



Mechanismus der Neuroserpin-Demenz an einem *Caenorhabditis elegans*-Modell (Maupas, 1900) Dougherty, 1953

Dissertation

Zur Erlangung der Würde des Doktors der Naturwissenschaften
des Fachbereichs Biologie, der Fakultät für Mathematik, Informatik
und Naturwissenschaften der Universität Hamburg

vorgelegt von
Sascha Norbert Lange
aus Hamburg

Hamburg, August 2011

Genehmigt vom Fachbereich Biologie
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
an der Universität Hamburg
auf Antrag von Prof. Dr. M. GLATZEL
Weiterer Gutachter der Dissertation:
Priv.-Doz. Dr. H. LÜTHEN
Tag der Disputation: 10. Juni 2011

Hamburg, den 26. Mai 2011

A. Temming

Professor Dr. Axel Temming
Leiter des Fachbereichs Biologie

Die vorliegende Arbeit wurde von Juli 2006 bis Februar 2011 unter Anleitung von Prof. Dr. Markus Glatzel am Institut für Neuropathologie am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf durchgeführt.

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
im Fachbereich Biologie
der Universität Hamburg
vorgelegt von
Diplom-Biochemiker Sascha N. Lange
aus Hamburg

Dissertationsgutachter:	Prof. Dr. Markus Glatzel PD Dr. Hartwig Lüthen
Disputationsgutachter:	Prof. Dr. Hans-Peter Mühlbach PD Dr. Irm Hermans-Borgmeyer

Für Tillmann & Justus

Ein Wissenschaftler in seinem Laboratorium ist nicht nur ein Techniker;
er steht auch vor den Naturgesetzen wie ein Kind vor der Märchenwelt.

- Marie Curie -

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	IX
Tabellenverzeichnis	X
Abkürzungsverzeichnis	XI
Erläuterung zur Nomenklatur von Genen und Proteinen	XIV
1 Zusammenfassung	1
1.1 Abstract	2
2 Einleitung	3
2.1 Serpine	3
2.1.1 Physiologische Funktion von humanen Serpinen	3
2.1.2 Struktur und Inhibitionsmechanismus von Serpinen	4
2.1.3 Neuroserpin und <i>FENIB</i>	5
2.2 Proteinhomeostase und Pathophysiologie von Demenzen	8
2.3 Der Nematode <i>Caenorhabditis elegans</i>	10
2.3.1 <i>C. elegans</i> als Modellorganismus für neurodegenerative Erkrankungen	13
2.3.2 Die intrazellulären Serpine in <i>C. elegans</i>	14
3 Materialien	15
3.1 Stämme	15
3.1.1 Bakterienstämme	15
3.1.2 <i>C. elegans</i> -Stämme aus anderen Laboratorien	15
3.1.3 Generierte <i>C. elegans</i> -Stämme	16
3.2 Reagenzien	17
3.2.1 Nukleinsäure und Nukleotide	17
3.2.2 Enzyme	18
3.2.3 Antikörper	18
3.2.4 Chemikalien	19
3.2.5 Puffer und Lösungen	19
3.2.6 Reagenzsysteme (Kits)	23
3.3 Verbrauchsmaterial	23
3.4 Laborgeräte	24
4 Methoden	26
4.1 Methoden der <i>in silico</i> -Recherche und Bioinformatik	26
4.2 Molekularbiologische Methoden	26

4.2.1	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	26
4.2.2	Zielgerichtete Mutagenese	27
4.2.3	Restriktionsverdau	27
4.2.4	DNA-Gelelektrophorese	28
4.2.5	Aufreinigung von DNA-Fragmenten	28
4.2.6	Konzentrationsbestimmung von DNA.....	28
4.2.7	Ligation von DNA-Fragmenten	28
4.2.8	Transformation von Bakterien	29
4.2.9	Bakterienkulturen.....	29
4.2.10	Screening der Bakterienkolonien	29
4.2.11	Präparation von Plasmid-DNA	30
4.2.12	Kryokonservierung transformierter Bakterien	30
4.2.13	DNA-Sequenzierung	30
4.2.14	Plasmidherstellung	30
4.3	Proteinbiochemische Methoden.....	32
4.3.1	SDS-Gelelektrophorese.....	32
4.3.2	Nicht-reduzierende Gelelektrophorese	33
4.3.3	Western Blot	33
4.3.4	Coomassie-Färbung	33
4.3.5	Immunodetektion	33
4.3.6	Detektion von nicht-reduzierenden Gelen	34
4.4	<i>C. elegans</i> -Methoden	34
4.4.1	Haltung von <i>C. elegans</i>	34
4.4.2	Generierung von Männchen durch Hitzeschock.....	34
4.4.3	Genetische Kreuzungen	34
4.4.4	Synchronisieren von <i>C. elegans</i>	35
4.4.5	Ballistische Transformation von <i>C. elegans</i>	35
4.4.6	RNAi-Fütterung auf NGM-Platten	36
4.4.7	Isolierung von genomischer DNA aus <i>C. elegans</i>	37
4.4.8	Einzelwurm-PCR zur Genotypisierung	37
4.4.9	Herstellung von Wurmlysaten	37
4.4.10	DiL-Färbung von Amphid- und Phasmidneuronen	38
4.4.11	Rhodamin-Phalloidin-Färbung in <i>C. elegans</i>	38
4.4.12	Antikörperfärbungen in <i>C. elegans</i>	39

4.4.13	Kryokonservierung von <i>C. elegans</i>	39
4.4.14	Verhaltenstests	39
4.4.14.1	<i>Bodybend</i> -Assay.....	39
4.4.14.2	Chemotaxis-Assay	40
4.4.15	Test von Substanzen auf Agarplatten.....	40
4.5	Mikroskopie	40
4.5.1	Herstellung von Lebendpräparaten	40
4.5.2	Konventionelle Fluoreszenz- und Nomarski-Mikroskopie.....	40
4.5.3	Konfokale Mikroskopie	41
4.5.4	FRAP-Analyse	41
4.6	Statistik.....	42
5	Ergebnisse	43
5.1	Generierung und Charakterisierung eines <i>C. elegans</i> -Modells für <i>FENIB</i>	43
5.1.1	<i>In silico</i> -Analyse von Neuroserpin-Homologen in <i>C. elegans</i>	43
5.1.2	Herstellung der Plasmide	44
5.1.3	Generierung eines <i>C. elegans</i> -Modells für <i>FENIB</i>	45
5.1.4	Proteinbiochemie der Aggregate.....	48
5.1.5	Charakterisierung der muskelspezifischen Expression von <i>Srp-2::YFP</i>	49
5.1.6	Charakterisierung der endogenen Expression von <i>Srp-2::YFP</i>	55
5.2	Analyse möglicher Abbauwege bei <i>FENIB</i> anhand des <i>C. elegans</i> -Modells....	57
5.2.1	Ausschaltung spezifischer Signalwege mittels RNAi.....	57
5.2.2	Kreuzung der generierten Linien mit Deletionsmutanten.....	59
5.2.3	Charakterisierung der Kreuzungen	60
5.2.4	Effekt von UPR-induzierenden Substanzen.....	64
6	Diskussion.....	66
6.1	Charakterisierung von Serpinopathien anhand des generierten <i>C. elegans</i> -Modells.....	66
6.2	Analyse möglicher Abbauwege bei <i>FENIB</i> anhand des <i>C. elegans</i> -Modells....	70
6.3	Effekt von UPR-induzierenden Substanzen.....	77
6.4	Ausblick	77
7	Literatur- und Quellenverzeichnis.....	79
8	Anhang	92
8.1	Primer.....	92
8.2	Plasmidkarten.....	94

Danksagung.....96

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2.1: Struktur und Inhibitionsmechanismus der Serpine.....	5
Abbildung 2.2: Vergrößerung der <i>shutter</i> -Region.....	7
Abbildung 2.3: Die humane <i>Unfolded Protein Response</i>	10
Abbildung 2.4: Anatomie eines Hermaphroditen.....	11
Abbildung 2.5: Lebenszyklus eines Hermaphroditen.....	12
Abbildung 5.1: Proteinalignment von murinem (mNS) und humanem (hNS) Neuroserpin mit <i>Srp-2</i>	44
Abbildung 5.2: PCR der einzelnen Fragmente.....	45
Abbildung 5.3: Expressionsmuster von <i>unc-54::srp-2::YFP</i> & <i>unc-54::srp-2^{H302R}::YFP</i>	46
Abbildung 5.4: Expressionsmuster von <i>srp-2::srp-2::YFP</i> & <i>srp-2::srp-2^{H302R}::YFP</i>	47
Abbildung 5.5: PAGE von Wurmlysaten der generierten Linien.....	49
Abbildung 5.6: Bilder des FRAP-Experiments von <i>unc-54::srp-2::YFP</i> & <i>unc-54::srp-2^{H302R}::YFP</i> -Linien.....	50
Abbildung 5.7: FRAP-Analyse von <i>unc-54::srp-2::YFP</i> & <i>unc-54::srp-2^{H302R}::YFP</i> -Linien.....	51
Abbildung 5.8: Rhodamin-Phalloidin-Färbung von <i>unc-54::srp-2::YFP</i> & <i>unc-54::srp-2^{H302R}::YFP</i> -Linien.....	52
Abbildung 5.9: ER-Färbung der <i>unc-54::srp-2^{H302R}::YFP</i> -Linie.....	53
Abbildung 5.10: „Bodybend-Assay“.....	54
Abbildung 5.11: Amphid- und Phasmidneuronen-Färbung der <i>srp-2::srp-2::YFP</i> -Linie.....	55
Abbildung 5.12: Primerdesign und entstehendes Bandenmuster.....	60
Abbildung 5.13: Übersicht der Kreuzungen von <i>unc-54::srp-2^{H302R}::YFP</i> mit Deletionsmutanten.....	61
Abbildung 5.14: Quantifizierung der Aggregaten pro Wurm.....	61
Abbildung 5.15: PAGE von Würmern der Kreuzungen.....	63
Abbildung 5.16: „Bodybend-Assay“ der Kreuzungen.....	64
Abbildung 5.17: Effekt von UPR-induzierenden Substanzen.....	65
Abbildung 6.1: Übersicht über die möglichen Abbauege von <i>Srp-2</i>	71

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1: Übersicht über die bekannten Mutationen in Neuroserpin.	7
Tabelle 3.1: Verwendete <i>E. coli</i> -Stämme.	15
Tabelle 3.2: <i>C. elegans</i> -Stämme.	16
Tabelle 3.3: Generierte <i>C. elegans</i> -Stämme.	16
Tabelle 3.4: Verwendete Plasmide.	17
Tabelle 4.1: PCR-Programm für die meisten Reaktionsbedingungen.	27
Tabelle 4.2 Verwendete Antibiotika.	29
Tabelle 4.3: Zusammensetzung der SDS-Gele.	32
Tabelle 5.1: Chemotaktischer Index der Linien.	56
Tabelle 5.2: RNAi gegen spezifische Proteine in <i>C. elegans</i> und deren humanen Homologe.	58
Tabelle 8.1 Auflistung der verwendeten Primer.	92

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Erklärung
A	Alanin
C	Cystein
D	Asparaginsäure
E	Glutaminsäure
F	Phenylalanin
G	Glycin
H	Histidin
I	Isoleucin
K	Lysin
L	Leucin
M	Methionin
N	Asparagin
P	Prolin
Q	Glutaminsäure
R	Arginin
S	Serin
T	Threonin
V	Valin
W	Tryptophan
Y	Tyrosin
°C	Grad Celsius
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaar(e)
BSA	Rinderserumalbumin
C. elegans	Caenorabditis elegans
CCC	Kation-Chlorid-Cotransporter
C-Terminus	Carboxyterminus einer Proteinkette
d	Tage
Da	Dalton

ddH ₂ O	bidestilliertes Wasser
d. h.	das heißt
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Deoxyribonucleic acid/ Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Mischung aller vier Nukleosidtriphosphate
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
et al	et alii (lat.: und andere Mitarbeiter)
<i>FENIB</i>	Familial Encephalopathy with Neuroserpin Inclusion Bodies
FRAP	Fluorescent Recovery after Photobleaching
g	Gramm bzw. Normal-Fallbeschleunigung (9,81 m/s ²)
h	<i>Hour</i> / Stunde
HRP	Meerrettichperoxidase
kbp	Kilobase(n)
kDa	Kilodalton
l	Liter
LB	Luria Broth
M	molar
m	Milli (10 ⁻³)
min	Minute
μ	Micro (10 ⁻⁶)
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
n	nano (10 ⁻⁹) bzw. Anzahl
N-Terminus	Aminoterminus einer Proteinkette

OD	optische Dichte
p.A.	<i>pro analysis</i> (zur Analyse)
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat gepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
Tris	Trishydroxymethylaminoethan
U	Units / Einheiten
UTR	Untranslatierte Region
UV	ultraviolettes Licht
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
ya	young adult/ junges adultes Tier
YFP	yellow fluorescent protein/ gelb fluoreszierendes Protein
z. B.	zum Beispiel

Erläuterung zur Nomenklatur von Genen und Proteinen

In der vorliegenden Arbeit werden Gene und Proteine gemäß der Konvention von Horvitz et al. benannt (Horvitz et al., 1979). Dazu werden Gene stets klein und kursiv (z.B. *srp-2*) geschrieben. Endogene Proteine werden nicht kursiv und mit dem ersten Buchstaben großgeschrieben (z.B. Srp-2), während humane Proteine komplett großgeschrieben werden. Fusionierte Proteine werden durch zwei Doppelpunkte getrennt, so beispielsweise Srp-2::YFP. Wenn es sich um Gene handelt, so ist stets der Promotor angegeben sowie das unter diesem exprimierte Protein (z.B. *unc-54::srp-2::YFP*). Fluoreszenzproteine und Gene werden dabei immer großgeschrieben. Durch die ballistische Transformation entstehen entweder integrierte (Is) oder extrachromosomale (Ex) Linien. RNAi wurde zwar gegen die RNA gebildet, zur Vereinfachung wird aber jeweils das nicht-translatierte Protein genannt.

1 Zusammenfassung

Demographisch bedingt leiden in Deutschland mehr als eine Million Menschen an Demenz. Die genauen Ursachen dieser Erkrankungen sind kaum verstanden. Trotzdem nimmt man an, dass verschiedene Demenzen gemeinsame Signalwege teilen. Die familiäre Enzephalopathie mit Neuroserpin-Einschlußkörperchen (*FENIB*), ist eine autosomal-dominant vererbte Demenz, bei der es zu einer intraneuronalen Akkumulation von fehlgefaltetem Neuroserpin kommt. Dieser dynamische Prozess, der durch Mutationen im Neuroserpin-Gen verursacht wird, bewirkt eine Störung der Proteinhomeostase und führt bereits in frühen Jahren zu Demenz.

Srp-2, ein Protein in *Caenorhabditis elegans*, zeigt eine ausgeprägte Homologie zu Neuroserpin. Durch biolistische Transformation wurden Wurmlinien generiert, in denen Srp-2 mit einem Fluoreszenzgen fusioniert wurde, um eine *in vivo*-Lokalisation zu ermöglichen. Durch gezieltes Einbringen von Mutationen in *srp-2* war es möglich, *FENIB* in *C. elegans* nachzustellen und zu analysieren. Die gewebsspezifische Expression (muskel-spezifisch bzw. endogen) führte zur altersabhängigen intrazellulären Akkumulation von mutiertem Srp-2. Zusätzlich zeigten die Würmer unter dem muskel-spezifischen Promotor im Vergleich zu Wildtyp-Srp-2 Defizite in der Beweglichkeit. Die Analyse mittels Fluorescent Recovery after Photobleaching (FRAP) und Antikörperfärbungen ergab eine Lokalisierung im Endoplasmatischen Retikulum (ER). Durch die Verwendung von RNAi und Deletionsmutanten konnte gezeigt werden, dass Induktoren der *Unfolded Protein Response*, namentlich Ire-1, Atf-6 und Pek-1 sowie ein genereller Hitzeschock-Faktor (Hsf-1) eine Rolle beim Abbau von Srp-2-Aggregaten spielen.

Zusammenfassend ist das beschriebene Modell das erste, in dem ein endogenes Protein in *C. elegans* manipuliert wurde und dadurch *in vivo* Proteinaggregate bildet. Das Modell ermöglichte dadurch die Untersuchung von Signalwegen welche eine Rolle beim Abbau von Srp-2-Aggregaten spielen.

1.1 Abstract

Due to the demographic changes, in Germany more than one million people suffer from dementia. The exact cause of this disease is poorly understood. Nevertheless, it is assumed that different types of dementia share common signaling pathways. *Familial encephalopathy with neuroserpin inclusion bodies (FENIB)* is an autosomal dominant dementia, which leads to intraneuronal accumulation of misfolded neuroserpin. This dynamic process caused by mutations in the neuroserpin-gene, leading to a disturbance of protein homeostasis and dementia at an early age.

Srp-2, a protein in *Caenorhabditis elegans* shows considerable homology to neuroserpin. By biolistic transformation wormlines were generated, in which Srp-2 was fused to a fluorescent protein to enable *in vivo* localization. By selectively introducing mutations in *srp-2* it was possible to simulate and analyze *FENIB*. The tissue-specific expression (muscle-specific or endogenous) resulted in aggregate-formation of mutant Srp-2 at a specific timepoint of development. In addition, the worms showed mobility deficits under the muscle-specific promoter compared to wildtype Srp-2. The analysis by FRAP and antibody staining revealed a localization in the ER. By the use of RNAi and deletion mutants it could be shown that inducers of the *unfolded protein response*, namely *ire-1*, *atf-6* and *pek-1* and a general heat shock factor (*hsf-1*) play a role in the degradation of Srp-2-aggregates.

In summary, the model is the first in which an endogenous protein in *C. elegans* has been manipulated to form protein aggregates *in vivo*. The model allowed the investigation of signaling pathways involved in degradation of Srp-2 aggregates.

2 Einleitung

2.1 Serpine

Die Serpine wurden das erste Mal in einer Veröffentlichung durch die Arbeitsgruppe von Hunt und Dayhoff beschrieben. Es fiel auf, dass die Proteinsequenz von α 1-Antitrypsin und Antithrombin III eine enorme Ähnlichkeit zu Ovalbumin, dem Hauptbestandteil von Hühnereiweiß zeigte (Hunt and Dayhoff, 1980). Deshalb wurde beschlossen die Proteine in einer neuen Proteinsuperfamilie zusammen zu fassen, den Serpinen (Serinprotease-Inhibitoren), obwohl Ovalbumin und andere Proteine der Familie keine inhibitorische Funktion aufweisen. Die Serpine werden in 16 Stämme unterteilt, die bei A beginnen und bei P enden. Bisher sind mehr als 3000 Mitglieder bekannt, die in Lebewesen aller drei Domänen (Bakterien, Archaeen und Eukaryoten) vorkommen (Irving et al., 2000; Irving et al., 2002; Steenbakkers et al., 2008).

2.1.1 Physiologische Funktion von humanen Serpinen

Wie der Name erklärt, handelt es sich bei Serpinen um Proteaseinhibitoren, die dabei hauptsächlich Proteasen mit Serin im aktiven Zentrum inhibieren. Von den 36 im Menschen bekannten Serpinen entsprechen 27 dieser Klassifizierung als Inhibitoren. Eine weitere Unterteilung erfolgt durch die Unterscheidung intra- und extrazellulärer Serpine. Obwohl die Serpine beim Menschen auf 10 verschiedenen Chromosomen liegen, bilden sie Cluster. So liegen 13 der extrazellulären Proteine der Stammes A auf den Chromosomen 1, 14 und X, während 13 intrazelluläre Proteine des Stammes B auf den Chromosomen 18 und 6 liegen. Die Proteine des Stammes A benötigen zum Ausschleusen aus der Zelle ein Signalpeptid, welches sich am N-Terminus befindet (Silverman et al., 2001). Das bekannteste und auch am weitesten verbreitete extrazelluläre Serpin im menschlichen Körper ist das α 1-Antitrypsin, das bis zu 2 % des Blutserumproteins ausmacht. Das α 1-Antitrypsin schützt die Lunge vor Enzymen wie Elastase, welche bei Entzündungsprozessen das Bindegewebe angreift. Eine weitere wichtige Rolle spielen Serpine bei der Blutgerinnung, der Fibrinolyse und der Umstrukturierung der extrazellulären Matrix. Neben den inhibitorischen Serpinen existieren solche, die nicht-inhibitorisch, z.B. als Hormontransporter, Chaperone und Tumorsuppressoren wirken (Law et al., 2006; Silverman et al., 2001; Whisstock et al., 2010).

2.1.2 Struktur und Inhibitionsmechanismus von Serpinen

Serpine zeichnen sich durch eine konservierte Struktur aus. So zeigen alle Serpine eine spezifische Struktur, die aus circa 350 Aminosäuren gebildet wird. Diese wird durch zusätzliche Aminosäuren am N- und/oder C-Terminus verlängert. Die Tertiärstruktur besteht aus drei β -Faltblättern (A, B und C) sowie 8 bis 9 α -Helices (hA–hI genannt). Auffällig ist die reaktive Schleife (reactive center loop, RCL), die aus ungefähr 25 Aminosäuren besteht und zwischen dem A- und C- β -Faltblatt gespannt ist. Aufgrund dieser Faltung bilden die Serpine eine Besonderheit, denn entgegen der Vermutung von Anfinsen, wonach Proteine stets die energieärmste Struktur annehmen, bildet die Serpine eine metastabile Konformation (Anfinsen, 1973; Cabrita and Bottomley, 2004). Verursacht wird dies durch eine instabile Konfiguration zweier paralleler β -Stränge im Faltblatt A (s3A und s5A) in der *shutter*-Region. Diese Konfiguration ist die Voraussetzung für die irreversible Protease-Inhibition. Der Inhibitionsmechanismus beruht auf der reaktiven Schleife, die als Beute fungiert und die Protease inhibiert, indem eine Bindung am reaktiven Zentrum (P-P1') gespalten wird. Das Serpin durchläuft dadurch eine enorme Konformationsänderung, bei welcher der n-terminale Teil der reaktiven Schleife als Strang s4A zwischen s3A und s5A inseriert und es dadurch zu einer anti-parallelen Faltblattstruktur kommt. Das Serpin geht dabei von der metastabilen (S-/stressed) in die stabile (R-/relaxed) Konformation über (Law et al., 2006). Dies wird durch die sehr flexible Scharnierregion (hinge-region) ermöglicht. Eine weitere Besonderheit ist, dass die frei werdende Energie bei der Konformationsänderung dazu genutzt wird, die gebundene Protease zu deformieren. So kann die Protease die Proteolyse nicht beenden und der Komplex muss als Ganzes abgebaut werden (Huntington et al., 2000; Tew and Bottomley, 2001). Eine ähnliche Konformationsänderung durchlaufen die nicht-inhibierenden Serpine. Allerdings erfolgt hier keine kovalente Bindung und die Protease kann am Ende in einem aktiven Zustand den Komplex verlassen (Silverman et al., 2001). Die Abbildung 1.1 zeigt eine schematische Darstellung des Inhibitionsmechanismus von Serpinen am Beispiel des α 1-Antitrypsins.

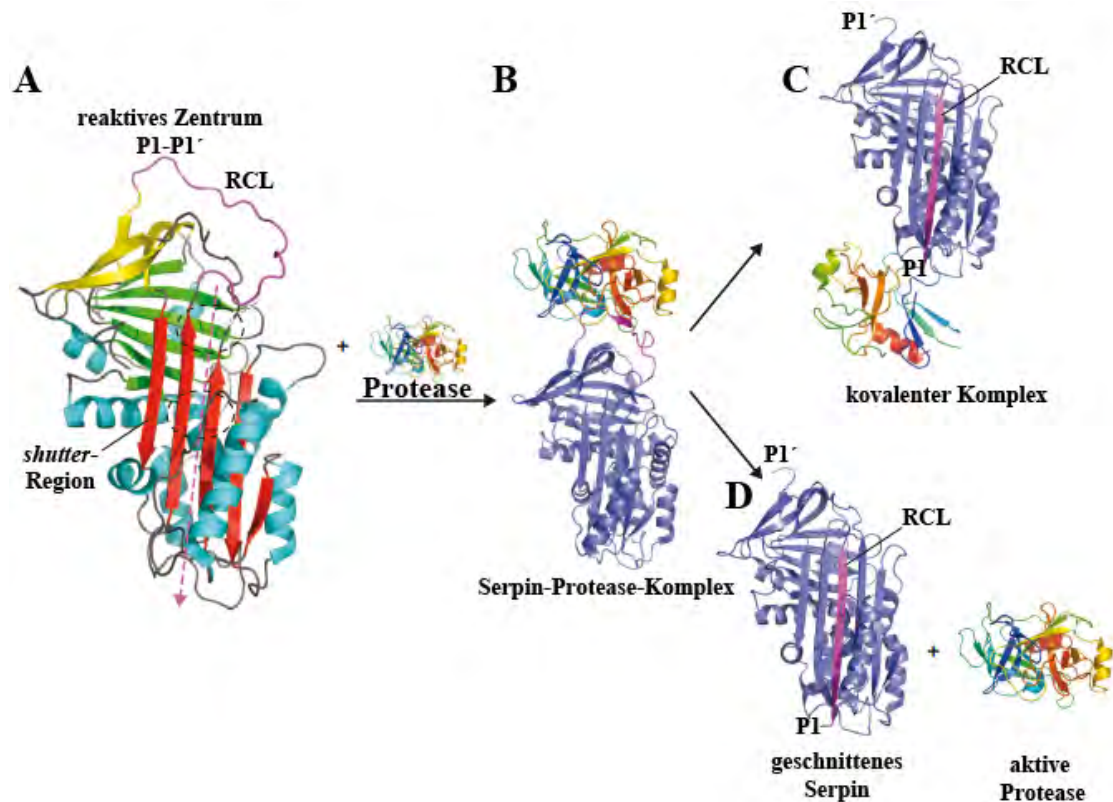


Abbildung 2.1: Struktur und Inhibitionsmechanismus der Serpine.

(A) Native Struktur von α_1 -Antitrypsin mit den drei β -Faltblättern A (rot), B (grün), C (gelb) und den α -Helices (hA-hI) in blau und dem magentafarbenen reaktiven Zentrum mit P1-P1'. Die shutter-Region ist ebenfalls markiert. Die gestrichelte Linie zeigt die folgende s4A-Strangeinlagerung an. (B) Serpin-Protease-Komplex. (C) kovalenter Komplex mit deformierter Protease bei inhibitorischen Serpinen. (D) geschnittenes Serpin und aktive Protease bei nicht-inhibitorischen Serpinen [modifiziert nach (Law et al., 2006)].

2.1.3 Neuroserpin und *FENIB*

Neuroserpin ist ein extrazelluläres Protein, welches ausschließlich im zentralen Nervensystem vorkommt und dort an Axonen sezerniert wird (Hastings et al., 1997; Osterwalder et al., 1996). In zahlreichen *in vitro*-Studien zeigte Neuroserpin eine bevorzugte Inhibition von gewebespezifischem Plasminogenaktivator (*tissue-type plasminogen activator*), *t-PA*. Das Enzym *t-PA* spielt eine wichtige Rolle in der Fibrinolyse (Bugge et al., 1996). Welche Aufgabe *t-PA* jedoch im zentralen Nervensystem erfüllt, ist weitestgehend unbekannt. Bisherige Studien zeigen jedoch eine Verbindung zum Lernverhalten (Seeds et al., 2003; Seeds et al., 1995), Gedächtnis (Baranes et al., 1998; Huang et al., 1996; Qian et al., 1993) und zur Neurodegeneration (Tsirka et al., 1995). Neben der Reaktion mit *t-PA* zeigt Neuroserpin eine Interaktion mit Urokinase, Trypsin, Plasmin und weiteren Enzymen (Hastings et al., 1997).

Studien mit Mäusen, die Neuroserpin überexprimieren, zeigen einen signifikanten Rückgang in der t-PA-Aktivität (Cinelli et al., 2001). Dies spricht dafür, dass t-PA auch *in vivo* das Substrat von Neuroserpin ist. Zellkulturexperimente zeigen, dass der Komplex aus Neuroserpin und t-PA durch das Low Density Lipoprotein Rezeptor-related Protein 1 (LRP1) aufgenommen wird. Da Neuroserpin nicht direkt an LRP1 binden kann, wird spekuliert, dass es einen Co-Faktor für die Aufnahme gibt (Makarova et al., 2003). Im ZNS ist Neuroserpin ab dem 13. Tag im Embryo exprimiert und hauptsächlich dort zu finden wo t-PA detektierbar ist (Krueger et al., 1997). Im adulten ZNS kommt Neuroserpin in drei Größen vor. Diese haben ein Molekulargewicht von 47, 57 und 105 kDa und entsprechen der geschnittenen, der nativen und der Proteinase-Komplex-Form (Hastings et al., 1997). Die Proteinexpression erfolgt hauptsächlich im Neocortex, im Hippocampus, im olfaktorischen Bulbus, in der Amygdala und in Purkinjezellen des Cerebellums. Dies sind Regionen, in denen die synaptische Plastizität erhalten bleibt. *In vitro*-Daten belegen eine Rolle von Neuroserpin bei Lernprozessen (Berger et al., 1999). Wie bei anderen Proteinen findet sich mRNA von Neuroserpin auch in den Hoden und der Bauchspeicheldrüse (Hastings et al., 1997; Osterwalder et al., 1996).

Der inhibitorische Mechanismus der Serpine (hier Neuroserpin) ist aufgrund der enormen Konformationsänderung des Proteins anfällig für Punktmutationen. Der metastabile Zustand wird dabei so verändert, dass das β -Faltblatt A, welches sich beim Wildtyp erst nach dem Schneiden durch beispielsweise t-PA öffnet, in eine stabilere Konformation übergeht. Das reaktive Zentrum eines Moleküls lagert sich dann in das Faltblatt eines weiteren und es kommt zu einer Dimer- und letztlich zur Polymerbildung (Miranda et al., 2004). Das Krankheitsbild dieser autosomal-dominant vererbten Erkrankung ist die familiäre Enzephalopathie mit Neuroserpin-Einschlusskörperchen (*FENIB*, *Familial Encephalopathy with Neuroserpin Inclusion Bodies*). Die Erkrankung gehört zu den Demenzen und weiter gefasst zu den Serpinopathien, die durch β -Faltblattfehlfaltung verursacht werden (Lomas and Carrell, 2002). Charakteristisches Merkmal von *FENIB* ist die intraneuronale Einlagerung von sogenannten Collins-Körperchen, die hauptsächlich aus den Neuroserpinpolymeren bestehen und einen Durchmesser von 5 – 50 μm zeigen (Davis et al., 1999a; Davis et al., 1999b). Bei Neuroserpin sind bisher vier Positionen bekannt, an denen eine Punktmutation zu einer Fehlfaltung führt (Davis et al., 2002; Davis et al., 1999b).

Die folgende Tabelle 2.1 zeigt die jeweilige Mutation und die Instabilität, die durch die Mutation verursacht wird.

Tabelle 2.1: Übersicht über die bekannten Mutationen in Neuroserpin.

SYNONYM	MUTATION	INSTABILITÄT
SYRACUSE	Ser49Pro	+
PORTLAND	Ser52Arg	++
	His338Arg	+++
	Gly392Glu	+++
	Gly392Arg	+++

Obwohl die Mutationen von der Aminosäuresequenz her weit auseinander liegen, zeigt sich in einem Modell in Abbildung 2.2, welches anhand der Kristallstruktur von humanem Neuroserpin (Takehara et al., 2009) modelliert wurde, dass die auslösenden Aminosäuren in der *shutter*-Region des Proteins lokalisiert sind.

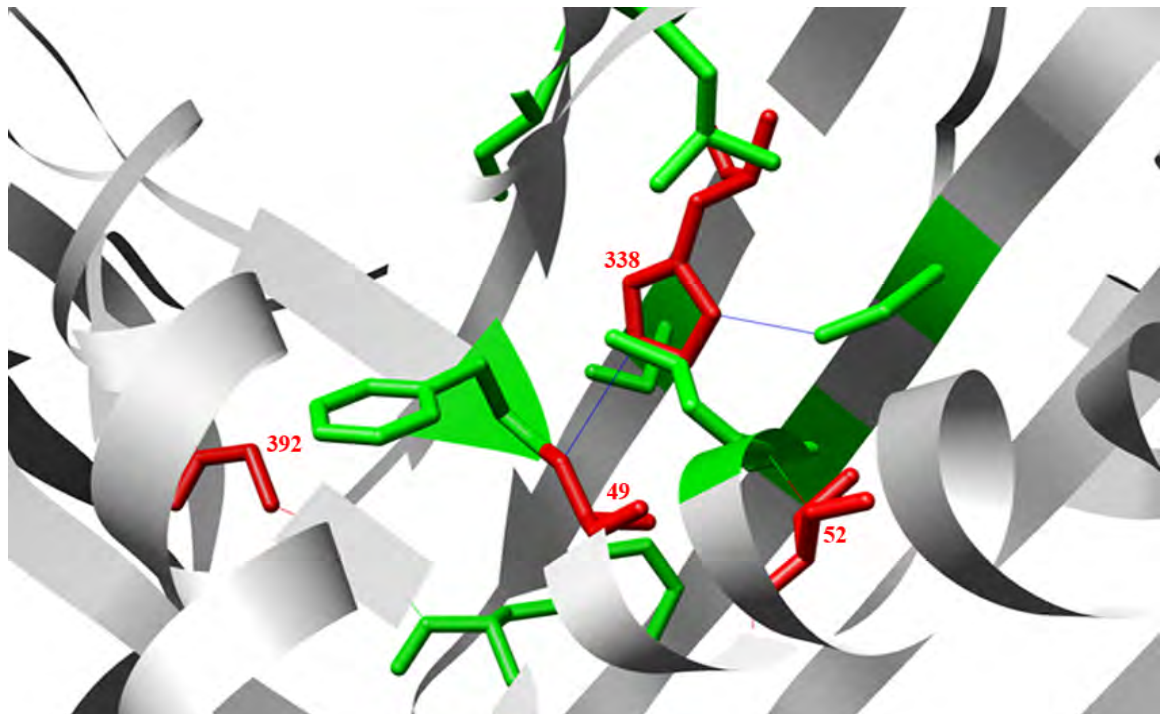


Abbildung 2.2: Vergrößerung der *shutter*-Region. (© S. Lange)

Die Vergrößerung der *shutter*-Region zeigt die Lokalisierung der pathogenen Aminosäuren in rot und die umgebenden Aminosäuren, die ein hydrophobes Milieu formieren, in grün.

Die Aminosäuren in der *shutter*-Region bewirken eine Polymerbildung. Dabei ist auffällig, dass die Punktmutationen am C-Terminus schneller Polymere bilden als N-Terminale. Dieser Umstand ist durch die Umgebung der Aminosäuren zu erklären, in der Abbildung 2.2 in grün dargestellt. Es bildet sich ein hydrophobes Umfeld in der engen Tasche des β -Faltblatts A. Das Histidin an Position 338 geht Wasserstoffbrückenbindungen mit den Serinen an Position 49 und 52 ein. Eine Mutation von Histidin zu Arginin zerstört die Interaktion, so dass in der Folge das β -Faltblatt instabil wird und sich öffnet. Das Glycin an Position 392 verursacht bei einer Mutation die schnellste Polymerisierung, da diese Position für die enge Faltung und damit Struktur des Serpins verantwortlich ist. Aus diesem Grund ist diese Position auch in allen Serpinen konserviert (Ryu et al., 1996). Durch die zunehmende Instabilität von Ser49Pro über Ser52Arg, His338Arg und Gly392Glu zu Gly392Arg zeigen sich auch die Symptome bei *FENIB* entsprechend früher. Der Beginn liegt der Reihe nach bei 48, 24, 15, 13 und 8 Jahren (Belorgey et al., 2010). Die klinischen Symptome zeigen sich hauptsächlich durch Aufmerksamkeitsdefekten sowie Konzentrations- und Sprachstörungen später als Demenz und Myoklonus-Epilepsie (Bradshaw et al., 2001; Davis et al., 2002). Anders als beispielsweise bei der Alzheimer'schen Erkrankung wird *FENIB* von nur einem fehlgefalteten Protein ausgelöst. Diese, relativ gesehen, einfache Veränderung ermöglicht in spezifischen Tiermodellen neue Einblicke in die Entstehung von Demenzen.

2.2 Proteinhomeostase und Pathophysiologie von Demenzen

Die Proteinhomeostase, also das Gleichgewicht zwischen Proteinsynthese, deren Faltung und Abbau, sowie die Fähigkeit auf Umgebungsänderungen und pathophysiologische Konditionen zu reagieren, ist ein charakteristisches Merkmal aller Lebewesen (Dobson, 2003). Studien haben gezeigt, dass ein direkter Zusammenhang zu Demenz besteht, da Zellen mit zunehmendem Alter nicht mehr in der Lage sind, fehlgefaltete Proteine abzubauen. Dies liegt möglicherweise an der erniedrigten Proteostase (Douglas and Dillin, 2010; Garcia et al., 2007; Kikis et al., 2010). Der Proteinabbau erfolgt unter normalen Bedingungen über das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) und über Autophagie.

