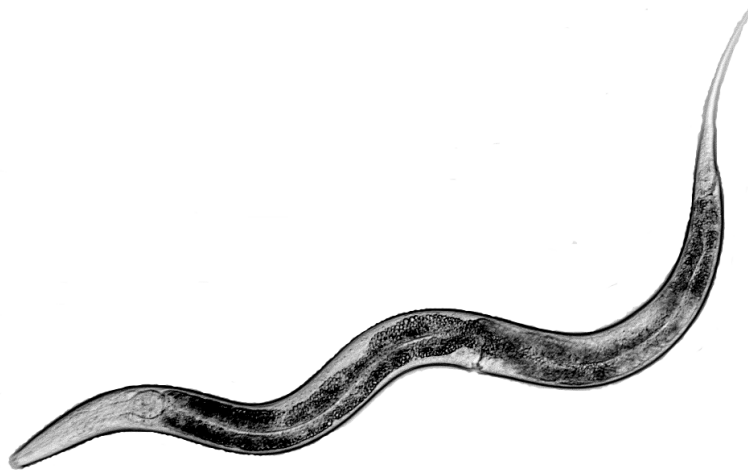


**Funktionale Analyse ausgewählter
Caenopores, antimikrobielle Effektorproteine
von *Caenorhabditis elegans***



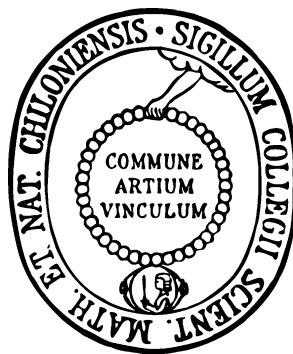
Aylin Höckendorf

Dissertation - Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Funktionale Analyse ausgewählter Caenopores,
antimikrobielle Effektorproteine von *Caenorhabditis elegans*

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von
Dipl.-Biol. Aylin Höckendorf
aus Berlin



Kiel, Januar 2012

Referent:	Prof. Dr. Matthias Leippe
Korreferent:	Prof. Dr. Hinrich Schulenburg
Tag der mündlichen Prüfung:	12.03.2012
Zum Druck genehmigt:	12.03.2012
gez. Prof. Dr. Lutz Kipp, Dekan	

Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass die vorliegende Abhandlung – abgesehen von der Beratung durch meinen Betreuer Prof. Dr. Matthias Leippe – nach Inhalt und Form meine eigene Arbeit ist.

Diese Arbeit hat weder in Auszügen noch in ganzer Form einer anderen Stelle im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegen. Sie wurde in ihrer Gesamtheit nicht veröffentlicht und auch nicht zur Veröffentlichung eingereicht.

Die Arbeit ist unter Einhaltung der Regeln guter wissenschaftlicher Praxis der Deutschen Forschungsgemeinschaft entstanden.

Kiel, den 10. Januar 2012

Aylin Höckendorf

Teile der vorliegenden Arbeit wurden bereits zur Veröffentlichung eingereicht oder zur Publikation vorbereitet:

Hoeckendorf A, Stanisak M, Leippe M. The saposin-like protein SPP-12 is an antimicrobial polypeptide in pharyngeal neurons of *Caenorhabditis elegans* and participates in defence against a natural bacterial pathogen. *Biochem J*. Eingereicht am 29. November 2011.

Hoeckendorf A, Leippe M. The saposin-like protein SPP-3 is an antimicrobial and pore-forming polypeptide in the intestine and in one head neuron of *Caenorhabditis elegans*. Manuskript in Vorbereitung zur Publikation.

Konferenzbeiträge in denen Teilaspekte der vorliegenden Arbeit vorgestellt wurden:

Kademci A, Leippe M. Role of caenopores and ADAMs in the defence of *Caenorhabditis elegans*. Symposium, Worms in Kiel. Kiel. 24. März 2009. Vortrag.

Kademci A, Leippe M. Role of selected caenopores and ADAMs in the defence of *Caenorhabditis elegans*. Symposium, Worms in Kiel. Kiel. 23. September 2009. Vortrag.

Kademci A, Stanisak M, Leippe M. Role of selected caenopores in the defence of *Caenorhabditis elegans*. EMBO Conference Series C. *elegans*: Development and Gene Expression. Heidelberg. 17 – 20 Juni 2010. Poster.

Kademci A, Leippe M. The role of caenopores and ADAMs in the defence of *Caenorhabditis elegans*. Symposium, Worms in Kiel. Kiel. September 2010. Vortrag

Kademci A, Stanisak M, Leippe M. Caenopores in the defence of *Caenorhabditis elegans*. 103. DZG-Jahrestagung. Hamburg. 17. – 20. September 2010. Vortrag.

Höckendorf A, Leippe M. Functional analysis of selected caenopores – antimicrobial proteins in *Caenorhabditis elegans*. Symposium, Worms in Kiel. Kiel. 21. Februar 2011. Vortrag.

Treitz C, Hoeckendorf A, Leippe M, Tholey A. Differential proteomic analysis of *Caenorhabditis elegans* ADAM knock-out mutants. 5th European Summer School, "Proteomic Basics". Brixen/Bressanone, Südtirol, Italien. 31. Juli – 6. August 2011, Poster vertreten durch Christian Treitz.

Kurzfassung

Caenopores sind antimikrobielle und porenbildende Polypeptide der SAPLIP-Familie des Nematoden *Caenorhabditis elegans*, welche einen wichtigen Beitrag zum Immunsystem des Wurms leisten. Die wenigen bisher untersuchten Mitglieder der *spp*-Genfamilie, kodierend für Caenopores, zeigten Promotoraktivität im Darm, dem Hauptangriffspunkt für bakterielle Infektionen (Roeder *et al.* 2010, Alper *et al.* 2007, Kunitomo *et al.* 2005).

Im Fokus dieser Arbeit standen drei Vertreter dieser Familie, SPP-1, SPP-3 und SPP-12. Dabei war die Lokalisierung der Promotoraktivität der zugehörigen Gene, die phänotypische Charakterisierung von Knock-out- und Knock-down-Mutanten auch im Hinblick auf Pathogenexposition sowie die *in-vitro*-Aktivität der rekombinanten Proteine gegen verschiedenste Bakterien von besonderem Interesse.

Für *spp-12* wurde in dieser Arbeit Promotoraktivität erstmals exklusiv in zwei Neuronen des Pharynx nachgewiesen. Eines dieser Neuronen ist das neurosekretorische Motoneuron NSM, welches wahrscheinlich durch Serotonin-Sekretion die pharyngeale Pumprate und die Eiablage an das Vorhandensein von Futterbakterien anpasst (Horvitz *et al.* 1982). Da die *spp-12*-Mutante im Vergleich zum Wildtyp in dieser Arbeit Abweichungen in der pharyngealen Pumprate und in der Eiablage zeigte, ist anzunehmen, dass SPP-12 an der Wahrnehmung von Bakterien beteiligt ist. Gegenüber Sporen eines für *C. elegans* pathogenen *B. thuringiensis*-Stammes wies die *spp-12*-Mutante zusätzlich eine erhöhte Empfindlichkeit auf. Dafür können sowohl die vermehrte Aufnahme von Sporen aufgrund der gesteigerten Pumprate, als auch das Fehlen des gegen diesen Bakterienstamm antimikrobiellen Proteins SPP-12 verantwortlich sein. Auf nicht-pathogenen *E. coli* OP50 zeichnete sich die *spp-12*-Mutante dagegen durch ausgeprägte Langlebigkeit aus, welche wahrscheinlich wegen der verminderten Wahrnehmung auf vermeintliche diätetische Restriktion zurückzuführen ist.

Für SPP-1 konnte *in-vitro* keine antimikrobielle Aktivität gegen *E. coli* OP50 und *B. thuringiensis* gezeigt werden. Jedoch ist *spp-1* im Wurm im Umgang mit *E. coli* OP50 essentiell. In Kontakt mit pathogenem *B. thuringiensis* erwies sich die Anwesenheit von *spp-1* sogar als Nachteil. Zusätzlich wurde beobachtet, dass die Transkription von *spp-1* in diesem Fall stark negativ reguliert wird. Unter Berücksichtigung beider Ergebnisse lässt sich folgern, dass *B. thuringiensis* in Antwort auf SPP-1 Pathogenitätsfaktoren bildet, welche den Wurm schädigen und dazu veranlassen die Transkription von *spp-1* zu inhibieren.

Die Promotoraktivität eines dritten Vertreters, *spp-3*, konnte sowohl im Darm als auch in einem Kopfneuron nachgewiesen werden. Das zugehörige Protein war antimikrobiell aktiv gegen ein weites Spektrum an Gram-negativen und Gram-positiven Bakterien. Es zeigte membranpermeabilisierende und pH-abhängige porenbildende Aktivität und kann somit als wahres Caenopore bezeichnet werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit liefern neue Informationen über den Ort der Expression der untersuchten *spp*-Gene sowie über deren Bedeutung unter pathogenen und nicht-pathogenen Bedingungen und können zu einem besseren Verständnis der Funktion der zugehörigen antimikrobiellen Proteine in *C. elegans* beizutragen.

Abstract

Caenopores are antimicrobial and pore-forming polypeptides of the nematode *Caenorhabditis elegans* with great importance for its immune system. Former tests on three members of the *spp* gene family, coding for caenopores, have shown promoter activity in the intestine, the main target for bacterial infection (Kunitomo *et al.* 2005, Alper *et al.* 2007, Roeder *et al.* 2010). Selected members of the caenopore family are in the spotlight of this thesis, namely SPP-1, SPP-3 and SPP-12. The tissue localization of the promoter activity of the respective genes, the phenotypical characterization of the knock-out and knock-down mutants, also under pathogenic conditions, and the *in-vitro* activity against various bacteria were of great interest of this study.

This work shows first evidence for promoter activity of *spp-12* exclusively in two pharyngeal neurons, and none in the intestine. One of these neurons is the NSM, which is believed to modulate the serotonin secretion in response to bacteria and thereby regulate the pharyngeal pumping and egg-laying behavior (Horvitz *et al.* 1982). Differences in pharyngeal pumping and egg laying of the *spp-12* mutant compared to wild-type lead to the assumption, that SPP-12 is involved in sensing of bacteria. Additionally, the *spp-12* mutant is susceptible to spores of a pathogenic *B. thuringiensis* strain, presumably caused by increased ingestion or missing protection through the absent antimicrobial protein SPP-12, which is *in vitro* able to kill this strain. Exposed to non-pathogenic *E. coli* OP50 the *spp-12* mutant showed a longer lifespan than the wild-type. This is possibly due to the defect in sensing yielding in a supposed dietary restriction.

In vitro SPP-1 was not antimicrobial active against *E. coli* OP50 and *B. thuringiensis*. However, in the worm *spp-1* was essential for coping with *E. coli* OP50. In contrast, exposed to pathogenic *B. thuringiensis* the presence of *spp-1* was detrimental. Furthermore, the transcription of *spp-1* in wild-type was highly down-regulated in contact to this bacterium. Together these results suggest, that *B. thuringiensis* is producing virulence factors in response to SPP-1, which harm the worm and provoke to reduce the transcription.

Promoter activity of a third member, *spp-3*, was localized to the intestine and one head neuron. The respective protein was antimicrobial active against a wide range of gram-negative and gram-positive bacteria and showed membrane permeabilizing and pH-dependent pore-forming activity. For this reason it can be termed a true caenopore.

The results of this work give information about tissue location of the expression of the *spp* genes of interest, as well as their importance under pathogenic and non-pathogenic conditions, and lead to a better understanding of the function of the respective antimicrobial proteins in *C. elegans*.

Abkürzungsverzeichnis

ABF	<i>antibacterial factor</i>
AMPs	antimikrobielle Peptide
ASABF	<i>Ascaris suum antibacterial factor</i>
Bp	Basenpaare
BT	<i>Bacillus thuringiensis</i>
CFU	<i>colony-forming unit</i> , koloniebildende Einheit
CNCs	Caenacine
CTLD	<i>C-Type-Lectin domain containing proteins</i> , Proteine mit einer C-Typ-Lectin-Domäne
DIC	<i>Differential interference contrast</i> , differentieller Interferenz-Kontrast
EPEC	enteropathogene <i>E. coli</i>
GFP	<i>green-fluorescent protein</i> , grün-fluoreszierendes Protein
IGF-1	Insulin/Insulin-like-growth-factor 1
IMAC	Immobilisierte-Metall-Affinitäts-Chromatographie
LPS	Lipopolysaccharide
MALDI	<i>Matrix-assisted laser desorption/ionization</i> , Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisierung
MAMPs	<i>microbe-associated molecular patterns</i> , Mikroben-assoziierte molekulare Muster
Mb	Megabasenpaare
MS	Massenspektrometrie
NLPs	<i>neuropeptide-like peptides</i> , Neuropeptid-ähnliche Peptide
NSM	pharyngeales neurosekretorisches Motorneuron
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerase-Kettenreaktion
PRRs	<i>pattern-recognition receptors</i> , Muster-Erkennungs-Rezeptoren
qRT-PCR	quantitative <i>Real-time-PCR</i>
RNAi	RNA-Interferenz
SAPLIPs	<i>saposin-like proteins</i> , Saposin-ähnliche Proteine
SPPs	<i>SaPosin-like Protein family</i>
TLRs	Toll-like-Rezeptoren
TOF	<i>time of flight</i> , Flugzeit
Wt	Wildtyp

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Antimikrobielle Effektor-Proteine	1
1.1.1	SAPLIPs.....	3
1.2	Der Modellorganismus <i>Caenorhabditis elegans</i>	4
1.2.1	Systematik und Morphologie von <i>C. elegans</i>	5
1.2.2	Pathogen-Interaktion von <i>C. elegans</i>	9
1.2.3	Regulation der Immun-Antwort in <i>C. elegans</i>	10
1.2.4	Immun-Effektoren in <i>C. elegans</i>	12
1.2.4.1	SAPLIPs in <i>C. elegans</i>	14
1.3	Alternative Antibiotika.....	20
1.4	Zielsetzung.....	20
2	Material und Methoden.....	22
2.1	Verbrauchsmaterial und Geräte	22
2.2	Lösungen, Puffer, Medien und Medienzusätze.....	25
2.3	Plasmide und Oligonukleotide	27
2.4	Nematoden- und Bakterienstämme	29
2.5	Haltung von <i>C. elegans</i> im Labor und wurmbezogene Methoden.....	30
2.5.1	Aufrechterhaltung der Wurmstämme	30
2.5.2	Gefrierlagerung von <i>C. elegans</i>	30
2.5.3	Synchronisation von <i>C. elegans</i>	31
2.5.4	Wurmlyse und <i>Single-Worm-PCR</i>	31
2.5.5	Bestimmung der Populationsgröße.....	31
2.5.6	Bestimmung der Eiablage rate.....	31
2.5.7	Bestimmung der Entwicklungsrate.....	32
2.5.8	Bestimmung der pharyngealen Pumprate.....	32
2.5.9	Bestimmung der Anzahl lebender Bakterien im Darm.....	33
2.5.10	Fettfärbung mit BODIPY	33
2.5.11	Lebensspannen-Analyse	33
2.5.12	Überlebensrate auf <i>B. thuringiensis</i>	34
2.5.13	Vermessung des Pharynx sowie der Darmweitung und Körpermaße nach Exposition mit <i>B. thuringiensis</i>	34

2.5.14	Produktion der <i>B. thuringiensis</i> -Sporen	34
2.5.15	RNA-Interferenz.....	35
2.5.16	Mikroinjektion von Promotor- <i>gfp</i> -Konstrukten zur Gewebslokalisierung	35
2.6	Molekularbiologische Methoden	36
2.6.1	Polymerase-Kettenreaktion (<i>Polymerase Chain Reaction</i> , PCR)	36
2.6.2	Agarose-Gelelektrophorese	37
2.6.3	Reinigung von DNA-Fragmenten aus dem Agarose-Gel.....	37
2.6.4	Restriktionsenzymatische Spaltung	37
2.6.5	Ligation.....	37
2.6.6	Transformation	37
2.6.7	Herstellung kompetenter Zellen für die Hitzeschock-Transformation	37
2.6.8	Isolierung von Plasmid-DNA.....	38
2.6.9	DNA-Konzentrations-Bestimmung	38
2.6.10	DNA-Sequenzierung.....	38
2.6.11	RNA-Extraktion aus <i>C. elegans</i> und cDNA-Synthese durch reverse Transkription.....	38
2.6.12	Quantitative <i>Real-time</i> -PCR (qRT-PCR).....	38
2.7	Biochemische Methoden	40
2.7.1	Synthese des rekombinaten Fusionsproteins rSPP-3	40
2.7.1.1	Klonierung des Expressionsvektors	40
2.7.1.2	Expression im heterologen System.....	40
2.7.1.3	Extraktion mittels Ultraschall	40
2.7.1.4	Reinigung durch Immobilisierte-Metall-Affinitäts-Chromatographie (IMAC)	40
2.7.1.5	Dialyse.....	41
2.7.1.6	Entfernung des Fusionspartners durch proteolytische Spaltung mit <i>FactorXa</i>	41
2.7.1.7	Finale Reinigung über IMAC und hydrophobe Matrix (SepPak)	41
2.7.1.8	Gefriertrocknung.....	41
2.7.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	41
2.7.3	Kolloidale Coomassie-Färbung nach Kang <i>et al.</i> 2002.....	42
2.7.4	Protein-Identifizierung mittels MALDI-TOF/TOF-MS/MS	42
2.7.5	Protein-Konzentrations-Bestimmung	43
2.7.6	Aktivitätstests	43

2.7.6.1	Analyse antimikrobieller Aktivität mittels Mikrosuszeptibilitätstest	43
2.7.6.2	Analyse der membranpermeabilisierenden Aktivität	43
2.7.6.3	Analyse der porenbildenden Aktivität mittels Liposomen- Depolarisationstest	44
2.8	Statistische Auswertung	45
2.9	Bioinformatik	45
3	Ergebnisse	46
3.1	Promotor-Analyse der SAPLIP-Gene	46
3.2	Gewebslokalisierung der Promotoraktivität von <i>spp-12</i>	48
3.3	Charakterisierung ausgewählter <i>spp</i> -Knockout-Mutanten	48
3.3.1	Eiablage der <i>spp-12</i> -Mutante	49
3.3.2	Bestimmung der Populationsgröße ausgewählter <i>spp</i> -Mutanten	50
3.3.2	Pharyngeale Pumprate ausgewählter <i>spp</i> -Mutanten	51
3.3.3	Toleranz ausgewählter <i>spp</i> -Mutanten gegenüber pathogenen Bakterien..	53
3.3.4	Einfluss ausgewählter <i>spp</i> -Gene auf die Lebensspanne in Kontakt zu nicht- pathogenen Bakterien	55
3.3.5	Einfluss ausgewählter <i>spp</i> -Gene auf die Fettreserven in Kontakt zu nicht- pathogenen Bakterien	60
3.4	Antimikrobielle Aktivität von SPP-1 und SPP-12	61
3.5	Transkriptionsregulation ausgewählter <i>spp</i> -Gene unter pathogenen und nicht- pathogenen Bedingungen	62
3.6	Charakterisierung von SPP-3	64
3.6.1	Synthese und Reinigung von SPP-3	64
3.6.2	Porenbildende Aktivität von SPP-3	66
3.6.3	Antimikrobielle Aktivität von SPP-3	67
3.6.4	Membranpermeabilisierende Aktivität von SPP-3	68
3.7	Gewebslokalisierung der Promotoraktivität von <i>spp-3</i>	69
3.8	Charakterisierung <i>spp-3</i> -RNAi-behandelter Würmer	70
3.8.1	Eiablagerate von <i>spp-3</i> -RNAi-behandelten Wümmern	70
3.8.2	Anzahl lebender Bakterien im Darm von <i>spp-3</i> -RNAi-behandelten Wümmern	70
4	Diskussion	71
5	Literaturverzeichnis	86

1 Einleitung

Bakterien sind auf der Erde allgegenwärtig. Sie befinden sich in der Luft, im Wasser und im Boden. Sie besiedeln sogar extrem heiße und kalte Standorte. Dementsprechend ist ihnen auch jedes andere Lebewesen ausgesetzt und zwar nicht nur äußerlich, sondern Bakterien werden auch zusätzlich mit der Nahrung aufgenommen und mit der Luft eingeatmet. Die meisten Vertreter sind allerdings unschädlich, manche sogar nützlich, so helfen sie z.B. bei der Verdauung oder schützen allein durch ihre Anwesenheit vor dem Festsetzen opportunistischer Pathogene. Nur wenige Mikroorganismen sind potentiell schädlich und können Krankheiten hervorrufen und dies auch nur, wenn die Abwehr des Wirts nicht ausreicht, um die eindringenden Parasiten zu kontrollieren.

Natürlich sind die Organismen den Keimen nicht schutzlos ausgeliefert, sondern haben ein ausgeklügeltes Verteidigungssystem. Die erste Abwehrlinie bildet eine physikalische und biochemische Barriere, wie z.B. beim Menschen Haut, Schleimhaut, Magensäure und bakterizide Substanzen. Wenn die Krankheitserreger diese überwunden haben, werden konservierte, weit verbreitete makromolekulare Komponenten, wie z.B. bakterielle Lipopolysaccharide (LPS) oder Lipoteichonsäuren, der Pathogene, sogenannte Mikroben-assoziierte molekulare Muster (MAMPs), von Muster-Erkennungs-Rezeptoren (PRRs) erkannt. Innerhalb von Minuten bis Stunden nach Pathogenkontakt wird über die Aktivierung von Signalkaskaden eine Immunreaktion ausgelöst. Neben dem Einsatz phagozytischer Zellen kommt es hierbei zur raschen Bildung eines breiten Spektrums antimikrobieller Proteine, wodurch die Infektion eingegrenzt oder eindringende Mikroorganismen zerstört werden (Hancock & Diamond 2000). Auf diese antimikrobiellen Effektor-Proteine wurde in dieser Arbeit ein besonderes Augenmerk gerichtet.

1.1 Antimikrobielle Effektor-Proteine

Jedes Lebewesen produziert antimikrobielle Peptide (AMPs), von einzelligen Mikroorganismen über Invertebraten bis hin zu höheren Eukaryoten inklusive Pflanzen und des Menschen (Wang & Wang 2004). Bis heute sind etwa 1800 antimikrobielle Peptide identifiziert (<http://aps.unmc.edu/AP/main.php>, Wang & Wang 2004, Wang *et al.* 2009), wobei die Anzahl in den letzten Jahren stark angestiegen ist und sehr wahrscheinlich noch weiter zunehmen wird. Die Größe der antimikrobiellen Peptide beträgt typischerweise 12–100 Aminosäuren (Jenssen *et al.* 2006). Allerdings gibt es noch eine Reihe anderer antimikrobiell wirkender Effektor-Proteine, die größer sind, wie z.B. Saposin-ähnliche Proteine (Bruhn 2005) und Lysozyme mit etwa dreimal so großen Vertretern (Wilcox & Cole 1957). Die Effektor-Proteine haben ein weites antimikrobielles Aktivitäts-Spektrum, welches einzigartig für jedes Protein ist und verschiedenste

Mikroorganismen als Ziel hat, darunter Gram-negative und Gram-positive Bakterien, Pilze, Viren und sogar Tumorzellen (Wang & Wang 2004, Suttman *et al.* 2008, Palffy *et al.* 2009). Ihr primäres Ziel ist die Zellhülle oder Zellmembran (Zaslouff 2002), welche zerstört werden muss, um invadierende Mikroorganismen (Stenger *et al.* 1998) bzw. phagozytierte Bakterien (Andrä *et al.* 2003) zu töten.

Obwohl die Effektoren sehr verschieden sind mit geringen Sequenzhomologien und diversen Sekundärstrukturen (Jenssen *et al.* 2006), enthalten sie dennoch alle einen Bereich von hydrophoben und kationischen Aminosäuren (Zaslouff 2002). Dieser Bereich ist essentiell für die Anheftung an die negativ geladene Bakterienmembran und die Integration in die Phospholipide der Membran zur Porenbildung bzw. Membranzerstörung (Brogden 2005). Zu den antimikrobiell wirkenden Proteinen gehören die Mitglieder der Familie der Saposin-ähnlichen-Proteine (SAPLIPs, *saposin-like proteins*), auf welche im Folgenden näher eingegangen wird.

