2 (6046 bp)
dk1/dk2 (1813 bp)
dk1/dk2 (1123 bp)
di1/di2 (1722 bp)
left_primer
VS_F02G3.1_1
VS_F02G3.1fu_3
HH_F02G3.1_dk1
HH_F02G3.1_di1
right_primer
VS_F02G3.1afu_2
VS_F02G3.1cfu_2
HH_F02G3.1_dk2
HH_F02G3.1_di2
HH_F02G3.1_dk2

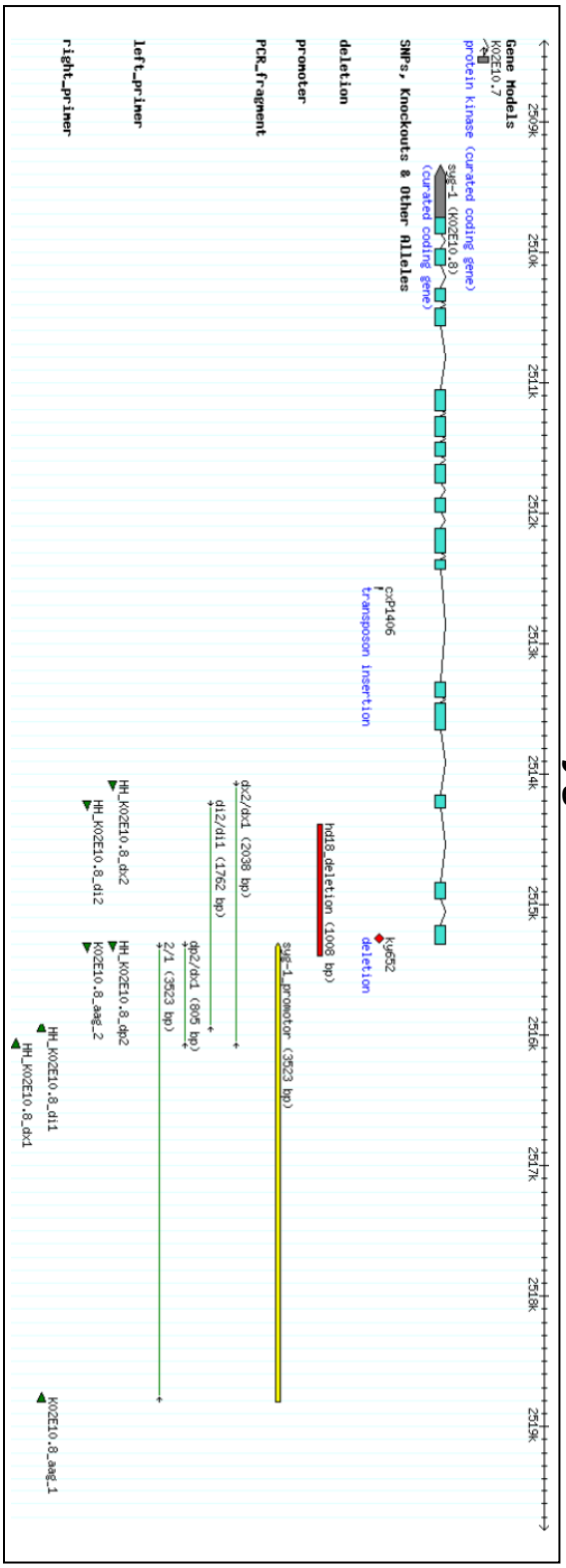

Icam-1
Gene Models
F39H12.4
(curated coding gene)
SNPs, Knockouts & Other Alleles
dk711
deletion
snp_F39H12[4]
SNP (predicted)
cxP7113
transposon insertion
uCE6-557
SNP (verified)
uCE6-558
SNP (verified)
promoter
F39H12.4_promotor (4405 bp)
PCR_fragment
dk1/dk2 (3527 bp)
dk11/dk12 (2828 bp)
2/3 (4405 bp)
left_primer
HH_F39H12.4_dk1
HH_F39H12.4_dk11
VS_F39H12.4fu_2
right_primer
HH_F39H12.4_dk12
HH_F39H12.4_dk2
VS_F39H12.4fu_3
VS_F39H12.4_1

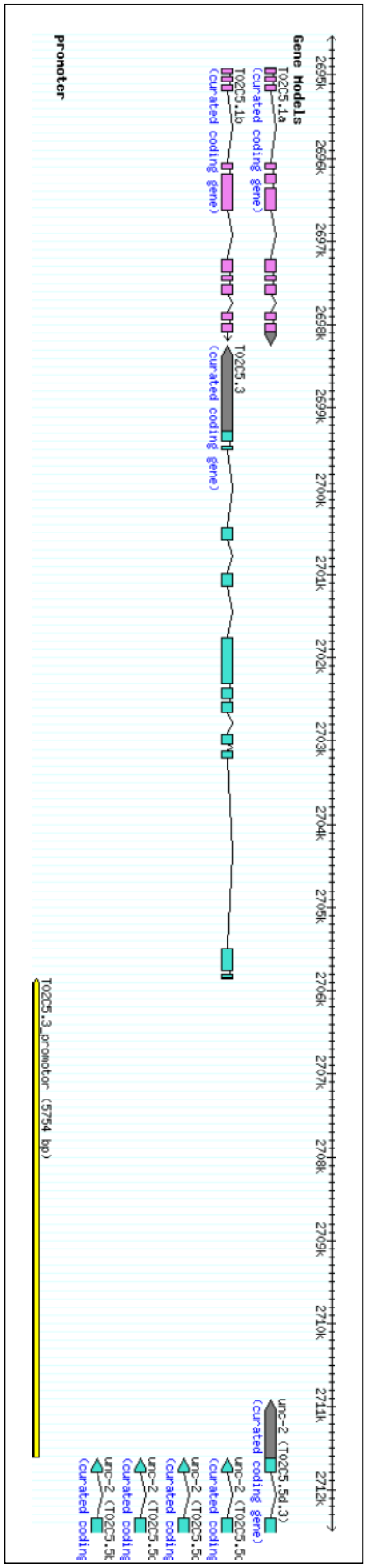

Icam-2
Gene Models
SSD1.1
neural cell adhesion protein (curated coding gene)
T22E5.3
(curated coding gene)
SNPs, Knockouts & Other Alleles
deletion
hd32_deletion (777 bp)
promoter
SSD1.1_promotor-gene (5980 bp)
PCR_fragment
dx2/dx1 (1946 bp)
dx2/dp1 (1291 bp)
di2/di1 (1810 bp)
2/3 (5980 bp)
left_primer
HH_SSD1.1_dx2
VS_SSD1.1fu_2
right_primer
HH_SSD1.1_di2
HH_SSD1.1_dp1
HH_SSD1.1_di1
HH_SSD1.1_dx1
VS_SSD1.1fu_3
VS_SSD1.1_1
6379k
6380k
6381k
6382k
6383k
6384k
6385k
6386k


Syg-2
Gene Models
syg-2 (C26G2.1)
Immunoglobulin domain ; Fibronectin type III domain (curated coding gene)
SNPs, Knockouts & Other Alleles
cxP9169
Mos insertion
tm856
deletion
cxP7909
transposon insertion
hd50_deletion (338 bp)
deletion
promoter
syg-2_promotor (3553 bp)
PCR_fragment
pr1/pr2 (3553 bp)
dx1/dx2 (2229 bp)
dx1/dp2 (664 bp)
di1/di2 (1768 bp)
left_primer
Ce_neph_pr1
HH_C26G2.1_dx1
HH_C26G2.1_di1
right_primer
Ce_neph_pr2
HH_C26G2.1_dp2
HH_C26G2.1_di2
HH_C26G2.1_dx2
14652k
14653k
14654k
14655k
14656k
14657k
14658k
14659k
14660k
14661k
14662k
14663k

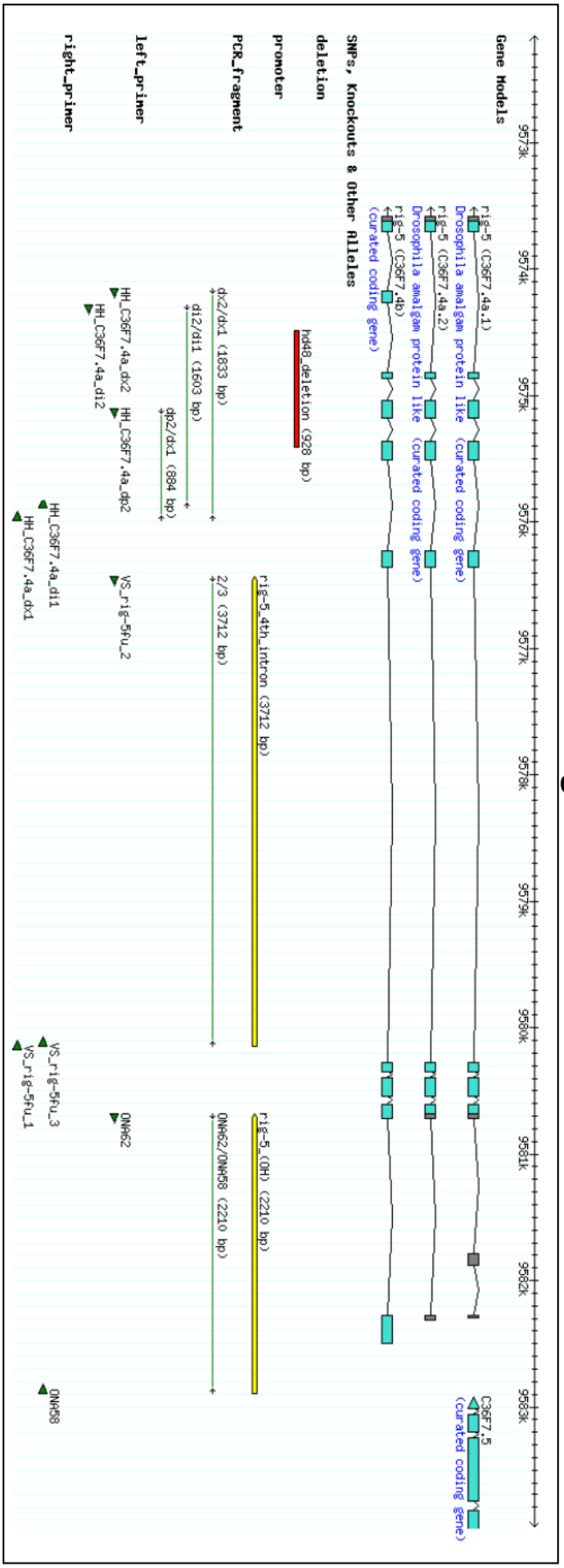

Wrk-1
8387k
8388k
8389k
8390k
8391k
8392k
8393k
8394k
8395k
8396k
8397k
Gene Models
F41D9.t2 wrk-1 (F41D9.3b.1)
tRNA-Arg (curated coding gene)
wrk-1 (F41D9.3b.2)
(curated coding gene)
wrk-1 (F41D9.3c)
(curated coding gene)
wrk-1 (F41D9.3e)
(curated coding gene)
wrk-1 (F41D9.3a)
(curated coding gene)
wrk-1 (F41D9.3d)
(curated coding gene)
SNPs, Knockouts & Other Alleles
snp_F41D9[2]
SNP (predicted)
tm1099
deletion
snp_F41D9[4]
SNP (predicted)
ok695
deletion
pkP6157
SNP (verified)
snp_F41D9[5]
SNP (predicted)
snp_F41D9[6]
SNP (predicted)
snp_F41D9[7]
SNP (predicted)
snp_F41D9[8]
SNP (predicted)
snp_F41D9[9]
SNP (predicted)
deletion
hd17_deletion (647 bp)
hd45_deletion (268 bp)
hd46_deletion (714 bp)
promoter
wrk-1_promotor (4680 bp)
PCR_fragment
dx4/dx3 (1872 bp)
di4/di3 (1686 bp)
dp4/dx3 (1192 bp)
dx6/dx5 (2284 bp)
di6/di5 (2028 bp)
dp6/dx5 (367 bp)
2/1 (4680 bp)
left_primer
HH_F41D9.3_dx4
HH_F41D9.3_di4
HH_F41D9.3_dp4
HH_F41D9.3_dx6
HH_F41D9.3_di6
HH_F41D9.3_dp6
sv_F41D9.3_2
right_primer
HH_F41D9.3_di3
HH_F41D9.3_dx3
HH_F41D9.3_di5
HH_F41D9.3_dx5
sv_F41D9.3_1


Rig-3
6850k
6851k
6852k
6853k
6854k
6855k
6856k
6857k
6858k
6859k
6860k
6861k
6862k
Gene Models
rig-3 (C5387.1)
(curated coding gene)
C5387.7
(curated coding gene)
SNPs, Knockouts & Other Alleles
snp_C5387f11
SNP (predicted)
deletion
hd19_deletion (554 bp)
hd51_deletion (1521 bp)
promoter
rig-3_promoter (4337 bp)
PCR_fragment
1/2 (4337 bp)
dx1/dx2 (1872 bp)
di1/di2 (1744 bp)
dp1/dx2 (1053 bp)
dx3/dx4 (2157 bp)
di3/di4 (1982 bp)
dp3/dx4 (1576 bp)
left_primer
VS_C5387.1_1
HH_C5387.1_dx1
HH_C5387.1_dx3
HH_C5387.1_di1
HH_C5387.1_di3
HH_C5387.1_dp1
HH_C5387.1_dp3
right_primer
VS_C5387.1_2
HH_C5387.1_di2
HH_C5387.1_di4
HH_C5387.1_dx2
HH_C5387.1_dx4


Syg-1
2509k
2510k
2511k
2512k
2513k
2514k
2515k
2516k
2517k
2518k
2519k
Gene Models
K02E10.7
protein kinase (curated coding gene)
syg-1 (K02E10.8)
(curated coding gene)
SNPs, Knockouts & Other Alleles
cx_P1406
transposon insertion
ky652
deletion
deletion
hd18_deletion (1008 bp)
promoter
syg-1_promoter (3523 bp)
PCR_fragment
dx2/dx1 (2038 bp)
di2/di1 (1762 bp)
dp2/dx1 (805 bp)
2/1 (3523 bp)
left_primer
HH_K02E10.8_dx2
HH_K02E10.8_dp2
HH_K02E10.8_di2
K02E10.8_aag_2
right_primer
HH_K02E10.8_di1
HH_K02E10.8_dx1
K02E10.8_aag_1


Gene Models
T02C5.1a
(curated coding gene)
T02C5.1b
(curated coding gene)
T02C5.3
(curated coding gene)
unc-2 (T02C5.5d.3)
(curated coding gene)
unc-2 (T02C5.5c
(curated coding
unc-2 (T02C5.5c
(curated coding
unc-2 (T02C5.5c
(curated coding
unc-2 (T02C5.5b
(curated coding
unc-2 (T02C5.5a
(curated coding
promoter
T02C5.3_promotor (5754 bp)

Icam-3


Gene Models
rig-5 (C36F7.4a.1)
Drosophila analgam protein like (curated coding gene)
rig-5 (C36F7.4a.2)
Drosophila analgam protein like (curated coding gene)
rig-5 (C36F7.4b)
(curated coding gene)
C36F7.5
(curated coding gene)
SNPs, Knockouts & Other Alleles
deletion
hd48_deletion (928 bp)
promoter
rig-5_4th_intron (3712 bp)
rig-5_(OH) (2210 bp)
PCR_fragment
dx2/dx1 (1833 bp)
di2/di1 (1603 bp)
db2/dx1 (884 bp)
2/3 (3712 bp)
ONH62/ONH58 (2210 bp)
left_primer
HH_C36F7.4a_dx2
HH_C36F7.4a_db2
VS_rig-5fu_2
ONH62
right_primer
HH_C36F7.4a_di2
HH_C36F7.4a_di1
HH_C36F7.4a_dx1
VS_rig-5fu_3
VS_rig-5fu_1
ONH58

Rig-5

2.2 Expressionsanalyse der IgCAMs

Mit den GFP-Reporter Konstrukten wurden jeweils mehrere unabhängige transgene Linien hergestellt (siehe Mat. und Meth. 4.2 und 4.3). Als Koinjektionsmaker wurde entweder *pha-1*, *rol-6* oder *lin-15* verwendet (Kramer et al. 1990; Clark et al. 1994; Granato et al. 1994). Alle transgenen Linien enthalten das GFP-Reporter Konstrukt als extrachromosomales DNA-Element**.** Da extrachromosomale DNA-Elemente nicht gleichmäßig vererbt werden, führen sie zu einer mosaikartigen Expression, so dass die folgenden Abbildungen nicht das komplette Expressionsmuster darstellen. In allen Abbildungen liegt der Kopf links. Zur Orientierung sind nicht erkennbare Umrisse der Tiere mit einer gelb punktierten Linie dargestellt.

2.2.1 *Rig-4*

Embryo: Im 3-fach Stadium des Embryos ist erstmals schwache Expression im Pharynx zu sehen.

Larve: Ab dem L1 Larvenstadium ist Expression in DA Motorneuronen zu sehen. Vor allem die Motorneurone posterior der Vulva, insbesondere DA8 und DA9 exprimieren stark. Oft kann man 1-2 Zellkörper von DD oder VD Motorneuronen sehen. Die Kommissuren exprimieren schwach aber der Dorsalstrang ist durchgehend zu sehen. Im Kopf findet man Expression in RMDL/R Motorneuronen, in mindestens zwei weiteren Neuronen und in den Glia Zellen AMso. Die Expression im Pharynx bleibt in allen Larvenstadien und im adulten Wurm erhalten. Expression setzt außerdem in den Saumzellen, im Darm sowie in der H-Zelle ein.

Adultes Tier: Die Expression in den Motorneuronen ist kaum mehr zu sehen, es dominiert die Expression im Pharynx und im Darm. Die uv3 (uterine ventral) Zellen und das Vulva Epithelium exprimieren, letzteres nur schwach. Vereinzelt exprimieren Körpermuskelzellen.

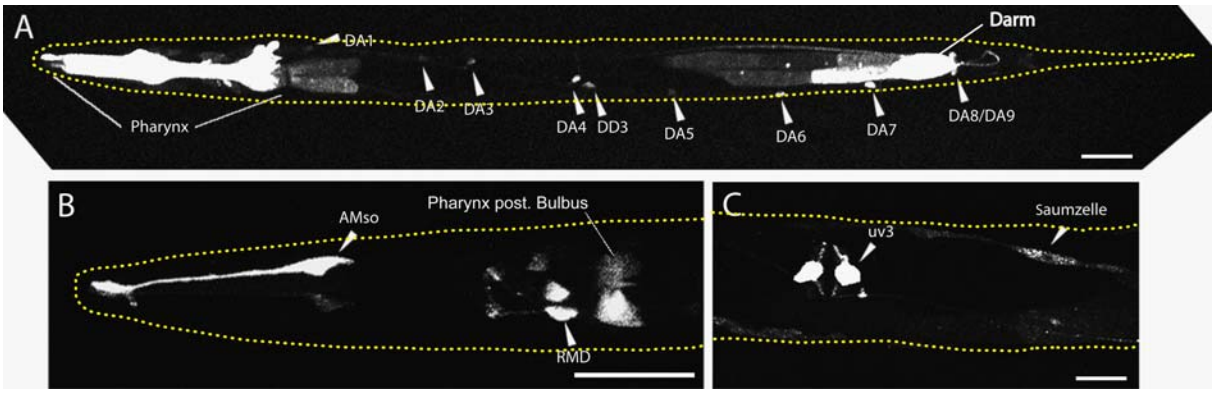


Abb. 2.3: Expression von *rig-4*. Expression ist erst im 3-fach Stadium zu beobachten, was wahrscheinlich auf die lange Reifung des Fluoreszensmarkers DsRed2 zurück zu führen ist. **A** (Seitenansicht) zeigt eine L4 Larve. Die Motorneurone liegen auf dem Ventralstrang. Der Wurm ist verdreht, da der Koinjektionsmarker *rol-6* verwendet wurde. **B** (Aufsicht) und **C** (Ventralansicht) zeigen den Kopf bzw. die Vulva eines jungen Adulten. Balken: 20µm.

2.2.2 Lad-2a/b

Embryo: Ab dem späten Komma-Stadium bzw. frühen 1,5-fach Stadium ist im Kopfbereich Expression in SMB und SMD Motorneuronen sowie in wenigen weiteren Neuronen sichtbar. Zwei Gliazellen von sensorischen Neuronen im Kopf sind erkennbar. Außerdem exprimieren die DB6 und DB7 Motorneurone im Schwanz.

Larve und adultes Tier: Hier ist die Expression entsprechend der Beschreibung von Aurelio und Mitarbeiter (Aurelio et al. 2002) in SMD Motorneuronen, SDQ Interneuronen, in ALN und PLN Neuronen sichtbar.

In *lad-2a* gibt es ein großes Intron. Dieses Intron als Promotor erzeugt im 1,5-fach Stadium Expression in einer Pharynxzelle. Im adulten Tier ist nur sehr schwache Expression in zwei Pharynx Neuronen sowie in den Spermatheken und im Darm zu sehen.

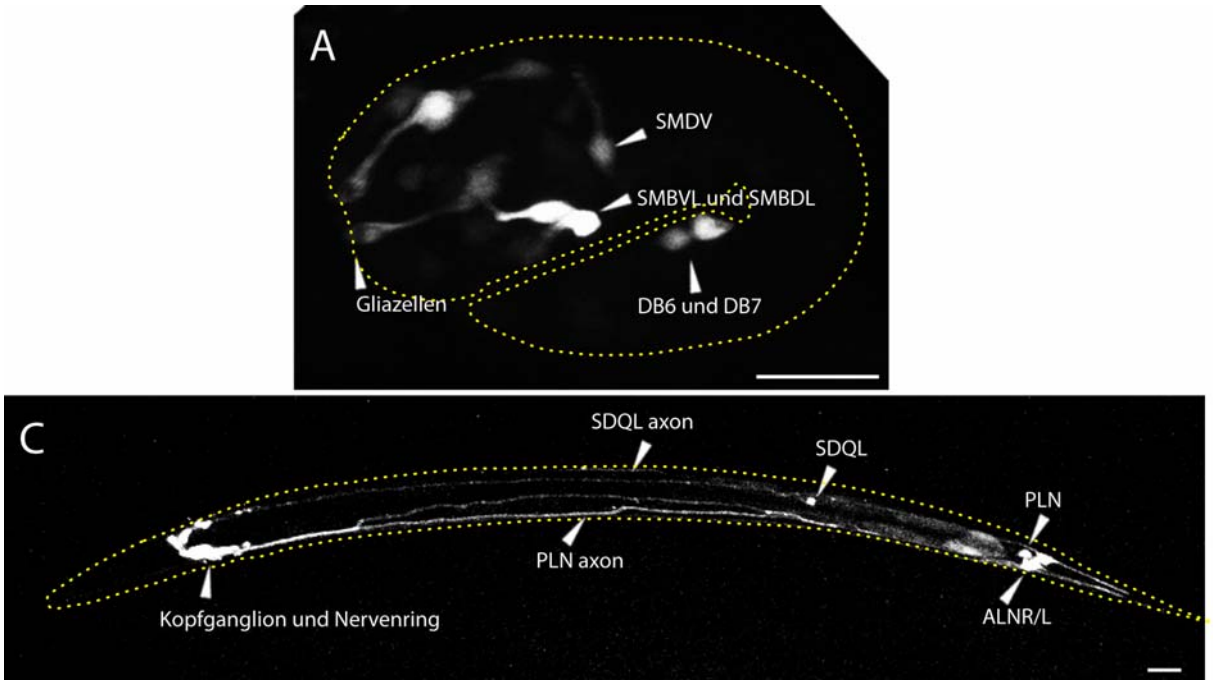


Abb. 2.5: Expression von *lad-2a/b*. A Embryo im 2-fach Stadium, und Larve (**B**), (Seitenansicht). Balken: 20µm.

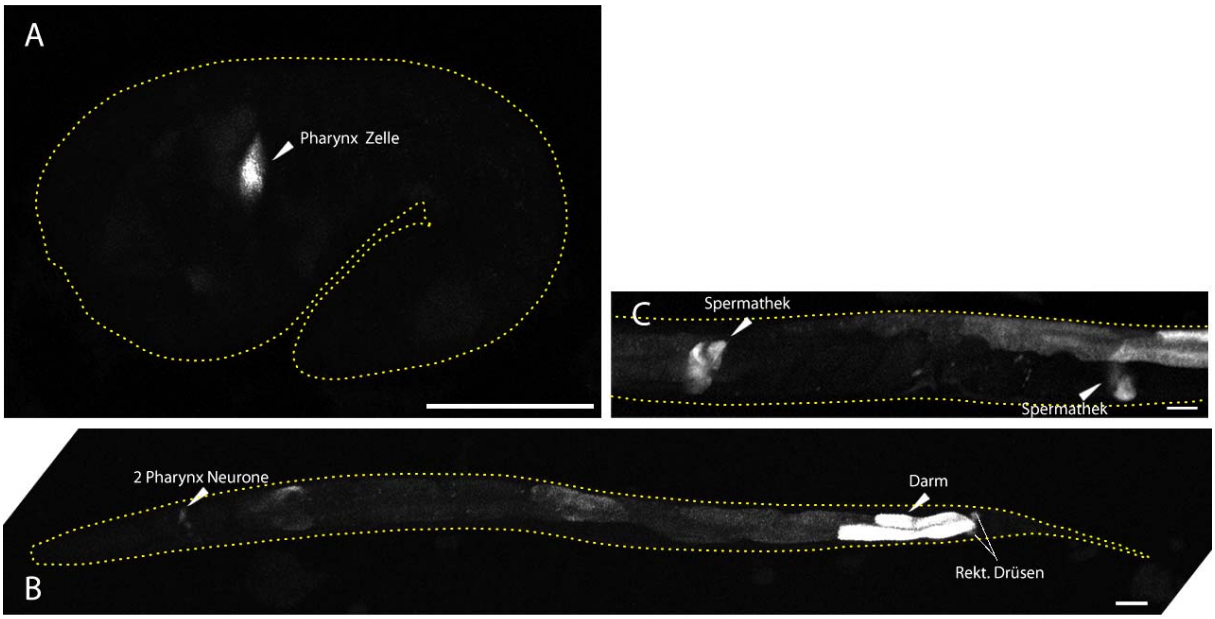


Abb. 2.6: Expression mit dem 9. Intron von *lad-2a* als Promotor A Embryo, 1,5 fach Stadium **B** L4 Larve, **C** adultes Tier, Seitenansicht, Balken: 20µm.

2.2.3 *Rig-6a*

Embryo: Die Expression beginnt in der späten Gastrulation in Körpermuskelzellen. Im 1,5 - fach Stadium ist Expression in Motorneuronen zu sehen und sehr schwach in Neuronen im Kopf. Nicht neuronale Expression ist stark in der exkretorischen Zelle.

Larve und adultes Tier: Die DA, DB und D-Typ Motorneurone exprimieren, sowie viele Neurone im Kopfganglion. Darunter sind einige Interneurone mit Axonen im rechten Bündel des Ventralstranges. Selten sieht man auch ein oder zwei Axone im linken Bündel. Durch die starke Expression in Körpermuskeln und in der Hypodermis ist eine eindeutige Bestimmung der Neurone nicht möglich. In adulten Tieren kommt zusätzlich Expression in der Spermathek und der Vulva (vm1/2) hinzu.

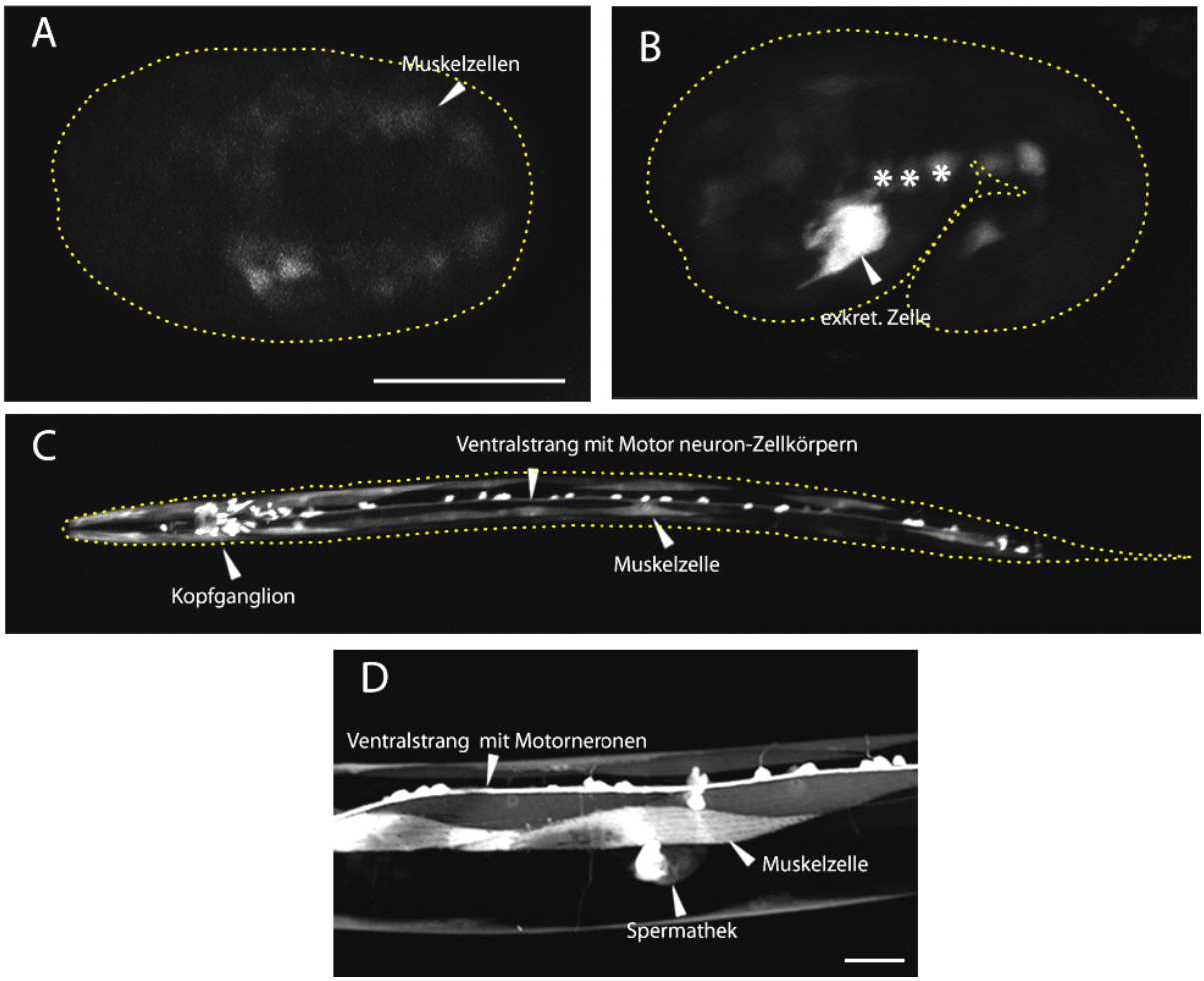


Abb. 2.7: Expression von *rig-6a*
Die Expression in Motorneuronen beginnt im 1,5-fach Stadium des Embryos (Bild **B**, *). **A** Embryo, späte Gastrulation, **A**, **B** Seitenansicht, **C**, **D** Ventralansicht. Balken: 20µm.

2.2.4 *Rig-6b/d*

Embryo: Ab dem 1,5-fach Stadium ist Expression in den DD Motorneuronen, CAN, NSM, URX und in einigen weiteren Kopfneuronen zu sehen.

Larve und adultes Tier: In L1 Larven setzt sich die Expression aus dem Embryo fort. Die Beschreibung der Expression von Aurelio und Mitarbeitern (Aurelio et al. 2002) konnte bestätigt werden (URX und wenige Kopfneurone). In L2-3 Larven kommt Expression in weiteren Motorneuronklassen dazu. Die Expression nimmt aber in allen Motorneuronen sowie in den CAN und ALN Neuronen stark ab und ist im adulten Tier nicht mehr zu sehen. Nicht neuronale Expression konnte nicht beobachtet werden.

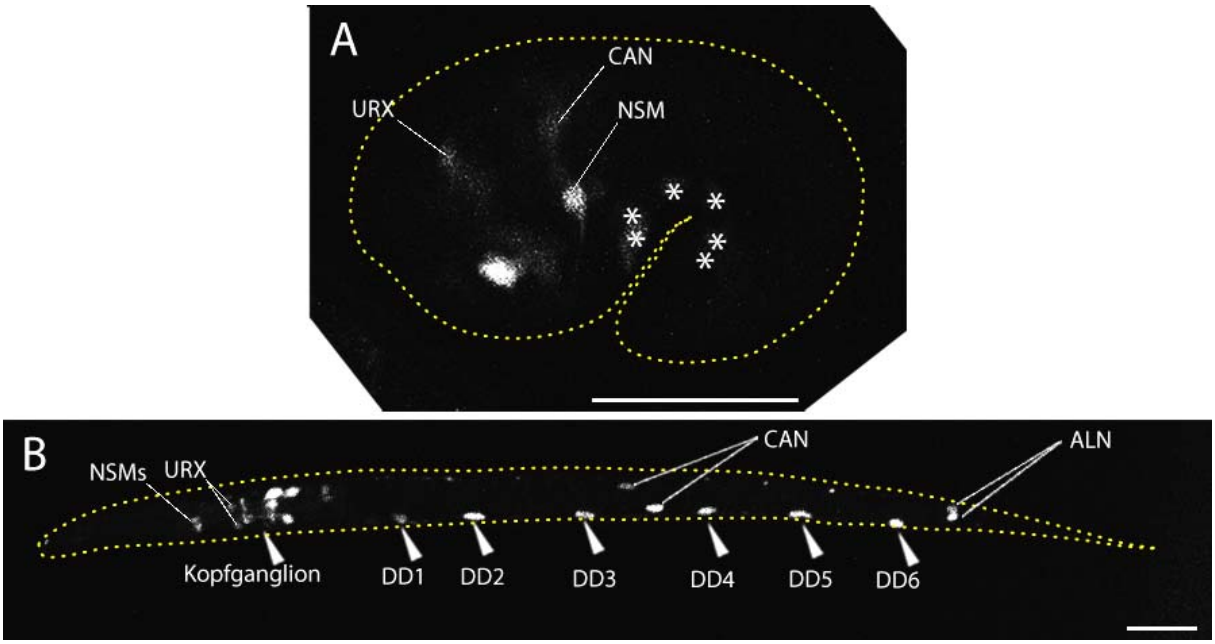


Abb. 2.8: Expression von *rig-6b*
Die Expression in DD Motorneuronen beginnt im 1,5-fach Stadium des Embryos und ist sehr schwach (**A**, *). **B** L1 Larve, Seitenansicht, Balken: 20µm.

2.2.5 *Rig-6c*

Für *rig-6c* konnte keine Expression festgestellt werden.

2.2.6 *Rig-1a*

Embryo: Während der späten Gastrulation exprimieren wenige Neurone im Kopfbereich. Im Schwanz exprimiert PVC und ein weiteres Neuron stark. Ebenfalls starke Expression zeigen der Pharynx, sowie die Hypodermis.

Larven: Viele Interneurone im rechten Bündel des Ventralstranges und Glia der inneren und äußeren labial -sensorischen Neurone zeigen Expression. Der Pharynx zeigt vor allem während des L1 Stadiums starke Expression, die in den weiteren Larvenstadien rasch abnimmt. Schwache Expression, die ebenfalls in den folgenden Larvenstadien abnimmt, ist in der Hypodermis zu sehen.

Adultes Tier: In adulten Tieren verstärkt sich die Expression in Interneuronen mit Zellkörper im Kopfganglion und Axon im Ventralstrang, in weiteren Neuronen des Kopfganglions und in den Pharynxneuronen I2. Die Expression in einigen Kopfneurone kolokalisiert mit dem Marker *glr-1*::GFP (Hart et al. 1995; Maricq et al. 1995). Mit diesem Marker konnte die Expression im PVC Interneuron verifiziert werden. Expression ist weiterhin in Gliazellen der inneren und äußeren labial-sensorischen Neurone zu sehen.

Die Expression in Pharynx und Hypodermis ist nicht mehr zu sehen, aber das Vulvaepithel exprimiert.