Das UPS übernimmt dabei den Abbau für Proteine, die sich im Cytosol befinden, während die Autophagie dem Abbau von cytoplasmatischen Bestandteilen und ganzer Zellorganellen übernimmt (Rubinsztein, 2006; Schwartz and Ciechanover, 2009). Durch Akkumulation von Proteinen im endoplasmatischen Retikulum kommt es zu einer direkten lokalen Antwort, die als *Unfolded Protein Response* (UPR), also die Antwort auf ungefaltete Proteine zusammengefasst wird. Die Abbildung 2.3 zeigt einen Überblick über drei Marker-Proteine der UPR. Dies sind *IRE1 (inositol-requiring kinase 1)*, *ATF6 (activating transcription factor 6)* und *PERK (PKR-like ER kinase)*. Die Signalkaskade wird dadurch ausgelöst, dass das ER-Chaperon BiP (*Binding immunoglobulin protein*), welches unter normalen Bedingungen mit den drei obigen Proteinen am ER-Lumen assoziiert ist, durch fehlgefaltete Proteine im ER als Chaperon agiert und somit die Aktivierung der drei Signalwege zulässt (Zhang and Kaufman, 2004). Dabei spielt jeder der Signalwege eine andere Rolle. Der IRE1-Signalweg steuert die Transkription von ER-Chaperonen und Proteasomen, indem es nach Aktivierung als RNase das Zielmolekül XBP1 so schneidet, dass dieses aktiv ist. Der zweite Signalweg wird durch ATF6, einen Transkriptionsfaktor ausgelöst. ATF6 steuert direkt die Transkription von ER-Chaperonen und Proteinen der Qualitätskontrolle.

Ein weiterer diskutierter Weg stellt eine direkte Vernetzung zwischen IRE1 und ATF6 dar, dazu bilden XBP1 und ATF6 Heterodimere und ermöglichen die Transkription weiterer Chaperone (Wu et al., 2007; Yamamoto et al., 2007). Der dritte Signalweg verläuft über PERK, welches einerseits die Proteinsynthese durch Phosphorylierung von eIF2 α verhindert und andererseits die Bildung des Transkriptionsfaktors ATF-4 begünstigt (Ron and Walter, 2007). Durch die UPR werden die fehlgefalteten Proteine ins Cytosol geleitet, wo sie durch den ER-assoziierten Abbauweg (ER-associated degradation pathway, ERAD) abgebaut werden (Bonifacino and Weissman, 1998; Kostova and Wolf, 2003; Plemper and Wolf, 1999). Für *FENIB* wurde ein weiterer Signalweg beschrieben, dabei handelt es sich um die sogenannte *ER overload response* (Davies and Lomas, 2008; Pahl and Baeuerle, 1995), die unabhängig von der UPR zu einer Aktivierung von NF- κ B führt. Für Serpinopathien wurden *in vivo* sowohl die UPR wie auch die *ER overload response* gezeigt (Davies et al., 2009; Hidvegi et al., 2005; Lawless et al., 2004; Miranda et al., 2004). Aufgrund von *in vitro*-Untersuchungen wird jedoch davon ausgegangen, dass mutantes Neuroserpin durch ERAD abgebaut wird, wobei auch Autophagie indirekt eine Rolle spielt (Kamimoto et al., 2006; Kroeger et al., 2009).

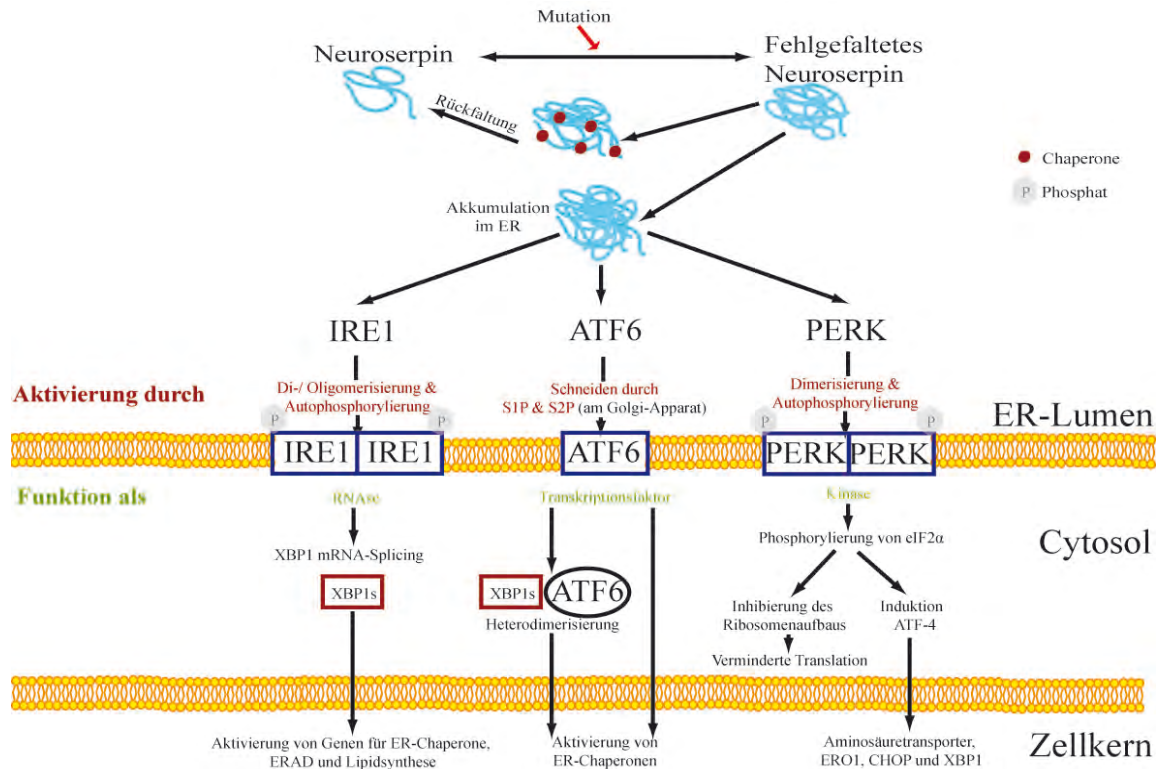


Abbildung 2.3: Die humane Unfolded Protein Response.

Die Abbildung zeigt die Signalkaskade, die durch die Proteine IRE1, ATF6 und PERK ausgelöst wird und die Lokalisierung dieser Proteine. Die Aktivierung der Signalwege erfolgt durch Freisetzung von BiP. IRE1 bildet Di- und Oligomere, die dann als RNase wirken und die mRNA von XBP1 spalten. Dies bewirkt eine Aktivierung von verschiedenen Genen. ATF6 wird durch S1P & S2P am Golgi-Apparat geschnitten und dadurch aktiviert. Im Folgenden bildet es Heterodimere mit geschnittenem XBP1 oder agiert direkt als Transkriptionsfaktor für ER-Chaperone. PERK hingegen bildet Dimere, autophosphoryliert und wirkt als Kinase auf eIF2 α . Dieses bewirkt durch die erfolgte Phosphorylierung zum einen eine Inhibierung des Ribosomenaufbaus und zum anderen induziert es ATF-4, einen Transkriptionsfaktor der ERO1, CHOP und XBP1 transkribiert [modifiziert nach (Springer, 2005)].

2.3 Der Nematode *Caenorhabditis elegans*

Der Nematode *C. elegans* wurde zum ersten Mal von Émile Maupas im Jahre 1900 unter dem Namen *Rhabditis elegans* beschrieben (Maupas, 1900). Er wird systematisch in die Familie der Rhabditidae eingeordnet, die zur Ordnung der Rhabditida gehört. Die Klasse sind die Secernentea. In Bezug auf die Gattung wurde er im Jahre 1952 von Günther Osche zunächst in eine Untergattung, dann ein Jahr später durch Ellsworth C. Dougherty der Gattung *Caenorhabditis* zugeordnet (Dougherty, 1953; Osche, 1952). Der heute in allen Laboren verwendete Stamm wurde im Jahre 1959 von L. Staniland nahe Bristol, Großbritannien isoliert und als Modellorganismus für genetische Studien von Sydney Brenner eingeführt, der die gefundenen Ergebnisse von Watson und Crick in den Kontext des Lebens setzen wollte (Brenner, 1974).

Wie alle Nematoden besteht auch *C. elegans* aus zwei konzentrischen Röhren, die durch ein Pseudocoelom, die Eierstöcke getrennt sind. Die innere Röhre wird durch den Darm gebildet, während die äußere Röhre aus Kuticula, Hypodermis sowie Muskel- und Nervenzellen besteht (Wood, 1988). Die Gewebe wie Muskel- und Nervenzellen sind dabei so komplex wie in höheren Organismen, so dass sich daraus ideale Bedingungen für Proteininteraktionen in Geweben ergeben. Durch seine Transparenz, Länge (1 mm) und leichte Handhabbarkeit ist er ein optimales Modell für zelluläre Untersuchungen *in vivo*. Im Labor kann *C. elegans* leicht gehalten werden, da die natürliche Umgebung leicht im Labor nachgestellt werden kann. Die Würmer werden dazu bei 15 - 25°C auf mit Bakterien inokulierten Agarplatten oder in Flüssigkultur gehalten. *C. elegans* kommt in zwei verschiedenen Geschlechtern vor, Hermaphroditen und Männchen. Während Hermaphroditen aus 959 Zellen bestehen, ist das Männchen aus 1031 Zellen aufgebaut. Der schematische Aufbau eines Hermaphroditen ist in Abbildung 2.3 gezeigt.

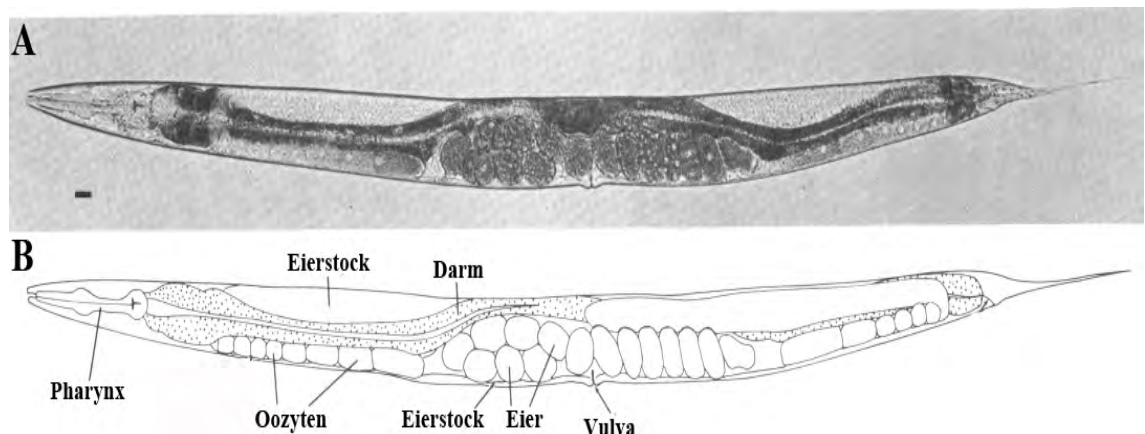


Abbildung 2.4: Anatomie eines Hermaphroditen.

(A) Durchlichtmikroskopische Aufnahme eines Hermaphroditen. (B) Schematischer Aufbau des Körpers mit den wichtigsten Organen (Sulston and Horvitz, 1977). Maßstab 20µm.

Bei der Selbstfertilisation eines Hermaphroditen erzeugt ein Tier circa 300 Nachkommen, während die Befruchtung mit Männchen circa 1000 Nachkommen erzeugt. Der Wurm durchläuft in seinem Leben verschiedene Larvenstadien (L1, L2, L3 & L4) hat sich nach drei Tagen (je nach Haltungsbedingungen) zum geschlechtsreifen adulten Tier entwickelt. Hieraus ergibt sich ein weiterer Vorteil, denn unter ungünstigen Bedingungen gehen die Würmer vom L1-Stadium in einen weiteren Zyklus und bilden Dauerstadien, die nicht altern.

Deletionsmutanten hierfür können genutzt werden um Würmer zu selektieren, die durch ballistische Transformation (siehe 4.4.5) das verantwortliche Gen zurückgewonnen haben. Die folgende Abbildung 2.3 zeigt den Lebenszyklus eines Hermaphroditen.

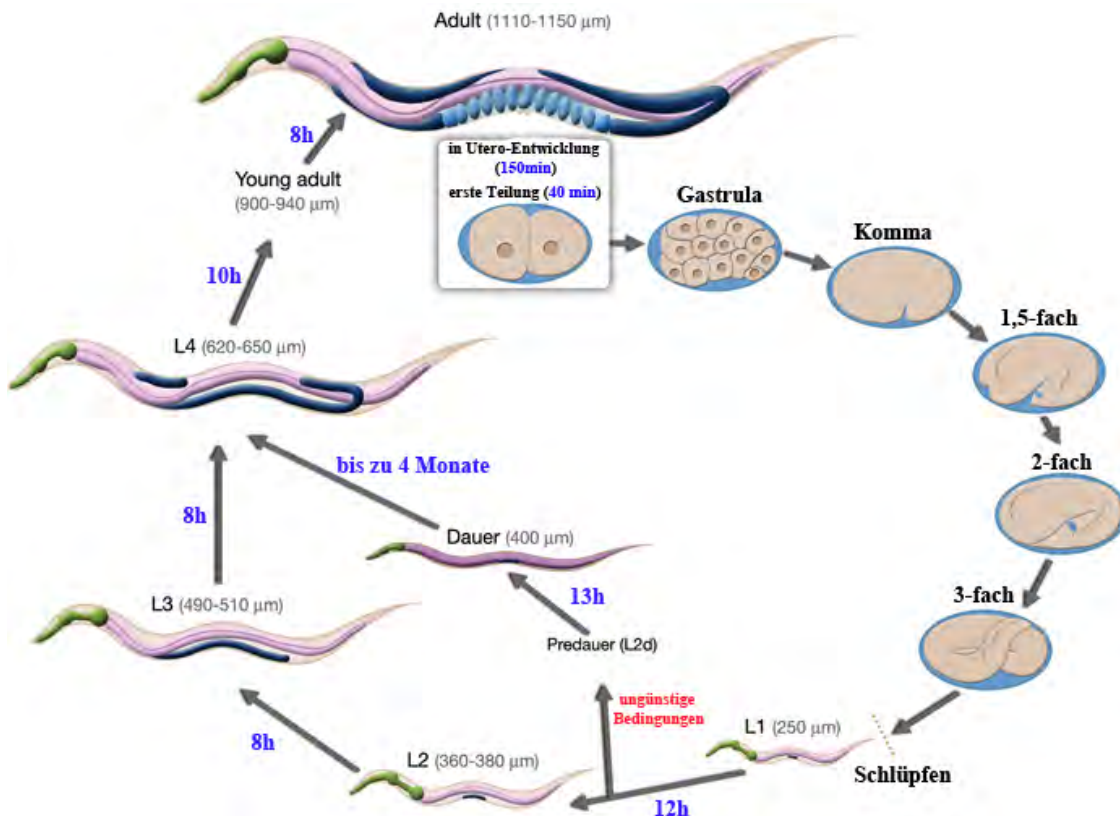


Abbildung 2.5: Lebenszyklus eines Hermaphroditen.

C. elegans durchläuft zunächst mehrer Faltungen und schlüpft dann. Je nach äußeren Bedingungen entwickelt sich der Wurm innerhalb von 12 Stunden weiter zum L2-Stadium oder geht in die Dauerform über. Das L2-Stadium hält circa 8 Stunden an bis die Entwicklung zum L3-Wurm abgeschlossen ist. Auch diese dauert 8 Stunden und geht über das L4-Stadium zum jungen adulten (10 Stunden) in den adulten und reproduktionsfähigen Wurm über. (Quelle: <http://www.wormatlas.org>).

C. elegans war der erste mehrzellige Organismus, dessen Genom vollständig sequenziert wurde (The *C. elegans* Sequencing Consortium, 1998). Dabei zeigte sich, das Genom auf sechs Chromosomen verteilt. Hermaphroditen besitzen zehn Autosomen und 2 Sexchromosomen, während Männchen durch Non-Disjunktion der Chromosomen entstehen und entsprechend nur ein Sexchromosom besitzen (Wood, 1988). Das Genom ist circa 100 Millionen Basenpaare lang und besteht zu 26 % aus Introns. Schätzungen zufolge codieren diese für 16.000 RNAs.

Es zeigte sich durch entsprechende Studien, dass mehr als 40 % der Gene in *C. elegans* eine Homologie zu anderen Eukaryoten aufweisen (Kamath et al., 2003). Bei Vergleichen der Genome zeigte sich, dass 22 % der Gene in *C. elegans*, die Homologie aufweisen, eine essentielle Rolle für das Überleben von *C. elegans* haben (Tu et al., 2006). In der letzten Dekade haben Arbeiten am Modellorganismus *C. elegans* entschieden dazu beigetragen den programmierten Zelltod (Apoptose), RNA-Interferenz und die Nutzung von Fluoreszenzproteinen zu erklären und zu optimieren. Diese Arbeiten wurden in den Jahren 2002, 2006 und 2006 mit dem Nobelpreis in Physiologie oder Medizin und Chemie ausgezeichnet (Brenner, 1974; Chalfie et al., 1994; Fire et al., 1998; Sulston and Horvitz, 1977).

2.3.1 *C. elegans* als Modellorganismus für neurodegenerative Erkrankungen

Schätzungen des *World Alzheimer Reports* (Alzheimer's Disease International 2010) gehen davon aus, dass derzeitig circa 36 Millionen Menschen als Demenz erkrankt sind. Diese Zahl wird sich bis zum Jahr 2030 nahezu verdoppelt und bis zum Jahr 2050 verdreifacht haben. Ein Großteil neurodegenerativer Erkrankungen geht mit dem Verlust von Neuronen einher. Wie es dazu kommt, ist bisher jedoch weitgehend unklar. Ein charakteristisches Merkmal ist jedoch die Anhäufung von fehlgefaltetem Protein. Aufgrund der genannten Eigenschaften eignet sich *C. elegans* daher hervorragend für die Expression und Manipulation von Proteinen und *in vivo*-Analyse. Bisher wurden zahlreiche *C. elegans*-Modelle entwickelt, in denen ein humanes Protein so modifiziert wurde, dass das humane Krankheitsbild nachgestellt werden konnte. Im Folgenden soll nun ein kurzer Überblick der bisherigen Modelle erfolgen. Das erste beschriebene Modell für β -Amyloid zeigte Aggregate im Muskelgewebe, die dazu führten, dass 3 Hitzeschockproteine verstärkt exprimiert wurden (Link, 1995). Weitere Modelle sind mit α -Synuclein und Parkinson assoziiert (Cooper et al., 2006; van Ham et al., 2008), mit Tauopathien (Brandt et al., 2009) sowie mit amyotropher Lateralsklerose (Oeda et al., 2001). Neben diesen Modellen existieren noch mehrere für die sogenannten Trinukleotiderkrankungen wie Huntington. Hierbei wird die Aminosäure Glutamin, die durch die Nukleotidsequenz CAG codiert wird, vielfach in das Protein eingebaut, so dass lange Polyglutaminketten entstehen. Die beschriebenen Modelle für diese Trinukleotiderkrankungen (Brignull et al., 2006; Morley et al., 2002) sind vielfach untersucht worden und dienen in der vorliegenden Arbeit als Kontrolle für Aggregation.

2.3.2 Die intrazellulären Serpine in *C. elegans*

Das Genom von *C. elegans* enthält neun serpin-ähnliche Proteine (*serpin-like proteins*; *srp*), die alle auf Chromosom V lokalisiert sind (Luke et al., 2006; Pak et al., 2004; Pak et al., 2006). Sämtliche Mitglieder der *srp*-Familie sind auf DNA-Ebene hochkonserviert. So zeigen beispielsweise *srp-5/srp-6* und *srp-9/srp-10* eine Sequenzübereinstimmung von 89 % und 90 % (Silverman et al., 2010). Diese hohe Sequenzhomologie lässt auf eine Genduplikation schließen, die stattfand, als *C. elegans* eine andere Entwicklung als andere Nematoden nahm. Die Proteine Srp-1, Srp-2, Srp-3, Srp-6, und Srp-7 enthalten eine alaninreiche Scharnierregion, die eines der typischen Charakteristika der inhibitorischen Serpine darstellt (Levy et al., 1990; Perry and Carrell, 1989). Die physiologische Funktion der Srp-Familie ist bisher nur zum Teil aufgeklärt. So lassen sich die neun Serpine in einem Kladogramm in drei taxonomische Gruppen unterteilen. Die erste Gruppe enthält Srp-1, die zweite Srp-2 und Srp-3 und die letzte die übrigen Serpine Srp-5, -6, -7, -8, -9, und -10 (Silverman et al., 2010).

Da unter 2.1.2 auf die Struktur der Serpine eingegangen wurde, werden im Folgenden die Unterschiede hierzu erläutert. Anders als eine Vielzahl der Serpine in Säugern und Insekten, besitzen die Mitglieder der Srp-Familie kein n-terminales hydrophobes Signalpeptid, welches der extrazellulären Lokalisierung dient. Dies lässt den Schluss zu, dass die Proteine ähnlich wie die Serpine des Stammes B intrazellulär lokalisieren (Silverman et al., 2004). Die Funktion der einzelnen Serpine in *C. elegans* ist weitestgehend unbekannt. Lediglich Srp-2 und Srp-6 wurden bisher genauer charakterisiert (Luke et al., 2007; Pak et al., 2004). Srp-6 spielt eine wichtige Rolle beim Schutz vor Nekrose wenn diese durch einen hypotonischen Schock ausgelöst wird. Der Fokus dieser Arbeit liegt auf Srp-2, welches ein Inhibitor von Serpin- und Cystein-Proteasen ist. Als Besonderheit hat Srp-2 an der P1 Position Glutamin als Aminosäure. Dies ist nur bei einem weiteren Protein der Fall, dem SerpinB9 welches dadurch Granzyme B inhibieren kann (Sun et al., 1996). Granzyme B spielt eine entscheidende Rolle bei Apoptose und könnte in einer endogenen Form auch in *C. elegans* diese Rolle übernehmen (Waterhouse et al., 2005).

3 Materialien

3.1 Stämme

3.1.1 Bakterienstämme

Die Quelle der Stämme ist jeweils angegeben. CGC (Caenorhabditis Genetics Centre, University of Minnesota, Minneapolis, MN, U.S.A.).

Tabelle 3.1: Verwendete *E. coli*-Stämme.

STAMMNAME	VERWENDUNGSZWECK	ANTIBIOTIKARESISTENZ	QUELLE
OP50	Nahrungsquelle für <i>C. elegans</i> , uracil auxotroph	Tet ^r	CGC
Epicurian Coli XL10 Gold® ultracompetent cells	Klonierung	Tet ^r , Cam ^R	Agilent
HT115 (DE3)	DE3 lysogen: lacUV5 Promotor-T7 RNA polymerase (IPTG- induzierbare T7 RNA Polymerase), RNase III minus, Produktion von doppelsträngiger RNA für RNAi-Fütterung	Tet ^r	CGC

3.1.2 *C. elegans*-Stämme aus anderen Laboratorien

Die Stämme wurden von den folgenden Quellen erhalten. Dem CGC (University of Minnesota, Minneapolis, MN, U.S.A.), J. Hodgkin (Oxford University, Oxford, England), B. Herman (University of Minnesota, Minneapolis, MN, U.S.A.), S. Mitani (Tokyo Women's Medical College, Tokyo, Japan), P. Sternberg (California Institute of Technology, Pasadena, U.S.A.), R. Kaufman (Department of Biological Chemistry, University of Michigan Medical Center, Ann Arbor, MI, U.S.A.) und R. Barstead (Oklahoma Medical Research Foundation, Oklahoma City, OK, U.S.A.).

Tabelle 3.2: *C. elegans*-Stämme.

STAMMNAME	GENOTYP	EIGENSCHAFTEN	QUELLE
N2	<i>C. elegans</i> wild-type (Bristol variant)	Wildtyp	CGC
BR584	unc-119(ed4)III	Gestörte Motorik & Dauerlarvenbildung	CGC
CB1033	che-2(e1033)X	Gestörte Chemosensorik	J. Hodgkin
CB1124	che-3(e1124)I	Gestörte Chemosensorik	B. Herman
FX00744	srp-2(tm744)V	Deletionsmutante srp-2	S. Mitani
PS3551	hsf-1(sy441) I	Deletionsmutante hsf-1	P. Sternberg
RE666	ire-1(v33)II	Deletionsmutante ire-1	R. Kaufmann
RB545	pek-1(ok275)X	Deletionsmutante pek-1	R. Barstead
RB772	atf-6(ok551)X	Deletionsmutante atf-6	R. Barstead
RB631	srp-2(ok350)V	Deletionsmutante srp-2	R. Barstead
RB1317	srp-3(ok1433)V	Deletionsmutante srp-3	R. Barstead

3.1.3 Generierte *C. elegans*-Stämme

Die nachfolgende Tabelle enthält eine Übersicht über die in der Arbeit verwendeten *C. elegans*-Stämme. Eine Erläuterung zu der entstandenen Linie bzw. zu deren Phänotyp findet sich an entsprechender Stelle im Ergebnisteil.

Tabelle 3.3: Generierte *C. elegans*-Stämme.

STAMMNAME	GENOTYP
PP654	unc-119(ed4)III; hhIs74[unc-119(+); unc-54::srp-2::yfp]
PP655	unc-119(ed4)III; hhIs75[unc-119(+); unc-54::srp-2::yfp]
PP656	unc-119(ed4)III; hhEx38[unc-119(+); unc-54::srp-2::yfp]
PP657	unc-119(ed4)III; hhIs76[unc-119(+); unc-54::srp-2(H302R)::yfp]
PP658	unc-119(ed4)III; hhIs77[unc-119(+); unc-54::srp-2(H302R)::yfp]
PP659	unc-119(ed4)III; hhEx39[unc-119(+); unc-54::srp-2(H302R)::yfp]
PP660	unc-119(ed4)III; hhIs79[unc-119(+); srp-2::srp-2::yfp]
PP667	unc-119(ed4)III; hhIs82[unc-119(+); srp-2::srp-2(H302R)::yfp]
PP804	N2; ire-1(v33)II; hhIs75[unc-119(+); unc-54::srp-2::yfp]
PP805	N2; ire-1(v33)II; hhIs76[unc-119(+); unc-54::srp-2(H302R)::yfp]
PP806	N2; ire-1(v33)II; hhIs79[unc-119(+); srp-2::srp-2::yfp]
PP807	N2; ire-1(v33)II; hhIs82[unc-119(+); srp-2::srp-2(H302R)::yfp]
PP808	N2; pek-1(ok275)X; hhIs75[unc-119(+); unc-54::srp-2::yfp]
PP809	N2; pek-1(ok275)X; hhIs76[unc-119(+); unc-54::srp-2(H302R)::yfp]

STAMMNAME	GENOTYP
PP810	N2; pek-1(ok275)X; hhIs79[unc-119(+); srp-2::srp-2::yfp]
PP811	N2; pek-1(ok275)X; hhIs82[unc-119(+); srp-2::srp-2(H302R)::yfp]
SL1	N2; hsf-1(sy441)I; hhIs75[unc-119(+); unc-54::srp-2::yfp]
PP816	N2; hsf-1(sy441)I; hhIs76[unc-119(+); unc-54::srp-2(H302R)::yfp]
PP817	N2; hsf-1(sy441)I; hhIs79[unc-119(+); srp-2::srp-2::yfp]
PP818	N2; hsf-1(sy441); hhIs82[unc-119(+); srp-2::srp-2(H302R)::yfp]
SL2	N2; atf-6(ok551)X; hhIs75[unc-119(+); unc-54::srp-2::yfp]
SL3	N2; atf-6(ok551)X; hhIs76[unc-119(+); unc-54::srp-2(H302R)::yfp]
SL4	N2; atf-6(ok551)X; hhIs79[unc-119(+); srp-2::srp-2::yfp]
SL5	N2; atf-6(ok551)X; hhIs82[unc-119(+); srp-2::srp-2(H302R)::yfp]
PP644	srp-2(ok350)V; srp-3(ok1433)V
PP645	srp-2(tm744)V; srp-3(ok1433)V

3.2 Reagenzien

3.2.1 Nukleinsäure und Nukleotide

Oligonukleotide

Die Oligonukleotide für die Polymerase-Kettenreaktion (Primer) wurden mit dem Programm Vector NTI (Invitrogen) entworfen und bei Sigma-Aldrich bestellt. Eine vollständige Auflistung inklusive Beschreibung befindet sich im Anhang 8.1.

Plasmide

Tabelle 3.4: Verwendete Plasmide.

NAME	BESCHREIBUNG	VERWENDUNG	QUELLE
pJET1.2/blunt	2974 bp, Amp ^r	Klonierungsvektor	Fermentas
L4440	2790 bp, Amp ^r , zwei T7 Promotoren in gegenseitige Richtung	RNAi-Fütterung	A. Fire
pPD88.27	7138 bp, Amp ^r	Vector enthält den unc-54 Promotor für muskelspezifische Expression	Addgene
pLN022yfp	12490 bp, Amp ^r , C-terminales yfp-Protein	Vektor für ballistische Transformation	L. Neukomm

A. Fire (Stanford University School of Medicine, Stanford, U.S.A.), L. Neukomm (University of Massachusetts Medical School, Worcester, MA, U.S.A.)

Längenmarker für DNA-Gelelektrophorese

1 kb plus DNA Leiter: 100, 200, 300, 400, 500, 650, 850, 1000, 1650, 2000, 3000, 4000, 5000, 6000, 7000, 8000, 9000, 10000, 11000 und 12000 bp (Invitrogen)

Größenmarker für SDS-Gele

PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder: 10, 15, 25, 35, 55, 70, 100, 130 und 250 kDa (Fermentas)

3.2.2 Enzyme

Restriktionsendonukleasen

Die Restriktionsendonukleasen *FseI* (2.000 U/ml) - *ApaI* (50.000 U/ml) - *AscI* (10.000 U/ml) - *SbfI* (10.000 U/ml) und *PacI* (10.000 U/ml) wurden von New England Biolabs bezogen. Bei Einzelverdau wurden die Enzyme in den mitgelieferten Puffern eingesetzt. Für die Doppelverdau wurde entsprechend der Empfehlungen von New England Biolabs verfahren. Falls erforderlich wurde gereinigtes bovines Serumalbumin in der Konzentration von 100 µg/ml zugesetzt.

Andere Enzyme

rAPid Alkaline Phosphatase	Roche
T4 DNA-Ligase	Roche
MangoTaq™ DNA Polymerase	Bioline
Phusion™ Flash	Finnzyme
Collagenase IV	Stigma

3.2.3 Antikörper

Primärantikörper

ANTIKÖRPER	SPEZIES	SPEZIFITÄT	VERDÜNNUNG	QUELLE
Anti-living color	Maus	Monoklonal gegen Fluoreszenzproteine	1:5000	Clontech
Anti- α -Tubulin	Maus	Monoklonal gegen α -Tubulin	1:5000	Sigma-Aldrich
Anti-CYP-33E1	Maus	Monoklonal gegen Cytochrom P450 des ERs	1:1000	DSHB

Sekundärantikörper

ANTIKÖRPER	KONJUGAT	VERDÜNNUNG	QUELLE
Ziege Anti-Maus HRP	Meerrettichperoxidase	1:10000	Jackson Immuno Research
Alexa Fluor® 555 Ziege Anti-Maus	Alexa Fluor 555	1:200	Sigma-Aldrich

Zu allen Ansätzen mit sekundären Alexa Fluor-gekoppelten Antikörpern wurde der Farbstoff DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole 1 mM Lösung in DMSO, Sigma-Aldrich) in einer Verdünnung von 1:1000 hinzugegeben. DAPI bildet Komplexe mit doppelsträngiger DNA und ermöglicht aufgrund seiner Fluoreszenz eine Detektion von DNA bzw. Zellkernen bei 461 nm.

3.2.4 Chemikalien

Alle Chemikalien wurden - falls nicht anders vermerkt - von den Firmen Roth (Karlsruhe), Sigma-Aldrich (Deisenhofen), Merck (Darmstadt), Fluka (Neu-Ulm) und Roche (Basel) im Reinheitsgrad p. A. bestellt.

3.2.5 Puffer und Lösungen

Die verwendeten Pufferlösungen wurden mit deionisiertem Wasser der Qualität Aqua bidest (ddH₂O) hergestellt. Lösungen und Medien wurden nach Bedarf autoklaviert (20 min, 121°C, 2x10⁵ Pa). Die nachfolgend aufgeführten Lösungen für die Molekularbiologie und für histologische Methoden wurden gemäß Literatur (Sambroock, 2000) oder den entsprechenden Protokollen hergestellt und sind nachfolgend alphabetisch aufgeführt.