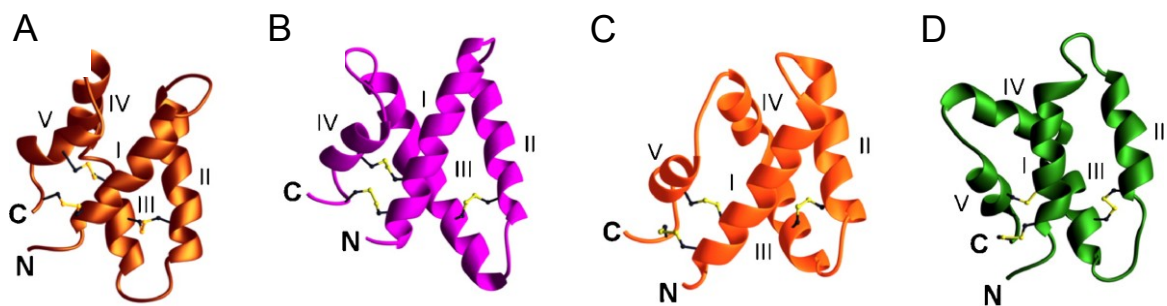


Abb. 1 Strukturelle Ähnlichkeit von **A)** Canopore-5, **B)** Saposin A, **C)** NK-Lysin, **D)** Amoebapore A, Disulfidbrücken sind in gelb dargestellt und die α -Helices sind durchnummeriert (modifiziert nach Mysliwy *et al.* 2010)

1.1.1 SAPLIPs

Als Saposin-ähnliche Proteine werden strukturell ähnliche, lipid-interagierende Proteine zusammengefasst (Munford *et al.* 1995). Sie zeichnen sich durch eine kompakte Struktur aus fünf α -Helices aus (**Abb. 1**), welche durch Disulfidbrücken zwischen konservierten Cysteinen erzielt wird (Liepinsh *et al.* 1997, Hecht *et al.* 2004, Mysliwy *et al.* 2010).

Die Familie der SAPLIPs mit über 200 Mitgliedern wurde benannt nach den Saposinen, vier kleinen Proteinen, welche aus einem größeren Vorläuferprotein hervorgehen und als Kofaktoren im Sphingolipid-Katabolismus in den Lysosomen eukaryotischer Zellen identifiziert wurden (Tamaru *et al.* 1986, Kishimoto *et al.* 1992, Bruhn 2005). SAPLIPs werden von der Amöbe bis hin zum Säuger gefunden, nicht aber in Prokaryoten (Munford *et al.* 1995, Bruhn 2005). Die Gruppe hat sowohl antimikrobiell wirkende Vertreter, als auch Mitglieder mit vor allem negativ geladenen Aminosäuren, denen diese Fähigkeit fehlt. Die letztgenannten binden Membranen z.B. für den Lipidabbau (de Alba *et al.* 2003, Bruhn 2005, Winkelmann *et al.* 2006).

Typische Vertreter der Saposin-ähnlichen Proteine sind die Amoebapores der Amöbe *Entamoeba histolytica*, das NK-Lysin des Schweins, das Granulysin humaner Lymphozyten und die Canopores des Nematoden *Caenorhabditis elegans*.

Die Amoebapores der parasitären Amöbe *Entamoeba histolytica* haben vor allem antimikrobielle Wirkung gegen Gram-positive Bakterien (Leippe *et al.* 1994), sind aber auch cytotoxisch gegen eukaryotische Zellen des Wirts-Immunsystems (Berninghausen & Leippe 1997, Andrä *et al.* 2004). Die antimikrobielle Aktivität wird hier über die Bildung von Poren durch Integration und Oligomerisierung von Proteinen in der Membran nach dem *barrel-stave*-Modell (Leippe *et al.* 1991) vermittelt und dient wahrscheinlich der Lyse phagozytierter Zellen (Andrä *et al.* 2003). Das NK-Lysin ist ein Effektormolekül cytotoxischer T- und NK-Zellen des Schweins (Andersson *et al.* 1995) mit antimikrobieller Aktivität gegen Gram-positive und Gram-negative Bakterien und Pilze und lytischer Aktivität gegen eine NK-sensitive Maus-Tumorzelllinie (Leippe 1995). Es permeabilisiert und zerstört die Membran ebenfalls durch Porenbildung, jedoch auf andere Weise als die Amoebapores (Miteva *et al.* 1999, Gutschmann *et al.* 2003). Auch das Granulysin in humanen cytotoxischen Lymphozyten zeigt antimikrobielle und cytotoxische Aktivität (Pena & Krensky 1997).

Der Nematode *Caenorhabditis elegans* weist ebenfalls eine Reihe von Genen auf, welche für potentiell antimikrobielle Proteine der Saposin-ähnlichen Proteinfamilie kodieren, die Caenopores genannt werden. Auf diese wird später ausführlich eingegangen.

Da das angeborene Immunsystem und seine antimikrobiellen Proteine sowohl in Pflanzen als auch in Tieren gefunden werden, geht man davon aus, dass dies ein evolutionär ursprünglicher Teil der Abwehr ist, welcher entstanden ist, bevor sich die beiden Reiche getrennt haben (Janeway & Medzhitov 2002). Die erfolgreichen Immunstrategien wurden dabei während der Evolution konserviert, so dass es möglich ist, grundlegende Abwehrmechanismen, welche auch im Menschen vorkommen, an einfacheren Organismen zu untersuchen.

1.2 Der Modellorganismus *Caenorhabditis elegans*

Der Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* bietet ein leicht zugängliches System, um Wirts-Pathogen-Interaktionen auf genetischer und molekularer Ebene zu untersuchen. In seinem natürlichen Habitat frischem Kompost und verrottendem Obst (Barrière & Félix 2005, Barrière & Félix 2007) ist der Wurm ständig Mikroorganismen ausgesetzt. Diese dienen dem vorwiegend bakterivoren Organismus vor allem als Nahrungsquelle, sind aber auch potentielle Pathogene, gegen die er sich schützen muss.

C. elegans kann im Labor einfach infiziert werden, indem man den Wurm mit dem gewünschten Pathogen konfrontiert, wobei der Infektionsverlauf, aufgrund der Transparenz des Wurms in Echtzeit verfolgt werden kann.

Ein großer Vorteil dieses Systems ist, dass viele Humanpathogene, darunter Bakterien und Pilze auch im Fadenwurm tödliche Infektionen verursachen (Aballay & Ausubel 2002), so z.B. das Gram-positive Bakterium *Staphylococcus aureus* und das Gram-negative Bakterium *Pseudomonas aeruginosa* (Tan *et al.* 1999a, Sifri *et al.* 2003). Mittlerweile sind mehr als 40 für *C. elegans* pathogene Arten beschrieben. Die meisten Pathogene infizieren den Wurm über den Darm, dessen Zellen sich aufgrund ihrer Ähnlichkeit mit mammalen Darmzellen hervorragend für Studien der Interaktion mit mikrobiellen Pathogenen eignen (Irazaqui *et al.* 2010b). Hinzu kommt, dass fundamentale Signalwege in Nematoden und Menschen konserviert sind (Ruvkun & Hobert 1998).

C. elegans hat sich darüber hinaus als gutes Modell herausgestellt, um Virulenzfaktoren von Bakterien zu identifizieren, von denen viele auch für die mammale Pathogenese notwendig sind (Mahajan-Miklos *et al.* 1999, Tan *et al.* 1999a, Tan *et al.* 1999b), z.B. LasR in *P. aeruginosa* und PhoP/Q, Regulatoren eines Zwei-Komponenten-Systems, in *Salmonella* (Tan *et al.* 1999a, Aballay *et al.* 2000, Alegado *et al.* 2003).

Vielfältige Methoden können zur Untersuchung der Wirts-Pathogen-Interaktion herangezogen werden. Die kurze Lebensspanne des Wurms ermöglicht es, Veränderungen in der Überlebensrate nach Exposition mit Pathogenen in angemessener Zeit quantifizieren zu können. Durch das seit 1998 vollständig aufgeklärte Genom (*C. elegans* sequencing consortium 1998) ist es möglich,

Unterschiede in der Genexpression durch Microarray (Portman 2006) oder quantitative *Real-time*-PCR (qRT-PCR) zu untersuchen (Mallo *et al.* 2002, Shapira *et al.* 2006, Troemel *et al.* 2006). Außerdem kann zur Herstellung transgener Tiere DNA in den Wurm injiziert werden und so z.B. durch Reportergenkonstrukte die Promotoraktivität interessierender Gene lokalisiert werden (Couillault *et al.* 2004, Boulin *et al.* 2006, Evans 2006, Alper *et al.* 2007). Es gibt Methoden mit denen man morphologische Auffälligkeiten und Verhaltensänderungen messen kann (Hart 2006), inklusive der bakteriellen Persistenz und der Akkumulation im Darm (Aballay *et al.* 2000).

Auch ansonsten eignet sich der Wurm hervorragend als Forschungsobjekt und bietet alle Vorteile eines Modellorganismus. Er ist klein, hat eine kurze Generationszeit, erzeugt viele Nachkommen, ist einfach zu halten, lässt sich einfrieren und wieder auftauen. *C. elegans* ist einfach genetisch manipulierbar. Es ist sowohl möglich Mutanten durch mutagene Substanzen herzustellen (Ahringer 2006), als auch Gene durch das RNA-Interferenz-Verfahren stillzulegen (Fire 2007). *C. elegans* pflanzt sich typischerweise durch Selbstbefruchtung der überwiegend vorkommenden Hermaphroditen fort, allerdings können diese auch durch Männchen befruchtet werden, wodurch Kreuzungen möglich sind. Das diploide Genom umfasst fünf Paar autosomale und ein Paar Geschlechtschromosomen mit 97 Mb und über 19 000 vorhergesagten Protein-kodierenden Genen (*C. elegans Sequencing Consortium* 1998). Die Geschlechter werden über die Verteilung der Geschlechtschromosomen festgelegt (Hermaphroditen XX/Männchen X0).

Sydney Brenner traf somit vor über 40 Jahren eine gute Wahl, als er diesen Wurm als Modellorganismus etablierte.

1.2.1 Systematik und Morphologie von *C. elegans*

C. elegans gehört zu einer großen Gruppe primär bakterivorer Nematoden, den Rhabditiden. Diese umfassen ökologisch und genetisch sehr verschiedene Spezies, inklusive einiger Parasiten. *C. elegans* kommt in den gemäßigten Klimazonen auf allen Kontinenten der Erde vor (Hodgkin & Doniach 1997, Barrière & Félix 2005).

Der unsegmentierte, bilateralsymmetrische Körperbau des etwa einen Millimeter langen und 70 µm breiten Wurms ist sehr einfach bestehend aus zwei konzentrischen Schläuchen, welche durch einen flüssigkeitsgefüllten Raum, das Pseudocoelom, getrennt sind (**Abb. 2**, **Abb. 3**). Der äußere Schlauch ist bedeckt von kollagenhaltiger Kutikula, welche von der darunterliegenden Hypodermis sezerniert wird, und beherbergt die Muskulatur, die Gonaden, das Nervensystem, das exkretorische/sekretorische System und die Coelomocyten. Der innere Schlauch besteht aus dem Darm, dem Pharynx mit assoziiertem Nervensystem und Muskulatur (Riddle *et al.* 1997). Der hydrostatische Druck im Pseudocoelom verleiht dem Wurm seine Form und dient als Hydroskelett. Vier longitudinale Muskelstränge, zwei dorsale und zwei ventrale,

erzeugen alternierend durch konzertierte Anspannung und Relaxation ein sinusoidales Bewegungsmuster (Driscoll & Kaplan 1997). Ringmuskulatur ist nicht vorhanden.

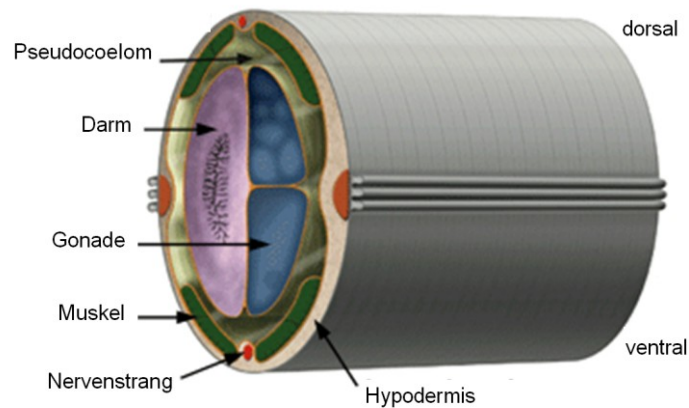


Abb. 2 Querschnitt durch den mittleren Körperabschnitt eines adulten *C. elegans*-Hermaphroditen (modifiziert nach www.wormatlas.org, 19.10.2011)

Das Reproduktionssystem des Hermaphroditen besteht aus zwei Armen, welche jeweils ein Ovar mit Ovidukt, eine Spermatheka und einen Uterus mit befruchteten Eiern beherbergen (Schedl 1997). Beide Arme münden in einen Eiablageapparat mit Vulva, deren Kontraktion zur Eiablage führt (Greenwald 1997). Männchen zeichnen sich durch eine komplexe Schwanzstruktur als Begattungsorgan aus, im Gegenzug fehlen ihnen die weiblichen Geschlechtsorgane. Sie sind deutlich dünner als die Hermaphroditen, da sie keine Eier produzieren. Hermaphroditen legen innerhalb ihres etwa dreiwöchigen Lebens ungefähr 300 Eier aus denen sich je nach Temperatur in 2–3 Tagen über vier durch Häutungen getrennte Larvenstadien neue Adulte entwickeln. Bei ungünstigen Bedingungen bilden die Tiere ein alternatives L3-Stadium, das Dauerstadium, in welchem sie resistent gegenüber Stressbedingungen sind und viele Monate ohne Nahrung überdauern können (Cassada & Russell 1975). Durch die Zellkonstanz kann man sagen, dass der ausgewachsene Hermaphrodit genau 959 somatische Zellkerne besitzt und das Männchen 1031.

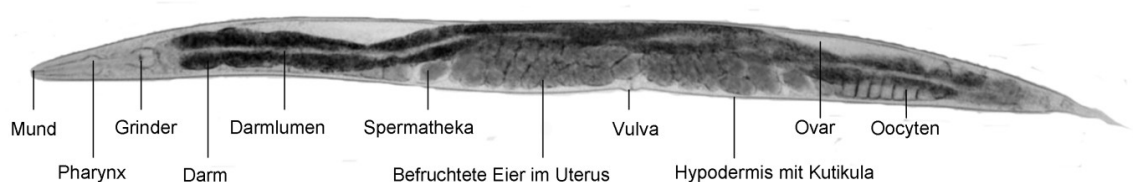


Abb. 3 Körperbau eines adulten *C. elegans*-Hermaphroditen. Foto: A. Höckendorf

Durch die Mundöffnung aufgenommene Bakterien werden im Pharynx durch zeitlich leicht versetzte Kontraktion und Relaxation des Korpus und des anterioren Isthmus im Lumen konzentriert (Avery & Shtonda 2003) und dann bei geschlossenem posterioren Isthmus durch Inversion der Platten des Grinders aufgrund der Kontraktion des terminalen Bulbus aufgebrochen und zum Darm weiterbefördert (Albertson & Thomson 1976, Avery & Horvitz 1987, Avery & Horvitz 1989). Innerhalb von drei Minuten werden aufgenommene Nahrungspartikel verdaut, die Nährstoffe aus dem intestinalen Lumen durch epitheliale Zellen aufgenommen und nicht absorbiertes Material über den Anus in der Nähe des Schwanzes exkretiert (Avery & Shtonda 2003). Außerdem dient der Darm der Synthese und Lagerung von Makromolekülen. Die einzellige Schicht an Darmzellen ist zum Darm-Lumen hin mit Mikrovilli und einer extrazellulären Glykokalix bedeckt. Die Glykokalix besteht aus Glykoproteinen, welche die Mikrovillioberfläche vor mechanischer Beschädigung oder Pathogenangriffen schützen (McGhee 2007). Trotzdem ist das Darmepithel die Hauptangriffsfläche für pathogene Bakterien (Irazaqui *et al.* 2010b). Der pH-Wert im Darm-Lumen oszilliert zwischen 4 und 6 (Pfeiffer *et al.* 2008).

C. elegans ist einer der einfachsten Organismen mit einem Nervensystem, wobei die Grundzüge der neuronalen Kontrolle der Immunantwort der Säuger bereits hier vorhanden sind (Sun *et al.* 2011, Tracey 2011). Der Wurm hat ein wohl definiertes Nervensystem, die Identität jedes einzelnen der 302 Neuronen ist bekannt und die Vernetzung jedes Neurons ist bis ins Detail kartiert (Albertson & Thomson 1976).

Der Hauptteil der Neuronen befindet sich in der Kopfreion, welche mit sensorischen Rezeptoren angereichert ist. Ein circumpharyngealer Nervenring, ein Bündel aus Axonen, umschließt den Isthmus und besteht aus mehr als der Hälfte der Neuronen von *C. elegans*, so dass er als Gehirn des Wurms angesehen werden kann (White *et al.* 1986). Viele der Synapsen zwischen Neuronen und viele neuromuskuläre *Junctions* sind in dieser Region lokalisiert, außerdem im dorsalen und ventralen Nervenstrang und im Schwanz (Hall & Russell 1991). Der Nervenring erhält und integriert sensorische Informationen und vermittelt sie an Motorneuronen im Kopf und entlang des Nervenstrangs.

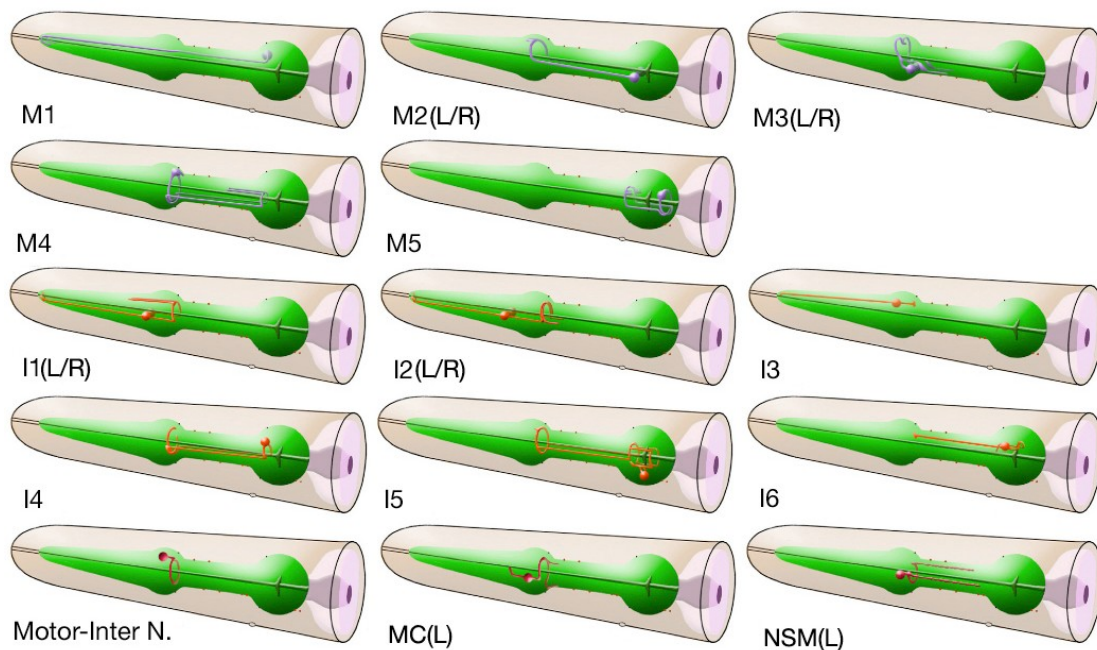


Abb. 4 Pharyngeale Neuronen von *C. elegans* (www.wormatlas.org, 19.10.2011)

Das Nervensystem des Pharynx besteht aus 20 Zellen (**Abb. 4**), welche alle komplett im Pharynx liegen und vermutlich für die Regulation der Nahrungsaufnahme verantwortlich sind (Albertson & Thomson, 1976). Die pharyngealen Neuronen werden in verschiedene Kategorien unterteilt, die Motoneurone (M1-M5), die Interneurone (I1-I6) und andere Typen (MC, NSM, MI). Die Neurite vieler dieser Axone bilden den pharyngealen Nervenring. Dieser ist viel kleiner als der extrapharyngeale Nervenring, liegt innerhalb des ersten Bulbus und umrundet das Lumen des Pharynx, so dass die pharyngealen Neurone synaptische Kontakte zu anderen Neuronen bilden können. Keines der Neurone des somatischen Nervensystems ist daran beteiligt (Herndon & Hall 2010), so dass das pharyngeale Nervensystem komplett autonom fungiert.

Obwohl die paarigen neurosekretorischen Motoneurone (NSM) in der Detektion von Bakterien wahrscheinlich redundant mit anderen Neuronen, vor allem dem MC, sind, wird ihnen viel Beachtung geschenkt (Avery & Horvitz 1989). Dieses Neuronpaar hat Synapsen im Isthmus, nicht nur im Muskel, sondern auch an der Basallamina (Albertson & Thomson 1976), auf dessen gegenüberliegender Seite sich der extrapharyngeale Nervenring befindet. Da die putativen sensorischen Enden der NSM an der Grenze zwischen Korpus und Isthmus liegen, wo Bakterien akkumulieren, ist es wahrscheinlich, dass in Antwort auf die Detektion von Futter im pharyngealen Lumen die Sekretion von Serotonin ins Pseudocoelom moduliert wird und das Signal dadurch verbreitet wird (Albertson & Thomson 1976).

Einige sensorische Neuronen können durch ihre Verbindung zur Außenwelt direkt Umwelteinflüsse wahrnehmen und darauf reagieren, z.B. in der Kontrolle der Immunabwehr oder des Meideverhaltens in Antwort auf Pathogene.

1.2.2 Pathogen-Interaktion von *C. elegans*

C. elegans kann auf verschiedene Weisen von Pathogenen attackiert werden.

Die Kutikula bietet eine dicke, harte und impermeable Barriere über die es nur wenigen Bakterien und Pilzen möglich ist den Wurm zu infizieren. Der Pilz *Drechmeria coniospora* bindet an die Oberfläche in der Region um Mund und Vulva und penetriert den Wurm mit Hyphen (Jansson 1994), wohingegen das Pestbakterium *Yersinia pestis* und das nahe verwandte *Y. pseudotuberculosis* sich in der Kopfregion des Wurms anheften und dort einen Biofilm bilden, welcher den Wurm am Fressen hindert (Darby *et al.* 2002, Joshua *et al.* 2003).

Einigen Organismen gelingt es den Grinder unbeschädigt zu passieren. Im Darm können sie sich dann vermehren und intestinale Infektionen hervorrufen, welche oft mit einer Darmweitung im anterioren Abschnitt oder Schädigung der Epithelzellen einhergehen. Beispiele für Pathogene, welche den Darm infizieren und meistens zum Tode führen sind die Gram-negativen Bakterien *P. aeruginosa* PA14 (Mahajan-Miklos *et al.* 1999), *Salmonella enterica* Serotyp Typhimurium (Labrousse *et al.* 2000) und *Serratia marcescens* (Mallo *et al.* 2002), sowie das Gram-positive Bakterium *Enterococcus faecalis* (Garsin *et al.* 2001).

Andere Pathogene, wie z.B. *P. aeruginosa* PA01 oder einige Stämme von *Bacillus thuringiensis* schädigen den Wurm durch die Produktion von Toxinen, welche eine neuromuskuläre Paralyse bzw. eine Zerstörung der Darmzellen hervorrufen (Darby *et al.* 1999, Marroquin *et al.* 2000). Kürzlich wurden auch Viren gefunden, welche den Wurm über den Darm infizieren (Félix *et al.* 2011).