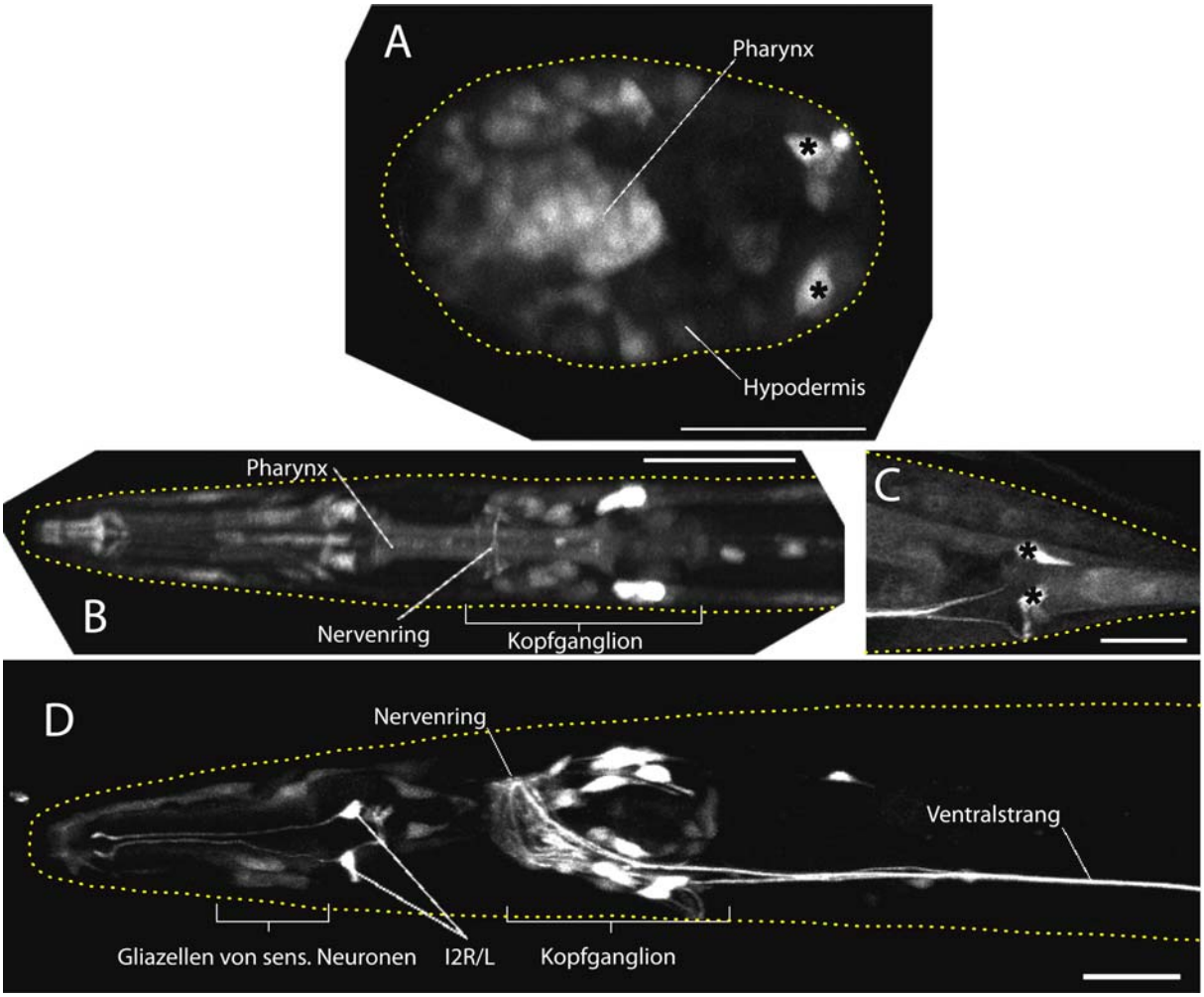


Abb. 2.9: Expression von *rig-1*
Mit dem Marker *glr-1*::GFP konnte die Expression von *rig-1* in PVC (*) verifiziert werden. **A** Embryo späte Gastrulation, **B** L1 Larve Kopf, **C** adultes Tier Schwanz, **D** adultes Tier Kopf. **A** und **B** Dorsalansicht, **C**-**D** ventral-laterale Ansicht, Balken: 20µm.

2.2.7 *Ncam-1a/b*

Embryo: Während der Gastrulation ist eine starke Expression in den Darmzellen zu sehen. Am Übergang zum Komma-Stadium wird Expression in URYV, NSM und Zellen, die ihrer Position nach Neurone des Kopfganglions sind sichtbar.

Larve und adultes Tier: In Larven und in adulten Tieren ist eine ausgeprägte Expression in allen DA und DB Motorneuronen, sowie in weiteren Motorneuronenzellkörpern sichtbar. Außerdem exprimiert AVG, URYV, NSM, PHC sowie wenig weitere Kopfneurone.

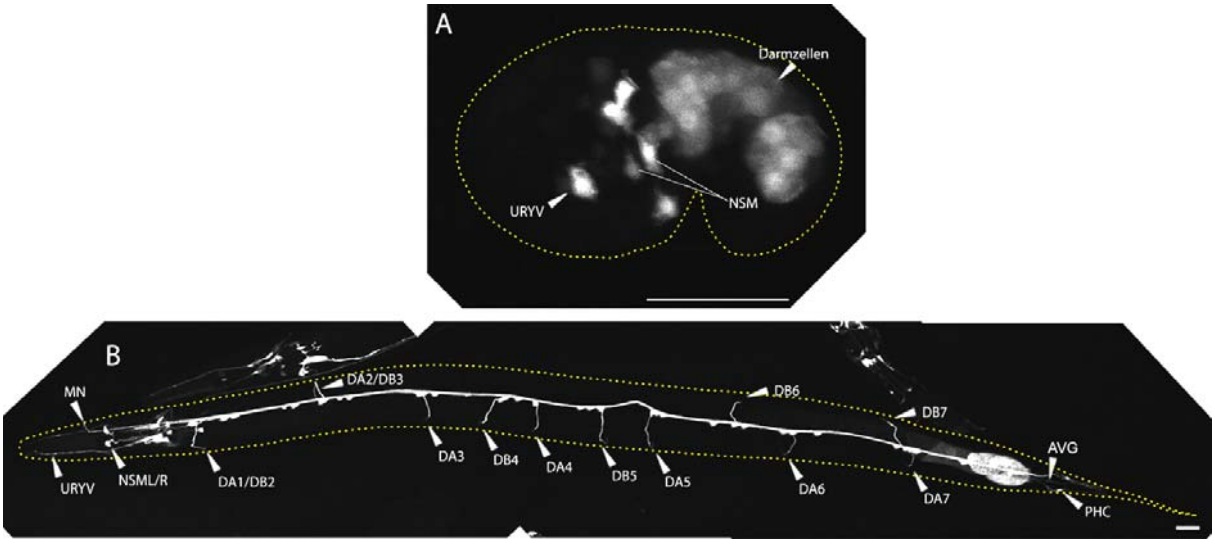


Abb. 2.10: Expression von *ncam-1a/b*
A Embryo, 1,5-fach Stadium (Seitenansicht), **B** adultes Tier, MN Kommissur eines Motoneurons im Kopf (Dorsalansicht), Balken: 20µm.

2.2.8 *Ncam-1c*

Der *Ncam-1c* Promotor umfasst den Promotorbereich von *Ncam-1a/b* und hat zusätzlich das erste Intron von *a* und *b*. Die Expression in den Motorneuronen ist schwächer, zusätzlich sind noch weitere Neurone im Kopfganglion markiert. Außerdem ist im Pharynx Expression zu sehen (ohne Abbildung).

2.2.9 *Icam-1*

Embryo: Neuronale Expression ist im Embryo erst kurz vor dem Schlüpfen der Larve zu erkennen. Nicht neuronale Expression ist vor allem in den Hypodermis zu sehen, sowie im Darm und schwach im Pharynx.

Larve und adultes Tier: Die neuronale Expression beschränkt sich auf labial sensorische Neurone sowie Gliazellen im Kopfbereich. Interessant ist, dass die CAN Neurone eine starke Expression zeigen. Der Pharynx exprimiert stark, wie auch die Saumzellen (laterale Hypodermis). Im Schwanz sieht man zwei Phasmidgliazellen (PHsh).

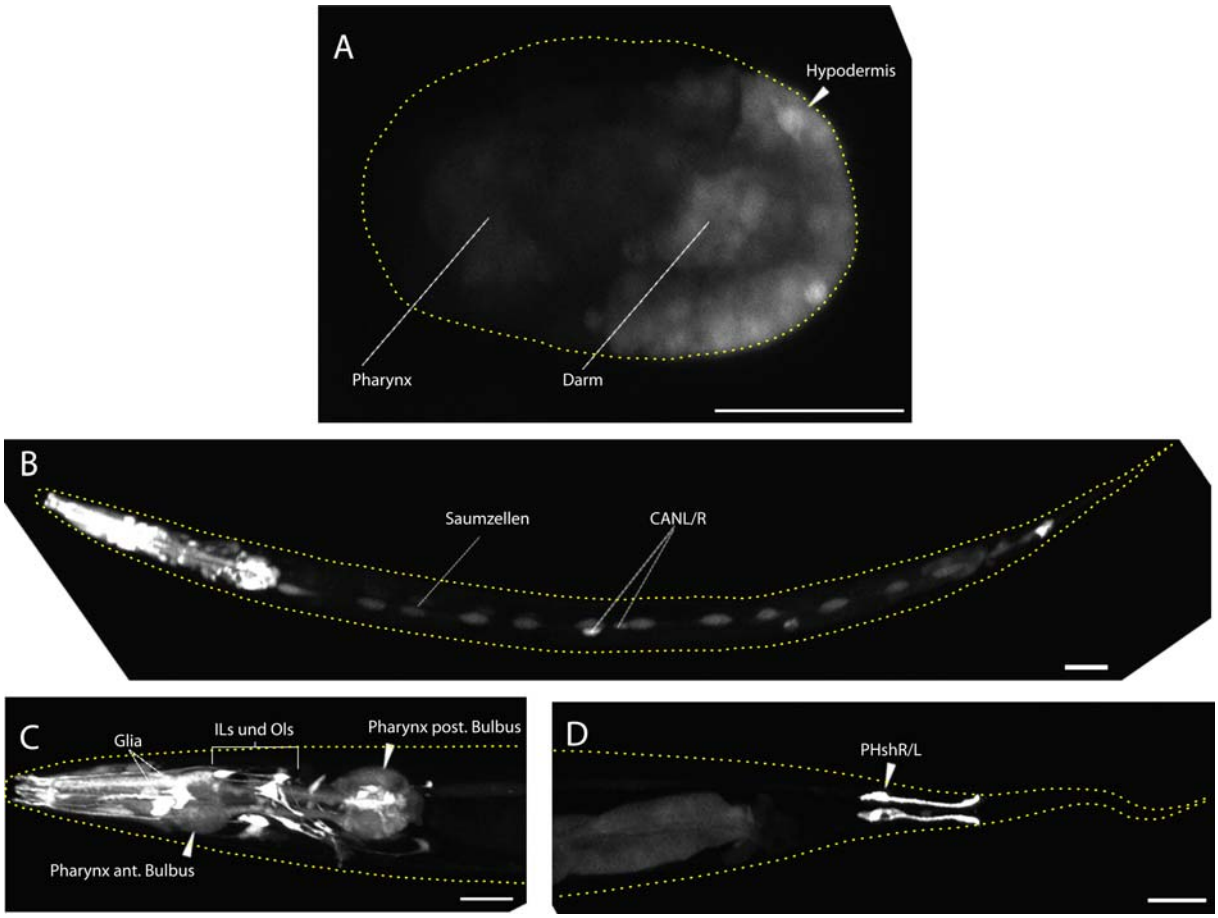


Abb. 2.11: Expression von *icam-1*
A, **B** Embryo späte Gastrulation (Aufsicht), **C**, **D** L4 Larve(Seitenansicht), E, F Kopf eines adulten Tieres (Seitenansicht), und **G**, **H** Schwanz eines adulten Tieres (Aufsicht), Balken: 20µm.

2.2.10 *Icam-2*

Dieses Reporter-Konstrukt besteht aus einem 0,8kb großen Promotorbereich und dem Gen, an welches das GFP anschließt (Fusionsprotein). Während der späten Gastrulation ist Expression in der Hypodermis zu beobachten, wobei man die so genannten *leading cells* sehen kann (siehe Expression von *icam-3* für eine genaue Beschreibung) (Williams-Masson et al. 1997). Allerdings ist die Expression meist sehr schwach. In adulten Tieren ist ebenfalls nur eine äußerst schwache Expression in wenigen Kopfneuronen, der Hypodermis und dem Pharynx zu sehen. Eine Expression in PVT, wie sie von Aurelio und Mitarbeitern beschrieben ist, konnte ich nicht bestätigen.

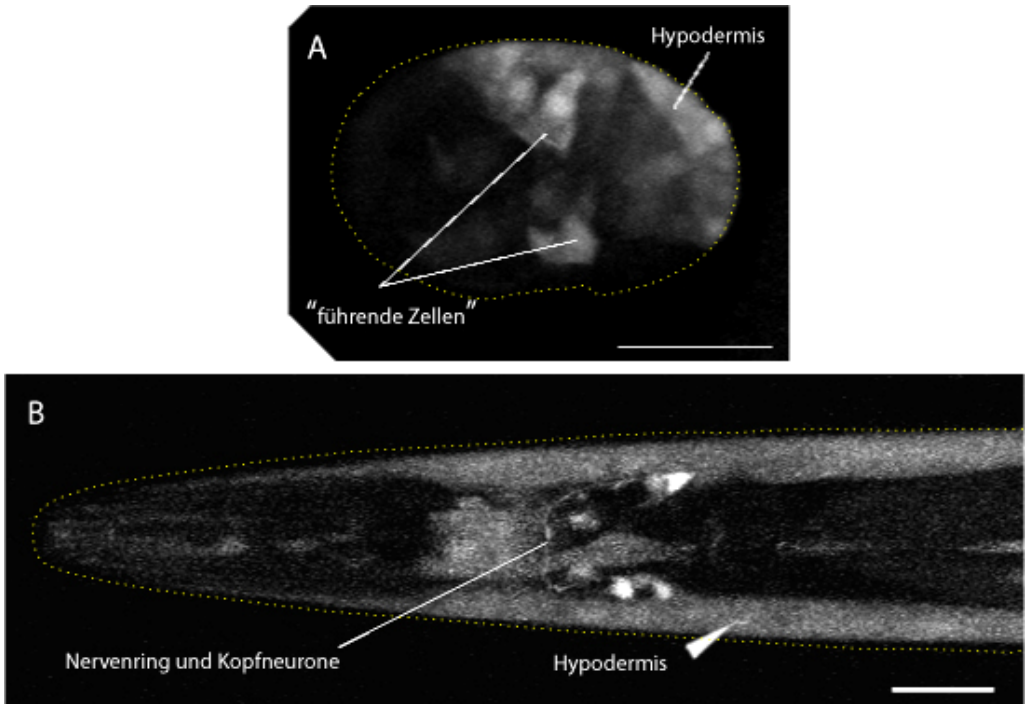


Abb. 2.12: Expression von *icam-2* (Fusionsprotein)
A, **B** Embryo, späte Gastrulation-Komma-Stadium (Ventralansicht), **C**, **D** Kopf eines adulten Tieres (Aufsicht), Balken: 20µm.

2.2.11 *Syg-2*

Embryo: Während der späten Gastrulation beginnt die Expression in Körpermuskelzellen. Ab dem 1,5-fach Stadium kommt Expression in Neuronen im Kopfganglion hinzu. Zwei dieser Neurone haben Axone im Mundbereich, zwei weitere ventral liegende Neurone senden Axone in den Nervenring. Die Expression in Motorneuronen ist vor allem in der Embryonalphase sichtbar.

Larve und adultes Tier: Eine starke Expression ist in den ALN und PLN Neuronen zu sehen. Ein Neuron im Schwanz ist wahrscheinlich PVT. Selten sind Kommissuren zu sehen, wobei die Zellkörper meist nicht zu sehen sind. Das Konstrukt ist schwach in Kopfneuronen exprimiert, die meistens von der Expression der Kopfmuskulatur überdeckt ist. Sehr starke Expression ist auch in den Körpermuskeln, in Vulva Muskelzellen (vm1/2) und Vulva Epidermiszellen zu sehen (für die Vulva Expression siehe auch Shen et al. 2004).

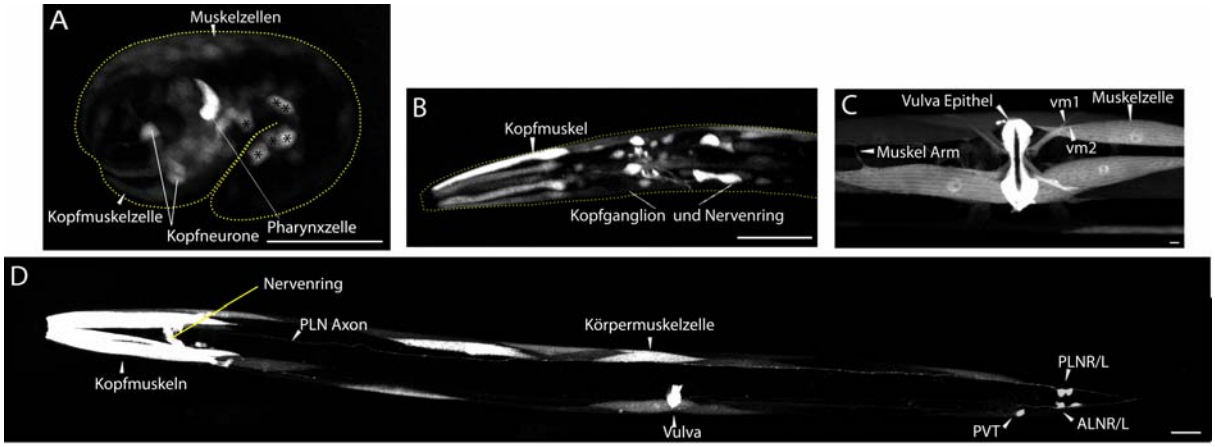


Abb. 2.13: Expression von *syg-2*
Im Embryo (**A**, 1,5-fach Stadium Seitenansicht) ist Expression in Motorneuron zu sehen (*), die im weiteren Verlauf der Entwicklung kaum mehr zu erkennen ist. **B** Kopf (Seitenansicht), **C** Vulva (Ventralansicht), **D** ganzes Tier (Seitenansicht), Balken: 20µm.

2.2.12 *Wrk-1*

Embryo: Während der späten Gastrulation beginnt die Expression im Darm, wobei am vorderen Ende des Darms ein Band aus Zellen stärker exprimiert. Im 1,5-fach Stadium kommen dann Motorneurone sowie Gliazellen von sensorischen Neurone im Kopfbereich dazu.

Larve und adultes Tier: In L1 Larven exprimieren sensorische - und Interneurone im Kopfganglion. Vor allem posterior der Vulva sind im L1 Stadium Motorneuronzellkörper zu erkennen, selten auch anterior der Vulva. In den folgenden Larvenstadien lässt die Expression in den Motorneuronen nach, das PDA Interneuron ist gut zu sehen. Des Weiteren ist Expression in Gliazellen (AMso, CEPso) der sensorischen Neurone im Kopf sichtbar. Sehr starke Expression ist in allen Coelomocyten, den distalen Spitzenzellen (DTC = *distal tip cells*) und selten in der Gonade und der Vulva (vm1/2) zu sehen. Im zweiten Bulbus des Pharynx ist selten schwache Expression zu erkennen. Im Darm ist die Expression in frühen Larvenstadien noch gut zu sehen und lässt im Verlauf der Entwicklung nach. In adulten Tieren ist nur noch in den Coelomocyten starke Expression zu beobachten.

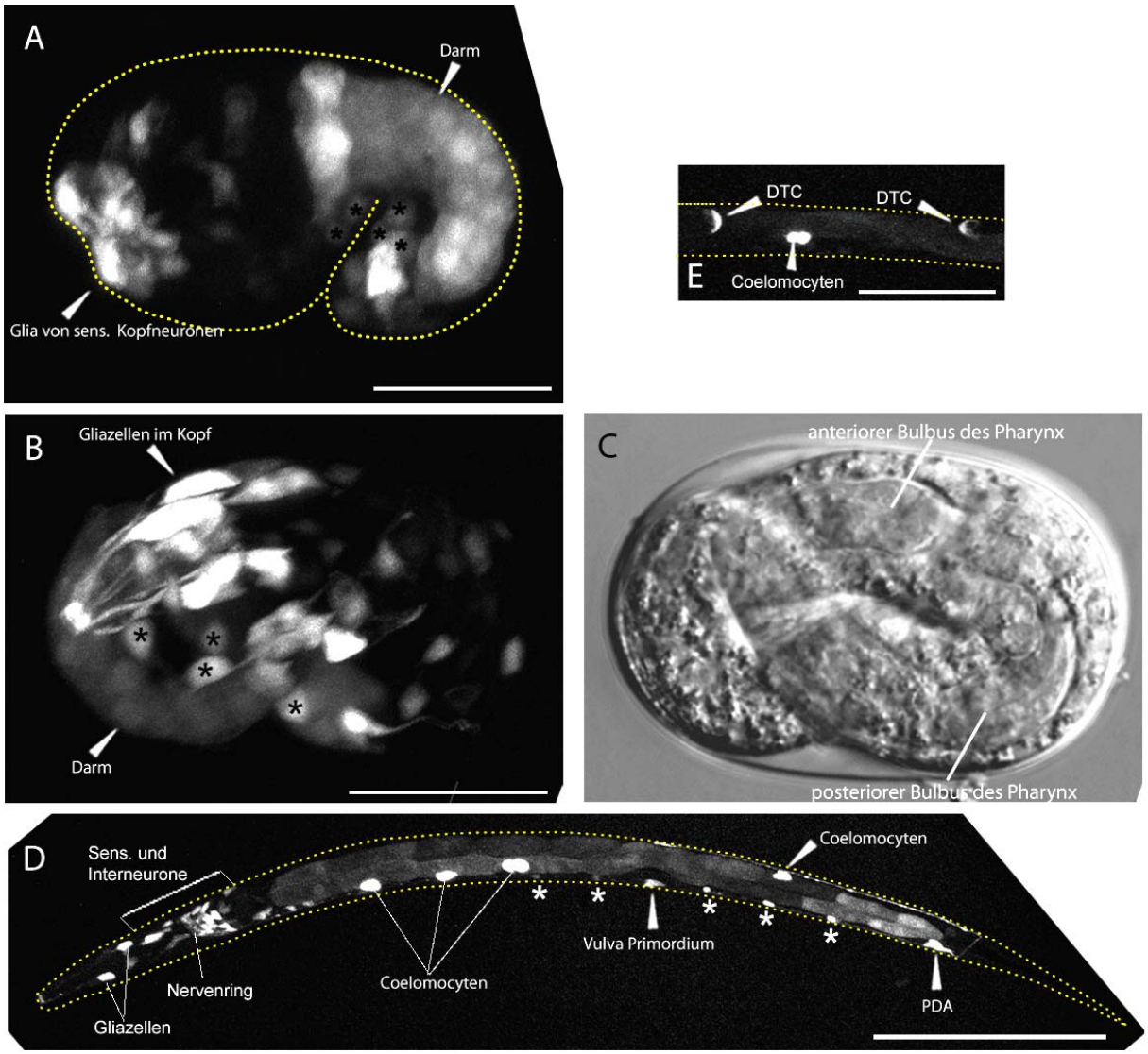


Abb. 2.14: Expression von *wrk-1*
Im Embryo, (**A** 1,5-fach Stadium und B, **C** 3-fach Stadium) ist Expression in Motorneuron zu sehen (*) die im weiteren Verlauf der Entwicklung zunehmend schlechter zu sehen ist (**D**, L4 Larve). Distale Spitzenzellen (DTC) exprimieren während die Gonade auswächst (**E**). Seitenansicht, Balken: 20µm.

2.2.13 *Rig-3*

Embryo: Ab der späten Gastrulation sieht man Expression in RMED und in zwei Gliazellen von sensorischen Neuronen im Kopf (ILsoVL und ILshVL).

Larve und adultes Tier: *Rig-3* ist ausschließlich in neuronalem Gewebe und Gliazellen exprimiert. Im Ventralstrang exprimiert ausschließlich AVA. Im Kopfganglion sind einige weitere Neurone zu sehen. In einigen Tieren exprimiert auch RMED. Im Bereich des posterioren Bulbus des Pharynx exprimiert I4 sowie AMshR/L. Im anterioren Bulbus des

Pharynx exprimiert I1, M4 und NSM. Die Expression ist unverändert vom L1 Stadium bzw. dem 3-fach Stadium des Embryos bis zum adulten Tier.

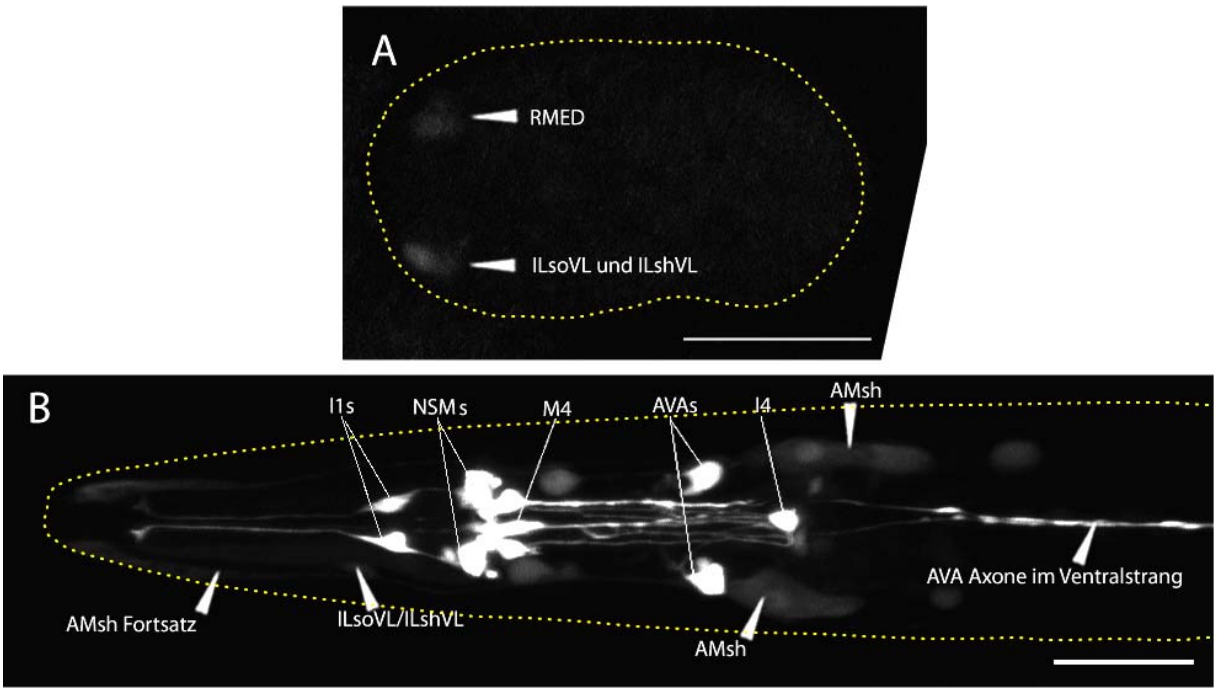


Abb. 2.15: Expression von *rig-3*
A Embryo, Komma-Stadium (Seitenansicht), **B** Kopf (Ventralansicht), Balken: 20µm.

2.2.14 *Syg-1*

Embryo: Expression ist während der Embryonalphase nicht zu sehen. Erst kurz vor dem Schlüpfen der Larven erkennt man Expression in Motorneuronen.

Larve und adultes Tier: Die Expression ist allgemein nur sehr schwach. Im Kopfganglion sind einige Neurone sichtbar. Auffallend ist die Expression in mehreren Klassen von Motorneuronen: Im hinteren Teil des Tieres exprimieren DA, VA und AS Motorneurone, im vorderen Teil exprimieren zusätzlich die DB Motorneurone (Identifikation in Zusammenarbeit mit Joseph Watson). Im Kopf exprimieren Gliazellen der sensorischen Neurone. Nicht neuronale Expression ist in der Kopfmuskulatur und in Vulva Muskelzellen (vm1/2) zu sehen.

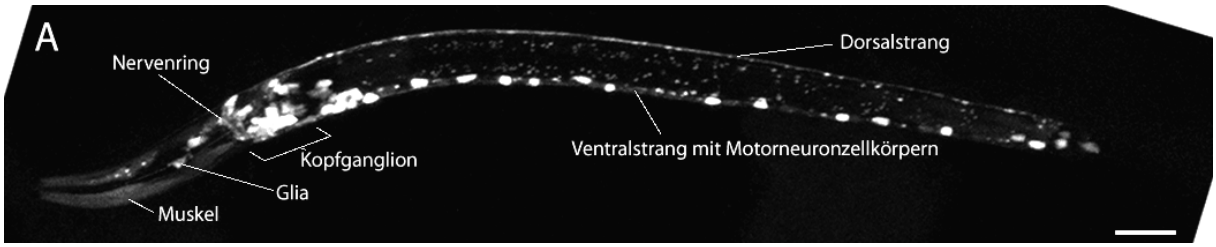


Abb. 2.16: Expression von *syg-1*
Seitenansicht einer Larve, Balken: 20µm.

2.2.15 *Icam-3*

Embryo: Während der späten Gastrulation ist Expression in den Hypodermiszellen zu sehen. Im Komma-Stadium sieht man die zwei Paare der so genannten *leading cells* (anterior rechts: ABpraappap und posterior rechts: ABpraapppa). Sie sind die ersten beiden Hypodermiszellen, die bei der ventralen Schließung des Embryos auswachsen (Williams-Masson et al. 1997). Das anteriore Paar verschmilzt zum hyp6 Syncytium, das posteriore Paar ist der Anfang vom hyp7 Syncytium, welches die Körperhypodermis bildet.

Larve und adultes Tier: Schwache Expression ist in Gliazellen im Kopf in allen Larvenstadien und im adulten Tier zu sehen. Die nicht neuronale Expression überwiegt und betrifft die Gonade, die Spermathek, Vulva-Ringmuskelzellen, Saumzellen, rektale Drüsenzellen und rektales Epithel.

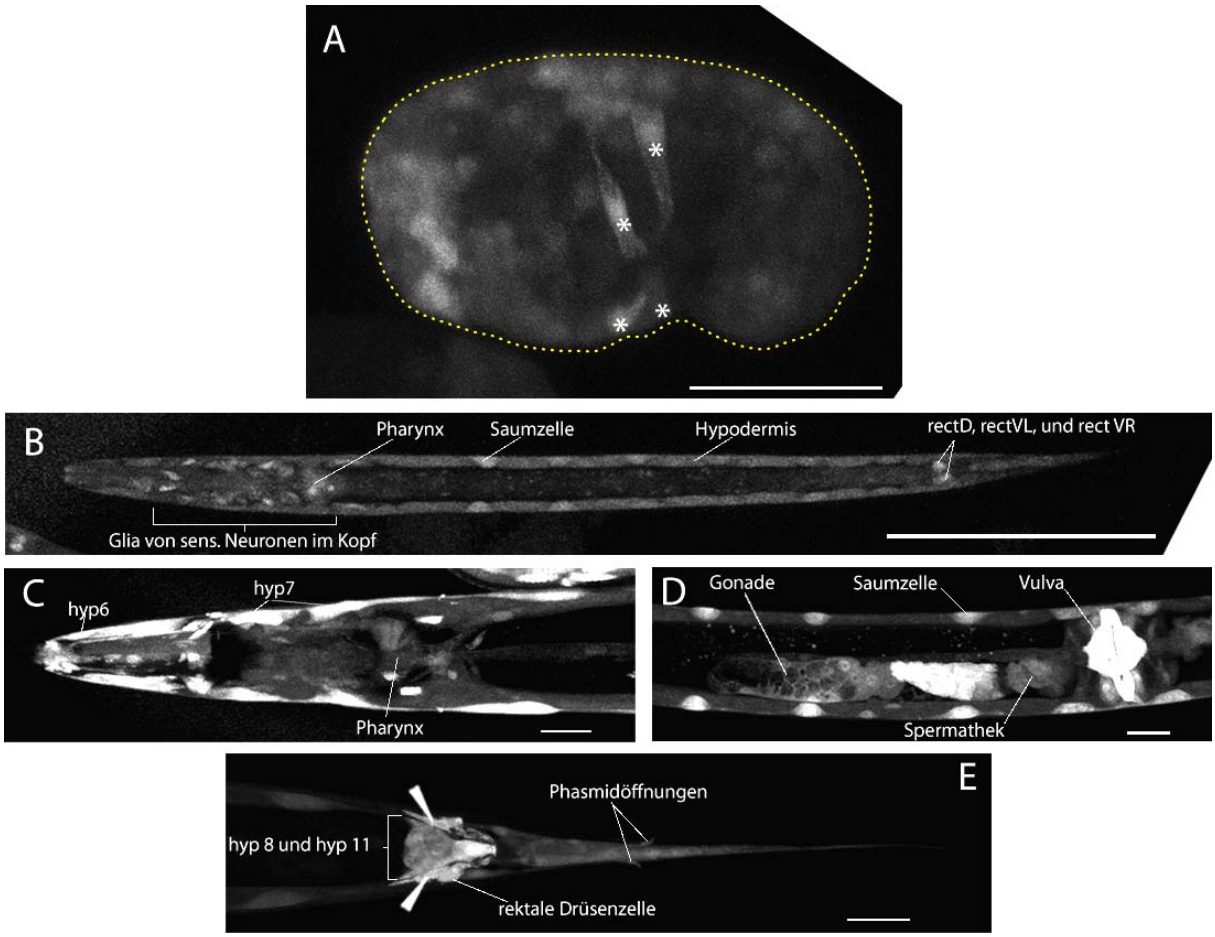


Abb. 2.17: Expression von *icam-3*
In Bild **A**, Embryo, Komma-Stadium (ventral-lateral Ansicht) sind die *leading cells* (*) kurz vor der ventralen Schließung zu sehen. Bild **B** (Larve) und **C** und **D** (adultes Tier) sind Ventralansichten. In Bild **C** (Aufsicht) ist die Hypodermis mit hyp7 bezeichnet. Die Pfeilspitzen in Bild **E** (Dorsalansicht) deuten auf Epithelzellen des Rektums., Balken: 20µm.

2.2.16 *Rig-5a/b* 4.Intron

Embryo: Im Embryo des Expressionsstammes von O. Hobert kann ab dem 1,5 fach Stadium Expression von 4-6 Zellen im Kopfbereich (RMD Motorneurone) und manchmal wenigen ventral liegenden Zellen (wahrscheinlich ein Motorneuron im Ventralstrang) gesehen werden.
Larve und adultes Tier: Im adulten Tier konnte die von Aurelio und Kollegen beschriebene Expression in den RMD Motorneuronen bestätigt werden (Aurelio et al. 2002). Außerdem ist Expression im Darm und in den rektalen Drüsenzellen zu sehen.
In dem Stamm, in dem das vierte Intron als Promotor verwendet wurde, ist Expression ab der Gastrulation im Kopfbereich des Embryos schwach zu erkennen. Die Expression wird zunehmend stärker. In Larven exprimieren viele Neurone des Kopfganglions, sensorischen Neurone, Gliazellen und Pharynxneurone (NSM, I2, M2 und M4). In wenigen Tieren sind

zwei Axone im rechten Axonbündel des Ventralstrangs zu sehen, deren Zellkörper im Kopfganglion liegen. Im Schwanz exprimieren die PHA Neurone. Insgesamt macht dieser transgene Stamm jedoch einen kranken Eindruck.

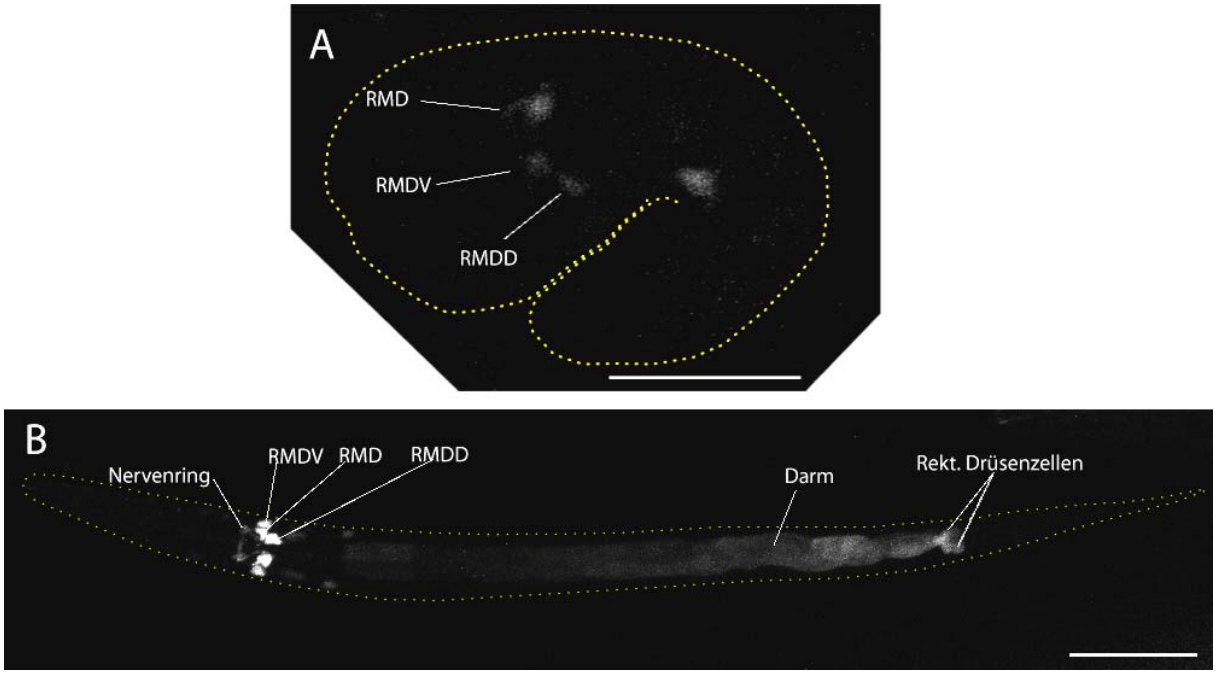


Abb. 2.18: Expression von *rig-5*
Bild **A**, Embryo, 1,-fach Stadium (Seitenansicht), Bild **B** L1 Larve (Ventralansicht), Balken: 20µm.

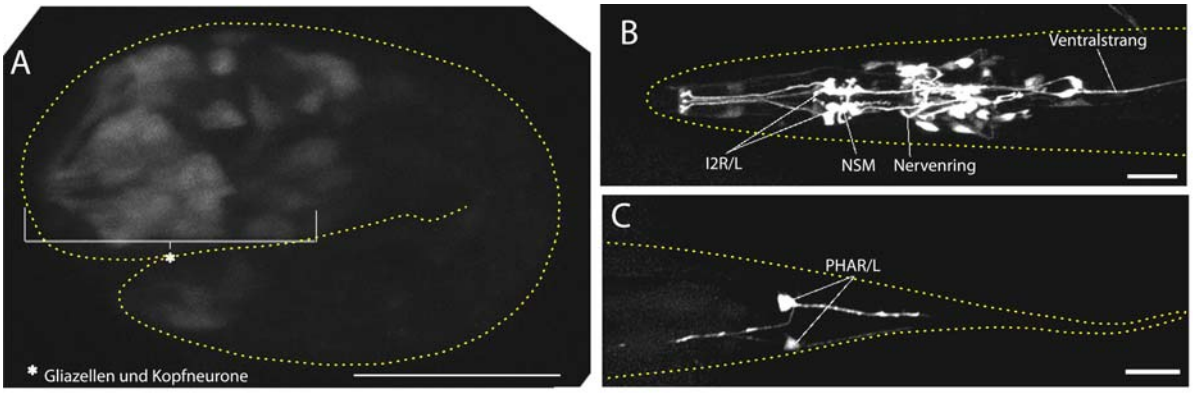


Abb. 2.19: Expression mit dem 4. Intron von *rig-5*
Bild **A** Embryo 1,5-fach Stadium (Seitenansicht), Bild **B** Kopf (Ventralansicht), Bild **C** Schwanz eines adulten Tieres (Dorsalansich), Balken: 20µm.