AbA-Lösung	40 ml PBS 200 µl Triton X-100 0,4 g BSA
β-Mercaptoethanol-Lösung	1 ml ddH ₂ O 400 µl 0,5M Tris (pH 6.8) 15 µl Triton X-100 76 µl β-Mercaptoethanol
Bleichlösung	2,5 ml 5 M KOH, 6 ml NaOCl, ad 50 ml

Blockierlösung	5 % Milchpulver in 1x PBS-T
Blottingpuffer	50 ml Tris-Glycine (20x), 20 % (v/v) Methanol, 0,01 % (w/v) SDS, ad 1 l
Chemotaxis-Platten	2 % Difco Agar 5 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 6,0) 1 mM CaCl ₂ 1 mM MgSO ₄
Cholesterin-Lösung	5 mg/ml in Ethanol
Collagenase-Lösung	480 µl ddH ₂ O 120 µl Tris (pH 7,4) 0,6 µl CaCl ₂ 12 µl Collagenase-Stammlösung
Collagenase-Stammlösung	100 mg Collagenase IV 1 ml Tris pH 7,4
Coomassie-Lösung	1 g/l Coomassie brilliant blue R-250 45 % (v/v) Methanol, 10 % (v/v) Eisessig in ddH ₂ O filtriert durch Whatmannfilter Nr. 1
DAPI-Lösung	1 mM in DMSO gelöst
DiL-Lösung	2 mg/mL DiL in Dimethylformamid
DNA- Ladepuffer (10x)	0,25 % (w/v) Bromphenolblau, 0,25 % (w/v) Xylencyanol, 30 % (w/v) Glycerin
dNTP-Mix	10 mM pro dATP, dCTP, dGTP, dTTP
Entfärbelösung (Coomassie)	20 % (v/v) Ethanol, 10 % (v/v) Eisessig in ddH ₂ O
Ethidiumbromidlösung	10 mg/ml Ethidiumbromid
<i>Freezing</i> -Lösung	20 ml 1 M NaCl, 10 ml 1 M Kaliumphosphatpuffer, 60 ml 100 % Glycerin, 0,6 ml 0,1 M MgSO ₄ ad 200 ml mit ddH ₂ O
IPTG	1 M Stammlösung in ddH ₂ O

Kaliumphosphatpuffer	0,8 M KH_2PO_4 , 0,2 M K_2HPO_4 , pH 6 ad 1 l
LB-Medium	0,5 % NaCl 0,5 % Hefeextrakt, 0,1 % Glukose, in ddH ₂ O (pH 7)
LB-Amp-Medium	LB-Medium, 100 µg/mL Ampicillin
LB-Amp-Platten	1 l LB-Amp-Medium, 15 g Agar
M9-Puffer	20 mM KH_2PO_4 , 40 mM Na_2HPO_4 , 80 mM NaCl, 1 mM MgSO_4
Nativgel-Lysepuffer	50 mM Tris pH 7,4, 5 mM MgCl_2 , 0,5 % Triton-X 100, 1 Complete-Tablette je 10 ml
Natriumacetat-Lösung	3 M Natriumacetat in ddH ₂ O (pH 5,2)
NGM-Agarplatten	0.3 % (w/v) NaCl, 2 % Agar (w/v), 0.25 % (w/v) Peptone, 0.0005 % (w/v) Cholesterin. Autoclavieren, dann CaCl_2 und MgSO_4 (je 1 mM finale Konzentration) und Kaliumphosphatpuffer (pH 6.0; 25 mM finale Konzentration) Die Platten werden bei RT gelagert
PAGE-Laufpuffer (nicht-reduzierend)	20 mM Tris, 200 mM Glycin, pH 8,3
PAGE-Probenpuffer (5x)	250 mM Tris, 0,5 % Bromphenolblau, 50 % Glycerin
PBS (10x)	1,37 M NaCl, 27 mM Kgl, 100 mM Na_2HPO_4 , 20 mM KH_2PO_4 pH 7,4
PBS-T	siehe PBS, Zugabe von Tween 20 (finale Konzentration 0,1 % (v/v))
Proteinase K-Lösung	20 mg/ml

Rhodamine-Phalloidine-Lösung	Rhodamine-Phalloidine (Invitrogen) gelöst in 1,5 ml Methanol (200 U/ml)
Sammelgelpuffer	0,5 M Tris, 0,4 % SDS, pH 6,8
<i>Single worm lysis buffer</i>	50 mM KCl, 10 mM Tris (pH 8,3), 2.5 mM MgCl ₂ , 0.45 % (v/v) Tween 20, 0.01 % (w/v) Gelatine. Proteinase K-Zugabe erfolgt vor Benutzung (Endkonzentration 50 µg/µl)
Sodium dodecyl sulfate (SDS)	20 % (w/v) Stammlösung
SDS-PAGE-Laufpuffer (10x)	250 mM Tris, 2 M Glycin, 1 % SDS
SDS-PAGE-Probenpuffer (5x)	250 mM Tris, 10 % SDS, 0,5 % Bromphenolblau, 50 % Glycerin
SOC-Medium	2 % Trypton, 0,5 % Hefeextrakt, 8,6 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 20 mM MgSO ₄ , 20 mM Glukose
TBE-Puffer (10x)	1M Tris-HCl, 1M Borsäure, 20 mM EDTA, pH 8
TE (1×)	10 mM Tris-HCl pH 8.0 0,1 mM EDTA pH 8.0
Trenngelpuffer	1,5 M Tris, 0,4 % SDS, pH 8,8
Tris-Puffer	Molarität und pH-Wert nach Bedarf
Tris-Glycine (20x)	250 mM Tris, 1,9 M Glycin ad 1 l
Wurm Lyse Puffer für genomische DNA	200 mM NaCl, 100 mM Tris-HCl (pH 8.5) 50 mM EDTA (pH 8.0) 0,5 % SDS Proteinase K-Zugabe erfolgt vor Benutzung (Endkonzentration 50 µg/µl)

3.2.6 Reagenzsysteme (Kits)

Gelextraktion	QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen
Mutagenese	QuickChangeII Site Directed Mutagenesis Kit	Agilent
PCR-Aufreinigung	QIAquick PCR Purification Kitt	Qiagen
Plasmid-Präparation	QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen
	Qiagen Plasmid Midi Kit	Qiagen
Proteaseinhibitor	Complete Protease Inhibitor	Roche
	Cocktail Tablett	
Western Blot Detektion	Pierce ECL Western Blotting Substrate	Thermo-Scientific

3.3 Verbrauchsmaterial

Combitips	versch. Größen	Eppendorf
Deckgläser, 0,13-0-16 mm	12 x 12 mm	Marienfeld
Einwegpipetten, steril	5, 10, 25 ml	Falcon/BD Biosciences
Filterpapier	Whatman	Schleicher & Schuell
Filmentwicklungslösung		Kodak
Filmfixierungslösung		Kodak
Filme für die Chemolumineszenz	Hyperfilm ECK	GE Healthcare
Goldpulver	0,3 – 3 Mikron	ChemPur
Kryoröhrchen	1 ml	Nunc
Nitrocellulosemembran	HyBond C	GE Healthcare
Objektträger, 1 mm	76 x 26 mm	Marienfeld
Parafilm		VWR
Pipettenspitzen	epT.I.P.S.	Eppendorf
Polypropylenröhrchen	15 ml, 50 ml	Greiner
Reaktionsgefäße	versch. Größen	Eppendorf
Untersuchungshandschuhe	Peha-Soft	Hartmann

3.4 Laborgeräte

Analysenwaage	Analytical Plus	Satorius
Autoklav	Modell 2540 EK	Tuttnauer
	Varioklav	HRP Labortechnik GmbH
Bakterienbrutschrank	BD115	Binder
Ballistischer Transformator	PSD-1000/He	BioRad
Computer	MacBook Pro 4.1	Apple Inc.
Eismaschine	FM-120DE-50	Hoshizaki
Erlenmeyerkolben	versch. Größen	VOR
Feinwaage	430-39	Kern
Filmentwicklungsmaschine	Fuji Medical Film,	Fuji Photo Film Co., Ltd.
	Professor FPM-100A	
Fluoreszenzimager	Typhoon Trio	GE Healthcare
Fluoreszenzmikroskop	Axiovert 200M	Zeiss
Fluoreszenzmikroskop- Objektive	Plan-Apochromat	Zeiss
	20x/0,80	
	Plan-Neofluar 40x/0,75	Zeiss
	Plan-Apochromat	Zeiss
	63x/1,25	
	CFG Plan Apochromat	Nikon
	60x/1,4	
Geldokumentation	DeVision G	Delon ScienceTEC
Gefrierschrank -20°C	comfort	Liebherr
Glasflaschen	versch. Größen	Schott
Heizblock	Thermomixer comfort	Eppendorf
Kühlschrank	Premium	Liebherr
Kühlzentrifuge	5417R	Eppendorf
Laufkammern für die DNA-Gelelektrophorese	PerfectBlue Gelsystem	PEQLAB
	verschiedenen Größen	
Laufkammern für die (SDS-) PAGE	SE260 Mighty Small II	Hofer

Laufkammern für den Westernblot	TE22 Mini Transfer Tank	Hoefer
Inkubator	MIR-154/MIR-254	Sanyo
Magnetrührer	RCT S 26	Omnilab/IKA-Labortechnik
Mikro-Pipetten	Typ „ <i>Research</i> “	Eppendorf
Mikrowellenofen	R-334	Sharp
Plattformschüttler	STR6	Stuart Scientific
Pipettierhilfe	Pipetboy accu	Integral
Röntgenfilmkassetten	Suprema	Dr. Goos
Scanner CanoScan	N6556U	Canon
Schüttelinkubator	Ecotron/Unitron	Infors
Spannungsgerät für die DNA-Gelelektrophorese	Modell BI0105 LVD	BioRad
Spannungsgerät für die SDS-PAGE/Elektoblot	Power Pack Basic	BioRad
Spinning Disc-Mikroskop	Ultraview Vox	Perkin Elmer
Stereomikroskop	MZ7.5	Leica
Thermocycler	MyCycler	BioRad
Tischzentrifuge	Typ 5418	Eppendorf
Ultraschallsonde	Sonopuls mini 20	Bandelin
UV-Spektrometer	NanoDrop™ 8000	Thermo
UV-Transilluminator	60-ETX20-M	Peqlab
Vortex	MixMate	Eppendorf
Wasserbad	Typ 1007	GFL
Wasserdeionisierungsanlage	MilliQ synthesis	Millipore
	Elia 10	Millipore
Zentrifuge	5430R	Eppendorf
-80°C-Schrank	UF80-450S	Colora

4 Methoden

4.1 Methoden der *in silico*-Recherche und Bioinformatik

Die *in silico*-Recherche diente der Findung von Neuroserpin-homologen Proteinen in *C. elegans*. Dazu wurden Sequenzdatenbanken auf ähnliche Sequenzen in der Primärstruktur mit Hilfe des *Basic Local Alignment Search Tools (BLAST)* durchsucht (Altschul et al., 1990). Verwendet wurde hierfür der blastp-Algorithmus, der eine Aminosäuresequenz gegen eine Proteinsequenzdatenbank abgleicht. Die BLAST-Suche erfolgte über die Internetseiten des *National Center for Biology Information (NCBI)* (URL: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) sowie der Ensembl-Datenbank (URL: <http://www.ensembl.org/Multi/blastview>). Die Anordnung der homologen Proteine in Sequenzalignments und die Berechnung der Sequenzidentitäten erfolgte mit dem Programm ClustalW (URL: <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2>). Die grafische Darstellung von Proteinen erfolgte mit dem Programm UCSF Chimera.

4.2 Molekularbiologische Methoden

4.2.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR ist eine *in vitro*-Methode zur enzymatischen Synthese definierter DNA-Sequenzen. Im Programmablauf wurden zunächst die Wasserstoffbrückenbindungen der komplementären DNA-Stränge getrennt, so dass sich zwei Primer, welche die zu amplifizierende Region (Ziel-DNA) flankieren, anlagern konnten. Eine thermostabile DNA-abhängige DNA-Polymerase synthetisierte, ausgehend von den entsprechenden Primer, die jeweiligen komplementären DNA-Stränge. Durch mehrmalige Wiederholung dieser Denaturierung, Anlagerung und Verlängerung, kam es zu einer exponentiellen Amplifikation der gewünschten DNA-Sequenz der Ziel-DNA, deren Enden durch die Primer festgelegt waren. Als Reaktionsvolumen wurden 50 µl gewählt, so dass eine Einheit DNA-Polymerase, 50 ng DNA-Matrize, je 10 pmol Primer, 1 µl 10 mM dNTP-Mix, 1,5 µl 25 mM MgCl₂ und 5 µl 10 x PCR-Puffer eingesetzt wurden. Die Wahl der jeweiligen Zeit pro Schritt war abhängig von der Anlagerungstemperatur der Primer, von der Länge des erwarteten Produktes und von der Menge der DNA-Sequenz in der Probe. In der folgenden Tabelle 4.1 ist ein Standard PCR-Programm beschrieben.

Tabelle 4.1: PCR-Programm für die meisten Reaktionsbedingungen.

SCHRITT	TEMPERATUR	ZEIT	SCHLEIFE
Initiale Denaturierung	94°C	5 min	
Denaturierung	94°C	30 s	32 x
Primerbindung	55°C	45 s	
Synthese	72°C	45 s / 1 kbp	
Finale Synthese	72°C	7 min	
Aufbewahrung	4°C	Beliebig	

Nach Ablauf der Reaktion wurden die Ansätze mit 1/10 Vol. DNA-Ladepuffer (10x) versetzt und die Amplifikate über ein Agarosegel getrennt, dadurch von eventuell auftretenden Primer-Dimeren gereinigt und aus dem Agarosegel eluiert (4.2.6).

4.2.2 Zielgerichtete Mutagenese

Die zielgerichtete Mutagenese von Plasmiden wurde nach dem Protokoll des QuickChange Site Directed Mutagenesis Kits von Agilent durchgeführt. Die verwendeten Primer sind in Anhang 8.1 aufgeführt. Nach erfolgter Polymerase-Kettenreaktion wurde dem Ansatz 1 µl der Restriktionsendonuklease *DpnI* (20 U) zugesetzt, für eine Stunde bei 37 °C inkubiert und im Anschluss 20 min bei 65 °C die Restriktionsendonuklease inaktiviert. 1 µl dieses Mutageneseansatzes wurde in 50 µl XL10-Gold ultrakompetente Zellen transformiert und auf LB-Agarplatten mit Antibiotikum ausgestrichen. Aus Einzelkolonien wurden 3 ml-Kulturen in LB-Medium mit Antibiotikum angeimpft. Aus der Kultur wurde dann Plasmid-DNA isoliert (4.2.10) und durch Sequenzierung (4.2.13) die erfolgreiche Mutagenese überprüft. Ein Teil der Kultur wurde für die Kryokonservierung (4.2.12) eingesetzt.

4.2.3 Restriktionsverdau

Im Allgemeinen wurde jeweils gemäß Hersteller die erforderliche Menge an Puffer und Restriktionsendonuklease eingesetzt. Dazu wurde in der Regel 1,5 µg Vektor mit 10 Einheiten in einem Volumen von 50 µl verdaut. Der Ansatz wurde dann für 2 Stunden bei der vom Hersteller angegebenen Temperatur inkubiert. Anschließend wurde der Vektor mit alkalischer Phosphatase (Roche) gemäß Herstellerangaben dephosphoryliert um eine Religation zu verhindern. Der Ansatz wurde dann wie unter 4.2.6 beschrieben aufgereinigt. Insert-DNA wurde entsprechend verdaut, jedoch ohne die anschließende Dephosphorylierung.

4.2.4 DNA-Gelelektrophorese

Zur Analyse sowie der präparativen Trennung von DNA-Fragmenten nach dem Restriktionsverdau wurde die Agarose-Gelelektrophorese eingesetzt. Es wurden Flachbettgelapparaturen und je nach erwarteter Größe der DNA-Fragmente 0,8-1,0 %ige Agarosegele mit TBE (0,5x) verwendet. Die DNA wurde in DNA-Ladepuffer aufgenommen und die Proben bei 10-15 V/cm laufen gelassen. Nach erfolgter Gelelektrophorese wurde die DNA in den Gelen in einem Ethidiumbromid-Bad angefärbt und auf einem UV-Transilluminator detektiert und dokumentiert. Zur Bestimmung der Fragmentgröße wurde der Marker 1 kb plus DNA (Invitrogen) verwendet.

4.2.5 Aufreinigung von DNA-Fragmenten

Die Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde mit dem QIAquick Gel Extraction Kit nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Hierbei wurde die Agarose durch Inkubation in einem Puffer mit chaotropen Salzen bei 50° C aufgelöst und die DNA mittels Anionenaustauschersäulen aufgereinigt. Zur Elution wurde ddH₂O verwendet.

4.2.6 Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Konzentrationsbestimmung erfolgte über die optische Dichte. Dazu wurde konventionsgemäß eine OD von 1 einer Konzentration von 50 µg/ml bei doppelsträngiger DNA zugrunde gelegt. Die Konzentrationsbestimmung der isolierten Plasmid-DNA Lösungen erfolgte durch photometrische Messung der OD bei 260 nm mit einem Photometer NanoDropTM 8000. Für die Bestimmung der Reinheit der DNA-Lösung wurde der Quotient aus OD 260 nm/OD 280 nm gebildet. Eine saubere DNA-Präparation sollte eine Ratio von 1,8 – 2,0 aufweisen.

4.2.7 Ligation von DNA-Fragmenten

Zur Ligation wurden 150 ng des verdauten und aufgereinigten Vektorfragmentes (siehe 4.2.5 und 4.2.6) mit einer geeigneten Menge an geschnittenem Insertfragment versetzt. In der Regel wurde ein 3-facher Überschuß der Insert- zu Vektor-Konzentration eingesetzt, basierend auf folgender Formel:

- i.) $\text{Größe des Vektors (bp)} / \text{Größe des Inserts (bp)} = Y$
- ii.) $\text{ng des Vektors} / Y * 3 = \text{ng des Inserts}$

Die Ligationsfragmente wurden mit 4 µl 2x Ligase-Puffer (Roche) und 1 µl T4 DNA-Ligase (5 U/µl, Roche) in einem finalen Volumen von 20 µl ligiert. Dieser Schritt erfolgte für 60 min bei Raumtemperatur bei kohesiven Enden oder bei 16°C über Nacht bei stumpfen Enden.

4.2.8 Transformation von Bakterien

Für die Amplifikation von Plasmid-DNA wurde diese in Bakterien des Stammes XL10 Gold® (Agilent) nach Herstellerangaben eingebracht (Ausubel, 1996). Zur Transformation wurden 50 µl frisch aufgetaute Bakteriensuspension mit 2 µl des Ligationsansatzes bzw. der Plasmid-DNA versetzt. Durch Hitzeschock bei 42°C für 30 Sekunden wurden die Bakterien transformiert. Die transformierten Bakterien wurden in 1 ml SOC-Medium aufgenommen und 1 h bei 37°C und 230 rpm inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien auf LB-Agarplatten mit entsprechendem Antibiotikum ausgestrichen und über Nacht bei 37°C kultiviert.

4.2.9 Bakterienkulturen

Die Bakterien wurden entweder auf Agarplatten oder in Flüssigkultur mit entsprechendem Selektionsdruck durch Antibiotikum bei 37°C kultiviert. In der folgenden Tabelle sind die entsprechenden Antibiotika aufgeführt.

Tabelle 4.2 Verwendete Antibiotika.

ANTIBIOTIKUM	STAMMLÖSUNG	LAGERUNG	ENDKONZENTRATION
Ampicilin	100 mg/ml in ddH ₂ O	- 20°C	100 µg/µl
Chloramphenicol	34 mg/ml in ddH ₂ O	- 20°C	34 µg/µl
Tetracyclin	12,5 mg/ml in Ethanol	- 20°C	12,5 µg/µl

4.2.10 Screening der Bakterienkolonien

Bakterienkolonien, die über Nacht auf Agarplatten wuchsen, wurden mit einem Zahnstocher gepickt und in 3 ml LB-Medium aufgenommen. Nach der erfolgten Kultur über Nacht wurden dann die Plasmid-DNA der Bakterien wie in 4.2.11 beschrieben isoliert und anschließend mit geeigneten Restriktionsenzymen verdaut. Die entstehenden Fragmente wurden dann über ein Agarosegel nach den erwarteten Banden durchsucht.

4.2.11 Präparation von Plasmid-DNA

Für die Gewinnung von Plasmid-DNA wurden Bakterien, die das gewünschte Plasmid enthielten, entsprechend aufgeschlossen. Dazu wurde die DNA aus den in 4.2.10 erhaltenen Kolonien nach der Anzucht durch das QIAprep Spin Miniprep Kit isoliert. Dieses Isolations-Kit kombiniert die Methoden der alkalischen Lyse mit der selektiven und reversiblen Bindung der DNA an eine sogenannte HiBind®-Silikamembran. Die Durchführung erfolgte gemäß den Herstellervorgaben. Für die Midipräparationen (ermöglichte je nach Plasmid eine Isolation von 100-200 µg DNA) wurde das Qiagen Plasmid Midi Kit nach Angaben des Herstellers verwendet. Das durch Zentrifugation gewonnene Bakterienpellet wurde dabei mittels alkalischer Lyse (Birnboim and Doly, 1979) aufgeschlossen. Die finale Elution erfolgte in ddH₂O.

4.2.12 Kryokonservierung transformierter Bakterien

Zur Erhaltung von generierten Plasmiden wurden die transformierten Bakterien konserviert. Dies ist dadurch möglich, dass Bakterien in einem glycerinhaltigen Medium bei -80 °C eingefroren werden. Dazu wurden 700 µl einer Flüssigkultur mit 300 µl sterilem 70 % (w/v) Glycerin versetzt, gevortext und in einem Kryoröhrchen kurz in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Das Kryoröhrchen wurde anschließend in einen -80 °C Schrank überführt und dort gelagert.

4.2.13 DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierungen wurden mit einem *ABI Prism® 3100 DNA Sequencer* (Applied Biosystems) unter Verwendung des *ABI Prism Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit* (Applied Biosystems) vom DNA-Sequenzierservice der Analytical Services North unter Leitung von Herrn PD Dr. R. Simon durchgeführt. Das Verfahren beruht auf der Didesoxy-Kettenabbruchmethode, bei der fluorochrome Nukleotide die lineare Polymerisierungsreaktion beenden (Sanger et al., 1977).

4.2.14 Plasmidherstellung

Zur Herstellung der Vektoren für die ballistische Transformation (Im Folgenden Bombardmentvektor) wurde der Vektor pLN022yfp verwendet. Dieser wurde von Herrn Dr. Lukas Neukomm zur Verfügung gestellt und ist durch mehrere Charakteristika gekennzeichnet. Er enthält das Ampicillinresistenz-Gen sowie das Gen, um unc-119 Deletionsmutanten in die Lage zu versetzen, Dauerlarven entwickeln zu können (unc-119(+)-rescue).

Der Vektor enthält ein C-terminales Fluoreszenzgen (YFP) inklusive des Stopcodons, so dass das zu exprimierende Gen direkt mit diesem fusioniert werden und in der Zelle lokalisiert werden kann. Jeweils zwei Restriktionsschnittstellen flankieren den Promotor, das Gen und die 3' untranslatierte Region (siehe Plasmidkarte in 8.2). Der Vektor kann so genutzt werden, um ein beliebiges Gen mit YFP zu koppeln, unter verschiedenen Promotoren zu exprimieren und dabei die gewebsspezifische 3'UTR zu verwenden, indem die Fragmente im Vektor ausgetauscht werden. Dazu werden die entsprechenden Inserts, wie unter 4.2.1 beschrieben, durch Primer amplifiziert. Dabei werden die Erkennungssequenzen um die entsprechenden Schnittstellen für die Restriktionsendonukleasen verlängert (Sequenzen der Primer im Anhang 8.1). In der vorliegenden Arbeit wurden folgende Plasmide zur Generierung transgener Linien verwendet.

pSL1 (*unc-54::srp-2::YFP*): Expression von Srp-2 unter dem muskelspezifischen Promotor *unc-54*. Der 254 bp umfassende Promotor für die muskelspezifische Expression wurde mit Hilfe der PCR aus dem Vektor pPD88.27 herausamplifiziert und dann in den Hilfsvektor pJET1.2 (Fermentas) kloniert, um entsprechend größere Mengen des Fragments als durch PCR möglich zu erhalten. Anschließend wurde durch die flankierenden Schnittstellen für *SbfI* und *AscI* das DNA-Fragment per Restriktionsverdau und Ligation in den Bombardmentvektor eingebracht. Das 1777 bp lange Fragment der genomische *srp-2*-DNA ohne das entsprechende Stopcodon wurde mit den flankierenden Restriktionsschnittstellen für *AscI* und *FseI* subkloniert. Die vorhandene 3'UTR des *let-858*-Gens im pLN022yfp-Vektor wurde in diesem Fall nicht substituiert, da die Expression nicht unter endogenen Bedingungen stattfand.

pSL2 (*unc-54::srp-2^{H302R}::YFP*): Expression einer mutierten Form von Srp-2::YFP unter dem muskelspezifischen Promotor *unc-54*. Hier wurde das Plasmid pSL1 nach der erfolgten Herstellung - wie unter 4.2.4 beschrieben - mutiert. Die Mutagenese bewirkte einen Austausch der Aminosäure Histidin an Position 302 zu Arginin im translatierten Srp-2.

pSL3 (*srp-2::srp-2::YFP*): Expression von Srp-2::YFP unter dem endogenen Promotor. Der 5532 bp umfassende Promotor für die endogene Expression wurde in einem Stück mit dem 1777 bp großen genomischen *srp-2*-Fragment ohne Stopcodon

über PCR amplifiziert und durch die flankierenden Schnittstellen für *SbfI* und *FseI* in den Bombardmentvektor eingebracht. Die vorhandene 3'UTR des *let-858*-Gens im pLN022yfp-Vektor wurde in diesem Fall durch die endogene substituiert, indem diese aus der genomischen DNA herausamplifiziert wurde. Flankiert wurde dieses 680 bp große Fragment durch Restriktionsschnittstellen für *PacI* und *ApaI*.

pSL4 (*srp-2::srp-2^{H302R}::YFP*): Das Plasmid pSL3 wurde wie Plasmid pSL2 mutiert, so dass in der codierenden Sequenz an Position 302 eine Mutation von Histidin zu Arginin erfolgte.

4.3 Proteinbiochemische Methoden

4.3.1 SDS-Gelelektrophorese

SDS-Polyacrylamidgele wurde mit Rotiphorese®-Fertiggellösungen hergestellt. Diese gebrauchsfertige Lösung wird so eingesetzt, dass die gewünschte Gelkonzentration erzielt wurde. In der folgenden Tabelle 4.3 ist diese Zusammensetzung für die Herstellung von jeweils einem Laufgel und einem Sammelgel angegeben.

Tabelle 4.3: Zusammensetzung der SDS-Gele.

KOMPONENTE	7,5 % LAUFGEL	SAMMELGEL
30 % Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1)	1,4 ml	319 µl
ddH ₂ O	4 ml	1,8 ml
10 % SDS	62,5 µl	25 µl
1,5 M Tris pH 8,8	1,95 ml	-
1 M Tris pH 6,8	-	312 µl
10 % Ammoniumpersulphat	62,5 µl	25 µl
TEMED	6,2 µl	2,5 µl

Die aufzutragenden Proben wurden mit der entsprechenden Menge SDS-PAGE-Probenpuffer versetzt, bei 96°C für 5 Minuten inkubiert, für eine Minute bei 12.000 g zentrifugiert und anschließend auf Eis gelagert. Die Gele wurden in die Laufkammer für PAGE-Gele eingespannt, der SDS-Laufpuffer eingefüllt und die Proben nach Beladungsplan aufgetragen. Als Größenmarker für SDS-Gele wurde die PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder von Fermentas verwendet. Die Elektrophorese erfolgte bei 90 Volt für circa 1 ½ Stunden bei Raumtemperatur.

4.3.2 Nicht-reduzierende Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von nativen Proteinextrakten wurden die Gele wie in Tabelle 4.3 hergestellt, hier wurde die Komponente SDS durch Wasser ersetzt. Ebenfalls wurde der Laufpuffer wie auch der Probenpuffer ohne SDS verwendet. Die Proben wurden entsprechend nur für eine Minute bei 12.000 g zentrifugiert und anschließend auf Eis gelagert.

4.3.3 Western Blot

Die verwendete Nitrocellulosemembran (GE Healthcare) wurde vor dem Transfer in Blottingpuffer getränkt. Die Gele wurden dann aus der Laufkammer in den TE22 Mini Transfer Tank (Hoefer) überführt, indem dieser nach Herstellerangaben zusammengesetzt wurde. Der Proteintransfer erfolgte dann bei 200 mA für 2 Stunden bei Raumtemperatur. Wie gut der Transfer funktionierte wurde mit Ponceau S Färbelösung (0,1 % Ponceau S in 3 % Trichloressigsäure) überprüft. Dann wurde die Nitrocellulosemembran mit PBS-T entfärbt.

4.3.4 Coomassie-Färbung

Die SDS-Page-Gele wurden für 30 Minuten in Coomassie-Lösung gefärbt, dann einmal mit Wasser gespült und anschließend mit Entfärbelösung behandelt, bis das Bandenmuster sichtbar wurde.

4.3.5 Immunodetektion

Zur Detektion von spezifischen Proteinen wurde die Nitrocellulosemembran nach dem Western Blot (4.3.3) mit Blockierlösung für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Dies diente der Blockierung von unspezifischen Bindungen. Der primäre Antikörper wurde dann in Blockierlösung in der gewünschten Konzentration eingesetzt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Am folgenden Tag wurde die Membran dreimal für je 10 Minuten in PBS-T gewaschen, für 1 Stunde mit dem sekundären Antikörper in Blockierlösung bei Raumtemperatur inkubiert, erneut dreimal in PBS-T gewaschen und die Immunodetektion durchgeführt. Dazu wurde die Membran mit dem ECL- (*enhanced chemoluminescence*-) Substrat von Thermo Scientific inkubiert und anschließend in der Dunkelkammer ein Röntgenfilm aufgelegt, der dann das aufgetrennte Bandenmuster zeigte. Die verwendeten Antikörper sind in 3.2.3 angegeben.

4.3.6 Detektion von nicht-reduzierenden Gelen

Zur Detektion von Proteinen die mit gelb fluoreszierendem Protein gekoppelt waren, wurde an Stelle des Western Blots und der Immunodetektion die direkte Detektion durchgeführt. Dazu wurden die Gele nach der Elektrophorese auf den Typhoon Trio Scanner (GE Healthcare) gelegt und die Gele bei einer Wellenlänge von 488 nm angeregt. Da die Emissionsspitze des gelb fluoreszierendem Proteins bei 527 nm liegt, wurde zur Detektion der 520-nm Bandpassfilter (520 BP 40) gewählt, der für Licht mit einer Wellenlänge zwischen 500 and 540 nm durchlässig ist.

4.4 *C. elegans*-Methoden

4.4.1 Haltung von *C. elegans*

Um *C. elegans* in Kultur zu halten wurden NGM-Platten verwendet, auf denen Bakterien des Stammes OP50 wachsen. Diese Bakterien dienten den Würmern als Nahrungsquelle. Die Würmer wurden auf neue Platten gesetzt, bevor der Bakterienrasen aufgefressen war. Die Haltung erfolgte in einem Inkubator bei 15- 25°C. Wenn nicht anders angegeben, wurden die Würmer bei 20°C gehalten (Stiernagle, 2006; Sulston, 1988).

4.4.2 Generierung von Männchen durch Hitzeschock

Für genetische Kreuzungen wurden von den entsprechenden Wurmlinien Männchen generiert. Dazu wurden jeweils 20 Würmer des Stadiums L4 auf mit OP50 kolonisierte NGM-Agarplatten gegeben und anschließend für 6 Stunden bei 30°C belassen. Nach circa drei Tagen wurden die entstandenen Männchen gepickt und dann mit Hermaphroditen gekreuzt.

4.4.3 Genetische Kreuzungen

Hermaphroditen der Linie A wurden mit Männchen der Linie B gekreuzt, indem 3 Hermaphroditen (L4-Stadium) mit einem Überschuss an Männchen zusammen auf eine Platte gegeben wurden. Jeweils 5 Würmer der folgenden heterozygoten F1-Generation und 20 Würmer der F2-Generation wurden dann vereinzelt. Nachdem die F2-Generation erste Nachkommen erzeugte, wurde das Elterntier auf Homozygotie für das Fluoreszenzgen mittels eines Mikroskops (alle Nachkommen zeigten Fluoreszenz) und die Deletion für *xbp-1*, *atf-6* und *pek-1* durch PCR (siehe 4.4.8) bzw. durch einen Hitzeshock bei 25°C für *hsf-1* überprüft.

4.4.4 Synchronisieren von *C. elegans*

Die Synchronisierung von *C. elegans* erfolgte durch Bleichen. Man macht sich hierbei zu Nutze, dass die Cuticula der *C. elegans*-Eier für längere Zeit sehr resistent gegen Bleiche ist. Zur Gewinnung der Eier wurden adulte Würmer von den Kulturplatten mit M9-Puffer abgewaschen, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und anschließend bei 12.000 g für 1 Minute zentrifugiert. Danach wurde der Überstand abgenommen und durch Bleichlösung substituiert. Die Würmer wurden so lange inkubiert, bis ein Großteil der Würmer aufgebrochen war (circa 5 Minuten). Dann wurde erneut zentrifugiert und dreimal mit M9-Puffer gewaschen. Die freigelegten Eier wurden über Nacht unter Rotieren in M9-Puffer bei Raumtemperatur gelagert. Am nächsten Tag waren die überlebenden Embryos im L1-Stadium arretiert, da aufgrund der nicht vorhandenen Bakterien keine weitere Entwicklung möglich war.

4.4.5 Ballistische Transformation von *C. elegans*

Die ballistische Transformation wurde wie beschrieben durchgeführt (Praitis et al., 2001). Dazu wurden die Würmer des Stammes DP38 so synchronisiert und hochgezogen, dass am Tag der Transformation die Würmer das L4-Stadium erreicht hatten. Die Würmer wurden mit M9-Puffer geerntet und in 50 ml Polypropylenröhrchen auf Eis gelagert. Die Würmer ab dem L4-Stadium sedimentierten dabei, so dass am Ende hauptsächlich diese transformiert werden konnten. Während die Würmer sich absetzten, wurde die Plasmid-DNA an Goldpartikel gebunden. Dazu wurden die Goldpartikel zunächst mit 70 % Ethanol gewaschen, für 5 Minuten gevortext, 15 Minuten stehen gelassen und dann kurz zentrifugiert. Im Anschluss wurden die Partikel dann dreimal mit Wasser gewaschen und jeweils dazwischen zentrifugiert. Das Goldpellet wurde dann in 50 % Glycerin aufgenommen. Für die Transformation wurden 7 µg des einzubringenden Plasmids (in 30 µl gelöst) unter permanenten Vortexen mit 70 µl Goldlösung gemischt. Zum Binden der DNA an die Goldpartikel und zur Fällung dieser wurden dann ebenfalls unter Vortexen zunächst 300 µl einer 2,5 molaren CaCl₂-Lösung und dann 112 µl einer 0,1 molaren Spermidin-Lösung gegeben. Nach weiteren 5 Minuten Vortexen bei Raumtemperatur wurden die nun mit DNA beladenen Goldpartikel zunächst mit 70 % Ethanol und dann zweimal mit 100 % Ethanol gewaschen.

Zur Transformation wurde das Bio-Rad PDS-1000/He-Gerät entsprechend der Herstellerangaben verwendet. Die Goldpartikel wurden dazu auf die sogenannten Macrocarrier gegeben und gewartet bis der Ethanol verdunstete. Die Maschine wurde dann inklusive des Zubehörs zusammengesetzt. Kurz vor der Transformation wurden dann die sedimentierten Würmer auf eine Agarplatte gegeben und nach dem Trocknen der Flüssigkeit die Transformation durchgeführt. Nach der Transformation wurden die Würmer für 1 Stunde auf der Platte belassen, dann mit M9-Puffer abgespült und auf neue NGM-Agarplatten verteilt. Nach drei Wochen bei 20°C wurde dann überprüft, welche Würmer das Plasmid aufgenommen hatten. Dazu wurden die Würmer auf ein positives Fluoreszenz-Signal und Dauerlarvenbildung hin untersucht. Die Würmer können bei der ballistischen Transformation das Gen entweder in das Genom integrieren (Is = Integrierter Stamm) oder es entsteht - ähnlich wie bei Plasmiden in Bakterien - ein extrachromosomaler Array (Ex). Dies lässt sich anhand der Aufspaltung der Nachkommen erkennen, leuchten alle Nachkommen grün, so ist der Array in das Genom integriert. Bei der extrachromosomalen Expression hingegen treten auch Würmer auf, die den Array nicht geerbt haben und somit keine Fluoreszenz zeigten.

4.4.6 RNAi-Fütterung auf NGM-Platten

Die RNAi-Fütterung auf NGM-Platten wurde nach dem Protokoll für die RNAi-Bakterienfütterung gemacht (Kamath et al., 2001; Timmons et al., 2001). Die Verwendung von RNAi über diese Methode erlaubt es jedes Protein in *C. elegans* auszuschalten (Fire et al., 1998). Der verwendete *E. coli*-Stamm HT115(DEM) beinhaltet das Plasmid L4440 (Vektorkarte siehe Anhang 8.2. Dieses Plasmid enthält den T7 Promotor, der durch IPTG induzierbar ist. Der Promotor flankiert dabei Schlüsselsequenzen, die ein bestimmtes Zielgen ausmachen. Die Sequenz lässt die Bakterien dann doppelsträngige RNA bilden. Dazu werden die Bakterien, die in Bakterienkulturen in entsprechender Menge hochgezogen werden, auf NGM-Platten mit 1 mM IPTG und 100 µg/ml Ampicillin ausplattiert und über Nacht bei 20°C die RNAi-Bildung induziert. Am folgenden Tag wurden die Würmer auf diese Platten transferiert und deren Nachkommen für weitere Versuche wie den *Bodybend*-Assay oder die Überprüfung möglicher Signalwege verwendet. Als Negativkontrolle wurde ein Plasmid ohne Zielsequenz verwendet, so dass das Plasmid zwar induziert, aber keine RNAi gebildet wurde.

Als RNAi-Bibliothek für die verwendeten Proteine wurde die *C. elegans* RNAi-Bibliothek aus dem Ahringer Labor und die ORF-RNAi Library v1.1 verwendet (Kamath et al., 2003; Rual et al., 2004).

4.4.7 Isolierung von genomischer DNA aus *C. elegans*

Die Isolierung von genomischer DNA aus *C. elegans* erfolgte nach dem folgenden Protokoll. Für diesen Versuch wurden reguläre NGM-Platten mit 1 %-iger Agarose beschichtet, um eine Kontamination mit DNA-verdauenden Substanzen zu verhindern. Die Würmer wurden von den Kulturplatten mit eiskaltem M9-Puffer abgewaschen, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und anschließend bei 12.000 g für 1 Minute zentrifugiert. Dieser Schritt wurde mehrere Male wiederholt, bis die Lösung über den Würmern klar war, also fast keine Bakterien mehr enthielt. Dann wurden die Würmer in 1 ml Wurmlysepuffer aufgenommen, für 1 Stunde bei 65°C inkubiert und anschließend die Proteinase K durch 25 Minuten bei 95°C inaktiviert. Es folgte eine Phenol/Chloroform-Extraktion (pH auf 8 mit Tris gepuffert) und vorsichtiges Mischen. Nach 5 Minuten Zentrifugation bei 12.000 g und Raumtemperatur wurde die DNA-enhaltende wässrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Zur Fällung der DNA wurden dann 0,1 Volumen 3 M Natriumacetat-Lösung (pH 5,2) und 0,7 Volumen Isopropanol hinzugegeben und für 5 Minuten inkubiert. Dann wurde die Lösung bei 13.200 g für 15 Minuten zentrifugiert, mit Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert. Nach dem Trocknen des Pellets wurde dieses dann in ddH₂O aufgenommen und dieser Lösung RNaseA in einer finalen Konzentration von 100 µg/µl zugesetzt, bei 37°C inkubiert und dann eine weitere Phenol-Extraktion durchgeführt.

4.4.8 Einzelwurm-PCR zur Genotypisierung

Einzelne Würmer wurden zur Genotypisierung in 10 µl *Single Worm Lysis Buffer* (*SWLB*) aufgenommen, für 1 Stunde bei 65°C verdaut und anschließend die Proteinase im *SWLB* für 15 Minuten bei 95°C inaktiviert. Für die anschließende PCR gemäß dem Protokoll in 4.2.3 wurde 2 µl PCR-Templat eingesetzt. Anders also dort beschrieben wurde die PCR in 25 µl durchgeführt und das eingesetzte Volumen vom Wasser angezogen.

4.4.9 Herstellung von Wurmlysaten

Zur Herstellung der Wurmlysate wurden die Würmer in M9 Puffer gesammelt und dann für 1 Minute bei 3.000 g zentrifugiert.

Das Pellet wurde dann wie beschrieben (Gidalevitz et al., 2009) in Nativgel-Lysepuffer aufgenommen und dreimal für 10 Sekunden und 60 % Leistung mit einer Ultraschallsonode sonifiziert. Die Lösung wurde dann für eine Minute bei 30 g zentrifugiert und die abgenommenen Überstände entweder mit dem PAGE-Probenpuffer (für nicht-reduzierende Gele) oder dem SDS-PAGE-Probenpuffer vermischt.

4.4.10 DiI-Färbung von Amphid- und Phasmidneuronen

Neurone, die Kontakt nach außen haben und somit eine Rolle bei der Chemotaxis spielen, lassen sich in *C. elegans* mit dem DiI-Farbstoff färben. Dazu wurden die Würmer von Platten gewaschen und für 30 Minuten in der DiI-Lösung belassen (Stammlösung 1:200 mit M9-Puffer verdünnt). Dann erfolgte ein mehrmaliges Waschen mit M9-Puffer und Zentrifugieren. Anschließend wurden die Würmer auf frische Agarplatten gegeben und dann so lange gewartet, bis unspezifische Färbungen nicht mehr zu sehen waren. Dies wurde unter einem Fluoreszenzmikroskop in regelmäßigen Abständen kontrolliert.