C. elegans kann Pathogene erkennen und diesen teilweise entgehen, indem der Wurm potentiell schädlichen Bakterien entflieht, oder die Aufnahme einstellt (Pujol *et al.* 2001). So meidet *C. elegans* z.B. pathogene *B. thuringiensis* und reduziert die Futteraufnahme in Kontakt zu diesem Bakterium (Schulenburg & Müller 2004). Dies ist durch die Erkennung und Bewertung bestimmter von Bakterien produzierter Stoffe möglich. Beispielsweise sind acylierte Homoserinlactone, Autoinducer Gram-negativer Bakterien, für *C. elegans* ein *Attractant*, so dass er von potentiellen Futterbakterien angelockt wird, andere können aber auch spezifisches Meideverhalten auslösen, wenn sie z.B. mit einem pathogenen Stamm von *P. aeruginosa* in Zusammenhang gebracht werden (Beale *et al.* 2006). Auch das *Surfactant* Serrawettin W2 von *S. marcescens* wirkt als *Repellent* und führt nach spezifischer Detektion zur Meidung durch den Wurm (Pradel *et al.* 2007). Durch Kontakt mit Bakterien kann die olfaktorische Präferenz zusätzlich

modifiziert werden, vermittelt durch Serotonin in den chemosensorischen Neuronen ADF bei Pathogenexposition (Zhang *et al.* 2005).

Bis heute ist der exakte Mechanismus der Pathogen-Erkennung für *C. elegans* unbekannt. Kein einziger PRR wurde bisher identifiziert, der Bakterien erkennt und dadurch eine gesteigerte Immunantwort herbeiführt (Tan & Shapira 2011). Es wird diskutiert, ob eine direkte Erkennung der Pathogene vorliegt, oder eine durch Pathogene hervorgerufene Schädigung erkannt wird (Ewbank 2006).

Der Toll-Rezeptor, ein berühmtes Beispiel für einen PRR, wurde in der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* gefunden, wo er in der Entwicklung (Anderson *et al.* 1985) und in der Pathogen-Erkennung (Lemaitre *et al.* 1996) eine Rolle spielt. Toll-like-Rezeptoren (TLRs) existieren auch in Vertebraten, wo sie, wie Toll in der Fliege, direkt durch MAMPs aktiviert werden und selbst eine Immunantwort auslösen (Akira 2006). Der Nematode *C. elegans* hat ein einziges Homolog des Toll-Gens, *tol-1*, welches ebenfalls wichtig für die Entwicklung des Wurms ist (Pujol *et al.* 2001) und nötig, um *Salmonella enterica* an der Invasion des Pharynx zu hindern (Tenor & Aballay 2007). Zusätzlich wird *S. marcescens* durch einen TOL-1-vermittelten Prozess gemieden (Pujol *et al.* 2001). In *Drosophila* führt die Aktivierung von Toll zum Import von Transkriptionsfaktoren der NF- κ B-Familie in den Kern und zur Steigerung der Expression antimikrobieller Peptide. Im Wurm ist *tol-1* dagegen nicht an der Detektion der Bakterien und Signalübermittlung beteiligt, so fehlt auch der Transkriptionsfaktor NF- κ B in *C. elegans* (Irazoqui 2010b, Pujol *et al.* 2001). Es muss allerdings andere Mechanismen zur spezifischen Erkennung von Pathogenen oberhalb des Signalweges geben.

1.2.3 Regulation der Immun-Antwort in *C. elegans*

Obwohl der Toll-NF κ B-Weg in *C. elegans* nicht vorhanden ist (Pujol *et al.* 2001) hat der Wurm dennoch mindestens sieben verschiedene konservierte Signalwege mit denen er sich effektiv gegen verschiedenste Pathogene schützen kann, darunter der p38-Mitogen-aktivierte-Proteinkinase (MAPK)-Weg (Kim *et al.* 2002) und der Insulin-like-Rezeptor-Signalweg (Garsin *et al.* 2003). **Abb. 5** zeigt die Komplexität der parallelen sowie interagierenden Signalwege.

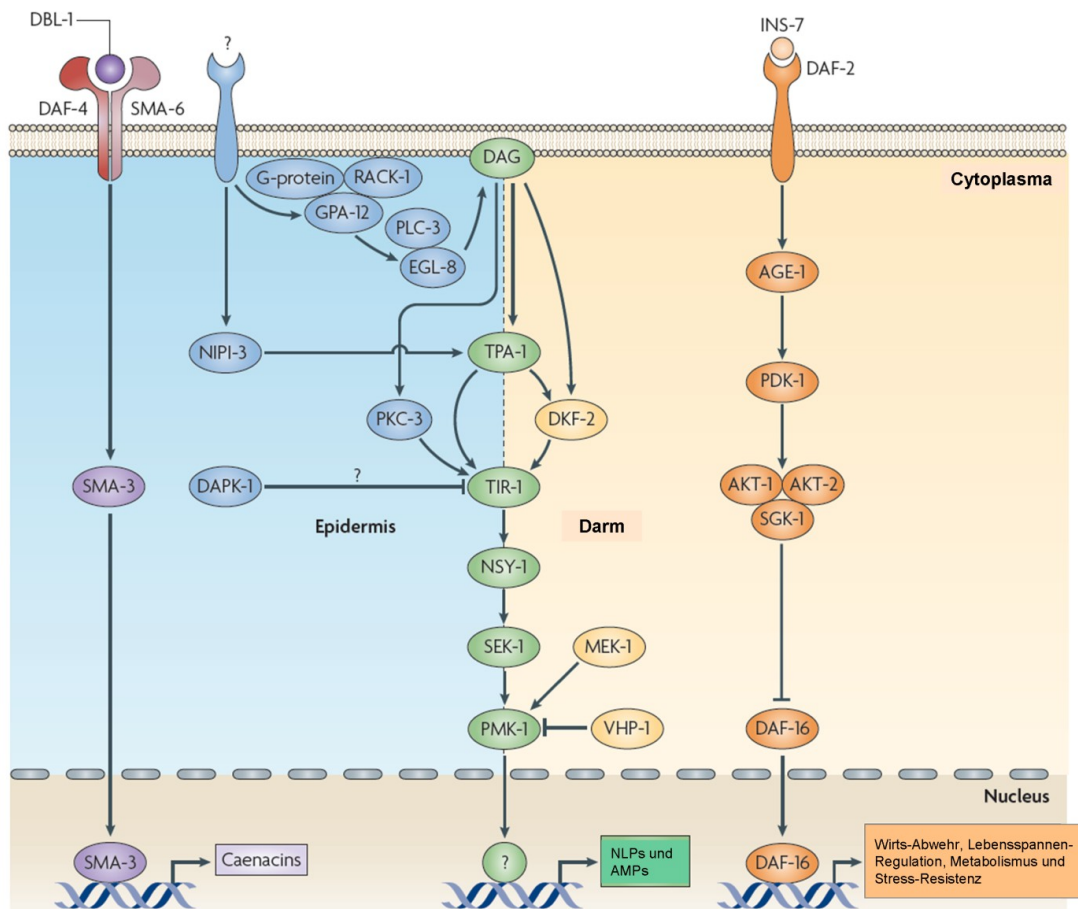


Abb. 5 Komplexität der Signalwege der Immunantwort (modifiziert nach Irazoqui *et al.* 2010b)

Ein wichtiger Signalweg in Antwort auf Stress und Infektion des Darms ist der DAF-2/DAF-16-Insulin-*like*-Rezeptor-Signaltransduktionsweg, welcher auch an der Regulation der Transkription einiger SAPLIP-Gene im Wurm beteiligt ist. Er kontrolliert nicht nur den Eintritt ins Dauerstadium (Gottlieb & Ruvkun 1994) und die Lebensspanne (Kenyon *et al.* 1993, Murakami & Johnson 1996, Henderson & Johnson 2001), sondern ist auch verantwortlich für die Abwehr sowohl Gram-positiver, als auch Gram-negativer pathogener Bakterien wie *E. faecalis*, *Staph. aureus* und *P. aeruginosa* (Garsin *et al.* 2003) und den Schutz vor porenbildenden Toxinen von *B. thuringiensis* (Hasshoff *et al.* 2007, Chen *et al.* 2010, Wang *et al.* 2011). In diesem Fall führt die Inaktivierung des einzigen Insulin/Insulin-*like-growth-factor* 1(IGF-1)-Rezeptors in *C. elegans*, DAF-2, zu erhöhter Pathogenresistenz, da dieser den Signalweg negativ reguliert (**Abb. 4**). Insulin-ähnliche Liganden aktivieren bzw. inaktivieren DAF-2. INS-7, ein Neuropeptid und Agonist des DAF-2-Rezeptors, sorgt für die Aktivierung von DAF-2, wobei der Insulin-ähnliche Ligand selbst unter neuronaler Kontrolle steht, denn die Nervenzellen sezernieren INS-7 aus Vesikeln, um den Signalweg im Darm zu aktivieren und damit die Immunantwort zu unterdrücken (Kawli & Tan 2008, Kawli *et al.* 2010a). Der aktivierte

Rezeptor DAF-2 sorgt über AGE-1, PDK-1 und den AKT-1/AKT-2-Komplex für die Phosphorylierung des *forkhead*-Transkriptionsfaktors der FOXO-Familie DAF-16 (Morris *et al.* 1996), wodurch dieser an der Translokation in den Nukleus gehindert wird (Lin *et al.* 2001, Henderson & Johnson 2001) und somit auch nicht die Transkription der Zielgene aktivieren kann. Zu den Zielgenen gehören Gene kodierend für antimikrobielle Effektorproteine wie die Lysozym-Gene *lys-7*, *lys-8*, die SAPLIP-Gene *spp-1*, *spp-12* und das Thaumatin-Gen *thn-2* (Murphy *et al.* 2003), aber auch Gene, deren Genprodukte an der generellen Stressantwort, bzw. Antwort auf oxidativen Stress oder Detoxifikation beteiligt sind (Murphy *et al.* 2003).

Jedoch können Bakterien den Schutzmechanismen, welche über diesen Signalweg vermittelt werden, entgehen, indem sie die Wirtsabwehr stören. *P. aeruginosa* gelingt es durch bakterielle Virulenzfaktoren GacA, LasR und RhlR den DAF-2/DAF-16-Signaltransduktionsweg über INS-7 zu aktivieren und dadurch die DAF-16 vermittelte Immunantwort zu inhibieren (Evans *et al.* 2008).

Der Insulin-ähnliche Signalweg wird sowohl über die Keimbahn als auch über das Nervensystem und den Einfluss externer Stimuli reguliert (Lin *et al.* 2001). Hier kontrolliert die Freisetzung von Serotonin aus serotonergen Neuronen die DAF-16-Translokation in den Nukleus. Dabei wird die DAF-16-Aktivierung bei Futtermangel durch Serotonin-Freisetzung aus pharyngealen NSM gesteigert, wohingegen Serotonin-Sekretion aus den chemosensorischen Neuronen ADF die Anwesenheit von Futter signalisiert und die Akkumulation von DAF-16 im Nukleus vermindert (Liang *et al.* 2006).

Auch die Futterzusammensetzung beeinflusst diesen Signalweg, z.B. indem Glucose dafür sorgt, dass der Transkriptionsfaktor DAF-16 inaktiv ist, und diesen so an der Aktivierung der Transkription seiner Zielgene hindert (Lee *et al.* 2009). Die genaue Regulation von DAF-16 ist noch unverstanden und kann offensichtlich zusätzlich ohne DAF-2-Beteiligung erfolgen (Evans *et al.* 2008), wobei die Regulation von DAF-16 über DAF-2 vor allem der Kontrolle der Lebensspanne dient (Kenyon *et al.* 1993, Lin *et al.* 1997).

Eine direkte Aktivierung von DAF-16 konnte durch enteropathogene *E. coli*, *P. fluorescens* und *B. thuringiensis* nachgewiesen werden (Anyanful *et al.* 2009, Neidig *et al.* 2011, Wang *et al.* 2011).

1.2.4 Immun-Effektoren in *C. elegans*

Die durch Infektion regulierten Signalwege, sorgen jeweils für ein einzigartiges Muster gesteigerter Produktion von Immun-Effektoren, welche oft antimikrobielle Aktivität innehaben und letztendlich für die Bekämpfung der Pathogene verantwortlich sind. Sequenzvergleiche mit bekannten antimikrobiellen Faktoren anderer Organismen zeigen, dass das *C. elegans*-Genom für viele potentiell antimikrobielle Peptide und

Proteine kodiert, deren Genexpression häufig in Antwort auf Infektion auf Transkriptionsebene reguliert wird (Mallo *et al.* 2002, O'Rourke *et al.* 2006, Shapira *et al.* 2006, Troemel *et al.* 2006, Wong *et al.* 2007).

Eine wichtige Gruppe bilden die Lysozyme, deren 15 Vertreter in *C. elegans* zwei verschiedenen Klassen angehören, den Invertebraten- und den *Entamoeba*-Typ-Lysozymen (Nickel *et al.* 1998, Schulenburg & Böhnisch 2008). Die untersuchten Lysozyme werden vor allem im Darm, aber auch in einigen Neuronen exprimiert (Mallo *et al.* 2002, Alper *et al.* 2007), wobei die Expression im Darm z.B. durch *S. marcescens* induziert werden kann (Mallo *et al.* 2002). Lysozyme vermitteln antibakterielle Wirkung, indem sie das Peptidoglycan der bakteriellen Zellwand spalten, welches die Bakterienzelle zusammenhält, und sorgen so, wahrscheinlich nach Sekretion ins Darmlumen, für den Schutz des Wurms gegenüber Gram-negativen und Gram-positiven Bakterien (Mallo *et al.* 2002, O'Rourke *et al.* 2006).

Außerdem hat *C. elegans* eine große Familie von Proteinen, welche eine C-Typ-Lectin-Domäne enthalten (CTLDs, *C-Type-Lectin domain containing proteins*), mit ca. 280 Mitgliedern (Schulenburg *et al.* 2008) und Galectinen, (Nemoto-Sasaki *et al.* 2008, Ideo *et al.* 2009), welche Zucker auf der Oberfläche von Mikroben binden können und dadurch als Kandidaten für die Pathogenerkennung gehandelt werden (Nicholas & Hodgkin 2004, Schulenburg *et al.* 2004, Schulenburg *et al.* 2008). Die Transkription vieler der zugehörigen Gene wird in Antwort auf Pathogenkontakt aktiviert (Mallo *et al.* 2002, O'Rourke *et al.* 2006, Troemel *et al.* 2006, Alper *et al.* 2007, Wong *et al.* 2007, Schulenburg *et al.* 2008, Irazoqui *et al.* 2010a).

Hinzu kommen die sechs Homologe der cysteinreichen ASABF-Peptide (*Ascaris suum* *antibacterial factor*) des parasitischen Nematoden *Ascaris suum* in *C. elegans*, die ABF-Peptide (*antibacterial factor*), welche große Ähnlichkeit mit Defensinen der Vertebraten haben und in Darm und Pharynx lokalisiert sind (Kato *et al.* 2002, Alper *et al.* 2007). Das rekombinante ABF-2 hat ein weites antimikrobielles Spektrum gegen Gram-negative und Gram-positive Bakterien und Hefe (Kato *et al.* 2002). Einige Vertreter sind konstitutiv exprimiert, andere in Antwort auf Infektion, mit Bakterien und Pilzen induziert (Alegado & Tan 2008, Alper *et al.* 2007, Means *et al.* 2009, Irazoqui *et al.* 2010a).

Aus der großen Familie der NLPs (*neuropeptide-like peptides*), welche typischerweise in Neuronen und der Hypodermis exprimiert werden, konnte bisher für einen Vertreter antimikrobielle Aktivität nachgewiesen werden. Rekombinantes NLP-31 hat antifungale Aktivität gegen *D. coniospora* und andere Pilze und wirkt antibakteriell gegen Gram-positive und Gram-negative Bakterien (Couillault *et al.* 2004). Außerdem wird die Expression einiger Gene kodierend für NLPs und der nahe verwandten Caenacine (CNCs) in Antwort auf den Pilz *D. coniospora* in der Epidermis induziert (Couillault *et al.*

2004, Fekete *et al.* 2008, Pujol *et al.* 2008, Zugasti & Ewbank 2009), jedoch nicht durch *S. marcescens* oder *P. aeruginosa* im Darm (Zugasti & Ewbank 2009).

Neben den vorgestellten Effektorproteinen gibt es noch einige andere, welche in die Abwehr von Pathogenen involviert sind. Ein Zusammenwirken all dieser Kandidaten, jeweils an den betreffenden Orten ihrer Expression nach Pathogenkontakt, ist sehr wahrscheinlich (**Abb. 6**). Daran beteiligt sind auch die SAPLIPs, die letzte große Gruppe potentiell antimikrobieller Proteine, auf welche im Folgenden ausführlich eingegangen wird.

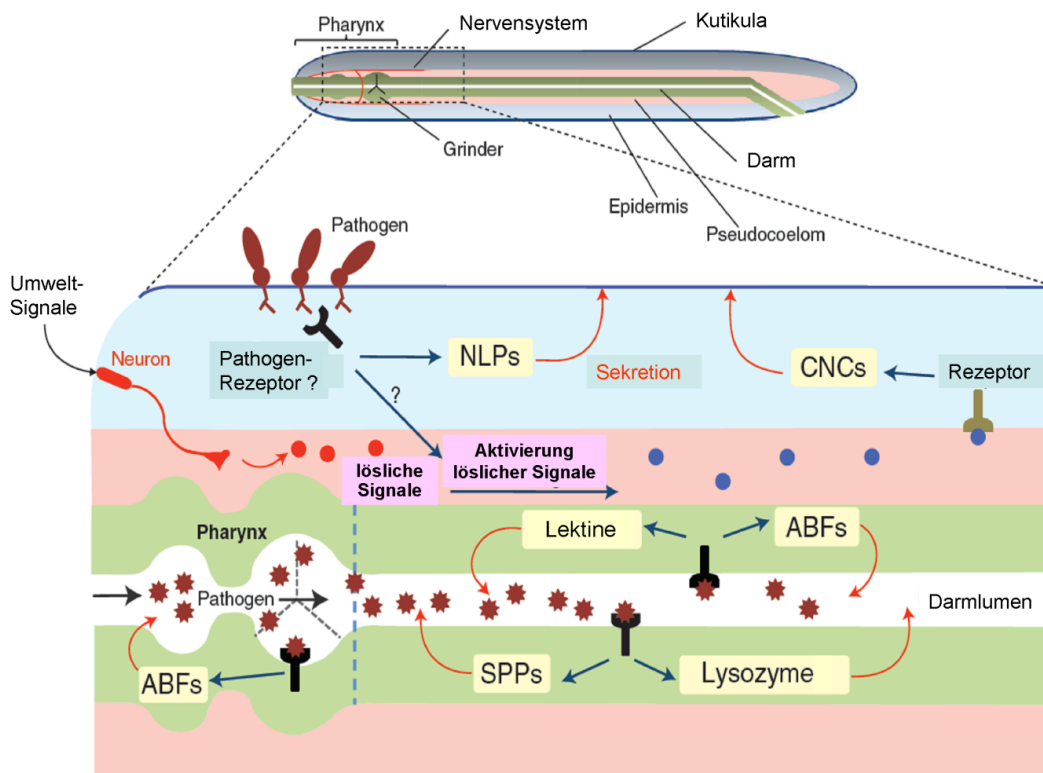


Abb. 6 Interaktion der antimikrobiellen Peptide und Proteine in *C. elegans* (modifiziert nach Ewbank & Zugasti 2011)

1.2.4.1 SAPLIPs in *C. elegans*

Die Homologe der Amoebapores in *C. elegans* sind die Caenopores (Bányai & Patthy 1998, Leippe 1999). Auch sie bestehen aus fünf charakteristischen α -Helices, wobei sechs konservierte Cysteinreste über drei Disulfid-Brücken verbunden sind und so die kompakte Faltung erreicht wird. Strukturell gehören sie daher ebenfalls der Saposin-ähnlichen Protein (SAPLIP)-Superfamilie an und werden deshalb im Wurm auch SPPs

(*SaPosin-like Protein family*) genannt. Die dreidimensionale Struktur wurde exemplarische für SPP-5 aufgeklärt (Mysliwy *et al.* 2010).

Die 28 Gene dieser Familie kodieren wahrscheinlich für 33 Proteine (Roeder *et al.* 2010), da *spp-7*, *spp-8* und *spp-10* für Proteine mit mehreren SAPLIP-Domänen kodieren, welche möglicherweise posttranslational voneinander gespalten werden (Stanisak 2007).

Bis auf für zwei Vertreter (*spp-6* und *spp-19*) wird für alle SPPs ein etwa 20 Aminosäuren langes N-terminales Signalpeptid vorausgesagt (Stanisak 2007), welches für den Transport des Proteins in das Endoplasmatische Retikulum sorgt, von wo aus das um das Signalpeptid verkürzte Protein dann an seinen Bestimmungsort gebracht werden kann.

In den Promotorregionen fast aller *spp*-Gene wurde die Konsensus-Sequenz für eine ELT-2-Bindungsstelle gefunden (Roeder *et al.* 2010). ELT-2 ist ein darmspezifischer Transkriptionsfaktor und tatsächlich werden alle bisher untersuchten *spp*-Gene im Darm exprimiert. Dabei zeigen *spp-1* und *spp-5* ausschließlich im Darm Promotoraktivität (Kunitomo *et al.* 2005, Alper *et al.* 2007, Roeder *et al.* 2010). Wohingegen *spp-7* neben der verstärkten Expression im posterioren Teil des Darms ebenfalls in verschiedenen Zellen des Pharynx, vor allem in der pharyngealen Muskelzelle pm7, exprimiert wird (Alper *et al.* 2007) und beim Männchen ebenfalls in der Schwanzregion (**Abb. 7**).

Eine Ausnahme bilden die vier *spp*-Gene *spp-2*, *spp-12*, *spp-16* und *spp-19*, welchen eine ELT-2-Bindungsstelle in ihrer Promotorregion fehlt (Roeder *et al.* 2010). Es konnte bereits durch RNA-Isolierung aus Darmzellen und Nicht-Darmzellen gezeigt werden, dass *spp-12* vor allem in Nicht-Darmzellen transkribiert wird (Stanisak 2007).

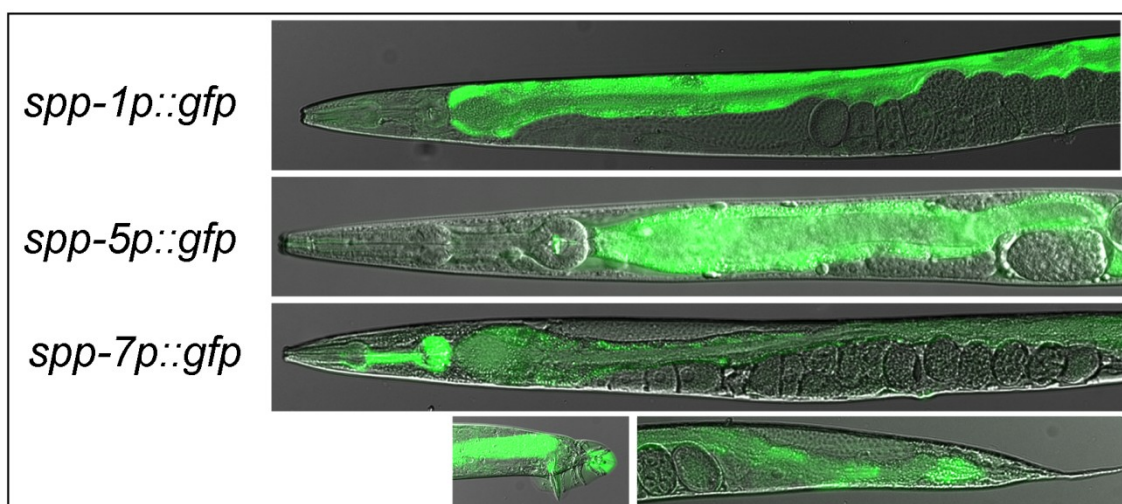


Abb. 7 Gewebslokalisierung der Promotoraktivität einiger *spp*-Gene. Die Stämme wurden freundlicherweise von Dr. Scott Alper und Dr. Hirofumi Kunitomo zur Verfügung gestellt. Foto: A. Höckendorf

Wie Amoebapore, Granulysin und NK-Lysin sind auch die SPPs Porenbildner (Roeder *et al.* 2010). Für ausgewählte Vertreter wurde bereits porenbildende und antimikrobielle Aktivität nachgewiesen. SPP-1 war der erste Kandidat für den ein antibakterieller Effekt gezeigt wurde (Bányai & Patthy 1998), gefolgt von SPP-5, welches *E. coli* und *B. megaterium* töten kann (Roeder *et al.* 2010). SPP-1 und SPP-12 sind ebenfalls antimikrobiell aktiv gegen *B. megaterium* nicht aber gegen *E. coli*. Daneben sind SPP-1, SPP-5 und SPP-12 gegen Zellen der Hefen *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans* und der Amöbe *Dictyostelium discoideum* aktiv. Allerdings fehlt ihnen cytotoxische Aktivität gegenüber humanen Jurkat-T-Zellen, welche ihre Strukturverwandten, die Amoebapores, innehaben (Stanisak 2007).