Gen	neuronal	nicht neuronal
rig-4	DA, DD/VD, RMD, AMso	Pharynx, Vulva(uv3), Darm, Saumzellen,einzelne Muskeln,H-Zelle
lad-2a/b	DB6/7, SAA, SMB, SMD, SDQ, ALN, PLN	-
lad-2a/b (9. Intron)	2 Kopfneurone	Darm, Spermathek
rig-6a	mehrer Klassen Motorneurone, viele Neurone im Kopfganglion, Interneurone im Ventralstrang	Vulva (vm1/2), Muskel, Spermathek, Hypodermis, Exkret. Zelle
rig-6b/d	DD, CAN, ALN, URX, NSM, schwach in einigen weiteren Kopfneuronen,	-
rig-6c	-	-
rig-1a	I2 Glia von sens. Neuronen im Kopf, Intereurone mit Axon im Ventralstrang, PVC	Pharynx, Vulvaepithel, Hypodermis,
ncam-1a/b	DA, DB und weitere Motorneurone, AVG, URYV, NSM PHC, Kopfneurone	Darm
ncam-1c	wie ncam-1a/b und weitere Neurone im Kopfganglion	Pharynx
icam-1	CAN, sensorische Neurone, Gliazellen im Kopf, PHsh,	Pharynx, Saumzellen, Darm
icam-2	schwach in 2-4 Kopfneuronen in adulten Tieren.	Pharynx und Hypodermis schwach
syg-2	PVT, ALN, PLN, Motorneurone im Embryo, Kopfneuronen,	Vulva (vm1/2), Vuvla Epidermis, Muskel
wrk-1 a+b.1/2+c+d+e	Motorneurone stark in den Lavenstadien, sensorische Kopfneurone und deren Glia, AMso, weiter Kopfneurone, PDA,	Pharynx schwach, Vulva (vm1/2), Darm, Coelomocyten, DTC, Gonade, ,
rig-3	RMED, AVA, wenige Kopfneurone schwach, I1, I4, M4, NSM, AMsh, IlsoVL/IlshVL	-
syg-1	Schwach in DA, DB, VA, und AS Motorneuronen, Kopfneurone, Gliazellen von sens. Kopfneuronen	Vulva (vm1/2), Muskel im Kopf
icam-3	schwach in Kopfneuronen und Gliazellen der sens. Kopfneurone	Pharynx, Vulva (Ringmuskelzellen), Spermathek, Saumzellen, rekt. Drüsenzellen, Gonade
rig-5a/b	RMD, RMDV, RMDD	Darm, Rekt. Drüsenzellen
rig-5 (4. Intron)	Kopfneurone, Inerneurone im Ventralstrang, NSM, M2; M4, sens. Neurone, PHA, RMDs, Gliazellen	-

Tab. 2.3: Übersicht und Zusammenfassung der einzelnen Expressionmuster.

Gen	Embryo	L1-L4	Adult
ncam-1a/b	++	+++	+++
rig-6a	+	+++	+++
rig-1a	+	++	+++
rig-3	+	++	+++
syg-2	+	+++	+++
wrk-1a+b.1/2+c+d+e	+	+++	++
lad-2a/b	++	++	++
rig-5 (4. Intron)	+	++	+++
icam-1	-	++	++
rig-6b/d	+	++	-
rig-4	-	++	+
ncam-1c	+	+	+
rig-5a/b	+	+	+
icam-2	-	+	+
syg-1	-	+	+
icam-3	-	+	+
lad-2a/b (9. Intron)	-	-	-
rig-6c	-	-	-

Tab. 2.4: Expression der IgCAMs in neuronalem Gewebe während der Entwicklung.
Die Angaben sind Abschätzungen mit dem Auge, und dienen nur einem groben Überblick der Expressionsdynamik. +++ starke Expression, ++ mittelstarke Expression, + schwache Expression, - keine Expression. Expression im Embryo ist, wenn vorhanden, vor dem Auswachsen der Axon zu sehen (am Ende des 2-fach Stadiums/Anfang des 3-fach Stadiums (480-550 min nach der Befruchtung)).

3. Die Deletionsbank

3.1 Die Herstellung der Deletionsbank im Überblick

Aus der Deletionsbank können *C. elegans* Individuen isoliert werden, die in einem bestimmten Gen eine Deletion besitzen. Damit ist sie die Grundlage zur funktionellen Charakterisierung der hier untersuchten IgCAMs. In Kapitel 3 (Mat. und Meth.) ist die Herstellung der Deletionsbank detailiert beschrieben.
Die Deletionsbank wurde mit fünf unabhängigen Mutagenesen (Chargen) hergestellt, so dass nicht nur für die in dieser Arbeit untersuchten IgCAMs Deletionen gefunden werden konnten, sondern für insgesamt 49 Deletionen (weitere sind in Arbeit).
Jede Charge umfasst 110 96 *well* Kulturplatten, mit 20 unabhägigen, mutagenisierten Würmern pro *well*. Damit repräsentiert die Deletionsbank ca. 2,2 Mio. haploide Genome in 1100 Pools. Ein Pool entspricht ca. 2000 haploiden Genomen.

3.2 Screening nach Deletionsmutanten

Das Durchsuchen (*screening*) der Deletionsbank erfolgte ausschließlich mit der „*poison primer* PCR“ (Edgley et al. 2002), die es ermöglicht, eine einzige Deletion in 2000 Genomen so stark zu amplifizieren, dass sie auf einem Agarosegel sichtbar ist. Die Methode ist so empfindlich, dass man auch noch Deletionen in einem Pool von 4000-5000 Genomen detektieren kann. Die Primer zur Isolation wurden meist so gewählt, dass sie entweder am 5`- oder am 3`- Ende eines Gens binden, d.h. dass die Deletion entweder schon den Genanfang oder die Transmembrandomäne zerstört, um ein Null-Allel zu erhalten. Das Wildtyp PCR-Fragment der externen PCR wurde mit einer Länge von 1800bp bis 2200bp gewählt.
Um möglichst viel Deletionsmutanten zu finden, ist es einerseits wichtig, dass das Verhältnis von Wildtyp-Genomen zu mutanten Genomen in den Pools maximal 5000:1 ist (optimal: 2000:1). Andererseits ist die DNA Menge in den Pools der limitierende Faktor, da sobald die Pools aufgebraucht sind, die Deletionsbank nicht mehr ohne erheblichen Mehraufwand nach neuen Deletionen durchsuchbar ist. Ein weiterer wichtiger Punkt ist das Einfrieren: Je weniger Würmer das Einfrieren überleben, desto geringer ist die Wahrscheinlichkeit den mutanten Wurm zu finden.

In Tab. 2.5 ist das Verhältnis von reproduzierbaren Deletionsbanden in den Pools zu wieder gefundenen Deletionsbanden in den Lysaten, sowie die Zahl der anschließend tatsächlich isolierten Mutanten und der aufgetauten *wells* aufgelistet. Eine erhebliche Zahl von Falsch-Positiven wird meist im ersten Schritt in den Pools gefunden, die sich nicht reproduzieren lassen (zwischen 3 und 52). Mit sechs Primer-Sets wurden für die PCR zwei Pools vereinigt, was einer Komplexität von 4000 haploiden Genomen entspricht. Für vier dieser Primersets, die je zwei verschiedenen Genen entsprechen, wurde keine Deletion gefunden, obwohl die ganze Deletionsbank durchsucht wurde. Für zwölf weitere Primer-Sets wurden die Pools mit einer Komplexität von 2000 haploiden Genomen eingesetzt. Dabei wurde nur mit zwei Primer-Sets keine Deletion gefunden.

Gen	Primer	Genome durchsucht	positive Pools	positive Lysate	aufget. *wells*	positive Würmer
Tabelle A						
rig-3	dx3/4	2,2 mio	8	4	2	+
rig-5	dx1/2	2,2 mio	1	1	1	+
rig-6	a_dx1/2	2,2 mio	1	-	-	-
rig-6	dx3/4	2,2 mio	1	-	-	-
icam-1	dx1/2	2,2 mio	-	-	-	-
icam-1	dx3/4	2,2 mio	-	-	-	-
Zwischenergebnis 1			67% (4/6)	34% (2/6)		34% (2/6)
Tabelle B						
rig-3	dx1/2	190000	1	1	1	+
wrk-1	dx3/4	380000	2	1	1	+
rig-4	dx1/2	380000	1	-	-	-
rig-1	dx1/2	380000	1	1	1	+
syg-1	dx1/2	380000	2	2 + 1	2	+
icam-2	dx1/2	960000	-	1	1	+
syg-2	dx1/2	960000	2	2	2	+
ncam-1	dx1/2	1150000	1	1	1	+
rig-4	dx5/6	1340000	6	4	3	+
lad-2	dx1/2	1900000	-	1	1	+
rig-6	b_dx1/2	2110000	-	-	-	-
wrk-1	dx5/6	2,2 mio	3	1	1	+ (1 + 1)
Zwischenergebnis 2			75% (9/12)	83% (10/12)		83% (10/12)
Gesamtergebnis			72% (13/18)	66% (12/18)		66% (12/18)

Tab. 2.5: Darstellung des *screening* Verlaufs in Zahlen. Tabelle A: Komplexität der durchsuchten Pools von 4000 haploiden Genomen (Pools A und E vereinigt). **Tabelle B**: Komplexität der durchsuchten Pools von 2000 haploiden Genomen. Positive Pools: Anzahl der gefundene Deletionsbanden, die in einer weiteren, unabhängigen PCR bestätigt wurden. Positive Lysate: Anzahl der in Lysaten wieder gefunden bzw. auch neu gefundenen Deletionsbanden, die sich reproduzieren ließen. Aufgetaute *wells*: Anzahl der aufgetauten *wells* mit Würmern (für daraus erhaltene Würmer siehe Tab. X nächste Seite). Positive Würmer: + aus einem, der aufgetauten *wells* erhaltene mutante Würmer. In den Lysatplatten bzw. den Lysaten der vereinzelten Würmer konnten teilweise weitere reproduzierbare Deletionsbanden gefunden werden.

Mit einem dieser Primer-Sets liegt das wahrscheinlich daran, dass nur zwei von zwölf Platten mit Pools durchsucht wurden, mit dem zweiten Primer-Set für ein anderes Gen wurden allerdings elf Platten mit Pools durchsucht. Außerdem wurden nur mit einem dieser zwölf

Primer-Sets alle zwölf Platten mit Pools durchsucht, mit den anderen Primer-Sets wurden zwischen einem und zehn Platten durchsucht. Für die Gene *lad-2* und *icam-2* wurden die Pools kein zweites Mal zur Bestätigung durchsucht, bzw. konnte keine Deletionsbande bestätigt werden. Trotzdem wurde auf der Ebene der Lysate weiter gesucht, was zu einer Deletionsmutante führte. Obwohl also mit der doppelten Komplexität im Vergleich zur einfachen immer die ganze Bank durchsucht wurde, war die Trefferquote geringer.

Dadurch, dass meistens nicht alle zwölf 96 *well* Platten mit Pools durchsucht wurden, stammen die isolierten Mutanten für die IgCAMs hauptsächlich aus den Chargen 1 und 2 der Deletionsbank (Platten 1-96 und 101-196). In den aufgetauten *wells* sollten durchschnittlich 200-600 Würmer die Einfrier-Prozedur überleben. Für die Charge 1 liegt der Mittelwert der erhaltenen Würmer bei 277 (höchster Wert: 477, niedrigster Wert: 85). Die Werte für die zwei *wells* in denen die Mutante gefunden werden konnten, liegen bei 207 und 477 Würmern, wobei aus einem *well* mit 340 überlebenden Würmern keine Mutante isoliert werden konnte. Für die Charge 2 ergibt sich ein Mittelwert von 295 aufgetauten Würmern (höchster Wert: 715, niedrigster Wert: 0). Der Mittelwert für die *wells* aus denen Mutanten isoliert wurden liegt bei 339 Würmern.

Das *screnning* mit einer Komplexität von 2000 haploiden Genomen ist also tendenziell erfolgreicher, genauso wie aus *wells* mit mehr überlebenden Würmern tendenziell die Mutanten isoliert wurden.

Platte/well	Gen	Primer	überlebende Würmer	getestete Würmer	Positive Würmer	pos/getestet
126/C6	*syg-1*	dx1/2	0	0	0	0
125/G5	*rig-4*	dx5/6	56	21	2	9,5%
83/E5	*rig-4*	dx5/6	85	32	0	0
129/E12	*syg-2*	dx1/2	118	47	0	0
121/D7	*rig-3*	dx3/4	123	45	0	0
175/G12	*rig-5*	dx1/2	126	50	4	8%
439/H7	*lad-2*	dx1/2	150	72	1	1,4%
265/A4	*icam-2*	dx1/2	170	96	2	2,0%
1/D12	*rig-3*	dx1/2	207	75	3	4,0%
143/F9	*syg-2*	dx1/2	221	67	1	1,5%
172/D4	*wrk-1*	dx3/4	267	96	9	9,6%
136/B1	*syg-1*	dx1/2	270	162	2	1,2%
3/D2	*rig-4*	dx5/6	340	198	0	0
130/A11	*rig-1*	dx1/2	438	72	6	8,3%
82/G4	*ncam-1*	dx1/2	477	319	4	1,2%
127/D1	*rig-3*	dx3/4	620	188	3	1,6%
148/B1	*wrk-1*	dx5/6	715	180	2+2	1,1% (2,2%)
Gesamt				1720	39 (41)	2,2%
Durchschnitt			288 (± 194)*	108		

Tab. 2.6: Ergebnisse des Auftauens der *wells* mit den Würmern. Durchschnittlich sind ca. 2% der getesteten Würmer Träger der gefundenen Deletion. Insgesamt konnten aus ca. 1000 eingefrorenen *C. elegans* Individuen durchschnittlich 288 wieder aufgetaut werden (ca. 30%). Wobei die Standardabweichung (*) bei 194 liegt.

4. Die Deletionsmutanten

Für folgende IgCAMs wurde im Verlauf dieser Arbeit keine Deletionsmutante isoliert: *rig-6* (C33F10.5), *icam-1* (F39H12.4) und *icam-3*, (T02C5.3). Für alle anderen wurde eine oder mehrere Deletionsmutanten isoliert (siehe Abb. 2.2 und Tab. 2.7). Die Größe der Deletionen liegt zwischen 268 und 1521bp. Die meisten Deletionen führen zu einem Stopcodon vor der Transmembrandomäne (TM) bzw. entfernenen sie (*lad-2*). Die Deletion von *rig-4* erzeugt ein Stopcodon erst nach der TM, die Deletion von *syg-2* ist neben *lad-2* die einzige, die nicht zu einer Verschiebung des Leserasters führt und nur die Fibronektin III Domäne deletiert. Für *rig-3* wurde eine Deletion isoliert, die im Leseraster ist und die 2. und 3. Ig-Domäne entfernt und eine zweite Deletion, die das Gen ab der Fibronektin III Domäne zerstört und zusätzlich noch ins nächste Gen hineinreicht. Dieses Gen (C53B7.7) hat C-terminal ein Peptidase-M13 Domäne, die von der Deletion betroffen ist.

Gen	Allele	Deletion in bp	Beschreibung der Deletion	Auswirkung
rig-4	*hd47*	742	Beginn in Exon 11 (AS 2069, nach TM), Ende in Intron 11	erzeugt Stopcodon nach AS 2098
lad-2a	*hd31*	702	Beginn in Intron 20 (AS 1078), Ende in Intron 21	im Leseraster, TM fehlt
lad-2c	*hd31*	702	Beginn in Intron 1 (AS 35), Ende in Intron 2	im Leseraster, TM fehlt
rig-1a	*hd15*	527	Beginn in Exon 2 (AS 60 = 1. Ig-Domäne), Ende in Intron 3	erzeugt Stopcodon nach AS 79
ncam-1a	*hd49*	698	Beginn und Ende in Exon 11 (AS 587 = 1. Fn3-Domäne)	erzeugt Stopcodon nach AS 600
ncam-1b	*hd49*	698	Beginn und Ende in Exon 11 (AS 587 = 1. Fn3-Domäne)	erzeugt Stopcodon nach AS 600
ncam-1c	*hd49*	698	Beginn und Ende in Exon 10 (AS 614 = 1. Fn3-Domäne)	erzeugt Stopcodon nach AS 627
icam-2	*hd32*	777	Beginn in Intron 14 (AS 542, TM fehlt, Rest des Gens deletiert)	Stopcodon bei AS 543
syg-2	*hd50*	338	Beginn in Exon 18, Ende in Exon 19 (AS 977 bis 1072)	im Leseraster, Fn3-Domäne fehlt
wrk-1a	*hd45*	268	Beginn in Intron 4 (AS 155 = 2. Ig-Domäne), Ende in Intron 5	Stopcodon bei AS 159
wrk-1a	*hd46*	714	Beginn in Intron 3 (AS 113 = 2.Ig-Domäne), Ende in Exon 4	erzeugt Stopcodon im 5 Exon
wrk-1a	*hd17*	647	Deletion im 3´-UTR	3´-UTR betroffen
wrk-1b	*hd45*	268	siehe wrk-1a	siehe wrk-1a
wrk-1b	*hd46*	714	siehe wrk-1a	siehe wrk-1a
wrk-1b	*hd17*	647	siehe wrk-1a	siehe wrk-1a
wrk-1c	*hd45*	268	siehe wrk-1a	siehe wrk-1a
wrk-1c	*hd46*	714	siehe wrk-1a	siehe wrk-1a
wrk-1c	*hd17*	647	siehe wrk-1a	siehe wrk-1a
wrk-1d	*hd45*	268	Deletion im 3´ UTR	3´-UTR betroffe
wrk-1d	*hd46*	714	Deletion im 3´ UTR	3´-UTR betroffe
wrk-1e	*hd45*	268	siehe wrk-1a	siehe wrk-1a
wrk-1e	*hd46*	714	siehe wrk-1a	siehe wrk-1a
wrk-1e	*hd17*	647	siehe wrk-1a	siehe wrk-1a
rig-3	*hd19*	554	Beginn in Exon 5, Ende in Exon 6 (AS 165-333)	im Leseraster, 2. u. 3. Ig-Domäne fehlt
rig-3	*hd51*	1521	Beginn in Exon 6 (AS 346 = Fn3-Domäne), Ende im letzten Exon vom nächsten Gen (C53B7.7)	Membranverankerung fehlt, Peptidasedomäne von C53B7.7 betroffen
syg-1	*hd18*	1008	Beginn in 5`-UTR, Ende in Intron 2	ATG fehlt
rig-5a	*hd48*	928	Beginn in Exon 5, (AS 174 = 2. Ig-Domäne,), Ende in Intron 7	erzeugt nach AS 199 Stopcodon
rig-5b	*hd48*	928	Beginn in Exon 5, (AS 264 = 2. Ig-Domäne,), Ende in Intron 7	erzeugt nach AS 289 Stopcodon

Tab.: 2.7 Beschreibung der isolierten Deletionen. Die deletierten Sequenzabschnitte mit Positionsangaben sind im Anhang aufgelistet. In der ersten Spalte sind unter „Gen“ alle betroffenen Spleißvarianten eines Gens angegeben.

4.1 Analyse der Deletionsmutanten

Nach zweimaligem Auskreuzen der Deletionsmutanten wurden verschiedene neuronale GFP-Marker hineingekreuzt, so dass die Mutanten am Ende 3-fach ausgekreuzt waren. Die Suche nach Defekten war einerseits auf gravierende allgemeine anatomische Fehler des Nervensystems gerichtet und im speziellen auf Fehler der Faszikulierung bzw. ektopischen Überkreuzung im Ventralstrang. Keine der Mutanten weist gravierende bzw. auffällige Defekte, die zu einem *unc*-Phänotyp (*unc*oordinated = unkoordinierte Bewegung), zu morphologischen Veränderungen oder zu Lethalität führen, auf. Auf Fehler der Faszikulierung und ektopische Überkreuzung im Ventralstrang wird in der Beschreibung der einzelnen Deletionsmutanten eingegangen. Bezüglich der DA/DB-Motorneuron-Kommissuren wurde kontrolliert, ob sie auf der richtigen Seite auswachsen und ob sie in Wildtyp-Formation den Dorsalstrang erreichen. Letzteres war immer der Fall.

Die meisten Deletionsmutanten wurden mit einem Standardset von neuronalen Markern analysiert. F25B3.3::GFP ist ein panneuronalen Marker, *glr-1*:YFP ist ein Marker für Interneurone im Ventralstrang (exprimiert in folgenden Neuronenpaaren mit Zellkörper im Kopfganglion: AVA, AVB, AVD, AVE, AVJ, AIB, RIM, RIS, RME, RMD, in den drei Neuronen des retrovesikulären Ganglions AVG, RIGL/R und in den beiden Interneuronen PVCL/R mit Zellkörper im Schwanz) (Hart et al. 1995; Maricq et al. 1995). Außerdem wurde der Marker *sra-6*::DsRed2 (Troemel et al. 1995) für die PVQ Interneurone und der Marker *odr-2*::CFP (Chou et al. 2001) für die AVG und PVP Interneuron - Analyse verwendet. Die Mutanten mit einer Expression in Motorneuronen sowie *rig-1*, *rig-3* und *rig-5* wurden zusätzlich mit dem DA/DB-Motorneuron-Marker *unc-129*::CFP analysiert (Colavita et al. 1998). Zusätzlich wurden noch weitere Marker verwendet, um dem spezifischen Expressionsmuster der einzelnen IgCAMs gerecht zu werden. Die Analyse der Mutanten mit ihrem eigenen, spezifischen Promotor-GFP Reporter war aufgrund zu schwacher Expression meist nicht gut möglich, wurde aber für einige Deletionsmutanten durchgeführt (siehe Beschreibung der einzelnen Mutanten). Der Vergleich der einzelnen Deletionsmutanten in Bezug auf die Marker: F25B3.3::GFP, *glr-1*:YFP, *sra-6*::DsRed2, *odr-2*::CFP und *unc-129*::CFP ist am Ende der Beschreibung der einzelnen Deletionsmutanten in Tabellen zusammengefasst. Die Ergebnisse für spezielle Marker für einzelne Gene sind nur im Text erwähnt. Im Folgenden sind die einzelnen Mutanten beschrieben, geordnet nach Mutanten mit Defekten (4.1.1 - 4.1.8) und Mutanten, die keine signifikanten Defekte zeigten (4.1.9 - 4.1.11). Um sicher zu stellen, dass die vorhandenen Defekte nicht von unerkannten anderen

Mutationen stammen, wurde für die meisten Mutanten, zusätzlich zum Auskreuzen, die spezifische WT-Gensequenz in Form eines Cosmids in die einzelnen Mutanten injiziert. Dadurch werden Defekte, die aufgrund einer Deletion in einem bestimmten Gen auftreten, behoben („gerettet“).

4.1.1 *Wrk-1 (hd45)*

Die *wrk-1* Mutante wurde mit folgenden Markern untersucht: F25B3.3::GFP, *glr-1*::YFP, *sra-6*::DsRed2, *odr-2*::CFP und *wrk-1*::YFP *(unc-47*::DsRed2, nicht ausgewertet). Mit *wrk-1*::YFP sind Neurone nur schlecht erkennbar, so dass keine Aussage gemacht werden konnte. Mit den Interneuron Marker *glr-1*::YFP hatten 24% der Tiere Überkreuzungsdefekte entlang des Ventralstranges. Auffallend ist, dass beim Überwechseln von mehreren Axonen in das linke Axonbündel, die fehlgeleiteten Axone nicht gebündelt sondern häufig aufgefächert bzw. defaszikuliert sind (Abb.: 2.21 E). Diesen Überkreuzungsdefekt findet man auch mit dem Marker F25B3.3::GFP in 42% der Tiere. Auffällig ist, dass die Überkreuzungen meist direkt posterior der Vulva bzw. im posterioren Teil des Ventralstranges stattfindet. In diesem Bereich findet man auch des Öfteren zwei bis vier Motorneuronzellkörper, die lateral anstatt auf dem Ventralstrang positioniert sind. Da mit diesem Marker beide Axonbündel des Ventralstranges sichtbar sind, kann man unterscheiden, von welchem Bündel die Axone in das jeweils andere Bündel wechseln. Aus dem linken Bündel wechseln in 19% der Tiere Axone in das rechte Bündel, und umgekehrt wechseln 11%. Das entspricht keinem signifikanten Unterschied. PVQ und PVP zeigen signifikante Defekte. Dabei ist PVQL und PVPR, die beide im linken Bündel des Ventralstranges verlaufen aneinander gekoppelt, d.h. nur selten wechseln beide an unterschiedlichen Stellen in das rechte Bündel. Mit dem DA/DB Motorneuron Marker wurden mit einer niedrigen Penetranz, aber statistisch signifikant, Kommissuren auf der falschen Seite festgestellt (für eine Übersicht welche Kommissuren betroffen sind siehe Tab. 2.9). Besonders betroffen ist die Kommissur des DB5 Motorneurons. Es wurden nur Tiere mit einer falsch verlaufenden Kommissur gefunden. Außerdem sind die DA6/DB6 Motorneuronzellkörper häufig lateral des Ventralstranges positioniert.

Die Defekte konnten mittels eines Rettungsexperiments, in dem F25B3.3::GFP als Marker verwendet wurde, eindeutig auf die Deletion zurückgeführt werden. Gerettete Stämme (= signifikant weniger Defekte als die Mutante): 2/7. Defekte in den geretteten Stämmen: VH1209: 18,6% (n = 59), VH1210: 13,8% (n = 58). Verwendetes Cosmid: F41D9.

4.1.2 *Wrk-1* (*hd46*)

Wrk-1 (*hd46*) wurde mit den selben Markern analysiert wie *wrk-1* (*hd45*) außer mit *glr-1*::YFP und *unc-129*::CFP. Dabei stellte sich heraus, dass dieses Allel tendenziell noch stärkere Defekte zeigt als *hd45* (siehe Tab.: 2.8 und 2.11). Die Defekte konnten mittels eines Rettungsexperiments, in dem F25B3.3::GFP als Marker verwendet wurde, eindeutig auf die Deletion zurückgeführt werden. Gerettete Stämme (= signifikant weniger Defekte als die Mutante): 2/5. Defekte in der geretteten Stämmen: VH1211: 13,5% (n = 52), VH1212 19,5%, (n = 46). Verwendetes Cosmid: F41D9

4.1.3 *Rig-1* (*hd15*)

Die *rig-1* Mutante wurde mit folgenden Markern untersucht: F25B3.3::GFP, *glr-1*:YFP, *unc-129*::CFP, *sra-6*::DsRed2, *odr-2*::CFP und *rig-1*::YFP. Mit *rig-1*::YFP sind Neurone nur schlecht erkennbar, so dass keine Aussage gemacht werden konnte.
Mit dem *glr-1*:YFP Marker, welcher Interneurone markiert, in denen auch *rig-1* exprimiert wird, wurden ektopische Überkreuzung von einzelnen oder auch mehreren Axonen im Verlauf des Ventralstranges gefunden (41% der Tiere zeigten diese Defekte, siehe Tab.: 2.8). Dabei scheint es keinen speziellen Ort zu geben an dem die Überkreuzung bevorzugt stattfindet. Einerseits findet sie statistisch sehr signifikant im Bereich des retrovesikulären Ganglions (RVG) statt, andererseits aber auch signifikant im weiteren Verlauf des Ventralstranges. Die Überkreuzungen gehen meist nur über kurze Strecken und betreffen häufig nur ein einzelnes Axon. Dadurch ist es schwierig, diese Defekte im panneuronalen Marker wieder zu finden. Teilweise wachsen ein oder mehrere Axone auch fast die ganze Strecke im linken Axonbündel.
Die Defekte konnten mittels eines Rettungsexperiments, in dem *glr-1*:YFP als Marker verwendet wurde eindeutig auf die Deletion zurückgeführt werden. Gerettete Stämme (= signifikant weniger Defekte als die Mutante): 3/6. Defekte in den geretteten Stämmen: VH1201: 19,2% (n = 73), VH1202: 14,7% (n = 68), VH1203 20,9% (n = 67). Verwendetes Cosmid K09E2.

4.1.4 *Rig-5* (*hd48*)

Die *rig-5* Mutante wurde mit folgenden Markern untersucht: F25B3.3::GFP, *glr-1*::YFP, *sra-6*::DsRed2, *odr-2*::CFP und *unc-129*::CFP.
Mit dem Interneuron Marker *glr-1*::YFP konnten ektopische Überkreuzungen am RVG, sowie im weiteren Verlauf des Ventralstranges festgestellt werden. Bei Überkreuzungen von mehreren Axonen bildete sich nicht ein Strang, der in das linke Axonbündel überwechselte sondern die Axone verliefen häufig defaszikuliert.
Die ektopischen Überkreuzungen wurden auch mit dem panneuronalen Marker (F25B3.3::GFP) gefunden. Dabei ist kein signifikanter Unterschied zwischen Überkreuzungen von links nach rechts bzw. umgekehrt feststellbar. Nur die Summe aller Überkreuzungen ist signifikant höher als in der Kontrolle. Mit den anderen Markern waren keine Defekte zu sehen.
Zur Rettung der Defekte wurde das Cosmid C36F7 in Mutanten mit den Markern *glr-1*::YFP und F25B3.3::GFP injiziert. Gerettete Stämme mit *glr-1*::YFP (= signifikant weniger Defekte als die Mutante): 2/7. Defekte in den geretteten Stämmen mit *glr-1*::YFP: VH1206: 14,1% (n = 92) VH:1207: 6,9% (n = 58). Gerettete Stämme mit F25B3.3::GFP: 1/3. Defekte in den geretteten Stämmen mit F25B3.3::GFP: VH1208: 7,1% (n = 56).

4.1.5 *Lad-2* (*hd31*)

Die *lad-2* Mutante wurde mit folgenden Markern untersucht: F25B3.3::GFP, *glr-1*:YFP, sowie mit dem *lad-2*::GFP Marker von O. Hobert (*otEx231*). Da die Expression von *lad-2*::GFP meist schwach ist und sehr starken Mosaikcharakter aufweist, konnte mit diesen Markern keine eindeutige Auswertung gemacht werden. Mit *glr-1*::YFP konnte ektopische Überkreuzung von einzelnen oder auch mehreren Axonen im Verlauf des Ventralstranges in 27% der Tiere gefunden werden. Außerdem wuchsen die in *glr-1*::YFP markierten zwei sublateralen Axone anstatt parallel zum Ventralstrang von anterior nach posterior in Schleifen aus und wechseln die Richtung oft mehrmals (66% der Tiere, n=39) (siehe Abb. 2.21.F).

4.1.6 *Rig-3* (*hd51*)

Die *rig-3* Mutante wurde mit folgenden Markern untersucht: F25B3.3::GFP, *glr-1*::YFP, *sra-6*::DsRed2, *odr-2*::CFP, *unc-25::snb-1*::GFP (Exprimiert in synapitsichen Vesikel von DD, VD, AVL, DVB, RME und RIS Neuronen) (Zhen and Jin 1999) und *rig-3*::DsRed2.
Mit dem Interneuron Marker *glr-1*::YFP zeigten 22% der Tiere ektopische Überkreuzungen. Die Überkreuzungen finden entlang des gesamten Ventralstranges statt. Mit den anderen Markern konnten keine Defekte festgestellt werden.
Ein durchgeführtes Rettungsexperiment ergab zwei aus sechs Stämmen, die sich nicht signifikant von *hd51* unterschieden, die aber auch keine signifikanten Unterschiede zum Kontrollstamm aufweisen, so dass eine eindeutige Aussage nicht möglich ist.

4.1.7 *Syg-1* (*hd18*)

Die *syg-1* Mutante wurde mit folgenden Markern untersucht: F25B3.3::GFP, *glr-1*::YFP, *sra-6*::DsRed2, *odr-2*::CFP, *lin-11*::GFP (VC Motorneurone), *unc-4*::GFP (DA, VA, VC, SAB Motorneurone) und *him-4*::GFP (Körpermuskelzellen). *Syg-1*::YFP wurde in die Mutante hineingekreuzt, allerdings war die YFP Fluoreszenz in dieser Kombination nicht mehr zu sehen.
Mit dem Marker *glr-1*::YFP konnte ektopische Überkreuzungen hauptsächlich im Bereich des RVG festgestellt werden. Außerdem wachsen Kommissuren der DA/DB Motorneurone auf der falschen Seite aus (siehe Tab. 2.9). In jedem Tier ist nur eine Kommissur fehlgeleitet. Dabei sind die gemeinsam verlaufenden Kommissuren von DA2/DB3 am stärksten betroffen.
Mit einem Rettungsexperiment mit *glr-1*::YFP als Marker konnten die Defekte behoben werden. Gerettete Stämme (= signifikant weniger Defekte als die Mutante): 1/7. Defekte im geretteten Stamm: VH1205: 9,8% (n = 92). Verwendetes Cosmid: C54A10.

4.1.8 *Ncam-1* (*hd49*)

Die *ncam-1* Mutante wurde mit den Markern: F25B3.3::GFP und *unc-129*::CFP untersucht.
Mit dem *unc-129*::CFP Marker, der die DA/DB Motorneurone markiert, in denen *ncam-1* auch exprimiert ist, wurden Defekte gefunden. Die Motorneuron-Kommissuren wachsen nicht auf der richtigen Seite in Richtung Dorsalstrang. Die Kommissur des DB6 Motorneurons wächst dabei am häufigsten falsch aus (siehe Tab. 2.9). Insgesamt wurden in *ncam-1 (hd49)*

neun falsch verlaufende Kommissuren in 114 Tieren gefunden. Davon waren in zwei Tieren die DB6 und DA6 Motorneurone gemeinsam betroffen.

4.1.9 *Icam-2* *(hd32)*

Die *icam-2* Mutante wurde mit den Markern: F25B3.3::GFP und *glr-1*::YFP untersucht. *Icam-2*::GFP ist zu schwach, um als Marker zu dienen. Mit keinem Marker konnten Defekte festgestellt werden.

4.1.10 Rig-4 *(hd47)*

Die *rig-4* Mutante wurde mit folgenden Markern untersucht: F25B3.3::GFP, *glr-1*:YFP, *unc-129*::CFP, *lin-11*::GFP (VC Motorneurone) (Hobert and Ruvkun 1998), *unc-47*::GFP (DD/VD Motorneurone) (McIntire et al. 1997), *unc-4*::GFP (DA, VA, VC, SAB Motorneurone) (Miller and Niemeyer 1995), *sra-6*::DsRed2 und *odr-2*::CFP.
Mit keinem Marker konnten statistisch signifikante Defekte im Nervensystem festgestellt werden.

4.1.11 *Syg-2* *(hd50)*

Die *syg-2* Mutante wurde mit den Markern: F25B3.3::GFP und *him-4*::GFP (Vogel and Hedgecock 2001) (Körpermuskelzellen, entspricht der Expression von *syg-2*) untersucht. Mit keinem Marker konnten Defekte festgestellt werden.

Gen	% Tiere mit Defekten					Liste anderer Marker[f]
	panneuronal[a]	Interneurone[b]	DA, DB Motorneurone[c]	PVQ[d]	PVP[e]	
WT	9,0	8,0	1,3	27,3	22,4	
wrk-1 *(hd45)*	41,7**	23,9**	8,8**	57,1**	55,6**	*wrk-1*::YFP
wrk-1 *(hd46)*	51,8**	-	-	60,7**	55,9**	*wrk-1*::YFP
rig-1	15,6	41,2**	4,0	11,3	12,4	*rig-1*::YFP
rig-5	20,8**	28,5**	1,9	13,2	10,9	-
lad-2	13,5	27,8**	-	-	-	*lad-2*::GFP
rig-3	7,3	21,6**	1,5	29,3	23,2	*unc-25::snb-1*::GFP, *rig-3*::DsRed2
syg-1	13,8	22,7*	10,0**	35,8	37,7	*unc-4*::GFP, *him-4*::GFP, *syg-1*::YFP
ncam-1	4,8	-	6,1*	-	-	-
icam-2	7,9	12,0	-	-	-	-
rig-4	7,6	6,1	4,0	22,0	20,3	*unc-47*::GFP,*unc-4*:GFP, *lin-11*::GFP
syg-2	-	-	-	-	-	*him-4*::GFP
syg-1*(hd18);* ***rig-4*** *(hd47)*	-	11,6	18,5**	17,1	14,7	-
syg-1 *(hd18);* ***wrk-1****(hd45)*	-	28,2**	19,3**	52,3**	49,2**	-
rig-4 *(hd47);* ***wrk-1****(hd45)*	-	27,8**	5,3*	44,9*	41,1	-
rig-1 *(hd15);* ***rig-3*** *(hd51)*	26,3**	30,3**	-	25,8	25,8	-
rig-3 *(hd51);* ***cdh-1*** *(hd44)*	8,8	-	-	14,9	17,6	-

Tab. 2.8: Vergleich der Defekte mit verschiedenen Markern. - nicht ausgewertet, [a] F25B3.3::GFP, Überkreuzungen von Neuronen im Ventralstrang wurden gezählt. [b] *glr-1*::YFP, Überkreuzungen von Interneuronen im Ventralstrang wurden gezählt. [c] *unc-129*::CFP, die DA und DB Motorneurone erreichen alle den Dorsalstrang, als Defekt wurde das Auswachsen auf der falschen Seite gewertet. [d] *sra-6*::DsRed2, Überkreuzung von PVQ wurde gezählt. [e] *odr-2*::CFP das Überkreuzen von PVP wurde gezählt. [f] weitere Marker die zur Analyse in die Mutante hineingekreuzt wurden (mit keinem dieser zusätzlichen Marker konnten signifikante Defekte festegestellt werden) * $p<0.05$, ** $p<0.01$. Für *rig-1 (hd15)*; *cdh-1 (hd44)* wurde anstatt von *hdIs26* (*sra-6*::DsRed2, *odr-2*::CFP), hdIs29 verwendet. Die Kontrolle hat folgende Werte: PVQ: 14,3%, PVP: 12,2%.