4.4.11 Rhodamin-Phalloidin-Färbung in *C. elegans*

Um Würmer mit Farbstoffen für bestimmte Zellbestandteile wie Aktinfasern oder Zellkompartimente (Endoplasmatisches Retikulum) zu färben, wurden die Würmer zunächst fixiert. Dazu wurde eine entsprechende Menge Würmer wie gewohnt kultiviert und dann von den Platten mit M9-Puffer abgewaschen. Nach der erfolgten Zentrifugation wurden die Würmer in eiskalter 4 %-iger Formaldehydlösung aufgenommen und dann für 30 Minuten auf Raumtemperatur gestellt. Dadurch wurde das Gewebe fixiert und die Muskelstränge kontrahiert. Es erfolgte dreimaliges Waschen mit PBS-T und Zentrifugieren bei 1.000 g für 1 Minute. Dann wurden die Würmer über Nacht bei 37°C in der β -Mercaptoethanol-Lösung unter Schütteln auf einem Thermomixer (Eppendorf) bei 300 rpm inkubiert, um Disulfidbrücken in der Kutikula der Würmer zu reduzieren. Am folgenden Tag wurde dann erneut mit PBS-T gewaschen. Die Würmer wurden dann in 1000 μ l AbA-Lösung aufgenommen und 1 μ l Rhodamine-Phalloidine-Lösung sowie 1 μ l DAPI-Lösung hinzugegeben. Nach 1 Stunde auf dem Thermomixer wurden sie für dreimal 20 Minuten in AbA-Lösung gewaschen und dann wie unter 4.5.2 dokumentiert verfahren. Dazu wurde die Lösung mit den gefärbten Würmern direkt auf Objektträgern mit Fluoromount G (Southern Biotech) vermischt.

4.4.12 Antikörperfärbungen in *C. elegans*

Zur Antikörperfärbung von *C. elegans* wurden die Würmer wie unter 4.4.10 beschrieben fixiert, über Nacht mit β -Mercaptoethanol-Lösung behandelt und dann gewaschen. Um die Würmer für die Antikörper permeabel zu machen, wurden diese mit Collagenase-Lösung behandelt. Dazu wurden die Würmer für 5 Minuten bei 37°C und kräftigem Schütteln im Thermomixer (1400 rpm) inkubiert. Diese Reaktion wurde durch Kühlung auf Eis gestoppt und die Würmer dann dreimal mit PBS-T und einmal mit AbA-Lösung gewaschen. Über Nacht wurde dann der erste Antikörper in AbA-Lösung in der entsprechenden Konzentration eingesetzt. Am folgenden Tag wurde dreimal mit AbA-Lösung für jeweils 20 Minuten gewaschen und dann für 2 Stunden der sekundäre Antikörper sowie DAPI-Lösung hinzugegeben und in Dunkelheit inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit AbA-Lösung wurden die Würmer dann auf einen Objektträger gegeben, mit Fluoromount G eingebettet und die Beobachtungen, wie unter 4.5.2 angegeben, dokumentiert.

4.4.13 Kryokonservierung von *C. elegans*

C. elegans bietet neben vielen weiteren Vorteilen, die in der Einleitung genannt wurden, die Möglichkeit der Kryokonservierung. Dazu wurden jeweils 20 Würmer auf 3 10 cm Platten gegeben und für 7 Tage bei 20°C kultiviert. Dann wurden 5 ml M9-Puffer auf die Platten gegeben und für 1 Minute bei 3.000 g zentrifugiert. Dieser Schritt erfolgte so lange, bis der Überstand über dem gebildeten Wurmpellet klar, also frei von Bakterien war. Zum Schluss wurden 3 ml M9-Puffer mit 3 ml *Freezing*-Lösung gemischt und die Würmer in dieser Lösung aufgenommen. Dann wurde die Lösung gleichmäßig auf 6 Kryoröhrchen aufgeteilt und die Röhrchen in einen Behälter aus Styropor auf -80°C gestellt. Der Styroporbehälter bewirkte dabei ein langsames Abkühlen auf die Temperatur.

4.4.14 Verhaltenstests

4.4.14.1 *Bodybend*-Assay

Um die Beweglichkeit von einzelnen Würmern zu überprüfen, wurde der sogenannte *Bodybend*-Assay durchgeführt. Dazu wurde ein einzelner Wurm in 20°C warmen M9-Puffer aufgenommen und dieser auf einen Objektträger gegeben.

Nachdem sich der Wurm für 1 Minute akklimatisiert hatte, wurden die Windungen gezählt, die der Wurm in der Flüssigkeit machte. Alle verwendeten Würmer hatten für diesen Versuch das L4-Stadium, da erst in diesem die Muskulatur vollständig ausgebildet war.

4.4.14.2 Chemotaxis-Assay

Zur Durchführung diese Assays wurden die Würmer zunächst gründlich gewaschen. Dies erfolgte durch mehrmaliges Aufnehmen in M9-Puffer und Zentrifugieren (1.000 g, 1 Minute), so dass keine störenden Bakterien mehr in der Lösung waren, die den Assay beeinflussen. Zeitgleich wurden die über Nacht getrockneten Chemotaxis-Platten vorbereitet. Dazu wurde an zwei gegenüberliegenden Punkten jeweils 1 µl Natriumazidlösung pipettiert. Nachdem diese eingetrocknet war, wurde auf den einen Punkt 1 µl Lösungsmittel für den Lockstoff (Ethanol) und auf den anderen Punkt 1 µl des Lockstoffes, in Lösungsmittel (Isoamylalkohol 1:10 in Ethanol verdünnt) gegeben. Nachdem der Lockstoff ebenfalls eingezogen war, wurden die Würmer auf die Platte gegeben. Nach 1 Stunde wurden die durch Natriumazid betäubten Würmer ausgezählt und der chemotaktische Index nach folgender Formel berechnet:

$$\frac{\text{Anzahl der Tiere am Lockstoff} - \text{Anzahl der Tiere am Lösungsmittel}}{\text{Anzahl der gesamten Würmer}} \text{index}$$

4.4.15 Test von Substanzen auf Agarplatten

Um die Effektivität von Substanzen auf Würmer zu untersuchen, wurden diese direkt in der benötigten Konzentration in den noch flüssigen Plattenagar gegeben. Weitere Angaben finden sich bei dem entsprechenden Versuch.

4.5 Mikroskopie

4.5.1 Herstellung von Lebendpräparaten

Die Herstellung der Lebendpräparate erfolgte nach Standardmethoden (Sulston, 1988). Dazu wurden die zu dokumentierenden Würmer auf 2 % Agarose-Objektträger gegeben, auf den zur Betäubung eine Natriumazid-Lösung (10 mM) aufgetragen wurde. Dann wurde ein Deckglas auf die Probe gelegt und diese am Mikroskop dokumentiert.

4.5.2 Konventionelle Fluoreszenz- und Nomarski-Mikroskopie

Für die konventionelle Fluoreszenz- und Nomarski-Mikroskopie wurde ein inverses Mikroskop des Typs Axiovert 200M (Zeiss) benutzt.

Das Mikroskop war mit den Objektiven Plan Apochromat 20x/0,8 NA, Plan Neofluar 40x/0,75 NA und Plan Apochromat 63x/1,25 NA (Ölimmersion) bestückt. Das Immersionsöl "Immersol" 518 F wurde von Zeiss bezogen. Als Lichtquelle wurde eine Quecksilberdampflampe vom Typ HBO103 eingesetzt. Zur Dokumentation diente die CCD-Kamera AxioCam MRm. Die Steuerung des Mikroskops erfolgte mit der Software Axiovision (Zeiss).

4.5.3 Konfokale Mikroskopie

Die konfokale Mikroskopie wurde an einem Spinning Disk-Mikroskop durchgeführt. Hierbei handelt es sich um ein konfokales Mikroskop, bei dem der Lichtweg durch eine schnell drehende Scheibe unterbrochen wird. So kann über längere Zeit ein Bild gemacht werden, ohne dass die Probe ausbleicht. Das System war das Ultraview Vox der Firma Perkin Elmer mit Festkörperlasern einer Wellenlänge von 405, 440, 488, 514, 561 und 640 nm, welches auf ein Nikon-Ti Mikroskopstativ montiert war. Für die Experimente wurde ein CFG Plan Apochromat 60x/1,4-Objektiv verwendet. Das Immersionsöl "Immersol" 518 F wurde von Zeiss bezogen. Als Lichtquelle wurde die Quecksilberdampflampe HBO103 eingesetzt. Als Kamera wurde die EM-CCD-Kamera C9100-50 (Hamamatsu) verwendet. Die Bedienung des Mikroskops erfolgte über die Software Volocity 5 (Perkin Elmer).

4.5.4 FRAP-Analyse

Die FRAP-Analyse wurde ebenfalls am Spinning Disc-Mikroskop durchgeführt. Die Würmer wurden dazu wie unter 4.5.1 präpariert und unter das Mikroskop gelegt. Die Probe wurde dann auf eine bestimmte Region fokussiert und das Mikroskop so eingestellt, dass im Sichtfenster nur ein Teil des Fluoreszenzsignals gebleicht wurde. Dazu wurde mit dem Formenwerkzeug der Volocity-Software dieser Bereich markiert und zunächst für 5 Sekunden der Grundwert der Fluoreszenzintensität (dieser Wert wurde mit 100 % bzw. 1 gleichgesetzt) gemessen (pre bleach). Dann erfolgte das Bleichen mit dem 488 nm und dem 514 nm Laser bei voller Laserleistung (bleach) und im Anschluss - im Abstand von jeweils 10 Sekunden - die 5 minütige Dokumentation des Fluoreszenzsignals (post bleach). Die Rohdaten der Fluoreszenzintensität wurden dann in Microsoft Excel übertragen, analysiert und graphisch dargestellt.

4.6 Statistik

Die Auswertung der Werte erfolgte mittels Excel 2008. Zur Auswertung der statistischen Signifikanz wurde der T-Test mit einem Signifikanzwert von $p \leq 0,001$ verwendet. Der jeweils angegebene Fehler des Mittelwertes wurde mit der folgenden Formel berechnet:

$(\sum(x_i - m)^2)^{1/2} / n$, wobei x_i der Wert der einzelnen Probe ist, m der Mittelwert und n die Anzahl der Proben.

5 Ergebnisse

Der Ergebnissteil gliedert sich in zwei Abschnitte. Im ersten Abschnitt wird der Weg zum generierten *C. elegans*-Modell beschrieben und die erhaltenen Würmer werden näher charakterisiert. Im zweiten Teil werden potentielle Abbauwege für Srp-2-Aggregate mit Hilfe von RNAi und Deletionsmutanten untersucht und der Effekt von Tunicamycin und DTT - zwei Induktoren der UPR - untersucht.

5.1 Generierung und Charakterisierung eines *C. elegans*-Modells für *FENIB*

5.1.1 *In silico*-Analyse von Neuroserpin-Homologen in *C. elegans*

Die Suche nach sequenzzhomologen Proteinen in *C. elegans* ergab in der Analyse die größte Übereinstimmung von Neuroserpin mit Srp-2. Obwohl die Sequenzen nur eine Homologie von 34 % aufweisen, sind die spezifischen Domänen erhalten. Dies zeigt die Abbildung 5.1, in der die Aminosäuresequenzen der Proteine untereinander aufgetragen (engl. aligned) wurden. Die rot markierten Stellen zeigen die Aminosäuren, die *FENIB* verursachen. Die grün markierten Positionen zeigen die hydrophobe Tasche, die in der Einleitung unter 2.1 beschrieben und der Abbildung 2.2 gezeigt wurde. Die rot markierten Stellen in der Abbildung 5.1 sind identisch (durch Sterne markiert). Die Aminosäuren, die die hydrophobe Tasche bilden, weisen identische Aminosäuren bzw. Aminosäuren mit gleichen chemischen Eigenschaften (durch Sterne oder Doppelpunkte markiert) auf. Die homologen Aminosäuren in *C. elegans* liegen an Position 29, 32, 302 & 356. Die Aminosäuren an diesen Positionen sind identisch mit den humanen an den Positionen 49, 52, 338 & 392. Für den weiteren Verlauf der Arbeit wurde zur Generierung des *C. elegans*-Modells die Aminosäure 302 gewählt, da diese beim Menschen eine schnelle Aggregation verursacht und im Gen von *srp-2* noch weit genug vom C-Terminus entfernt liegt.

```

mNS      MTYLELLALLALQSVVTGATFPDETITTEWSVNMYNHLRGTGEDENILF S PLSIALAMGMM 60
hNS      MAFLGLFSLLVLQSMATGATFPPEEAIADLSVNMYNRLRATGEDENILF S PLSIALAMGMM 60
srp-2    -----MSDNATSQTD FAL KLLATLPHSG-----S V V L S P L S I S L G L A L I 39
          :   : : : : : :   *   : *   . . . . . * * * * * * * . . . . .

mNS      ELGAQGSTRKEIRHSMGYEGLKGGEEFSFLRDFS NMASAEENQYVMKLANSLFVQNGFHV 120
hNS      ELGAQGSTQKEIRHSMGYDSLKNGEEFSFLKEFS NMVTAKESQYVMKIANS LFVQNGFHV 120
srp-2    HAGACGSTQKELEDVLG-----GSRIFEEFSGLMEAVGDTDNGVETKIVNRFVFNQAYTI 94
          . ** *** : * : * : * : * . . . * . : : : . : . * : * * : * : : :

mNS      NEEFLQMLKMYFNAEVNHVDFSQNVAVANSINKWVENYTN SLLKDLVSPEDFDGVTNLAL 180
hNS      NEEFLQMMKKYFNAAVNHVDFSQNVAVANYINKWVENNTN LVKDLVSPRDFDAATYLAL 180
srp-2    HQDYLETVEKLYKASGESLDFSQTEQA AKT MNTFVENHTNGKIKDLIP--ADSANNAFAFL 153
          : : : : : : : : : * : : : * : : * : * : * * . : * : : * : * :

mNS      INAVYFKGNWKSQFRPENTRTFSFTKDDSEVQIPMMYQQGEFY YGEFSDGSNEAGGIYQ 240
hNS      INAVYFKGNWKSQFRPENTRTFSFTKDDSEVQIPMMYQQGEFY YGEFSDGSNEAGGIYQ 240
srp-2    VNAMYFKADWQSKFAKESTTGREFFTSEAESRQIPFLTELDEHR-----DYTEDVLFVQ 206
          : * : * : * : * * : * * . * . . . . * : : : : : * : . . : * : *

mNS      VLEIPYEGDEISMMLALS RQEVPLATLEPLLK AQLIEEWANSVKKQKVEVYLP RFTVEQE 300
hNS      VLEIPYEGDEISMMLVLS RQEVPLATLEPLVKAQLVEEWANSVKKQKVEVYLP RFTVEQE 300
srp-2    VLSLKYADPKFTLAI FLPKQRFGLVALEKINGEYIQNLLN DLKSSVVSQIPKFKIEKE 266
          * : . : * . : : : : : * : * : . * . : : : : : * : * : . * : * : * : *

mNS      IDLKDILKALGVTEIFIKDANLTAMSDKKELFLSKAVHKS CIEVNEEGSEAAAA SGMIAI 360
hNS      IDLKDVLKALGITEIFIKDANLTGLSDNKEIFLSKAIHKS FLEVNEEGSEAAAA SGMIAI 360
srp-2    IDLKETLEAIGIKEIFAE GADLSGIADK--VFIS SGIHKAII EVDDEGTTAAAA S A FKVQ 324
          : * : * : * : * : * : : * : * : : : : : : * : * : * : * : * : * : * .

mNS      SRMAVLYP--QVIVDHPFLYLIRNRKSGIIL MGRVMNPETMNTSGHDFEEL 410
hNS      SRMAVLYP--QVIVDHPFFFLIRNRRTGTILEMGRVMHPE TMNTSGHDFEEL 410
srp-2    LEMMIMAEPTQFVADHPFLFAVLFEN--HTLELG VHA----- 359
          . * : : * . . : * : * : : : : : . . * : * *

```

Abbildung 5.1: Proteinalignment von murinem (mNS) und humanem (hNS) Neuroserpin mit Srp-2.

Aminosäuresequenz der drei Proteine im Vergleich zueinander. Rot markierte Stellen verursachen *FENIB*, grün markierte Stellen entsprechen der hydrophoben Tasche in Abbildung 2.2. Sterne zeigen identische Aminosäuren, Punkte stehen für ähnliche Eigenschaften.

5.1.2 Herstellung der Plasmide

Die Herstellung der Plasmide erfolgte wie unter 4.2.14 angegeben. Dabei wurden die PCR-Bedingungen jeweils so gewählt, dass der Syntheseschritt jeweils 45 Sekunden pro 1000 Basenpaare betrug. Die Abbildung 5.2 zeigt exemplarisch dokumentierte Agarosegele der PCRs. Die amplifizierte Banden stimmten mit den Fragmentgrößen der Promotoren und des *srp-2*-Gens überein. So zeigte der muskelspezifische Promotor eine Laufhöhe von 200 – 300 bp (Abbildung 5.2 A), was dem theoretischen Wert von 254 bp entsprach. Der endogene Promotor von Srp-2 lief auf einer Höhe von circa 5000 bp (Abb. 5.2 B), während der endogene Promotor zusammen mit dem genomischen Fragment eine theoretische Höhe von 7309 bp erreichte und dementsprechend in 5.2 B höher läuft. Die 3'-UTR von Srp-2 zeigte eine Laufhöhe von 600 – 700 bp und entsprach damit dem erwarteten PCR-Fragment von 680 bp. Die Fragmente wurden nach der DNA-Gelelektrophorese (4.2.4) aufgereinigt, verdaut, die Konzentration bestimmt und dann mit dem Vektor pLN022yfp ligiert (4.2.3, 4.2.5 – 4.2.7).

Anschließend wurden die erhaltenen Plasmide in Bakterienkulturen vervielfältigt und nach erfolgter Sequenzierung (und Mutagenese) für die ballistische Transformation (4.4.5) eingesetzt.

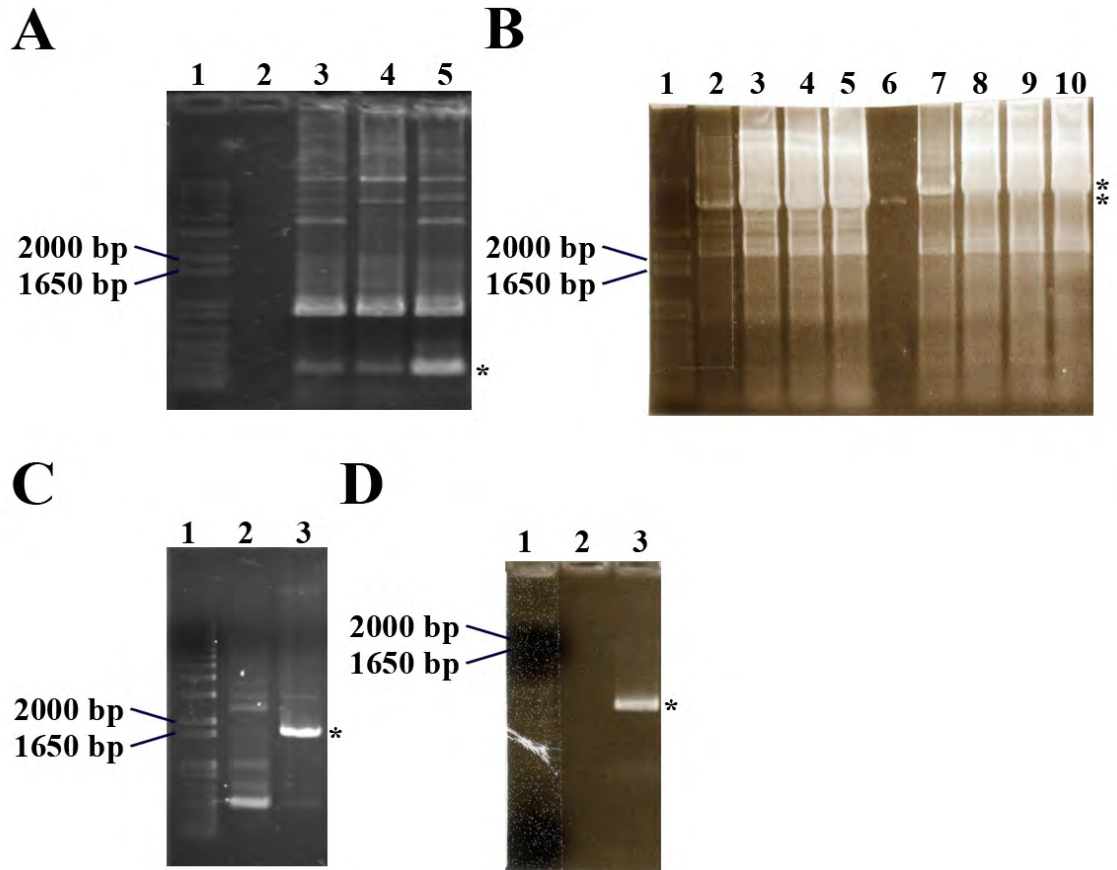


Abbildung 5.2: PCR der einzelnen Fragmente.

(A) PCR des Unc-54-Promotors (254 bp) (B) Spur 2 – 5 Srp-2-Promotor (5532 bp) Spur 6 – 10 Srp-2-Promotor und Gen (7309 bp) (C) Spur 3 Srp-2 Gen (1777 bp) (D) Spur 3 *srp-2* 3'-UTR. Stern gibt die korrekte Bande an. Spur 1 jeweils 1 kb plus Marker.

5.1.3 Generierung eines *C. elegans*-Modells für *FENIB*

Die ballistische Transformation von *unc-119*-Deletionsmutanten ergab mehrere unabhängige Linien für die Plasmide pSL1 bis pSL4. In der Abbildung 5.3 ist zunächst das Expressionsmuster für Srp-2 unter dem muskelspezifischen Promotor *unc-54* gezeigt.

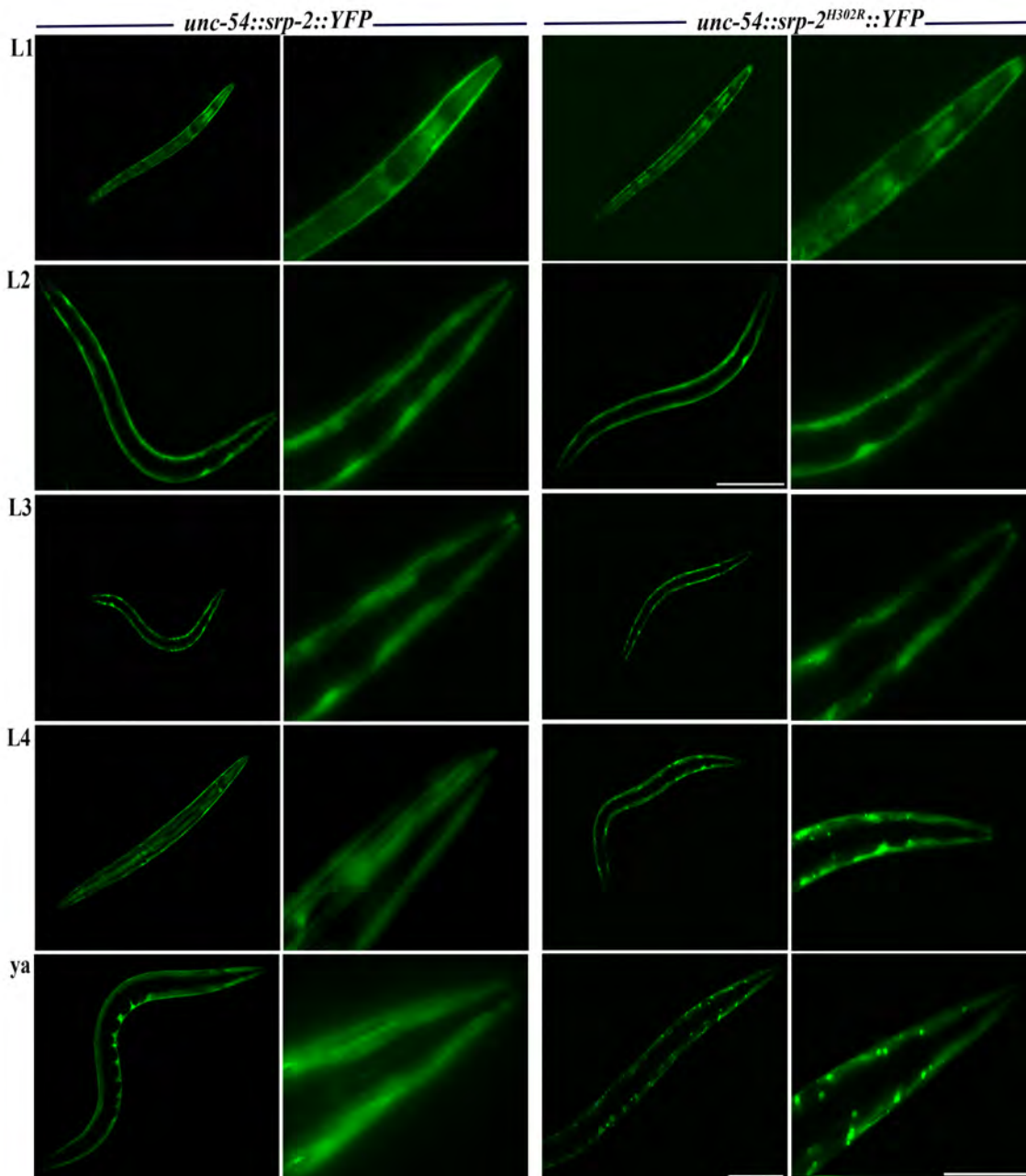


Abbildung 5.3: Expressionsmuster von *unc-54::srp-2::YFP* & *unc-54::srp-2^{H302R}::YFP*.

Die Bilder zeigen die Expression in den einzelnen links aufgeführten Stadien der Würmer. Das rechte Bild zeigt jeweils eine Vergrößerung des Kopfbereichs. Die progressive Aggregation in der Mutante (*unc-54::srp-2^{H302R}::YFP*) im Vergleich zum Wildtyp (*unc-54::srp-2::YFP*) wird ab dem L2-Stadium erkennbar. Maßstab bis L2 100 μm , ab L3 200 μm , in den Vergrößerungen 50 μm .

Wie zu erkennen ist, zeigten die Würmer eine Expression von Srp-2::YFP entlang der Körpermuskulatur. So sind im Wildtyp die Muskelfasern als deutliche Stränge zu erkennen. Das mutierte Srp-2-Protein, in dem eine Aminosäure ausgetauscht wurde, zeigte bereits im L2-Stadium erste punktierte Aggregate die mit zunehmender Entwicklung stärker wurden. In der Vergrößerung kann man sehen, dass ab dem L3-Stadium der Würmer die Aggregatmenge anstieg.

Ab dem L4-Stadium waren die Aggregate in der Vergrößerung zwar kaum als solche wahrzunehmen, dies liegt daran, dass die Aggregation im Kopfbereich erst begann, als im restlichen Körper deutliche Aggregation vorhanden war. Für die Expression unter dem endogenen Promotor wurden ebenfalls mehrere unabhängige Linien erhalten. In der Abbildung 5.4 wird das Expressionsmuster im Verlauf der Wurmentwicklung gezeigt.

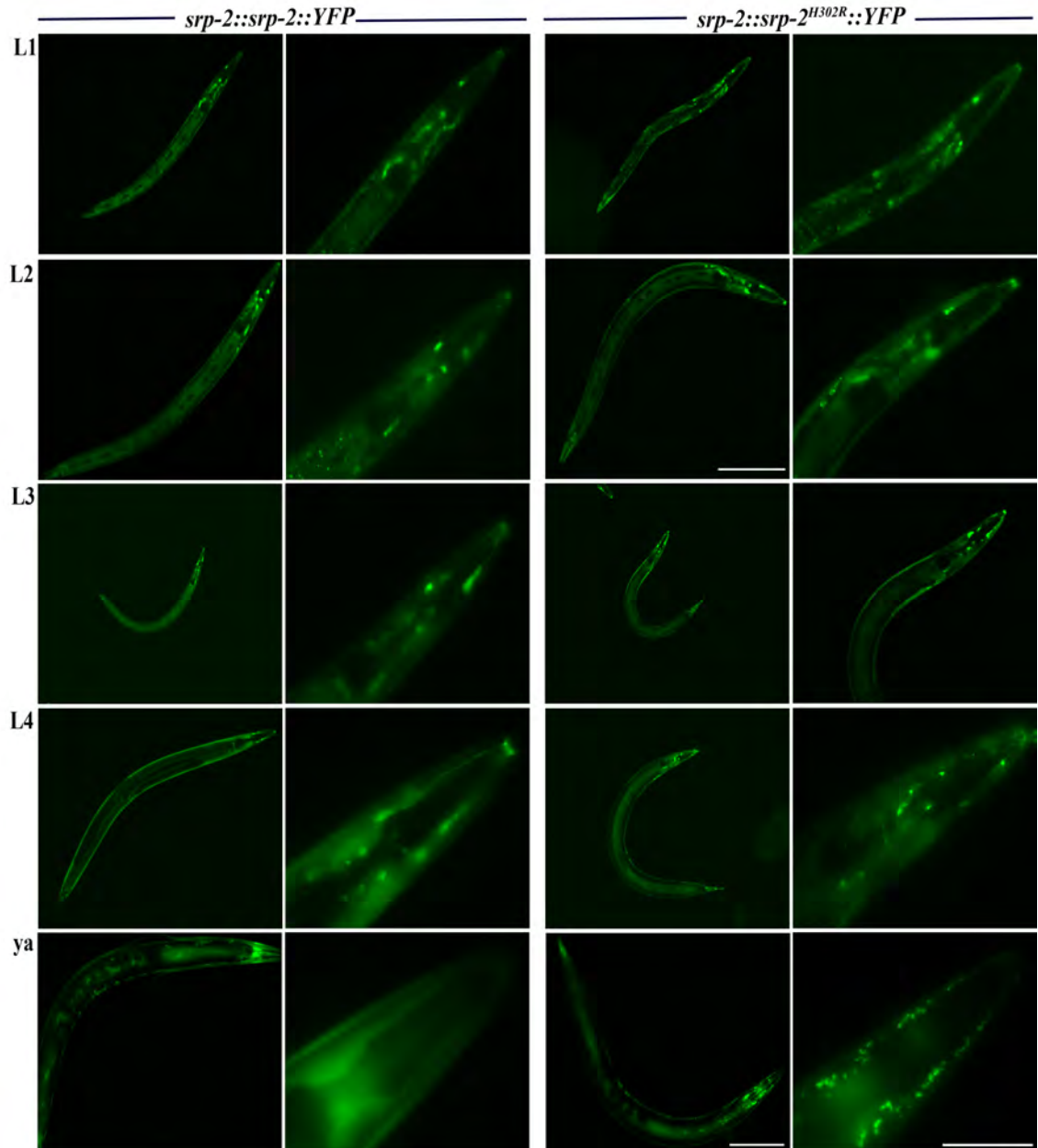


Abbildung 5.4: Expressionsmuster von *srp-2::srp-2::YFP* & *srp-2::srp-2^{H302R}::YFP*.

Die Bilder zeigen die Expression in den einzelnen links aufgeführten Stadien der Würmer. Das rechte Bild zeigt jeweils eine Vergrößerung des Kopfbereichs. Die progressive Aggregation in der Mutante (*srp-2::srp-2^{H302R}::YFP*) im Vergleich zum Wildtyp (*srp-2::srp-2::YFP*) wird ab dem L3-Stadium erkennbar. Maßstab bis L2 100 μm , ab L3 200 μm , in den Vergrößerungen 100 μm .

Die Expression des Proteins zeigte sich im L1- und L2-Stadium sowohl im Wildtyp wie auch in der Mutante hauptsächlich im Darm, aber auch in der Hypodermis und - wie später unter 5.1.6 gezeigt - in den Phasmid-Neuronen und entsprach dem publizierten Expressionsmuster (Pak et al., 2004). Dabei waren in diesen Stadien keine Unterschiede zwischen Wildtyp und Mutante zu erkennen. Im Laufe der Entwicklung zeigte die Mutante in der Kopfregion eine Aggregation des Proteins. Diese begann im L3-Stadium und schritt dann fort. Sobald die Würmer im jungen adulten Stadium (ya) waren, zeigten die mutierten Würmer im Kopfbereich nur noch Aggregate und kein diffuses YFP-Signal mehr.

5.1.4 Proteinbiochemie der Aggregate

Als Nachweis der Aggregation wurden Wurmlysate von mehreren, voneinander unabhängigen, muskelspezifischen und endogenen Expressionslinien auf nicht-reduzierende Gele aufgetragen und gemäß Methodenteil detektiert (4.3.6). Als Kontrolle für die Gesamtproteinmenge wurde ein aliquoter Teil der Proteine mit reduzierendem Ladepuffer gemischt und auf ein SDS-Page-Gel aufgetragen. Die Bestimmung der Gesamtproteinmenge erfolgte mittels α -Tubulin. Um die Detektion und die Aggregation der Proteine zu testen, wurde als Negativkontrolle für die Detektion der Wildtyp-Stamm N2 verwendet. Für die Unterscheidung der YFP-Signale wurden die Q0::YFP-Linie, die keine Aggregate bildet, sowie die Q40::YFP-Linie, die bei Expression unter dem *unc-54*-Promotor Aggregation zeigt, verwendet (Morley et al., 2002). Die Abbildung 5.5 gibt diesen Versuch wieder. Das jeweils untere Gel in Abbildung 5.5 zeigt anhand der Bande für α -Tubulin, dass die aufgetragene Proteinmenge bei allen Proben gleich war. Im oberen Gelbild ergibt sich für die Q0::YFP-Linie eine Bande, die die Laufhöhe des YFP-Moleküls allein darstellt. Bei der Q40::YFP-Linie war die Bande ebenfalls vorhanden, aber auch mehrere Aggregationsbanden, die entsprechend höher liefen. Bei der Expression unter dem muskelspezifischen Promotor wie auch unter dem endogenen Promotor zeigten drei unabhängigen Linien für Srp-2::YFP (jeweils zwei integrierte und eine extrachromosomale pro Genotyp) im Wildtyp eine stärkere Bande, die dem Monomer entspricht. Die Mutante von Srp-2::YFP zeigte eine Proteinleiter die dem unterschiedlich stark polymerisierten Srp-2::YFP entsprach. Die Mutante ergab nur dieses Muster, jedoch keine Bande auf der Höhe des Wildtyp-Monomers.

Die beiden Blots zeigten, dass es sich bei den Ablagerungen, die in den Fluoreszenzaufnahmen zu sehen waren, um Polymere handelte, die in nicht-reduzierenden Gelen das charakteristische Muster einer Proteinleiter zeigen (Gidalevitz et al., 2009).

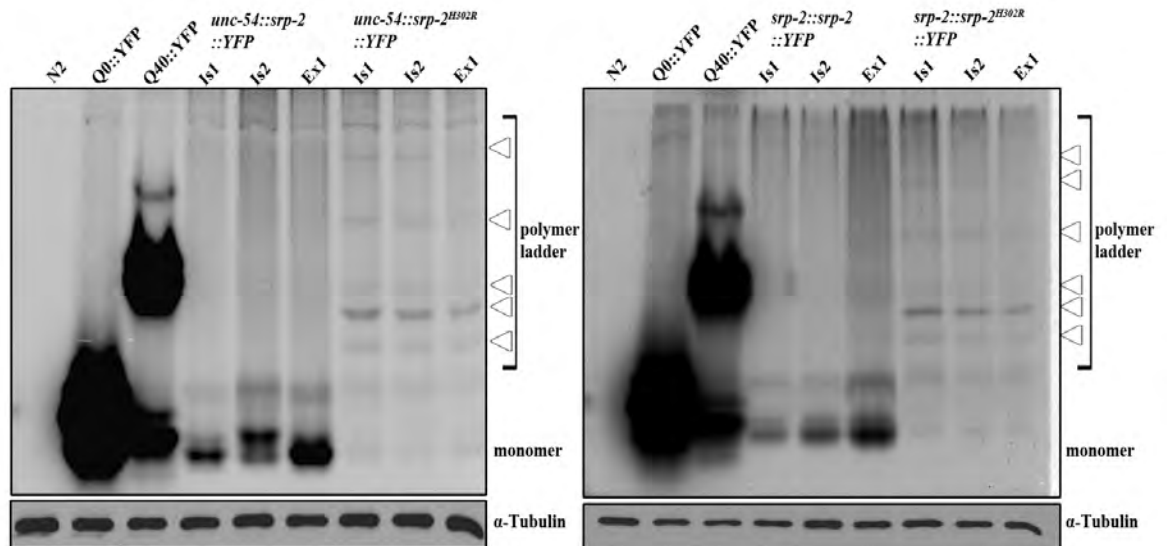


Abbildung 5.5: PAGE von Wurmlysaten der generierten Linien.