Für SPP-1, SPP-5 und SPP-12 wurde weiterhin porenbildende Aktivität gegen Liposomen nachgewiesen (Stanisak 2007, Roeder *et al.* 2010), wobei das pH-Optimum im sauren Bereich lag, so dass angenommen werden kann, dass zumindest einige Vertreter aus den Darmzellen ins Darmlumen sezerniert werden, wo sie auf ihre Zielzellen treffen. Der primäre Angriffsort für SPP-5 ist die cytoplasmatische Membran der Bakterien (Roeder *et al.* 2010), in welches es Poren bildet und dadurch die Bakterien tötet (Roeder *et al.* 2010). Darüber hinaus ist SPP-5 nötig, um das Futterbakterium *E. coli* zu töten und abzubauen, um an die Nährstoffe zu gelangen. Fehlt SPP-5, hat der Wurm zum einen eine zehnfach erhöhte Anzahl lebender Bakterien im Darm und zum anderen zeichnet er sich durch sehr geringe Fettreserven, eine verringerte Eiablage und Einschränkung von Wachstum und Bewegung aus. Weniger als 5% der Larven eines *spp-5*-defizienten Wurms wachsen zum adulten Tier heran (Roeder *et al.* 2010).

So wie es für Amoebapores und Lysozyme in *E. histolytica* wahrscheinlich ist, dass diese synergistisch in der Tötung und dem Abbau der Bakterien arbeiten (Leippe 1999), kann dies auch für Caenopores und Lysozyme in *C. elegans* angenommen werden, wobei ihre exakte Rolle noch nicht vollständig charakterisiert ist (Roeder *et al.* 2010).

Transkripte von *spp-1*, *spp-5* und *spp-12* sind sowohl in Embryonen, als auch in allen Larvenstadien und im adulten Wurm vorhanden, mit verstärktem Vorkommen von *spp-12*-mRNA in frühen Entwicklungsstadien (Stanisak 2007). Während *spp-5* wahrscheinlich konstitutiv exprimiert wird, kann die *spp-3*-Transkription unter verschiedenen Bedingungen induziert werden, so ist *spp-3*-mRNA nur nach Kontakt zu *B. megaterium* und *Micrococcus luteus* und unter Hungerbedingungen nachweisbar (Roeder *et al.* 2010).

Die Transkription vieler *spp*-Gene wird in Kontakt zu Pathogenen reguliert, spezifisch für jedes Gen und jedes Pathogen (Wong *et al.* 2007, Alegado & Tan 2008, Evans *et al.* 2008, Roeder *et al.* 2010). **Tab. 1** kann entnommen werden, wie sich die Transkription der einzelnen SAMLIP-Gene in Kontakt zu verschiedenen Mikroorganismen verändert. Bei der Erstellung der Tabelle wurden nur Microarray- und quantitative *Real-time*-PCR-

Ergebnisse mit einbezogen, welche sich auf *E. coli* OP50 als Kontrolle beziehen. Obwohl inzwischen viele Informationen über die Transkriptionsänderung in Kontakt zu unterschiedlichsten Mikroben vorliegen, lassen diese sich nicht immer vergleichen, bzw. sind sogar widersprüchlich. Dies kann daran liegen, dass zum Teil andere Stämme und andere Kontrollen benutzt wurden oder das experimentelle Vorgehen verschieden war.

Tab. 1 Transkriptionsänderung der SAPLIP-Gene nach Mikrobenkontakt in *C. elegans*

	PA	SM	PL	EC	SE	SA	EF	MN	BT	BM	CA
<i>spp-1</i>	■	■			■			■			
<i>spp-2</i>			■								
<i>spp-3</i>	■	■									
<i>spp-4</i>	■								■		■
<i>spp-5</i>		■		■			■				
<i>spp-6</i>						■					
<i>spp-8</i>						■	■				
<i>spp-9</i>				■			■				
<i>spp-10</i>		■									
<i>spp-12</i>						■					■
<i>spp-14</i>		■		■			■	■			
<i>spp-15</i>		■									
<i>spp-17</i>		■					■			■	
<i>spp-18</i>	■		■			■		■		■	
<i>spp-20</i>									■		
<i>spp-23</i>	■							■			■
Y116F11A.3				■							
F23F1.7			■	■							

Schwarzer Kasten steht für negative Regulation, grauer Kasten für positive Regulation, SE *S. enterica* Serotyp Thyphimurium (Alegado & Tan 2008), BT Cry5B-Toxin von *B. thuringiensis*, welches von *E. coli* exprimiert wurde (Huffman *et al.* 2004), PA *P. aeruginosa* PA14 nach 24 h (Shapira *et al.* 2006), nach 4 h und nach 8 h (Troemel *et al.* 2006), SM *S. marcescens* Db11 nach 24 h und 48 h (Mallo *et al.* 2002), PL *Photobacterium luminescens* nach 24 h (Wong *et al.* 2007), EC *Erwinia carotovora* nach 24 h (Wong *et al.* 2007), EF *E. faecalis* nach 24 h (Wong *et al.* 2007). SA *Staph. aureus* nach 8 h (Iraozqui *et al.* 2010a). MN *Microbacterium nematophilum* nach 6 h (O'Rourke *et al.* 2006), BM *B. megaterium* (Coolon *et al.* 2009), CA *C. albicans* nach 4 h (Pukkila-Worley *et al.* 2011).

Anhand der Tabelle kann man erkennen, dass die Transkriptionsregulation sehr spezifisch für die einzelnen Mikroorganismen ist. Beispielsweise werden *spp-3* und *spp-18* nach Exposition mit *P. aeruginosa* stark positiv reguliert, wohingegen *spp-1*, *spp-4* und *spp-23* negativ reguliert werden (Shapira *et al.* 2006, Troemel *et al.* 2006). Dabei ist die Repression der Transkription von *spp-1* zurückführbar auf das Wirken von Virulenzfaktoren des verwendeten Bakterienstammes (Evans *et al.* 2008). Auch unterscheidet sich die Antwort auf Mikroben deutlich von der Reaktion auf abiotische Faktoren, diese ist in **Tab. 2** dargestellt, so dass man nicht von einer generellen Stressantwort sprechen kann, sondern von einer spezifischen Antwort auf die jeweilige Bedingung.

Obwohl die Transkriptionsänderung der SAPLIP-Gene in der Regel nur maximal vierfach ist, wird interessanterweise die *spp-12*-Transkription bei leichtem osmotischen Stress nach 6 h stark positiv (20-fach) reguliert (Rohlfing *et al.* 2010).

Tab. 2 Transkriptionsänderung der SAPLIP-Gene in Antwort auf abiotische Faktoren in *C. elegans*

Gen	NaCl	Glucose	CdCl ₂	Pestizide	Ethanol
<i>spp-1</i>					
<i>spp-2</i>					
<i>spp-3</i>					
<i>spp-4</i>					
<i>spp-5</i>					
<i>spp-8</i>					
<i>spp-9</i>					
<i>spp-10</i>					
<i>spp-12</i>					
<i>spp-14</i>					
<i>spp-15</i>					
<i>spp-17</i>					
<i>spp-18</i>					

Schwarzer Kasten steht für negative Regulation, grauer Kasten für positive Regulation, Pestizide Organophosphat-haltige Pestizide Dichlorvos, Fenamiphos mit Melloquin als Kontrolle nach 8 h (Lewis *et al.* 2009), NaCl 200 mM nach 6 h (Rohlfing *et al.* 2010), Ethanol 7% nach 6 h (Kwon *et al.* 2004), Glucose 2% (Lee *et al.* 2009), CdCl₂ 1 mM nach 3 h (Huffman *et al.* 2004).

Auf welchem Wege die Regulation der Transkription der *spp*-Gene stattfindet ist noch weitestgehend ungeklärt. Sicher ist dass *spp-1* und *spp-12* Zielgene des DAF-2/DAF-16 Signalwegs sind und die Transkription von *spp-1* und *spp-12* unter anderem durch DAF-16 aktiviert wird (Murphy et al. 2003), da *spp-1* und *spp-12* im DAF-2(-)-Hintergrund positiv reguliert werden. Auch *spp-5* hat wie *spp-1* und *spp-12* mehrere DAF-16-Bindungsstellen in seiner Promotorregion, und wird in Antwort auf Glucosegabe negativ reguliert. Da Glucose DAF-16 inhibiert, ist dies ein weiterer Hinweis, dass *spp-5* ebenfalls über DAF-16 reguliert wird (Lee et al. 2009). Weiterhin werden *spp-14* und *spp-10* durch DAF-2 reguliert (Halaschek-Wiener et al. 2005). Jedoch schließt dies nicht aus, dass die Transkription noch auf anderem Wege beeinflusst wird. So ist die negative Regulation von *spp-1* in Kontakt zu *P. aeruginosa* DAF-2-abhängig, benötigt aber nicht DAF-16 und spricht somit für eine komplexe Regulation von *spp-1*. Diese wird möglicherweise beeinflusst durch ELT-2 oder einen anderen GATA-Motiv bindenden Transkriptionsfaktor, wobei der darmspezifische Transkriptionsfaktor ELT-2 in der Signalkaskade unterhalb von DAF-2/DAF-16 agiert und die *spp-1*-Transkription unter nicht-infizierten Bedingungen aktiviert (Evans et al. 2008). Zusätzlich sind die Phospholipase C β EGL-8 (Kawli et al. 2010b) und die $\Delta 6$ -Desaturase FAT-3 (Nandakumar & Tan 2008) an der Regulation der *spp-1*-Transkription beteiligt.

Die Transkription von *spp-9* und *spp-18* wird durch DKF-2, eine Proteinkinase D in *C. elegans*, reguliert (Ren et al. 2009) möglicherweise über PMK-1, die von *spp-7* durch ACY-1, eine Adenylat-Cyklase und TUB-2, einem *tubby*-Homolog (Alper et al. 2008). Desweiteren wird die *spp-13*- und *spp-1*-Transkription durch OCTR-1, einen putativen G-Protein gekoppelten Katecholamin-Rezeptor kontrolliert, welcher die Unterdrückung von Immunantworten durch die negative Regulation der Transkription der Gene verantwortlich für die Antwort auf ungefaltete Proteine bewirkt (Sun et al. 2011). Außerdem ist *spp-1* für die Abwehr von enteropathogenen *E. coli* (EPEC) nötig und beteiligt an der Konditionierung auf dieses Bakterium, wobei das Pathogen wahrscheinlich über dopaminerge Neuronen wahrgenommen wird, welche dann DAF-16 und PMK-1 aktivieren, und zur Expression der Zielgene beitragen (Anyanful et al. 2009).

Vieles deutet darauf hin, dass die SAPLIPs in *C. elegans* eine Rolle in der Regulation der Lebensspanne spielen bzw. im Alter entsprechend reguliert werden. Stilllegen von *spp-1* und *spp-12* in einer *daf-2*-Mutante führt zu einer reduzierten Lebensspanne (Murphy et al. 2003). Desweiteren wird *spp-13* in jungen Adulten über CTBP-1 reprimiert, ein NAD(H)-abhängiger transkriptionaler Korepressor, welcher wahrscheinlich das Altern über den Insulin-ähnlichen Signalweg und den Lipidmetabolismus moduliert (Chen et al. 2009). Außerdem wird die Transkription von *spp-1* und *spp-4* in 15 Tage alten Würmern negativ reguliert, relativ zu 4 Tage alten Tieren (Youngman et al. 2011).

Die antimikrobiellen und nicht cytotoxischen Eigenschaften, sowie die geringe molekulare Größe der Vertreter der SAPLIP-Proteinfamilie bieten geeignete Voraussetzungen um als Antibiotika Anwendung zu finden.

1.3 Alternative Antibiotika

Durch zu niedrig dosierte, abgesetzte oder unnötig eingenommene Antibiotika kommt es immer häufiger zur Entstehung von Antibiotika-Resistenzen. Diese können in Form von multiresistenten Erregern und solchen, gegen die auch die Notfall-Antibiotika nicht mehr wirken, für den Menschen gefährlich werden. Aus diesem Grund ist es nötig Alternativen zu den klassischen Antibiotika zu finden (Bush 2010), idealerweise antimikrobielle Verbindungen mit einem anderen Wirkmechanismus.

Eine Möglichkeit bieten membranaktive kationische antimikrobielle Peptide, wie z.B. das Esculentin des Frosches, welcher kürzlich in *C. elegans* gegen *P. aeruginosa* getestet wurde. Hier wird die Membran des Pathogens innerhalb des infizierten Wurms permeabilisiert (Uccelletti *et al.* 2010). Antimikrobielle Peptide wirken als endogene Antibiotika durch direkte Zerstörung der Mikroorganismen (Pálffy *et al.* 2009).

Diese Verbindungen haben sowohl den Vorteil, dass die benötigte Dosis wesentlich geringer ist als die vieler traditioneller Antibiotika, als auch dass im Gegensatz zu den klassischen Antibiotika beim Einsatz antimikrobieller Peptide keine Resistenzen beobachtet wurden, da diese einerseits die Membran der Bakterien angreifen und andererseits in der Natur als Waffe gegen diese Bakterien existieren (Gutsmann *et al.* 2003)

C. elegans ist nicht nur ein geeigneter Organismus um antibiotische Verbindungen im Infektionsmodell zu testen (Ewbank & Zugasti 2011), sondern produziert auch selbst antimikrobielle Proteine, welche eventuell als alternative Antibiotika eingesetzt werden können.

1.4 Zielsetzung

In dieser Arbeit lag der Fokus auf der Untersuchung von ausgewählten Mitgliedern der *spp*-Genfamilie kodierend für antimikrobielle Proteine, die Saposin-ähnlichen Proteine in *C. elegans*. Besonderes Interesse galt hierbei *spp-12*, da es im Gegensatz zu den meisten anderen Vertretern dieser Familie keine Bindungsstelle für den darm-spezifischen Transkriptionsfaktor ELT-2 in seiner Promotorregion aufweist (Stanisak 2007). Zum Vergleich sollte mit *spp-1* ein typischer Vertreter hinzugezogen werden, welcher Promotoraktivität im Darm zeigt (Alper *et al.* 2007). Diese Kandidaten wurden ferner ausgewählt, da sie bekannte Zielgene des DAF-2/DAF-16-Signalweges (Murphy *et al.* 2003) sind und für beide bereits antimikrobielle und porenbildende Aktivität *in-vitro* nachgewiesen wurde (Stanisak 2007).

Durch Einbringung von Promotor-*gfp*-Konstrukten sollte mithilfe von Fluoreszenzmikroskopie die Promotoraktivität von *spp-12* im Wurm lokalisiert werden. Des Weiteren sollten die *spp-1*- und die *spp-12*-Mutante ausgekreuzt werden, um sie in verschiedenen phänotypischen Tests zu untersuchen, darunter die Eiablage, die Populationsgröße, die pharyngeale Pumprate und der Fettgehalt. Zusätzlich sollte das Überleben auf diversen Bakterien getestet werden, um eventuelle Defizite im Umgang mit bekannten *C. elegans*-Pathogenen festzustellen. Weiterhin sollte zur Charakterisierung der Mutanten ebenfalls die Lebensspanne in Kontakt mit dem Futterbakterium für *C. elegans* im Labor untersucht werden. Auf diese Weise sollte auf die Funktion der Genprodukte geschlossen werden, welche außerdem als rekombinante Proteine auf ihre antimikrobielle Wirksamkeit gegen die eingesetzten Bakterien getestet werden sollten.

Zusätzlich interessierte die Regulation der Transkription ausgewählter *spp*-Gene in Antwort auf Bakterienexposition mit für *C. elegans* pathogenen und nicht-pathogenen Stämmen.

Darüber hinaus sollte *spp-3*, ein Vertreter, dessen Genprodukt in Bezug auf antimikrobielle Aktivität noch nicht getestet wurde, aber der sich durch Transkriptionsänderung nach Kontakt zu Bakterien auszeichnet (Shapira *et al.* 2006, Wong *et al.* 2007, Roeder *et al.* 2010), rekombinant hergestellt und funktional in Hinsicht auf seine porenbildende Aktivität und sein antimikrobielles Spektrum charakterisiert werden. In diesem Zusammenhang sollte auch die Gewebslokalisierung der Promotoraktivität von *spp-3* und die Auswirkung der Stilllegung des Gens auf die Eiablage und die Anzahl überlebender Bakterien im Darm durch Herstellung und Einbringung eines RNA-Interferenz-Plasmids für *spp-3* im Wurm untersucht werden.

Aus den Ergebnissen dieser Arbeit sollten Informationen über die Bedeutung der einzelnen SPPs unter pathogenen und nichtpathogenen Bedingungen gewonnen werden, um damit zu einem besseren Verständnis der Funktion dieser antimikrobiellen Proteine im Wurm beizutragen.

2 Material und Methoden

2.1 Verbrauchsmaterial und Geräte

Im Folgenden sind die verwendeten Verbrauchsmaterialien (**Tab. 3**) und Geräte (**Tab. 4**) aufgeführt. Die Wurbkugeln wurden freundlicherweise von Prof. Dr. H. Schulenburg (Evolutionsoökologie, Zoologisches Institut, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel) zur Verfügung gestellt.

Tab. 3 Bezugsquellen des verwendeten Verbrauchsmaterials

Hersteller, Standort	Bezeichnung
Applichem, Darmstadt	Ammoniumpersulfat (APS); Bromphenolblau-Natriumsalz; Chloroform; Coomassie-Brilliantblau G-250; K ₂ SO ₄ ; Kaliumacetat; Na ₂ SO ₄ ; MgSO ₄ ; MnCl ₂ ; MOPS (3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure); Natriumazid; Paraformaldehyd; Tris-Maleat; Tween20
Bio-Budget, Krefeld	RNA-Magic
Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf	Phusion HF DNA-Polymerase
Fermentas GmbH, St. Leon-Rot	GeneRuler DNA Ladder Mix; dNTPs; Restriktionsendonukleasen <i>Cfr42I</i> und <i>PstI</i> mit zugehörigem Puffer; Proteinase K, T4-Ligase mit zugehörigem Puffer; <i>Taq</i> -DNA-Polymerase mit dazugehörigem Puffer und MgCl ₂
Invitrogen GmbH, Karlsruhe	Agarose; BODIPY 493/503; SeeBluePlus2 Protein-Größenstandard; Streptomycin; SuperScriptIII Reverse Transkriptase; SYTOX Green
Kodak, Stuttgart	DTDC (3,3'-Diethylthiadicyaniniodid)
Macherey-Nagel, Düren	Nucleospin Plasmid QuickPure; Nucleospin Extrakt II
Merck, Darmstadt	Imidazol
PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen	peq GOLD DNA-Extraktionskits
Pierce Thermo Fisher Scientific, Bonn	Micro BCA (Bichinoninsäure) Protein Assay Kit, Slide-A-Lyser Dialysis Cassette G2
Qiagen GmbH, Hilden	Ni-NTA-Agarose

Hersteller, Standort	Bezeichnung
Roche Applied Science, Mannheim	LightCycler Kapillaren, <i>Restriction Protease FactorXa</i>
Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe	2-Propanol, Acetonitril (ACN); Acrylamid-Löung (32:1/49:1); Agar-Agar Kobe I; Al ₂ (SO ₄) ₃ x H ₂ O; Ampicillin; DTT (1,4-Dithiothreitol); EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure); Essigsäure; Ethanol; Ethidiumbromid; Gentamycin; Glukose; Glycerol; HCl; Hefeextrakt; HEPES; IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid); Kanamycin; KCl; KH ₂ PO ₄ ; K ₂ HPO ₄ ; MES; NaCl; Na ₂ HPO ₄ ; NaH ₂ PO ₄ Natriumhypochlorit (NaOCl); NaOH; Natriumdodecylsulfat (SDS); Palmitinsäure; Pepton aus Casein; o-Phosphorsäure; TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin); TFA; Tricin (N-(2-Hydroxy-1,1-bis(hydroxymethyl)ethyl)glycin); Tris (Tris-(hydroxylmethyl)-methylamin), Wasser (HPLC <i>gradient grade</i>)
Sarstedt, Nürnbrecht	Sämtliches Plastikmaterial
Serva, Heidelberg	BSA (<i>bovine serum albumin</i> , Fraktion V); Trypsin (<i>porcine</i> , NB <i>sequencing grade</i>)
Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim	Alamethicin; Bacto-Pepton; CaCl ₂ ; CHCA (α-Cyano-4-Hydroxy-Zimtsäure); Cholesterol; Cecropin P1; FeSO ₄ ; Iodacetamid (IAA); L-α-Phosphatidylcholin Typ II S (Sojabohne); Magainin II; Melittin; MgCl ₂ ; MnSO ₄ ; NH ₄ HCO ₃ (ABC); Nonidet P40; Tetracyclin; Valinomycin; ZnSO ₄ ;
TAKARA Bio Inc., Tokio, Japan	SYBR <i>Premix Ex Taq</i> (Perfect Real Time)
Waters GmbH, Eschborn	SepPak Vac6cc (500 mg) tC18 Cartidge

Tab. 4 Verwendete Geräte mit Bezugsquelle

Kategorie	Gerätebezeichnung (Hersteller, Standort)
Autoklav	Varioklav® Steam Dampfsterilisator 135 S (H+P Labortechnik, Oberschleißheim, heute Thermo Fisher Scientific Ltd. & Co. KG)
Elektrophorese	PerfectBlue Gelsysteme (PeqLab, Erlangen) Spannungsgeber E835/E861/E143 (Consort N. V., Turnhout, Belgien) Transilluminator mit angeschlossener Kamera (Phase, Lübeck)
Inkubatoren	Inkubationsschüttler (Hassa, Lübeck) Inkubator (Haereus, Hanau) Thermomixer compact und comfort (Eppendorf AG, Hamburg) Thermostatschrank AL428210 (Aqua@lytic, Dortmund)

Kategorie	Gerätebezeichnung (Hersteller, Standort)
Mikroskope	<p>Fluoreszenzmikroskop Axiomager.Z1 mit Apotome und MRm Rev. 2D-Kamera und Software Axiovision Res 4.7 (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Hamburg)</p> <p>Inverses Mikroskop Leica DM IL (Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar) mit Mikromanipulator inklusive Joystick M/W (Phyton-Elektronik GmbH, Gröbenzell)</p> <p>Stereomikroskop Leica M80/MDG35 (Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar) mit Lichtgeber KL 1500 LCD (Lighting and Imaging Schott AG, Mainz)</p>
PCR	<p>Light-Cycler (Roche Applied Science, Mannheim)</p> <p>Mastercycler <i>EPGradient</i> (Eppendorf AG, Hamburg)</p>
Photometer	<p>Fluoreszenz-Spektrometer LS50B (Perkin-Elmer, Fremont, USA) Software FL Winlab, Programm Lipo.mth</p> <p>Fluoroskan II (Labsystems Merkin, Bornheim-Hersel)</p> <p>NanoDrop ND-100 Spektrophotometer (Thermo Scientific, Bonn)</p> <p>Titertek Multiskan® MCC/340 Platten-Spektrometer (Flow Laboratories, Korea) mit Analogschreiber</p> <p>Ultrospec 1100 pro (Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg)</p>
Sonstiges	<p>Gefriertrocknungsanlage Alpha 2-4 LSC</p> <p>pH-Meter (WTW, Weilheim)</p> <p>Vortex Schüttler REAX 1 (Heidolph Instruments GmbH & Co. KG)</p> <p>Wasseraufbereitungsanlage <i>GenPure</i>, TKA (TKA Wasseraufbereitungssysteme GmbH, Niederelbert)</p>
Ultraschall	<p>Sonotrode MS73 <i>Sonoplus</i> (Bandelin Homogenisatoren HD 2070, Berlin)</p> <p>Ultraschallbad Sonorex Super RK 106 (Bandelin Sonorex, Berlin)</p>
Waagen	<p>Analysewaage ABJ 220-4M (Kern & Sohn AG, Balingen)</p> <p>Waage 1219MP (Sartorius AG, Göttingen)</p>
Zentrifugen	<p>Eppendorf MiniSpin® Tischzentrifuge (Eppendorf AG, Hamburg)</p> <p>Kühlzentrifuge Centricon H-401 (Kontron, München)</p> <p>Kühlzentrifuge Eppendorf 5417R (Eppendorf AG, Hamburg)</p> <p>Kühlzentrifuge Rotanta 460R (Hettich-Zentrifugen GmbH & Co. KG, Tuttlingen)</p> <p>SpeedVac® concentrator SPD series SPD131DDA (Thermo Electron GmbH, Karlsruhe)</p>

2.2 Lösungen, Puffer, Medien und Medienzusätze

Die Zusammensetzung der verwendeten Lösungen, Puffer, Medien und Medienzusätze kann der **Tab. 5** entnommen werden.