	Motorneurone									Defekte Tiere gesamt	n =
	DA2/DB3 r	DA3 l	DB4 l	DA4 l	DB5 l	DA5 l	DB6 r	DA6 l	DB7 r		
WT (*unc-129*::CFP)	0	0	0	0	0.3	0	0	1,0	0	**1,3**	308
syg-1 *(hd18)*	7,1	1,0	0,3	0	0,6	0,6	0,6	0	0,6	**10,0****	310
wrk-1 *(hd45)*	0,8	1,6	0,3	0,3	4,4	0,8	0,5	0	0	**8,8****	365
ncam-1 *(hd49)*	0	1,7	0	0	0	0	3,5	1,7	0,9	**6,1***	114
rig-4 *(hd47)*	0,3	1,4	0,9	0,3	0,3	0	0,9	0	0	**4,0**	348
syg-1 *(hd18)*; ***rig-4*** *(hd47)*	14,4	0,8	1,2	0	0	0	1,2	0,4	0,4	**18,5****	243
syg-1 *(hd18);* ***wrk-1*** *(hd45)*	11,2	4,6	0	1,0	1,5	0	0,5	0,5	0	**19,3****	197
rig-4 *(hd47)****;*** ***wrk-1*** *(hd45)*	0	3,4	0,5	0	1,4	0	0	0	0	**5,3***	208

Tab. 2.9: Analyse der DA/DB Motorneuron-Kommissuren.
Angaben in %, **r**: in Wildtyp rechts verlaufend, **l**: in Wildtyp links verlaufend, * $p<0.05$, ** $p<0.01$

	Defekte am RVG	Überkreuzung Ventralstrang	Defaszikulierung	Defekte Tiere gesamt	n =
WT (*glr-1*::YFP)	1,0	7,0	0	**8,0**	100
rig-1 *(hd15)*	23,7	17,5	0	**41,2****	114
rig-5 *(hd48)*	10,2	10,9	7,3	**28,5****	137
lad-2 *(hd31)*	16,2	11,6	0	**27,8****	198
wrk-1 *(hd45)*	7,6	12,3	4,1	**23,9****	171
syg-1 *(hd18)*	17,3	5,4	0	**22,7***	75
rig-3 *(hd51)*	10,8	7,9	2,9	**21,6****	139

Tab. 2.10: Überkreuzungs- und Defaszikulierungsdefekte in *glr-1*::YFP exprimierenden Interneuronen. RVG: Retrovesikular-Ganglion, Angaben in %, * $p<0.05$, ** $p<0.01$.

	Überkreuzung L → R	Überkreuzung R → L	mehrere Überkreuzungen	Defaszikulierung	Defekte Tiere gesamt	n =
WT (F25B3.3::GFP)	6,2	2,8	0	0	**9,0**	177
wrk-1 *(hd46)*	27,8	3,7	11,1	11,1	**51,8****	54
wrk-1 *(hd45)*	19,4	11,1	11,1	0	**41,7****	72
rig-5 *(hd48)*	10,8	6,6	2,5	0,9	**20,8****	212

Tab. 2.11: Überkreuzungs- und Defaszikulierungsdefekte mit dem panneuronalen Marker F25B3.3::GFP. L→R bzw R→L: Überkreuzung vom linken Axonbündel des Ventralstranges ins rechte Axonbündel bzw. umgekehrt. Angaben in %, * $p<0.05$, ** $p<0.01$.

	PVQL defekt	PVQR defekt	AVG defekt	PVPR defekt	PVPL defekt	PVQ gesamt	PVP gesamt	n =
WT *(hdIs26)*	26,5	1,0	1,0	21,4	1,0	**27,3**	**22,4**	98
wrk-1 *(hd46)*	52,4	8,4	2,4	51,2	5,9	**60,7****	**55,9****	84
wrk-1 *(hd45)*	44,4	3,8	4,5	36,8	3,8	**57,1****	**55,6****	33

Tab. 2.12: Überkreuzungsdefekte von PVQ und PVP sowie AVG. PVQL und PVPR verlaufen in WT im linken Axonbündel des Ventralstranges, PVQR und PVPL im rechten. Wenn PVQL/PVQR defekt ist, verläuft es ein kurzes Stück oder auch gänzlich im kontralateralen Axonbündel des Ventralstranges, meistens zusammen mit PVPR. Angaben in %, * $p<0.05$, ** $p<0.01$.

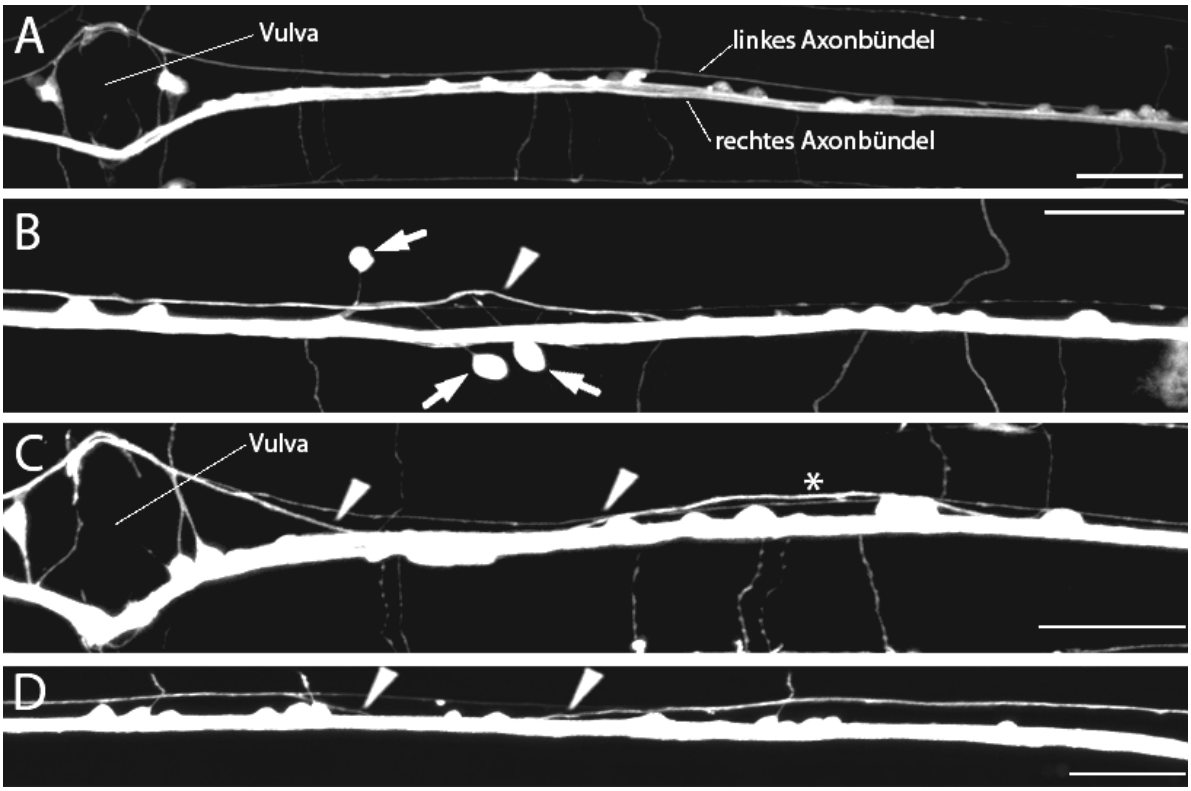


Abb. 2.20: Defekte mit dem panneuronalen Marker F25B3.3::GFP. Bild **A** zeigt einen Abschnitt des Ventralstranges. Das linke Bündel besteht aus 4 Axonen, das rechte aus mehr als 40. Entlang des Ventralstranges sind Zellkörper von Motorneuronen zu sehen. Bild **B** zeigt *wrk-1*(*hd46*). Axone wechseln in das rechte Bündel (Dreieck). Motorneurone posterior der Vulva befinden sich oft an falschen Positionen seitlich des Ventralstranges (Pfeile). In *wrk-1*(*hd46*) ist Defaszikulierung zu beobachten (**C**, *). Im Gegensatz zu *wrk-1*, wo die Überkreuzung bevorzugt posterior der Vulva zu sehen ist, findet sie in *rig-5*(*hd48*) verteilt über den Ventralstrang statt (Bild **D**, Dreiecke zeigen Überkreuzungen anterior der Vulva). Balken 20µm.

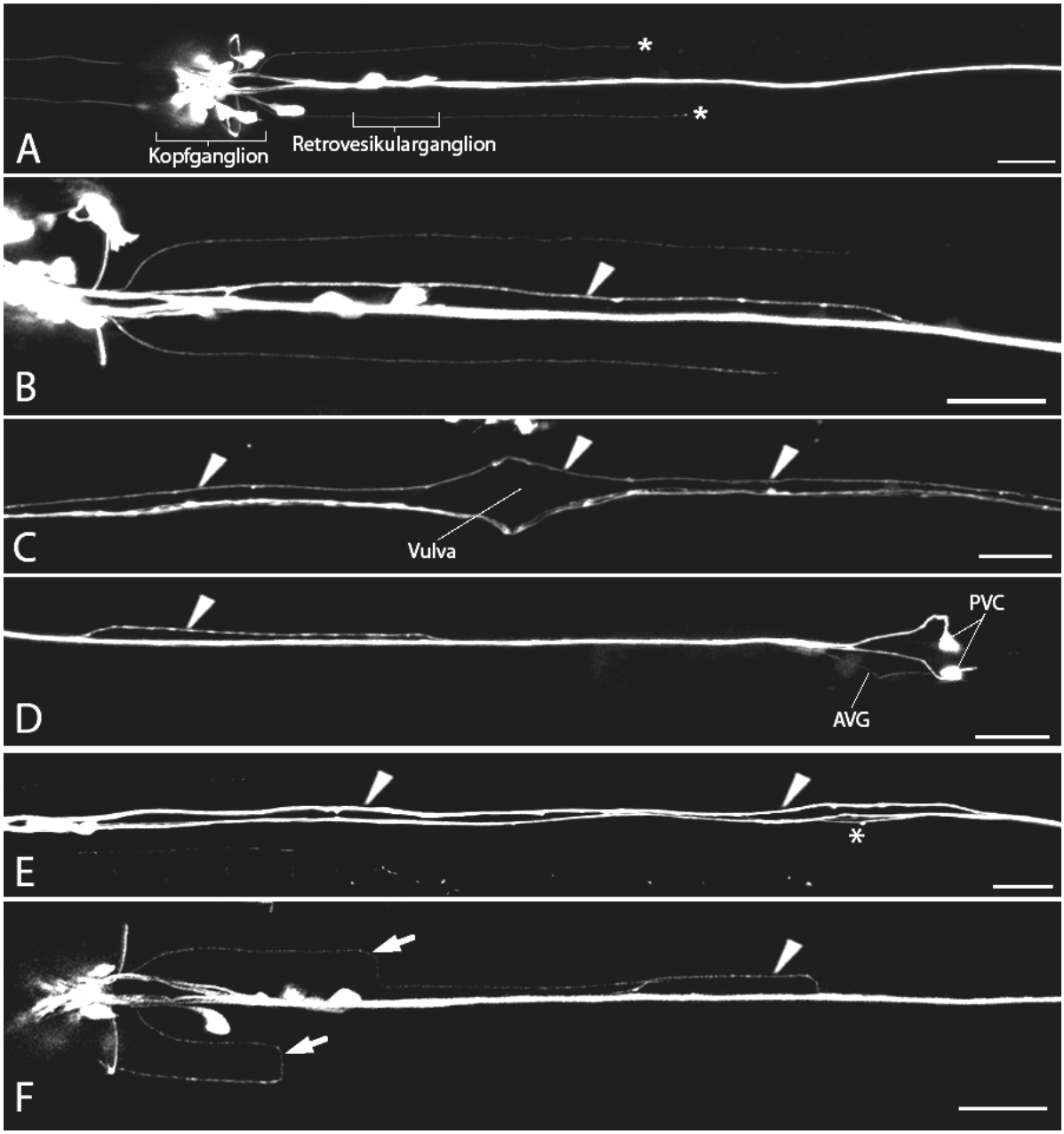


Abb. 2.21: Defekte mit dem Marker *glr-1*::YFP. Im WT (**A**) verlaufen Interneurone im rechten Axonbündel des Ventralstranges und zwei Axone verlaufen sublateral links und rechts parallel zum Ventralstranges (*****). **B** zeigt ein Beispiel (*rig-5,*(*hd48*)) für eine Überkreuzung am Retrovesikularganglion, wie sie in *rig-1*(*hd15*), *syg-1* (*hd18*), und weniger oft in *rig-3* (*hd51*), *lad-2* (*hd31*), und *wrk-1* (*hd45*) vorkommt (Dreieck). Dabei ist zu beachten, dass einige Axone, die links aus dem Nervenring austreten und in den rechten Strang kreuzen sollten, im linken Strang bleiben. **C** zeigt *rig-1 (hd15)* wo ein oder zwei Axone ständig im linken Bündel des Ventralstranges verlaufen (Dreiecke). Überkreuzung kommt auch posterior der Vulva vor (**D**, *rig-5* (*hd48*), Dreieck). Mehrfaches Wechseln einzelner oder mehrerer Axone zwischen den Axonbündeln des Ventralstranges ist selten (**E**, *wrk-1* (*hd45*), Dreiecke) und wurde in der Auswertung nicht extra berücksichtigt. Defaszikulierung ist nur in *rig-5*(*hd48*) ein statistisch signifikantes Ereignis (**E** (*)). *Lad-2* (*hd31*) zeigt neben Überkreuzungsdefekten (**F**, Dreieck), Defekte der beiden sublateralen Axone (Pfeile). Balken 20µm.

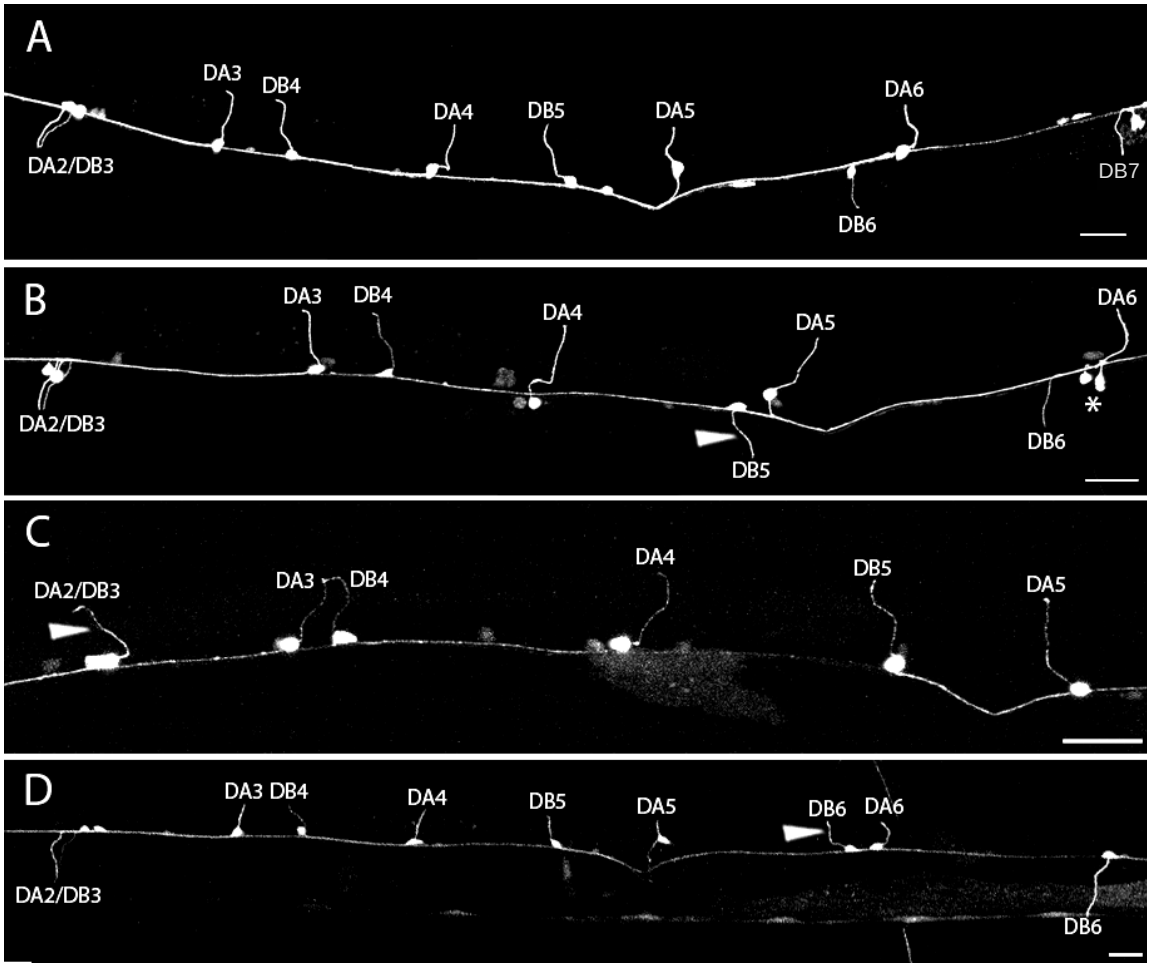


Abb. 2.22: Auswachsdefekte mit dem Marker *unc-129*::CFP. Die Kommissuren der Motorneurone (hier die exzitatorischen Motorneurone DA/DB) wachsen reproduzierbar auf der gleichen Seite Richtung Dorsalstrang (Bild **A**: WT). Die Kommissur des DB5 Motorneurons wächst in *wrk-1* (*hd45*) häufig auf der falschen Seite (**B**, Dreieck) In *wrk-1* (*hd45*) ist außerdem die Position von Motorneuronzellkörpern posterior der Vulva gestört *. In *syg-1* (*hd18*) sind meistens die Kommissuren der DA2/DB3 Motorneurone betroffen (**C**, Dreieck), In *ncam-1*(*hd49*) ist es die Kommissur von DB6, die, bezogen auf die andern Kommissuren am häufigsten betroffen ist (**D**, Dreieck). Balken 20µm.

4.1.12 Analyse von Doppelmutanten

Einige IgCAMs haben ein teilweise überlappendes Expressionsmuster. Daraus ergibt sich die Frage, ob diese IgCAMs zusammen oder unabhängig voneinander agieren. Es wurden Doppelmutanten hergestellt, um zu untersuchen, ob sich Defekte verstärken, addieren oder ob qualitativ andere Defekte auftreten. Folgende Doppelmutanten wurden hergestellt: ***syg-1***(*hd18*)/***rig-4***(*hd47*), ***syg-1***(*hd18*)/***wrk-1***(*hd45*), ***wrk-1***(*hd45*)/***rig-4***(*hd47*), ***rig-1***(*hd15*)/***rig-3***(*hd51*). Außerdem wurde eine Doppelmutante mit ***cdh-1***(*hd44*) und ***rig-3***(*hd51*) erzeugt.

Cdh-1 ist wie *rig-3* in AVA Interneuronen exprimiert und gehört zur Familie der Cadherine, die ebenfalls Zelladhäsionsmoleküle sind.

Alle Doppelmutanten außer *rig-3*/*cdh-1* wurden mit dem Marker *glr-1*::YFP analysiert. Die Defekte blieben, verglichen mit den Einzelmutanten, qualitativ und quantitativ gleich. Es wurden die Defekte wieder gefunden, die der Einzelmutante mit den stärkeren Defekten entsprachen (*wrk-1/rig-4*, *wrk-1/syg-1* und *rig-1*/*rig-3*). Das würde auf eine Interaktion hindeuten (nicht additiv = gemeinsame Funktion), allerdings hat *rig-4* alleine gar keine Defekte und auch in der *syg-1* Einzelmutanten sind die Defekte zwar signifikant aber doch sehr schwach, so dass eher davon auszugehen ist, dass die *wrk-1* Defekte wieder gefunden werden. Die geringern Defekte in (*syg-1/rig-4*) könnten allerdings auf eine Interaktion an der noch ein weiterer Faktor beteiligt sein müsste, hinweisen (siehe Disskussion 3.3). *Rig-1*/*rig-3* und *rig-3*/*cdh-1* wurden mit dem panneuronalen Marker F25B3.3::GFP analysiert. Für die Doppelmutante *rig-3/cdh-1* konnten, wie auch für *rig-3* alleine im Vergleich zu WT, keine Defekte festgestellt werden. *Rig-1* zeigt mit dem panneuronalen Marker zwar Defekte, aber nicht statistisch signifikant. *Rig-3* zeigt gar keine Defekte mit diesem Marker. Im Doppel zeigen 26% der Tiere Defekte, was einen statistisch sehr signifikanten Unterschied ($p < 0,01$) verglichen mit WT darstellt. Mit den Markern *sra-6* und *odr-2* wurden alle Doppelmutanten untersucht. Dabei zeigten nur *wrk-1*/*syg-1* signifikante Defekte, die denen von *wrk-1* als Einzelmutante entsprechen. *Wrk-1/rig-4* zeigte für PVQ schwach signifikante Defekte und für PVP gerade nicht signifikante Defekte.

Die Doppelmutanten mit *wrk-1* und *syg-1* wurden auch darauf hin analysiert, ob die Kommissuren der DA/DB Motorneurone auf der richtigen Seite auswachsen. Dabei stellte sich heraus, dass in *syg-1/rig-4* und *syg-1/wrk-1* die DA2/DB3 Kommissuren häufig auf der falschen Seite auswachsen, eine Tendenz, die auch in *syg-1* etwas abgeschwächt zu beobachten ist. Interessant ist, dass die Fehlerhäufigkeit von DB5, die in *wrk-1* tendenziell am höchsten ist, abnimmt so dass hier auf eine Interaktion mit wahrscheinlich weiteren Interaktionspartner geschlossen werden könnte.

III. DISKUSSION

1. Funktionelle Analyse der IgCAMs in *C. elegans*

Die vollständige Sequenzierung der Genome einiger Modellorganismen sowie des Menschen zeigt auf Gen- bzw. Proteinebene, welche Gemeinsamkeiten und auch Unterschiede in den einzelnen Organismen vorliegen. In *C. elegans* gibt es eine Expansion an Kollagengenen, wie sie bis heute für keinen anderen Organismus bekannt ist. Die hohe Zahl an kutikulären Kollagenen korreliert mit dem unterschiedlichen Aufbau der Kutikula, dem „Exoskelett" von *C. elegans*, in den verschiedenen Larvenstadien. Oft ist der funktionale Zusammenhang aber nicht so eindeutig und offensichtlich. Zur Funktion der in *C. elegans* ebenfalls stark expandierten Astacine und Proteine mit einer C-Typ-Lektin ähnlichen Domäne ist noch kaum etwas bekannt (Drickamer and Dodd 1999; Möhrlen et al. 2003) Die Neuerungen und Entwicklungen in höheren bzw. komplexeren Organismen spiegeln sich ebenfalls in Genomanalysen wider. Das gesamte Gen-Repertoir für die Entwicklung und Funktion des Gefäßsystems scheint erst in der Vertebratenlinie evolviert zu sein. In Invertebraten fehlen neben anderen Elastin, der von Willbrand Faktor und Selektine (Hynes and Zhao 2000).

Neben diesen Unterschieden zwischen einfachen und komplexen Organismen gibt es auch erstaunliche Gemeinsamkeiten. Das Gen-Repertoir, welches für die Entwicklung des Nervensystems notwendig ist, ist zwar den komplexeren Bedingungen in höher entwickelten Organismen angepasst, aber vor allem Mitglieder der IgCAM Genfamilie zeigen von *C.elegans* bis zu den Vertebraten eine erstaunliche Konservierung. IgCAMs gehören zur Immunglobulin-Superfamilie (IgSF), die während der Evolution stark expandiert ist und zu einer der größten im Vertebratengenom zählt: (Barclay, 2003) das menschliche Genom enthält zehn Mal mehr IgSF Proteine als *C. elegans* (865: 80) (Drickamer and Dodd 1999; Thiery 2003; Vogel et al. 2003) und *D. melanogaster* immerhin noch ca. doppelt so viele (153) (Kamiguchi and Lemmon 2000) wie *C. elegans*. Die Ig-Domäne ist der Grundbaustein aller Mitglieder der IgSF. Ihre Struktur ist ideal um ein großes Spektrum an möglichen Protein-Protein Interaktionen zu ermöglichen (Vaughn and Bjorkman 1996) Das wiederum ist die Basis für die Entstehung einer Vielzahl von Zelloberflächenrezeptoren, Zelladhäsionsmolekülen und vor allem Molekülen des Immunsystems. Die starke Expansion von Proteinen mit Ig-Domänen in Vertebraten ist hauptsächlich auf die Verwendung dieser Domäne im Immunsystem zurück zu führen. Damit ist diese Funktion im Immunsystem aber

auch noch relativ jung. Ihre ursprüngliche Funktion haben Proteine mit Ig-Domäne bei der Entwicklung und Aufrechterhaltung der Anatomie und Morphologie bestimmter Gewebetype durch Zelladhäsion (Edelman 1987). Die IgCAMs erfüllen durch ihre Struktur die Voraussetzungen für eine Rolle bei der axonalen Zielfindung. Durch die Aneinanderreihung vieler Ig- und Fibronektin III Domänen reicht das Molekül weit in den extrazellulären Raum und ermöglicht bzw. erleichtert so die Interaktion mit Liganden und Signalen in optimaler Weise. Außerdem können IgCAMs mittels der zytoplasmatischen Domänen auch der Signalweiterleitung ins Zellinnere dienen oder direkt mit dem Zytoskelett interagieren, wie es z.B. für L1, welches über Ankyrin an Spectrin bindet, gezeigt ist (Bennett and Chen 2001). Die IgCAMs sind eine evolutiv alte Unterfamilie der IgSF, die erstaunlich starke Konservierung nicht nur der Sequenz sondern auch der Funktion aufweist: SAX-3, UNC-5 und auch UNC-40 sind über die Artgrenze hinaus wichtige Moleküle der axonalen Zielfindung. Außerdem sind die IgCAMs in komplexeren Organismen expandiert: dem einzigen Robo Homolog in *C. elegans* (SAX-3) stehen drei Robos in *D. melanogaster* und vier in Vertebraten gegenüber. UNC-5 stehen ebenfalls vier Homologe in Vertebraten gegenüber. Einer Vielzahl von IgCAMs in Vertebraten mit teilweise redundanter Funktion steht damit eine kleine, gut überschaubare Gruppe von 17 IgCAMs (inklusive UNC-5) in *C. elegans* gegenüber. Die geringe Zahl von IgCAMs in *C. elegans* erlaubt eine umfassende und vollständige *in vivo* Analyse dieser Unterfamilie der IgSF und zeigt den Wert der Sequenzierung von Genomen auf.

Viel Wissen zu IgCAMs stammt aus *in vitro* Analysen oder aus Analysen einzelner Gewebetypen, wie z.B. der Retina (siehe folgende Artikel und darin enthaltene Referenzen Kamiguchi and Lemmon 2000 Rutishauser, 2000 #250; Avci et al. 2004). In *C. elegans* ist es möglich, die Expression von IgCAMs in Bezug zum ganzen Organismus zu untersuchen. Davon ausgehend können funktionale Analysen einzelner Gewebe folgen. Durch die hohe funktionelle Konservierung der IgCAMs während der Evolution besteht die Möglichkeit, in einer ersten Annäherung Ergebnisse aus *C. elegans* auf komplexere Organismen zu übertragen.

2. Die Expression der IgCAMs im Vergleich

Das zielgerichtete axonale Auswachsen ist ein räumlich und zeitlich hoch spezifizierter Prozess. Die Expression einzelner IgCAMs wird nicht nur in einzelnen Phasen des axonalen Auswachsens verstärkt oder vermindert, sondern kann auch entlang des Axons dynamisch

reguliert werden (Dodd and Jessell 1988). So kann das zeitliche und räumliche Muster schon erste Hinweise auf den Prozess geben, in den ein spezielles IgCAM involviert ist. Das zielgerichtete Auswachsen von Axonen in *C. elegan*s beginnt gegen Ende des 1,5-fach Stadiums des Embryos, so dass eine Expression von darin involvierten IgCAMs ab diesem Zeitpunkt zu erkennen sein sollte. Insgesamt zeigen die IgCAMs in *C. elegans* eine Expression, die meist nicht auf einen Gewebetyp beschränkt ist und oft schon zum Zeitpunkt des Auswachsens von Axonen zu erkennen ist. Zusammenfassend ist fest zu halten, dass die Expression der meisten IgCAMs im Verlauf der Entwicklung tendenziell zunimmt. In Bezug auf einzelne IgCAMs bzw. einzelne Gewebetypen ist auch das Gegenteil der Fall. Die differenzierte Analyse der einzelnen IgCAMs ergab ein dynamisches Expressionsmuster. In *rig-4*, *rig-6b/d* und *wrk-1* nimmt z.B. die Expression in Motorneuronen im adulten Tier stark ab.

Vergleicht man die Expressionsmuster, so ergeben sich vielfältige Überschneidungen, die die Ausstattung verschiedener Gewebetypen mit unterschiedlichen Zelloberflächenmolekülen widerspiegeln. Das ist in Übereinstimmung mit dem Wissen über IgCAMs, die in unterschiedlichen Kombinationen in vielfältiger Weise interagieren können (siehe Übersichtsarktikel Walsh and Doherty 1997; Kamiguchi and Lemmon 2000; Brummendorf and Lemmon 2001; Rougon and Hobert 2003). Die vielfältigen Kombinationsmöglichkeiten bilden die Grundlage für zielgerichtetes axonales Auswachsen und andere Entwicklungsprozesse, bei denen differenzielle Adhäsion wichtig ist. Durch die Kombination des relativ kleinen Sets an IgCAMs können weitere unterschiedliche Signale erzeugt werden, die neben anderen Molekülen notwendig sind, um das zwar nur aus 302 Neuronen aber durch Unterscheidung in 118 Klassen doch sehr komplexe und heterogene Nervensystem von *C. elegans* zu etablieren.

2.1 Expression von IgCAMs in Motorneuronen

Sieben der analysierten IgCAMs, *rig-4*, *rig-6*, *ncam-1*, *wrk-1*, *syg-1*, *syg-2* und *lad-2* werden in Motorneuronen entlang des Ventralstranges exprimiert. Die Expression von *rig-4* und *wrk-1* in Motorneuronzellkörpern zeigt eine auffallende Abnahme der Expressionsstärke von posterior nach anterior in den einzelnen Motorneuronen. Dabei nimmt die Expression in den Motorneuronzellkörpern besonders ab der Vulva Richtung Kopf schnell ab. Die Expression von beiden Genen ist in Motorneuronen insgesamt nicht stark und vor allem am Ende der Embryonalentwicklung und in den frühen Larvenstadien zu sehen. Bei den Motorneuronen, die *rig-4* exprimieren, handelt es sich neben einzelnen DD oder VD Motorneuronen um DA

Motorneurone. In *wrk-1*, wo die Kommissuren nicht zu erkennen sind, ist eine Zuordnung schwierig, es handelt sich wahrscheinlich auch um die DA oder DB Motorneurone.
Motorneurone senden Axone entlang des Ventralstranges aus. Dazu können sie allgemeine, den Ventralstrang spezifizierende Signale, benutzen. Viel komplexer erscheint es, die Anordnung individueller Motorneuronzellkörper auf definierten Positionen entlang des Ventralstranges zu etablieren. Die in Motorneuronen von posterior nach anterior abnehmende Expression von *wrk-1* und *rig-4* könnte bei der Positionierung der Motorneurone entlang des Ventralstranges eine Rolle spielen, oder zumindest die Identität von Motorneuronen anterior bzw. posterior der Vulva festlegen.
Zusätzlich zu *rig-4* und *wrk-1* sind drei weitere IgCAMs in DA Motorneuronen und verschiedenen anderen Motorneuronklassen exprimiert: *ncam-1*, *rig-6* und *syg-1*. Die Expression von *syg-1* in Motorneuronen ist insgesamt sehr schwach. *Syg-1* ist wahrscheinlich in DA, VA und AS Motorneurone entlang des gesamten Ventralstranges exprimiert. Anterior der Vulva zeigen zusätzlich DB Motorneurone Expression. Das unterschiedliche Repertoir an IgCAMs spricht dafür, dass verschiedene Motorneurone durch Expression von unterschiedlichen Rezeptormolekülen entweder ihre eigene Orientierung (zellautonom) oder die von umgebenden Zellen bzw. Axonen definieren. Damit könnte wie auch bei *rig-4* und *wrk-1* eine grobe Untergliederung in Motorneurone, die anterior der Vulva und solche die sich posterior befinden, ermöglicht werden. Die Voraussetzung für ein spezifisches Rezeptor Repertoir ist die Spezifizierung der unterschiedlichen Identität der Motorneurone. In *C. elegans* wie auch in *D. melanogaster* und auch der Maus sind dabei Homeodomänenproteine von Bedeutung. Vor allem das *even-skipped* (*Eve*) Homolog (*vab-7* in *C.elegans*) spielt eine Rolle bei der Spezifizierung verschiedener Zellschicksale, in dem es eine Klasse von Motorneuronen daran hindert, die Identität einer anderen Klasse anzunehmen. Die gemeinsame Funktion der *Eve* Homologen ist die Unterdrückung eines weiteren Homeodomänenproteins in einer der beiden Motorneuronklassen. In *C. elegans* verhindert *vab-7* die Expression des DA Motorneuron-spezifischen Gens *unc-4* in DB Motorneuronen (Esmaeili et al. 2002).
Nur in *ncam-1* ist die Expression in DA Motorneuronen so stark, dass die Kommissuren gut zu erkennen sind. Allerdings unterscheiden sich die Spleißvariante: *ncam-1a/b* exprimiert stark und gleichmäßig und *ncam-1c* etwas schwächer. Vergleicht man das Expressionsmuster von *ncam-1* mit dem Homolog NCAM in der Maus bzw. Huhn, welches im gesamten Zentralen Nervensstem bzw. auch im periferen Nervensysem exprimiert ist (siehe Übersichtsarktikel) (Brümmendorf 1995), ist zwar vor allem die Spleißvarinate *ncam-1c* auch

in vielen Teilen des Nervensystems exprimiert. Es fehlen aber die meisten Interneurone im Ventralstrang und auch sensorische Neurone. Im Vergleich mit einem panneuronalen Marker wird die auf Teile des Nervensystems beschränkte Expression noch einmal deutlicher, so dass nicht von einer panneuronalen Expression gesprochen werden kann. *Ncam-1* ist auch noch in weiteren Motorneuronen exprimiert, die entweder keine Kommissuren ausbilden (z.B. AS oder VC Motorneurone) oder die Expression ist aufgrund der Expressionsstärke nur in den Zellkörpern sichtbar. Da die Expression erst im Larvenstadium einsetzt, ist von einer Funktion während der Entwicklung bzw. während des Auswachsens von Axonen eher abzusehen und von einer Adhäsionsfunktion im Komplex mit anderen Molekülen auszugehen, wie es auch für das Vertebraten- Homolog NCAM der Fall ist (Crossin 2000).
Eine sehr deutliche Expression in Motorneuronzellkörpern und schwache Expression in Kommissuren ist bei *rig-6* zu beobachten. Vergleicht man die Expression der Promotoren der Spleißvarianten *rig-6a* und *rig-6b/d*, ist in letzterer die Expression auf die DD Motorneurone beschränkt, die im adulten Tier stark abnimmt. Durch differenzielles Spleißen wird die funktionelle Vielfalt der IgCAMs erhöht. Allerdings bleibt die Zahl der Spleißvarianten in *C.elegans* (meist zwei bis vier Spleißvarianten) verglichen mit DSCAM aus *D. melanogaster* (ca. 38 000 mögliche Spleißvarianten) überschaubar (Wojtowicz et al. 2004).
In *syg-2* dominiert zwar die Expression in Muskelzellen und in Vulvaepithelzellen, aber während der Embryonalphase ist eindeutig Expression in Motorneuronen zu erkennen, so dass neben anderem auch eine Funktion von *syg-2* während der axonalen Wegfindung von Motorneuronaxonen plausibel erscheint. *Lad-2* zeigt Expression in wenigen Motorneuronen (vor allem DB6 und DB7) ausschließlich während der Embryonalphase, so dass in Bezug auf die Funktion zielgerichtetes Auswachsen, aber vor allem auch die Positionierung der Zellkörper, möglich ist.

2.2 Expression von IgCAMs in Interneuronen

Für sechs IgCAMs wurde Expression in einzelnen bzw. einigen Interneuronen mit Axonen im Ventralstrang gefunden: *rig-1*, *rig-3*, *rig-5*, *rig-6*, *ncam-1* und *syg-2*.
Der Ventralstrang besteht aus zwei Axonbündeln, eines mit mehr als 40 Axonen auf der rechten Seite und eines mit vier Axonen auf der linken Seite. Das erste Axon, welches im rechten Bündel während der Entwicklung auswächst, ist AVG, dessen Zellkörper im Retrovesikularganglion lokalisiert ist. Dem AVG Axon folgen dann Motorneuron- und weitere Interneuronaxone. Im linken Bündel wächst das PVPR Axon, dessen Zellkörper im Preanalganglion liegt, als erstes aus (Durbin 1987). Die meisten Interneuronaxone wachsen

im Nervenring aus und verlaufen von dort in den Ventralstrang. Ihre Zellkörper sind meist symmetrisch im Kopfganglion angeordnet. Die Asymmetrie des Ventralstranges entsteht erst, wenn die Axone den Nervenring verlassen. Dabei kreuzen die meisten Axone in den rechten Strang. Das heißt, in dem Bereich nach dem Verlassen des Nervenrings und vor dem Retrovesikularganglion müssen dem Axon Signale zur Verfügung stehen, die die Etablierung des asymmetrischen Ventralstranges bedingen.