Nicht-reduzierendes Gel der Wurmlysate mit den entsprechenden Kontrollen. Wildtyp *Srp-2::YFP* zeigt unter beiden Promotoren (*unc-54* & *srp-2*) eine distinkte Bande, während mutantes *Srp-2::YFP* eine Proteinleiter zeigte, die durch Pfeilspitzen markiert sind und für Aggregation sprechen. N2, Q0::YFP & Q40::YFP dienen als Kontrollen. Das untere Gel zeigt α -Tubulin und diente als Kontrolle, ob gleiche Proteinmengen aufgetragen wurden.

5.1.5 Charakterisierung der muskelspezifischen Expression von *Srp-2::YFP*

Zur Überprüfung ob die Aggregate in einem bestimmten Kompartiment der Zellen lokalisierten, wurde mit jeweils einer der generierten *unc-54::srp-2::YFP* und der *unc-54::srp-2^{H302R}::YFP*-Linie FRAP-Analysen durchgeführt. Jeweils fünf Tiere wurden pro Kohorte verwendet. Die Abbildung 5.5 zeigt exemplarisch Ausschnitte von einem Wurm der jeweiligen Kohorte. Die Kreisregion wurde jeweils mit den entsprechenden Lasern bestrahlt. Die Abbildung 5.6 zeigt deutlich, dass die Fluoreszenz im Wildtyp an der gebleichten Stelle sofort wieder vorhanden war, während in der Mutante die gebleichte Stelle kaum eine Rückgewinnung der Fluoreszenz zeigte. Dies lässt darauf schließen, dass die Aggregate nicht frei im Cytosol beweglich waren, sondern in einem membranumschlossenen Kompartiment lokalisierten.

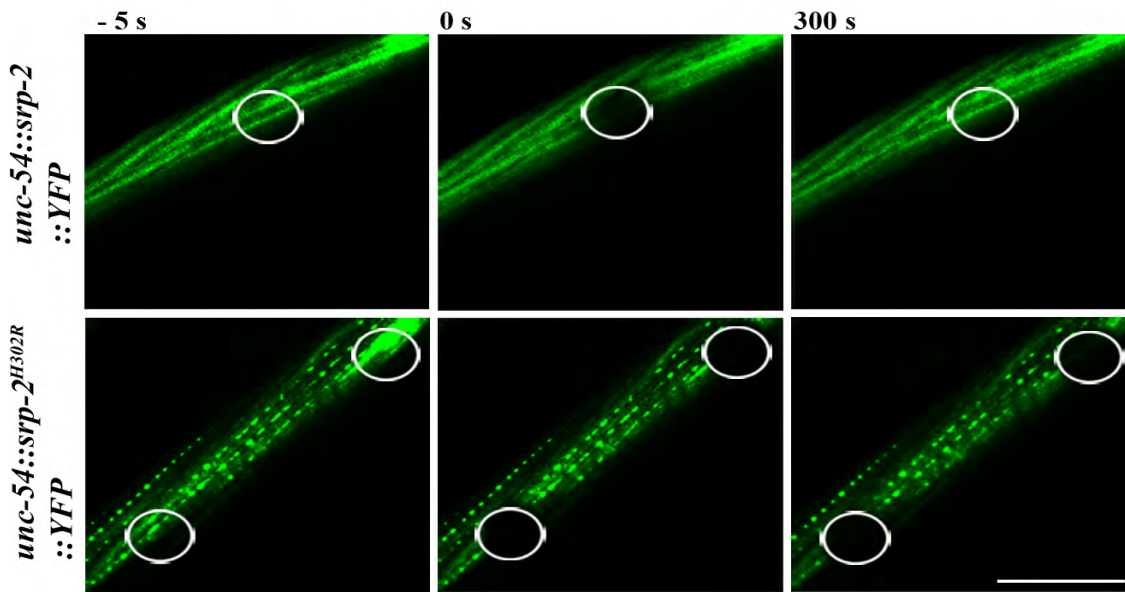


Abbildung 5.6: Bilder des FRAP-Experiments von *unc-54::srp-2::YFP* & *unc-54::srp-2^{H302R}::YFP*-Linien.

Repräsentative Ausschnitte der gebleichten Würmer vor (- 5 s), während (0 s) und 5 Minuten nach (300 s) dem Bleichen. Wildtyp-Würmer in der oberen Reihe zeigen eine Erneuerung des Fluoreszenzsignals. Mutante Würmer zeigen auch nach 5 Minuten keine Rückgewinnung des Fluoreszenzsignals. Der Maßstab entspricht 50 μ m.

Die Ergebnisse der FRAP-Experimente sind in Abbildung 5.7 zu sehen. Wie auch in den PAGE-Gelen dienten hier die Q0::YFP- und Q40::YFP-Linien als Kontrolle. In den Graphen ist die relative Intensität der Fluoreszenz in Prozent angegeben und gegen die Zeit aufgetragen. Die Intensität wurde vor dem Bleichen auf 100 % gesetzt, dann zum Zeitpunkt des Bleichens auf 0 %. Theoretisch kann der Wert bei freier Diffusion wieder auf 100 % steigen und ist damit unmittelbar ein Indiz für die Mobilität von Molekülen (Axelrod et al., 1976). Während Proteine, die sich im Cytosol der Zelle befinden, frei diffundieren, können Proteineaggregate in Zellkompartimenten dies nicht. Sobald die Gesamtmenge an Protein in diesem Kompartiment also gebleicht wurde, konnten durch die Kompartimentmembran keine Moleküle nachdiffundieren, d.h. die Moleküle wurden immobil. Diese wurde für die Q40::YFP-Linie gezeigt (Brignull et al., 2006; Morley et al., 2002). Wie aus der Abbildung 5.7 ersichtlich ist, zeigte *Srp-2::YFP* in der Wildtyp-Form ähnliche Eigenschaften wie die Q0::YFP-Linie und somit freie Diffusion in den Zellen, während die Mutante sich wie die Q40::YFP-Linie verhielt und immobil vorlag. So stieg das Signal beim Wildtyp wieder auf 60 %, während das Signal in der Mutante bei unter 10 % blieb. Daraus lässt sich schließen, dass das mutierte *Srp-2::YFP* in Zellkompartimenten lokalisierte.

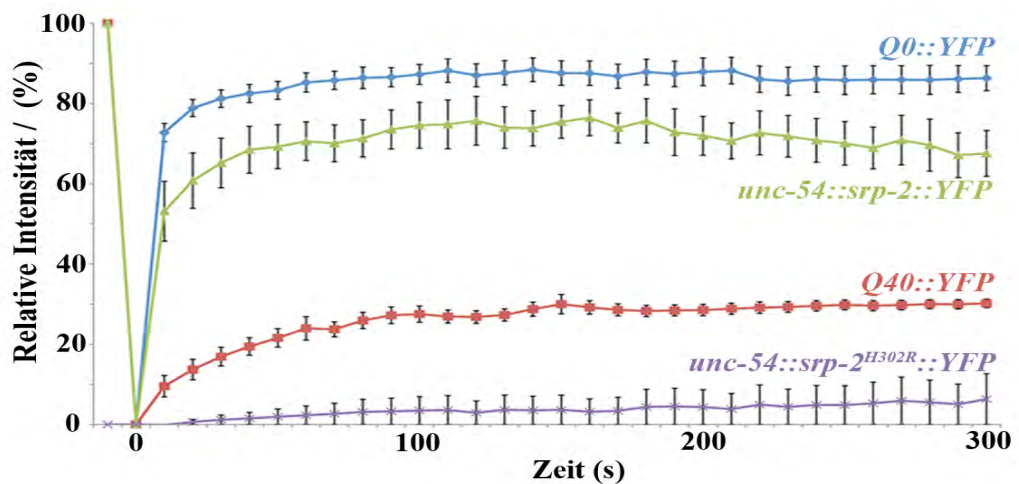


Abbildung 5.7: FRAP-Analyse von *unc-54::srp-2::YFP* & *unc-54::srp-2^{H302R}::YFP*-Linien. Die Abbildung zeigt den Wert der relativen Intensität im Verlauf der Zeit. Während das Fluoreszenzsignal bei der *unc-54::srp-2::YFP*-Linie bis auf 60 % zurückkehrt (grüne Kurve), bleibt das Signal bei der *unc-54::srp-2^{H302R}::YFP*-Linie (violett) bei unter 10 % des Ausgangssignals. Die beiden Linien entsprechen den jeweiligen Kontrollen für frei bewegliches Protein (Q0::YFP in blau) und für Aggregate (Q40::YFP in rot). Die Kurven stellen die Mittelwerte von fünf Würmern dar. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler des Mittelwertes.

Aus der Literatur ist bekannt, dass einige Proteinaggregationserkrankungen in *C. elegans* durch Einlagerung eine Veränderung der Muskelstruktur bewirken (Gidalevitz et al., 2009). Um die Muskelstruktur in den Aggregationsmodellen für FENIB zu untersuchen, wurden die *unc-54::srp-2::YFP* & *unc-54::srp-2^{H302R}::YFP*-Linien mit Rhodamin-Phalloidin, einem Farbstoff für Aktinfasern, gefärbt. Zur genaueren Orientierung diente der Farbstoff DAPI, der Komplexe mit doppelsträngiger DNA bildet und somit Zellkerne anfärbt. Die Abbildung 5.8 zeigt diese Färbung. Es ist zu erkennen, dass SRP-2::YFP- und Phalloidin-Signal im Wildtyp *unc-54::srp-2::YFP* kolokalisierten, während in der Mutante *unc-54::srp-2^{H302R}::YFP* die SRP-2::YFP-Signale an die Muskelfasern angrenzten. Dies wurde auch durch die Auftragung der beiden Signale in einem Streudiagramm verifiziert, in dem die Signale gegeneinander aufgetragen sind. Der errechnete Korrelationskoeffizient der beiden Signale kann einen maximalen Wert von 1 annehmen, dann besteht ein linearer Zusammenhang und es bildet sich eine Gerade. Beim Wildtyp beträgt der Wert 0,973. Das heißt die Signale kolokalisierten hier fast vollständig. In der Mutante hingegen lag der Wert bei 0,340 und somit bestand fast keine Kolokalisation. Die Muskelfasern sahen in beiden Kohorten normal aus und zeigen keine Fehlanordnung der Aktinfaserbündel.

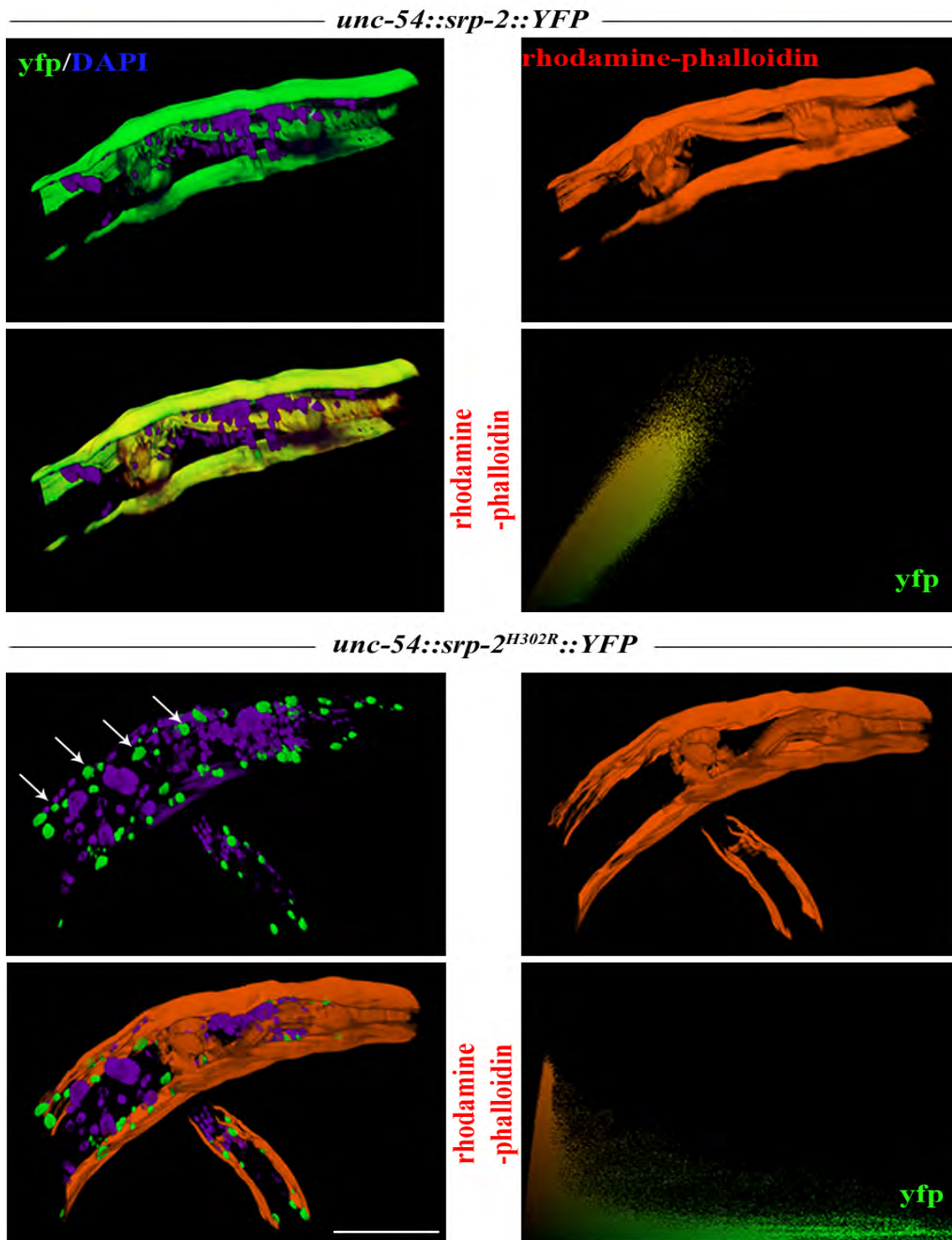


Abbildung 5.8: Rhodamin-Phalloidin-Färbung von *unc-54::srp-2::YFP* & *unc-54::srp-2^{H302R}::YFP*-Linien.

Die Abbildung zeigt die Lokalisation des grünen Srp-2::YFP-Signals in Wildtyp und Mutante sowie in blau die DAPI-Kernfärbung. In rot ist die Färbung von Aktin durch Rhodamine-Phalloidin zu sehen. Die Überlagerung der Signale zeigt eine Kolokalisation im Wildtyp, während das Signal in der Mutante nicht mit dem Aktinsignal kolokalisiert. Dies zeigt auch das jeweilige Streudiagramm, das im Wildtyp das Streudiagramm eine Linie ergibt während in der Mutante die Signale keinen linearen Zusammenhang aufweisen. Pfeile zeigen Aggregate. Der Maßstab entspricht 50 μm .

Zur genaueren Untersuchung wo sich das mutierte Protein befindet wurde eine Antikörperfärbung mit einem spezifischen Antikörper gegen das endoplasmatische Retikulum von *C. elegans* durchgeführt. Die Begründung hierfür war die Tatsache, dass das Signal des Srp-2::YFP-Proteins bei der obigen DAPI-Färbung dicht am Zellkern lokalisierte und dort das ER lokalisiert ist. Zusätzlich war bereits von anderen Serpinopathien bekannt, dass die Aggregate unter anderen im ER lokalisierten (Lin et al., 2001; Schmidt and Perlmutter, 2005). Der verwendete Antikörper CYP-33E1 wies eine starke Hintergrundfärbung auf, er ist jedoch der einzige ER-spezifische Antikörper in *C. elegans* (Hadwiger et al., 2010). In der Abbildung 5.9 ist das Fluoreszenzsignal für SRP-2::YFP und das ER zunächst ohne Falschfarben dargestellt, so dass man die Lokalisation besser erkennen kann. Die Überlagerung einschließlich DAPI zeigt die genauere Lokalisation des Srp-2::YFP-Signals um den Zellkern. In der Vergrößerung wird dies deutlich.

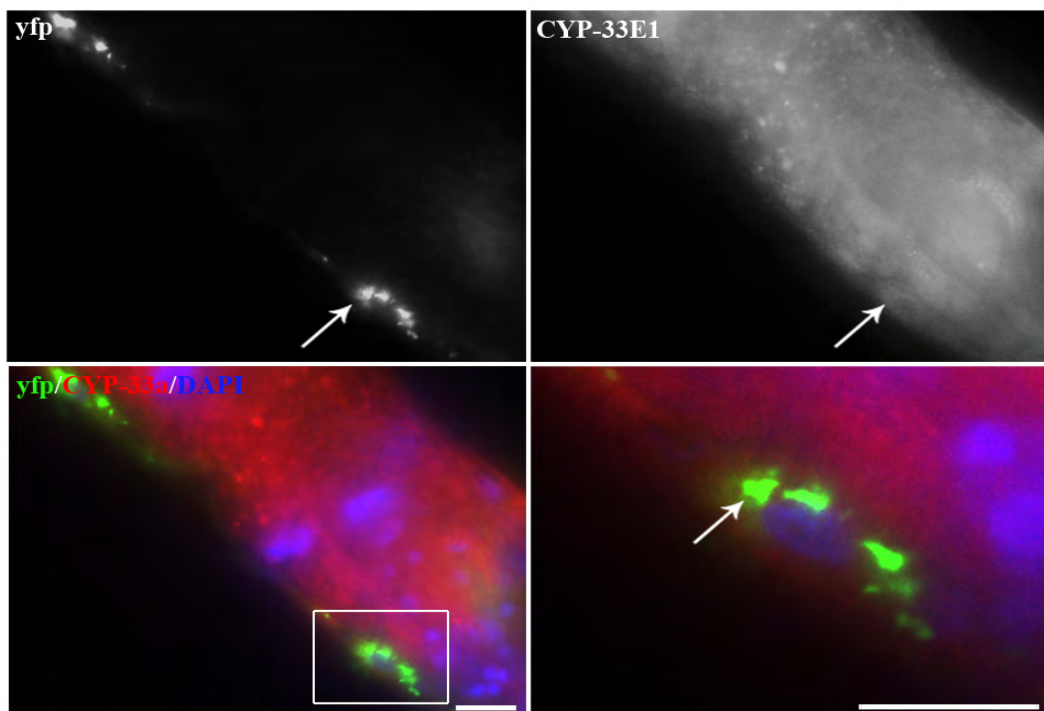


Abbildung 5.9: ER-Färbung der *unc-54::srp-2^{H302R}::YFP*-Linie.

Das Srp-2::YFP-Signal (yfp) und die ER-Färbung (CYP-33E1) sind zunächst einzeln dargestellt. In der Überlagerung und der Vergrößerung dieser ist die Lokalisation des Signals um den Kern (mittels DAPI gefärbt) zu erkennen. Der Pfeil zeigt ein Srp-2-Aggregat. Der Maßstab entspricht jeweils 10 μm .

Obwohl die Muskelstruktur in den Würmern keine Veränderung zeigte, wurde untersucht ob es einen Phänotyp gibt. Dazu wurde der sogenannte „Bodybend-Assay“ verwendet, bei dem die Anzahl der Körperwindungen pro Minute gezählt wurden.

Die Würmer zeigten auf Agarplatten keinen erkennbaren Phänotyp, das Bewegen in Flüssigkeit offenbarte Bewegungsdefizite, da hier kein Widerstand vorhanden ist und der Wurm sich aktiv bewegen mußte. Bewegungsdefizite wurden für Aggregationsmodelle der Trinukleotiderkrankungen und der amyotrophen Lateralsklerose Typ 1 gezeigt (Gidalevitz et al., 2009; Morley et al., 2002). Die Abbildung 5.10 zeigt die Anzahl der Körperwindungen der getesteten Wurmlinien pro Minute im Verhältnis zum Wildtyp-Stamm (N2). Alle Linien zeigten dabei im Vergleich mit der als Kontrolle dienenden N2-Linie ein signifikant schlechteres Ergebnis in der Bewegungsleistung. Die Linien für Trinukleotiderkrankungen (Q0::YFP & Q40::YFP) dienen auch in diesen Versuch als Kontrolle für die Bewegungsleistung. Neben den Signifikanzen der einzelnen Linien zur N2-Linie, zeigten auch die & *unc-54::srp-2^{H302R}::YFP* im Vergleich mit der *unc-54::srp-2::YFP*-Linie eine signifikante Verringerung der Bewegungsleistung. Sobald die *unc-54::srp-2^{H302R}::YFP*-Linie jedoch auf RNAi-Platten gegen YFP gehalten wurde, zeigte sich ein ähnlicher Wert in der Anzahl der Körperwindungen, wie bei den *unc-54::srp-2::YFP*-Linien. Die Kontrollkohorte mit leerem Vektor zeigte hingegen keine signifikante Verbesserung.

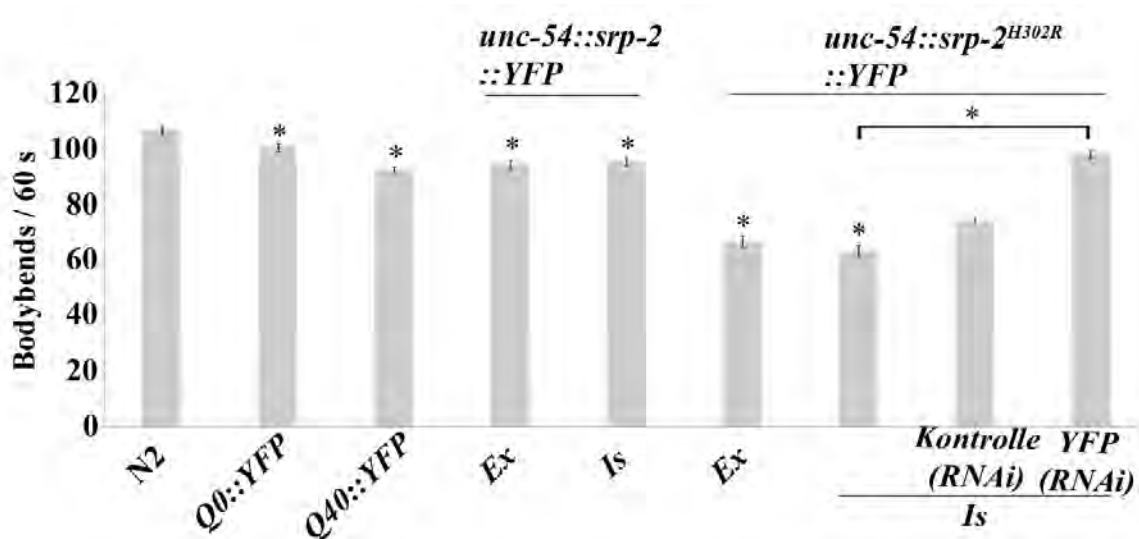


Abbildung 5.10: „Bodybend-Assay“.

Der „Bodybend-Assay“ zeigt die Mobilität in Flüssigkeit. Im Verhältnis zum Wildtyp N2 zeigten alle Linien ein signifikant schlechteres Ergebnis in der Leistung. Der Unterschied zwischen den Linien von *unc-54::srp-2::YFP* & *unc-54::srp-2^{H302R}::YFP* war ebenfalls signifikant. Durch Halten der *unc-54::srp-2^{H302R}::YFP*-Linie auf RNAi-Platten gegen YFP zeigte sich ein ähnlicher Wert in der Anzahl der Körperwindungen, wie bei den *unc-54::srp-2::YFP*-Linien, die Kontrollkohorte mit leerem Vektor zeigte keine signifikante Verbesserung. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler des Mittelwertes. n=30, * p≤ 0,001.

5.1.6 Charakterisierung der endogenen Expression von Srp-2::YFP

Neben den eingehend charakterisierten Linien mit muskelspezifischer Expression von Srp-2::YFP wurden die Linien mit dem endogenen Promotor untersucht. Gemäß Literatur zeigt der Wildtyp eine Expression in den sogenannten Phasmidneuronen (Pak et al., 2004), die für die Chemotaxis eine wichtige Rolle spielen (Hilliard et al., 2002). Das Expressionsschema ist in 5.1.3 gezeigt worden. Um die Amphid- und Phasmidneurone anzufärben, wurde der Farbstoff DiL wie unter 4.4.10 angegeben verwendet. Für die in Abbildung 5.11 gezeigte Färbung wurde die *srp-2::srp-2::YFP*-Linie verwendet. Der DiL-Farbstoff färbte die Amphid- und Phasmidneurone an. Das erzeugte Signal zeigte dabei Kolokalisation mit dem Signal von Srp-2::YFP, so dass davon ausgegangen werden kann, dass Srp-2::YFP in den entsprechenden Neuronen exprimiert wird.

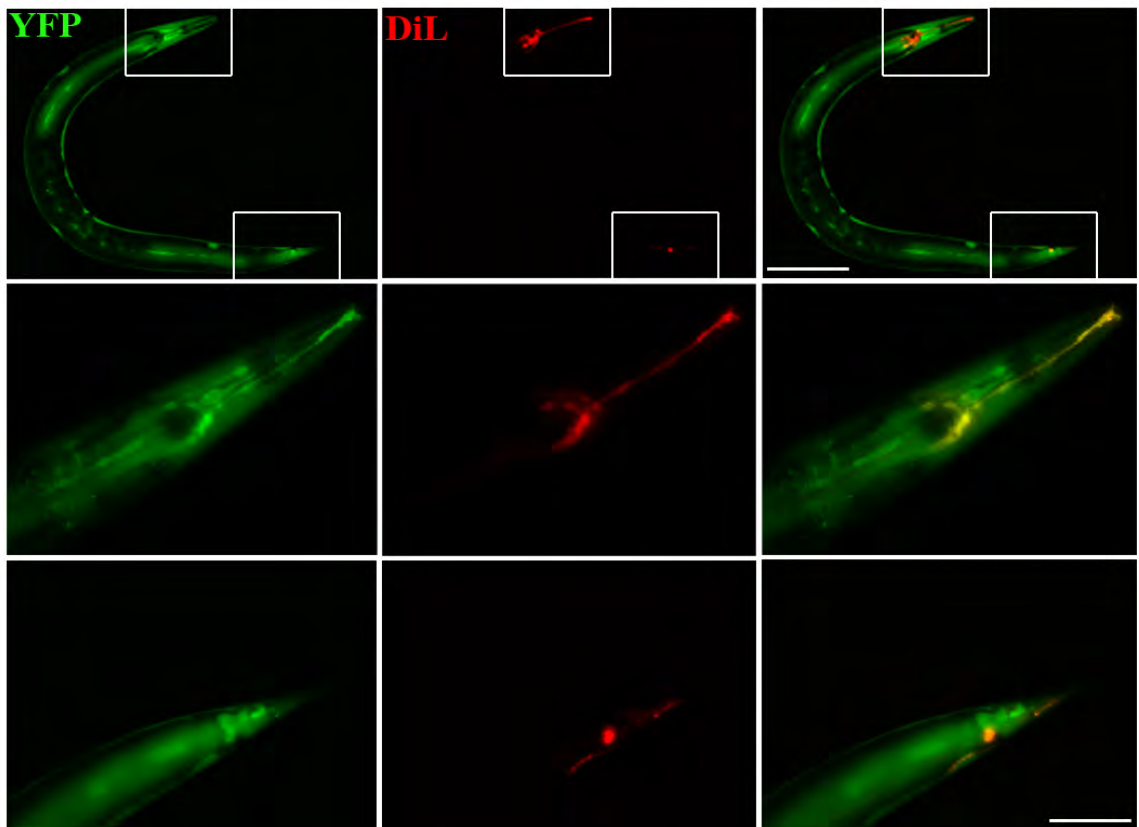


Abbildung 5.11: Amphid- und Phasmidneuronen-Färbung der *srp-2::srp-2::YFP*-Linie.

Die Amphidneurone im Kopf und die Phasmidneurone am Schwanz von *C. elegans* nahmen den DiL-Farbstoff auf (rotes Signal). Sowohl am Kopf (mittlere Reihe) als auch am Schwanz (untere Reihe) zeigte sich Kolokalisation. Der Maßstab entspricht 200 μm und 50 μm in der Vergrößerung.

Um einen möglichen Phänotyp in der Chemotaxis zu finden wurden die generierten Linien (*srp-2::srp-2::YFP* & *srp-2::srp-2^{H302R}::YFP*) verwendet. Als Kontrolle diente der Wildtyp-Stamm (N2) sowie zwei weitere Linien (CB1033 & CB1124), von denen ein Defizit in der Chemotaxis bekannt war (Lewis and Hodgkin, 1977). Um Aufschluss über eine generelle Funktion von Srp-2 in der Chemotaxis zu bekommen wurden die Deletionsmutanten für Srp-2 eingesetzt (FX00744 & RB631). Ebenso wurden Doppeldeletionsmutanten für Srp-2 und Srp-3 generiert (PP644 & PP645), um eine mögliche Rolle von Srp-3 zu überprüfen. Srp-3 wird hauptsächlich in Muskelzellen exprimiert, ist dem Srp-2 aber am ähnlichsten (Pak et al., 2006). Der Chemotaxis-Assay wurde wie unter 4.4.14.2 beschrieben durchgeführt. Die errechneten Werte finden sich in der Tabelle 5.1.

Tabelle 5.1: Chemotaktischer Index der Linien.

LINIE	CHEMOTAXIS-INDEX
N2	1,00
<i>srp-2::srp-2::YFP</i>	0,27
<i>srp-2::srp-2^{H302R}::YFP</i>	0,25
FX00744	0,77
RB631	0,58
PP644	0,34
PP645	0,43
CB1033	0,12
CB1124	0,20

Aus Tabelle 5.1 geht hervor, dass nur der N2-Stamm einen Chemotaxis-Index von 1 hat, d.h. dass alle Würmer zu dem Lockstoff gekrochen sind. Bei allen anderen Linien, denen Srp-2 fehlt, zeigte sich ein Phänotyp, der zwischen der Negativkontrolle (N2) und den Positivkontrollen (CB1033 & CB1124) lag. Demnach spielt Srp-2 eine Rolle bei der Chemotaxis in *C. elegans*, die durch die Amphid- und Phasmidneurone gesteuert wird. Interessanterweise bewirkte die Expression von Srp-2 unter dem endogenen Promotor sowohl in der Wildtyp- wie auch in der mutanten Form in der BR584-Linie ebenfalls eine Verschlechterung der Chemotaxis.

5.2 Analyse möglicher Abbauwege bei *FENIB* anhand des *C. elegans*-Modells

5.2.1 Ausschaltung spezifischer Signalwege mittels RNAi

Der Proteinabbau wird in Zellen durch verschiedene Signalwege gesteuert. Der Proteinabbau für cytosolische Proteine über das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) und der Abbau lysosomaler Proteine über die Autophagie (Rubinsztein, 2006; Schwartz and Ciechanover, 2009). Wenn Proteine jedoch im endoplasmatischen Retikulum akkumulieren, kommt es zu einer direkten lokalen Antwort, dem ER-Stress, der die *Unfolded Protein Response* (UPR) auslöst. Die UPR wird durch *IRE1* (*inositol-requiring kinase 1*), *ATF6* (*activating transcription factor 6*) und *PERK* (*PKR-like ER kinase*) reguliert (Zhang and Kaufman, 2004). Durch Weiterleitung von fehlgefalteten Proteinen ins Cytosol erfolgt die Aktivierung des ER-assoziierten Abbauweges (ER-associated degradation pathway, ERAD) (Bonifacino and Weissman, 1998; Kostova and Wolf, 2003; Plemper and Wolf, 1999). ER-Stress durch fehlgefaltete Proteine steht ebenfalls in Verdacht Apoptose auszulösen (Li et al., 2006). Um mögliche Abbauwege für mutiertes *Srp-2* in einem ersten Versuch näher einzugrenzen, wurde RNAi gegen Schlüsselproteine der oben beschriebenen Abbauwege eingesetzt. Sollte der ausgeschaltete Signalweg eine Rolle spielen, so würde sich dies bei einer Deaktivierung in einer erhöhten Menge an Aggregaten zeigen. Neben diesen in der Tabelle 5.2 aufgeführten Proteinen wurde RNAi gegen *Daf-16* und *Hsf-1* eingesetzt, die eine Rolle bei der Alterung von *C. elegans* spielen (Hsu et al., 2003) und gegen *Vha-15*, eine vakuoläre ATPase, die als einziges Protein in zwei anderen RNAi-Screens in *C. elegans* einen Effekt zeigte (Nollen et al., 2004; van Ham et al., 2008). Ebenso wurden der Effekt der Chaperonen *Hsp-6* und *Hsp-70* getestet, die eine als erste Instanz versuchen fehlgefaltete Proteine umzufalten (Bukau and Horwich, 1998). Für die Versuche wurden die generierten Linien für Wildtyp und Mutante unter dem muskelspezifischen und dem endogenen Promotor verwendet. Die Tabelle 5.2 gibt eine Übersicht über die Proteine und den beeinflussten Signalweg sowie das entsprechende humane Protein, falls vorhanden.

Tabelle 5.2: RNAi gegen spezifische Proteine in *C. elegans* und deren humanen Homologe.

<i>C. elegans</i> Protein	Humanes Protein	Signalweg
Atf-6	ATF6	<i>unfolded protein response</i> (UPR)
Bec-1	BECLIN-1	Autophagie
Cdc-48.1/2	P97	ER-assoziierten Abbauweges (ERAD)
Ced-3	CASP2	Apoptose
Ced-4	-	Apoptose
Daf-16	-	Alterungsprozesse
Ero-1	ERO1L	Hitzeschockantwort der Zelle
Hsf-1	HSF1	Hitzeschockantwort der Zelle
Hsp-6	DnaK/Hsp70	<i>unfolded protein response</i> (UPR)
Hsp-70	HSP70	Hitzeschockantwort der Zelle
Ire-1	IRE1	<i>unfolded protein response</i> (UPR)
Lgg-2	LC-3	Autophagie
Lgg-3	-	Autophagie
Pek-1	PERK	<i>unfolded protein response</i> (UPR)
Rnf-5	RNF5	Ubiquitin-Proteasom-System (UPS)
Rpn-10	PSMD4	Ubiquitin-Proteasom-System (UPS)
Rpt-1	PSMC2	Ubiquitin-Proteasom-System (UPS)
Sel-1	SEL1	ER-assoziierten Abbauweges (ERAD)
Ubc-1	UBE2A	Ubiquitin-Proteasom-System (UPS)
Ubc-2	-	Ubiquitin-Proteasom-System (UPS)
Ubc-13	UBE2N	Ubiquitin-Proteasom-System (UPS)
Ubc-22	-	Ubiquitin-Proteasom-System (UPS)
Uev-1	UBE2V2	Ubiquitin-Proteasom-System (UPS)
Ubq-1	-	Ubiquitin-Proteasom-System (UPS)
Ubq-2	-	Ubiquitin-Proteasom-System (UPS)
Ufd-1	UFD1	ER-assoziierten Abbauweges (ERAD)
Ufd-2	-	Ubiquitin-Proteasom-System (UPS)
Vha-15	ATP6V1H	Protonentransport

In den durchgeführten RNAi-Experimenten zeigte RNAi gegen die hervorgehobenen Proteine einen deutlichen Effekt auf die Aggregation. Die RNAi gegen Hsf-1 sowie bei Pek-1 bewirkte einen leichten Anstieg des Signals in der *unc-54::srp-2^{H302R}::YFP*- und der *srp-2::srp-2^{H302R}::YFP*-Linie, die sich hauptsächlich auf die Region um die Zellkerne lokalisierte. Ein weiterer potentieller Kandidat, war *Vha-15*, eine vakuoläre ATPase, die bei den verwendeten Wildtypen keinen Phänotyp ergab, bei den Mutanten jedoch eine Paralyse und erhöhte Aggregation zeigte.

5.2.2 Kreuzung der generierten Linien mit Deletionsmutanten

Die Ergebnisse des RNAi-Screens wurden durch Einkreuzung von Deletionsmutanten in die Linien überprüft. Zum einen wurde das Hsf-1-Protein (heat shock factor 1), ein grundlegender Transkriptionsregulator bei Stressantworten der Zelle, der bekanntermaßen eine Schlüsselrolle im Alterungsprozess und mit dem Alter assoziierten Erkrankungen spielt, eingekreuzt (Garigan et al., 2002; Hsu et al., 2003). Zum anderen wurden die Linien mit Deletionsmutanten für *ire-1*, *atf-6* und *pek-1* gekreuzt, die für die *Unfolded Protein Response* (siehe Einleitung 2.2) verantwortlich sind. Dazu wurden Männchen der Linien mit muskelspezifischem und endogenem Promotor (*unc-54::srp-2::YFP*, *unc-54::srp-2^{H302R}::YFP*, *srp-2::srp-2::YFP* & *srp-2::srp-2^{H302R}::YFP*), wie unter 4.4.2 durch Hitzeschock generiert. Anschließend wurden die Linien für Kreuzungen mit den Deletionsmutanten für *hsf-1*, *ire-1*, *atf-6* oder *pek-1* eingesetzt. Zur Überprüfung ob die Nachkommen der F3-Generation homozygot für die Deletion waren, wurde eine Genotypisierungs-PCR durchgeführt. Dazu wurden adulte Würmer der F2-Generation, die Eier gelegt hatten, für die PCR eingesetzt. Die Primer wurden dabei so generiert, dass jeweils drei Primer in einem PCR-Ansatz vorhanden waren. Zwei Primer flankierten dabei den DNA-Abschnitt in dem die Deletion vorhanden war, der dritte Primer band im putativen Deletionsbereich. Die Abbildung 5.12. zeigt den schematischen Aufbau (A), sowie ein exemplarisches Agarosegel-Bild (B) mit allen drei möglichen Genotypen (homozygot Wildtyp, homozygot deletiert und heterozygot) für eine der generierten Linien. Wenn die Würmer keine Deletion aufweisen, also genotypisch homozygot für Wildtyp sind, ergeben sich theoretisch zwei Banden die durch entsprechend stringente PCR-Bedingungen nicht entstehen. Die Bande der äußeren Primer 1 und 3 entstand nicht, sondern nur die Bande durch PCR von Primer 2 und 3. Wenn die Würmer hingegen eine Deletion zeigten, so entstand das PCR-Produkt aus Primer 1 und 3, welches durch Deletion entsprechend kürzer war. Tiere, die heterozygot für die Mutante waren, bildeten dementsprechend auch nur zwei Banden, zum einen die der Primer 2 und 3 zum anderen die durch die Deletion entsprechend kürze Bande der Primer 1 und 3.