Tab. 5 Zusammensetzung der verwendeten Lösungen

Lösung	Zusammensetzung
2xTY-Medium	16% Pepton; 1% Hefe-Extrakt; 86 mM NaCl; autoklaviert
6x DNA-Ladepuffer	50% Glycerol; 60 mM EDTA; 6% SDS; 0,9% Bromphenolblau; pH-Wert 8,0
Anodenpuffer	0,2 M Tris; pH 8,9
Antibiotika (Endkonzentration)	Ampicillin 100 µg/ml Kanamycin 15 µg/ml Gentamycin 50 µg/ml Streptomycin 50 µg/ml Tetrazyklin 12,5 µg/ml
BT-Medium	0,75% Bacto-Pepton; 5 mM Glukose; 25 mM KH ₂ PO ₄ ; 25 mM K ₂ HPO ₄ ; pH-Wert 7,2, autoklaviert
Coomassie- Entfärbe-Lösung	10% Ethanol; 2% o-Phosphorsäure
Gefrierlösung	0,1 M NaCl; 50 mM KPO ₄ -Puffer pH 6,0; 25% Glycerol; in Wasser, nach dem Autoklavieren 0,3 mM MgSO ₄ (sterilfiltriert)
Gelpuffer, 3 x	3 M Tris; 0,3% SDS; pH 8,45
Inkubationspuffer für Test auf membran- permeabilisierende Aktivität	20 mM MES, pH 5,2; 25 mM NaCl
Kaliumphosphat- Puffer	1 M K ₂ HPO ₄ ; 1 M KH ₂ PO ₄ ; pH 6,0 durch Titration der beiden Lösungen, autoklaviert
Kathodenpuffer	0,1 M Tris; 0,1 M Tricin; 0,1% SDS, pH 8,4
Kolloidale Coomassie- Färbelösung	5% Al ₂ (SO ₄) ₃ x H ₂ O; 10% Ethanol; 0,02% Coomassie Brilliantblau G-250; 2% o-Phosphorsäure
Küvettenpuffer	50 mM Tris-Maleat; 50 mM Na ₂ SO ₄ ; 0,5 mM EDTA-Na ₂ ; 0,02% Natriumazid; NaOH zur Einstellung des pH-Wertes
LB-Medium	1% NaCl; 1% Pepton; 0,5% Hefeextrakt; (1% Agar für Platten); autoklaviert
Liposomenpuffer	50 mM Tris-Maleat; 50 mM K ₂ SO ₄ ; 0,5 mM EDTA-Na ₂ ; 0,02% Natriumazid, KOH zur Einstellung des pH-Wertes auf 5,2

Lösung	Zusammensetzung
Modifiziertes NGM	wie NGM, aber 0,35% Pepton
Natriumphosphat-Puffer	10 mM Na ₂ HPO ₄ ; 10 mM NaH ₂ PO ₄ ; pH-Wert 5,2 bzw. 7,4 durch Titration der beiden Lösungen, autoklaviert
NGM-Medium <i>Nematode-growth medium</i>	51 mM NaCl; 0,25% Pepton; 1,7% Agar; in Wasser, nach dem Autoklavieren 5 µg/ml Cholesterol in Ethanol; 1 mM MgSO ₄ (autoklaviert); 1 mM CaCl ₂ (autoklaviert); 25 mM KPO ₄ -Puffer, pH 6,0 (autoklaviert)
PBS	75 mM NaCl; 16 mM KCl; 2,5 mM NaH ₂ PO ₄ ; 10 mM Na ₂ HPO ₄ ; pH 7,2, autoklaviert.
Protein-Ladepuffer, 2 x	125 mM Tris; 20% Glycerol; 4% SDS; 0,05% Bromphenolblau
PFM-Medium <i>Peptone-free medium</i>	NGM ohne Pepton
Rettungspuffer	5 mM HEPES, pH 7,2; 3 mM CaCl ₂ ; 3 mM MgCl ₂ , 66 mM NaCl; 2,4 mM KCl; 4% Glukose
Salzlösung für Sporenerstellung	100 mM MgSO ₄ ; 2,5 mM MnSO ₄ ; 10 mM ZnSO ₄ ; 14,5 mM FeSO ₄ ; sterilfiltriert
SOC-Medium	2% Pepton; 0,5% Hefeextrakt; 10 mM NaCl; 25 mM KCl; 10 mM MgCl ₂ ; 10 mM MgSO ₄ ; in Wasser, nach dem Autoklavieren 20 mM Glukose (sterilfiltriert)
TAE	400 mM Tris; 1,142% Essigsäure; 100 mM EDTA
TBS	20 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7,4
TfBI	30 mM Kaliumacetat; 50 nM MnCl ₂ ; 100 mM KCl; 10 mM CaCl ₂ ; 15% Glycerol, sterilfiltriert
TfBII	10 mM MOPS; 75 mM CaCl ₂ ; 10 mM KCl; 15% Glycerol; pH 7,0, sterilfiltriert
Wurmlysemix	50 mM KCl; 10 mM Tris-HCl, pH 8,3; 2,5 mM MgCl ₂ ; 0,45% Nonidet P40; 0,45% Tween20; 1 mg/ml Proteinase K

2.3 Plasmide und Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide wurden von Biomers (Ulm) bezogen (**Tab. 6**).

Tab. 6 Verwendete Oligonukleotide

Name	Sequenz	Anwendung
Oligo dT-T7	5'-gagagaggatccaagtactaataacgactcactat agggagatTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTv-3'	cDNA-Synthese
RA_spp-1_for	5'-gccaatccagtaaccactc-3'	qRT-PCR
RA_spp-1_rev	5'-gcacaaatcaacatcctgcac-3'	qRT-PCR
RA_spp-2_for	5'-actgtgcttgctgctgtg-3'	qRT-PCR
RA_spp-2_rev	5'-tcctgtggagcaaatggaat-3'	qRT-PCR
RA_spp-3_for	5'-catcgacagaggctaattgaa-3'	qRT-PCR
RA_spp-3_rev	5'-cagacgtcagatggagcagtt-3'	qRT-PCR
RA_spp-4_for	5'-cttgtgctagccgttttgg-3'	qRT-PCR
RA_spp-4_rev	5'-ttgtggggcaaatggaatag-3'	qRT-PCR
RA_spp-5_for	5'-gtcgccgttgccctcaggacttg-3'	qRT-PCR
RA_spp-5_rev	5'-gggcattcgtaagcttggtgc-3'	qRT-PCR
RA_spp-6_for	5'-acaacgcaatgccttagactg-3'	qRT-PCR
RA_spp-6_rev	5'-gaacactcgccaagtttgtg-3'	qRT-PCR
RA_spp-9_for	5'-agcaagtgcgtttgactgttt-3'	qRT-PCR
RA_spp-9_rev	5'-ttctgggtgcagttccagattc-3'	qRT-PCR
RA_spp-12_for	5'-ctcacggagcattttgtcatc-3'	qRT-PCR
RA_spp-12_rev	5'-caacagagttggcttctttgc-3'	qRT-PCR
RA_spp-18_for	5'-cattcctcgctctcgatgtg-3'	qRT-PCR
RA_spp-18_rev	5'-gcatgattcttgacgtgtca-3'	qRT-PCR
Primer A spp-12	5'-caccaatacacaatcgag-3'	Generierung von <i>Promotor::gfp</i> - Konstrukten mittels Fusions-PCR, unterstrichene Sequenzen markieren den Überlappungs- bereich mit dem Fusionspartner, nicht unterstrichene Sequenzen sind genspezifisch, bzw. vektorspezifisch
Primer B spp-12	5'- <u>gtcgacctgcaggcatgcaagctt</u> atcctctggaa tctcttg-3'	
Primer A spp-3	5'-gagaggttttggctgatagcg-3'	
Primer B spp-3	5'- <u>gtcgacctgcaggcatgcaagctt</u> acacattcca agcttggtgcag-3'	
Primer C pPD95_77	5'- <u>aagcttgcctgcctgcaggtc</u> -3'	
Primer D pPD95_77	5'-ggaaacagttatgtttgtata-3'	

Name	Sequenz	Anwendung
<i>spp-1</i> Mut_IntFWD	5'-tgaaaaatccggagagccta-3'	Genotypisierung
<i>spp-1</i> Mut_IntREV	5'-gatgctgcggtgtccagtag-3'	Genotypisierung
<i>spp-12</i> Mut_IntFWD	5'-aacctatgacatcatggag-3'	Genotypisierung
<i>Spp-12</i> Mut_IntREV	5'-ccctacctccacaattaac-3'	Genotypisierung
T7_Promotor	5'-taatacgactcactatggag-3'	vektorspezifisch
T7_Terminator	5'-gctagtattgctcagcg-3'	vektorspezifisch
CP3_pIVEX2.4a_for	5'-gagaccg cg caatggaattgaatgtg-3'	Expression, <i>Cfr42I</i>
CP3_pIVEX2.4a_rev	5'-gagactg cag taacacattccaagc-3'	Expression <i>PstI</i>

Tab. 7 Verwendete Plasmide

Name	Herkunft/Referenz	Anwendung
L4440	<i>Caenorhabditis Genetics Center CGC</i>	RNA-Interferenz
L4440 <i>spp-1</i>	Ahringer RNAi-Sammlung	RNA-Interferenz
L4440 <i>spp-3</i>	diese Arbeit	RNA-Interferenz
L4440 <i>spp-12</i>	Ahringer RNAi-Sammlung	RNA-Interferenz
L4440 Y110A7A.4	Ahringer RNAi-Sammlung	RNA-Interferenz Kontrolle
pPD95_77	A. Fire	<i>gfp</i> -Vektor
pRF4 <i>rol-6</i>	Kramer <i>et al.</i> 1990	Selektionsmarker für Mikroinjektion
pIVEX2.4a	Roche Applied Science (Mannheim)	Expressionsvektor
pIVEV2.4a <i>spp-3</i>	diese Arbeit	Expressionsvektor

2.4 Nematoden- und Bakterienstämme

Tab. 8 Verwendete Bakterienstämme

Bakterienstamm	Beschreibung/Verwendung	Herkunft
<i>Escherichia coli</i> OP50	Futterbakterium für <i>C. elegans</i>	CGC
<i>Escherichia coli</i> OP50 I	Futterbakterium für <i>C. elegans</i> Streptomycin-Resistenz	CGC
<i>Escherichia coli</i> HT115	RNase III defizienter Stamm	CGC
<i>Bacillus thuringiensis</i> DSM 350	für Nematoden nicht- pathogener Stamm	Prof. Dr. H. Schulenburg (Evolutionsoökologie und Genetik, Zoologisches Institut, Christian- Albrechts-Universität zu Kiel)
<i>Bacillus thuringiensis</i> NRRL-B18247	nematoden-pathogener Stamm	
<i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i> PA01	nematoden- und human- pathogener Stamm OD ₆₀₀ von 0,1 entspricht 6,3 x 10 ⁷ CFU/ml	
<i>Serratia marcescens</i> Db11	nematoden- und human- pathogener Stamm OD ₆₀₀ von 0,1 entspricht 5,0 x 10 ⁷ CFU/ml	
<i>Photorhabdus</i> <i>luminescence</i> Hb	nematoden-pathogen OD ₆₀₀ von 0,1 entspricht 7,4 x 10 ⁶ CFU/ml	
<i>Xenorhabdus</i> <i>nematophila</i> F1	nematoden-pathogen OD ₆₀₀ von 0,1 entspricht 7,0 x 10 ⁷ CFU/ml	
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 12600	OD ₆₀₀ von 0,1 entspricht 6,1 x 10 ⁷ CFU/ml	Laborsammlung
<i>Yersinia enterocolitica</i> 96 C	OD ₆₀₀ von 0,1 entspricht 2,8 x 10 ⁷ CFU/ml	Laborsammlung
<i>Escherichia coli</i> K12 D31	OD ₆₀₀ von 0,1 entspricht 2,5 x 10 ⁷ CFU/ml	Laborsammlung
<i>Bacillus megaterium</i> ATCC 14581	OD ₆₀₀ von 0,1 entspricht 2,8 x 10 ⁶ CFU/ml	Laborsammlung
<i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3) pAPIacI ^Q	Expressionsbakterien, Kanamycin-Resistenz	Dr. J. Clos, Bernhard- Nocht-Institut für Tropenmedizin, Hamburg, Hellberg <i>et al.</i> 2002

Tab. 9 Verwendete Nematodenstämme

C. elegans-Stamm	Beschreibung/Verwendung	Herkunft
N2-Bristol	Wildtyp-Stamm	CGC
RB2045 <i>spp-1</i> (<i>ok2703</i>) III.	700 bp große Deletion (mindestens zwei Drittel der Gensequenz betroffen), viermal rückgekreuzt, vollständig lebensfähig	CGC, diese Arbeit
<i>spp-12</i> (<i>tm2963</i>) V.	328 bp große Deletion und 20 bp Insertion: größter Teil des 451 bp großen Gens fehlt, viermal rückgekreuzt, vollständig lebensfähig	NBP Japan, diese Arbeit
Doppelmutante <i>spp-1;spp-12</i>	wurde ausgehend von den rückgekreuzten Einzelmutanten hergestellt	diese Arbeit
CF1379 <i>daf-2</i> (<i>mu150</i>) III.	dreifach rückgekreuzt	Murphy <i>et al.</i> 2003
<i>spp-3p::spp-3::gfp /rol-6</i>	Promotor und komplette Gensequenz fusioniert mit <i>gfp</i> injiziert in N2	diese Arbeit
<i>spp-12p::spp-12(97)::gfp / rol-6</i>	Promotor und Gensequenz für 97 von 106 Aminosäuren einschließlich des ersten Introns fusioniert mit <i>gfp</i> injiziert in N2	diese Arbeit

2.5 Haltung von *C. elegans* im Labor und wurmbezogene Methoden

2.5.1 Aufrechterhaltung der Wurmstämme

Die Haltung der Wurmstämme erfolgte auf 90 mm großen NGM-Agarplatten mit 500 µl einer *Escherichia coli* OP50-Kultur, welche über Nacht bei 37 °C in 2xTY-Medium gewachsen war. Ein bis zweimal die Woche wurde von einer NGM-Platte mit ausreichender Wurmpopulation ein circa ein Quadratzentimeter großes Stück ausgeschnitten und auf eine frische Agarplatte transferiert. Somit wurden die Wurmstämme für die Versuche bereitgehalten.

2.5.2 Gefrierlagerung von *C. elegans*

Für längere Zeit nicht benötigte Stämme eignete sich die Aufbewahrung bei -80 °C (Stiernagle 2006). Dafür wurden die Würmer zu dem Zeitpunkt mit M9-Puffer von der NGM-Agarplatte gespült, bei dem der Bakterienvorrat gerade aufgebraucht war. Nach dem Absinken der Würmer und Abnahme eines Teils des Überstandes wurde die

gleiche Menge Gefrierlösung dazugegeben und die Würmer in Gefriergefäßen langsam auf -80 °C eingefroren.

2.5.3 Synchronisation von *C. elegans*

Zum Erhalt von Tiere ausschließlich des gleichen Alters, diente die Synchronisation der Population. Hierfür wurden Wurm-Platten mit vorzugsweise adulten Hermaphroditen verwendet, welche schon ausreichend Eier gelegt hatten und auch welche in sich trugen. Diese wurden mit 5 ml sterilem Wasser von der Platte gespült und der Überstand nach dem Absinken der Würmer bis auf 3,5 ml abgenommen. Durch Zugabe einer Mischung aus 0,5 ml 5 M Natronlauge und 0,5 ml 12% Natriumhypochlorit (NaOCl) wurden innerhalb von 3 min die Wurmkörper aufgebrochen und die darin enthaltenen Eier freigesetzt, welche durch ihre Chitin-Außenhülle vor der Zersetzung geschützt waren. Zur raschen Entfernung der Bleichelösung erfolgte eine Zentrifugation bei 1300 x g und 20 °C für 2 min, so dass der Überstand abgenommen und durch Wasser ersetzt werden konnte. Nach erneuter Zentrifugation und Abnahme des Überstands wurden die Tiere entweder auf mit *E. coli* OP50 beimpfte NGM-Agarplatte ausgebracht oder mit M9-Puffer auf einem Rolltisch über Nacht inkubiert. Im Salzpuffer schlüpfen die Larven, entwickeln sich aber aufgrund des Nährstoffmangels nur bis zum ersten Larvenstadium, so dass man absolut synchrone Würmer erhält.

2.5.4 Wurmlyse und *Single-Worm-PCR*

Um den Genotyp eines *C. elegans*-Stammes mit einer Deletion in der genomischen DNA zu verifizieren, wurde regelmäßig eine *Single-Worm-PCR* durchgeführt. Dazu wurde ein Wurm in 10 µl Wurm-Lyse-Mix eingefroren und dann 30 Minuten bei 60 °C inkubiert. In dieser Zeit wurden die Gewebestrukturen aufgebrochen. Die anschließenden 10 Minuten bei 95°C dienten der Inaktivierung der Proteinase K. Mit der freigesetzten DNA konnte nun die PCR erfolgen.

2.5.5 Bestimmung der Populationsgröße

Jeweils 10 synchronisierte L4-Hermaphroditen wurden in 3 Replikaten auf 120 mm-große NGM-Platten mit 1 ml *E. coli* OP50 transferiert. Ihnen wurde innerhalb von 5 Tagen bei 20 °C gestattet eine Population zu gründen. Anschließend wurden alle Würmer und Eier mit M9-Puffer von der Platte gespült und mit dem COPAS Biosort (*Wurmsorter*) gezählt, welcher in der Arbeitsgruppe von Professor Döring, der Abteilung Molekulare Prävention der CAU, zur Verfügung stand.

2.5.6 Bestimmung der Eiablagerrate

Die Eiablagerrate wurde auf zweierlei Weise jeweils in mindestens 5 Replikaten bei 15 °C, 20 °C und 25 °C auf NGM-Agarplatten mit *E. coli* OP50 bestimmt. Für die RNAi-

behandelten Würmer wurde die Rate der Eiablage nur durch die erste Methode in jeweils 10 Replikaten bei 20 °C bestimmt.

Bei der ersten Methode wurden fünf Hermaphroditen am ersten Tag des Erwachsenseins auf 60 mm-Platten gesetzt und nach 24 h der Nachwuchs gezählt. Dadurch wurden nur die Eier in Betracht gezogen, welche zu Beginn des Eiablage-Zeitraums gelegt werden.

Die zweite Methode bezieht auch die spätere Eiablage mit ein. Dafür wurde ein L4-Hermaphrodit auf 3 mm-Platten gesetzt, wobei der dann adulte Wurm jeden Tag auf eine neue Platte transferiert und die gelegten Eier gezählt wurden bis die Eiproduktion eingestellt war.

2.5.7 Bestimmung der Entwicklungsrate

Adulte Hermaphroditen wurden auf NGM-Platten mit *E. coli* OP50, *P. aeruginosa* PA01 oder *S. marcescens* Db11 bzw. auf PFM-Platten mit Sporen des nicht-pathogenen *B. thuringiensis*-Stammes DSM350 oder des pathogenen *B. thuringiensis*-Stammes BT247 verdünnt in *E. coli* OP50 gesetzt. Wobei die Sporenkonzentration 2×10^8 Sporen in 6×10^9 *E. coli* OP50 pro ml betrug. Nach 1 h bei 17 °C wurden die Adulten wieder abgesammelt und die Platten mit den in der Zeit gelegten Eiern zu 20 °C bzw. 25 °C transferiert. Zu bestimmten Zeitpunkten wurden dann jeweils mindestens drei Würmer in einem Tropfen 0,1% Natriumazid auf einen Objektträger fixiert. Die Entwicklungsrate wurde unter dem Mikroskop anhand folgender Kriterien bestimmt: Die Tiere wurden als L1 gewertet, wenn die Gonade aus nicht mehr als vier Zellen bestand, als L2, wenn die Gonade mehr als vier Zellen aufwies. L3-Larven zeichneten sich durch bereits vollzogene Rotation der Gonadenarme aus und L4-Larven durch die Entwicklung der Vulva. Schließlich wurden die Würmer als adult beziffert, wenn Eier sichtbar waren.

2.5.8 Bestimmung der pharyngealen Pumprate

Jeweils 10 synchronisierte L4-Hermaphroditen wurden in 3 Replikaten 1 h vor Versuchsbeginn auf die entsprechenden 60 mm-Platten mit 200 µl Bakterien gesetzt, entweder NGM-Platten mit lebenden bzw. hitzeinaktivierten *E. coli* OP50 oder PFM-Platten mit Sporen des nicht-pathogenen *B. thuringiensis*-Stammes DSM350 oder des pathogenen *B. thuringiensis*-Stammes BT247 verdünnt in *E. coli* OP50. Wobei die Sporenkonzentration 2×10^8 Sporen in 6×10^9 *E. coli* OP50 pro ml betrug. Die Hitzeinaktivierung erfolgte durch zweistündige Inkubation bei 80 °C im Wasserbad einer zuvor mit Gentamycin (final 50 µg/ml) behandelten und zweifach konzentrierten Übernacht-Kultur. Nach 1, 6 und 26 h wurde die pharyngeale Pumprate von fünf zufällig ausgewählten Würmern durch Bestimmung der Anzahl rhythmischer Kontraktionen des Grinders innerhalb von 20 s, gemessen. Es wurden zwei unabhängige Experimente bei 20 °C durchgeführt.

2.5.9 Bestimmung der Anzahl lebender Bakterien im Darm

Würmern am Übergang zum Erwachsenenstadium wurde 1 h lang Streptomycin-resistente *E. coli* OP50 I gefüttert. Dann wurden diese mit M9-Puffer unter Zusatz von 15 µg/ml Kanamycin mehrmals gewaschen und anschließend auf sterile NGM-Platten zur weiteren Entfernung anhaftender Bakterien ausgebracht. Nach 1 h erfolgte die Zerkleinerung von je 20 Würmern im Glashomogenisator in 150 µl M9-Puffer und die resultierende Mischung wurde auf LB-Agarplatten mit 50 µg/ml Streptomycin ausplattiert. Nach Inkubation über Nacht bei 37 °C wurde durch Auszählung der Kolonien die Anzahl lebender Bakterien im Darm bestimmt.