Im weiteren Verlauf müssen Axone dann nur noch im richtigen Strang weiter wachsen. Dazu verwenden sie unterschiedliche Kombinationen an extrazellulären Signalen und Adhäsion an spezifische, früh ausgewachsene Axone (Hutter 2003).

Drei IgCAMs zeigen Expression in mehreren Interneuronaxonen: *rig-1*, *rig-5* und *rig-6a*. Die Expression der Interneurone in *rig-1* nimmt im Laufe der Entwicklung bis zum adulten Tier zu. Im Embryo ist nur Expression in den PVC Interneuronen mit Zellkörper im Lumbarganglion im Schwanz eindeutig zu erkennen. Auch im L1 Larvenstadium ist die Interneuronexpression noch schwach, so dass nicht von einer Funktion von *rig-1* während der Entwicklung ausgegangen werden kann. Vielmehr deutet die Expression auf eine Adhäsionsfunktion im adulten Tier hin. Die exprimierenden Interneurone entsprechen teilweise den Interneuronen in denen auch *glr-1* exprimiert wird. Eine genaue Identifikation der Neurone war aber im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich.

Die Interneuronexpression von *rig-5* bezieht sich ausschließlich auf die Verwendung des vierten Intron von *rig-5* als Promotor und ist erst nach dem Auswachsen der Axone deutlich zu sehen. Selten exprimieren ein oder zwei Axone auch im linken Bündel des Ventralstranges. Der 5`- Bereich von *rig-5* resultiert in der Expression in RMD Neuronen. Auch die Expression von *rig-6a* ist, neben Interneuronen im rechten Axonbündel, selten in Axonen im linken Axonbündel des Ventralstranges zu sehen, allerdings erst nach dem Auswachsen der Axone.

Die folgenden IgCAMs exprimieren jeweils nur in einem Interneurontyp: *Rig-3* (AVA), *ncam-1* (AVG) und *syg-2* (PVT).

Die Expression von IgCAMs in Interneuronen kann aufgrund ihres späten Einsetzens während der Entwicklung nur eine Funktion im ausgebildeten Nervensystem erfüllen. Das kann entweder die Aufrechterhaltung der Axonbündelung mittels Adhäsion sein, aber auch die Spezifikation von Synapsen. Fertig ausgebildete Axone sind mit einer Vielzahl von möglichen synaptischen Partner konfrontiert und nur spezifische Rezeptor-Ligand Interaktionen führen zu einer spezifischen Verschaltung.

Für IgCAMs die nur in einzelnen Neuronentypen exprimiert sind, ist eher eine Funktion bei der Spezifizierung von synaptischen Kontakten vorstellbar, solche die in mehreren Axonen exprimiert sind, spielen voraussichtlich eher eine Rolle bei der Bündelung von Axonen durch homophile oder auch heterophile IgCAM Interaktionen im Ventralstrang. Allerdings können auch IgCAMs, die nur auf einzelnen Axonen exprimiert sind, eine adhäsive Wirkung ausüben. In *rig-3* wurde die Anordnung der Synapsen der VD und DD Motorneurone analysiert. Es konnten jedoch keine Veränderungen festgestellt werden.

2.3 Expression von IgCAMs in anderen Neuronen

Neben der Expression einzelner IgCAMs in einzelnen Neuronen wie PDA, PHA, PHC, PVC, RMD, RMED, SDQ, URX, URY und Pharnxneuronen, sind in den folgenden Neuronen mindestens zwei IgCAMs exprimiert: ALN, PLN, CAN und NSM. ALN und PLN bilden Synapsen mit SMB, SAA und SMD. In *lad-2* exprimiert auch SMB sowie SMD, so dass es möglich ist, dass *lad-2* über homophile Interaktionen die Synapsenbildung und Stabilisierung zwischen ALN, PLN und SMB und SMD vermittelt. Die zelluläre Lokalisation mit Hilfe von translationellen Gen-GFP Fusionsreportern könnte darüber Aufschluss geben, wo genau *lad-2* seinen Funktionsort hat. Aber auch *syg-2* ist in ALN und PLN exprimiert und *rig-6b/d* in ALN alleine, so dass auch Kontakte über heterophile Interaktionen zustande kommen können. CAN Neurone, die für das Überleben von *C. elegans* notwendig sind, zeigen Expression von *rig-6b/d* und *icam-1*. Sie verlaufen zusammen mit ALA und PVD entlang des exkretorischen Kanals (White et al. 1986). Die NSM Neurone exprimieren *rig-3*, *rig-5*, *rig-6b/d*, und *ncam-1a/b*. Zur Klärung von reduntanten Funktionen von IgCAMs, die in ein und demselben Neuronentyp exprimiert werden, können Doppelmutantenanalysen in Zukunft Aufschluss geben.

2.4 Expression von IgCAMs in nicht- neuronalem Gewebe

Die Expression der IgCAMs beschränkt sich meist nicht auf neuronales Gewebe. Nur *rig-3*, *rig-6b/d*, und *lad-2* sind ausschließlich neuronal exprimiert. Prinzipiell ist davon auszugehen, dass IgCAMs durch ihre Struktur auch in anderen Geweben eine Rolle bei der Zelladhäsion und auch bei der Signalaufnahme und Weiterleitung spielen. Viele IgCAMs sind im Pharynx exprimiert (*rig-1*, *rig-4*, *ncam-1c*, *icam-1*, *icam-2* (schwach), *icam-3*, *wrk-1* (schwach)). Des Weiteren sind einige IgCAMs in der Hypodermis bzw. den Saumzellen (*rig-1*, *rig-4*, *rig-6a*, *icam-1*, *icam-2* und *icam-3*), in Muskel (*rig-4* (wenig), *rig-6a*, *syg-1* und *syg-2*), in der Vulva

(*rig-1*, *rig-4*, *rig-6*, *syg-2* und *icam-3*), im Darm (*rig-4*, *rig-5*, *ncam-1a/b*, *wrk-1*, *icam-1*, und *lad-2*) und in der Spermathek (*rig-6b/d*, *lad-2* und *icam-3*) exprimiert. Daraus ergibt sich eine Vielzahl an möglichen Interaktionen zwischen den Geweben. Für die Hypodermis ist wahrscheinlich vor allem Zelladhäsion von Bedeutung. Die Hypodermis bildet für viele Axone eine Oberfläche auf der sie auswachsen können. Die Expression in Muskeln kann einerseits der Adhäsion aber auch dem Auswachsen der Muskelfortsätze, die am Ventralstrang inserieren, dienen. Die Expression von wenigen IgCAMs in der Spermathek könnte einerseits der Interaktion von Ei und Spermium dienen oder aber auch nur der Adhäsion der Spermathek im Gewebeverband des Uterus bzw. der Gonade.
Im Zusammenhang mit dem Nervensystem stellt sich aber insbesondere die Frage, ob z.B. auf Muskeln oder in anderem Gewebe wie der Vulva exprimierte IgCAMs zur Etablierung von synaptischen Kontakten wichtig sind, wie es für das Interaktionspaar *syg-1/2* in *C. elegans* gezeigt wurde (Shen and Bargmann 2003; Shen 2004; Shen et al. 2004).
Vergleicht man die Lokalisation der IgCAMs mit den Homologen in anderen Organismen, fällt auf, dass sie zwar überwiegend neuronal exprimiert sind, aber wie auch in *C. elegans* nicht nur auf das Nervensystem beschränkt sind. Man findet Expression in der Lunge, dem Pankreas, im Herz, in Muskeln, im Darm, im Knochenmark und in anderen Geweben (siehe Übersichtsartikel Brümmendorf 1995).

3. Die IgCAM Deletionsmutanten

Für 10 von 13 IgCAMs wurde in dieser Arbeit eine Deletionsmutante isoliert. Die Sequenzanalyse der Deletionen lässt den Schluss zu, dass die meisten Deletionen zu einem Funktionsverlust des Genproduktes führen, da ein vorzeitiges Stopcodon im Leseraster entsteht bzw. die Transmembrandomäne fehlt. Nur ein Deletionen ist im Leseraster (*syg-2*), was wahrscheinlich zu teilweise funktionalem Protein führt. Die 10 IgCAM Deletionsmutanten können in solche mit Defekten im Nervensystem (*rig-1*, *rig-3*, *rig-5*, *ncam-1*, *wrk-1*, *syg-1* und *lad-2*) und solche ohne Defekte (*rig-4*, *icam-2*, *syg-2*) unterteilt werden. Erstere zeigen entweder nur Ventralstrangdefekte (*rig-1*, *rig-3*, *rig-5*, *lad-2*) oder zusätzlich Defekte der Kommissuren (*wrk-1*, *syg-1*). Nur Kommissurdefekte zeigt *ncam-1*. Weitere Defekte im Nervensystem zeigt *lad-2*.

3.1 Deletionsmutanten mit Ventralstrangdefekten

Im panneuronalen Marker zeigen nur *wrk-1* und *rig-5* signifikante Überkreuzungsdefekte im Ventralstrang. Der panneuronale Marker erlaubt im Ventralstrang vor allem aufgrund der zahlreichen Motorneuronzellkörper und Kommissuren nicht die Auflösung von einzelnen, fehlgeleiteten Axonen. Dazu eignen sich Marker, die nur eine bestimmte Klasse von Neuronen markieren. In *wrk-1* und *rig-5* kreuzen oft mehrere Axone in den kontralateralen Strang, wohingegen Überkreuzungen in *rig-1*, *rig-3*, und *syg-1* meist nur einzelne Axone betreffen, die im panneuronalen Marker nicht eindeutig zu erkennen sind. Daraus kann man schließen, dass es Signale gibt, die nur spezielle Axone betreffen und solche die generell wichtig zu sein scheinen für axonale Wegfindung im Ventralstrang oder zumindest mehrer Axone betreffen, wie *rig-5* und *wrk-1*. Auffallend ist, dass überkreuzende Axone in *wrk-1* und *rig-5* nicht immer gemeinsam gebündelt verlaufen, sondern defaszikuliert sind. Das deutet darauf hin, dass diese Axone die Adhäsion zueinander verloren haben, aber der anterior-posterior Achse noch folgen können.

Erstaunlich ist, dass *wrk-1* nicht in Interneuronen im Ventralstrang exprimiert ist, sondern nur in Motorneuronen. Diese Motorneurone könnten, da ihre Axone sehr früh auswachsen, mittels *wrk-1* als adhäsives Substrat und für später auswachsende Interneurone dienen und so zur Faszikulierung des Ventralstranges beitragen. Dadurch entsteht die Frage, welche Interaktionspartner auf den Interneuronaxonen das von *wrk-1* vermittelte Signal aufnehmen.

Die Wirkung von *wrk-1* auf Interneurone kann auch durch das Vorhandensein eines GPI Ankers erklärt werden. GPI Verankerungen können aktiv durch PI-PLC (Phosphatidylinositol spezifische Phospholipase C) von der Membran gelöst werden. *Wrk-1* muss dadurch nicht zwangsläufig an der Membran der exprimierenden Zelle verankert bleiben, sondern kann durch Diffusion an einem anderen Ort seine Funktion ausüben (siehe Einleitung 1.1.2.1). Damit könnte seine Wirkung eine allgemeine bei der axonalen Wegfindung oder der Aufrechterhaltung der Axonbündelung durch Adhäsion sein, die nicht auf einzelnen Axone beschränkt ist. Auch die *ZIG* Proteine, die aus zwei Ig-Domänen bestehen, sind sekretiert und spielen eine Rolle bei der Aufrechterhaltung der Bündelung von Axonen im Ventralstrang. Im Gegensatz zu *wrk-1* sind sie aber spezifisch im L1 Larvenstadium exprimiert. In L1 Stadium werden durch Zellteilung weitere Motorneurone in den Ventralstrang eingefügt. Dieser Prozess führt ohne spezifische Adhäsion der Axone zu Defaszikulierung des Ventralstranges (Aurelio et al. 2003). Ein weiterer Faktor der bei axonalen Wegfindung und bei der Aufrechterhaltung der Axonbündelung eine Rolle spielt, ist *EGL-15*. *EGL-15* ist das einzige

FGF-Rezeptor Homolog in *C. elegans*, welches in zwei Spleißvarianten vorkommt: *EGL-15(5A)* und *EGL-15(5B)*. Nur *EGL-15(5A)* hat eine Funktion bei der Aufrechterhaltung der Axonbündelung und betrifft vor allem PVP und PVQ Axone, die auch in *wrk-1* Defekte aufweisen. Die Aufrechterhaltung der Axonbündelung kann dabei ausschließlich von der extrazellulären Domäne von *EGL-15(5A)*, die zwei Ig-Domänen enthält, vermittelt werden (Bulow et al. 2004). Es ist bekannt, dass NCAM mit dem vertebraten FGF-Rezeptor interagiert um axonale Auswachsen und Zelladhäsion zu vermitteln (Kiselyov et al. 2003).
Allerdings treten in *wrk-1* Mutanten auch einzelne fehlplazierte Motorneuronzellkörper auf und zwar nur posterior der Vulva, was wiederum auf eine zellautonome Funktion, die auch mit der Expression in Motorneuronzellkörpern korreliert, hinweist.
Die Überkreuzungsdefekte von Interneuronen in *rig-5* im Ventralstrang sind in Übereinstimmung mit der Expression, so dass von einer zellautonomen Funktion ausgegangen werden kann. In *wrk*-1 und *rig-5* erfolgt die Überkreuzung tendenziell eher von links nach rechts, wobei diese Tendenz in *wrk-1* stärker ausgeprägt ist als in *rig-5*. Im linken Strang befinden sich genau vier Axone der folgenden Neurone: PVP, PVQ, AVK und HSN. In *wrk-1* konnte gezeigt werden, dass PVPR und PVQL, die im linken Axonbündel des Ventralstranges verlaufen, signifikante Defekte aufweisen. In *rig-5* konnten keine signifikanten Defekte der Axone von PVP und PVQ gefunden werden, was auf eine Fehlleitung bzw. ein Adhäsionsproblem der Axone von HSN und AVK hinweist.
Rig-1, *rig-3* und *syg-1* zeigen mit dem Interneuronmaker *glr-1*::GFP ektopische Überkreuzungen entlang des Ventralstranges. In *syg-1* findet man, verglichen mit dem Rest des Ventralstranges, die meisten Defekte zwischen dem Austreten der Axone aus dem Nervenring und dem RVG. Bei *rig-1* und *rig-3* ist kein bevorzugter Punkt der Überkreuzung feststellbar. In keiner der oben erwähnten Mutanten verlassen Axone den Ventralstrang und wachsen völlig orientierungslos aus, so dass davon ausgegangen werden kann, dass IgCAMs in der Feinpositionierung von Axonen eine Rolle spielen, aber das Fehlen einzelner IgCAMs nicht ausreicht um die Gesamtanatomie des Nervensystems zu beeinträchtigen. In *lad-2* findet man neben Überkreuzungsdefekten im Ventralstrang, dass zwei sublateral verlaufende Axone, die in WT parallel zum Ventralstrang von anterior nach posterior verlaufen und noch vor der Vulva enden, vollständig fehlgeleitet sind und oft jegliche Orientierung vermissen lassen. Da *lad-2* in PLN Neuronen exprimiert ist, welche ebenfalls sublateral verlaufen, ist anzunehmen, dass PLN bzw. die *lad-2* Expression in PLN an der Orientierung der beiden sublateralen Axone beteiligt ist.

3.2 Deletionsmutanten mit Kommissurdefekten

In allen Deletionsmutanten erreichen Kommissuren der DA und DB Motorneurone den Dorsalstrang in WT-Formation. Allerdings verlaufen Kommissuren in *wrk-1*, *syg-1* und *ncam-1* zum Teil statistisch signifikant auf der falschen Seite. Im WT wachsen Kommissuren individuell hoch reproduzierbar immer auf derselben Seite aus. In *wrk-1* ist hauptsächlich DB5 betroffen, in *syg-1* DA2/DB3 und in *ncam-1* DB6. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass einzelne Kommissuren jeweils unterschiedliche Signale benutzen, um auf der richtigen Seite auszuwachsen. *Wrk-1*, *syg-1* und *ncam-1* sind zwar in Motorneuronen exprimiert, allerdings ist unklar, wie sie dazu beitragen, dass Kommissuren auf einer bestimmten Seite auswachsen, da die Expression keine Seiten spezifischen Unterschiede erkennen lässt. Der molekulare Mechanismus, der zum Auswachsen von Kommissuren auf einer bestimmten Seite führt, ist noch nicht bekannt. Allerdings gibt es eine auffällige anatomische Korrelation zwischen der Position von DA Motorneuronen und der ventralen Hypodermis in Embryos. Letztere besteht aus sechs so genannten P-Zellen, die links-rechts paarig angeordnet sind. Die P-Zellen grenzen am Vorder- und Hinterende von *C. elegans* an die Körperhypodermis (hyp7). DA3-DA7 Motorneurone sind an der Grenze zwischen zwei P-Zellen lokalisiert, an der auch die Kommissuren dieser Motorneurone einzeln auswachsen. Auffällig ist, dass nur die Kommissur des DA2 Motorneurons, welches an der Grenze zwischen P-Zelle und hyp7 liegt auf der rechten Seite, zusammen mit der Kommissur des DB3 und DD2 Motorneurons auswächst. Ähnlich verhält es sich mit der Kommissur des DA1, DA8 und DA9 Motorneurons, welche auch nicht an einer Grenze zwischen zwei P-Zellen liegen und zusammen mit anderen Kommissuren ein Bündel bilden. Die Kommissuren dieser Motorneurone wachsen im Fall von DA1 zusammen mit der von DB2 und von DD1 bzw. im Fall von DA8 und DA9 zusammen mit Lumbarkommissuren im Schwanz aus. Für die Spezifizierung der Seite auf der Kommissuren der DB Motorneurone auswachsen, gibt es keine vergleichbaren anatomischen Strukturen. Diese Kommissuren verlaufen im Gegensatz zu DA und DD Kommissuren, die fast alle auf der linken bzw. rechten Seite auswachsen auf der linken und rechten Seite (Durbin 1987). Auffallend ist, dass in *ncam-1*, *syg-1* und *wrk-1* immer DB Motorneuronkommissuren betroffen sind. Das weist darauf hin, dass DB Kommissuren, die individuell reproduzierbar links oder rechts auswachsen am meisten von spezifischen Signalen abhängig sind.

Im Gegensatz zu Kommissuren der DA und DB Motorneurone verlaufen Kommissuren der DD Motorneurone erst anterior entlang des Ventralsstranges und wachsen an einem

bestimmten Punkt Richtung Dorsalstrang. Einiges weist darauf hin, dass die DD Kommissuren sobald sie einen DB Motorneuronzellkörper erreicht haben Richtung Dorsalstrang wachsen. Diese Kommissuren wachsen fast alle auf der rechten Seite aus, da sie, bevor sie Richtung Dorsalstrang auswachsen im rechten Bündel des Ventralstranges verlaufen (Durbin 1987).

3.3 IgCAM Doppelmutanten

Die untersuchten IgCAMs zeigen teilweise überlappende Expression, was entweder auf eine redundante Funktion oder auf die Bildung von funktionalen Komplexen, wie sie bereits für IgCAMs beschrieben sind, hinweist (Kamiguchi and Lemmon 2000). Im Falle von funktioneller Redundanz würde man erst in Doppelmutanten Defekte erkennen können bzw. würden vorhandene schwache Defekte der einzelnen Mutanten verstärkt auftreten. Da IgCAMs abhängig vom Komplex, in dem sie vorkommen, unterschiedliche Funktionen ausüben können, könnte man in Doppelmutanten unter Umständen auch völlig andere Defekte erwarten als in Einzelmutanten. Es wurden Doppelmutanten mit IgCAMs, die in Motorneuronen exprimiert sind, hergestellt (*syg-1*/*rig-4*, *syg-1*/*wrk-1* und *rig-4*/*wrk-1*), sowie eine Doppelmutante mit *rig-1* und *rig-3*, da beide Gene Expression in Interneuronen des Ventralstranges zeigen. Außerdem wurde eine Doppelmutante mit *rig-3* und *cdh-1* (Cadherin-1) hergestellt, da letzteres wie *rig-3* in AVA Interneuronen exprimiert ist.

Die Analyse der Interneurone *(glr-1*::YFP) in den verschiedenen Doppelmutanten zeigte, dass Defekte der Einzelmutante *wrk-1* im selben Ausmaß in den Doppelmutanten vorhanden sind, so dass weder von Redundanz noch von Komplexbildung ausgegangen werden kann.

Die Reduktion von Defekten in der *syg-1*/*rig-4* Doppelmutante könnte darauf zurück geführt werden, dass Axone ohne diese beiden Adhäsionsmoleküle andere adhäsiven Interaktionen nutzen können, wobei *syg-1* in Anwesenheit von *rig-4* notwendig ist um Adhäsion zu vermitteln. Umgekehrt ist das aber nicht der Fall, so dass die *rig-4* Mutante keine Defekte zeigt.

Die *rig-1*/*rig-3* Doppelmutante zeigte im Gegensatz zu den Einzelmutanten, die nur Defekte im Interneuronmarker (*glr-1*::YFP) zeigen, auch Defekte mit dem panneuronalen Marker. Da die Expression von *rig-1* in AVA nicht eindeutig nachgewiesen ist, so dass man nicht von einer gemeinsamen Expression ausgehen kann, deuten diese Defekte auf eine heterophile Interaktion zwischen *rig-1* und *rig-3* hin, die der Bündelung von Axonen dient. Die Defekte dieser Doppelmutante in Interneuronen (*glr-1*::YFP) entspricht den Defekten der

Einzelmutanten. Beide Einzelmutanten zeigen signifikant Überkreuzungsdefekte, wobei *rig-1* signifikant mehr Defekte aufweist als *rig-3* und die Anzahl der Defekte der Doppelmutante dazwischen liegt. Das heißt bezogen auf *rig-1* sind es weniger Defekte, aber verglichen mit *rig-3* sind es mehr.
Die *rig-3*/*cdh-1* Doppelmutante wurde mit dem panneuronalen Marker untersucht und es konnten keine Defekte festgestellt werden. Das deutet darauf hin, dass *rig-3* und *cdh-1* keine redundante Funktion haben und auch nicht interagieren.

4. Die Deletionsbank und andere Methoden zur Herstellung von Mutanten

C. elegans ist das erste Tier dessen Genom vollständig sequenziert wurde. Damit war eine Ressource für spezifische Geninaktivierung und damit für Genfunktionsanalyse gegeben. In *C. elegans* ist homologe Rekombination, wie sie in der Maus durchgeführt wird, nicht effizient möglich. Geninaktivierung mittels RNAi (Fire et al. 1998) ist eine viel verwendete und schnelle Methode zur Evaluierung von Genfunktionen. Allerdings ist das Ausmaß, der durch RNA Interferenz erreichten Geninaktivierung kaum nachzuvollziehen und der Effekt ist nicht erblich, so dass weiterführende, genetische Analysen nicht durchführbar sind. Die Geninaktivierung mittels zufälliger Transposon *Tc1* Insertion führt zwar zu stabilen Deletionsmutanten, allerdings können solche Mutanten nur mit erheblichem Aufwand isoliert werden. Die Insertion alleine führt nicht zwangsläufig zu einer Geninaktivierung. Meist ist ein Gen nur dann inaktiv, wenn das Transposon und die flankierende genomische DNA Sequenzen durch Transposon Exzission deletiert ist, was aber ein seltenes Ereignis ist (Zwaal et al. 1993). Des Weiteren sind Transposon Insertionen kein zufälliges Ereignis, da es bestimmte Stellen im Genom gibt, an denen Transposons häufiger inserieren. Chemische Mutagenese dagegen ist ein zufälliges Ereignis und mutagenisierte Tiere können mit PCR schnell und einfach nach Deletionen in einem Gen überprüft werden (Yandell et al. 1994; Jansen et al. 1997). Dadurch, dass die chemische Mutagenese ein seltenes Ereignis ist, ist die Wahrscheinlichkeit eine Deletion in einem bestimmten Gen zu finden höher je mehr mutagenisierte Genome die Deletionsbank umfasst. *C. elegans* eignet sich besonderes gut zur Herstellung von Deletionsbanken in großem Maßstab, da er einerseits in großen Mengen in Flüssigmedium kultiviert und andererseits bei -80°C eingefroren werden kann. Die Suche nach Deletionen kann dann nach und nach erfolgen. Es ist bekannt, dass mit UV-TMP (Trimethylpsoralen) Mutagenese die Rate an detektierbaren Deletionen am höchsten ist, allerdings ist die Quote an isolierten Deletionsmutanten nach dem Auftauen schlecht (Liu et

al. 1999). Bei der in dieser Arbeit erstellten Deletionsbank wurde EMS als Mutagen verwendet, welches tendenziell eher kleinere Deletionen erzeugt, aber eine relative gute Rate an wieder aufgetauten Tieren ergibt (ca. 300 von 1000 eingefrorenen Tieren). Ein Nachteil der zufälligen Mutagenese im Vergleich zur Homolgen Rekombination ist, dass je nach Konzentration des eingesetzten Mutagens meist mehr als eine Mutation pro Genom induziert wird. Das bedeutet, dass isolierte Deletionsmutanten ausgekreuzt werden müssen, um Sequenzveränderungen in anderen als dem gewünschten Bereich gegen die WT-Sequenz auszutauschen. Außerdem müssen auftretende Defekte (Phänotypen) mittels Injektion von WT DNA z.B. in Form von Cosmiden gerettet werden, um den Defekt eindeutig auf die Deletion zurückführen zu können.

Auch andere Arbeitsgruppen haben beobachtet, dass revers genetische Ansätze oft zu keinem Phänotyp führen. Es gibt Schätzungen, dass Mutationen in mehr als der Hälfte aller *C. elegans* Gene keinen offensichtlichen Phänotyp zeigen (Park and Horvitz 1986; Liu et al. 1999). Das kann an der Deletion liegen, die nicht ausreicht um das Gen zu inaktivieren. Gene können aber auch funktionelle Redundanz haben oder ein Phänotyp tritt nur unter bestimmten Umweltbedingungen ein, bzw. ist nur minimal und damit schwer zu entdecken (Liu et al. 1999).

Insgesamt ist eine Deletionsbank eine effiziente Methode zur funktionellen Charakterisierung von Genen, vor allem im Vergleich zu direkten genetischen Ansätzen, bei denen ausgehend von einem Defekt das Gen aufwendig kartiert werden muss.

Kann für eine Deletion kein Phänotyp gefunden werden, so hat man mit der Deletionsbank die Möglichkeit schnell nach weiteren Deletionen im selben oder in auch in orthologen Genen zu suchen. Dabei kann man die Primer so wählen, dass bestimmte funktional wichtige Domänen getroffen werden. Meist liegen die Deletionen im Bereich des *poison primer*, so dass damit sehr präzise die Deletionsregion gewählt werden kann.

5. Ausblick

Die Analyse der Deletionsmutanten hat gezeigt, dass die in dieser Arbeit untersuchten IgCAMs zwar an der Etablierung des Nervensystems beteiligt sind, allerdings im Vergleich zu den bekannten Rezeptoren aus dieser Familie wie UNC-5, UNC-40 und SAX-3 keine globale Rolle im Nervensystem spielen. Es ist bekannt, dass IgCAMs in homo- und heterophilen Komplexen zusammenwirken. Die dynamische und differenzielle Expression der IgCAMs in *C. elegans* weist auf viele solche möglichen Kombinationen hin. Es wurden

exemplarisch Doppelmutanten von einigen IgCAMs, die in Motorneuronen exprimiert sind, sowie eine Doppelmutante mit IgCAMs, die in Interneuronen exprimiert sind, analysiert. Letztere zeigt, dass Interaktionen stattfinden, so dass eine Ausweitung der Analyse von Doppel und auch Mehrfachmutanten in Zukunft besonders wichtig ist. Die Erzeugung von Doppel- und Mehrfachmutanten ist gerade in *C. elegans* gut durchführbar, jedoch liegen viele IgCAMs auf dem X Chromosom, so dass die Herstellung von Doppel- und Mehrfachmutanten nur durch Rekombination erreicht werden kann.

Ein weiterer interessanter Aspekt ist die Analyse von Über- bzw. ektopischer Expression der IgCAMs in WT wie auch in IgCAM Mutanten. Dazu wird cDNA der einzelnen IgCAMs hergestellt und mit unterschiedlichen Promotoren ligiert in *C. elegans* injiziert. Außerdem soll die Frage geklärt werden, welche Faktoren die Expression der IgCAMs steuern. Dazu werden die *C. elegans* Stämme, die IgCAMs exprimieren, in Mutanten von verschiedenen Transkriptionsfaktoren gekreuzt und die Expression analysiert.

In dieser Arbeit wurde hauptsächlich ein Aspekt der Nervensystementwicklung analysiert. Da für IgCAMs auch Funktionen bei der Bildung und Spezifizierung von Synapsen bekannt sind, wird die Analyse dahingehend vertieft werden. Die Expression in Muskel, Hypodermis, Pharynx und weiteren Geweben, weist auch auf Funktionen der IgCAMs in anderen Organen als dem Nevensystem hin. Die Deletionsmutanten bilden die Grundlage für weiterführende Untersuchungen in den oben genannten Geweben, so dass in Zukunft der Einfluß der IgCAMs auf die Entwicklung und Aufrechterhaltung von verschiedenen Geweben aufgeklärt werden kann.

IV. MATERIAL und METHODEN

1 Material

1.1 Chemikalien, Enzyme und sonstige Verbrauchsmaterialien

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien (Reinheitsgrad p.A.), Enzyme und Verbrauchsmaterialien wurden, wenn nicht anders angegeben, von folgenden Firmen bezogen. Difco Labs (Detroit, USA), Invitrogen (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), Qiagen (Hilden), Roche (Mannheim), Sigma (München), Riedel de Häen (Hannover), Roth (Darmstadt), MBI-Fermentas (St. Leon-Roth), PeqLab (Erlangen), Eppendorf (Hamburg), Serva (Heidelberg), BioMol (Hamburg), New England Biolabs (Beverly, MA, USA), Steinbrenner Laborsysteme (Wiesenbach), Eurogentec (Köln).
Primersequenzen und *C. elegans* - Stämme sind im Anhang aufgelistet.

1.2 Primer

Alle Primer sind in 5`-3` Richtung angegeben. In der Regel liegen Primer mit einer ungeraden Zahl am Ende des Namens auf dem Sinnstrang und solche mit einer geraden Zahl auf dem Gegenstrang. Die Primer wurden bei Invitrogen mit einem Synthesemaßstab von 50nmol bestellt. Aus den lyophylisierten Proben wurden Stammlösungen mit einer Konzentration von 100pmol/µl in TE, pH 7,4 hergestellt und bei -20°C gelagert. Die Konzentration der Gebrauchslösung betrug, wenn nicht anders vermerkt, 10 pmol/µl.

1.3 Plasmide

Plasmide, die mit pVH bezeichnet sind, stammen aus dem eigenen Labor.

Name	Beschreibung
pPD95.77	GFP-Vektor aus dem Fire Lab Vektor Kit
pBX	*pha-1* - Koinjektionsplasmid (Granato et al. 1994)
unc-122 Plasmid	*unc-122* – Koinjektionsplasmid (Loria et al. 2004)S
pRF-4	*rol-6* – Koinjektionsplasmid (Mello et al. 1991)
pVH10.45	5754bp Promotorregion von *icam-3* in pVH20.01 (pVH12.15)

pVH13.01	3553bp Promotorregion von *syg-2* in pVH20.01 kloniert (XbaI/BamHI)
pVH13.04	3523bp Promotorregion von *syg-1* in pVH20.01 kloniert (PstI/BamHI)
pVH14.05	DsRed2-Vektor ohne Promotor
pVH20.01	YFP-Vektor ohne Promotor
pVH16.10	4337bp Promotorregion von *rig-3* in pVH14.05 kloniert (SphI/BamHI)
pVH16.11	4380bp Promotorregion von *rig-4* in pVH14.05 kloniert (KpnI)
pVH16.13	4337bp Promotorregion von *rig-3* in pVH20.01 kloniert (SphI/BamHI)

1.4 Cosmide und YACs (yeast artificial chromosome)

Die folgenden Cosmide und YACs wurden vom Sanger Center, Hinxton Hall, Cambridge von Dr. A. Fraser erhalten. Sie wurden für Rettungsexperimente verwendet.

Cosmide:	F02G3, F12D9, F40B5, F41B3, F42H11, K09E2, F41D9, C26G2, C38D1, C36F7, C53B7, C54A10, M02A10, R04A4
YAC:	Y54G2

1.5 Bakterienstämme

Escherichia coli OP50	Uracil-auxotropher Stamm, dient als Nahrungsquelle für *C. elegans* Kulturen (Brenner 1974)
Escherichia coli HB101	für Flüssigkultur von *C.elegans* (M. Kölle Lab, Yale University School of Medicine)
Escherichia coli DH5α	*Subcloning Efficiency, chemically competent cell* (Invitrogen).

1.6 Hefestämme

AB 1380	Uracil-auxotroph, Träger der YACs (Burke et al. 1987)

1.7 C. elegans Stämme

Die Stämme mit einem VH-Namen wurden in unserem Labor generiert. Alle anderen Stämme wurden entweder vom *C. elegans* Genetic Center (CGC) an der Universität von Minesota (USA) oder direkt von dem Labor, in dem der Stamm hergestellt worden war, bezogen. Für die Herstellung der Deletionsbank wurde als Wildtypstamm N2 *ancestral* vom CGC bestellt und als VH811 bezeichnet.

1.8 Puffer und Medien

Für die Herstellung von Puffern und Medien wurde deionisiertes, autoklaviertes Wasser verwendet. Spezielle Puffer und Medien für die Herstellung der Deletionsbank sind im Kapitel 3 (Material und Methoden) separat beschrieben.

Medien und Lösungen für Bakterien

Ampizillin	50 mg/ml in H_2O, Stammlösung (50µg/ml Endkonzentration)
Kanamycin	10 mg/ml in H_2O, Stammlösung (10µg/ml Endkonzentration)
LB-Medium	1,0% Bacto-Trypton, 0,5% Hefeexrakt, 1,0% NaCL
LB-Platten	LB-Medium, 1,2% Bacto Agar

Medien und Lösungen für *S. cerevisiae*

YPD Medium	10 g Hefeextrakt 20 g Bacto-Pepton 900 ml H_2O autoklavieren 100 ml 20% Glukose zugeben, separat autoklavieren
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 H_2O
Synthet. 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% Glukose ad 1 l H_2O
Hefe-Platten	entsprechendes Medium, 2,0% Bacto-Agar
Lyticase-Stammlösung	1000 u/ml

Medien und Lösungen für *C. elegans*

NGM Agar	3 g NaCl 17 g Agar 2,5 g Pepton 1 ml Cholesterol (5 mg/ml in EtOH) autoklavieren

Nach dem Autoklavieren zugeben:	1 ml 1 M $CaCl_2$ 1 ml 1 M $MgSO_4$ 25 ml 1 M K_2HPO_4/KH_2PO_4, pH 6
M9 Puffer	22 mM KH_2PO_4 42 mM Na_2HPO_4 86 mM NaCl 1 mM $MgSO_4$ (nach Autoklavieren zugeben)

Medien und Lösungen für molekularbiologische Arbeiten

6 x Ladepuffer	0,25% Bromphenolblau 0,25% Xylen Cyanol FF 30 % Glycerin in H_2O
TE (Tris-EDTA)	1 mM Tris/HCl pH 7,4 (oder pH 8,0) 1 mM EDTA
TAE (Tris-Acetat-EDTA)	40 mM Tris/HCl pH 8,3 20 mM Na-Acetat 2 mM EDTA
NTE-Puffer	100 mM NaCl 50 mM Tris pH 8,0 20 mM EDTA pH 8,3 ad 50 ml H_2O
CTAB Plasmid Minipräp	
Lösung I:	50 mM Glukose 25 mM Tris pH 8,0 10 mM EDTA Lagerung bei 4°C
Lösung II:	0,2 N NaOH 1% SDS frisch ansetzen
Lösung III:	3 M K-Acetat pH 5,2
	aus Lösung III 0,3 M K-Acetat pH 5,2 herstellen
	5% CTAB
Lysepuffer mit Proteinsase K	500 µg/ml Proteinas K (Stammlösung 10mg/ml) 1% SDS in NTE
RNase Lösung	1mg/ml in H_2O

2 Methoden

2.1 Molekularbiologische Methoden

Für die Aufreinigung und Isolierung von DNA (PCR-Fragemente, Plasmide, Cosmide, Restriktionsverdaus) wurden neben den unten beschriebenen Methoden folgende Kit-Systeme benutzt: QIAquick® PCR Purification Kit, QIAprep® Spin Miniprep Kit, QIAquick® Gel Extraction Kit, HiSpeed™ Plasmid Maxi Kit (alle von Qiagen, Hilden). Die Größenbestimmung und Konzentrationsbestimmung von DNA erfolgte auf Agarosegelen mit dem Größen - und Konzentrationsstandard SmartLadder® von Eurogentec (Köln).
Molekularbiologische Standardmethoden, wurden, wenn nicht anders angegeben, nach dem Laborhandbuch *Molecular Cloning* (Sambrook und Russell 2001) durchgeführt.