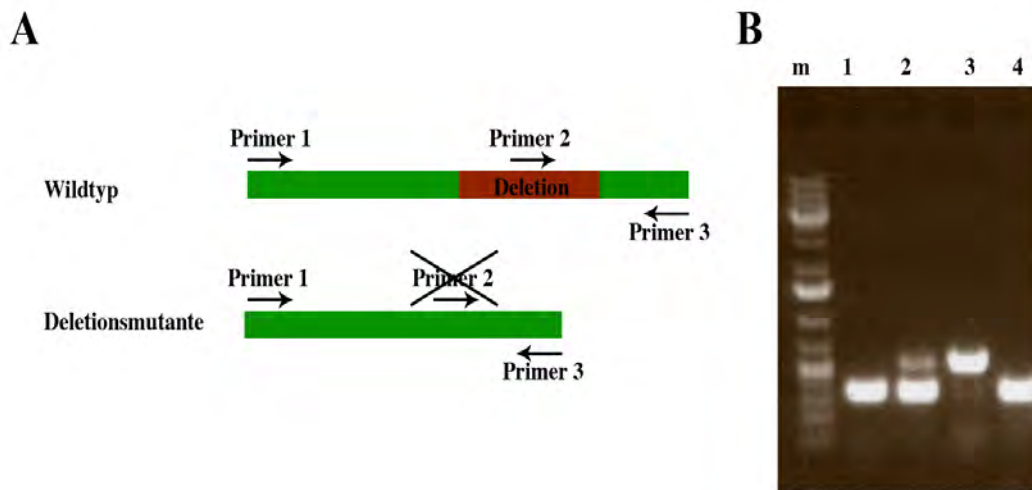


Abbildung 5.12: Primerdesign und entstehendes Bandenmuster.

(A) Schema der PCR. Das PCR-Produkt aus Primer 1 und 3 entstand beim Wildtyp aufgrund der stringenten PCR-Bedingungen nicht, sondern nur das Produkt aus Primer 2 und 3. Bei der Deletionsmutante entstand nur das PCR-Produkt aus Primer 1 und 3. (B) Agarose-Gel mit den drei Möglichen Bandenmustern. Spur 1 & 4 homozygote Deletionsmutante, Spur 2 heterozygote Linie und Spur 3 homozygoter Wildtyp. M = 1 kb plus Längenmarker.

Für die weiteren Versuche wurden die Nachkommen der Würmer verwendet, die in der PCR homozygot für die Deletion waren. Diese wurden zuvor auf Fluoreszenz überprüft. Es wurden dazu in der PCR nur Würmer eingesetzt, deren Nachkommen alle das Fluoreszenzsignal zeigten und somit homozygot für das Transgen waren. Das verwendete Schema ließ sich nicht für die *hsf-1*-Linie einsetzen, da diese Mutation zwar eine Deletion enthält, diese aber zu kurz war, um sie mittels PCR zu detektieren. Die Würmer dieser Linie wurden durch einen Hitzeschock überprüft. Dazu wurden jeweils 15 Nachkommen der F2-Generation auf Platten bei 25°C inkubiert. Da die *hsf-1*-Linie temperatursensitiv ist, zeigten die Nachkommen, die homozygot für die Deletion waren, Lethalität.

5.2.3 Charakterisierung der Kreuzungen

Die erhaltenen Linien wurden auf einen möglichen Phänotyp überprüft. Dazu wurden nur die Linien mit der muskelspezifischen Expression verwendet, da diese ein besseres Auszählen der Aggregate ermöglichten. Während im Wildtyp (*unc-54::srp-2::YFP*) kein Unterschied in der Expression zu erkennen war, zeigten die Linien mit der Mutation (*unc-54::srp-2^{H302R}::YFP*) eine unterschiedlich hohe Anzahl der Aggregate. Die Abbildung 5.13 gibt einen Überblick über die gekreuzten Linien. Es wird ausschließlich die Kopffregion der Würmer gezeigt.

Wie aus der Abbildung ersichtlich ist, zeigten die Kreuzungen eine erhöhte Aggregation im Vergleich zur Kontrolle (*unc-54::srp-2^{H302R}::YFP*-Linie). Die Menge der Aggregate bei der *hsf-1*-Deletion, die im RNAi-Screen einen leichten Anstieg im Signal hatte, zeigte auch hier eine Aggregatzunahme.

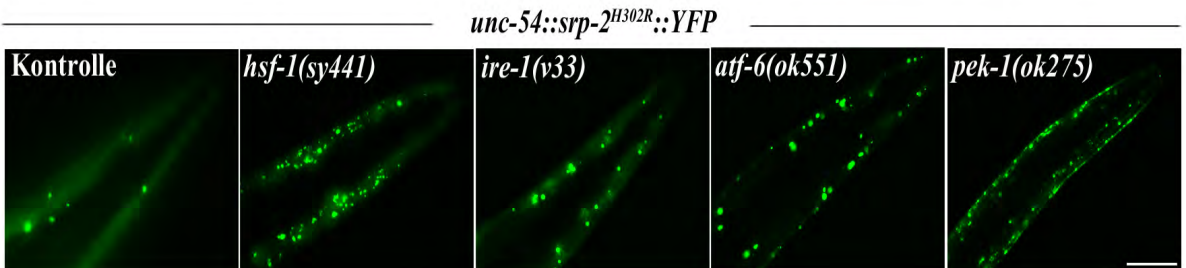


Abbildung 5.13: Übersicht der Kreuzungen von *unc-54::srp-2^{H302R}::YFP* mit Deletionsmutanten.

Der schematische Überblick zeigt die Einkreuzung der Deletionsmutanten. Wie auf den Bildern des Kopfbereiches zu erkennen ist, zeigen die Deletionsmutanten eine erhöhte Aggregation im Vergleich zur Kontrolle (*unc-54::srp-2^{H302R}::YFP*-Linie). Der Maßstab entspricht 50 μm .

Zur Quantifizierung der Aggregate wurde in jeweils 15 Würmern des L4-Stadiums die Gesamtzahl der Aggregate, wie in der Literatur beschrieben, gezählt. (van Ham et al., 2010). Als Kontrolle diente dabei ebenfalls die *unc-54::srp-2^{H302R}::YFP*-Linie, die nicht mit einer der Deletionsmutanten gekreuzt wurde. Die Ergebnisse der Auszählung sind in Abbildung 5.14 dargestellt. Es ist zu sehen, dass alle gekreuzten Linien im Vergleich zur Kontrolle eine signifikante Erhöhung der Aggregatanzahl aufweisen. Die Anzahl der Aggregate in der *hsf-1*-Linie zeigt eine Verfünffachung der Aggregatmenge, während die Anzahl in der *pek-1*-Linie verdreifacht und in der *ire-1* und *atf-6*-Linie jeweils verdoppelt ist.

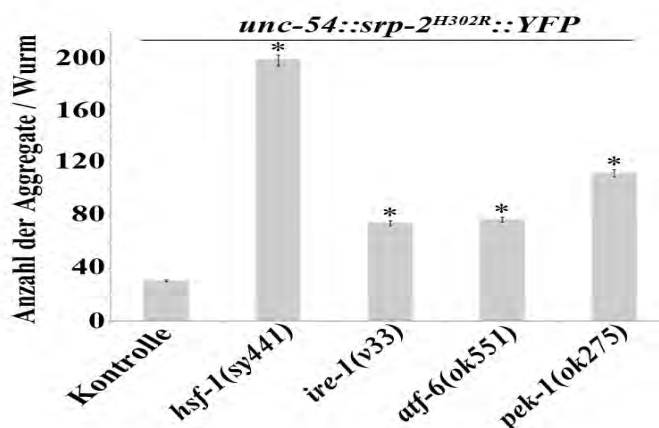


Abbildung 5.14: Quantifizierung der Aggregate pro Wurm.

Die Auszählung der Würmer zeigte in allen gekreuzten Linien eine signifikante Erhöhung der Aggregatanzahl. Dabei zeigte die *hsf-1*-Linie die stärkste Erhöhung, um das Fünffache. Die *ire-1* und die *atf-6*-Linie zeigten jeweils eine Verdoppelung der Aggregate, während die Anzahl der Aggregate in der *pek-1*-Linie ungefähr einer Verdreifachung entsprach. $n=15$, * $p \leq 0,001$.

Die Ergebnisse, zeigen einen Einfluss des Hsf-1 sowie der *Unfolded protein response* auf die Anzahl der Aggregate, so bewirkte eine Ausschaltung der entsprechenden Proteine eine signifikante Erhöhung der Aggregatmenge. Um zu testen, ob die Anzahl der Aggregate auch mit einer unterschiedlichen Gesamtmenge des exprimierten Srp-2::YFP und der Menge des polymeren Srp-2 zusammenhing, wurde mit einem nicht-reduzierenden Gel und einem SDS-Gel mit anschließendem Western Blot untersucht. Dazu wurden die muskelspezifischen Linien, wie unter 5.1.4 beschrieben, analysiert. Neben α -Tubulin wurde auch das Fluoreszenzsignal des Srp-2::YFP-Proteins im SDS-Gel überprüft. Wie in Abbildung 5.15 zu sehen ist, wurden in diesem Fall neben den Kreuzungen aus Deletionsmutanten und mutantem Srp-2::YFP ebenfalls die Würmern der jeweilige Wildtypkreuzung eingesetzt. In der Abbildung zeigt sich, dass in den Kreuzungen des Wildtyps keine deutlichen Unterschiede in der Signalstärke zu erkennen waren. Dies galt sowohl für das nicht-reduzierende, als auch für das SDS-Gel.

Anders verhielt es sich in den Kreuzungen aus Srp-2-Mutante und Deletionsmutanten. Bereits im nicht-reduzierenden Gel waren hier Unterschiede zu erkennen. So zeigte die Kreuzung aus *hsf-1*-Deletion und Mutante ein deutlich stärkeres Signal, obwohl die Proteinmenge, wie durch α -Tubulin im unteren SDS-Gel detektiert, gleich war. Bei dem Wurmlysat aus der Kreuzung der *pek-1*-Deletionsmutante und mutantem Srp-2::YFP zeigte sich im Vergleich zu den anderen Kreuzungen von *ire-1* und *atf-6* ein stärkeres Signal in der Geltasche, was am oberen Rand des Gelbildes zu sehen ist. Das SDS-Gel bestätigt dieses Bild. So war das Signal für α -Tubulin bei allen annähernd gleich, während das Signal für YFP, also das Fusionsprotein aus Srp-2 und YFP in den Kreuzungen aus Mutante und *hsf-1* bzw. *pek-1* im Vergleich zu den anderen erhöht war.

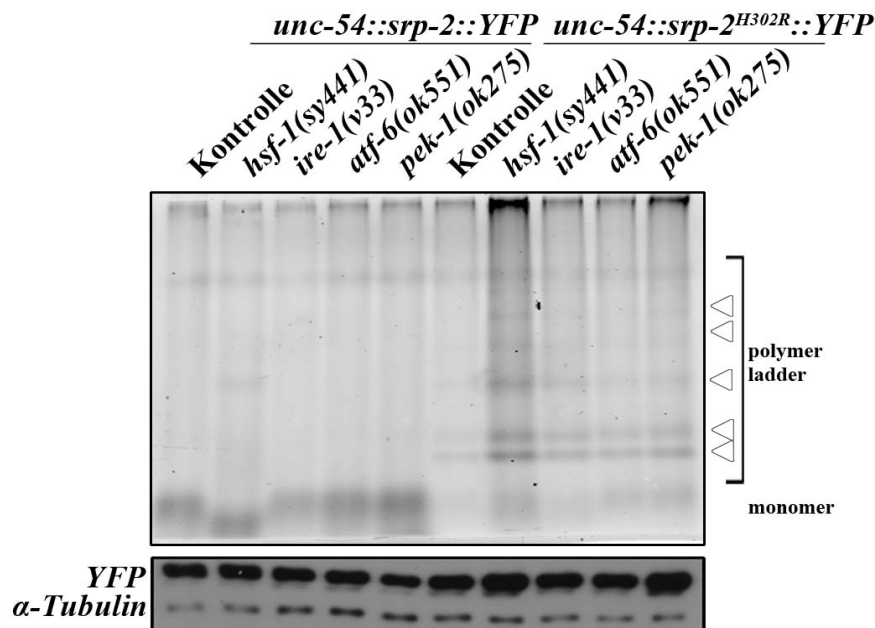


Abbildung 5.15: PAGE von Würmern der Kreuzungen.

Das obere Bild zeigt ein nicht-reduzierendes Gel der angegebenen Proben. In den Mutanten ist ein charakteristisches Bandenmuster zu sehen, während im Wildtyp eine Bande dominant zu sehen ist, die dem Wildtyp-Protein entspricht. Die Fluoreszenzbanden bei der Kreuzung aus Mutante und Deletion für *hsf-1* waren deutlich stärker als bei den anderen Deletionen, obwohl die gleiche Proteinmenge aufgetragen wurde. Bei der Kreuzung aus Mutante und *pek-1* ist nur eine stärkeres Signal in der Tasche zu sehen. Das untere Gelbild zeigt den Western Blot eines SDS-Gels der obigen Proben, in dem neben α -Tubulin auch das Fluoreszenzsignal (Srp-2::YFP) detektiert wurde. Die Banden bei der Kreuzung der Mutante mit *hsf-1* und *pek-1* zeigen keinen Unterschied im Western Blot während das Signal für YFP hingegen erhöht ist.

Welche Auswirkung diese Erhöhung an Aggregaten auf den Phänotyp hatte, wurde mit dem „Bodybend-Assay“ überprüft, dessen Ergebnisse in Abbildung 5.16 gezeigt sind. Während die Expression im Wildtyp (*unc-54::srp-2::YFP*) keinen Effekt in den Deletionsmutanten hatte, zeigte sich sowohl in der Deletionsmutante für *hsf-1* wie auch für *pek-1* ein signifikanter Effekt in der Anzahl der Körperwindungen. Während diese Anzahl in der *pek-1*-Linie sank, stieg die Anzahl der Körperwindungen pro Minute in der *hsf-1*-Linie an.

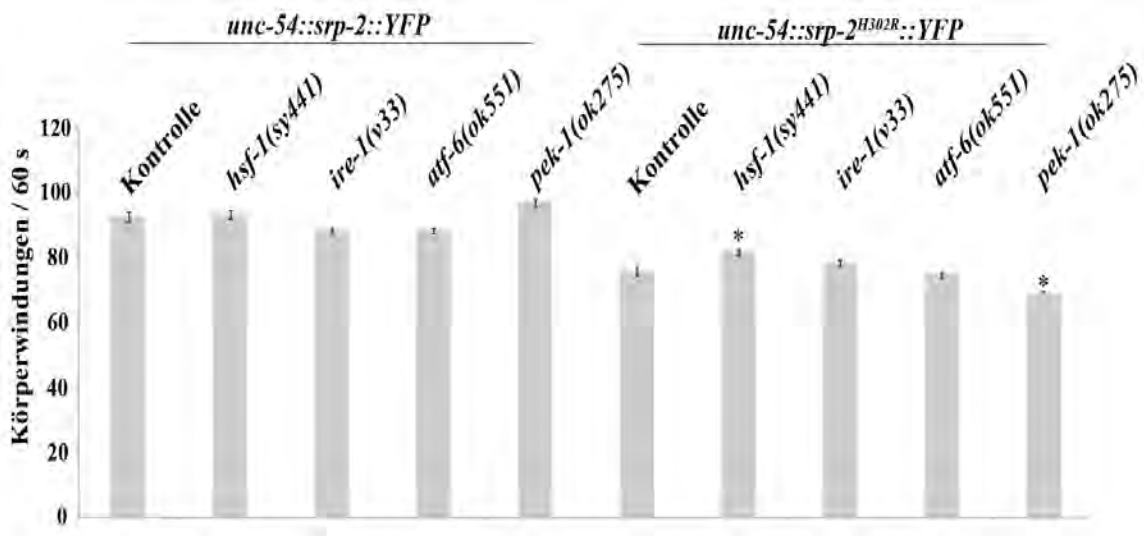


Abbildung 5.16: „Bodybend-Assay“ der Kreuzungen.

Der Bodybend-Assay für die einzelnen Linien. Das Srp-2::YFP-Protein in seiner Wildtypform hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Anzahl der Bodybends. Das mutierte Srp-2::YFP-Protein hatte einen signifikanten Einfluss in der Deletionsmutante für *hsf-1* und *pek-1*, während die Anzahl der Körperwindungen in der *pek-1*-Deletion sinkt, steigt diese in der *hsf-1*-Deletion. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler des Mittelwertes. n=30, * p≤0,001.

5.2.4 Effekt von UPR-induzierenden Substanzen

Die UPR kann neben fehlgefalteten Proteinen auch durch bestimmte andere Substanzen ausgelöst werden. Zwei bekannte Auslöser sind Tunicamycin (TC) und Dithiotreitol (DTT). DTT bewirkt eine Reduktion von Disulfidbrücken, wodurch diese aufgebrochen werden. Viele Proteine enthalten als strukturgebendes Element Disulfidbrücken, so dass eine Zugabe von DTT bewirkt, dass Proteine sich entfalten bzw. fehlfalten, die im ER lokalisiert sind (Back et al., 2005). TC hingegen inhibiert eine Transferase, die Proteine glykosyliert (Barnes et al., 1984; Lehle and Tanner, 1976; Takatsuki and Tamura, 1971). Zur Überprüfung welchen Effekt diese beiden Substanzen auf den muskelspezifischen Wildtyp und die Mutante haben, wurden die Würmer auf Platten mit TC und DTT kultiviert. Dabei war die Idee, dass eine frühzeitige Aktivierung der UPR eine Aggregation verringert bzw. verhindert. Um diese Theorie zu überprüfen wurden die Substanzen in der angegebenen Konzentration direkt zu dem Agar für die Platten hinzugegeben. Für das Experiment wurden L1-Würmer für fünf Tage auf den Platten kultiviert. Dann wurde ein Lysat hergestellt und dieses auf einem SDS-Gel aufgetragen. Der Nachweis erfolgte über Western Blot. Wie die Abbildung 5.17 zeigt, waren in den einzelnen Taschen keine Unterschiede zwischen der Kontrolle (unbehandelt) und den verschiedenen Konzentrationen an TC und DTT zu erkennen.

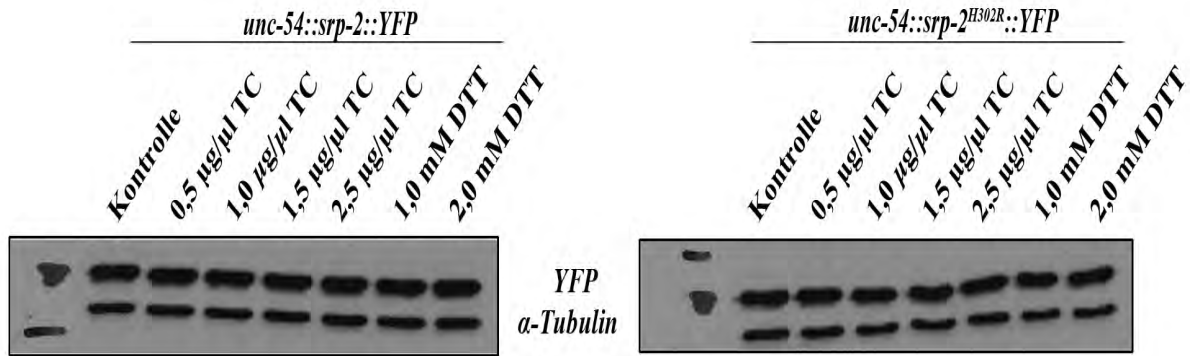


Abbildung 5.17: Effekt von UPR-induzierenden Substanzen.

Die verschiedene Konzentrationen von Tunicamycin (TC) und Dithiotreithol (DTT) hatten keinen Effekt auf die Menge des Srp-2::YFP-Proteins in Wildtyp- und mutierter Form. Als Ladekontrolle diente α -Tubulin.

6 Diskussion

In diesem Kapitel werden die Ergebnisse im Kontext der verfügbaren Literatur diskutiert. Dazu wird im ersten Teil - wie in dem Ergebniskapitel - zunächst auf das generierte und charakterisierte *C. elegans*-Modell eingegangen und in den Kontext anderer beschriebener *C. elegans*-Modelle für neurodegenerative Erkrankungen gestellt. Im zweiten Teil wird auf die möglichen Abbauwege für Srp-2-Aggregate eingegangen. Dazu werden die gefundenen Signalwege eingehend analysiert und mögliche Abbauwege gezeigt sowie der Effekt von UPR-induzierenden Substanzen diskutiert. Zum Schluss erfolgt ein Ausblick, wie das Modell für weitere Untersuchungen verwendet werden kann. Hierbei werden auch die Schwachstellen beim Übertragen auf höhere Organismen - wie beispielsweise den Menschen - berücksichtigt.

6.1 Charakterisierung von Serpinopathien anhand des generierten *C. elegans*-Modells

Zunächst wurde die *in-silico*-Analyse durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass Srp-2 in *C. elegans* die größte Übereinstimmung mit dem humanen Neuroserpin aufwies. Obwohl die Aminosäuresequenz von Srp-2 nur zu 34 % mit der des humanen Neuroserpins übereinstimmt, liegen in Srp-2 alle Schlüsselregionen vor, die für die Funktion als Serpin eine Rolle spielen. Neben der reaktiven Schleife mit dem reaktiven Zentrum, das die Protease bindet, enthalten Proteine der Srp-Familie auch die sogenannte Serpinsignatur, die die Scharnierregion beschreibt (Whisstock et al., 1999; Zang and Maizels, 2001). Neben diesen bekannten Strukturen lässt sich aufgrund der in dieser Arbeit durchgeführten *in-silico*-Analyse ein weiteres Merkmal auch in *C. elegans* zeigen. Es handelt sich um die *shutter*-Region, die ein enges Packen des entsprechenden β -Faltblattes ermöglicht. Obwohl keine Kristallstruktur für Srp-2 vorliegt, lassen sich so Aussagen über ein weiteres Strukturelement treffen. Die Aminosäuren, die in murinem und humanem Neuroserpin die *shutter*-Region bilden, liegen ebenfalls in Srp-2 vor (siehe Abbildung 2.2 & 5.1). Das generierte Modell bewirkt, dass eine Punktmutation an Position 302, die der humanen Position 338 entspricht, dazu führt, dass Srp-2 Aggregate bildet. Das vorliegende Modell ist das erste, in dem der Austausch einer einzelnen Aminosäure in einem *C. elegans*-kodierten Protein zu Aggregation führte. Im humanen Neuroserpin geht das Histidin an Position 338 mit den Serinen an den Positionen 49 und 52 Wasserstoffbrückenbindungen ein.

Eine Zerstörung dieser Bindung bewirkt eine Öffnung des β -Faltblattes (Ryu et al., 1996). Auch in Srp-2 sind diese Serine an den entsprechenden Positionen 29 und 32 vorhanden. Dies spricht für ein β -Faltblatt. Die generierten Linien zeigten bei einem Austausch der Aminosäure an Position 302 von Histidin zu Arginin Aggregate. Diese zeigten sich in der Wurmentwicklung je nach verwendetem Promotor im L2- (muskelspezifische Expression) und im L3-Stadium (endogene Expression). Im Vergleich zu bisher beschriebenen Aggregations-Modellen in *C. elegans* erfolgte die Aggregation relativ spät. Ein Modell für die amyotrophe Lateralsklerose zeigte schon im Embryo Aggregation (Gidalevitz et al., 2009). Die Charakterisierung der generierten Linien zeigte im proteinbiochemischen Nachweis die Aggregatbildung in den mutierten Linien (*unc-54::srp-2^{H302R}::YFP* und *srp-2::srp-2^{H302R}::YFP*) bereits im L4-Stadium. Die gebildete Proteinleiter bestand aus hochmolekularen Srp-2-Polymeren und zeigte nur eine sehr schwache Bande auf der Höhe des Srp-2-Monomers. Die Wildtyp-Linien zeigten hingegen eine distinkte Bande auf der Höhe des Monomers. Die Banden bei den Kontrolllinien, welche das YFP-Protein unter dem *unc-54*-Promotor (Q0::YFP) bzw. YFP mit einem n-terminalen Polyglutamintag (Q40::YFP) exprimierten, zeigten hier ein deutlich stärkeres Fluoreszenzsignal. Sowohl *in vivo* als auch *in vitro* war die Menge an exprimiertem Protein deutlich höher als in den Srp-2-Linien. Hierfür gibt es zwei mögliche Erklärungen. Die erste Möglichkeit ist die Struktur des Expressionskonstruktes. Zur Expression wurde die genomische DNA von Srp-2 verwendet. Diese hat eine Länge von 1777 bp, während die cDNA von Srp-2 1080 bp umfasst. Damit unterscheidet sich das vorliegende Modell von allen bisher beschriebenen Modellen auch von den verwendeten Kontrolllinien (Q0::YFP und Q40::YFP), in denen ein humanes Protein durch die cDNA kodiert wurde (Brandt et al., 2009; Brignull et al., 2006; Cooper et al., 2006; Link, 1995; Morley et al., 2002; Oeda et al., 2001; van Ham et al., 2008). Das Transkript von Srp-2 ist um 697 bp länger als die codierende Sequenz. Diese 697 bp werden durch fünf Introns gebildet (Pak et al., 2004). Möglicherweise haben auch hier die Introns regulatorische Funktionen die bewirken, dass Srp-2 nicht sofort in vollem Umfang translatiert wird (Farrer et al., 2002). Eine weitere Erklärung für die schwächere Expression die im Expressionskonstrukt liegt, ist der verwendete Promotor, der bei den Kontrolllinien über einen zusätzlichen Verstärker verfügte, während für die muskelspezifische Expression der Srp-2-Linien ein Minimalpromotor verwendet wurde, um mögliche Expressionsartefakte auszuschließen.

Die zweite Möglichkeit für die erst später auftretende Aggregation bei mutiertem Srp-2 im Vergleich zu der Kontrolllinie Q40::YFP, beruht auf der Theorie der „seeded nucleation“. Diese Theorie ist bereits für neurodegenerative Erkrankungen wie der Alzheimer'schen Erkrankung, Prionenerkrankungen und Trinukleotiderkrankungen beschrieben worden (Chen et al., 2002; Jarrett and Lansbury, 1993). Die Theorie besagt, dass die Proteinaggregation in distinkten Phasen abläuft. Zunächst werden die fehlgefalteten Proteine in eine lag-Phase akkumuliert, dann erfolgt eine exponentielle Akkumulation der fehlgefaltete Proteine. Durch einen Initiationskeim erfolgt dann schlagartig die Aggregatbildung. Möglicherweise folgt die „seeded nucleation“ bei *FENIB* einer anderen Kinetik als dies bei anderen Proteinaggregationserkrankungen der Fall ist, wodurch das spätere zeitliche Auftreten der Aggregate erklärt werden kann.

Um die Lokalisierung der Aggregate weiter aufzuklären, wurde die FRAP-Analyse der Würmer durchgeführt. So konnte gezeigt werden, dass Würmer unlösliche Aggregate des mutierten Srp-2-Proteins bildeten, die sich in Zellkompartimenten und nicht freibeweglich im Cytosol befanden. Durch die dreidimensionale Darstellung der Würmer mittels des Spinning Disk-Mikroskops, war es möglich, die Kolokalisation der Signale von Srp-2 und einen Marker für f-Aktin (Rhodamin-Phalloidin) genauer zu untersuchen und in einem Streudiagramm aufzutragen. Der errechnete Korrelationskoeffizient betrug beim Wildtyp 0,973. Die Signale kolokalisierten hier zu 97 % und damit fast vollständig. In der Mutante hingegen lag der Wert bei 0,340, was bedeutet, dass die Aggregate zwar in den Muskelzellen exprimiert wurden (was die Wildtyp-Kontrolle deutlich zeigte) aber nicht in die Aktinfasern eingelagert waren. Mutantes Neuroserpin lokalisiert im ER (Miranda et al., 2004). Um die genauere Lokalisation von Srp-2::YFP zu untersuchen, wurde ein spezifischer Antikörper gegen CYP-33E1 verwendet, der zur Cytochrom P450-Familie gehört und im ER lokalisiert ist (Chakrapani et al., 2008). Die Färbung mit dem Antikörper zeigte zwar ein Kolokalisierung der Srp-2-Aggregate mit dem Cytochrom P450, allerdings ist die Trennschärfe des Antikörpers nicht besonders gut, so dass sich auch viel Hindergrundfärbung zeigte. Antikörper wie Calnexin und Calreticulin wurden ebenfalls getestet, zeigten aber keine Färbung in Würmern. Durch die Färbung mit DAPI zeigte sich eine Lokalisation um den Zellkern.

Zusammenfassend mit der FRAP-Analyse lässt sich sagen, dass sich die Aggregate in einem Kompartiment befinden, das um den Zellkern lokalisierte.

Obwohl die Aggregate nicht die Struktur der Muskelzellen durch Einlagerung in die Aktinfasern zerstörten, wurde ein Bewegungsassay durchgeführt. Dieser Bodybend-Assay zeigte signifikante Defekte in der Bewegungsleistung bei den verwendeten *C. elegans*-Linien, die *Srp-2* unter dem muskel-spezifischen Promotor exprimierten. Im Vergleich zu dem N2-Stamm war dieser bei allen Linien signifikant. Die Würmer zeigten diesen Phänotyp spezifisch in Flüssigkeit jedoch nicht auf Agarplatten. Durch RNAi wurde in einer der *unc-54::srp-2^{H302R}::YFP*-Linien überprüft, ob die Defizite in der Mobilität reversibel waren. In diesem Experiment zeigten die mutierten Würmer, die auf Agarplatten mit RNAi gegen YFP kultiviert wurden ähnliche Ergebnisse wie die *unc-54::srp-2::YFP*-Linien. Dies spricht dafür, dass der Phänotyp durch das fehlgefaltete *Srp-2* ausgelöst wurde. Auch in anderen *C. elegans*-Modellen zeigten Linien eine Störung in dem Bodybend-Assay. Neben der Linie für Trinukleotiderkrankungen wie Huntington, die hier als Kontrolle verwendet wurde (Morley et al., 2002), zeigte auch eine Expression von humanem β -Amyloid und mutierter Superoxiddismutase diesen Effekt (Gidalevitz et al., 2009; Link, 1995). Das aggregierte *Srp-2* hat demnach eine Beeinflussung der Funktion in den Muskelzellen zur Folge. Eine Hypothese, die als Calcium-Hypothese bei der Alzheimer'schen Erkrankung zum ersten Mal beschrieben wurde besagt, dass lange vor den ersten Anzeichen der eigentlichen Erkrankung eine Dysregulation des intrazellulären Calciums stattfindet (LaFerla, 2002). Ein wichtiger Calciumspeicher ist das endoplasmatische Retikulum bzw. das dementsprechende sarkoplasmatische Retikulum in Muskelzellen. In einer Deletionsmutante für Troponin zeigte sich ein Bewegungsphänotyp, bei dem die Würmer auf Platten keine Bewegungseinschränkungen zeigten. Wenn diese jedoch in Flüssigkeit analysiert wurden, zeigten sie unkoordinierte Bewegungen (Myers et al., 1996). Da Troponin eine Bindestelle für Calcium aufweist (Ebashi et al., 1969), spielt die Dysregulation eine mögliche Rolle bei der Calciumhomöostase in Muskelzellen.

Die Expression unter dem endogenen Promotor unterscheidet sich von der muskelspezifischen dadurch, dass neben dem endogenen Promotor auch die 3'-UTR verwendet wurde, die wie Introns regulatorische Eigenschaften hat (Mangone et al., 2010; Merritt et al., 2008). Dadurch konnte eine physiologische Expression von *Srp-2* in Darm, Hypodermis und Phasmid-Neuronen erreicht werden (Pak et al., 2004). Phasmid-Neuronen haben in *C. elegans* unter anderem eine Funktion bei der Chemotaxis (Bargmann and Horvitz, 1991; Ward et al., 1975).

Um zu überprüfen, welchen Effekt eine Expression des Srp-2::YFP-Protein in der Wildtyp- oder mutierten Form auf die Chemotaxis hat, wurde der entsprechende Assay durchgeführt. Dabei zeigten bis auf den Wildtyp N2 alle getesteten Würmer einen Phänotyp. Auffällig war dabei, dass sowohl der Wildtyp als auch die Mutante für Srp-2::YFP (*srp-2::srp-2::YFP* und *srp-2::srp-2^{H302R}::YFP*) einen nahezu identischen chemotaktischen Index zeigten, welcher bei dem der Positivkontrollen lag. Dies bedeutet, dass eine Überexpression von Srp-2 zu einem Chemotaxis-Phänotyp führte. Auch die Deletion von Srp-2 (FX00744 & RB631) führte zu einem leichten Chemotaxis-Phänotyp, der durch die Doppeldeletion mit Srp-3 (PP644 & PP645) noch verstärkt wurde. Somit lässt sich sagen, dass sowohl eine Überexpression als auch eine Deletion von Srp-2 zu einem Phänotyp führte. Für eine genauere Untersuchung des Phänotyps sind jedoch weitere Assays nötig. Ebenso sollte für die Versuche eine Wurmlinie generiert werden, in der eine Deletionsmutante für Srp-2 mit einer Linie gekreuzt wird, in der Srp-2 ohne ein Fluoreszenzprotein exprimiert ist. Nur dadurch ist es möglich, einen alleinigen Einfluss von Srp-2 zu bestimmen. Es lässt sich nicht ausschließen, dass eine Proteinüberexpression zu einer Störung der Proteinhomeostase führt. Durch die durchgeführten Experimente ergeben sich Hinweise, dass bereits die Expression von Srp-2 in der Wildtypform das Gleichgewicht der Zellen beeinflusst. Dafür spricht, dass die Expression von Wildtyp-Srp-2 unter dem endogenen Promotor sowohl eine schlechtere Reaktion des Wildtyps (*srp-2::srp-2::YFP*) im Chemotaxis-Assay als auch im Bodybend-Assay (*unc-54::srp-2::YFP*) im Vergleich zum N2-Stamm verursachte.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass ein *C. elegans*-Modell für *FENIB* generiert werden konnte, in dem mutiertes Srp-2 im ER akkumulierte und zu einem muskelspezifischen Bewegungsdefizit führte.

6.2 Analyse möglicher Abbauwege bei *FENIB* anhand des *C. elegans*-Modells

Proteine gelangen auf zwei Wegen in das ER (Corsi and Schekman, 1996). Der Transport erfolgt während der Umschreibung der RNA in ein Protein (co-translational) oder nach der Translation (posttranslational). Die Abbildung 6.1 gibt die möglichen Abbauwege für mutiertes Srp-2 wieder. Unter physiologischen Bedingungen erfolgt der Abbau über das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) oder über Autophagie.

Während das UPS den Abbau für Proteine, die sich im Cytosol befinden, übernimmt, dient die Autophagie dem Abbau von cytoplasmatischen Bestandteilen und ganzer Zellorganellen (Rubinsztein, 2006; Schwartz and Ciechanover, 2009). Bei einer Überlastung des ERs kommt es zu Ausbildung von ER-Stress und zur Aktivierung der *Unfolded Protein Response*. Fällt ein Protein bei der im ER-lokalisierten Qualitätskontrolle durch, erfolgt eine Einschleusung in das UPS mittels ERAD. Eine Reihe von Signalwegen induziert chronischen ER-Stress. Dieser führt dazu, dass die Zelle in den programmierten Zelltod (Apoptose) übergeht.

Die Auswertung der Rolle eines spezifischen Signalweges erfolgte anhand der Überwachung der Srp-2-Aggregate in *C. elegans* bei Kultivierung auf RNAi-Platten. Bei einer signifikanten Zunahme der Menge an aggregiertem Srp-2 wurde dies als Hinweis dafür gewertet, dass der über RNAi inhibierte Signalweg beim spezifischen Abbau von mutiertem Srp-2 eine Rolle spielte.