2.5.10 Fettfärbung mit BODIPY

Mit dem Farbstoff BODIPY (Boron-dipyrromethen) ist es möglich den Fettanteil der Würmer sichtbar zu gemacht. Hierfür wurden die Tiere in M9-Medium mit 1% Natriumazid für 2 min auf Eis inkubiert und anschließend das Natriumazid durch zweimaliges Waschen mit kaltem M9 wieder entfernt. Die Fixierung erfolgte mit 4%igem Paraformaldehyd für 15 min bei Raumtemperatur. Nach drei Zyklen Einfrieren in flüssigem Stickstoff und Auftauen wurde dreimal mit kaltem M9 gewaschen und die Waschlösung weitestgehend entfernt. Nun wurde die BODIPY-Lösung in einer Konzentration von final 1 µg/ml zugegeben und für 1 h bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Schließlich wurde der Fluoreszenzfarbstoff durch dreimaliges Waschen mit M9 wieder entfernt und der Fettgehalt der Würmer mithilfe eines Fluoreszenzmikroskops visualisiert. Zum Vergleich des Fettanteils verschiedener Wurmstämme wurde jeweils die Belichtungszeit konstant gehalten.

2.5.11 Lebensspannen-Analyse

Die Lebensspanne wurde bei 20 °C und 25 °C auf mit Palmitinsäure umrandeten 60 mm-NGM-Platten mit 200 µl *E. coli* OP50 durchgeführt, zusätzlich bei 20 °C auch mit hitzeinaktivieren *E. coli* OP50. Die Hitzeinaktivierung erfolgte durch zweistündige Inkubation bei 80 °C im Wasserbad einer zuvor mit Gentamycin (final 50 µg/ml) behandelten und zweifach konzentrierten Übernacht-Kultur. Je 10 synchronisierte L4-Hermaphroditen in 5 Replikaten wurden jeden zweiten Tag, nach dem Ende der Eiablage nur noch alle sieben Tage, auf neue Platten transferiert. Die Tiere wurden als tot bewertet, wenn sie auf leichte Berührung mit der Wimper keine Reaktion zeigten. Würmer, welche durch Abgabe des Körperinhalts durch die Vulva (*exploded*-Phänotyp) verendeten oder von der Platte verschwunden waren, wurden zensiert. Es wurden mindestens drei unabhängige Experimente durchgeführt.

2.5.12 Überlebensrate auf *B. thuringiensis*

Zur Bestimmung der Überlebensrate auf *B. thuringiensis* wurden jeweils 10 synchronisierte Hermaphroditen in 5 Replikaten auf mit Palmitinsäure umrandete 60 mm-PFM-Platten mit 200 µl einer Mischung aus *B. thuringiensis*-Sporen und *E. coli* OP50 gesetzt. Hierbei wurden entweder Sporen des nicht-pathogenen *B. thuringiensis*-Stammes DSM350 oder des pathogenen *B. thuringiensis*-Stammes BT247 in einer Konzentration von 2×10^8 Sporen in 6×10^9 *E. coli* OP50 pro ml verwendet. Über eine Dauer von 22 Tagen wurden die Würmer jeden zweiten bis dritten Tag auf frische Platten transferiert und dabei als tot gewertet, wenn sie auf leichte Berührung mit der Wimper keine Reaktion zeigten. Würmer, welche durch Abgabe des Körperinhalts durch die Vulva (*exploded*-Phänotyp) verendeten oder von der Platte verschwunden waren, wurden zensiert. Es wurden mindestens drei unabhängige Experimente durchgeführt.

2.5.13 Vermessung des Pharynx sowie der Darmweitung und Körpermaße nach Exposition mit *B. thuringiensis*

Synchronisierte L4-Hermaphroditen wurden auf 60 mm-PFM-Platten mit 200 µl einer Mischung aus *B. thuringiensis*-Sporen und *E. coli* OP50 gesetzt. Hierbei wurden ausschließlich Sporen des pathogenen *B. thuringiensis*-Stammes BT247 in einer Konzentration von 2×10^8 Sporen in 6×10^9 *E. coli* OP50 pro ml verwendet. Nach 24 h wurden am Mikroskop mit dem Vermessungswerkzeug des Programms Axiovision einzelne Parameter bestimmt, darunter die Größe der Bulbi und des Isthmus des Pharynx, die Weitung des anterioren Abschnitts des Darms, sowie die Körperlänge und Körperbreite.

2.5.14 Produktion der *B. thuringiensis*-Sporen

Unter bestimmten Bedingungen produziert *B. thuringiensis* Sporen, welche man konzentriert, in kleine Volumen aliquotiert bei -20°C lagern kann (Leyns *et al.* 1995). Dadurch ist es möglich für alle Versuche Sporen aus derselben Kultur zu verwenden. Dies ist erforderlich, da die Sporenkonzentration und Toxizität verschiedener Kulturen sehr unterschiedlich sein kann. Zur Herstellung einer Sporen-Kultur wurde BT-Medium mit 0,5% Salzlösung und 1,25 mM CaCl_2 mit *B. thuringiensis* beimpft und 7 Tage bei 28°C schüttelnd inkubiert. Am dritten Tag wurde nochmals Salzlösung und CaCl_2 zugegeben. Am siebten Tag erfolgte nach der mikroskopischen Prüfung der Sporen die Ernte durch Zentrifugation. Die Sporensedimente wurden in PBS gelöst und in Aliquots bei -20°C eingefroren. Vor dem ersten Gebrauch wurden die Sporenkonzentration und die Toxizität gegenüber Wildtyp-Würmern bestimmt.

2.5.15 RNA-Interferenz

Das RNA-Interferenz-(RNAi)-Verfahren kann dazu verwendet werden interessierende Gene stillzulegen, indem die zugehörige mRNA durch Einbringung komplementärer doppelsträngiger RNA abgebaut wird. Waren RNAi-Stämme nicht in der Ahringer RNAi-Sammlung zugänglich, wurde die kodierende Sequenz in den Vektor L4440 mit den Restriktionsschnittstellen *Cfr42I* und *PstI* kloniert und *E. coli* HT115 mit diesem transformiert. Die Über-Nacht-Kultur der RNAi-Bakterien wurde zweifach konzentriert auf NGM-Platten mit 1 mM IPTG und 250 µg/ml Ampicillin ausgebracht und die Würmer auf diesen mindestens 3 Generationen kultiviert, bevor sie in den entsprechenden Versuchen eingesetzt wurden. Als negativ Kontrolle diente der leere Vektor und als RNAi-Kontrolle wurde Y117A7A.4 (Thymidylat-Synthase) verwendet, dieses führt zu embryonaler Letalität. Zusätzlich wurde die Abwesenheit der *spp-3*-mRNA nach RNA-Extraktion und reverser Transkription durch Polymerase-Kettenreaktion mit *spp-3*-spezifischen Oligonukleotiden nachgewiesen.

2.5.16 Mikroinjektion von Promotor-*gfp*-Konstrukten zur Gewebslokalisierung

Durch eine Fusions-PCR (Boulin *et al.* 2006) wurde der Promotorbereich des Gens *spp-12* einschließlich des ersten Introns an das Reportergen *gfp* gekoppelt. Die Oligonukleotide wurden so konzipiert, dass die letzten 30 Nukleotide des Gens nicht im Konstrukt enthalten sind (Tab. 6). Dadurch ist das dazugehörige Protein zehn Aminosäuren kürzer, wodurch zwei der konservierten Cysteine dem Fusionsprodukt fehlen. Es handelt sich also nicht um eine gleichzeitige Überexpression von *spp-12*. Das *spp-3p::spp-3::gfp*-Fusionskonstrukt wurde ebenfalls durch eine Fusions-PCR hergestellt, jedoch enthält dieses neben dem Promotorbereich die gesamte Gensequenz von *spp-3*.

Mikroinjektion ist eine effektive Methode um transgene Tiere zu erhalten. Dabei wird DNA in den distalen Arm der Gonade injiziert (Mello *et al.* 1991 und Mello & Fire 1995). Für die Injektion wurde eine Glaskapillare (Femtotips I von Eppendorf) mit 100 ng/µl DNA des gewünschten Promotor-*gfp*-Konstrukts und des Plasmids pRF4 mit dem Selektionsmarkergen *rol-6(su1006)* befüllt. Dabei entfielen 50 ng/µl auf das Plasmid pRF4 mit dem Selektionsmarkergen *rol-6(su1006)*, welches für eine veränderte Form des Kollagens kodiert (Kramer *et al.* 1990).

Wohlgenährte, junge adulte Hermaphroditen mit einer vollen, aber einzigen Reihe an Eiern wurden auf einen Objektträger auf ein 2%iges Agarosekissen geklebt und mit Injektionsöl (Voladef) überschichtet. Die DNA wurde dann mit Hilfe einer Injektionsapparatur, welche an einem Mikroskop installiert ist, mittels Luftdruck in den distalen Arm der Gonade geschossen. Die distale Keimbahn von *C. elegans* enthält einen zentralen Kern von Cytoplasma, welches von vielen Keimzellnuklei geteilt wird.

Später, wenn sich Oocyten in der proximalen Region des Ovars formen, werden die Keimzellnuklei zusammen mit Teilen des Cytoplasmas von einer Membran eingeschlossen. Auf diese Weise kann DNA, welche hierhin gebracht wird, an viele Nachkommen weitergegeben werden. Nach erfolgreicher Injektion wurde der Wurm mit Rettungspuffer beträufelt und für einige Minuten in einer feuchten Kammer bei 27 °C inkubiert. Anschließend wurde der dadurch rehydrierte Wurm auf den Teil einer mit OP50 beimpften NGM-Platte gesetzt, welcher frei von Bakterienrasen war. Am darauffolgenden Tag wurden die überlebenden Würmer auf neue Platten umgesetzt und von nun an der Nachwuchs auf rollende Tiere untersucht. Diese exprimieren das Selektionsmarkergen *rol-6*, welches einen dominanten „roller“-Phänotyp hervorruft, bei dem die Tiere sich korkenzieherartig im Kreis drehen. Schließlich wurden rollende und leuchtende Würmer, die ebenfalls das gewünschte Promotor-*gfp*-Konstrukt aufgenommen hatten, vermehrt und untersucht. Durch die Fluoreszenz des GFP wurde am Mikroskop der Ort der Expression von *spp-12* im Gewebe lokalisiert. Promotor-*gfp*-Konstrukte und transgene Tiere durch Mikroinjektion wurden mit Hilfe von Dr. Kerstin Isermann (ehemals Zoophysilogie, Zoologisches Institut, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel) hergestellt

2.6 Molekularbiologische Methoden

2.6.1 Polymerase-Kettenreaktion (*Polymerase Chain Reaction, PCR*)

Die Polymerase-Kettenreaktion ist eine Methode zur Vervielfältigung von DNA zwischen zwei entgegengesetzt ausgerichteten Oligonukleotiden durch das Enzym DNA-Polymerase in mehreren Zyklen. Jeder Zyklus besteht wiederum aus drei Phasen mit unterschiedlichen Temperaturen. In der ersten Phase wird der DNA-Doppelstrang bei hoher Temperatur aufgeschmolzen (Denaturierung, 95 °C), gefolgt von der Anlagerung der Oligonukleotide bei einer Temperatur abhängig von ihrer Schmelztemperatur in der zweiten Phase (*Annealing*). Die Temperatur der dritten Phase entspricht der optimalen Arbeitstemperatur der Polymerase, welche nun den komplementären DNA-Strang synthetisiert (Elongation, 72 °C für die *taq*-Polymerase von Fermentas und die Phusion *Proof-Reading*-Polymerasen von Biozym). Ein üblicher PCR-Ansatz von 50 µl enthielt eine Einheit Polymerase, einfach Reaktionspuffer, 2 mM MgCl₂, 0,8 mM dNTPs, jeweils 0,1 µM jedes Oligonukleotids, chromosomale oder Plasmid-DNA oder cDNA und Wasser. Durch die Verwendung von Oligonukleotiden mit Überhängen, deren Sequenz bestimmten Restriktions-Schnittstellen entspricht, war es möglich diese für die Ligation in einen Vektor vorzubereiten. In diesem Fall wurde für die PCR die *Proof-Reading*-Polymerase Phusion von Biozym mit dem dazugehörigen Puffer verwendet, um die Fehlerrate bei der Amplifikation gering zu halten.

2.6.2 Agarose-Gelelektrophorese

Im Agarose-Gel können Nukleinsäure-Fragmente elektrophoretisch proportional zum Logarithmus ihres Molekulargewichts aufgetrennt werden. PCR-Produkte oder RNA wurden mit Ladebuffer versetzt und in einem 1,5%igen Agarose-Gel mit 0,001% Ethidiumbromid in TAE-Puffer bei 100 V aufgetrennt. Die im elektrischen Feld zur Anode gewanderten negativ geladenen Nukleinsäuren wurden anschließend mittels UV-Licht sichtbar gemacht.

2.6.3 Reinigung von DNA-Fragmenten aus dem Agarose-Gel

Die DNA-Fragmente wurden mit dem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und mithilfe des *peq GOLD DNA-Extraktionskits* der Firma *PeqLab* nach Herstellerangaben gereinigt.

2.6.4 Restriktionsenzymatische Spaltung

Das PCR-Fragment mit den angefügten Restriktions-Schnittstellen und der Zielvektor wurden mit den gleichen spezifischen Restriktions-Endonukleasen nach Herstellerangaben (*Fermentas*) gespalten, so dass komplementäre Überhänge entstanden.

2.6.5 Ligation

Komplementäre Überhänge, welche aus der restriktionsenzymatischen Spaltung hervorgingen, wurden durch das Enzym *Ligase* (*Fermentas*) nach Herstellerangaben ligiert.

2.6.6 Transformation

Als Transformation bezeichnet man die Aufnahme von Plasmid-DNA in eine prokaryotische Empfängerzelle mittels Hitzeschock oder Elektroporation. Für die Hitzeschock-Transformation wurden kompetente Zellen mit der aufzunehmenden DNA vermischt und für 2 min auf Eis inkubiert, gefolgt von 45 s bei 42 °C im Heizblock. Nach weiteren 2 min auf Eis wurden 200 µl SOC-Medium zugegeben und der Ansatz zur Ausprägung der Antibiotika-Resistenz 45 min bei 37 °C inkubiert. Schließlich wurden die Bakterien auf LB-Platten mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert.

2.6.7 Herstellung kompetenter Zellen für die Hitzeschock-Transformation

Zur Herstellung kompetenter Zellen wurde der gewünschte Bakterien-Stamm bei 37 °C bis zu einer OD_{600} von 0,5 schüttelnd inkubiert und dann auf 4 °C abgekühlt. Nach Zentrifugation bei 2000 x g für 5 min wurde das Sediment in eiskaltem TfBI aufgenommen und 15 min auf Eis inkubiert, gefolgt von erneuter Zentrifugation und

Aufnahme in TfbII. Die nun chemisch kompetenten Bakterien wurden aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

2.6.8 Isolierung von Plasmid-DNA

Aus einer aus der Transformation hervorgehenden Kolonie wurde eine Über-Nacht-Kultur mit dem für das jeweilige Plasmid selektierenden Antibiotikum in LB-Medium angesetzt und am nächsten Tag die Plasmid-DNA mit dem Plasmid-Präparations-Kit „NucleoSpin Plasmid QuickPure“ der Firma Macherey-Nagel nach Herstellerangaben isoliert.

2.6.9 DNA-Konzentrations-Bestimmung

Die DNA-Konzentration wurde bei 260 nm am Nano-Drop ND-100 Spektrophotometer (Thermo Scientific, Bonn) bestimmt.

2.6.10 DNA-Sequenzierung

DNA-Sequenzierungen gereinigter Plasmid-DNA mit dem vektorspezifischen Oligonukleotid T7 wurden von der Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg) durchgeführt.

2.6.11 RNA-Extraktion aus *C. elegans* und cDNA-Synthese durch reverse Transkription

Die Würmer, deren RNA isoliert werden soll, wurden mit 3 ml M9-Puffer von der NGM-Agarplatte gespült und die sedimentierten Würmer dreimal mit M9-Puffer gewaschen. Der Puffer wurde weitestgehend abgenommen und der Ansatz bei -80 °C eingefroren, um die Kutikula aufzubrechen. Anschließend wurde mithilfe von RNAmagic (Bio-Budget Technologies, Krefeld) die RNA nach Herstellerangaben isoliert und nach der Lufttrocknung in DEPC-Wasser aufgenommen. Durch das Enzym SuperScriptIII Reverse Transkriptase (Invitrogen) wurde die RNA in einzelsträngige komplementäre DNA (cDNA) unter Beachtung der Herstellerangaben umgeschrieben. Das Oligonukleotid Oligo-dT T7 diente nach Anlagerung an den Poly-A-Schwanz der RNA als Ansatzpunkt für die Reverse Transkriptase.

2.6.12 Quantitative *Real-time*-PCR (qRT-PCR)

Zur Untersuchung der Transkriptionsregulation nach Kontakt zu verschiedenen Bakterien wurden Transkripte von *spp*-Genen durch quantitative *Real-time*-PCR untersucht. Es handelt sich dabei um eine PCR, bei welcher in jedem Zyklus die DNA-Menge mithilfe einer Fluoreszenzmessung von in doppelsträngige DNA-interkalierendem Fluoreszenzfarbstoff bestimmt wird. Dabei nimmt die Fluoreszenz proportional zur DNA-Menge zu. Die Quantifizierung erfolgt in der exponentiellen Phase der PCR.

Als Startmaterial wurde eine gemischte Wurmpopulation des Wildtyps synchronisiert und die Eier bei Raumtemperatur für 24 h rollend in M9-Puffer inkubiert. Die schlüpfenden Larven konnten sich aufgrund des Nährstoffmangels nicht entwickeln und blieben in ihrer Entwicklung beim L1-Stadium stehen. Als Folge erhielt man absolut synchrone Tiere, welche nun auf mit *E. coli* OP50 beimpften NGM-Platten bis zum L3- bzw. L4-Stadium herangezogen wurden. Die Würmer konnten nach einem Waschschrift mit M9-Medium auf die entsprechenden Versuchsplatten aufgebracht werden. Für die Ermittlung der Transkriptionsänderung nach *B. thuringiensis*-Exposition wurden auf PFM-Platten entweder Sporen des nicht-pathogenen *B. thuringiensis*-Stammes DSM350 oder des pathogenen *B. thuringiensis*-Stammes BT247 in einer Konzentration von 2×10^8 Sporen in 6×10^9 *E. coli* OP50 pro ml verwendet.

Alle anderen Versuchsbedingungen wurden auf modifiziertem NGM-Medium in Wurmbällen durchgeführt, welche den Vorteil haben, dass die Würmer schlechten Bedingungen nicht entfliehen können. Die Bälle wurden einen Tag zuvor mit *E. coli* OP50 oder hitzeinaktivierten Bakterien desselben Stammes beimpft. Die Hitzeinaktivierung erfolgte durch Inkubation einer zuvor mit 50 µg/ml Gentamycin behandelten zweifach konzentrierten Über-Nacht-Kultur für 2 h bei 80 °C im Wasserbad. Zusätzlich wurde zur Kontrolle, ob das Hitzeinaktivierungs-Verfahrens einen Einfluss auf die Transkriptionsrate ausübt, ein Ansatz mit Medium, welches ebenfalls das Hitzeinaktivierungs-Verfahren durchlaufen hat, durchgeführt.

Nach 24-stündiger Inkubation unter den jeweiligen Versuchsbedingungen bei 20 °C bzw. 25 °C wurden die Würmer von den PFM-Platten bzw. Ballhälften gespült und die RNA isoliert. Diese wurde in cDNA umgeschrieben und nach einer Test-PCR für die quantitative *Real-time*-PCR im Light-Cycler-System (Roche) mit den dazugehörigen Kapillaren (Roche) verwendet. 1 µl cDNA wurde mit jeweils 0,25 µM der beiden Oligonukleotide und 5 µl SYBR *Premix Ex Taq* (TAKARA) zu einem 10 µl-Ansatz zusammengefügt. Als Haushaltsgen diente *rpl-29*, welches für ein ribosomales Protein kodiert. Es wurden die Stärke der Expression von *spp-1*, *spp-2*, *spp-3*, *spp-4*, *spp-5*, *spp-6*, *spp-9*, *spp-12* und *spp-18* sowohl in drei biologischen als auch jeweils zwei technischen Replikaten auf Transkriptionsebene untersucht. Die Auswertung erfolgte nach der $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode:

$$2^{-[(Ct_{sppx} - Ct_{Haushaltsgen})_{pathogen} - (Ct_{sppx} - Ct_{Haushaltsgen})_{apathogen}]}$$

Im Exponenten werden dabei die Werte des *sppx* bei denen die Fluoreszenz erstmals signifikant die Hintergrundfluoreszenz überschreitet (Ct-Werte), jeweils durch Abzug der Ct-Werte des Haushaltsgens in ihren Mengen relativ zueinander angeglichen und die Kontrollwerte jeweils von denen der Versuchsbedingungen abgezogen, z.B. pathogen minus nicht-pathogen. Als Endergebnis erhält man schließlich die x-fache

Expressionsänderung des untersuchten Gens unter Pathogeneinfluss im Vergleich zu nicht-pathogenen Bedingungen.

2.7 Biochemische Methoden

2.7.1 Synthese des rekombinaten Fusionsproteins rSPP-3

2.7.1.1 Klonierung des Expressionsvektors

Mit Hilfe der Oligonukleotide CP3_pIVEX2.4a_for und CP3_pIVEX2.4a_rev wurde der von ihnen eingeschlossene Bereich der cDNA amplifiziert und nach einer restriktionsenzymatischen Spaltung mit den Restriktionsendonukleasen *Pst*I und *Cfr*42I in den ebenfalls mit diesen Enzymen gespaltenen pIVEX2.4a-Expressionsvektor hinter den durch IPTG induzierbaren T7-Promotor ligiert. Dadurch entstand ein Konstrukt, das für ein SPP-3-Fusionsprotein kodierte, welches eine N-terminale Kette aus 6 Histidinen enthielt. Dieser *His-Tag* ist über eine *FactorXa*-Erkennungssequenz aus vier Aminosäuren (IEGR) vom eigentlichen SPP-3 getrennt, an dessen Ende die Protease spezifisch spaltet. Hierdurch ist es möglich den Histidin-Schwanz zu entfernen, sodass nur noch ein zusätzliches Glycin am N-Terminus des SPP-3 erhalten bleibt. Das Fusionsprotein hat eine erwartete molekulare Masse von 10663,2 Da, wohingegen SPP-3 ohne Histidin-Schwanz ein Molekulargewicht von 8791,2 aufweisen sollte.

2.7.1.2 Expression im heterologen System

Mit dem durch Sequenzierung auf seine Richtigkeit überprüften Plasmid wurden die Expressionsbakterien *E. coli* BL21 pAPlacI^Q transformiert. Die Synthese des rekombinanten Proteins erfolgte nach Induktion mit 0,4 mM IPTG bei einer OD₆₀₀ von 0,4 für 4 h in LB bei 37 °C schüttelnd. Als Kontrolle wurden das leere Plasmid pIVEX2.4a-tragende Bakterien induziert.

2.7.1.3 Extraktion mittels Ultraschall

Bakteriensedimente aus je einem Liter wurden in 50 ml TBS (20 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7,4) aufgenommen und mit 4 Zyklen Ultraschall à 45 s (0,7 s mit Zwischenintervallen von 0,3 s bei 30%iger Leistung) mit einminütigen Unterbrechungen im Eisbad aufgeschlossen. Die anschließende Zentrifugation bei 40.000 x g und 4 °C trennte die Proteine von übrigen Zellbestandteilen.