2.1.1 Isolierung von genomischer DNA aus *C. elegans*

Zur Isolierung von genomischer DNA wird auf 20 großen Kulturplatten (8,5 cm Durchmesser) *C. elegans* solange kultiviert, bis die Futterbakterien gerade aufgebraucht sind. Die Population wird mit M9 Puffer abgespült und in Zentrifugenröhrchen überführt. Nach 3 min. Zentrifugation bei 5000 upm wird der Überstand abgenommen und das Wurmpellet noch einmal mit M9 Puffer gewaschen.
Das saubere Wurmpellet wird mit 10 ml NTE Puffer resuspendiert. Nach einer weiteren Zentrifugation (3 min. 5000 upm) wird der Überstand abgenommen und das Pellet in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Es folgt eine Zentrifugation bei 13000 upm für 3 min. Der Überstand wird abgenommen und das Pellet in einem Ethanol-Trockeneis-Bad eingefroren.
Nach Auftauen des Pellets folgt nach Zugabe von 0,5 ml Lysepuffer mit Proteinase K (500 µg/ml) eine Inkubation bei 65°C für eine Stunde. Im Anschluss werden 500 µl Phenol zugegeben, gevortext und bei 13000 upm 2 min zentrifugiert. Die obere, wässrige Phase wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt und es wird ein Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol Mix (25:24:1) zugegeben, gevortext, und noch einmal wie oben zentrifugiert. Die obere Phase wird wieder abgenommen und 1 ml Ethanol (absolut, eiskalt), zugegeben. Die Lösung wird 10 min bei 4°C und 13000 upm zentrifugiert. Danach sieht man ein weißes Pellet. Der Überstand wird verworfen, und das weiße Pellet mit 1 ml EtOH (absolut, eiskalt) gewaschen. Nach 5 min. Zentrifugation bei 13000 upm wird der Überstand wieder verworfen und das

Pellet getrocknet. Zum trockenen Pellet werden 400 µl NTE sowie 10 µl RNase hinzugefügt und das ganze 30 min bei 37°C inkubiert. Es folgt wieder eine Phenol/Chloroform Aufreinigung wie oben. Nach der Ethanolfällung entsteht wieder ein weißes Pellet, das wieder getrocknet wird.
Das trockene Pellet wird in TE pH 7,4 aufgenommen.

2.1.2 Plasmid Minipräparation mit der CTAB-Methode

Eine Bakterien-Übernachtkultur (1,5 ml - 2 ml) wird für 2 min. bei 13000 upm zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Bakterienpellet in 100 µl Lösung I (4°C) resuspendiert. Dazu kommen 200 µl Löung II, das ganze wird vorsichtig gemischt und 5 min auf Eis inkubiert. Danach werden 150 µl Lösung III zugegeben, wieder vorsichtig gemischt und 5 min auf Eis inkubiert.
Anschließend werden die Bakterienüberreste abzentrifugiert (10 min, 13000 upm, 4°C), der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und 50 µl einer 5%-igen CTAB Lösung zugegeben und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert.
Die ausgefallene DNA wird abzentrifugiert (10 min, 13000 upm, RT), der Überstand verworfen und 400 µl 0,3 M K-Acetat pH 5,2 und 800 µl absolutes Ethanol zugegeben. Es folgt eine weitere Zentrifugation (10 min, 13000 upm, 4°C), danach wird der Überstand verworfen und das Pellet mit absolutem Ethanol gewaschen. Das erhaltene Pellet wird getrocknet und in 50 µl TE pH 7,4 aufgenommen.

2.1.3 PCR zur Amplifizierung von Promotorfragmenten für Klonierungen

Für die Herstellung von Promotorfragmenten wurde folgende PCR durchgeführt (alle Komponenten außer der Matrizen-DNA und den Primern sind von MBI Fermentas, St. Leon Roth):

50 µl	Ansatz	PCR Programm		
5 µl	Puffer mit $(NH_4)_2SO_4$ (10 x)	94°C	2 min	
5 µl	dNTP Mix (jedes 2 mM)	94°C	30 s	34 Zyklen
4 µl	$MgCl_2$ (25 mM)	50-68°C*	30 s	
1 µl	sense Primer (10 µM)	72°C	4 min**	
1 µl	antisense Primer (10µM)	72°C	10 min	
1 µl	*Taq*-DNA Polymerase (5 u/µl)			
2 µl	genomische DNA (50 ng-500 ng)			
3 µl	H_2O			

* abhängig von der Schmelztemperatur der Primer
** abhängig von der Länge des zu amplifizierenden Fragmentes (~1kb/ min)

Die Primer waren so konstruiert, dass sie jeweils am Ende des PCR Fragementes noch spezielle Restriktionsschnittstellen während der PCR anfügten. Die PCRs wurde mit dem PCR Purification Kit von Qiagen aufgereinigt und in 30 µl TE eluiert.

2.1.4 Klonierungen

Aufgereinigte PCR Fragmente wurden verdaut und in einen, mit denselben Restriktionsenzymen verdauten Vektor ligiert. Die Restriktionsenzyme sowie die Puffer wurden von New England Biolabs (Schwalbach) bezogen. Die Reaktionsbedingungen für den sequenzspezifischen DNA Restriktionsverdau (DNA Hydrolyse) wurde entsprechend den Angaben des Herstellers gewählt. In der Regel wurde die Enzymmenge für eine Reaktionszeit von einer Stunde berechnet (1 u Enzym hydrolysiert 1 µg DNA pro Stunde). Für analytische Proben wurde 0,5 - 1 µg und für präparative Zwecke mit folgender Ligation 1-10 µg DNA in einem Gesamtvolumen von 20 - 100 µl eingesetzt.
Für Ligationsreaktionen wurde ausschließlich Gel-eluierte oder Phenol - Chloroform - gereinigte DNA verwendet. Die Ligation erfolgte mit T4 - Ligase (New England Biolabs, Schwalbach), nach Angaben des Herstellers. Für die Ligationsreaktion wurde 20 - 100 ng gesamt DNA in einem Volumen von 10-20 µl verwendet. Das molare Verhältnis von Vektor zu Insert wurde wie folgt berechnet und lag je nach Ligation zwischen 1:3 und 1:6: (ng Vektor x kb Insert/kb Vektor) x molares Verhältnis. Die Ligation wurde entweder 2-3 h bei RT inkubiert oder über Nacht bei 15°C.
Eine mögliche anschließende Transformation wurde laut Hersteller der kompetenten Bakterien (Invitrogen, Karlsruhe) durchgeführt.

2.1.5 Fusions-PCR zur Herstellung von Promotor-GFP Konstrukten

Mit der Fusions-PCR kann die aufwendige und arbeitsintensive Klonierung umgangen werden. In einem ersten Schritt werden zwei zu fusionierende DNA Fragmente mittels PCR erzeugt. Im zweiten Schritt werden die beiden DNA Fragmente in einer weiteren PCR fusioniert. Die Fusions-PCR wurde nach den Angaben von (Hobert 2002) ausgeführt. Das GFP kodierende PCR Fragment wurde mit den Primern HH_GFPfu_2 und HH_GFPfu_3 (entsprechen den Primern C und D in Abb. 4.1) aus dem Vektor pPD95.77 (Fire Lab Vector

Kit) amplifiziert. Mit genspezifischen Primern wurde der Promotorbereich synthetisiert, wobei der Primer mit der Endung fu_2 in der Primerbezeichnung den Primer B darstellt. Am 3`-Ende des Pimers B sind 24 Nukleotide angehängt, die dem GFP im Vektor pPD95.77 entsprechen. Für die zweite PCR wurde der GFP- spezifische Primer HH_GFPfu_4 (Primer D*) verwendet sowie der genspezifische Primer mit der Endung fu_3 (Primer A*).

Für die Fusions PCR wurde vor allem die *high fidelity* DNA Polymerase Phusion™ von Finnzymes verwendet. Die PCR wurde wie folgt duchgeführt:

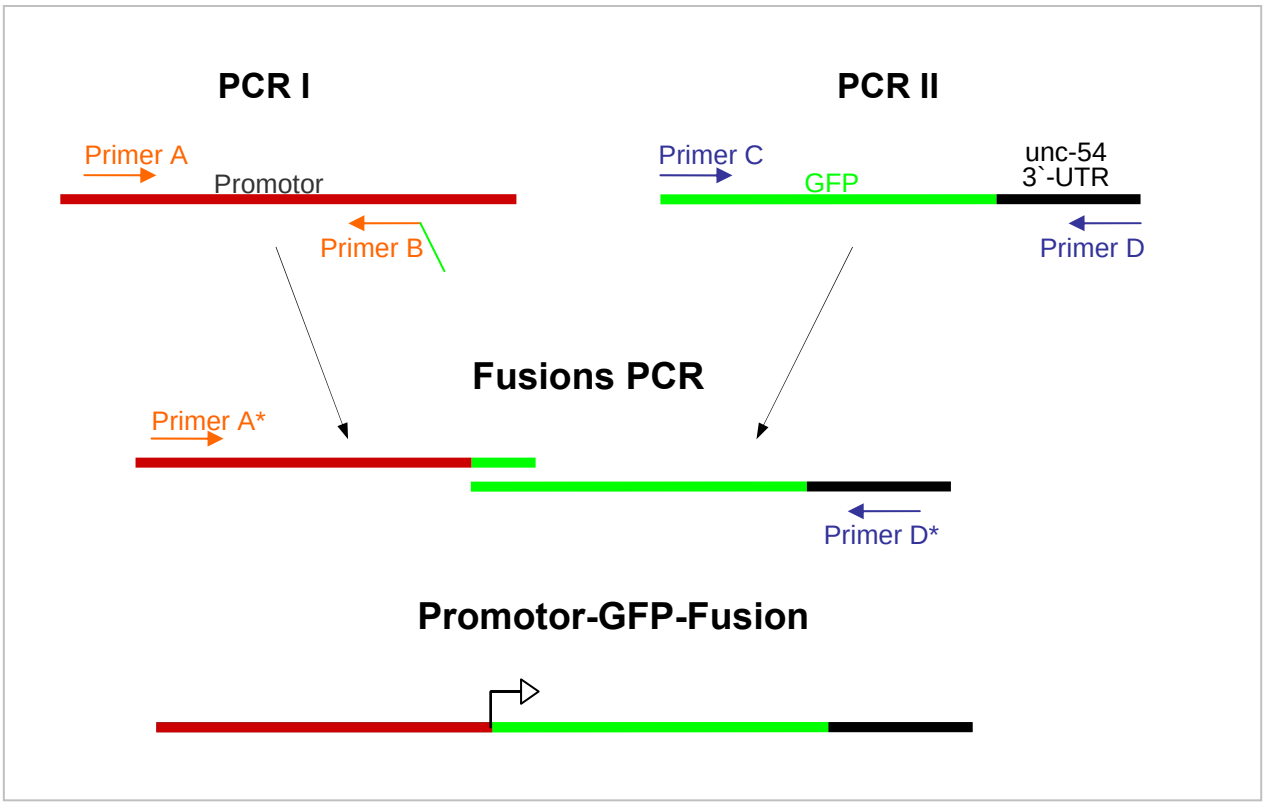


Abb.: 4.1 Schematische Darstellung der Fusions-PCR

1.) Herstellung der PCR Fragmente:

50 µl	Ansatz	PCR Programm		
10 µl	Puffer HF (5 x)	98°C	30 s	
5 µl	dNTP Mix (jedes 2 mM)	98°C	5 s	34 Zyklen
2,5 µl	sense Primer (10 µM)	60°C*	10 s	
2,5 µl	antisense Primer (10 µM)	72°C	3 min**	
0,5 µl	Phusion™ (2 u/µl)	72°C	5 min	
2 µl	genomische DNA (50 ng/µl)			
27,5 µl	H_2O			

* abhängig von der Schmelztemperatur der Primer

** abhängig von der Länge des zu amplifizierenden Fragmentes (15-30 s/1 kb)

2.) Herstellung der PCR Fusions-Fragmente: der Ansatz wurde wie oben gewählt und anstelle der genom. DNA das GFP Fragment sowie das genspezifischer Promotorfragment als

Matrize verwendet. Das Programm wurde entsprechend der Länge des erwarteten Fusionsfragmentes angepasst.

2.1.6 Präparation von Cosmiden aus *E. coli*

Die Aufreinigung von Cosmid DNA aus *E. coli* wurde nach einem modifizierten Protokoll von Birnboim und Doly (1979) durchgeführt. Es wurden die Puffer aus dem Plasmid –Mini-Präp Kit von Qiagen verwendet.
Eine 15 ml Übernachtkultur wird abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 1,2 ml Puffer P1 resuspendiert. Die Bakteriensuspension wird auf zwei 2 ml Reaktionsgefäße aufgeteilt und jeweils 600 µl Puffer P2 zugegeben. Nach vorsichtigem Mischen und 5 min Inkubation bei RT werden 600 µl gekühlter Puffer P3 zugegeben, gemischt und 5 min auf Eis inkubiert. Es folgt eine Zentrifugation für 10 min, 13000 upm bei 4°C. Der Überstand wird abgenommen und auf eine mit 1 ml Puffer QBT äquilibrierte Qiagen-Tip 20 Säule geladen. Nach dem vollständigen Durchlaufen der Lösung wird mit 4 ml Puffer QC gewaschen, die DNA mit 0,8 ml Puffer QF (auf 65°C vorgewärmt) eluiert und mit 0,7-fachem Volumen Isopropanol gefällt. Die DNA wird durch eine Zentrifugation bei 13000 upm, 30 min, RT pelletiert und mit 70% EtOH gewaschen und anschließend wieder pelletiert und getrocknet. Zur Kontrolle werden 1-2 µl der DNA auf einem Agarosegel (0,5%) analysiert.

2.1.7 Präparation von YACs aus Hefe

Die Kultivierung der Hefezellen erfolgte unter Standardbedingungen, nach dem *Clontech Yeast Protocol* Handbuch (PT3024-1, Clontech, Palo Alto, CA, USA).
Die Hefestämme mit YACs wurden als Schrägagarkulturen geliefert. Daraus wurden mit einer Impföse Hefezellen entnommen, in eine Einfrierlösung (100 µl 50%Glycerin und 100 µl Uracil-Mangelmedium) überführt und in einem Trockeneis-EtOH Bad schockgefroren. Dieser Vorrat wird bei -80°C gelagert.
Zur Präparation der YACs werden Hefezellen auf selektiven Hefe-Platten ohne Uracil (SD_{-ura}) ausgestrichen, bei 30°C inkubiert und nach drei Tagen können 20 ml YPD - Flüssigkulturen mit einer Einzellkolonie beimpft werden. Flüssigkulturen werden bis zu einer Zelldichte von 3 x 10^8 Zellen/ml bei 30°C auf einem Schüttler inkubiert. Die Zelldichte wurde mit einer Fuchs-Rosenthal Zählkammer (Tiefe: 0,2 mm, Volumen 0,0625 mm^2) bestimmt. Die Aufreinigung

erfolgt mit dem Genomic DNA Kit von Qiagen laut Handbuch. Die Inkubation mit Lyticase - und Proteinase K Lösung (20mg/ml Stammlösung, davon 100 µl pro Midi-Ansatz) erfolgt jeweils 90 min lang. Um dem Verstopfen der Säulen vorzubeugen, wurde die Lösung vor dem Aufbringen auf die Säule ein zweites Mal zentrifugiert. Das Pellet wird nach der Säulenaufreinigung in 150µl TE pH 7,4 aufgenommen und für zwei Stunden inkubiert (55°C). Die aufgereinigte DNA (1-2 µl) wird zur Mengenabschätzung und Qualitätskontrolle auf ein 0,5% Agarosegel aufgetragen. Das YAC ist auf dem Gel nicht von der genomischen Hefe DNA zu unterscheiden, deshalb ist es notwendig mittels PCR zu überprüfen ob das YAC bzw. ein bestimmter DNA Abschnitt vorhanden ist.

3 Die Herstellung der Deletionsbank

Die Deletionsbank wurde in fünf Chargen hergestellt, wobei jede Charge einer Mutagenese entspricht. Für je eine Charge wurde die F1 Generation von EMS mutagenisierten Würmern synchronisiert und in 100 96-*well* Mikrotiterplatten kultiviert (20 F1/*well* in 50µl Kulturmedium). Nach fünf Tagen waren die Futterbakterien in den *wells* aufgebraucht und ca. 2000 F2/*well* vorhanden.

Die Deletionsbank wurde erstellt, indem die Kultur der mutagenisierten Würmer in drei Teile aufgeteilt wurde: 50% der Würmer wurden in 96-*well* Mikrotiterplatten bei -80°C eingefroren, 25% der Würmer wurden so vereinigt, dass die Reihen A-D sowie die Reihen E-H einer Mikrotiterplatte je einen Pool ergaben und zu den restlichen 25% Würmern wurde Lysepuffer pipettiert und die Würmer zur DNA-Gewinnung lysiert. Aus den Pools wurde mit Phenol-Chloroform-Extraktion sauber die DNA präpariert. Einer Charge entsprechen 192 Pools.

Die Platten der einzelnen Chargen wurden wie folgt bezeichnet. 1-96 (Charge-1), 101-196 (Charge 2), 201-296 (Charge 3), 301-396 (Charge 4) 401-496 (Charge 5). Da zu jeder Charge noch extra Kulturen für Tests erzeugt wurden, die schließlich doch zur Deletionsbank hinzugefügt wurden, enthält sie folgende weitere Platte: T01-T69.

Insgesamt besteht die Deletionsbank aus etwa 549 Mikrotiterplatten mit eingefrorenen Würmern, 549 Mikrotiterplatten mit lysierten Würmern und 1098 Pools mit reiner DNA, die ebenfalls in 96 *well* Mikrotiterplatten aufbewahrt wird. Diese Platten sind bezeichnet mit A1-96 für vereinigte DNA von den Reihen A-D der Kulturplatten 1-96 und mit E1-96 für vereinigte DNA von den Reihen E-H der Kulturplatten 1-96 (und so weiter für die folgenden Chargen).

Das folgende Protokoll bezieht sich, der besseren Übersicht wegen, auf die Herstellung einer Charge der Deletionsbank mit einem Umfang von 100 96-*well* Kulturplatten. Jedem *well* entsprechen ca. 20 mutagenisierte Würmer, sodass eine Charge knapp 200000 Würmern und damit 400000 haploiden Genomen entspricht. *C. elegans* Kulturen wurden für alle Schritte bei 20°C kultiviert. Alle Medien und Lösungen für die Herstellung der Deletionsbank sind im Anschluss an das Protokoll aufgelistet. Zum Pipettieren wurden 12-Kanal Eppendorfpipetten (Eppendorf Research® pro) verwendet. Das Protokoll ist verändert nach M. Koelle (26.04.1999), (*http://info.med.yale.edu/mbb/koelle/*).

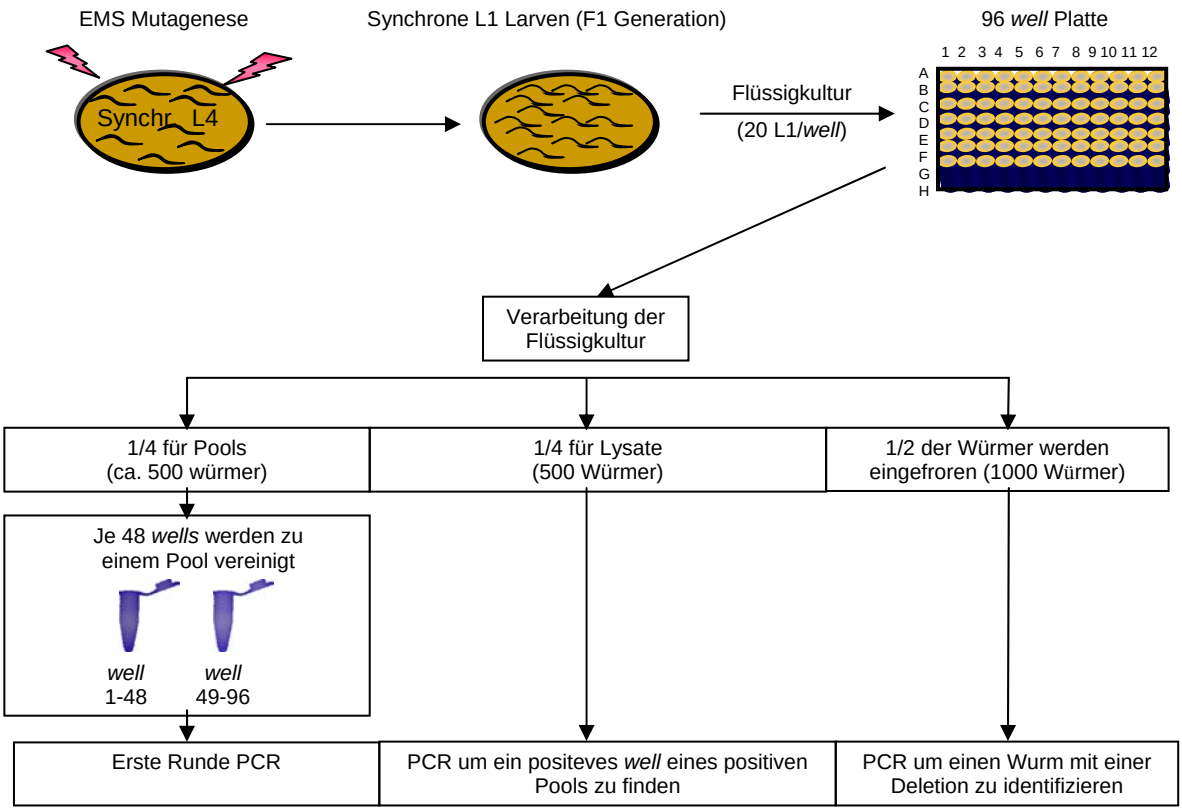


Abb. 4.2 Schematische Darstellung der Hersellung einer Deletionsbank

3.1 Protokoll zur Herstellung der Deletionsbank

Übersicht

1. Tag	**Start der Wurmkultur**: L1 Larven werden auf Platten ausgeimpft (morgens).
4. Tag	**1. Synchronistation**: adulte Würmer werden mit NaOCl behandelt (morgens), nur die Eier überleben und werden auf Platten ohne Futterbakterien ausgebracht. Über Nacht schlüpfen L1 Larven.
5. Tag	**Start der synch. *C. elegans* Kultur**: L1 Larven werden auf Platten mit Futterbakterien ausgebracht.
7. Tag	**Mutagenese**: Die Larven haben sich zu jungen adulten Tieren entwickelt. Mutagenese mit EMS, danach kommen die Würmer auf Platten mit Futterbakterien.
8. Tag	**2. Synchronisation**: siehe 4. Tag
9. Tag	**Flüssigkultur**: Synchrone L1 Larven werden in 96-*well* Platten verteilt (~ 20 *C. elegans*/*well* und 50 µl Kulturmedium/*well*)
14. Tag	**Herstellung der Deletionsbank**: Aufarbeitung der Flüssigkultur.
15. Tag und später	Verarbeitung der Pools und Lyse der Teilpopulation (Schnellaufschluß).

3.1.1 Teil I: Vorbereitung einer mutagenisierten *C. elegans* Kultur

1. Tag Am Morgen werden zehn mit *E. coli* OP50 beimpfte NGM Platten (8,5 cm Durchmesser) mit L1 Larven beimpft und bei 20°C inkubiert.

4. Tag Am Morgen: Die Futterbakterien auf den 10 Platten sollten noch nicht ganz aufgebraucht und es sollten viele adulte Würmer mit maximal vielen Eiern in der Gonade vorhanden sein. Die Population wird mit M9 abgespült und in 15 ml Falcon-Röhrchen überführt. Nach 1 min Zentrifugation bei 3000 upm und 4°C sollte sich ein Wurmpellet von ca. 300 -500 µl ergeben (auf keinen Fall weniger).

Der Überstand wird vorsichtig abgenommen, 5 ml der NaOCl Lösung zugegeben, und das Pellet aufgemischt. Nach 90 s (nicht länger, da sonst auch die Eier sterben) wird wieder zentrifugiert und zwar bis die Zentrifuge 3000 upm erreicht hat bzw. nur solange wie es notwendig ist um die Würmer zu pelletieren. Spätestens nach 4-5 min sollte das Wurmpellet in M9 Puffer aufgenommen sein.

Das Wurmpellet wird 2 - 3 mal mit M9 gewaschen, nach dem letzten Waschschritt

auf 1 ml mit M9 aufgefüllt und jeweils 500 µl auf zwei NGM Platten (8,5 cm Durchmesser) ohne Futterbakterien aufgebracht. Diese Platten werden über Nacht bei 20°C inkubiert.

5. Tag Am Morgen: die synchronen L1 Larven werden mit M9 abgespült, in zwei 15 ml Falcon Röhrchen überführt und 3 min zentrifugiert (3000 upm, 4°C). Danach sollte kontrolliert werden, ob der Überstand noch L1 Larven enthält, falls notwendig noch einmal zentrifugieren, bis alle Larven pelletiert sind. Der Überstand wird bis auf 2 ml verworfen, das Wurmpellet wird aufgemischt und je 100 µl *C. elegans* werden auf 20 NGM Platten mit Futterbakterien verteilt. Diese Platten werden dann bei 20°C inkubiert.

7. Tag Die Population sollte aus L4 Larven, bzw. jungen Adulten bestehen. Sie werden mit M9 abgespült, in zwei Falcon Röhrchen überführt und pelletiert (3 min, 3000 upm, RT). Der Überstand wird verworfen, das Volumen des Pellets mit M9 auf 1 ml aufgefüllt und je 3 ml EMS Lösung zugegeben. Danach gut mischen und in 2 Petrischalen (3 cm Durchmesser) überführen und 4 Stunden mit gelegentlichem Mischen inkubieren. Nach der Inkubation werden die Würmer von je einer Petrischale in zwei 2 ml Reaktionsgefäße überführt und 10 s zentrifugiert (bis die Zentrifuge 10000 upm erreicht hat). Das Pellet wird 3 x mit M9 gewaschen und jedes Pellet wird auf 3 NGM Platten mit Futterbakterien (8,5 cm Durchmesser) verteilt (4 Pellets = 12 Platten). Es folgt eine Inkubation über Nacht bei 20°C.

8. Tag Die mutagenisierten Würmer sollten nun adult und voll mit Eiern sein. Es folgt eine Synchronisation wie an Tag 4.

Ansetzen von 2 x 400 ml LB Medium mit *E. coli* HB101 für eine Übernachtkultur bei 37°C im Schüttler (225 upm) für 16-17 Stunden.

9. Tag Die Übernachtkultur von *E. coli* HB101 wird zur Messung der OD550 1:10 verdünnt. Die OD550 muß zwischen 0,4 und 0,6 der 1:10 Verdünnung liegen. Die Bakterien werden danach abzentrifugiert und mit S-Medium auf eine theoretische OD550 von 13,2 gebracht.

Die synchronen, mutagenisierten L1 Larven werden mit M9 abgespült und in zwei Falcon Röhrchen (15 ml) überführt. Nun sinken die Karkassen der durch die NaOCl Behandlung abgetöteten adulten Würmer schneller ab, als die sich bewegenden L1 Larven. Man lässt die Karkassen 5 min absinken und überführt die obersten 5 ml mit den L1 Larven. Nach weiteren 5 min werden wieder die obersten 5 ml abgenommen und das ganze noch einmal wiederholt bis nur noch

ein Pellet aus Karkassen vorhanden ist. Mit diesem Pellet wird für eine optimale Ausbeute die ganze Prozedur wiederholt. Die L1 Larven werden abzentrifugiert (3 min, 3000 upm, 4°C), der Überstand verworfen, die Pellets der beiden Falcon Röhrchen vereinigt und 5 ml M9 dazu gegeben.

10 µl dieser Wurmsuspension werden mit 90 ml M9 versehen und 10µl davon auf einen Objektträger pipettiert und gezählt. Ich erhielt zwischen 70-140 Würmer in 10 µl. Für 100 96-*well* Platte benötigt man ca. 200000 Würmer (20/*well*). Man entnimmt der Wurmsuspension das Volumen, indem sich 200000 Würmer befinden und fügt 250 ml S-Medium hinzu. Damit sollte man eine Wurmdichte von 20 Würmern in 25 µl erhalten. Die Wurmdichte muß dahingehend überprüft werden!

Nun wird die Wurmsuspension und die Bakteriensuspension 1:1 gemischt, so dass man eine Wurmdichte von 20 Würmern in 50 µl und eine Bakteriendichte mit einer OD550 von 6,6 erreicht.

Die Würmer in der Flüssigkultur werden in 100 96-*well* Platten aliquotiert (50 µl/*well* = 20 *C. elegans*/*well*), locker abgedeckt, in Plastikboxen gestapelt und bei 20°C inkubiert. Die Plastikboxen sind mit feuchten Papierhandtüchern ausgelegt um ein Verdunsten der Flüssigkultur zu verhindern.

14. Tag Die Futterbakterien sind aufgebraucht, so dass sich die Nachkommen der mutagenisierten Population nicht mehr weiter entwickeln können. Es befinden sich ca. 2000 L1/L2 Larven in jedem *well*. 1000 Würmer werden abgenommen und in Einfrierlösung überführt und sofort eingefroren, 500 Würmer werden abgenommen und für die Pools gesammelt. Die restlichen 500 Würmer werden mit Lysepuffer versehen und laut Protokoll zum Aufbrechen eingefroren. Für eine detailierte Beschreibung der Aufarbeitung der Flüssigkulturen siehe nächstes Kapitel (3.1.2 Teil 2).

Medien und Lösungen für Teil I

NaOCl Lösung	9 ml 0,25 M NaOH + 1 ml ~ 10% NaOCl, Endkonzentration NaOCl: 1%
EMS Lösung	3 ml M9 + 20 µl EMS. Zu dieser Lösungen wird 1 ml Wurmsuspension hinzu gegeben. EMS Enkonzentration 50 mM (= 0,5%).

4 l S-Medium (10 x 400 ml für 5 Chargen)

S-Basal:

-NaCl	0,1M	(23,3 g)
-KH_2PO_4	0,05M	200 ml von 1M Lösung (136,1 g in 800 ml H_2O, mit KOH Plätzchen auf pH 6,0 einstellen (ca. 15 g), ad 1 l, autoklavieren
-4 ml Cholesterol		von 5 mg/ml Stammlösung (wenn notwendig zum Lösen auf 37°C erwärmen)

ad 4l H_2O
- aliquotieren (400 ml), autoklavieren

vor Gebrauch Aliquots mit folgenden sterilen Substanzen vesehen:

-$MgSO_4$	1,2 ml von 1 M Lösung
-$CaCl_2$	1,2 ml von 1 M Lösung
-K-Citrat (pH 6.0)	4 ml von 1 M Lösung(21,01g Citronensäure-Monohydrat in 80 ml H_2O, mit KOH Plätzchen auf pH 6,0 einstellen (ca. 15 g) ad 100 ml
-Spurenelemente:	4 ml
-100 x Penicillin/ Streptomycin	4 ml (100 x)
-Nystatin	200 µl (von 100mg/ml Stammlösung)

Spurenelemente-Lösung:	-$FeSO_4x7H_20$	2.5mM	0.346g
	-Na_2EDTA	5mM	0.930g
	-$MnCl_2x4H_2O$	1mM	0.098g
	-$ZnSO_4x7H_2O$	1mM	0.144g
	-$CuSO_4x5H_2O$	0.1mM	0.012g

ad 500 ml H_2O
autoklavieren und im Dunklen aufbewahren!

3.1.2 Teil II: Aufarbeitung der Flüssigkultur

Einfrieren von Wümern

Es werden 50 µl Einfrierlösung in 96-*well* Einfrierplatten vorgelegt. Zur Flüssigkultur werden 50 µl M9 hinzugefügt und dann 50 µl von der Kultur entnommen und in die Einfrierplatten überführt. Die Einfrierplatten werden mit einer Klebefolie verschlossen. Acht Einfrierplatten kommen in eine Styroporbox der Firma New England Biolabs (Beverly, MA, USA), werden mit Styroporflocken umgeben und bei -80°C eingefroren. Es sollte darauf geachtet werden, dass alle acht Platten etwa gleichzeitig fertig sind, so dass die Würmer, sobald sie mit der Enfrierlösung in Kontakt sind schnellsten eingefroren werden!!

Würmer für

Von jeder Kulturplatte werden zwei Pools erstellt (Reihen A-D und E-H).

pooled DNA

Dafür werden 25 µl der Kultur entnommen und in einen Trog überführt und anschließend in ein Eppendorfgefäß pipettiert. Die Würmer werden abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Wurmpellet eingefroren (-80°C). Die Pellets werden gesammelt, die Aufreinigung mittels Phenol/Chloroform erfolgt wenn alle Kulturplatten versorgt sind. Die Pellets bleibt bis dahin eingefroren.

DNA-Präparation: die Pellets werden aufgetaut und 0,5 ml eines Lysepuffers mit Proteinase K dazugegeben (siehe: Lösungen und Medien für molekularbiologische Arbeiten, Kapitel X). Es folgt eine Inkubation bei 65°C für 1 h. Danach wird 0,5 ml Phenol zugegeben, gut gemischt und 5 min bei 13000 upm zentrifugiert. Die obere Phase wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt und 0,5 ml Pheno/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) zugegeben und gut gemischt. Nach einer weiteren Zentrifugation wird wieder die obere Phase abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß pipettiert, 0,5 ml Chlorofom dazugegeben und wie oben zentrifugiert. Nachdem die obere Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt ist wird 1 ml EtOH (absolut, eiskalt) dazu gegeben und 15 min bei 13000 upm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und noch einmal 1 ml EtOH zugegeben und 5 min bei 13000 upm und 4°C zentrifugiert. Nachdem der Überstand abgenommen ist wird das Pellet getrocknet (nicht übertrocknen lassen) und in 100 µl TE(DL) pH 7,4 aufgenommen. Es muß kontrolliert werden ob das Pellet sich löst!

Ansetzen der Einzell-*well*-Lysate

In jedem *well* der Kulturplatten sind noch 25 µl übrig geblieben. Die darin enthaltenen Würmer werden lysiert indem 25 µl Lysepuffer zugegeben wird und die Platten bei -80°C eingefroren werden. Danach werden die Platten 1-1 ½ h bei 65°C und anschließend 30 min bei 95°C inkubiert.

Medien und Lösungen für Teil II

	Endkonzentration	Stammlösung
300 ml Lysepuffer (eine Charge)	-30 mM Tris pH 8,0	9 ml 1 M Tris pH 8,0
	-8 mM EDTA	4,8 ml 0,5 M EDTA
	-100 mM NaCl	30 ml 1 M NaCl
	-NP-40 0,7%	2,1 ml 100% NP-40
	-Tween 20 0,7%	2,1 ml 100% Tween 20

	ad 300 ml H_2O im Kühlschranke dunkel aufbewahren vor Gebrauch Proteinase K zugeben: 100 µg/ml 3 ml von 10 mg/ml Stammlösung
2 x Einfrierlösung	100 mM NaCl 50 mM KH_2PO_4 30% Glycerol mit 1 M NaOH neutralisieren 0,3 mM $MgSO_4$, nach autoklavieren zugeben
TE(DL) pH 7,4	10 mM Tris 0,1 mM EDTA

3.2 Das Isolieren von Deletionsmutanten

Die Deletionsbank wird mit der *poison primer* PCR nach Deletionen, bzw. nach Deltionsmutanten durchsucht (Edgley et al. 2002) (http://ko.cigenomics.bc.ca/poison1.html, http://ko.cigenomics.bc.ca/poison2.html). Die *poison primer* PCR ist eine Variante der *nested* PCR. Sie eignet sich besonders zur Vervielfältigung von seltenen DNA Matrizen (z.B. mit einer Deletion) in einem Pool von WT DNA Matrizen. Folgende Reagenzien für die PCR sind von MBI Fermentas (St. Leon Roth): 10 x Puffer, dNTPs (2mM), MgCl2 (25mM), *Taq* DNA Poymerase (5u/µl).

Das Durchsuchen (im Folgenden auch als *screening* bezeichnet) erfolgt in drei Schritten. Im ersten Schritt wird die vereinigte DNA (Pools) durchsucht. Diese DNA Präparation muss von sehr guter Qualität sein, da Verunreinigungen das Finden und Reproduzieren von Deletionen erschweren, wenn das Verhältnis von WT DNA Matrize zu DNA Matrize mit Deletion hoch ist.

Nach dem Finden eine Deletionsbande wird der positive Pool erneut getestet. Nur wenn die Deletionsbande reproduziert werden kann, wird in einem zweiten Schritt eine PCR mit den entsprechenden 48 *wells* der lysierten Würmer gemacht. Wenn sich die Deletion in der PCR mit den Lysaten zweimal unabhängig bestätigt hat, wird das entsprechende *well* mit der eingefrorenen Population aufgetaut. Die Würmer werden vereinzelt und sobald die Futterbakterien verbraucht sind, wird ein Teil der Population abgespült und lysiert. Mit den Lysaten wird wieder eine PCR gemacht, um die Platte mit der mutanten Wurmpopulation zu finden. Liegt die Deletion homozygot vor, kann sie mit den externen (Endung: dx) oder internen (Endung: di) Primern sequenziert werden.

Externe PCR mit Pools als Matrize

25 µl Ansatz	PCR Programm		
2,5 µl 10 x Puffer mit $(NH_4)_2SO_4$	94°C	30 s	
2,5 µl dNTP Mix (jedes 2 mM)	94°C	30 s	34 Zyklen
2 µl $MgCl_2$ (25 mM)	61°C	30 s	
0,5 µl sense Primer (10 µM)	72°C	30 s	
0,5 µl antisense Primer (10 µM)	4°C		
0,5 µl *poison primer* (10 µM)			
0,3 µl *Taq*-DNA Polymerase (5 u/µl)			
2,5 µl Matrizen DNA (Pools)			
13,7 µl H_2O			

Interne PCR mit der externen PCR als Matrize

25 µl Ansatz	PCR Programm		
2,5 µl 10 x Puffer mit $(NH_4)_2SO_4$	94°C	30 s	
2,5 µl dNTP Mix (jedes 2 mM)	94°C	30 s	34 Zyklen
2 µl $MgCl_2$ (25 mM)	55°C	30 s	
1 µl sense Primer (10 µM)	72°C	60 s	
1 µl antisense Primer (10 µM)	4°C		
0,3 µl *Taq*-DNA Polymerase (5 u/µl)			
1 µl Matrizen DNA (ext. PCR)			
14,7 µl H_2O			

Externe PCR mit Lysaten als Matrize

50 µl Ansatz	PCR Programm		
5 µl 10 x Puffer mit $(NH_4)_2SO_4$	94°C	30 s	
5 µl dNTP Mix (jedes 2 mM)	94°C	30 s	34 Zyklen
4 µl $MgCl_2$ (25 mM)	61°C	30 s	
1 µl sense Primer (10 µM)	72°C	30 s	
1 µl antisense Primer (10 µM)	4°C		
1 µl *poison primer* (10 µM)			
0,6 µl *Taq*-DNA Polymerase (5 u/µl)			
1 µl Matrizen DNA (Lysate)			
31,4 µl H_2O			

Die interne PCR auf Lysate wird wie die interne PCR auf Pools durchgeführt.