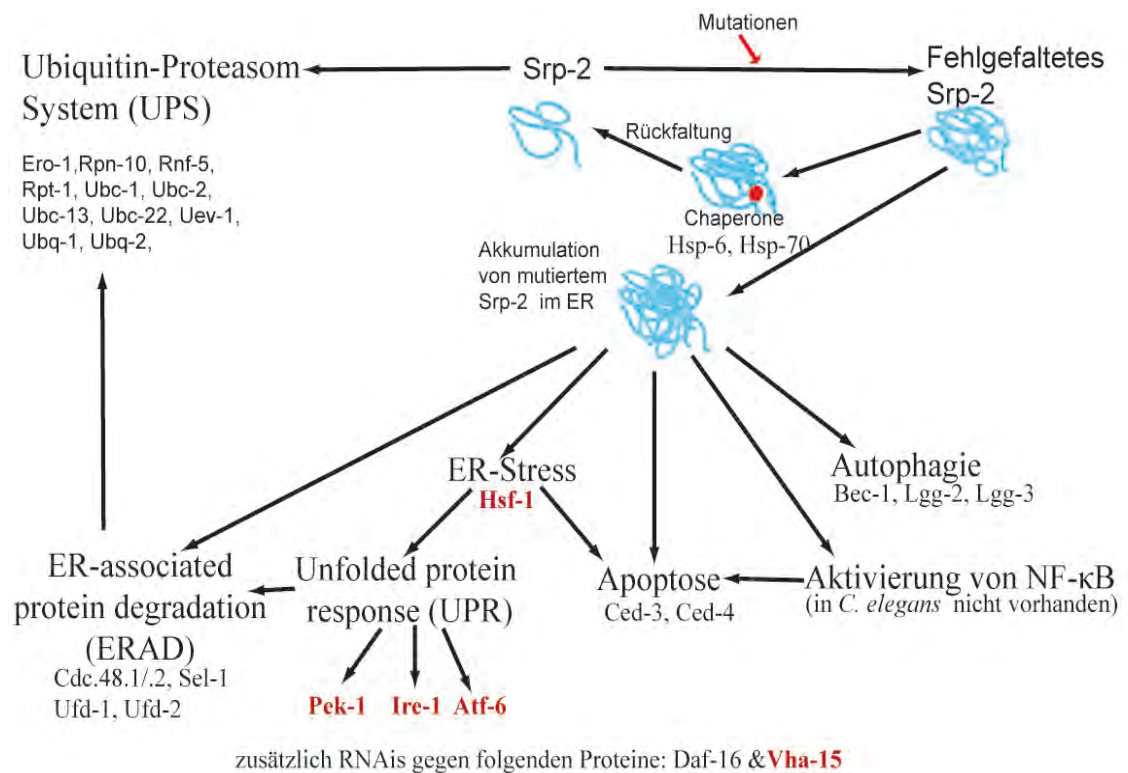


Abbildung 6.1: Übersicht über die möglichen Abbauwege von Srp-2. (© S. Lange)

Die Abbildung zeigt die in der Literatur beschriebenen Abbauwege adaptiert für Srp-2 bei *C. elegans*. Die in 5.3.1 verwendeten RNAis in *C. elegans* sind an den entsprechenden Stellen eingezeichnet. Rot dargestellte Proteine zeigten einen Effekt in den RNAi-Experimenten oder in Deletionsmutanten.

Im ER werden Proteine durch Chaperone der Hsp-70-Familie bei der korrekten Faltung unterstützt (Bukau and Horwich, 1998; Hartl, 1996). RNAi gegen das ER-lokalisierte Hsp-70 zeigte keinen Effekt auf die Aggregatmenge. RNAi gegen das mitochondriale Chaperon Hsp-6 zeigte ebenfalls keine Wirkung. Die Ausschaltung von Hsp-6 und Hsp-70 hatte demnach keinen Effekt auf die Aggregation von Srp-2. In *C. elegans* und im Menschen gibt es eine Vielzahl weiterer HSP-70-Proteine, die entweder im ER oder im Cytosol lokalisiert sind (Heschl and Baillie, 1990; Tavarina et al., 1996). Diese Daten sind in Übereinstimmung mit einem durchgeführten RNAi-Screen in der Gruppe von Plasterk, bei dem sich nur ein geringer Einfluss der Chaperone gegen Regulatoren von Trinukleotiderkrankungen zeigte (Nollen et al., 2004). Dieser Einfluss wurde mit der Spezifität der einzelnen Chaperone begründet, wobei in diesem Fall die beiden verwendeten Chaperone wahrscheinlich nur einen sehr kleinen Ausschnitt der Hsp-Familie wiedergeben. Ebenfalls wurde der Effekt von Ero-1 getestet. Dieses Protein lokalisiert im ER und wird durch ER-Stress induziert. Ero-1 bewirkt die Bildung von Disulfidbrücken in Proteinen (Fränd and Kaiser, 1998; Tu and Weissman, 2004). RNAi gegen Ero-1 zeigte keinen sichtbaren Effekt.

Durch RNAi gegen Daf-16 und Hsf-1 wurde überprüft, welchen Effekt generelle Regulatoren der Hitzeshockantwort auf die Aggregation von mutiertem Srp-2 hatten. Daf-16 und Hsf-1 bewirken eine synergistische Expression von kleinen Heatshock-Proteinen und sind damit in *C. elegans* an der Erhöhung der Lebenserwartung beteiligt (Hsu et al., 2003). Während RNAi gegen Daf-16 keinen Effekt auf die Aggregate zeigte, führte die Inhibierung von Hsf-1 durch RNAi zu einer Erhöhung von mutiertem Srp-2. Während es in höheren Organismen eine ganze Familie der Hitzeshock-Faktoren gibt, existiert in *C. elegans* nur ein einziger (Hsf-1) (Akerfelt et al., 2007; Nover et al., 2001; Wu, 1995). Hsf-1 übernimmt in *C. elegans* eine Schlüsselrolle bei Alterungsprozessen (Hsu et al., 2003; Morley and Morimoto, 2004).

Das UPS wurde durch RNAis für Schlüsselproteine der Proteasom-Assemblierung (Rpt-1 & Rpn-10) und der Ubiquitinylierung (Ero-1, Rnf-5, Ubc-1, Ubc-2, Ubc-13, Ubc-22, Uev-1, Ubq-1, Ubq-2) überprüft (Didier et al., 2003; Isasa et al., 2010; Jones et al., 2002). Bei keiner der genannten RNAis konnte eine Veränderung der Srp-2-Aggregatmenge beobachtet werden. Dies steht im Gegensatz zu einer beschriebenen Publikation für die Trinukleotiderkrankungen, bei der RNAi gegen Ubiquitin-Ligasen keine Reduktion, dafür aber eine Vergrößerung der Aggregate zeigte (Howard et al., 2007).

Für Serpinopathien ist die Bildung von membranumschlossenen Aggregaten beschrieben, bei denen es sich möglicherweise um Autophagosomen handelt (Davis et al., 1999a; Davis et al., 1999b). Die Rolle von Autophagie wurde bereits mehrfach in Zusammenhang mit neurodegenerativen Erkrankungen gebracht (Rubinsztein, 2006). Autophagie wurde deshalb mit RNAi gegen die Proteine Bec-1, Lgg-2 und Lgg-3 überprüft. Diese Proteine spielen eine Schlüsselrolle bei der Initiation der Autophagie (Jia et al., 2007; Melendez et al., 2003). Hier zeigte sich bei keiner der eingesetzten RNAis ein Effekt auf die Anzahl der Aggregate, so dass dieser Abbauweg keine wesentliche Rolle beim Abbau der Aggregate spielte. Während einige Publikationen einen Einfluss von Autophagie zeigen (Hidvegi et al., 2010; Kroeger et al., 2009) gehen andere davon aus, dass Autophagie bei *FENIB* keine Rolle spielt, bzw. dass es sich bei den vorhandenen Einschlusskörperchen nicht um Autophagosomen handelt (Granell et al., 2008). Bei der Publikation von Granell et al. zeigten sich membranumschlossene Einschlüsse, diese Membran enthielt aber nicht die spezifischen Moleküle der Autophagosomen. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte ein im Jahr 1992 beschriebenes Modell sein, bei dem sich Teile der ER-Zisterne verdickten und direkt in Lysosomen übergangen, die elektronenmikroskopisch den Autophagosomen ähnelten (Noda and Farquhar, 1992). Eine Reihe von Publikationen zeigt ein Zusammenspiel zwischen dem ER-assoziierten Abbauweg (ERAD) und Autophagie auf (Kroeger et al., 2009). Dabei bewirkt mutiertes, nicht-polymerisiertes Neuroserpin die Aktivierung von ERAD. ERAD ist wiederum direkt mit dem Abbau durch das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) assoziiert (Friedlander et al., 2000; Ron and Walter, 2007). Zur Überprüfung des ERAD wurde RNAi gegen entsprechende Komponenten eingesetzt. Dies waren Cdc 48.1/2., Sel-1, Ufd-1 und Ufd-2. Jedes dieser Proteine spielt eine entscheidende Rolle im ERAD, indem ein Komplex der Proteine die Ausschleusung von fehlgefalteten Proteinen aus dem ER bewirkt (Mouysset et al., 2006; Urano et al., 2002). Keine der verwendeten RNAis zeigte einen Effekt.

Wie aus der Abbildung 6.1 ersichtlich ist, existieren neben dem UPS und Autophagie weitere potentielle Prozessierungswege. Für andere Serpinopathien wurde in Zellkulturmodellen gezeigt, dass circa 15 % der Aggregate im ER lokalisieren (Lin et al., 2001; Schmidt and Perlmutter, 2005). Auch bei *FENIB* erfolgt eine Akkumulation von mutiertem Neuroserpin im ER (Miranda et al., 2008). Da die Srp-2-Aggregate in den durchgeführten RNAi-Experimenten nicht durch ERAD abgebaut wurden, dennoch aber im ER lokalisierten, wurde neben den bisher beschriebenen möglichen

Abbauwegen die *Unfolded Protein Response* untersucht. Diese zeigt einen Zusammenhang mit dem ERAD und dem UPS (Travers et al., 2000; Yoshida et al., 2003), kann aber auch autonom aktiviert werden (Zhang and Kaufman, 2004). Wie in der Abbildung 2.3 gezeigt, bewirkte die Aktivierung der UPR eine Kontrolle der Translation und der Transkription. Die Transkriptionskontrolle erhöhte dabei die Faltungskapazität des ER durch synthetisierte ER-Chaperone und die Translationskontrolle hemmte die Synthese bestimmter Proteine. RNAi gegen Ire-1 und Atg-6 zeigte keinen Effekt auf die Aggregatmenge, während RNAi gegen Pek-1 eine Erhöhung der Srp-2-Aggregate bewirkte. Pek-1, welches dem humanen PERK entspricht, verhindert die Proteinsynthese durch Phosphorylierung von eIF2 α und bewirkt die Bildung des Transkriptionsfaktors ATF-4 begünstigt (Ron and Walter, 2007). Dadurch erfolgt eine Blockierung der Proteinsynthese.

Ein Signalweg, der in Alterungsprozessen ebenfalls eine Rolle spielt, ist die Apoptose (Salminen et al., 2011). Die Apoptose wird als programmierter Zelltod bezeichnet, da hierbei nur die betroffene Zelle untergeht, ohne andere Zellen zu beeinflussen. In *C. elegans* wird der programmierte Zelltod von zwei Proteinen induziert. Dies sind Ced-3 und Ced-4 (Yuan and Horvitz, 1990). Beide eingesetzten RNAis zeigten keine Aggregaterhöhung des mutierten Srp-2-Proteins. Apoptose spielt bei ER-Stress jedoch eine wichtige Rolle und wird aktiviert, wenn keiner der Abbauwege greifen kann (Rutkowski and Kaufman, 2004; Shiraishi et al., 2006; Wu and Kaufman, 2006).

Bei allen oben erwähnten Prozessierungswegen spielen intakte Membranen eine wichtige Rolle. Aus diesem Grund wurden Membranen ebenfalls untersucht. Dazu wurde RNAi gegen eine ATPase verwendet. Die membranständige ATPase Vha-15 zeigte in zwei durchgeführten RNAi-Screens in *C. elegans* als einziges Protein einen Effekt auf die Aggregatbildung (Nollen et al., 2004; van Ham et al., 2008). ATPasen spielen eine entscheidende Rolle bei der pH-Homöostase von Zellen und wurden mit neurodegenerativen Erkrankungen assoziiert (Nishi and Forgac, 2002; Syntichaki et al., 2005). Eingesetzte RNAi gegen Vha-15 hatte paralysierte Würmer zur Folge, die vermehrt Srp-2-Aggregate zeigten. Gemäß Literatur bewirken ATPasen eine Ansäuerung des Cytosols und führen damit zu Nekrose (Syntichaki et al., 2005). In *C. elegans* führen zum Beispiel hohe Konzentrationen von Calcium zu Nekrose (Xu et al., 2001). Dies würde auch für die Calciumhypothese bei neurodegenerativen Erkrankungen sprechen, die unter 6.1 erläutert wurde.

Die Verwendung von RNAi zeigte, dass die Potenz des *C. elegans* hauptsächlich für Screens geeignet ist, in denen viele potentielle Kandidaten in Bezug auf eine Fragestellung getestet werden sollen. Dabei ergibt sich die Problematik, dass ein Teil der potentiellen Kandidaten nicht erfasst werden können. Dies ist bekannt und so generieren RNAi-Screens häufig falsch-positive oder falsch-negative Kandidaten (Simmer et al., 2003; Sonnichsen et al., 2005). Aus diesem Grund wurden die RNAi-Ergebnisse durch Deletionsmutanten überprüft. Für Vha-15 existiert keine Deletionsmutante, so dass diese Kreuzung nicht durchgeführt werden konnte. Die generierten Linien wurden deshalb mit Deletionsmutanten für die drei Signalwege der UPR (Ire-1, Atf-6 & Pek-1) sowie Hsf-1 gekreuzt. In *C. elegans* verläuft die UPR ähnlich wie im Menschen. Neben dem bereits beschriebenen Protein Pek-1 existieren weitere Signalwege. Durch RNAi-Experimente gelang es Shen et al. diese aufzuschlüsseln. (Shen et al., 2005). In *C. elegans* existiert eine konstitutive (c-UPR) sowie eine induzierbare UPR (i-UPR). Während der c-UPR eine Rolle bei der normalen Entwicklung zukommt, bewirkt die i-UPR eine Antwort auf akuten Zellstress. Dabei zeigt sich, dass Ire-1 und Atf-6 hauptsächlich Gene der c-UPR regulieren, während Pek-1 23 % der durch i-UPR regulierten Gene steuert. Ire-1 und Xbp-1 übernehmen bei *C. elegans* beide eine Schlüsselfunktion im i-UPR, indem sie Gene für den sekretorischen Signalweg, die Phospholipid- und Calciumhomeostase und die Funktion der Mitochondrien regulieren (Shen et al., 2005). Eine Deletion von Atf-6 zeigte keinen Effekt bei der aktiven Induktion von ER-Stress durch Tunicamycin. Dies lässt darauf schließen, dass viele der durch ATF-6 regulierten Gene für die i-UPR keine Rolle spielen, bzw. durch die anderen Proteine Ire-1, Xbp-1 und Pek-1 kompensiert werden können. Auf der Basis dieser Information zu den Proteinfunktionen in *C. elegans* erfolgt nun die Diskussion der Ergebnisse der einzelnen Kreuzungen. Wie im Ergebnissteil beschrieben ist, zeigte die vollständige Ausschaltung von *Ire-1*, *Atf-6*, *Pek-1* und *Hsf-1* in den Nachkommen der Kreuzungen eine Erhöhung der Aggregatmenge. Die Auszählung am Mikroskop ergab in der *hsf-1*-Linie eine Verfünffachung der Aggregatmenge, während die *ire-1*- und die *atf-6*-Linie jeweils eine Verdoppelung und die *pek-1*-Linie eine Verdreifachung zeigten. Dies war aus den vorher durchgeführten RNAi-Experimenten nicht zu erwarten, in denen sich nur ein leichter Anstieg der Aggregatmenge zeigte. Die weitere biochemische Charakterisierung der Linien ergab, erhöhten Mengen an Srp-2::YFP in der *hsf-1*- und *pek-1*-Linie.

Aus diesen Ergebnissen lässt sich schließen, dass die UPR eine entscheidende Rolle beim Abbau von mutiertem Srp-2 und der Verringerung der Aggregate hat. Dabei sind hauptsächlich die Gene verantwortlich, die durch Pek-1 reguliert werden und somit der i-UPR entsprechen. Dies zeigte sich deutlich bei der Auszählung der Aggregate. Hsf-1 ist Schlüsselprotein beim Abbau von Aggregaten. In einem *C. elegans*-Modell der amyotrophen Lateralsklerose zeigte eine Überexpression von Hsf-1 genau den gegenteiligen Effekt zu den Ergebnissen in dieser Arbeit. Die Überexpression führte dabei zu einer Verringerung der Aggregatmenge (Gidalevitz et al., 2009). Dies spricht zusammengenommen mit den Ergebnissen dieser Arbeit für eine Schlüsselrolle von Hsf-1. Ein nicht ganz einheitliches Bild ergab der Bodybend-Assay der Linien. In diesem Versuch zeigten die generierten Kreuzungslinien aus mutantern Srp-2::YFP und *hsf-1*-Deletion eine Verbesserung der Mobilität, während die Kreuzung mit der *pek-1*-Linie eine Verschlechterung zeigte. Möglicherweise sind die Aggregate bei den beiden Linien in unterschiedlichen Kompartimenten angeordnet. Bei Betrachtung der Linien fällt tatsächlich ein Unterschied in der Lokalisation der Aggregate auf. Diese sehen bei der *hsf-1*-Linie anders aus als in den anderen Linien. Eine interessante Verknüpfung zwischen Pek-1/PERK und Hsf-1 lässt sich bei Säugetieren herleiten. Beide Moleküle sind an der Regulation von NF- κ B beteiligt. In Zellkultur wurde gezeigt, dass eine Inaktivierung des humanen HSF-1-Proteins durch siRNA zu einer Erhöhung von NF- κ B führte (Chen and Currie, 2006). PERK hingegen kann die NF- κ B-Aktivierung durch eine starke Erhöhung von eIF2 α verursachen (Deng et al., 2004). Beide Moleküle spielen demnach eine Rolle in der Regulation von NF- κ B. NF- κ B ist ein Regulator für die unterschiedlichsten Prozesse in der Zelle, so auch die Stabilisierung des Genoms (Tian and Brasier, 2003). Für Serpinopathien wurde am Beispiel des α 1-Antitrypsin dem NF- κ B eine Rolle beim Abbau der Polymere zugeschrieben (Hidvegi et al., 2005; Lawless et al., 2004). Dabei bewirkt NF- κ B die in der Einleitung erwähnte *ER overload response*. Bei der *ER overload response* handelt es sich um eine Antwort auf ER-Stress, der durch fehlgefaltete Proteine ausgelöst wird. Durch Calcium und reaktive Sauerstoffspezies, die aus dem ER ausgeschleust werden, wird dann NF- κ B im Cytosol der Zellen aktiviert (Pahl and Baeuerle, 1995, 1996, 1997). Dieser Signalweg wird auch für *FENIB* diskutiert (Davies and Lomas, 2008). In dem Modell zeigte sich eine Entkopplung der NF- κ B-Aktivierung von PERK (Davies et al., 2009).

Eine nähere Untersuchung dieses kontroversen Signalweges, für den zum Teil auch die Ergebnisse in *C. elegans* sprechen, lässt sich auf diesen Grundlagen in *C. elegans* nicht genauer untersuchen, da NF- κ B in diesem Funktionsumfang nicht beschrieben wurde (Pujol et al., 2001).

Zusammenfassend konnte durch RNAi-Experimente und Deletionsmutanten eine Beteiligung von Hsf-1 und der i-UPR beim Abbau von fehlgefaltetem Srp-2 gezeigt werden.

6.3 Effekt von UPR-induzierenden Substanzen

In einer Studie in Mäusen mit mutierter Superoxiddismutase wurde gezeigt, dass die durch Arimoclolomol induzierte Aktivierung von Hitzeshockproteinen eine Verzögerung der Symptome zur Folge hatte (Kieran et al., 2004). Aufgrund der Lokalisierung von mutiertem Srp-2 im ER wurde die *Unfolded Protein Response* aktiviert, da diese Antwort im ER lokalisiert ist (Ron and Walter, 2007). Um zu testen welchen Effekt eine frühzeitige milde Induktion der UPR auf die Verringerung der Aggregate und somit der Gesamtproteinmenge hatte, wurde diese durch unterschiedliche Konzentrationen von DTT und Tunicamycin aktiviert. In dem verwendeten Versuchsaufbau haben weder DTT noch Tunicamycin einen Effekt auf die Srp-2::YFP-Menge. Dies ist in den Gelbildern in Abbildung 5.12 deutlich zu erkennen. Somit hatte eine frühe milde Aktivierung der UPR keinen Effekt auf den Abbau von Srp-2-Aggregaten.

6.4 Ausblick

Das generierte Modell für Srp-2-Aggregation ist das erste das Aggregation eines endogenen Proteins in *C. elegans* beschreibt. Es zeigten sich charakteristische Merkmale bisheriger Aggregationsmodelle beim Menschen. Das generierte *C. elegans*-Modell eignet sich für Untersuchungen, bei denen Substanzen auf ihre Wirksamkeit in der Aggregatreduktion getestet werden (Kaletta and Hengartner, 2006). Ein weiterer möglicher Screen beruht auf der Durchführung einer EMS-Mutagenese, bei der einzelne Gene mutiert werden (Jorgensen and Mango, 2002). So lassen sich ebenfalls neue Signalwege in *C. elegans* charakterisieren, wie dies beispielsweise bei Alterungsprozessen der Fall war (Hsu et al., 2003). Es zeigte sich in der vorliegenden Arbeit aber auch, dass das Modell seine Grenzen hat. In RNAi-Screens kommen häufig falsch-positive oder falsch-negative Kandidaten heraus (Simmer et al., 2003; Sonnichsen et al., 2005).

Aus diesem Grund müssen Ergebnisse aus RNAi-Experimenten durch Deletionsmutanten überprüft werden. Zur weiteren Untersuchung der gefundenen Signalwege, insbesondere um einen möglichen Einfluss von Calcium zu überprüfen, sollten die gefundenen Ergebnisse auf ein Zellkulturmodell, bei dem beispielsweise Neuroserpin mit Fluoreszenzproteinen gekoppelt ist, übertragen werden.

7 Literatur- und Quellenverzeichnis

Akerfelt, M., Trouillet, D., Mezger, V., and Sistonen, L. (2007). Heat shock factors at a crossroad between stress and development. *Ann N Y Acad Sci* *1113*, 15-27.

Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., and Lipman, D.J. (1990). Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* *215*, 403-410.

Anfinsen, C.B. (1973). Principles that govern the folding of protein chains. *Science* *181*, 223-230.

Ausubel, F.M., R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. D. Seidman, J. A. Smith und K. Struhl (1996). *Current protocols in molecular biology* New York, J Wiley & Sons.

Axelrod, D., Koppel, D.E., Schlessinger, J., Elson, E., and Webb, W.W. (1976). Mobility measurement by analysis of fluorescence photobleaching recovery kinetics. *Biophys J* *16*, 1055-1069.

Back, S.H., Schroder, M., Lee, K., Zhang, K., and Kaufman, R.J. (2005). ER stress signaling by regulated splicing: IRE1/HAC1/XBP1. *Methods* *35*, 395-416.

Baranes, D., Lederfein, D., Huang, Y.Y., Chen, M., Bailey, C.H., and Kandel, E.R. (1998). Tissue plasminogen activator contributes to the late phase of LTP and to synaptic growth in the hippocampal mossy fiber pathway. *Neuron* *21*, 813-825.

Bargmann, C.I., and Horvitz, H.R. (1991). Chemosensory neurons with overlapping functions direct chemotaxis to multiple chemicals in *C. elegans*. *Neuron* *7*, 729-742.

Barnes, G., Hansen, W.J., Holcomb, C.L., and Rine, J. (1984). Asparagine-linked glycosylation in *Saccharomyces cerevisiae*: genetic analysis of an early step. *Molecular and cellular biology* *4*, 2381-2388.

Belorgey, D., Irving, J.A., Ekeowa, U.I., Freeke, J., Roussel, B.D., Miranda, E., Perez, J., Marciniak, S.J., Crowther, D.C., Michel, C.H., *et al.* (2010). Characterisation of serpin polymers in vitro and in vivo. *Methods*.

Berger, P., Kozlov, S.V., Cinelli, P., Kruger, S.R., Vogt, L., and Sonderegger, P. (1999). Neuronal depolarization enhances the transcription of the neuronal serine protease inhibitor neuroserpin. *Molecular and cellular neurosciences* *14*, 455-467.

Birnboim, H.C., and Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic acids research* *7*, 1513-1523.

Bonifacino, J.S., and Weissman, A.M. (1998). Ubiquitin and the control of protein fate in the secretory and endocytic pathways. *Annual review of cell and developmental biology* *14*, 19-57.

Bradshaw, C.B., Davis, R.L., Shrimpton, A.E., Holohan, P.D., Rea, C.B., Fieglin, D., Kent, P., and Collins, G.H. (2001). Cognitive deficits associated with a recently reported familial neurodegenerative disease: familial encephalopathy with neuroserpin inclusion bodies. *Arch Neurol* *58*, 1429-1434.

Brandt, R., Gergou, A., Wacker, I., Fath, T., and Hutter, H. (2009). A *Caenorhabditis elegans* model of tau hyperphosphorylation: induction of developmental defects by transgenic overexpression of Alzheimer's disease-like modified tau. *Neurobiol Aging* 30, 22-33.

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

Brignull, H.R., Moore, F.E., Tang, S.J., and Morimoto, R.I. (2006). Polyglutamine proteins at the pathogenic threshold display neuron-specific aggregation in a pan-neuronal *Caenorhabditis elegans* model. *J Neurosci* 26, 7597-7606.

Bugge, T.H., Xiao, Q., Kombrinck, K.W., Flick, M.J., Holmback, K., Danton, M.J., Colbert, M.C., Witte, D.P., Fujikawa, K., Davie, E.W., *et al.* (1996). Fatal embryonic bleeding events in mice lacking tissue factor, the cell-associated initiator of blood coagulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 6258-6263.

Bukau, B., and Horwich, A.L. (1998). The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. *Cell* 92, 351-366.

Cabrita, L.D., and Bottomley, S.P. (2004). How do proteins avoid becoming too stable? Biophysical studies into metastable proteins. *Eur Biophys J* 33, 83-88.

Chakrapani, B.P., Kumar, S., and Subramaniam, J.R. (2008). Development and evaluation of an *in vivo* assay in *Caenorhabditis elegans* for screening of compounds for their effect on cytochrome P450 expression. *J Biosci* 33, 269-277.

Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W.W., and Prasher, D.C. (1994). Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* 263, 802-805.

Chen, S., Ferrone, F.A., and Wetzel, R. (2002). Huntington's disease age-of-onset linked to polyglutamine aggregation nucleation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 11884-11889.

Chen, Y., and Currie, R.W. (2006). Small interfering RNA knocks down heat shock factor-1 (HSF-1) and exacerbates pro-inflammatory activation of NF-kappaB and AP-1 in vascular smooth muscle cells. *Cardiovasc Res* 69, 66-75.

Cinelli, P., Madani, R., Tsuzuki, N., Vallet, P., Arras, M., Zhao, C.N., Osterwalder, T., Rulicke, T., and Sonderegger, P. (2001). Neuroserpin, a neuroprotective factor in focal ischemic stroke. *Molecular and cellular neurosciences* 18, 443-457.

Cooper, A.A., Gitler, A.D., Cashikar, A., Haynes, C.M., Hill, K.J., Bhullar, B., Liu, K., Xu, K., Strathearn, K.E., Liu, F., *et al.* (2006). Alpha-synuclein blocks ER-Golgi traffic and Rab1 rescues neuron loss in Parkinson's models. *Science* 313, 324-328.

Corsi, A.K., and Schekman, R. (1996). Mechanism of polypeptide translocation into the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 271, 30299-30302.

Davies, M.J., and Lomas, D.A. (2008). The molecular aetiology of the serpinopathies. *The international journal of biochemistry & cell biology*.

- Davies, M.J., Miranda, E., Roussel, B.D., Kaufman, R.J., Marciniak, S.J., and Lomas, D.A. (2009). Neuroserpin polymers activate NF-kappaB by a calcium signalling pathway that is independent of the unfolded protein response. *J Biol Chem*.
- Davis, R.L., Holohan, P.D., Shrimpton, A.E., Tatum, A.H., Daucher, J., Collins, G.H., Todd, R., Bradshaw, C., Kent, P., Feiglin, D., *et al.* (1999a). Familial encephalopathy with neuroserpin inclusion bodies. *Am J Pathol* *155*, 1901-1913.
- Davis, R.L., Shrimpton, A.E., Carrell, R.W., Lomas, D.A., Gerhard, L., Baumann, B., Lawrence, D.A., Yepes, M., Kim, T.S., Ghetti, B., *et al.* (2002). Association between conformational mutations in neuroserpin and onset and severity of dementia. *Lancet* *359*, 2242-2247.
- Davis, R.L., Shrimpton, A.E., Holohan, P.D., Bradshaw, C., Feiglin, D., Collins, G.H., Sonderegger, P., Kinter, J., Becker, L.M., Lacbawan, F., *et al.* (1999b). Familial dementia caused by polymerization of mutant neuroserpin. *Nature* *401*, 376-379.
- Deng, J., Lu, P.D., Zhang, Y., Scheuner, D., Kaufman, R.J., Sonenberg, N., Harding, H.P., and Ron, D. (2004). Translational repression mediates activation of nuclear factor kappa B by phosphorylated translation initiation factor 2. *Molecular and cellular biology* *24*, 10161-10168.
- Didier, C., Broday, L., Bhoumik, A., Israeli, S., Takahashi, S., Nakayama, K., Thomas, S.M., Turner, C.E., Henderson, S., Sabe, H., *et al.* (2003). RNF5, a RING finger protein that regulates cell motility by targeting paxillin ubiquitination and altered localization. *Molecular and cellular biology* *23*, 5331-5345.
- Dobson, C.M. (2003). Protein folding and misfolding. *Nature* *426*, 884-890.
- Dougherty, E.C. (1953). Problems of nomenclature for the growth of organisms of one species with and without associated organisms of other species. *Parasitology* *42*, 259-261.
- Douglas, P.M., and Dillin, A. (2010). Protein homeostasis and aging in neurodegeneration. *The Journal of cell biology* *190*, 719-729.
- Ebashi, S., Endo, M., and Otsuki, I. (1969). Control of muscle contraction. *Q Rev Biophys* *2*, 351-384.
- Farrer, T., Roller, A.B., Kent, W.J., and Zahler, A.M. (2002). Analysis of the role of *Caenorhabditis elegans* GC-AG introns in regulated splicing. *Nucleic acids research* *30*, 3360-3367.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E., and Mello, C.C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* *391*, 806-811.
- Frand, A.R., and Kaiser, C.A. (1998). The ERO1 gene of yeast is required for oxidation of protein dithiols in the endoplasmic reticulum. *Molecular cell* *1*, 161-170.

Friedlander, R., Jarosch, E., Urban, J., Volkwein, C., and Sommer, T. (2000). A regulatory link between ER-associated protein degradation and the unfolded-protein response. *Nature cell biology* 2, 379-384.

Garcia, S.M., Casanueva, M.O., Silva, M.C., Amaral, M.D., and Morimoto, R.I. (2007). Neuronal signaling modulates protein homeostasis in *Caenorhabditis elegans* post-synaptic muscle cells. *Genes & development* 21, 3006-3016.

Garigan, D., Hsu, A.L., Fraser, A.G., Kamath, R.S., Ahringer, J., and Kenyon, C. (2002). Genetic analysis of tissue aging in *Caenorhabditis elegans*: a role for heat-shock factor and bacterial proliferation. *Genetics* 161, 1101-1112.

Gidalevitz, T., Krupinski, T., Garcia, S., and Morimoto, R.I. (2009). Destabilizing protein polymorphisms in the genetic background direct phenotypic expression of mutant SOD1 toxicity. *PLoS genetics* 5, e1000399.

Granell, S., Baldini, G., Mohammad, S., Nicolin, V., Narducci, P., Storrie, B., and Baldini, G. (2008). Sequestration of mutated alpha1-antitrypsin into inclusion bodies is a cell-protective mechanism to maintain endoplasmic reticulum function. *Molecular biology of the cell* 19, 572-586.

Hadwiger, G., Dour, S., Arur, S., Fox, P., and Nonet, M.L. (2010). A monoclonal antibody toolkit for *C. elegans*. *PLoS ONE* 5, e10161.

Hartl, F.U. (1996). Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature* 381, 571-579.

Hastings, G.A., Coleman, T.A., Haudenschild, C.C., Stefansson, S., Smith, E.P., Barthlow, R., Cherry, S., Sandkvist, M., and Lawrence, D.A. (1997). Neuroserpin, a brain-associated inhibitor of tissue plasminogen activator is localized primarily in neurons. Implications for the regulation of motor learning and neuronal survival. *J Biol Chem* 272, 33062-33067.

Heschl, M.F., and Baillie, D.L. (1990). The HSP70 multigene family of *Caenorhabditis elegans*. *Comp Biochem Physiol B* 96, 633-637.

Hidvegi, T., Ewing, M., Hale, P., Dippold, C., Beckett, C., Kemp, C., Maurice, N., Mukherjee, A., Goldbach, C., Watkins, S., *et al.* (2010). An autophagy-enhancing drug promotes degradation of mutant alpha1-antitrypsin Z and reduces hepatic fibrosis. *Science* 329, 229-232.

Hidvegi, T., Schmidt, B.Z., Hale, P., and Perlmutter, D.H. (2005). Accumulation of mutant alpha1-antitrypsin Z in the endoplasmic reticulum activates caspases-4 and -12, NFkappaB, and BAP31 but not the unfolded protein response. *J Biol Chem* 280, 39002-39015.

Hilliard, M.A., Bargmann, C.I., and Bazzicalupo, P. (2002). *C. elegans* responds to chemical repellents by integrating sensory inputs from the head and the tail. *Curr Biol* 12, 730-734.

Horvitz, H.R., Brenner, S., Hodgkin, J., and Herman, R.K. (1979). A uniform genetic nomenclature for the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Mol Gen Genet* 175, 129-133.

- Howard, R.A., Sharma, P., Hajjar, C., Caldwell, K.A., Caldwell, G.A., du Breuil, R., Moore, R., and Boyd, L. (2007). Ubiquitin conjugating enzymes participate in polyglutamine protein aggregation. *BMC Cell Biol* 8, 32.
- Hsu, A.L., Murphy, C.T., and Kenyon, C. (2003). Regulation of aging and age-related disease by DAF-16 and heat-shock factor. *Science* 300, 1142-1145.
- Huang, Y.Y., Bach, M.E., Lipp, H.P., Zhuo, M., Wolfer, D.P., Hawkins, R.D., Schoonjans, L., Kandel, E.R., Godfraind, J.M., Mulligan, R., *et al.* (1996). Mice lacking the gene encoding tissue-type plasminogen activator show a selective interference with late-phase long-term potentiation in both Schaffer collateral and mossy fiber pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 8699-8704.
- Hunt, L.T., and Dayhoff, M.O. (1980). A surprising new protein superfamily containing ovalbumin, antithrombin-III, and alpha 1-proteinase inhibitor. *Biochem Biophys Res Commun* 95, 864-871.
- Huntington, J.A., Read, R.J., and Carrell, R.W. (2000). Structure of a serpin-protease complex shows inhibition by deformation. *Nature* 407, 923-926.
- Irving, J.A., Pike, R.N., Lesk, A.M., and Whisstock, J.C. (2000). Phylogeny of the serpin superfamily: implications of patterns of amino acid conservation for structure and function. *Genome research* 10, 1845-1864.
- Irving, J.A., Steenbakkens, P.J., Lesk, A.M., Op den Camp, H.J., Pike, R.N., and Whisstock, J.C. (2002). Serpins in prokaryotes. *Mol Biol Evol* 19, 1881-1890.
- Isasa, M., Katz, E.J., Kim, W., Yugo, V., Gonzalez, S., Kirkpatrick, D.S., Thomson, T.M., Finley, D., Gygi, S.P., and Crosas, B. (2010). Monoubiquitination of RPN10 regulates substrate recruitment to the proteasome. *Molecular cell* 38, 733-745.
- Jarrett, J.T., and Lansbury, P.T., Jr. (1993). Seeding "one-dimensional crystallization" of amyloid: a pathogenic mechanism in Alzheimer's disease and scrapie? *Cell* 73, 1055-1058.
- Jia, K., Hart, A.C., and Levine, B. (2007). Autophagy genes protect against disease caused by polyglutamine expansion proteins in *Caenorhabditis elegans*. *Autophagy* 3, 21-25.
- Jones, D., Crowe, E., Stevens, T.A., and Candido, E.P. (2002). Functional and phylogenetic analysis of the ubiquitylation system in *Caenorhabditis elegans*: ubiquitin-conjugating enzymes, ubiquitin-activating enzymes, and ubiquitin-like proteins. *Genome biology* 3, RESEARCH0002.
- Jorgensen, E.M., and Mango, S.E. (2002). The art and design of genetic screens: *caenorhabditis elegans*. *Nat Rev Genet* 3, 356-369.
- Kaletta, T., and Hengartner, M.O. (2006). Finding function in novel targets: *C. elegans* as a model organism. *Nature reviews* 5, 387-398.

Kamath, R.S., Fraser, A.G., Dong, Y., Poulin, G., Durbin, R., Gotta, M., Kanapin, A., Le Bot, N., Moreno, S., Sohrmann, M., *et al.* (2003). Systematic functional analysis of the *Caenorhabditis elegans* genome using RNAi. *Nature* *421*, 231-237.

Kamath, R.S., Martinez-Campos, M., Zipperlen, P., Fraser, A.G., and Ahringer, J. (2001). Effectiveness of specific RNA-mediated interference through ingested double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Genome biology* *2*, RESEARCH0002.