2.7.1.4 Reinigung durch Immobilisierte-Metall-Affinitäts-Chromatographie (IMAC)

Zur Reinigung des Fusionsproteins SPP-3 mit *His-Tag* von bakteriellen Proteinen wurde eine Immobilisierte-Metall-Affinitäts-Chromatographie (IMAC) mit 5 ml Ni-NTA-Agarose

(Qiagen) als Säulenbett verwendet. Das gebundene Fusionsprotein wurde mit 30 ml TBS, und mit je 10 ml TBS inkl. 30 mM, 40 mM bzw. 50 mM Imidazol gewaschen, wodurch unspezifisch bindende Proteine entfernt werden sollten. Die Elution erfolgte anschließend mit 14 ml TBS, 300 mM Imidazol und 15 ml TBS, 500 mM Imidazol.

2.7.1.5 Dialyse

Die 300 mM-Imidazolfraktion wurde gegen den empfohlenen Puffer für die Protease *FactorXa* (50 mM Tris/HCl, 100 mM NaCl, 1 mM CaCl₂, pH 7,6) in Slide-A-Lyser-Dialysekammern (Thermo Scientific) mit einer Ausschlussgröße von 2000 Da dialysiert.

2.7.1.6 Entfernung des Fusionspartners durch proteolytische Spaltung mit FactorXa

Drei solcher Fraktionen wurden vereinigt und die proteolytische Spaltung mit 100 µg *FactorXa* innerhalb von 7 Tagen bei 22 °C schüttelnd durchgeführt.

2.7.1.7 Finale Reinigung über IMAC und hydrophobe Matrix (SepPak)

Eine erneute IMAC trennte das abgespaltene SPP-3 von seinem Fusionspartner und von ungeschnittenem Fusionsprotein. Der Durchfluss und die aus dem darauffolgenden Waschschrift mit 10 ml TBS resultierende Fraktion wurden zusammen über eine hydrophobe Matrix (SepPak 500 mg, Waters) gegeben und so von der Protease befreit. Hierbei wurden die gebundenen Proteine mit 15 ml 0,1% TFA gewaschen und in 5 ml Schritten mit ansteigenden Konzentrationen an Acetonitril (30, 50, 80% ACN) in 0,1% TFA eluiert.

2.7.1.8 Gefriertrocknung

Letztlich wurden die Fraktionen zunächst auf -80 °C eingefroren und anschließend in der Gefriertrocknungsanlage Alpha 2-4 LSC (Christ, Osterode) im Vakuum lyophilisiert. Nachdem die flüchtigen Lösungsmittel ACN und TFA entfernt waren, wurden die Proteine in 0,01% TFA aufgenommen.

2.7.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Alle Extraktions-, Spaltungs- und Reinigungsschritte wurden durch Auftrennung in einem SDS-Polyacrylamid-Gel überprüft. Aufgrund des geringen Molekulargewichts der aufzutrennenden Proteine wurden modifizierte Tricin-Gele nach Schägger & v. Jagow 1987 mit Tricin als Folge-Ion verwendet, bestehend aus einem 4%igen Sammelgel (1,3 ml 30% Acrylamid-Lösung 32:1; 2,25 ml 3 x Gelpuffer; 6,45 ml Wasser; 10 µl TEMED; 18 µl 40% APS) und einem 13%igen Trenngel (6,5 ml 30% Acrylamid-Lösung 49:1; 3 ml 87% Glycerol; 4,5 ml 3 x Gelpuffer; 1 ml Wasser; 7,5 µl TEMED; 16 µl 40% APS).

Die Proteinproben wurden vor der Gelbeladung mit einfach Protein-Ladepuffer und 50 mM DTT versetzt und für 30 min bei 56 °C reduziert. Nach 5-minütiger Inkubation bei 100 °C erfolgte die Alkylierung mit 150 mM Iodacetamid (IAA) für 30 min bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss. Unmittelbar vor dem Gellauf wurden die Proben für 15 min auf 70 °C erhitzt und direkt aufgetragen. Als Elektrophoresepuffer wurde jeweils Anoden- und Kathodenpuffer verwendet und die Elektrophorese zunächst bei 25 mA für 30 min gestartet und schließlich mit 50 mA pro Gel beendet. Als Protein-Größenstandard diente SeeBlue Plus2 (Invitrogen).

2.7.3 Kolloidale Coomassie-Färbung nach Kang *et al.* 2002

Das Gel wurde zunächst in Wasser gewaschen und anschließend in Kolloidaler Coomassie-Färbelösung über Nacht inkubiert. Am folgenden Tag wurde das Gel mit Entfärbelösung soweit entfärbt, bis die unspezifische Hintergrundfärbung verschwunden war.

2.7.4 Protein-Identifizierung mittels MALDI-TOF/TOF-MS/MS

Die molekulare Identität wurde mittels *Peptide-Mass-Fingerprint* verifiziert. Dafür wurden Gelstücke im Bereich der interessierenden Proteinbande aus dem SDS-Polyacrylamid-Gel mit dem Spotpicker (Labtech International GmbH, Burkhardtsdorf) ausgestanzt und dreimal in Wasser (HPLC *gradient grade*) und anschließend mehrmals in 12,5 mM ABC-Lösung in 50% ACN gewaschen. Das Eintrocknen der Gelstücke erfolgte durch Zugabe von 100 µl ACN für ca. 10 min mit anschließender Abnahme des Überstands und Lufttrocknung. Nun wurden 20 µl Trypsin (100 ng in 25 mM ABC) zugegeben und für 15 min bei 4 °C und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die tryptische Spaltung wurde mit 20 µl 0,3% TFA in ACN gestoppt und die Überstände nach 15 min im Ultraschallbad in neue Gefäße überführt, die Gelstücke ein weiteres mal mit 20 µl 0,3% TFA in ACN versetzt und mit Ultraschall behandelt. Schließlich wurden die Überstände vereinigt und in der Speed-Vac unter Vakuum getrocknet. Die Sedimente wurden in 0,7 µl Matrixlösung (5 mg/ml CHCA, Sigma) in 0,1% TFA in 80%igem ACN resuspendiert und auf die Probenplatte aufgetragen.

Die massenspektrometrische Messung und die Analyse der Massenspektren wurde von Dr. Christoph Gelhaus, Zoophysiologie, Zoologisches Institut, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel mit einem MALDI (*matrix-assisted-laser-desorption-ionization*)-TOF/TOF (*time of flight/time of flight*)-Massenspektrometer (4700 *Proteomics Analyzer Workstation*, Applied Biosystems) und der Software 4000 Series Explorer V3.6 (Applied Biosystems) durchgeführt.

Zum Abgleich wurde eine spezielle Datenbank mit den Proteinsequenzen potentieller antimikrobieller Proteine von *C. elegans* verwendet und die Proteine mithilfe der Suchmaschine MASCOT V 2.0 (Matrix Science, University of California, San Francisco,

USA) identifiziert (Schmidt *et. al.* 2009), wobei die autokatalytisch hervorgerufenen Fragmente des Trypsins als interne Kalibrierung der Spektren verwendet wurden.

2.7.5 Protein-Konzentration-Bestimmung

Die Proteinkonzentration wurde mithilfe des Micro BCA Protein Assay Kits von Pierce nach Herstellerangaben in verschiedenen Verdünnungsstufen bestimmt.

2.7.6 Aktivitätstests

2.7.6.1 Analyse antimikrobieller Aktivität mittels Mikrosuszeptibilitätstest

Um antibakterielle Aktivität nachzuweisen, kann mit diesem Test die minimale Konzentration einzelner Proteine ermittelt werden bei welcher diese bakterizid bzw. bakteriostatisch wirken. Dafür wurde eine zweifach Verdünnungsreihe der zu testenden Proteine in 90 µl 10 mM Natriumphosphatpuffer in einer Mikrotiterplatte mit rundem Boden, die zuvor für 10 min mit 0,1% BSA blockiert wurde, erstellt. Als Kontrollen wurden bekannte antimikrobielle Peptide wie Melittin und Cecropin P1 ebenfalls in Verdünnungsstufen eingesetzt, sowie das Lösungsmittel, in welchem das zu testende Protein gelöst ist. 150 µl der Über-Nacht-Kultur der Bakterien wurden jeweils in 25 ml LB-Medium inokuliert und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,1 bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Anhand des für jeden Bakterienstamm bei dieser optischen Dichte im Voraus ermittelten CFU-Werts (*Colony forming units/ml*) wurden die Bakterien in LB-Medium auf 10.000 CFU/ml verdünnt und davon 10 µl in jede Vertiefung der Mikrotiterplatte gegeben (100 CFU). Zusätzlich wurden auch Vertiefungen mit Natriumphosphatpuffer nur mit LB-Medium versetzt, um die Sterilität zu überprüfen. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 37 °C. Am nächsten Tag wurden die Vertiefungen auf Bakterienwachstum untersucht. Die Proteinkonzentration bei der kein Bakteriensediment zu beobachten war, wurde als minimale inhibitorische Konzentration (MIC) bezeichnet. Für die Bestimmung der minimalen bakteriziden Konzentration wurden aus allen Vertiefungen, in denen kein Bakteriensediment zu erkennen war, 40 µl des resuspendierten Gemisches entnommen und auf LB-Agarplatten ausgebracht. Nach Inkubation über Nacht bei 37 °C konnte bei Platten ohne Koloniebildung die minimale bakterizide Konzentration (MBC) bestimmt werden.

2.7.6.2 Analyse der membranpermeabilisierenden Aktivität

Der in diesem Test eingesetzte Farbstoff SYTOX Green entfaltet Fluoreszenz, wenn er in DNA interkaliert. Da sich diese im Inneren der Zellen befindet, kann eine auftretende Fluoreszenz mit der Zerstörung der Zellmembran gleichgesetzt und somit die membranpermeabilisierende Aktivität gemessen werden. Dafür wurde eine zweifach Verdünnungsreihe der zu testenden Proteine in 50 µl Inkubationspuffer in einer

Mikrotiterplatte mit flachem Boden, die zuvor für 10 min mit 0,1% BSA blockiert wurde, erstellt. Als Kontrollen wurden bekannte antimikrobielle Peptide wie Magainin II und Cecropin P1 ebenfalls in Verdünnungsstufen eingesetzt, sowie das Lösungsmittel als Lebendkontrolle (F_{lebend}), in welchem das zu testende Protein gelöst ist, außerdem eine Reihe nur mit Puffer, zur Bestimmung des Maximalwertes mit toten Bakterien (F_{tot}). In jede Vertiefung wurde 50 μl frisch angesetztes SYTOX Green (4 μM) gegeben. Eine Über-Nacht-Kultur des gewünschten Bakterien-Stammes wurde 1:1000 in 50 ml LB-Medium verdünnt und bis zu einer OD_{600} von 0,4 bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Anschließend wurde die Kultur aufgeteilt, 2 min bei 1400 x g zentrifugiert, die Sedimente mit 30 ml Inkubationspuffer gewaschen und erneut zentrifugiert. Nun wurde das eine Sediment in 4 ml 75%igem Ethanol (tote Bakterien), das andere in 4 ml Puffer (lebende Bakterien) resuspendiert. Für die Tötung der Bakterien wurden diese 8 min im Ethanol inkubiert, zentrifugiert und das Sediment in 4 ml Puffer aufgenommen. Sowohl die lebenden als auch die toten Bakterien wurden schließlich anhand der OD_{600} und des für jeden Bakterienstamm ermittelten CFU-Werts (*Colony forming units/ml*) auf eine Zelldichte von 2×10^6 Zellen pro ml für *B. megaterium* eingestellt. Davon wurden jeweils 50 μl in die entsprechenden Vertiefungen gegeben und die Platte sofort und zu verschiedenen anderen Zeitpunkten im Fluoroskan-Spektrometer bei einer Anregungswellenlänge von 495 nm und einer Emission von 538 nm gemessen (Herbst *et al.* 2002). Der Prozentsatz der permeabilisierten Bakterien errechnete sich dann nach folgender Formel:

$$\% \text{ getötete Bakterien} = ((F_{\text{Probe}} - F_{\text{lebend}}) / (F_{\text{tot}} - F_{\text{lebend}})) \times 100.$$

2.7.6.3 Analyse der porenbildenden Aktivität mittels Liposomen-Depolarisationstest

Mit diesem Test ist es möglich, die Membrandepolarisation von Liposomen durch einen potentialsensitiven Fluoreszenzfarbstoff in einem Fluoreszenz-Spektrometer zu messen und somit auf porenbildende Aktivität eingesetzter Proteine zu schließen. Dabei lag die Anregungswellenlänge bei 620 nm und die Emissionswellenlänge bei 670 nm.

Zunächst wurden Liposomen nach Pick 1981 hergestellt, indem 60 mg L- α -Phosphatidylcholin Typ II S aus der Sojabohne (Sigma) in 1,5 ml Chloroform im Rundkolben gelöst wurden, die Lösung unter N_2 -Begasung und gleichmäßiger Drehung getrocknet wurde, gefolgt von Trocknung unter Vakuum im Exsikkator, dann der sich bildende Film in 1,5 ml Liposomenpuffer mit einigen Glasperlen schwenkend gelöst und in Probenröhrchen mit dem Ultraschallstab behandelt wurde bis die Lösung klar war. Nach dreimaligem Einfrieren und wieder Auftauen und weiteren 15 s Ultraschallbehandlung wurden die Liposomen im Kühlschrank gelagert.

2 μl der so gefertigten Liposomen und 8 μl 2 mM Fluoreszenzfarbstoff (DTDC, 3,3'-Diethylthiadicarbocyaninjodid, Kodak) wurden zu 8 ml Küvettenpuffer des gewünschten

pH-Werts gegeben und im Wasserbad bei 25 °C lichtgeschützt inkubiert. Für die Messung im Perkin-Elmer-Fluoreszenz-Spektrometer wurde 1 ml dieses Ansatzes in eine Plastikkuvette gegeben und der gemessene Fluoreszenzwert gleich 100% gesetzt. Durch Zugabe von 2 µl 0,5 µM Valinomycin (in Ethanol) entstand ein K⁺-Diffusionspotential über der Membran, wodurch sich der Fluoreszenzfarbstoff an die Membran anlagerte und seine fluoreszierende Eigenschaft verlor. Der nun gemessene Wert wurde als 0%-Wert betrachtet. Als nächstes wurden potentielle Porenbildner zugesetzt. Bei porenbildender Aktivität, wie z.B. beim Kontrollpeptid Alamethicin (Andrä *et al.* 2003), brach das Membranpotential zusammen, wodurch der Fluoreszenzfarbstoff wieder frei wurde und demnach auch die Fluoreszenz anstieg. Als Maßeinheit für die porenbildende Aktivität wurde der Fluoreszenzanstieg innerhalb von einer Minute nach Zugabe des Porenbildners bei 25 °C bestimmt und ein Anstieg um 5% als eine Aktivitätseinheit (Unit) definiert (Leippe *et al.* 1991). Zusätzlich wurde auch die porenbildende Aktivität des Lösungsmittels bestimmt, in welchem das zu untersuchende Protein gelöst war, und der gemessene Wert von allen anderen gemessenen Werten abgezogen.

2.8 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Programm Graph Pad Prism 3. Zur Feststellung signifikanter Unterschiede in der Lebensdauer und der Überlebensrate auf Pathogenen wurde ein Log-Rank-Test durchgeführt. Der Log-Rank-Test ist ein statistischer Hypothesentest zum Vergleich der Überlebenszeiten zweier unverbundener Stichproben. Unterschiede in der Eiablage, der pharyngealen Pumprate, der lebenden Bakterien im Darm und der Populationsgröße wurden mit dem Mann-Whitney-Test oder dem t-Test auf Signifikanz überprüft, wenn nötig gefolgt von der Bonferroni-Korrektur für multiple Paarvergleiche.

2.9 Bioinformatik

Zur Ermittlung von DAF-16-Bindungsstellen in der Promotorregion der *spp*-Gene wurde das im Internet zugängliche Programm RSAT (*Regulatory Sequence Analysis Tool*) verwendet (<http://rsat.ulb.ac.be/>). Hiermit wurde nach bekannten Sequenzen gesucht, für welche angenommen wird, dass der Transkriptionsfaktor DAF-16 an diese bindet. Die Sequenzen wurden Murphy *et al.* 2003 und Lee *et al.* 2009 entnommen.

Protein-Parameter wurden mit Hilfe des im Internet zugänglichen *Bioinformatics Resource Portal* ExPASy berechnet (<http://www.expasy.ch/>).

3 Ergebnisse

3.1 Promotor-Analyse der SAPLIP-Gene

Die beiden für eine nähere Untersuchung in dieser Arbeit ausgewählten Vertreter der *spp*-Genfamilie, *spp-1* und *spp-12*, sind bekannt dafür über den DAF-2/DAF-16 Signalweg reguliert zu werden (Murphy *et al.* 2003). Eine weitere Studie zeigte zusätzlich, dass *spp-5* ebenfalls eine Bindungsstelle für den Transkriptionsfaktor DAF-16 in seiner Promotorregion aufweist (Lee *et al.* 2009). Dieser Befund warf die Frage auf, ob noch weitere *spp*-Gene DAF-16-Bindungsstellen in ihrer Promotorregion besitzen. Aufgrund dessen wurde die Promotorregion sämtlicher SAPLIP-Gene in *C. elegans* bis 5000 bp oberhalb des Translations-Startpunkts auf ein Vorkommen der Konsensus-Sequenzen für die Bindung von DAF-16 mit dem im Internet zugänglichen Programm RSAT (*Regulatory Sequence Analysis Tool* <http://rsat.ulb.ac.be/>) hin untersucht, wobei die Konsensus-Sequenzen Murphy *et al.* 2003 und Lee *et al.* 2009 entnommen wurden. Die Analyse ergab, dass jedes *spp*-Gen mindestens über eine putative DAF-16-Bindungsstelle in seiner Promotorregion verfügt, viele besitzen sogar mehrere, die Spitze bildet *spp-18*, welches acht putative DAF-16-Bindungsstellen besitzt (**Tab. 10**).

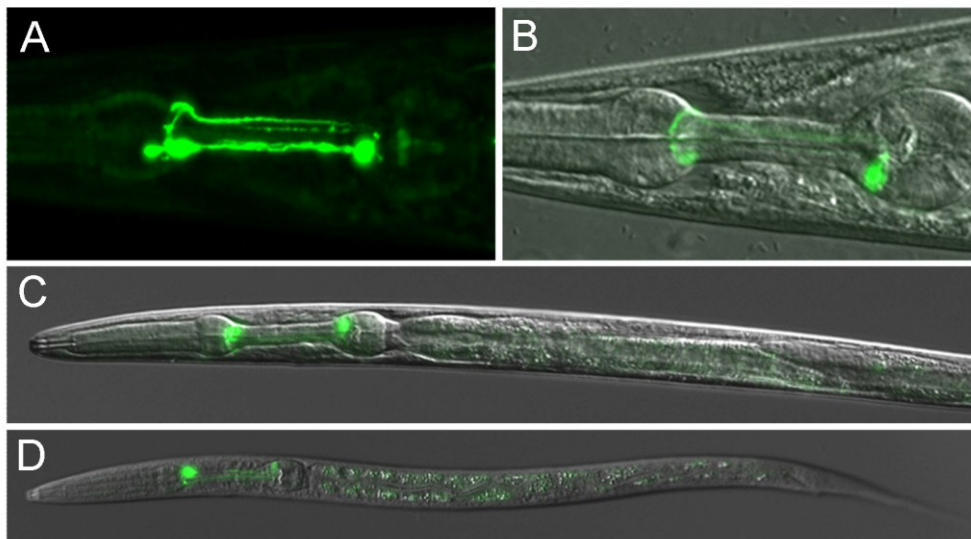


Abb. 8 Lokalisation der Promotoraktivität von *spp-12* im Gewebe mit Hilfe eines *spp-12p::spp-12(1-97)::gfp*-Reporterkonstrukts. Hierfür ist der Promotor und ein Teil des Gens fusioniert mit *gfp* in den Wurm eingebracht worden: *spp-12* wird ausschließlich in zwei pharyngealen Neuronen exprimiert. **A), B)** Bereich des Pharynx, **C)** vorderer und mittlerer Abschnitt des Wurms, **D)** gesamter Wurm, **A)** GFP-Kanal, **B), C), D)** Überlagerung DIC-Kanal und GFP-Kanal.

Tab. 10 DAF-16-Bindungsstellen in der Promotorregion der SAPLIP-Gene in *C. elegans*

Gen	GTAAACA	GTAAATA	CTTATCA
<i>spp-1</i>		-3642	-2151, -58
<i>spp-2</i>	-1660	-3927	-3711, -2107, -4618, -2767
<i>spp-3</i>	-3078		-3525, -179, -4472, -4185, -125
<i>spp-4</i>		-1924	-1708, -104, -2615, -1051, -764
<i>spp-5</i>	-4982	-3825, -4785, -316	-100, -1007
<i>spp-6</i>	-2610	-3075	-1867, -1813
<i>spp-7</i>	-4878		-1073
<i>spp-8</i>	-3171	-2028	-103
<i>spp-9</i>		-768	-482, -3779
<i>spp-10</i>		-2487, -1626	-1717
<i>spp-11</i>	-2465, -1627, -4552	-1544	-162
<i>spp-12</i>	-520, -3000	-1932, -322	
<i>spp-13</i>			-880
<i>spp-14</i>	-292, -1296		-2018, -3208, -980, -18
<i>spp-15</i>	-3259, -113	-3804	-2658, -2303
<i>spp-16</i>	-1094		-33
<i>spp-17</i>			-1221
<i>spp-18</i>	-2489, -957	-4888	-2775, -972, -4994, -1798, -40
<i>spp-19</i>	-4497, -3564	-3777	-1428
<i>spp-20</i>			-4637
<i>spp-21</i>		-3110	-2824
<i>spp-22</i>	-4918, -2317		-470
<i>spp-23</i>			-1343, -3647
Y34F4.3			-4767
Y116F11A.3			-3690, -1129
F30A10.11	-1010	-3622, -4426, -413	
K02A11.4	-1407		-3018
F23F1.7	-750		

Angegeben ist die Entfernung vom Translationsstart in Basenpaaren. Die Konsensus-Sequenzen wurden Murphy *et al.* 2003 und Lee *et al.* 2009 entnommen und die Analyse erfolgte mit dem Programm RSAT (*Regulatory Sequence Analysis Tool* <http://rsat.ulb.ac.be/>).

3.2 Gewebslokalisierung der Promotoraktivität von *spp-12*

Zusätzlich zur DAF-16-Bindungsstelle haben die meisten SAPLIP-Gene ebenfalls eine Bindungsstelle für den darmspezifischen Transkriptionsfaktor ELT-2 (Roeder *et al.* 2010) und die bisher untersuchten Vertreter weisen tatsächlich Promotoraktivität im Darm auf (Kunitomo *et al.* 2005, Alper *et al.* 2007, Roeder *et al.* 2010). Ein Vertreter ohne ELT-2-Bindungsstelle wurde zu Beginn der Arbeit beispielhaft auf seine Gewebslokalisierung hin untersucht. Nach Injektion eines *spp-12p::spp-12(1-97)::gfp*-Reporterkonstrukts, wodurch der Promotor von *spp-12* sowie ein Teil der Gensequenz, kodierend für 97 Aminosäuren, gekoppelt an *gfp* in den Wurm eingebracht wurde, zeigte sich Promotoraktivität von *spp-12* ausschließlich in zwei pharyngealen Neuronen: dem pharyngealen neurosekretorischen Motoneuron NSM/L und dem pharyngealen Interneuron I6 (**Abb. 8 A–C**).

3.3 Charakterisierung ausgewählter *spp*-Knockout-Mutanten

Die NSMs sind ein Paar Serotonin-sezernierender Motoneuronen des Pharynx (Sulston *et al.* 1975, Horvitz *et al.* 1982, Avery & Horvitz 1989), welche wahrscheinlich an der Erkennung von Bakterien beteiligt sind und die Information über Sekretion von Serotonin ins Pseudocoelom verbreiten (Albertson & Thomson 1976, Horvitz *et al.* 1982). Da sowohl die Anwesenheit von Futterbakterien als auch exogen zugeführtes Serotonin zu gesteigertem pharyngealen Pumpen, verringerter Motilität und vermehrter Eiablage führen, wird angenommen, dass die NSMs diesen Effekt hervorrufen (Horvitz *et al.* 1982). Weil die Transkription von *spp-12* auch in einem NSM aktiviert wird, stellte sich die Frage, ob *spp-12* eine Rolle in der Regulation dieser Verhaltensweisen spielt. Zur Untersuchung der Parameter Pharynxpumpen und Eiablage wurde eine *spp-12*-Knockout-Mutante verwendet, welche keine Veränderungen in ihrer Entwicklung sowohl auf *E. coli* OP50 als auch auf verschiedenen anderen Bakterien (*B. thuringiensis* DSM350 und BT247; *P. aeruginosa* PA01; *S. marcescens* Db11) im Vergleich zum Wildtyp zeigte (Daten nicht gezeigt).