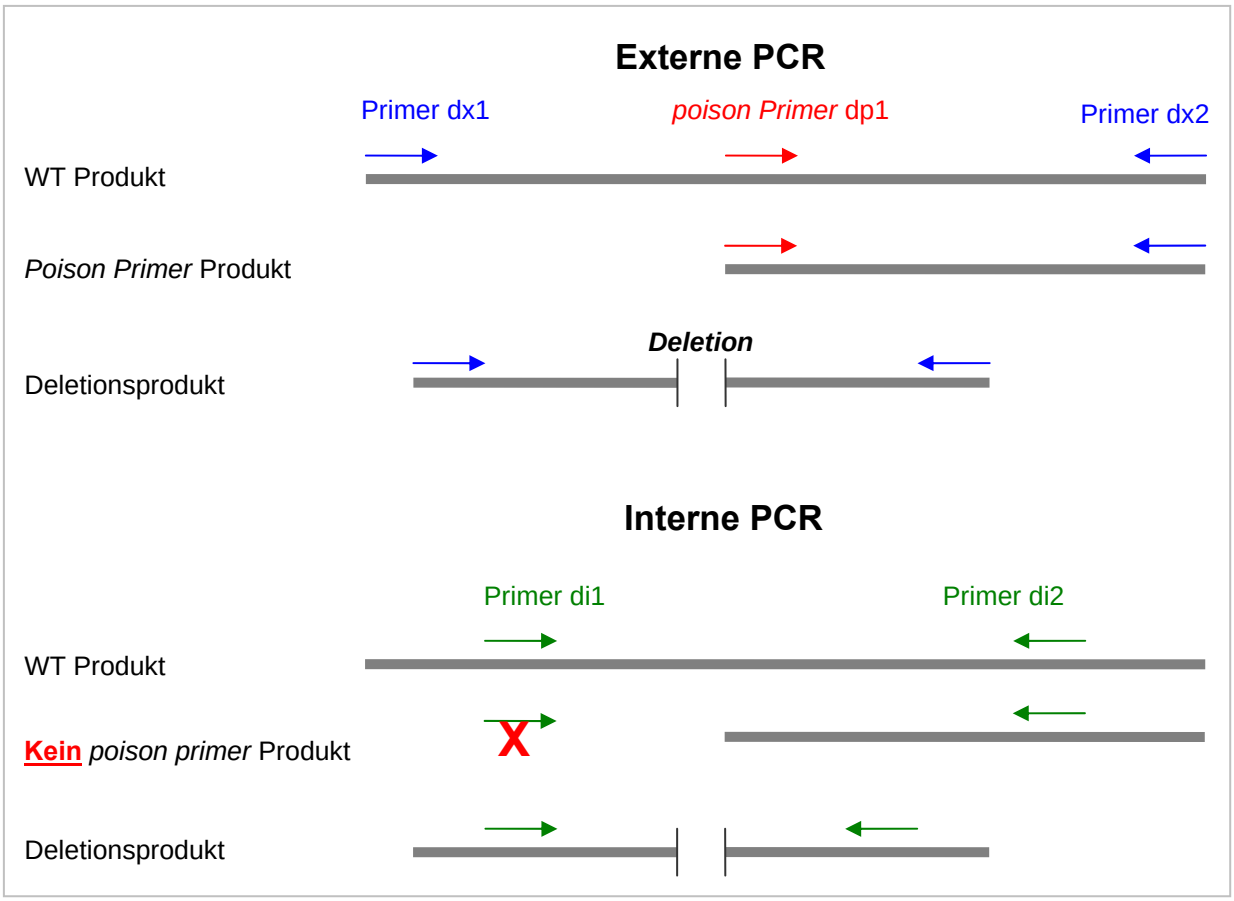


Abb.: 4.3: Die *Poison Primer* PCR. Es wird wie bei der *nested* PCR eine ext. und eine int. PCR durchgeführt. In der ext. PCR kommt ein dritter Primer zum Einsatz, der *poison primer*. Dadurch wird in der externen PCR das lange Wildtyp-Produkt mit den ext. Primern im Verhältnis zum kurzen *poison Primer* Produkt, nicht so stark amplifziert. Das Deletionsprodukt, welches erwartungsgemäß kürzer ist als das Wildtyp-Produkt hat durch die geringere Länge, wie das *poison primer* Produkt einen Vorteil. Allerdings ist die Matrize dafür nur in sehr geringer Konzentration im Vergleich zur Wildtyp-Matrize vorhanden, so dass es nicht ganz so stark amplifiziert wird wie das *poison primer* Produkt. In der ext. PCR ist also das Verhältnis von Wildtyp-Produkt zu Deletionsprodukt unter Erzeugung eines weiteren Produktes durch den *poison primer* zugunsten des Deltionsproduktes verschoben worden. In der int. PCR wird nun die ext. PCR als Matrize eingesetzt und kein interner *poison primer* eingesetzt, so dass das *poison primer* Produkt nicht mehr amplifiziert wird. Da aber in der ext. PCR das Deletionsprodukt angereichert wurde und es durch seine geringer Länge einen Vorteil gegenüber dem internen Wildtyp-Produkt hat, wird es so stark amplifiziert, dass man eine Bande auf einem Agarosgel sehen kann.

4 Arbeiten mit *Caenorhabditis elegans*

4.1 Kultivierung von C. elegans

Die Kultivierung erfolgte nach dem Standardprotokoll ((Brenner 1974; Wood 1988). Die Würmer wachsen auf NGM Platten mit einem Durchmesser von 3,5 cm, 5 cm oder 8,5 cm, die mit *E. coli* OP50 als Futterbakterien beimpft sind. Die Kultivierungstemperatur beträgt 15°C, 20°C oder 25°C. Würmer werden mit einem ausgeglühten Platindraht oder indem man ein Blöckchen mit einem Skalpell aus dem NGM Agar schneidet, steril auf neue Platten transferiert.

4.1.1 Verpaarung von *C. elegans*

C. elegans bildet Populationen, die zu 99,7% aus Hermaphroditen, die sich selbst Befruchten bestehen. Spermien, die von selten vorkommenden, aber unter Laborbedingungen gut erzeugbaren Männchen stammen, werden bei der Befruchtung von Oocyten gegenüber den Spermien der Hermaphroditen bevorzug. Das ermöglicht das Kreuzen von Hermaphroditen mit Männchen um heterozygote F1 Nachkommen zu erzeugen. Für eine Kreuzung werden vier L4 Hermaphroditen eines Stammes mit 15 Männchen eines anderen Stammes auf eine Platte transferiert. Um Selbstnachkommen der Hermaphroditen von Kreuzungsnachkommen zu unterscheiden kann ein dominanter Marker (z.B. GFP), der auch in heterozygoten F1 Würmern sichtbar ist verwendet werden. Die F1 Generation wird vereinzelt und die F2 Generation kontrolliert, ob sie vollständig Träger des Markers, also homozygot ist.
Auskreuzen von *C. elegans* Mutanten: Mutanten die aus der Deletionsbank isoliert werden, können neben der Deletion noch weitere Mutationen tragen, da EMS auf das ganze Genom wirkt. Um sicher zu stellen, dass ein Stamm mit einer speziellen Deletion nur diese eine Veränderung besitzt, wird er ausgekreuzt, d.h. er wird so lange mit einem WT Stamm verpaart, bis mit einer statistisch sehr hohen Wahrscheinlichkeit nur noch die spezielle Deletion vorhanden ist, also das Genom fast vollständig ausgetauscht ist. Es ist notwendig 3-4 x auszukreuzen. Nach jedem Kreuzungsschritt werden Würmer, die die Deletion noch tragen, isoliert und weiter ausgekreuzt.

4.2 Mikroinjektion zur Herstellung transgener C. elegans Stämme

Mittels Mikroinjektion von DNA in die Gonade von Hermaphroditen werden transgene *C. elegans* Stämme hergestellt (Fire 1986; Mello et al. 1991). Die so eingebrachte DNA bildet extrachromosomale *arrays*, die mosaikartig segregiert werden, so dass nicht jede Zelle das *array* trägt.

Zur Injektion wird neben der spezielle DNA auch noch eine Koinjektionsmarker DNA zur Selektion von transgenen Würmern eingesetzt. Beide DNAs werden gemischt (gesamt Konz.: 100 ng/µl) und abzentrifugiert um Partikel, die die Injektionsnadel verstopfen könnten zu sedimentieren. Auf ein großes Deckglas wird ein Tropfen 2%-iger Agarose aufgebracht und mit einem weiteren Deckglas flach gedrückt. Das so entstandene Agarosekissen wird eine Stunde bei 80°C getrocknet. Zur Injektion werden junge adulte Hermaphroditen auf das Agarosekissen gelegt und um die Dehydrierung zu kontrollieren, wird ein Tropfen Paraffinöl aufgetropft. Die so fixierten Würmer werden, mittels eines inversen Mikroskops und einem Mikromanipulator zur Steuerung der Glas-Injektionsnadel, injiziert. Die Glas-Injektionsnadel wird aus einer Glaskapillare hergestellt, indem sie mit einem *mikropipette-puller* unter Erwärmung auseinander gezogen wird (Parameter: heat: 0,6; pull: 100; vel: 50; del: 100). Die Nadel wird mit der zu injizierende DNA beladen, in den Mikromanipulator eingespannt und in die Gonade eines Wurms eingeführt. Nach erfolgter Injektion werden die Würmer mit M9 Puffer vom Objektträger gelöst und auf Kulturplatten transferiert. In der F1 Generation werden Würmer, die den Koinjektionsmarker tragen, klonal isoliert. Einige Würmer bilden in der F2 ein extrachromosomales *array* aus, welches weiter vererbt wird. Die Vererbungsrate dieser *arrays* liegt in unabhängigen Stämmen zwischen 10% und 90%.

Mit dieser Methode wurden Promotor-GFP Konstrukte zur Expressionsanalyse sowie Cosmide und YACs zur Rettung von Defekten in Mutanten injiziert. Die Konzentration des Injektionsmixes betrug 100ng/µl (ca. 50ng/µl Promotor GFP Konstrukt und ca. 50ng/µl Koinjektionsmarker, bzw. ca. 10ng/µl Cosmid oder YAC und 90ng/µl Koinjektionsmarker).

4.3 Ballistische Transformation von C. elegans

Zur Herstellung von transgenen *C. elegans* Stämmen wurde neben der Mikroinjektion auch die ballistische Transformation nach (Wilm et al. 1999) verwendet. Die Methode wurde im Labor von Prof. R. Schnabel *(http://www.ifg.tu-bs.de/Schnabel/ce-home.html*) weiter

entwickelt und nach einer persönlichen Mitteilung von Arend Hintze (Schnabel Labor) durchgeführt.

4.3.1 Vorbereitung von *C. elegans*

Für 1-2 Schüsse benötigt man etwa eine Platte (8,5 cm Durchmesser) voll mit jungen adulten *C. elegans*. Diese Platte wird mit Wurmeiern von NaOCl behandelten Würmern beimpft um eine synchrone Population zu erhalten.
Für jeden Schuß benötigt man eine kleine Platte (3,5 cm Durchmesser) die in der Mitte einen 20 µl großen (8-9 mm Duchmesser) nicht zu stark angewachsenen Tropfen mit *E. coli* OP50 besitzt. Diese Platten werden zu Beginn des Experiments auf Eis gekühlt, so dass die später darauf pipettierten Würmer erstarren und sich nicht fort bewegen.
Sobald die Würmer im richtigen Alter sind (junge Adulte), werden sie mit M9 Puffer abgewaschen und in ein Falcon-Röhrchen zum Sedimentieren überführt. Der Überstand wird verworfen.
Für das Beschießen wird *C. elegans* mit einer abgeschnittenen Pipettenspitze (gelb) vorsichtig aufgenommen und mit M9 Puffer verdünnt (100 µl Wurmpellet + 50 µl M9). Nun werden mit der gleichen Spitze 20 µl der Verdünnung auf die Bakterien der vorgekühlten Platten pipettiert. Es sollten ca. 2-3 Wurmschichten übereinander liegen. Die Platten mit den Würmern werden so lange auf Eis inkubiert, bis das Wurmpellet fest ist, dann sind die Würmer fertig zum Beschießen. Nach dem Beschießen wird jede beschossene Platte in 6 gleich große Stücke geteilt. Jedes Stück kommt auf eine große Platte (8,5 cm Durchmesser) mit Futterbakterien.

4.3.2 Vorbereitung der DNA

Die DNA wird mit Hilfe von Goldpartikeln (von Gold Chem Pur, Karlsruhe) in *C. elegans* geschossen. Dafür wird 1 mg Goldpartikel (0,3 – 3 µm, 99,9%) in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß eingewogen. Dazu kommen 100 µl 50 mM Spermidinlösung in H_2O. Das ganze wird gemischt (vortexen) und für 5-10 s in ein Ultraschallbad gegeben um Goldklümpchen zu lösen. Anschließend werden 16 µg DNA (1 µg/µl) dazu gegeben und 10 min inkubiert. Das Reaktionsgefäß soll dabei einige Male mit dem Finger zum aufmischen „angeschnippt“ werden. Nach der Inkubation werden 100 µl 1 M $CaCl_2$ Lösung tropfenweise zugegeben und

für 10 min präzipitiert. Anschließend wird die Lösung 15 s bei 13000 upm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Zum Schluß zweimal mit 1 ml absolutem, nicht vergälltem EtOH waschen und 200 µl PVP Lösung (10 mg PVP, 500 µl H_2O, 99,5 ml EtOH absolut nicht vergällt) aufnehmen. Pro Schuß werden 20 µl eingesetzt, ein Ansatz reicht für 7-8 Schüsse.
Die DNA Lösung wird auf das Sieb in der Schießvorrichtung pipettiert und die Platte mit den Würmern darunter gestellt. Sobald ein Vakuum von -0,4 Bar erreicht ist wird der Auslöser gedrückt. Es erfolgt ein Schuß mit einem Druck von 8 Bar Helium für ca.1 ms.

4.4 Mikroskopische Untersuchungen von C. elegans mit GFP

Einerseits wurden Deletionsmutanten unter dem Mikroskop auf mögliche Defekte hin untersucht, andererseits wurde die Expression von verschiedenen Promotoren ebenfalls unter dem Mikroskop analysiert.
Dazu wurden Eier und Würmer in allen Entwicklungsstadien mit einer 10 mM Natriumazid Lösung von den Platten abgespült, 30 - 60 min darin inkubiert und dann zur Analyse auf Objektträger mit Agarkissen pipettiert (ca. 7 µl Würmer in Na-Azid). Die Analyse wurden an einem Zeiss Axioplan Mikroskop unter Verwendung eines 40 x Objektives durchgeführt. Für alle Analysen wurden verschiedene GFP Varianten als Marker eingesetzt und die einzelnen Farbvarianten mit engen Bandpassfiltern getrennt: CFP: D436/20, 455DCLP und D480/40; GFP: HQ480/20, Q495/20LP, und HQ510/20; YFP: HQ500/20, Q515LP und HQ535/30; DsRed2: HQ565/30, Q585LP und HQ620/60.
Das grün fluoreszierende Protein (GFP) der Qualle *Aequoria victoria* und deren Derivate CFP (Y66W, N146I, M153T, V163A, (Heim and Tsien 1996) und YFP (S65G, V68A, S72A, T203Y) (Ormö et al. 1996) sowie DsRed2 (Clontech™) haben folgende Absorbtions- und Emmissionsmaxima:

Protein	Absorbtion	Emmission
CFP	433 nm	475/481* nm
GFP	489 nm	511 nm
YFP	513 nm	527/531* nm
DsRed2	558 nm	583/586 *nm

* siehe (Hutter 2004)

Zur Darstellung der Expressionsmuster sowie der Defekte der Deletionsmutanten wurden Anfnahmen an einem Leica SP2 konfokalen Mikroskop mit der dazu gehörigen Software

gemacht. Das Anregungslicht wurde von Argon- und Helium-Lasern generiert. Zur klaren Trennung der Kanäle von multi-GFP Stämmen war es ausreichend, die Daten der verschiedenen Kanäle nacheinander auf zu nehmen. Stapel von konfokalen Bildern wurden mit einem Abstand von 0,3-0,5 µm zwischen den einzelnen Aufnahmeebenen aufgenommen. Maximalprojektionen solcher Stapel zur Darstellung in dieser Arbeit wurden mit *Image J* Software erstellt und mit *Adobe Photoshop CS* und *Adobe Ilustrator CS* bearbeitet.

4.5 Zellidentifizierung in C. elegans

Die Identifizierung von einzelnen Zellen ist in *C. elegans* einerseits durch den vollständig bekannten Zellstammbaum und andererseits durch die invarianten Positionen der Zellen möglich. Die Identifizierung erfolgt mit Hilfe schon bekannter Expressionsmuster. Als Referenz wurde *unc-129* (DA und DB Motorneurone), *unc-47* (DD und VD Motorneurone), *glr-1* (Interneurone, vor allem im Ventralstrang), die Amphid und Phasmid Neurone (Dialkyl-Indocarbocyanin (DiI)-Färbung), sowie die Darstellung von R. Durbin (Durbin 1987) verwendet.

Außerdem steht im Internet unter *http://www.wormatlas.org/index.htm* ein Anatomieatlas zur Verfügung.

Mit Hilfe des Programms *Image J* wurden Expressionsmuster, die mit dem konfokalen Mikroskop aufgenommen wurden, analysiert. ImagJ ermöglicht durch ein von H. Hutter geschriebenes Plugin, Bilder aller Schnittebenen zu erzeugen, sowie DIC/Normarski und Fluoreszenzbilder übereinander zu legen was die Identifikation erleichtert.

In DIC/Nomarski Bildern kann man neuronale Zellkerne (klein, rund, punktiert/getüpfelt) gut von hypodermalen (ebenfalls rund aber größer, mit großem gut erkennbarem Nukleolus) und Muskelzellkernen (eiförmig, mittelgroß, kleiner kugelförmiger Nukleolus) unterscheiden. Die Zellidentifikation wird am Besten an jungen L1 Larven durchgeführt, da in diesem Stadium vor allem die Nervenzellen gut zu erkennen sind.

Einige Zellen sind schwierig zuzuordnen, da sie eine gewisse Variabilität ihrer Position zeigen: posterior- laterales Ganglion im Kopf (AIN, RIC, AIZ, ADEso, AVD), die anterioren Gliazellen (AMso, ILsh, ILso, OLQso) sowie die post - embryonaler Neurone im Schwanz und im Ventralstrang.

V. ANHANG

1.1 Abkürzungen

A	Adenosin
AA	Aminosäure (n) (*amino acid*)
Abb.	Abbildung
AS	siehe AA
C	Cytosin
C.elegans	*Caenorhabditis elegans*
cDNA	komplementäre DNA
CFP	blau (*cyan*) fluoreszierendes Protein
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
D. melanogaster	*Drosophila melanogaster*
DNA	Desoyribonukleinsäure
DsRed	rot fluoreszierendes Protein
E. coli	*Escherichia coli*
EDTA	Ethylendiaminotetraacetat
EMS	Ethylmethylsulfonat
et al.	und Mitarbeiter (et aliter)
EtOH	Ethanol
F3	Fibronektin
G	Guanosin
GFP	grün (*green*) fluoreszierendes Protein
GPI -Anker	Glycosyl-phosphatidyl-inositol - Anker
Ig	Immunglobulin
IgCAM	Immunglobulin Zelladhesionsmolekül
IgSF	Immunglobulin Superfamilie
L1-4	Larvenstadien von *C. elegans*
LB	Nährmedium für Bakterien: *Luria Broth*
M9	*C.elegans* Puffer
NGM	Nährmedium für *C. elegans*
OD	optische Dichte
p.a.	pro analysis
PCR	Polymerasekettenreaktion (*polymerase chain reaction*)
pH	negativ dekadischer Logarythmus der H^+-Inonenkonzentration
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
RTK	Rezeptor Tyrosin Kinase
RVG	Retrovesikularganglion
S. cerevisiae	*Saccharomyces cerevisiae*
SDS	Natrium-Dodecyl-Sulfat*sodium-dodecyl-sufat*
T	Thymidin
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TE	Tris EDTA
Tris	Tris-Hydroxymethylaminomethan
WT	Wildtyp
YFP	gelb (*yellow*) fluoreszierendes Protein
YPD	Hefevollmedium (*yeast extract, peptone, dextrose*)
mRNA	*messenger* RNA (Ribonukleinsäure)

1.2 Einheiten und Vorsätze:

°C	Grad Celcius
µ	mikro (10^{-6})
bp	Basenpaare
cm	Zentimeter
g	Gramm
h	Stunde
k	kilo (10^{3})
kb	Kilobasen
l	Liter
m	milli (10^{-3})
M	molar (mol/l)
min	Minute
mm	Millimeter
Mol	ca. 6,023 x 10^{23} Moleküle
n	nano (10^{-9})
p	pico (10^{-12})
s	Sekunde(n)
u	Einheit der Enzymaktivität (*unit*)
upm	Umdrehungen pro Minute

1.3 Primersequenzen

Primer für Klonierungen und Fusions-PCR

Name	Sequenz
VS_Y42H9B.2_1	ttcatttgtgtccgtccgttgc
HH_Y42H9B.2_2	cgttcctccatgtgtacttctcct
VS_lad-2fu_1	aagagaatgagggaaatttgaa
VS_lad-2fu_2	aaattgaggtgtttttgttggg
VS_lad-2fu_3	agtagccgttgaaggaaaactg
VS_C33F10.5afu_1	aaagagataagggtagtcgct
VS_C33F10.5afu_2	tggaaacctatgtagtagctg
VS_C33F10.5afu_3	ccaaaaagaagatgtgccgac
VS_C33F10.5cfu_1	ccatctcaaaccgcttcagca
VS_C33F10.5cfu_2	cacacttgtactttccagcat
VS_C33F10.5cfu_3	cctaactccctacgcttttcc
sv_K09E2.4_1	gggacgaagtaggaataatgtgga
sv_K09E2.4_2	gcaatcattgtagaattcctcatt
VS_F02G3.1_1	atctcgtgagccgtgttgttga
VS_F02G3.1afu_2	tcatcctgtgctttgccggtg
VS_F02G3.1fu_3	gtcatgttagatcaaagatcg
VS_F02G3.1cfu_2	tgacacatttgcgccgagttg
VS_F39H12.4_1	atgagatcttaccgacttccttatgg
VS_F39H12.4fu_2	ccctccc[a/g]tctggttggtagaatt
VS_F39H12.4fu_3	cacccttccgcatgtggttt
VS_SSSD1.1_1	catttctcgggaacgccaagat
VS_SSSD1.1fu_2	[tt/ta]agatttgagactgcttgtattct
VS_SSSD1.1fu_3	gaatacacagacgatggtagt
Ce_neph_pr1	atcttgtgcctcccatctaaa
Ce_neph_pr2	tggaatcactccacgtctgaa
sv_F41D9.3_1	gtctcaatactcaccacccttt
sv_F41D9.3_2	agcagaaccaatttcatcatgc
VS_C53B7.1_1	ggaaaaatgtgagatcttcg
VS_C53B7.1_2	gaatgaagttcttctgcaagg
K02E10.8_aag_1	taatggtcagcccgatagaaatag
K02E10.8_aag_2	ctgccaccgtacc[a/t]tctttctgcc

VS_rig-5fu_1	tcctaatccgtttgctttccc
VS_rig-5fu_2	gcaaacttgtgatgtttctgg
VS_rig-5fu_3	ccgagatagtgcgaagcaagt
HH_GFPfu_2	aagggcccgtacggccgactagtagg
HH_GFPfu_3	agcttgcatgcctgcaggtcgact
HH_GFPfu_4	ggaaacagttatgtttggtatattggg

Primer für die Isolierung von Deletionsmutanten

Name	Sequenz
HH_Y42H9B.2_dx1	ttctggccaagttggatagttt
HH_Y42H9B.2_dx2	gaaaacggcaagaattttgaac
HH_Y42H9B.2_dp1	atattggcagctgatgttcctt
HH_Y42H9B.2_di1	atgcttggcctaaagaagacag
HH_Y42H9B.2_di2	ccttcactcgtgctatcagttg
HH_Y54G2A.25_dx1	gaaagctcaaaaacatggttcc
HH_Y54G2A.25_dx2	cacttttcacgacagctttttg
HH_Y54G2A.25_dp1	tcttggcattggtctattcaca
HH_Y54G2A.25_di1	gtgctgttccattatggtttga
HH_Y54G2A.25_di2	attctctacgcagcgttctctc
HH_K09E2.4_dx1	gccaccccactcacttttta
HH_K09E2.4_dx2	ttgcacatccctcattgtgt
HH_K09E2.4_di1	agcgttaagtttgacggctg
HH_K09E2.4_di2	tttgatctgcccatgtttga
HH_K09E2.4_dp1	aagctcgcatgcaatcagtt
HH_F02G3.1_dx1	acctcagaaaattccgaagaaac
HH_F02G3.1_dx2	ggactaaaaataccacctgaccc
HH_F02G3.1_di1	tgaacgatgaggaagaccatact
HH_F02G3.1_di2	ttccttgtacgtgacagactacg
HH_F02G3.1_dp2	tttgaagtcaagtttggaatggt
HH_SSSD1.1_dx1	ttgcacaagtctccatgctc
HH_SSSD1.1_dx2	tttttcggaagtcgtccatc
HH_SSSD1.1_di1	aacgagttatgttggaccgc
HH_SSSD1.1_di2	gggttcgaacatgcgttaat
HH_SSSD1.1_dp1	cgccctcaaaaacgtatcag
HH_C26G2.1_dx1	gtttgtttgggagaaggatgag
HH_C26G2.1_dx2	ggatgaaaattggatagggaca
HH_C26G2.1_di1	ccgacgactacaccaagaaagt
HH_C26G2.1_di2	gcggacttgtgttattgtttga
HH_C26G2.1_dp2	ctagatgcaaatcctctggcat
HH_F41D9.3_dx3	tgagctcacgtggactgttc
HH_F41D9.3_dx4	gcttttccttcttcgcacac
HH_F41D9.3_di3	tagcacattcttggagcacg
HH_F41D9.3_di4	ccacattaccgtgtcgtcag
HH_F41D9.3_dp4	agaaaatggggaaatttggg
HH_F41D9.3_dx5	cacgaccgaattttacaactga
HH_F41D9.3_dx6	agatgagtgattgatggcacac
HH_F41D9.3_di5	gcacgctgtacagaactgtgtt
HH_F41D9.3_di6	ttgcagctttcctcctatcatt
HH_F41D9.3_dp6	aagtccaagaatcagcagaacc
HH_C53B7.1_dx1	tcttccaatgaggcaaatcc
HH_C53B7.1_dx2	atcctcatcggacactccag
HH_C53B7.1_di1	cgtcatttcatcagaagcca
HH_C53B7.1_di2	ccagatgatggagtgcctct
HH_C53B7.1_dp1	tggacaattgctggaaatga
HH_C53B7.1_dx3	tttctcaaggagcacatctcaa
HH_C53B7.1_dx4	ctgacggtcttccgtatttttc
HH_C53B7.1_di3	aacgatttgggcacttacaaat
HH_C53B7.1_di4	gtttaaggttcctgatgcttgc
HH_C53B7.1_dp3	agatccagatcttccaatgacc
HH_K02E10.8_dx1	tgctttgtcagtgccttttg

HH_K02E10.8_dx2	aaaccggaggagattgtgtg
HH_K02E10.8_di1	gcacttatctggtggccttc
HH_K02E10.8_di2	attccgagatttgacaagcg
HH_K02E10.8_dp2	gtctgccaccgtaccatctt
HH_C36F7.4a_dx1	ttttattttggagggtgagaagag
HH_C36F7.4a_dx2	ttgttttaaaatagcatgcctgaa
HH_C36F7.4a_di1	aattgacaacaacgacgatttaga
HH_C36F7.4a_di2	acatacatgcgatatttgagtgct
HH_C36F7.4a_dp2	tccaaaatgagatgattgaacatt

[x/y] WT Sequenz geändert von Nukleotid x zu y.

1.4 *C. elegans* Stämme

Allgemeine Stämme

Stamm	Genotyp	Referenz
CZ333	*juIs1[unc-25::SNB-GFP]*	Y. Jin
EG1306	*oxIs12[unc-47::GFPNTX;lin-15(+)] X*	E. Jorgensen
GE24	*pha-1(e2123ts) III*	R. Schnabel
MT9495	*nIs96[lin-11:GFP, lin-15(+)] V*	B. Horvitz
NW1229	*evIs111[F25B3.3::GFP] V*	CGC
OH2301	*pha-1(e2123ts)III; otEx231[lad-2::GFP, pha-1(+)]*	O. Hobert
OH2302	*otIs29[rig-5::GFP, rol-6(su1006)]*	O. Hobert
OH2303	*pha-1(e2123ts) III; otEx221[C33F10.5b::GFP], pha-1(+)]*	O. Hobert
VH1092	*pha-1(e2123ts) III; hdEx290[T02C5.3::GFP, pha-1(+)]*	
VH274	*pha-1(e2123ts) III; hdEx99[F41D9.3::YFP, pha-1(+)]*	
VH278	*pha-1(e2123ts) III; hdEx102[K09E2.4::YFP, pha-1(+)]*	
VH288	*hdIs8[him-4::GFP, rol-6(su1006)]*	
VH318	*hdIs10[unc-129::CFP, glr-1::YFP, unc-47::DsRed, hsp-16::rol-6] V*	
VH324	*pha-1(e2123ts) III; hdEx132[K02E10.8::YFP, pha-1(+)]*	
VH33	*rhIs7[unc-4::GFP, rol-6(su1006)] III*	
VH414	*hdIs14[odr-2::CFP, unc-129::YFP, glr-1::DsRed, hsp-16::rol6] IV*	
VH448	*unc-6(ev400) X; hdIs10 V*	
VH451	*unc-6(ev400) X; hdIs14 IV*	
VH489	*unc-6(ev400) X; evIs111 V*	
VH648	*hdIs26[odr-2::CFP, sra-6::DsRed2] III*	
VH654	*hdIs29[odr-2::CFP, sra-6::DsRed2]*	
VH697	*lin-15(n765ts) X; hdEx219[K02E10.8::YFP, lin-15(+)]*	
VH698	*lad-2(hd31)*	
VH700	*lad-2(hd31); evIs111[F25B3.3::GFP] V*	
VH790	*SSSD1.1(hd32)*	
VH795	*hdEx239[rig-3::DsRed2, rol-6(su1006)]*	
VH811	*N2 ancestral wild type*	CGC
VH813	*cdh-1(hd44)*	
VH862	*cdh-1(hd44) III; hdEx238[rig-3::DsRed2, rol-6(su1006)]*	
VH94	*rhIs16[glr-1::CFP, dpy-20(+)] X*	
VH577	*hdIs22[unc-129::CFP, unc-47::DsRed2] V*	
VH563	*rhIs16[glr-1::CFP, dpy-20(+)] X; nIs96 V*	

Eigene Stämme

Stamm	Genotyp
VH486	*rig-1(hd15) X*
VH528	*wrk-1(hd17) X*
VH529	*rig-2(hd18) X*
VH530	*rig-3(hd19) X*
VH566	*rig-1(hd15) X*

VH620	*rig-3(hd19) X*
VH621	*wrk-1(hd17) X*
VH625	*rig-2(hd18) X*
VH630	*rig-1(hd15) X; hdIs14[odr-2::CFP, unc-129::YFP, glr-1::DsRed, hsp-16::rol6] IV*
VH631	*rig-1(hd15) X; evIs111[F25B3.3::GFP] V*
VH632	*rig-1(hd15) X; hdIs10[unc-129::CFP, glr-1::YFP, unc-47::DsRed, hsp-16::rol-6] V*
VH667	*rig-3(hd19) X; hdIs10[unc-129::CFP, glr-1::YFP, unc-47::DsRed, hsp-16::rol-6] V*
VH668	*rig-3(hd19) X; hdIs14[odr-2::CFP, unc-129::YFP, glr-1::DsRed, hsp-16::rol6] IV*
VH669	*rig-3(hd19) X; evIs111[F25B3.3::GFP] V*
VH670	*wrk-1(hd17) X; hdIs10[unc-129::CFP, glr-1::YFP, unc-47::DsRed, hsp-16::rol-6] V*
VH671	*wrk-1(hd17) X; hdIs14[odr-2::CFP, unc-129::YFP, glr-1::DsRed, hsp-16::rol6] IV*
VH672	*wrk-1(hd17) X; evIs111[F25B3.3::GFP] V*
VH677	*rig-2(hd18) X; hdIs10[unc-129::CFP, glr-1::YFP, unc-47::DsRed, hsp-16::rol-6] V*
VH678	*rig-2(hd18) X; hdIs14[odr-2::CFP, unc-129::YFP, glr-1::DsRed, hsp-16::rol6] IV*
VH679	*rig-2(hd18) X; evIs111[F25B3.3::GFP] V*
VH717	*rig-1(hd15) X ; hdEx102[K09E2.4::YFP]*
VH718	*hdEx102[K09E2.4::YFP]; rhIs16[glr-1::CFP, dpy-20(+)] X*
VH720	*wrk-1(hd17) X; hdEx99[F41D9.3::YFP]*
VH721	*hdIs26[odr-2::CFP, sra-6::DsRed2] III; hdEx99[F41D9.3::YFP]*
VH755	*wrk-1(hd45) X*
VH756	*wrk-1(hd46) X*
VH757	*rig-4(hd47) IV*
VH758	*rig-5(hd48) I*
VH759	*F02G3.1(hd49) X*
VH820	*C26G2.1(hd50) X*
VH821	*wrk-1(hd45) X*
VH822	*wrk-1(hd46) X*
VH833	*rig-3(hd51) X*
VH834	*rig-4(hd47) IV*
VH848	*hdIs16[glr-1::YFP, unc-47::YFP, unc-129::YFP, rol-6(su1006)]; hdEx239[rig-3::DsRed2, rol-6(su1006)]*
VH857	*C26G2.1(hd50) X*
VH858	*rig-5(hd48); rhIs16[glr-1::CFP, dpy-20(+)] X*
VH860	*ncam-1(hd49)*
VH861	*wrk-1(hd45) X; hdEx99[wrk-1::YFP]*
VH866	*wrk-1(hd46) X; hdEx99[wrk-1::YFP]*
VH867	*rig-4(hd47) IV; oxIs12[unc-47::GFPNTX, lin-15(+)] X*
VH869	*hdEx247[rig-3::DsRed2]*
VH870	*hdEx248[rig-3::DsRed2]*
VH871	*hdEx249[rig-3::DsRed2]*
VH890	*rig-5(hd48) I; evIs111[F25B3.3::GFP] V*
VH891	*rig-4(hd47) IV; evIs111[F25B3.3::GFP] V*
VH892	*wrk-1(hd45) X; evIs111[F25B3.3::GFP] V*
VH893	*wrk-1(hd46) X; evIs111[F25B3.3::GFP] V*
VH894	*rig-2(hd18) wrk-1(hd45) X*
VH910	*rig-3(hd51) X; evIs111[F25B3.3::GFP] V*
VH911	*cdh-1(hd44) III; rig-3(hd51) X; evIs111[F25B3.3::GFP] V*
VH912	*rig-4(hd47) IV; wrk-1(hd45) X*
VH913	*cdh-1(hd44) III; rig-3(hd51) X*
VH914	*rig-4(hd47) IV; rig-2(hd18) X*
VH921	*C26G2.1(hd50) X; evIs111[F25B3.3::GFP] V*
VH923	*rig-3(hd51)X; hdEx239[rig-3::DsRed2, rol-6(su1006)]*
VH937	*rig-3(hd51) X; hdIs10[unc-129::CFP, glr-1::YFP, unc-47::DsRed, hsp-16::rol-6] V*
VH938	*ast-1(rh300) rol-6(e187)II; rig-3(hd51) X; hdIs10 V*
VH939	*rig-4(hd47) IV; hdIs10[unc-129::CFP, glr-1::YFP, unc-47::DsRed, hsp-16::rol-6] V*
VH940	*ast-1(rh300) rol-6(e187) II; rig-4(hd47) IV; hdIs10 V*
VH941	*rig-5(hd48) I; hdIs10[unc-129::CFP, glr-1::YFP, unc-47::DsRed, hsp-16::rol-6] V*
VH942	*wrk-1(hd45) X; hdIs10[unc-129::CFP, glr-1::YFP, unc-47::DsRed, hsp-16::rol-6] V*
VH943	*ast-1(rh300) rol-6(e187)II; wrk-1(hd45) X; hdIs10 V*
VH944	*F02G3.1(hd49) X; evIs111[F25B3.3::GFP] V*
VH946	*cdh-1(hd44) III; rig-3(hd51) X; hdEx238[rig-3::DsRed2, rol-6(su1006)]*
VH947	*ast-1(rh300) rol-6(e187) II; rig-1(hd15) X; hdIs10 V*
VH949	*rig-2(hd18) X; nIs96[lin-11::GFP, lin-15(+)] V*