Kieran, D., Kalmar, B., Dick, J.R., Riddoch-Contreras, J., Burnstock, G., and Greensmith, L. (2004). Treatment with arimoclomol, a coinducer of heat shock proteins, delays disease progression in ALS mice. *Nat Med* *10*, 402-405.

Kikis, E.A., Gidalevitz, T., and Morimoto, R.I. (2010). Protein homeostasis in models of aging and age-related conformational disease. *Advances in experimental medicine and biology* *694*, 138-159.

Kostova, Z., and Wolf, D.H. (2003). For whom the bell tolls: protein quality control of the endoplasmic reticulum and the ubiquitin-proteasome connection. *The EMBO journal* *22*, 2309-2317.

Kroeger, H., Miranda, E., Macleod, I., Perez, J., Crowther, D.C., Marciniak, S.J., and Lomas, D.A. (2009). ERAD and autophagy cooperate to degrade polymerogenic mutant serpins. *J Biol Chem*.

Krueger, S.R., Ghisu, G.P., Cinelli, P., Gschwend, T.P., Osterwalder, T., Wolfer, D.P., and Sonderegger, P. (1997). Expression of neuroserpin, an inhibitor of tissue plasminogen activator, in the developing and adult nervous system of the mouse. *J Neurosci* *17*, 8984-8996.

LaFerla, F.M. (2002). Calcium dyshomeostasis and intracellular signalling in Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci* *3*, 862-872.

Law, R.H., Zhang, Q., McGowan, S., Buckle, A.M., Silverman, G.A., Wong, W., Rosado, C.J., Langendorf, C.G., Pike, R.N., Bird, P.I., *et al.* (2006). An overview of the serpin superfamily. *Genome biology* *7*, 216.

Lawless, M.W., Greene, C.M., Mulgrew, A., Taggart, C.C., O'Neill, S.J., and McElvaney, N.G. (2004). Activation of endoplasmic reticulum-specific stress responses associated with the conformational disease Z alpha 1-antitrypsin deficiency. *J Immunol* *172*, 5722-5726.

Lehle, L., and Tanner, W. (1976). The specific site of tunicamycin inhibition in the formation of dolichol-bound N-acetylglucosamine derivatives. *FEBS Lett* *72*, 167-170.

Levy, N.J., Ramesh, N., Cicardi, M., Harrison, R.A., and Davis, A.E., 3rd (1990). Type II hereditary angioneurotic edema that may result from a single nucleotide change in the codon for alanine-436 in the C1 inhibitor gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* *87*, 265-268.

Lewis, J.A., and Hodgkin, J.A. (1977). Specific neuroanatomical changes in chemosensory mutants of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *J Comp Neurol* *172*, 489-510.

- Li, J., Lee, B., and Lee, A.S. (2006). Endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis: multiple pathways and activation of p53-up-regulated modulator of apoptosis (PUMA) and NOXA by p53. *J Biol Chem* 281, 7260-7270.
- Lin, L., Schmidt, B., Teckman, J., and Perlmutter, D.H. (2001). A naturally occurring nonpolymerogenic mutant of alpha 1-antitrypsin characterized by prolonged retention in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 276, 33893-33898.
- Link, C.D. (1995). Expression of human beta-amyloid peptide in transgenic *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 9368-9372.
- Lomas, D.A., and Carrell, R.W. (2002). Serpinopathies and the conformational dementias. *Nat Rev Genet* 3, 759-768.
- Luke, C.J., Pak, S.C., Askew, D.J., Askew, Y.S., Smith, J.E., and Silverman, G.A. (2006). Selective conservation of the RSL-encoding, proteinase inhibitory-type, clade L serpins in *Caenorhabditis* species. *Front Biosci* 11, 581-594.
- Luke, C.J., Pak, S.C., Askew, Y.S., Naviglia, T.L., Askew, D.J., Nobar, S.M., Vetica, A.C., Long, O.S., Watkins, S.C., Stolz, D.B., *et al.* (2007). An intracellular serpin regulates necrosis by inhibiting the induction and sequelae of lysosomal injury. *Cell* 130, 1108-1119.
- Makarova, A., Mikhailenko, I., Bugge, T.H., List, K., Lawrence, D.A., and Strickland, D.K. (2003). The low density lipoprotein receptor-related protein modulates protease activity in the brain by mediating the cellular internalization of both neuroserpin and neuroserpin-tissue-type plasminogen activator complexes. *J Biol Chem* 278, 50250-50258.
- Mangone, M., Manoharan, A.P., Thierry-Mieg, D., Thierry-Mieg, J., Han, T., Mackowiak, S., Mis, E., Zegar, C., Gutwein, M.R., Khivansara, V., *et al.* (2010). The Landscape of *C. elegans* 3'UTRs. *Science*.
- Maupas, É. (1900). Modes et formes de reproduction des nematodes. *Archives de Zoologie Experimentale et Generale* 8: 463-624.
- Melendez, A., Tallozy, Z., Seaman, M., Eskelinen, E.L., Hall, D.H., and Levine, B. (2003). Autophagy genes are essential for dauer development and life-span extension in *C. elegans*. *Science* 301, 1387-1391.
- Merritt, C., Rasoloson, D., Ko, D., and Seydoux, G. (2008). 3' UTRs are the primary regulators of gene expression in the *C. elegans* germline. *Curr Biol* 18, 1476-1482.
- Miranda, E., McLeod, I., Davies, M.J., Perez, J., Romisch, K., Crowther, D.C., and Lomas, D.A. (2008). The intracellular accumulation of polymeric neuroserpin explains the severity of the dementia FENIB. *Hum Mol Genet*.
- Miranda, E., Romisch, K., and Lomas, D.A. (2004). Mutants of neuroserpin that cause dementia accumulate as polymers within the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 279, 28283-28291.

- Morley, J.F., Brignull, H.R., Weyers, J.J., and Morimoto, R.I. (2002). The threshold for polyglutamine-expansion protein aggregation and cellular toxicity is dynamic and influenced by aging in *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* *99*, 10417-10422.
- Morley, J.F., and Morimoto, R.I. (2004). Regulation of longevity in *Caenorhabditis elegans* by heat shock factor and molecular chaperones. *Molecular biology of the cell* *15*, 657-664.
- Mouysset, J., Kahler, C., and Hoppe, T. (2006). A conserved role of *Caenorhabditis elegans* CDC-48 in ER-associated protein degradation. *J Struct Biol*.
- Myers, C.D., Goh, P.Y., Allen, T.S., Bucher, E.A., and Bogaert, T. (1996). Developmental genetic analysis of troponin T mutations in striated and nonstriated muscle cells of *Caenorhabditis elegans*. *The Journal of cell biology* *132*, 1061-1077.
- Nishi, T., and Forgac, M. (2002). The vacuolar (H⁺)-ATPases--nature's most versatile proton pumps. *Nat Rev Mol Cell Biol* *3*, 94-103.
- Noda, T., and Farquhar, M.G. (1992). A non-autophagic pathway for diversion of ER secretory proteins to lysosomes. *The Journal of cell biology* *119*, 85-97.
- Nollen, E.A., Garcia, S.M., van Haften, G., Kim, S., Chavez, A., Morimoto, R.I., and Plasterk, R.H. (2004). Genome-wide RNA interference screen identifies previously undescribed regulators of polyglutamine aggregation. *Proc Natl Acad Sci U S A* *101*, 6403-6408.
- Nover, L., Bharti, K., Doring, P., Mishra, S.K., Ganguli, A., and Scharf, K.D. (2001). Arabidopsis and the heat stress transcription factor world: how many heat stress transcription factors do we need? *Cell Stress Chaperones* *6*, 177-189.
- Oeda, T., Shimohama, S., Kitagawa, N., Kohno, R., Imura, T., Shibasaki, H., and Ishii, N. (2001). Oxidative stress causes abnormal accumulation of familial amyotrophic lateral sclerosis-related mutant SOD1 in transgenic *Caenorhabditis elegans*. *Hum Mol Genet* *10*, 2013-2023.
- Osche, G. (1952). Systematik und Phylogenie der Gattung *Rhabditis* (Nematoda), *Zool. Jb. Syst.* *81*:190-280.
- Osterwalder, T., Contartese, J., Stoeckli, E.T., Kuhn, T.B., and Sonderegger, P. (1996). Neuroserpin, an axonally secreted serine protease inhibitor. *The EMBO journal* *15*, 2944-2953.
- Pahl, H.L., and Baeuerle, P.A. (1995). A novel signal transduction pathway from the endoplasmic reticulum to the nucleus is mediated by transcription factor NF-kappa B. *The EMBO journal* *14*, 2580-2588.
- Pahl, H.L., and Baeuerle, P.A. (1996). Activation of NF-kappa B by ER stress requires both Ca²⁺ and reactive oxygen intermediates as messengers. *FEBS Lett* *392*, 129-136.
- Pahl, H.L., and Baeuerle, P.A. (1997). The ER-overload response: activation of NF-kappa B. *Trends in biochemical sciences* *22*, 63-67.

- Pak, S.C., Kumar, V., Tsu, C., Luke, C.J., Askew, Y.S., Askew, D.J., Mills, D.R., Bromme, D., and Silverman, G.A. (2004). SRP-2 is a cross-class inhibitor that participates in postembryonic development of the nematode *Caenorhabditis elegans*: initial characterization of the clade L serpins. *J Biol Chem* *279*, 15448-15459.
- Pak, S.C., Tsu, C., Luke, C.J., Askew, Y.S., and Silverman, G.A. (2006). The *Caenorhabditis elegans* muscle specific serpin, SRP-3, neutralizes chymotrypsin-like serine peptidases. *Biochemistry* *45*, 4474-4480.
- Perry, D.J., and Carrell, R.W. (1989). CpG dinucleotides are "hotspots" for mutation in the antithrombin III gene. Twelve variants identified using the polymerase chain reaction. *Mol Biol Med* *6*, 239-243.
- Plempner, R.K., and Wolf, D.H. (1999). Retrograde protein translocation: ERADication of secretory proteins in health and disease. *Trends in biochemical sciences* *24*, 266-270.
- Praitis, V., Casey, E., Collar, D., and Austin, J. (2001). Creation of low-copy integrated transgenic lines in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* *157*, 1217-1226.
- Pujol, N., Link, E.M., Liu, L.X., Kurz, C.L., Alloing, G., Tan, M.W., Ray, K.P., Solari, R., Johnson, C.D., and Ewbank, J.J. (2001). A reverse genetic analysis of components of the Toll signaling pathway in *Caenorhabditis elegans*. *Curr Biol* *11*, 809-821.
- Qian, Z., Gilbert, M.E., Colicos, M.A., Kandel, E.R., and Kuhl, D. (1993). Tissue-plasminogen activator is induced as an immediate-early gene during seizure, kindling and long-term potentiation. *Nature* *361*, 453-457.
- Ron, D., and Walter, P. (2007). Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol* *8*, 519-529.
- Rual, J.F., Ceron, J., Koreth, J., Hao, T., Nicot, A.S., Hirozane-Kishikawa, T., Vandenhaute, J., Orkin, S.H., Hill, D.E., van den Heuvel, S., *et al.* (2004). Toward improving *Caenorhabditis elegans* phenome mapping with an ORFeome-based RNAi library. *Genome research* *14*, 2162-2168.
- Rubinsztein, D.C. (2006). The roles of intracellular protein-degradation pathways in neurodegeneration. *Nature* *443*, 780-786.
- Rutkowski, D.T., and Kaufman, R.J. (2004). A trip to the ER: coping with stress. *Trends Cell Biol* *14*, 20-28.
- Ryu, S.E., Choi, H.J., Kwon, K.S., Lee, K.N., and Yu, M.H. (1996). The native strains in the hydrophobic core and flexible reactive loop of a serine protease inhibitor: crystal structure of an uncleaved alpha1-antitrypsin at 2.7 Å. *Structure* *4*, 1181-1192.
- Salminen, A., Ojala, J., and Kaarniranta, K. (2011). Apoptosis and aging: increased resistance to apoptosis enhances the aging process. *Cell Mol Life Sci* *68*, 1021-1031.
- Sambrook, J.a.R., D. W. (2000). *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbour Press.

Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74, 5463-5467.

Schmidt, B.Z., and Perlmutter, D.H. (2005). Grp78, Grp94, and Grp170 interact with alpha1-antitrypsin mutants that are retained in the endoplasmic reticulum. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 289, G444-455.

Schwartz, A.L., and Ciechanover, A. (2009). Targeting proteins for destruction by the ubiquitin system: implications for human pathobiology. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 49, 73-96.

Seeds, N.W., Basham, M.E., and Ferguson, J.E. (2003). Absence of tissue plasminogen activator gene or activity impairs mouse cerebellar motor learning. *J Neurosci* 23, 7368-7375.

Seeds, N.W., Williams, B.L., and Bickford, P.C. (1995). Tissue plasminogen activator induction in Purkinje neurons after cerebellar motor learning. *Science* 270, 1992-1994.

Shen, X., Ellis, R.E., Sakaki, K., and Kaufman, R.J. (2005). Genetic interactions due to constitutive and inducible gene regulation mediated by the unfolded protein response in *C. elegans*. *PLoS genetics* 1, e37.

Shiraishi, H., Okamoto, H., Yoshimura, A., and Yoshida, H. (2006). ER stress-induced apoptosis and caspase-12 activation occurs downstream of mitochondrial apoptosis involving Apaf-1. *Journal of cell science* 119, 3958-3966.

Silverman, G.A., Bird, P.I., Carrell, R.W., Church, F.C., Coughlin, P.B., Gettins, P.G., Irving, J.A., Lomas, D.A., Luke, C.J., Moyer, R.W., *et al.* (2001). The serpins are an expanding superfamily of structurally similar but functionally diverse proteins. Evolution, mechanism of inhibition, novel functions, and a revised nomenclature. *J Biol Chem* 276, 33293-33296.

Silverman, G.A., Whisstock, J.C., Askew, D.J., Pak, S.C., Luke, C.J., Cataltepe, S., Irving, J.A., and Bird, P.I. (2004). Human clade B serpins (ov-serpins) belong to a cohort of evolutionarily dispersed intracellular proteinase inhibitor clades that protect cells from promiscuous proteolysis. *Cell Mol Life Sci* 61, 301-325.

Silverman, G.A., Whisstock, J.C., Bottomley, S.P., Huntington, J.A., Kaiserman, D., Luke, C.J., Pak, S.C., Reichhart, J.M., and Bird, P.I. (2010). Serpins flex their muscle: I. Putting the clamps on proteolysis in diverse biological systems. *J Biol Chem* 285, 24299-24305.

Simmer, F., Moorman, C., van der Linden, A.M., Kuijk, E., van den Berghe, P.V., Kamath, R.S., Fraser, A.G., Ahringer, J., and Plasterk, R.H. (2003). Genome-wide RNAi of *C. elegans* using the hypersensitive rrf-3 strain reveals novel gene functions. *PLoS Biol* 1, E12.

Sonnichsen, B., Koski, L.B., Walsh, A., Marschall, P., Neumann, B., Brehm, M., Alleaume, A.M., Artelt, J., Bettencourt, P., Cassin, E., *et al.* (2005). Full-genome RNAi profiling of early embryogenesis in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 434, 462-469.

Springer, W. (2005). *Caenorhabditis elegans* as an Experimental Model Organism to Study Parkinson's Disease-Related Genes. Dissertation.

Steenbakkers, P.J., Irving, J.A., Harhangi, H.R., Swinkels, W.J., Akhmanova, A., Dijkerman, R., Jetten, M.S., van der Drift, C., Whisstock, J.C., and Op den Camp, H.J. (2008). A serpin in the cellulosome of the anaerobic fungus *Piromyces* sp. strain E2. *Mycol Res* *112*, 999-1006.

Stiernagle, T. (2006). Maintenance of *C. elegans*. *WormBook*, 1-11.

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

Sulston, J.E.a.H., J. (1988). Methods. . In *The nematode Caenorhabditis elegans* WB Wood, editor Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY 587-606.

Sun, J., Bird, C.H., Sutton, V., McDonald, L., Coughlin, P.B., De Jong, T.A., Trapani, J.A., and Bird, P.I. (1996). A cytosolic granzyme B inhibitor related to the viral apoptotic regulator cytokine response modifier A is present in cytotoxic lymphocytes. *J Biol Chem* *271*, 27802-27809.

Syntichaki, P., Samara, C., and Tavernarakis, N. (2005). The vacuolar H⁺ -ATPase mediates intracellular acidification required for neurodegeneration in *C. elegans*. *Curr Biol* *15*, 1249-1254.

Takatsuki, A., and Tamura, G. (1971). Effect of tunicamycin on the synthesis of macromolecules in cultures of chick embryo fibroblasts infected with Newcastle disease virus. *J Antibiot (Tokyo)* *24*, 785-794.

Takehara, S., Onda, M., Zhang, J., Nishiyama, M., Yang, X., Mikami, B., and Lomas, D.A. (2009). The 2.1-Å crystal structure of native neuroserpin reveals unique structural elements that contribute to conformational instability. *J Mol Biol* *388*, 11-20.

Tavaria, M., Gabriele, T., Kola, I., and Anderson, R.L. (1996). A hitchhiker's guide to the human Hsp70 family. *Cell Stress Chaperones* *1*, 23-28.

Tew, D.J., and Bottomley, S.P. (2001). Intrinsic fluorescence changes and rapid kinetics of proteinase deformation during serpin inhibition. *FEBS Lett* *494*, 30-33.

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

Tian, B., and Brasier, A.R. (2003). Identification of a nuclear factor kappa B-dependent gene network. *Recent Prog Horm Res* *58*, 95-130.

Timmons, L., Court, D.L., and Fire, A. (2001). Ingestion of bacterially expressed dsRNAs can produce specific and potent genetic interference in *Caenorhabditis elegans*. *Gene* *263*, 103-112.

Travers, K.J., Patil, C.K., Wodicka, L., Lockhart, D.J., Weissman, J.S., and Walter, P. (2000). Functional and genomic analyses reveal an essential coordination between the unfolded protein response and ER-associated degradation. *Cell* *101*, 249-258.

Tsirka, S.E., Gualandris, A., Amaral, D.G., and Strickland, S. (1995). Excitotoxin-induced neuronal degeneration and seizure are mediated by tissue plasminogen activator. *Nature* 377, 340-344.

Tu, B.P., and Weissman, J.S. (2004). Oxidative protein folding in eukaryotes: mechanisms and consequences. *The Journal of cell biology* 164, 341-346.

Tu, Z., Wang, L., Xu, M., Zhou, X., Chen, T., and Sun, F. (2006). Further understanding human disease genes by comparing with housekeeping genes and other genes. *BMC genomics* 7, 31.

Urano, F., Calfon, M., Yoneda, T., Yun, C., Kiraly, M., Clark, S.G., and Ron, D. (2002). A survival pathway for *Caenorhabditis elegans* with a blocked unfolded protein response. *The Journal of cell biology* 158, 639-646.

van Ham, T.J., Holmberg, M.A., van der Goot, A.T., Teuling, E., Garcia-Arencibia, M., Kim, H.E., Du, D., Thijssen, K.L., Wiersma, M., Burggraaff, R., *et al.* (2010). Identification of MOAG-4/SERF as a regulator of age-related proteotoxicity. *Cell* 142, 601-612.

van Ham, T.J., Thijssen, K.L., Breitling, R., Hofstra, R.M., Plasterk, R.H., and Nollen, E.A. (2008). *C. elegans* model identifies genetic modifiers of alpha-synuclein inclusion formation during aging. *PLoS genetics* 4, e1000027.

Ward, S., Thomson, N., White, J.G., and Brenner, S. (1975). Electron microscopical reconstruction of the anterior sensory anatomy of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *J Comp Neurol* 160, 313-337.

Waterhouse, N.J., Sedelies, K.A., Browne, K.A., Wowk, M.E., Newbold, A., Sutton, V.R., Clarke, C.J., Oliaro, J., Lindemann, R.K., Bird, P.I., *et al.* (2005). A central role for Bid in granzyme B-induced apoptosis. *J Biol Chem* 280, 4476-4482.

Whisstock, J.C., Irving, J.A., Bottomley, S.P., Pike, R.N., and Lesk, A.M. (1999). Serpins in the *Caenorhabditis elegans* genome. *Proteins* 36, 31-41.

Whisstock, J.C., Silverman, G.A., Bird, P.I., Bottomley, S.P., Kaiserman, D., Luke, C.J., Pak, S.C., Reichhart, J.M., and Huntington, J.A. (2010). Serpins flex their muscle: II. Structural insights into target peptidase recognition, polymerization, and transport functions. *J Biol Chem* 285, 24307-24312.

Wood, W.B. (1988). Introduction to *C. elegans* Biology. In *The nematode Caenorhabditis elegans*. W.B. Wood, editor. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY. 1-16.

Wu, C. (1995). Heat shock transcription factors: structure and regulation. *Annual review of cell and developmental biology* 11, 441-469.

Wu, J., and Kaufman, R.J. (2006). From acute ER stress to physiological roles of the Unfolded Protein Response. *Cell death and differentiation* 13, 374-384.

Wu, J., Rutkowski, D.T., Dubois, M., Swathirajan, J., Saunders, T., Wang, J., Song, B., Yau, G.D., and Kaufman, R.J. (2007). ATF6alpha optimizes long-term endoplasmic reticulum function to protect cells from chronic stress. *Developmental cell* 13, 351-364.

Xu, K., Tavernarakis, N., and Driscoll, M. (2001). Necrotic cell death in *C. elegans* requires the function of calreticulin and regulators of Ca(2+) release from the endoplasmic reticulum. *Neuron* 31, 957-971.

Yamamoto, K., Sato, T., Matsui, T., Sato, M., Okada, T., Yoshida, H., Harada, A., and Mori, K. (2007). Transcriptional induction of mammalian ER quality control proteins is mediated by single or combined action of ATF6alpha and XBP1. *Developmental cell* 13, 365-376.

Yoshida, H., Matsui, T., Hosokawa, N., Kaufman, R.J., Nagata, K., and Mori, K. (2003). A time-dependent phase shift in the mammalian unfolded protein response. *Developmental cell* 4, 265-271.

Yuan, J.Y., and Horvitz, H.R. (1990). The *Caenorhabditis elegans* genes *ced-3* and *ced-4* act cell autonomously to cause programmed cell death. *Developmental biology* 138, 33-41.

Zang, X., and Maizels, R.M. (2001). Serine proteinase inhibitors from nematodes and the arms race between host and pathogen. *Trends in biochemical sciences* 26, 191-197.

Zhang, K., and Kaufman, R.J. (2004). Signaling the unfolded protein response from the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 279, 25935-25938.

8 Anhang

8.1 Primer

Tabelle 8.1 Auflistung der verwendeten Primer.

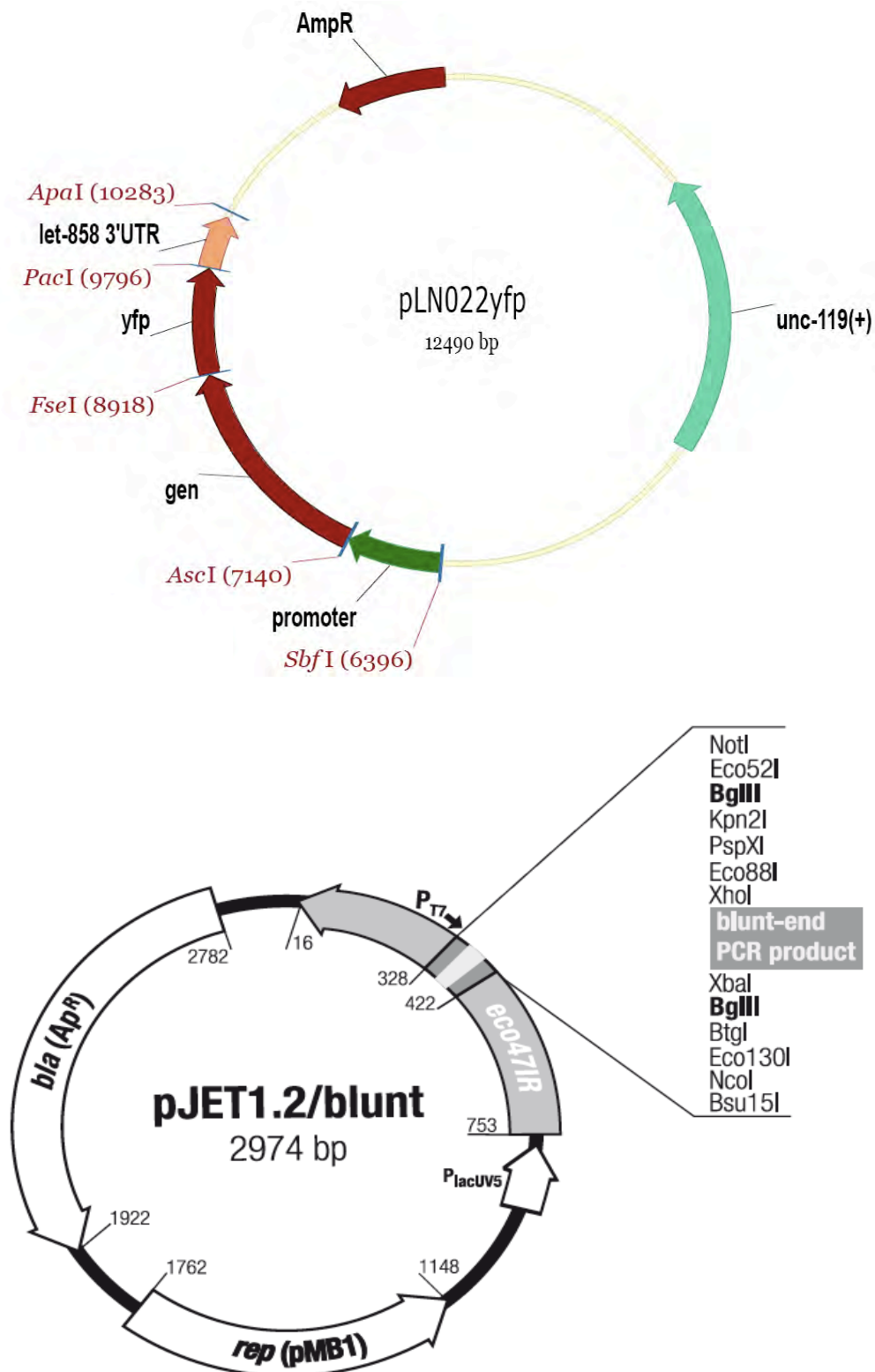
Die verwendeten Primer sind mehr oder weniger nach der chronologischen Verwendung in der angefertigten Dissertation angegeben. Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen sind unterstrichen.

NAME	PRIMER-SEQUENZ	VERWENDUNG
SL28	CTCGTCAGGGATCCACAAAGCAATCATTG	Mutageneseprimer srp-2 Histidin zu Arginin
SL29	CAATGATTGCTTTGTGGATCCCTGACGAG	Mutageneseprimer srp-2 Histidin zu Arginin
SL100	GTACGCCTGCAGGAAGCTTTAGTTTCAGA TGGTGG	SRP-2 Promotor sense incl. <i>SbfI</i>
SL101	GTACGGGCCGGCCAGCATGAACCCCAAG GAACA	SRP-2 genomische DNA incl. <i>FseI</i> ohne Stopcodon anti-sense
SL102	GTACGGGCCGCGCCATGTCCGATAACGCA AC	SRP-2 genomisches Fragment incl. <i>Ascl</i> sense
SL124	GTACGCCTGCAGGGAGGATCCCCAATTCT TGAGACTTCCAC	unc-54 Promotor pPD88.27 incl. <i>SbfI</i> sense
SL125	GTACGCCTGCAGGAATCCCGAGTTGAT GATGCGAGTGATG	unc-54 Promotor pPD88.27 incl. <i>Ascl</i> anti-sense
SL163	CATTTCCCGAAAAGTGCCA	Sequenzierprimer für Bombardmentkonstrukte 1
SL164	CAACTGTTGGGAAGGGCGAT	Sequenzierprimer für Bombardmentkonstrukte 2
SL165	AGAAGAAGAAGGCAATTGCTG	Sequenzierprimer für Bombardmentkonstrukte 3
SL166	TTGCCGGAATTGGAATTTTC	Sequenzierprimer für Bombardmentkonstrukte 4
SL167	CGGGTCTCGTTTGGATTATT	Sequenzierprimer für Bombardmentkonstrukte 5
SL168	TTTTCCCGCTTCAAACCTCAC	Sequenzierprimer für Bombardmentkonstrukte 6
SL169	GAGCTAGCACATCATTTGGTGTA	Sequenzierprimer für Bombardmentkonstrukte 7
SL170	GGAAAAATCATTTGCCGCC	Sequenzierprimer für Bombardmentkonstrukte 8
SL171	CAACTCTAAGTCTCTCTAAAATCCG	Sequenzierprimer für Bombardmentkonstrukte 9
SL172	AAAAATTCGGCCACCAAGTTT	Sequenzierprimer für Bombardmentkonstrukte 10
SL173	CCAAAATTTTTGGAAATGTTTGT	Sequenzierprimer für Bombardmentkonstrukte 11
SL174	GTGGGCATCTTTAAAGGTAG	Sequenzierprimer für Bombardmentkonstrukte 12
SL175	CGTGTCAAAACCTTTCGGCAAT	Sequenzierprimer für Bombardmentkonstrukte 13
SL176	CTCGCTTCGTGTATTCCCGG	Sequenzierprimer für Bombardmentkonstrukte 14
SL177	CCATTTTTCCGCTAAAATTTT	Sequenzierprimer für Bombardmentkonstrukte 15
SL178	CTCGCCGTTTTCCATAATA	Sequenzierprimer für Bombardmentkonstrukte 16
SL179	CAAATCTGCTCAACGACTTG	Sequenzierprimer für Bombardmentkonstrukte 17
SL180	TACTGGAAAACCTACCTGTTT	Sequenzierprimer für Bombardmentkonstrukte 18
SL181	CAGAACTTCAAATTAGACACAACA	Sequenzierprimer für Bombardmentkonstrukte 19
SL182	TTCATTTTCATTAGGACGTGGG	Sequenzierprimer für Bombardmentkonstrukte 20
SL183	TTCCTCGCTCACTGACTCGC	Sequenzierprimer für Bombardmentkonstrukte 21
SL184	GACTTATCGCCACTGGCAGC	Sequenzierprimer für Bombardmentkonstrukte 22
SL185	GACTCCCCGTCGTGTAGATAAC	Sequenzierprimer für Bombardmentkonstrukte 23
SL186	GAATAGTGATGCGGCGACC	Sequenzierprimer für Bombardmentkonstrukte 24
SL223	GTACGTTAATTAATTTTTTTTATCGGAAT ATTTTTTG	Primer für SRP-2 3'-UTR incl. <i>Pari</i> sense
SL224	GTACGGGCCCGATCATGATAAAGATTGT ATCGTAAG	Primer für SRP-2 3'-UTR incl. <i>Apal</i> anti-sense
SL233	GCAACCTGGCTTATCG	Sequenzierprimer Ahringer RNAi-Bibliothek sense
SL234	CCCAGTCACGACGTTG	Sequenzierprimer Ahringer RNAi-Bibliothek anti-sense
SL235	GTTTTCCAGTCACGACGTT	Sequenzierprimer ORFeome RNAi-Bibliothek sense

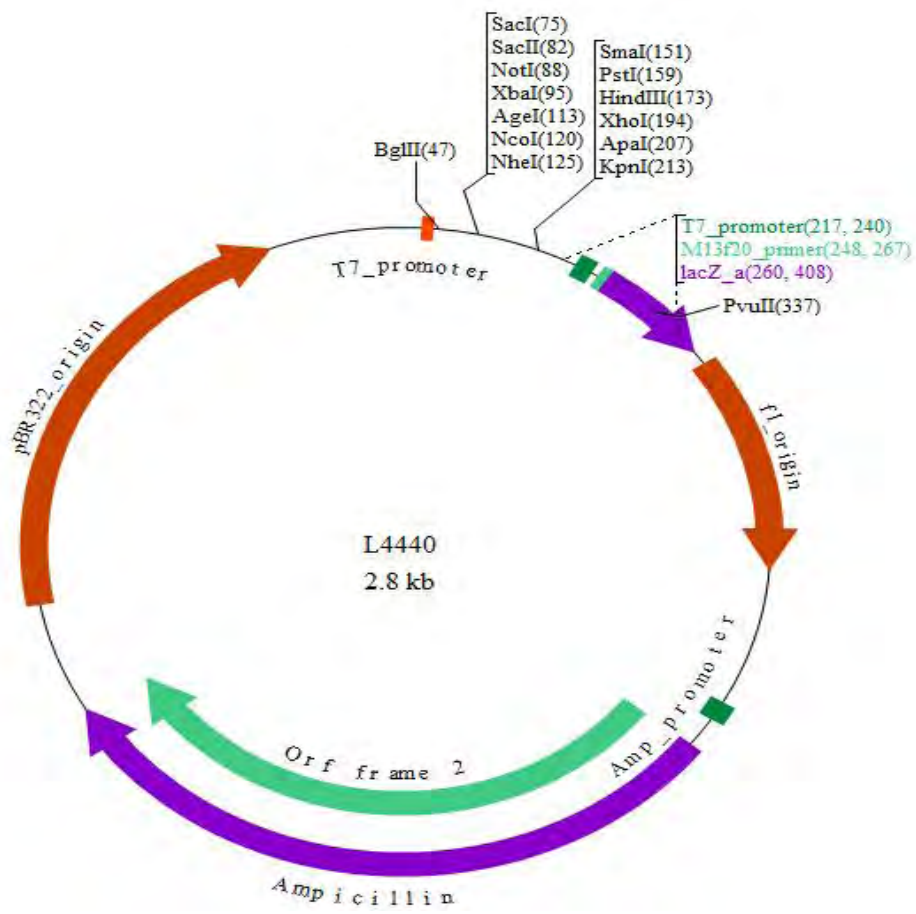
SL236	TGGATAACCGTATTACCGCC	Sequenzierprimer ORFeome RNAi-Bibliothek anti-sense
SL259	GGCCACGTATTCAC TTCAGGCAAC	Ire-1 Primer 1
SL260	GTTTGAGAGCTTTGGATTCAGAGAC	Ire-1 Primer 2
SL261	GTACCTTGCGTACTTGTGCACCGTATC	Ire-1 Primer 3
SL262	CTTGACAGCGTACTCGTTCATGTCTG	Pek-1 Primer 1
SL263	GAAGATTTTTGTTTACAGGTGATTAC	Pek-1 Primer 2
SL264	ATGGTTGATTTCTTTCAAGCACATG	Pek-1 Primer 3
SL265	GGAACCGAATGTACGCCCAAGCCTCT	Atf-6 Primer 1
SL266	GCACACTACCGACGTAATCGA ACTTC	Atf-6 Primer 2
SL267	TGTTGATCAATATCAGTATCACGGC	Atf-6 Primer 3

8.2 Plasmidkarten

Die Plasmidkarten der verwendeten Vektoren für den Erhalt größerer DNA-Mengen pJet1.2/blunt, die ballistische Transformation (pLN022yfp) und der RNAi-Vektor sind im Folgenden aufgeführt.



Quelle: <http://www.fermentas.com>



Quelle: <http://www.biovisualtech.com>

Danksagung

Ich bedanke mich bei Herrn Professor Dr. Markus Glatzel für die Vergabe des sehr interessanten Themas, die Möglichkeit zur Durchführung dieser Dissertation, die hervorragenden Laborbedingungen und die sehr gute Betreuung.

Herrn PD Dr. Hartwig Lüthen möchte ich für sein Interesse an meiner Arbeit und für die Erstellung des Zweitgutachtens danken.

Herrn Professor Dr. Thorsten Hoppe danke ich für die Möglichkeit, Teile der vorliegenden Arbeit in seinem Labor in Köln durchzuführen. Vielen Dank für die Unterstützung und die ebenfalls sehr guten Laborbedingungen.

Allen früheren und jetzigen Mitarbeitern des Instituts für Neuropathologie am U.K.E., insbesondere Frau Beata Szalay, danke ich für die bereichernden wissenschaftlichen Diskussionen, Ratschläge bei praktischen Problemen und die sehr gute Arbeitsatmosphäre. Den Kollegen im Institut für Genetik in Köln danke ich für die angenehme Zeit dort, die sie mir fernab der Heimat erträglicher gemacht haben. Hier danke ich insbesondere meinen Platznachbarn Alexandra Segref & Michael Schell. Bei Herrn Dr. Lukas Neukomm bedanke ich mich für den Grundlagenkurs in *C. elegans*.

Der Hans und Ilse Breuer Stiftung danke ich für die finanzielle Unterstützung, die mir die Durchführung dieses Forschungsprojektes ermöglichte.

Mein herzlicher Dank gilt darüber hinaus den Korrekturleserinnen Hannelore Balschun & Dagmar Pahlow.

Meinen Eltern Brigitte & Norbert Lange danke ich dafür, dass sie mir ermöglicht haben diesen Weg zu gehen.

Antje, nun ist die nächste akademische Arbeit fast geschafft und ich danke Dir für die Geduld, Opferbereitschaft und nicht zuletzt für Deine Liebe in den Jahren der Entstehung. Du gibst mir die Kraft und Unterstützung, die ich brauche. Ich freue mich auf unsere Zukunft.