VH985	*hdEx262[rig-4::DsRed2,rol-6(su1006)]*
VH986	*hdEx263[rig-4::DsRed2,rol-6(su1006)]*
VH987	*hdEx264[rig-4::DsRed2,rol-6(su1006)]*
VH988	*hd45(wrk-1) X; hdIs22[unc-129::CFP, unc-47::DsRed2] V*
VH989	*hd46(wrk-1) X; hdIs22[unc-129::CFP, unc-47::DsRed2] V*
VH990	*lad-2(hd31) IV; otEx231[lad-2::GFP, pha-1(+)]*
VH991	*C26G2.1(hd50) X; hdIs8[him-4:GFP, rol-6(su1006)]*
VH992	*rig-3(hd51)X; juIs1[unc-25::snb-1-GFP] IV*
VH993	*rig-4(hd47)IV; nIs96[lin-11::GFP, lin-15(+)] V*
VH994	*rig-4(hd47)IV; rig-2(hd18) X; hdIs10[unc-129::CFP, glr-1::YFP, unc-47::DsRed, hsp-16::rol-6] V*
VH995	*rig-4(hd47)IV; wrk-1(hd45) X; hdIs10[unc-129::CFP, glr-1::YFP, unc-47::DsRed, hsp-16::rol-6] V*
VH996	*rig-2(hd18) X wrk-1(hd45) X; hdIs10[unc-129::CFP, glr-1::YFP, unc-47::DsRed, hsp-16::rol-6] V*
VH859	*rig-3(hd51) X*
VH1053	*wrk-1(hd46) X; hdIs26[odr-2::CFP, sra-6::DsRed2] III*
VH1054	*wrk-1(hd45) X; hdIs26[odr-2::CFP, sra-6::DsRed2] III*
VH1055	*rig-3(hd51) X; hdIs26[odr-2::CFP, sra-6::DsRed2] III*
VH1056	*rig-1(hd15) rig-3(hd51) X*
VH1057	*rig-5(hd48) I; otIs29[rig-5::GFP, rol-6]*
VH1084	*rig-1(hd15) X rig-3(hd51) X; hdIs10[unc-129::CFP, glr-1::YFP, unc-47::DsRed, hsp-16::rol-6] V*
VH1085	*rig-1(hd15) X rig-3(hd51) X; evIs111[F25B3.3::GFP] V*
VH1086	*rig-2(hd18) X; rhIs7[unc-4::GFP]*
VH1087	*rig-2(hd18) X; hdIs8[him-4::GFP]*
VH1088	*rig-4(hd47) IV; rhIs7[unc-4::GFP]*
VH1089	*lad-2(hd31) IV; hdIs10[unc-129::CFP, glr-1::YFP, unc-47::DsRed, hsp-16::rol-6] V*
VH1090	*SSSD1.1(hd32) X; evIs111[F25B3.3::GFP] V*
VH1091	*SSSD1.1(hd32) X; hdIs10[unc-129::CFP, glr-1::YFP, unc-47::DsRed, hsp-16::rol-6] V*
VH1104	*rig-1(hd15) X; hdIs26[odr-2::CFP, sra-6::DsRed2] III*
VH1105	*rig-2(hd18) X; hdIs26[odr-2::CFP, sra-6::DsRed2] III*
VH1106	*rig-4(hd47) IV; hdIs26[odr-2::CFP, sra-6::DsRed2] III*
VH1107	*rig-5(hd48) I; hdIs26[odr-2::CFP, sra-6::DsRed2] III*
VH1108	*rig-2(hd18) X; wrk-1(hd45) X; hdIs26[odr-2::CFP, sra-6::DsRed2] III*
VH1109	*rig-4(hd47) IV; wrk-1(hd45) X; hdIs26[odr-2::CFP, sra-6::DsRed2] III*
VH1110	*rig-4(hd47) IV; rig-2(hd18) X; hdIs26[odr-2::CFP, sra-6::DsRed2] III*
VH1111	*rig-1(hd15) rig-3(hd51) X; hdIs26[odr-2::CFP, sra-6::DsRed2] III*
VH1144	*cdh-1(hd44) III; rig-3(hd51) X; hdIs29[odr-2::CFP, sra-6::DsRed2]*
VH1164	*pha-1(e2123ts) III; hdEx316[syg-2::YFP, pha-1(+)]*
VH1165	*pha-1(e2123ts) III; hdEx317[syg-2::YFP, pha-1(+)]*
VH1166	*pha-1(e2123ts) III; hdEx318[rig-3::YFP, pha-1(+)]*
VH1167	*pha-1(e2123ts) III; hdEx319[rig-3::YFP, pha-1(+)]*
VH1201	*rig-1(hd15) X; hdIs10 V; hdEx320[K09E2, unc-122::GFP]*
VH1202	*rig-1(hd15) X; hdIs10 V; hdEx321[K09E2, unc-122::GFP]*
VH1203	*rig-1(hd15) X; hdIs10 V; hdEx322[K09E2, unc-122::GFP]*
VH1204	*rig-1(hd15) X; hdIs10 V; hdEx323[K09E2, unc-122::GFP]*
VH1205	*syg-1(hd18) X; hdIs10 V; hdEx324[C54A10, unc-122::GFP]*
VH1206	*rig-5(hd48) I; hdIs10 V; hdEx325[C36F7, unc-122::GFP]*
VH1207	*rig-5(hd48) I; hdIs10 V; hdEx326[C36F7, unc-122::GFP]*
VH1208	*rig-5(hd48) I; evIs111[F25B3.3::GFP] V; hdEx327[C36F7, unc-122::GFP]*
VH1209	*wrk-1(hd45) X; evIs111[F25B3.3::GFP] V; hdEx328[F41D9, unc-122::GFP]*
VH1210	*wrk-1(hd45) X; evIs111[F25B3.3::GFP] V; hdEx329[F41D9, unc-122::GFP]*
VH1211	*wrk-1(hd46) X; evIs111[F25B3.3::GFP] V; hdEx330[F41D9, unc-122::GFP]*
VH1212	*wrk-1(hd46) X; evIs111[F25B3.3::GFP] V; hdEx331[F41D9, unc-122::GFP]*
VH1223	*pha-1(e2123ts) III; hdEx332[C36F7.4b_intron4::YFP, pha-1(+)]*
VH1224	*pha-1(e2123ts) III; hdEx333[C33F10.5a::YFP, pha-1(+)]*
VH1225	*pha-1(e2123ts) III; hdEx334[C33F10.5a::YFP, pha-1(+)]*
VH1226	*pha-1(e2123ts) III; hdEx335[F02G3.1a::YFP, pha-1(+)]*
VH1227	*pha-1(e2123ts) III; hdEx336[F02G3.1a::YFP, pha-1(+)]*
VH1228	*pha-1(e2123ts) III; hdEx337[lad-2a::YFP, pha-1(+)]*
VH1229	*pha-1(e2123ts) III; hdEx338[lad-2a::YFP, pha-1(+)]*
VH1230	*pha-1(e2123ts) III; hdEx339[SSSD1.1::YFP, pha-1(+)]*
VH1231	*pha-1(e2123ts) III; hdEx340[SSSD1.1::YFP, pha-1(+)]*
VH1246	*pha-1(e2123ts) III; hdEx341[F39H12.4::YFP, pha-1(+)]*
VH1247	*pha-1(e2123ts) III; hdEx342[C36F7.4b_intron4::YFP, pha-1(+)]*

VH1248 *pha-1(e2123ts) III; hdEx343[F02G3.1c::YFP, pha-1(+)]*
VH1249 *pha-1(e2123ts) III; hdEx344[F02G3.1c::YFP, pha-1(+)]*
VH1250 *pha-1(e2123ts) III; hdEx345[C33F10.5c::YFP, pha-1(+)]*
VH1251 *pha-1(e2123ts) III; hdEx346[C33F10.5c::YFP, pha-1(+)]*

1.5 Die deletierten Bereiche der Mutanten

Allel	Deletion	Chromosom	von..bis bp	Anfang..Ende der deletierten Sequenz
hd47	742 bp	IV	7992138..7992880	gcatcattccaattaaaaggaacat..taaaaaaaataaagcaagatctatt
hd31	702 bp	IV	2965097..2965799	atgttttcccagaaaatttgtagtt..tcgatggtgatcgatgtcgatgaat
hd15	527 bp	X	8661473..8662000	gaagctcgcatgcaatcagttgtat..tcgtagtttttataaaaaactttt
hd49	698 bp	X	700866..701564	ctacccgaactatggaaaatgttca..aatcaagtgcagctgacaaatatca
hd32	777 bp	X	6379281..6380058	gcccattatgcattcgtattctacc..tcacacaccaacttttaaaaatcgt
hd50	338 bp	X	14660737..14661075	cctttcaacctaacaatgacaaatt..gaatgaagatggggtaaacgtggca
hd17	647 bp	X	8387023..8387670	tgctcccccaaatttccccattttc..tgcgattgaagagagtagaagacac
hd45	268 bp	X	8390873..8391141	tggttcattataccccctaatctctt..acatgttgctggtaagcattttcaa
hd46	714 bp	X	8391237..8391951	tgagttgtggagagaaccttgtgaa..ttgtcgtcatctctccagacactgg
hd19	554 bp	X	6859008..6859562	actgtggagttaaggggccatccgg..aaatgcgaagctaacaatatcaaag
hd51	1521 bp	X	6859601..6861122	agtttttttttgaatgttaatgttc..gacttcatcattcttgagtcacttg
hd18	1008 bp	X	2514383..2515391	ttctcaatattgcgtgtctctcttt..atattttaggcctgagttttattgc
hd48	928 bp	I	9574483..9575411	atgggatgggaaaaggatggagaac..caaaagaatggtcgctttttcgttt

Die Angaben „von..bis“ beziehen sich auf die absolute Position auf dem Chromosom.

VI. LITERATURVERZEICHNIS

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.

Ahmed, A., S. Chandra, et al. (2003). "echinoid mutants exhibit neurogenic phenotypes and show synergistic interactions with the Notch signaling pathway." Development **130**(25): 6295-6304.

Alberts, B., D. Bray, et al. (1994). Molecular Biology of the cell.

Araujo, S. J. and G. Tear (2003). "Axon guidance mechanisms and molecules: lessons from invertebrates." Nat. Rev. Neurosci. **4**: 910-921.

Aspock, G., H. Kagoshima, et al. (1999). "Caenorhabditis elegans Has Scores of hedgehogRelated Genes: Sequence and Expression Analysis." Genome Res. **9**(10): 909-923.

Augsburger, A., A. Schuchardt, et al. (1999). "BMPs as mediators of roof plate repulsion of commissural neurons." Neuron **24**: 127-141.

Aurelio, O., T. Boulin, et al. (2003). "Identification of spatial and temporal cues that regulate postembryonic expression of axon maintenance factors in the C. elegans ventral nerve cord." Development **130**(3): 599-610.

Aurelio, O., D. H. Hall, et al. (2002). "Immunoglobulin-domain proteins required for maintenance of ventral nerve cord organization." Science **295**(5555): 686-90.

Avci, H. X., P. Zelina, et al. (2004). "Role of cell adhesion molecule DM-GRASP in growth and orientation of retinal ganglion cell axons." Developmental Biology **271**(2): 291-305.

Bagnard, D., M. Lohrum, et al. (1998). "Semaphorins act as attractive and repulsive guidance signals during the development of cortical projections." Development **125**(24): 5043-53.

Barclay, A. N. (2003). "Membrane proteins with immunoglobulin-like domains--a master superfamily of interaction molecules." Semin Immunol **15**(4): 215-23.

Barinaga, M. (1996). "Guiding neurons to the cortex." Science **274**(5290): 1100-1.

Bennett, V. and L. Chen (2001). "Ankyrins and cellular targeting of diverse membrane proteins to physiological sites." Current Opinion in Cell Biology **13**(1): 61-67.

Bixby, J. L. and W. A. Harris (1991). "Molecular mechanisms of axon growth and guidance." Annu. Rev. Cell Biol. **7**: 117-159.

Blundell, T. L., B. L. Sibanda, et al. (1987). "Knowledge-based prediction of protein structures and the design of novel molecules." Nature **326**: 347-352.

Bodily, K. D., C. M. Morrison, et al. (2001). "A Novel Member of the Ig Superfamily, turtle, is a CNS-Specific Protein Required for Coordinated Motor Control." J. Neurosci. **21**(9): 3113-3125.

Boschert, U., R. G. Ramos, et al. (1990). "Genetic and developmental analysis of irreC, a genetic function required for optic chiasm formation in Drosophila." J Neurogenet **6**(3): 153-71.

Bour, B. A., M. Chakravarti, et al. (2000). "Drosophila SNS, a member of the immunoglobulin superfamily that is essential for myoblast fusion." Genes Dev. **14**(12): 1498-1511.

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

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**(1): 59-63.

Bruckner, K., J. Pablo Labrador, et al. (1999). "EphrinB ligands recruit GRIP family PDZ adaptor proteins into raft membrane microdomains." Neuron **22**(3): 511-24.

Brummendorf, T. and V. Lemmon (2001). "Immunoglobulin superfamily receptors: cis-interactions, intracellular adapters and alternative splicing regulate adhesion." Curr Opin Cell Biol **13**(5): 611-8.

Brümmendorf, T. a. R., F.G. (1995). Cell adhesion molecules 1: Immunoglobulin superfamily. P. Sheterline.

Bulow, H. E., T. Boulin, et al. (2004). "Differential Functions of the C. elegans FGF Receptor in Axon Outgrowth and Maintenance of Axon Position." Neuron **42**(3): 367-374.

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.

Burridge, K. and M. Chrzanowska-Wodnicka (1996). "Focal adhesions, contractility and signaling." Annu Rev Cell Dev Biol **12**: 4463-519.

Butler, S. J., S. Ray, et al. (1997). "klingon, a novel member of the Drosophila immunoglobulin superfamily, is required for the development of the R7 photoreceptor neuron." Development **124**(4): 781-92.

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.

Chan, S. S., 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**(2): 187-95.

Chen, H., A. Chedotal, et al. (1997). "Neuropilin-2, a novel member of the neuropilin family, is a high affinity receptor for the semaphorins Sema E and Sema IV but not Sema III." Neuron **19**(3): 547-59.

Chen, H., Z. He, et al. (1998). "Semaphorin-neuropilin interactions underlying sympathetic axon responses to class III semaphorins." Neuron **21**(6): 1283-90.

Chen, L., B. Ong, et al. (2001). "LAD-1, the Caenorhabditis elegans L1CAM homologue, participates in embryonic and gonadal morphogenesis and is a substrate for fibroblast growth factor receptor pathway-dependent phosphotyrosine-based signaling." J Cell Biol **154**(4): 841-55.

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**(7): 781-90.

Chisholm, A. and M. Tessier-Lavigne (1999). "Conservation and divergence of axon guidance mechanisms." Curr Opin Neurobiol **9**(5): 603-15.

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**(1): 211-24.

Clark, S. G., X. Lu, et al. (1994). "The Caenorhabditis elegans Locus lin-15, a Negative Regulator of a Tyrosine Kinase Signaling Pathway, Encodes Two Different Proteins." Genetics **137**(4): 987-997.

Cohen, N. R., J. S. Taylor, et al. (1998). "Errors in corticospinal axon guidance in mice lacking the neural cell adhesion molecule L1." Curr Biol **8**(1): 26-33.

Colavita, A., S. Krishna, et al. (1998). "Pioneer axon guidance by UNC-129, a C. elegans TGF-beta." Science **281**(5377): 706-9.

Committee, S. N. (1999). "Unified Nomenclature of the Semaphorins/Collapsins." Cell **97**: 551-552.

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.

Cremer, H., R. Lanage, et al. (1994). "Inactivation of the N-CAM gene in mice results in size reduction of the olfactory bulb and deficits in spatial learning." Nature **367**: 455-459.

Crossin, K. L. a. K. L. A. (2000). "Cellular Siganlling by Neural Cell Adhesion Molecules of the Immunoglobulin Superfamily." Developmental Dynamics **218**: 260-279.

Culotti, J. G. and D. C. Merz (1998). "DCC and netrins." Curr Opin Cell Biol **10**(5): 609-13.

Dickson, B. J. (2002). "Molecular mechanisms of axon guidance." Science **298**(5600): 1959-64.

Dickson, B. J. and K. Keleman (2002). "Netrins." Curr Biol **12**(5): R154-5.

Dodd, J. and T. M. Jessell (1988). "Axon guidance and the patterning of neuronal projections in vertebrates." Science **242**(4879): 692-9.

Doherty, P. and F. S. Walsh (1996). "CAM-FGF receptor interactions: a model for axonal growth." Mol Cell Neurosci **8**(2-3): 99-111.

Doudney, K., J. N. Murdoch, et al. (2002). "Cloning and Characterization of Igsf9 in Mouse and Human: A New Member of the Immunoglobulin Superfamily Expressed in the Developing Nervous System." Genomics **79**(5): 663-670.

Drickamer, K. and R. B. Dodd (1999). "C-type lectin-like domains in Caenorhabditis elegans: predictions from the complete genome sequence." Glycobiology **9**(12): 1357-1369.

Durbin, R. M. (1987). Studies on the Development and Organization of the Nervous System of *Caenorhabditis elegans*. King´s College. Cambridge, Cambridge**:** 121.

Dustin, M. L., P. Selvaraj, et al. (1987). "Anchoring mechanisms for LFA-3 cell adhesion glycoprotein at membrane surface." Nature **329**: 846-848.

Edelman, G. M. (1987). "CAMs and Igs: Cell Adhesion and the Evolutionary Origins of Immunity." Immunological Reviews **100**: 11-45.

Edgley, M., A. D'Souza, et al. (2002). "Improved detection of small deletions in complex pools of DNA." Nucleic Acids Res **30**(12): e52.

Emsley, J. G. and T. Hagg (2003). "alpha6beta1 integrin directs migration of neuronal precursors in adult mouse forebrain." Exp Neurol **183**(2): 273-85.

Esmaeili, B., J. M. Ross, et al. (2002). "The C. elegans even-skipped homologue, vab-7, specifies DB motoneurone identity and axon trajectory." Development **129**(4): 853-862.

Falk, J., C. Bonnon, et al. (2002). "F3/contactin, a neuronal cell adhesion molecule implicated in axogenesis and myelination." Biology of the Cell **94**(6): 327-334.

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.

Fire, A. (1986). "Integrative transformation of Caenorhabditis elegans." EMBO Journal **5**(10): 2673 - 2680.

Fire, A., S. Xu, et al. (1998). "Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in Caenorhabditis elegans." Nature **391**(6669): 806-11.

Fitzli, D., E. T. Stoeckli, et al. (2000). "A direct interaction of axonin-1 with NgCAM-related cell adhesion molecule (NrCAM) results in guidance, but not growth of commissural axons." J Cell Biol **149**(4): 951-68.

Fredette, B. J. and B. and Ranscht (1994). "T-cadherin expression delineates specific regions of the developing motor axon-hindlimb projection pathway." J. Neurosci. **14**: 7331-7346.

Furley, A. J., S. B. Morton, et al. (1990). "The axonal glycoprotein TAG-1 is an immunoglobulin superfamily member with neurite outgrowth-promoting activity." Cell **61**: 157-170.

Gale, N. W., S. J. Holland, et al. (1996). "Eph receptors and ligands comprise two major specificity subclasses and are reciprocally compartmentalized during embryogenesis." Neuron **17**(1): 9-19.

Gallo, G. and P. C. Letourneau (1998). "Axon guidance: GTPases help axons reach their targets." Curr Biol **8**(3): R80-2.

Granato, M., H. Schnabel, et al. (1994). "pha-1, a selectable marker for gene transfer in C. elegans." Nucleic Acids Res **22**(9): 1762-3.

Guan, K. L. and Y. Rao (2003). "Signalling mechanisms mediating neuronal responses to guidance cues." Nat Rev Neurosci **4**(12): 941-56.

Hahn, A. C. and S. W. Emmons (2003). "The roles of an ephrin and a semaphorin in patterning cell-cell contacts in C. *elegans* sensory organ development." Dev Biol **256**: 379-388.

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.

Harpaz, Y. and C. Chothia (1994). "Many of the immunoglobulin superfamily domains in cell adhesion molecules and surface receptors belong to a new structural set which is close to that containing variable domains." J Mol Biol **238**(4): 528-39.

Hart, A. C., S. Sims, et al. (1995). "Synaptic Code for Sensory Modalities Revealed by C-Elegans Glr-1 Glutamate Receptor." Nature **378**(6552): 82-85.

He, Z., K. C. Wang, et al. (2002). "Knowing how to navigate: mechanisms of semaphorin signaling in the nervous system." Sci STKE **2002**(119): RE1.

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 **4**(1): 61-85.

Heim, R. and R. Y. Tsien (1996). "Engineering green fluorescent protein for improved brightness, longer wavelengths and fluorescence resonance energy transfer." Current Biology **6**(2): 178-182.

Hobert, O. (2002). "PCR fusion-based approach to create reporter gene constructs for expression analysis in transgenic C. elegans." Biotechniques **32**(4): 728-30.

Hobert, O. and G. Ruvkun (1998). "A Common Theme for LIM Homeobox Gene Function Across Phylogeny?" Biol Bull **195**(3): 377-380.

Hogan, B. L. (1996). "Bone morphogenetic proteins in development." Curr Opin Genet Dev **6**: 432-438.

Huang, X., H. J. Cheng, et al. (2002). "MAX-1, a novel PH/MyTH4/FERM domain cytoplasmic protein implicated in netrin-mediated axon repulsion." Neuron **34**(4): 563-76.

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**: 509-63.

Hutter, H. (2003). "Extracellular cues and pioneers act together to guide axons in the ventral cord of C. elegans." Development **130**(22): 5307-18.

Hutter, H. (2004). "Five-colour in vivo imaging of neurons in Caenorhabditis elegans." J Microsc **215**(Pt 2): 213-8.

Hutter, H., B. E. Vogel, et al. (2000). "Conservation and novelty in the evolution of cell adhesion and extracellular matrix genes." Science **287**(5455): 989-94.

Hynes, R. O. and Q. Zhao (2000). "The evolution of cell adhesion." Journal of Cell Biology **150**(2): F89-F95.

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**(5): 873-81.

Jansen, G., E. Hazendonk, et al. (1997). "Reverse genetics by chemical mutagenesis in Caenorhabditis elegans." Nat Genet **17**(1): 119-21.

Kamiguchi, H. and V. Lemmon (2000). "IgCAMs: bidirectional signals underlying neurite growth." Curr Opin Cell Biol **12**(5): 598-605.

Keleman, K., S. Rajagopalan, et al. (2002). "Comm sorts robo to control axon guidance at the Drosophila midline." Cell **110**(4): 415-27.

Kemler, R. (1993). "From cadherins to catenins: cytoplasmic protein interactions and regulation of cell adhesion." Trends in Genetics **9**: 317-321.

Kennedy, T. E., T. Serafini, et al. (1994). "Netrins are diffusible chemotopic factors for the commissural axons in the embryonic spinal cord." Cell **78**: 425-435.

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**(2): 205-15.

Kidd, T., C. Russell, et al. (1998). "Dosage-sensitive and complementary functions of roundabout and commissureless control axon crossing of the CNS midline." Neuron **20**(1): 25-33.

Kim, S. and W. G. Wadsworth (2000). "Positioning of longitudinal nerves in C. elegans by nidogen." Science **288**(5463): 150-4.

Kiselyov, V. V., G. Skladchikova, et al. (2003). "Structural basis for a direct interaction between FGFR1 and NCAM and evidence for a regulatory role of ATP." Structure (Camb) **11**: 691-701.

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.

Kramer, J. M. (1997). pp. 471-500. C. elegans II. D. L. Riddle, T. Blumenthal, B. J. Meyer and J. R. Priess. Cold Spring Habor, NY, Cold Spring Habor Press.

Kramer, J. M., R. P. French, et al. (1990). "The *Caenorhabditis elegans rol-6* Gene, Which Interacts with the *sqt-1* Collagen Gene To Determine Organismal Morphology, Encodes a Collagen." Molecular and Cellular Biology **10**(5): 2081-2089.

Kullander, K. and R. Klein (2002). "Mechanisms and functions of Eph and ephrin signalling." Nat Rev Mol Cell Biol **3**(7): 475-86.

Lee, C.-H., T. Herman, et al. (2001). "N-cadherin regulates target specificity in the Drosophila visual system." Neuron **30**: 437-450.

Lin, D. M., R. D. Fetter, et al. (1994). "Genetic analysis of fascilin II in Drosophila: defasciculation, refasciculation, and altered fasciculation." Neuron **13**: 1055-1069.

Liu, L. X., J. M. Spoerke, et al. (1999). "High-throughput isolation of Caenorhabditis elegans deletion mutants." Genome Res **9**(9): 859-67.

Loria, P. M., J. Hodgkin, et al. (2004). "A Conserved Postsynaptic Transmembrane Protein Affecting Neuromuscular Signaling in Caenorhabditis elegans." J. Neurosci. **24**(9): 2191-2201.

Lundquist, E. A., P. W. Reddien, et al. (2001). "Three C. elegans Rac proteins and several alternative Rac regulators control axon guidance, cell migration and apoptotic cell phagocytosis." Development **128**(22): 4475-88.

Luo, Y., D. Raible, et al. (1993). "A protein in brain that induces the collapse and paralysis of neuronal growth cones." Cell **75**: 217-227.

Lyuksyutova, A. I., C. C. Lu, et al. (2003). "Anterior-posterior guidance of commissural axons by Wnt-frizzled signaling." Science **302**(5652): 1984-8.

Maloof, J. N., J. Whangbo, et al. (1999). "Wnt signalling pathway controls *hox* gene expression and neuroblast migration in *C. elegans*." Development **126**: 37-49.

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.

McIntire, S. L., R. J. Reimer, et al. (1997). "Identification and characterization of the vesicular GABA transporter." Nature **389**(6653): 870-6.

Mello, C., J. Kramer, et al. (1991). "Efficient gene transfer in C.elegans: extrachromosomal maintenance and integration of transforming sequences." EMBO J. **10**(12): 3959-3970.

Miller, D. and C. Niemeyer (1995). "Expression of the unc-4 homeoprotein in Caenorhabditis elegans motor neurons specifies presynaptic input." Development **121**(9): 2877-2886.

Möhrlen, F., H. Hutter, et al. (2003). "The astacin protein family in *Caenorhabditis elegans*." Eur. J. Biochem **270**: 4909-4920.

Moon, R. T., B. Bowerman, et al. (2002). "The promise and perils of Wnt signaling through ß-catenin." Science **296**: 1644-1646.

Murai, K. K. and E. B. Pasquale (2003). "´Eph´ective signaling: forward, reverse and crosstalk." J Cell Sci **116**: 2823-2832.

Nakamura, F., R. G. Kalb, et al. (2000). "Molecular basis of semaphorin-mediated axon guidance." J Neurobiol **44**(2): 219-29.

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**(19): 2486-500.

Nguyen, D. N., Y. Liu, et al. (1997). "The sidekick gene, a member of the immunoglobulin superfamily, is required for pattern formation in the Drosophila eye." Development **124**(17): 3303-12.

Noordermeer, J. N., C. C. Kopczynski, et al. (1998). "Wrapper, a novel member of the Ig superfamily, is expressed by midline glia and is required for them to ensheath commissural axons in Drosophila." Neuron **21**(5): 991-1001.

Orioli, D. and R. Klein (1997). "The Eph receptor family: axonal guidance by contact repulsion." Trends Genet **13**(9): 354-9.

Ormö, M., A. B. Cubitt, et al. (1996). "Crystal Structure of the Aequorea victoria Green Fluorescent Protein." Science **273**(5280): 1392-1395.

Osterfield, M., M. W. Kirschner, et al. (2003). "Graded positional information: interpretation for both fate and guidance." Cell **113**(4): 425-8.

Park, E. C. and H. R. Horvitz (1986). "Mutations with dominant effects on the behaviour and morphology of the nematode *Caenorhabditis elegans*." Genetics **113**: 821-852.

Pavlou, O., K. Theodorakis, et al. (2002). "Analysis of Interactions of the Adhesion Molecule TAG-1 and Its Domains with otther Immunoglobuline Superfamily Members." Molecular and Cellular Neuroscience **20**: 367-381.

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.

Pollerberg, G. E. and T. G. Mack (1994). "Cell adhesion molecule SC1/DMGRASP is expressed on growing axons of retina ganglion cells and is involved in mediating their extension on axons." Dev Biol **165**(2): 670-87.

Rajagopalan, S., V. Vivancos, et al. (2000). "Selecting a longitudinal pathway: Robo receptors specify the lateral position of axons in the Drosophila CNS." Cell **103**(7): 1033-45.

Ranscht, B. (2000). "Cadherins: molecular codes for axon guidance and synapse formation." Int J Dev Neurosci **18**(7): 643-51.

Rhee, J., N. Z. Mahfooz, et al. (2002). "Activation of the repulsive receptor roundabout inhibits N-cadherin-mediated cell adhesion." Nat Cell Biol **4**: 798-805.

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**: 207-38.

Roy, P., H. Zheng, et al. (2000). "mab-20 encodes Semaphorin-2a and is required to prevent ectopic cell contacts during epidermal morphogenesis in Caenorhabditis elegans." Development **127**(4): 755-767.

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**(5): 1283-94.

Rutishauser, U. (2000). "Defining a role and mechanism for IgCAM function in vertebrate axon guidance." J Cell Biol **149**(4): 757-60.

Saffell, J. L., E. J. Williams, et al. (1997). "Expression of a dominant negative FGF receptor inhibits axonal growth and FGF receptor phosphorylation stimulated by CAMs." Neuron **18**: 231-242.

Salzer, J. L. and D. R. Colman (1989). "Mechanisms of Cell Adhesion in the Nervous System: Role of the Immunoglobuline Gene Superfamily." Dev Neurosci **11**: 377-390.

Sasakura, H., Inada, H., Kuhara, A., Fusaoka, E., Takemoto, D., Takeuchi, K. and Mori, I (2005), "Maintainance of neuronal positions in organized ganglia by SAX-7, a *Caenorhabditits elegans* homolog of L1." The EMBO Journal 1-12.

Schmucker, D., J. C. Clemens, et al. (2000). "Drosophila Dscam is an axon guidance receptor exhibiting extraordinary molecular diversity." Cell **101**: 671-684.

Schneider, T., C. Reiter, et al. (1995). "Restricted expression of the irreC-rst protein is required for normal axonal projections of columnar visual neurons." Neuron **15**(2): 259-71.

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.

Shen, K. (2004). "Molecular mechanisms of target specificity during synapse formation." Curr Opin Neurobiol **14**(1): 83-8.

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.

Shen, K., R. D. Fetter, et al. (2004). "Synaptic specificity is generated by the synaptic guidepost protein SYG-2 and its receptor, SYG-1." Cell **116**(6): 869-81.

Skaper, S. D., S. E. Moore, et al. (2001). "Cell signalling cascades regulating neuronal growth-promoting and inhibitory cues." Progress in Neurobiology **65**(6): 593-608.

Sonderegger, P., Ed. (1998). Ig Superfamily Molecules in the Nervous System. Cell Adhesion and Communication. Amsterdam, Harwood Academic Publishers.

Sperry, R. W. (1963). "Chemoaffinity in the orderly growth of nerve fiber patterns and connections." Proc. Natl. Acad. Sci. USA **50**: 703-710.

Stein, E. and M. Tessier-Lavigne (2001). "Hierarchical organization of guidance receptors: silencing of netrin attraction by slit through a Robo/DCC receptor complex." Science **291**(5510): 1928-38.

Strukelnberg, M., B. Bonengel, et al. (2001). "Rst and its paralogue Kirre act redundantly during embryonic muscle development in *Drosophila*." Development **128**: 4229-4239.

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." Developmental Biology **56**: 110 - 156.

Sulston, J. E., E. Schierenberg, et al. (1983). "The embryonic cell lineage of the nematode Caenorhabditis elegans." Developmental Biology **100**: 64 - 119.

Suter, D. M. and P. Forscher (1998). "An emerging link between cytoskeletal dynamics and cell adhesion molecules in growth cone guidance." Curr Opin Neurobiol **8**(1): 106-16.

Takahashi, T., A. Fournier, et al. (1999). "Plexin-neuropilin-1 complexes form functional semaphorin-3A receptors." Cell **99**(1): 59-69.

Tamagnone, L., S. Artigiani, et al. (1999). "Plexins are a large family of receptors for transmembrane, secreted, and GPI-anchored semaphorins in vertebrates." Cell **99**(1): 71-80.

Teichmann, S. A. and C. Chothia (2000). "Immunoglobulin superfamily proteins in Caenorhabditis elegans." J Mol Biol **296**(5): 1367-83.

Tessier-Lavigne, M. and C. S. Goodman (1996). "The molecular biology of axon guidance." Science **274**(5290): 1123-33.

The *C elegans* Sequencing Consortium (1998). "Genome sequence of the nematode C. elegans: a platform for investigating biology. The C. elegans Sequencing Consortium." Science **282**(5396): 2012-8.

Thiery, J. P. (2003). "Cell adhesion in development: a complex signaling network." Curr Opin Genet Dev **13**(4): 365-71.

Troemel, E. R., J. H. Chou, et al. (1995). "Divergent seven transmembrane receptors are candidate chemosensory receptors in C. elegans." Cell **83**(2): 207-18.

Vaughn, D. E. and P. J. Bjorkman (1996). "The (Greek) key to structures of neural adhesion molecules." Neuron **16**(2): 261-73.

Vogel, B. and E. Hedgecock (2001). "Hemicentin, a conserved extracellular member of the immunoglobulin superfamily, organizes epithelial and other cell attachments into oriented line-shaped junctions." Development **128**(6): 883-894.

Vogel, C., S. A. Teichmann, et al. (2003). "The immunoglobulin superfamily in Drosophila melanogaster and Caenorhabditis elegans and the evolution of complexity." Development **130**(25): 6317-28.

Voltmer, S. (2001). Expressionsanalyse ausgewählter Immunglobulin Zelladhäsionsmolekülen (IgCAMs) und Nidogen-ähnlichen Zelloberflächenproteinen in *Caenorhabditis elegans*. Max-Planck-Institut für Medizinische Forschung. Heidelberg, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg**:** 99.

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**: 425-56.

Walter, J., B. a. Mulller, et al. (1990). "Axonal guidance by an avoidance mechanism." J. Physiol. **84**: 104-110.

Whangbo, J. and C. A. Kenyon (1999). "Wnt signaling system that specifies two patterns of cell migration in *C. elegans*." Mol. Cell **4**: 851-858.

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.

Williams, A. F. and A. N. Barclay (1988). "The immunoglobulin superfamily--domains for cell surface recognition." Annu Rev Immunol **6**: 381-405.

Williams-Masson, E., A. Malik, et al. (1997). "An actin-mediated two-step mechanism is required for ventral enclosure of the C. elegans hypodermis." Development **124**(15): 2889-2901.

Wilm, T., P. Demel, et al. (1999). "Ballistic transformation of Caenorhabditis elegans." Gene **229**(1-2): 31-5.

Wojtowicz, W. M., J. J. Flanagan, et al. (2004). "Alternative Splicing of Drosophila Dscam Generates Axon Guidance Receptors that Exhibit Isoform-Specific Homophilic Binding." Cell **118**(5): 619-633.

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

Yamagata, M., J. A. Weiner, et al. (2002). "Sidekicks: Synaptic Adhesion Molecules that Promote Lamina-Specific Connectivity in the Retina." Cell **110**(5): 649-660.

Yandell, M. D., L. G. Edgar, et al. (1994). "Trimethylpsoralen induces small deletion mutations in Caenorhabditis elegans." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(4): 1381-5.

Yap, A. S., W. M. Brieher, et al. (1997). "Molecular and functional analysis of cadherin-based adherens junctions." Annu. Rev. Cell Dev. Biol. **13**: 119-146.

Yoshihara, Y., S. Oka, et al. (1991). "Immunoglobulin Superfamily molecules in the nervous system." Neuronscience Research **10**: 83-105.

Yoshikawa, S. and J. B. Thomas (2004). "Secreted cell signaling molecules in axon guidance." Curr Opin Neurobiol **14**(1): 45-50.

Yu, T. W. and C. I. Bargmann (2001). "Dynamic regulation of axon guidance." Nat Neurosci **4 Suppl**: 1169-76.

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.

Zhen, M. and Y. Jin (1999). "The liprin protein SYD-2 regulates the differentiation of presynaptic termini in C. elegans." Nature **401**(6751): 371-5.

Zwaal, R. R., A. Broeks, et al. (1993). "Target-selected gene inactivation in Caenorhabditis elegans by using a frozen transposon insertion mutant bank." Proc. Natl. Acad. Sci. USA **90**: 7431-7435.

DANKSAGUNG

Die vorliegende Arbeit wurde am Max-Planck-Institut für medizinische Forschung in Heidelberg unter der Leitung von Dr. Harald Hutter durchgeführt.

Mein Dank gilt vor allem Dr. Harald Hutter für die Überlassung des interessanten Themas, und die Betreueng dieser Arbeit. Insbesondere möchte ich ihm für die vielen anregenden Diskussionen, zu denen er immer Zeit fand, danken.

Prof. Dr. E. Pollerberg und Prof. Dr. P. Seeburg danke ich für die Begutachtung dieser Arbeit.

Allen Mitgliedern und ehem. Mitgliedern des Labors, Dr. IreneWacker, Dr. Christina Schmid, Caroline Schmitz, Parag Kinge, Suse Zobeley und Ilse Wunderlich danke ich für die herzliche und gute Atmosphäre sowie die gute Zusammenarbeit. Ihr habt mir in allen Phasen dieser Arbeit fachlich kompetent und freundschaftlich zur Seite gestanden.

Dr. B. Conradt und Mitarbeitern (MPI für Neurobiologie, Martinsried, München) danke ich für die großartige Hilfe bei der Herstellung der Deletionsbank.

A. Hintze vom Institut für Genetik der Technischen Universität Braunschweig möchte ich für die Einführung in die Methode der ballistischen Transformation von *C. elegans* danken.

Und nicht zuletzt möchte ich meiner Frau Ruth und meinen Eltern danken, dass ihr immer für mich da wart.