3.3.1 Eiablage der *spp-12*-Mutante

Die Eiablage wurde bei 15 °C, 20 °C und 25 °C auf zweierlei Weise untersucht. Zum einen wurde die gesamte Eiablage jedes einzelnen Wurms innerhalb seines Lebens bestimmt. Diese Methode zeigte bei allen untersuchten Temperaturen keinen Unterschied der *spp-12*-Mutante in der Eiablage verglichen mit dem Wildtyp (**Abb. 9 A**). Zum anderen wurde die Eiablage von fünf jungen Hermaphroditen innerhalb von 24 h beobachtet. Aufgrund dieser Methode wurde ein signifikanter Unterschied der *spp-12*-Mutante im Vergleich zum Wildtyp festgestellt, allerdings nur bei 25 °C ($p = 0,0089$). Bei 15 °C und 20 °C wurde keine Abweichung beobachtet (**Abb. 9 B**). Die *spp-12*-Mutante legte also bei 25 °C weniger Eier als der Wildtyp, wobei dieser Effekt aber am Anfang der Eiablage erzielt wurde.

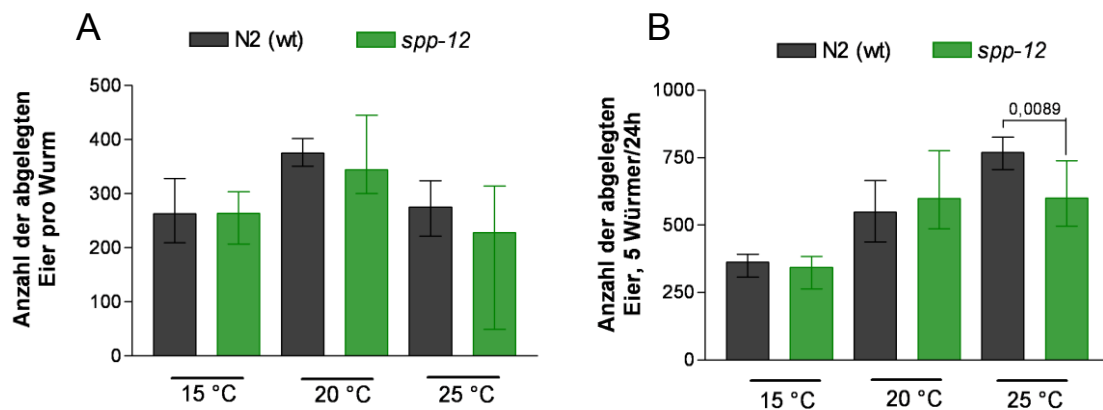


Abb. 9 Eiablage der *spp-12*-Mutante im Vergleich zum Wildtyp (N2): **A**) Gesamteiablage eines Wurms innerhalb seines Lebens auf *E. coli* OP50, **B**) von fünf Wümmern innerhalb von 24 h auf *E. coli* OP50 gelegte Eier, jeweils bei 15 °C, 20 °C und 25 °C, $n \geq 5$, dargestellt ist der Median und die Extremwerte. Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des Mann-Whitney-Tests. Die Eiablage ist signifikant unterschiedlich, wenn $p < 0,05$.

3.3.2 Bestimmung der Populationsgröße ausgewählter *spp*-Mutanten

Die Populationsgröße wurde bei 20 °C ausgehend von zehn Würmern nach fünf Tagen bestimmt und schließt somit die Nachkommenschaft zweier Generationen ein. Die **Abb. 10** zeigt, dass die *spp-12*-Mutante in Bezug auf den Wildtyp eine etwas geringere Populationsgröße erzielte. Obwohl dieser Unterschied nicht signifikant ist ($p = 0,1000$), ist doch die Tendenz zu erkennen, dass die *spp-12*-Mutante bei 20 °C weniger Nachkommen hat als der Wildtyp (**Abb. 10**).

Zusätzlich wurde *spp-1* in die Untersuchung miteinbezogen, als ein typischer im Darm exprimierter Vertreter der SAPLIP-Genfamilie mit ELT-2-Bindungsstelle. Sowohl eine *spp-1*-Mutante als auch eine *spp-1;spp-12*-Doppelmutante zeigten die gleiche Tendenz wie die *spp-12*-Mutante auch hier war eine verringerte Populationsgröße zu erkennen, wobei der Unterschied zum Wildtyp nicht signifikant ($p = 0,1000$) war (**Abb. 10**).

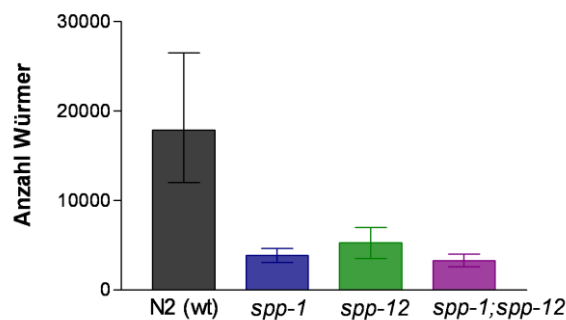


Abb. 10 Populationsgröße der *spp-1*-, *spp-12*- und der *spp-1;spp-12*-Mutante ausgehend von zehn L4-Larven nach 5 Tagen auf NGM-Platten mit *E. coli* OP50 bei 20 °C, $n = 3$, gezeigt sind alle drei Werte, der Median und die Extremwerte als Fehlerbalken.

3.3.2 Pharyngeale Pumprate ausgewählter *spp*-Mutanten

Die pharyngeale Pumprate wurde für die *spp-1*-, *spp-12*-Mutante, die *spp-1;spp-12*-Doppelmutante und für den Wildtyp auf unterschiedlichen Bakterien bei 20 °C bestimmt. Die Ergebnisse sind in **Abb. 11** dargestellt.

Die Messung der pharyngealen Pumprate auf dem Futterbakterium für *C. elegans* im Labor, *E. coli* OP50, erbrachte für die *spp-12*-Mutante eine erhöhte Pumprate nach einstündiger Inkubation auf den Testplatten im Vergleich zum Wildtyp. Diese Erhöhung war allerdings nach sechsständiger und 26-stündiger Inkubation nicht mehr zu erkennen. Zur Überprüfung, ob mögliche Effekte von den lebenden Bakterien ausgehen, wurde parallel die Pumprate auf hitzeinaktivierten Bakterien desselben Stammes untersucht. Auch die Inkubation der *spp-12*-Mutante auf toten Bakterien zeigte zu allen drei Zeitpunkten keinen Unterschied in der pharyngealen Pumprate im Vergleich zum Wildtyp (**Abb. 11**). Die *spp-1*-Mutante pumpte nach 6 h und nach 26 h Inkubation auf lebenden *E. coli* OP50 deutlich langsamer als der Wildtyp, ebenso nach 6 h auf hitzeinaktivierten Bakterien (**Abb. 11**).

Die Pumprate kann nicht nur in Anwesenheit von Futterbakterien erhöht werden, sondern wird auch beim Vorhandensein schädlicher Bakterien verlangsamt (Tan *et al.* 1999a, Aballay *et al.* 2000, Schulenburg & Müller 2004). Um die Frage zu klären, ob *spp-12* an diesem Prozess beteiligt ist, wurde hier die pharyngeale Pumprate auf Sporen eines pathogenen (BT247) und eines nicht-pathogenen (DSM350) *B. thuringiensis*-Stammes untersucht. Die Messung zeigte für die *spp-12*-Mutante auf Sporen des nicht-pathogenen Stammes das gleiche Ergebnis wie auf *E. coli* OP50, eine erhöhte Pumprate nach einstündiger Inkubation, aber nicht nach 6 h oder 26 h. Auf Sporen des pathogenen *B. thuringiensis*-Stammes war nach 1 h und nach 6 h Exposition kein Unterschied der Pumprate der *spp-12*-Mutante zum Wildtyp zu erkennen, die Pumprate sank bei allen untersuchten Wurm-Stämmen nahezu auf Null. Nach 26 h auf Sporen des pathogenen Stammes allerdings pumpte die *spp-12*-Mutante signifikant ($p = 0,0099$) schneller als der Wildtyp. Auch die *spp-1*-Mutante, welche ansonsten auf pathogenen wie auf nicht-pathogenen *B. thuringiensis*-Sporen und zu allen anderen Zeitpunkten in Bezug auf das Pharynxpumpen keinen Unterschied zum Wildtyp aufwies, hatte auf Sporen des pathogenen *B. thuringiensis*-Stammes eine signifikant ($p = 0,0018$) erhöhte pharyngeale Pumprate nach 26 h (**Abb. 11**).

Die *spp-1;spp-12*-Doppelmutante zeigte unter allen getesteten Bedingungen und zu allen Beobachtungszeitpunkten keinen Unterschied zum Wildtyp sowohl auf lebenden oder toten *E. coli* OP50 als auch in Kontakt zu Sporen des pathogenen oder nicht-pathogenen *B. thuringiensis*-Stammes, nach 1 h, 6 h oder 26 h (**Abb. 11**).

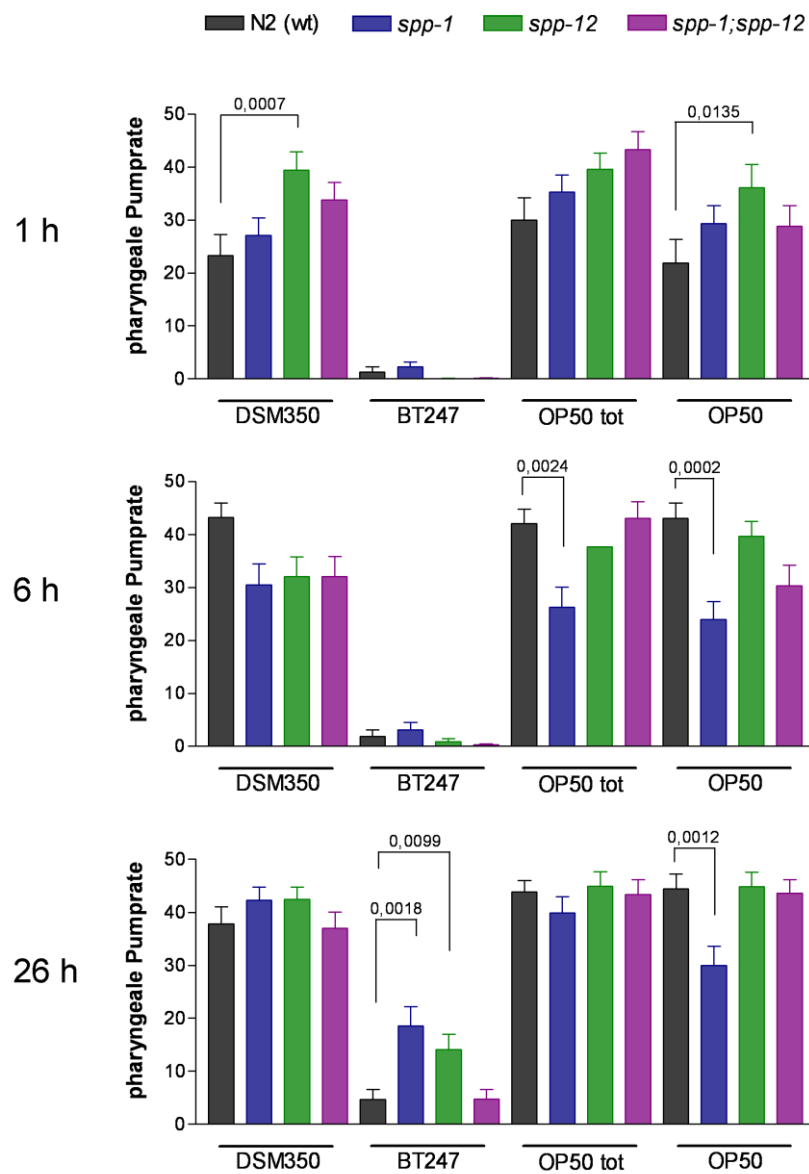


Abb. 11 Pharyngeale Pumprate der *spp-1*-, *spp-12*-, *spp-1;spp-12*-Mutante und des Wildtyps nach 1 h, 6 h und 26 h Kontakt zu lebenden bzw. hitzeinaktivierten *E. coli* OP50 und auf Sporen des nicht-pathogenen (DSM350) bzw. pathogenen (BT247) *B. thuringiensis*. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardfehler der Mittelwerte von zwei unabhängigen Experimenten. Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des Mann-Whitney-Tests und der Bonferroni-Korrektur. Die Pumprate ist signifikant unterschiedlich, wenn $p < 0,0167$.

3.3.3 Toleranz ausgewählter *spp*-Mutanten gegenüber pathogenen Bakterien

Da sowohl für SPP-1 als auch für SPP-12 bereits antimikrobielle Aktivität festgestellt wurde (Stanisak 2007), war es weiterhin von Interesse wie sich die Knockout-Mutanten auf Bakterien verhalten. Hierfür wurde ein für Nematoden pathogener *B. thuringiensis*-Stamm (BT247) ausgewählt und die Überlebensrate nach Exposition mit Sporen dieses Stammes bestimmt. Als Kontrolle wurden parallel dazu Sporen eines nicht-pathogenen *B. thuringiensis*-Stammes (DSM350) eingesetzt.

In **Abb. 12 B** sieht man, dass die *spp-12*-Mutante gegenüber Sporen des pathogenen *B. thuringiensis*-Stammes empfindlicher ist als der Wildtyp ($p < 0,0001$), wohingegen sie auf Sporen des nicht-pathogenen Stammes tendenziell länger überlebte. Dieser Unterschied war allerdings nicht signifikant ($p = 0,3179$). Die *spp-1*-Mutante verhielt sich unter denselben Bedingungen komplementär. Exposition mit Sporen des pathogenen *B. thuringiensis*-Stammes tolerierte die *spp-1*-Mutante im Vergleich zum Wildtyp ($p < 0,0001$), Sporen des nicht-pathogenen-Stammes dagegen ließen diese Mutante schneller sterben ($p < 0,0001$) als den Wildtyp (**Abb. 12 A**). Die *spp-1;spp-12*-Doppelmutante unterschied sich in ihrer Empfindlichkeit gegenüber Sporen des pathogenen ($p = 0,1969$) bzw. nicht-pathogenen ($p = 0,5043$) *B. thuringiensis* nicht vom Wildtyp und verhielt sich somit intermediär in Bezug auf die beiden Einzelmutanten (**Abb. 12 C**).

Unterschiede in der Empfindlichkeit gegenüber einem Pathogen können auch an zahlreichen anderen Faktoren abgelesen werden. Oft zeigen Würmer nach Infektion über den Darm eine Weitung des anterioren Darmabschnitts (Roeder *et al.* 2010), sowie eine Veränderung der Körpermaße des Wurms. Eine Vermessung der *spp-12*-, *spp-1*- und der *spp-1;spp-12*-Mutante an charakteristischen Punkten nach 24-stündiger Exposition mit Sporen des pathogenen *B. thuringiensis*-Stammes BT247 ergab keine Abweichungen der Mutanten von den Maßen des Wildtyps (Daten nicht gezeigt). Untersucht wurden Metakorpus, Isthmus und terminaler Bulbus des Pharynx, die Länge und Breite des Wurms und die Darmweitung an der breitesten Stelle des Darmlumens.

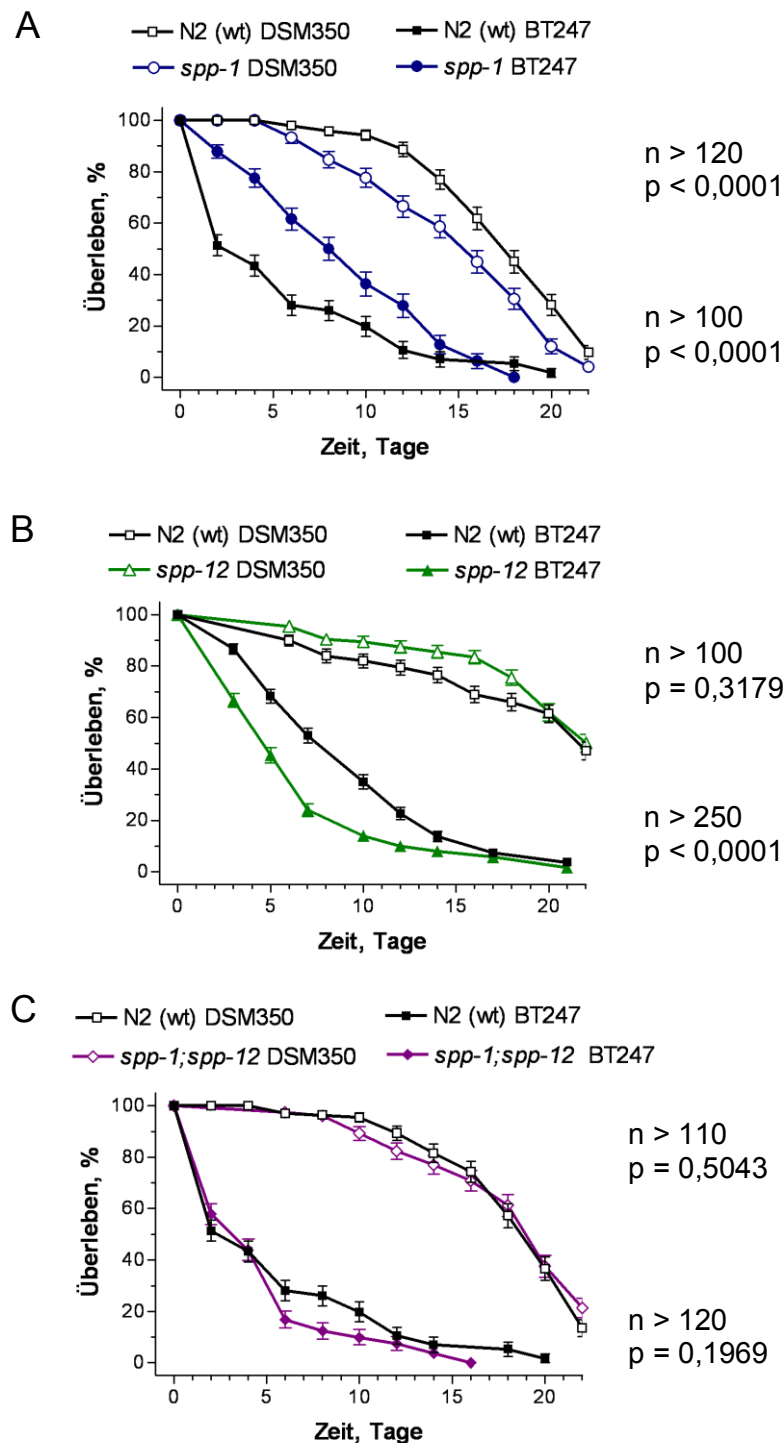


Abb. 12 Überlebensrate **A)** der *spp-1*-, **B)** der *spp-12*-, **C)** der *spp-1;spp-12*-Mutante und des Wildtyps auf Sporen des pathogenen (geschlossene Symbole, BT247) und nicht-pathogenen (offene Symbole, DSM350) *B. thuringiensis*-Stammes jeweils verdünnt in *E. coli* OP50 auf PFM-Platten bei 20 °C. Die Sporenkonzentration betrug 2×10^8 Sporen in 6×10^9 *E. coli* OP50 pro ml. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardfehler der Mittelwerte von mindestens drei unabhängigen Experimenten. Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des Logrank-Tests: n ist die in den Test eingehende Individuenzahl pro Stamm, die Überlebensrate ist signifikant unterschiedlich, wenn $p < 0,05$.

3.3.4 Einfluss ausgewählter *spp*-Gene auf die Lebensspanne in Kontakt zu nicht-pathogenen Bakterien

Interessant war nicht nur die abweichende Überlebensrate der Mutanten auf Pathogenen, sondern besonders das bessere Überleben der *spp-12*-Mutante auf Sporen des nicht-pathogenen *B. thuringiensis*-Stammes. Da die Sporen mit dem Futterbakterium für *C. elegans* im Labor, *E. coli* OP50, vermischt waren, wurde im Folgenden getestet, ob dieser Effekt auch alleine durch diesen Bakterien-Stamm hervorgerufen werden kann und somit die Lebensspanne auf nicht-pathogenen Bakterien näher untersucht. Die Auswirkung der Stilllegung von *spp-1* bzw. *spp-12* auf die Lebensspanne wurde bereits auf nicht-pathogenen *E. coli* im *daf-2*-Mutanten-Hintergrund getestet. In diesem Hintergrund lebten *spp-1*-, wie auch *spp-12*-RNAi-behandelte Würmer kürzer als die Kontrolle (Murphy *et al.* 2003). Zunächst sollte dieses Ergebnis verifiziert werden, bevor die Mutanten untersucht wurden. Obwohl die gleichen Bedingungen wie bei Murphy *et al.* 2003 geschaffen wurden, konnten keine Unterschiede zwischen den *spp-1*- bzw. *spp-12*-RNAi-behandelten Würmer und der Kontrolle bei 25 °C im *daf-2*-Mutanten-Hintergrund festgestellt werden (Abb. 13 A und B).

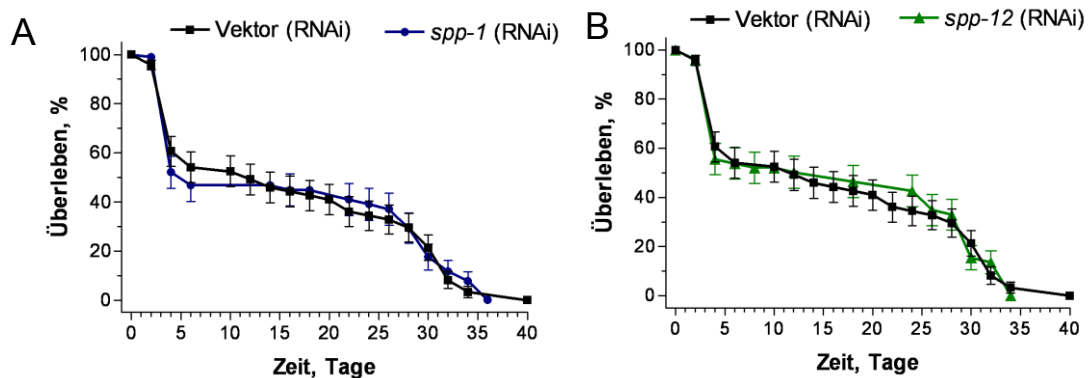


Abb. 13 Lebensspanne der *daf-2*-Mutante auf RNAi-Bakterien HT115 L4440 mit **A)** *spp-1* **B)** *spp-12* im Vergleich zum leeren Vektor bei 25 °C. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler der Mittelwerte von mindestens zwei unabhängigen Experimenten.

Im Weiteren wurde die Lebensspanne der *spp-1*-, *spp-12*-, bzw. *spp-1;spp-12*-Mutante in Kontakt zu *E. coli* OP50 bei 20 °C und bei 25 °C untersucht. Die Veränderungen der Überlebensrate der Mutanten auf Sporen des nicht-pathogenen *B. thuringiensis*-Stammes wurden auch unter diesen Bedingungen beobachtet: Exposition mit *E. coli* OP50 ohne Beimischung von Sporen ergab für die *spp-12*-Mutante eine signifikante Langlebigkeit sowohl bei 25 °C ($p < 0,0001$, **Abb. 15 A**) als auch bei 20 °C ($p = 0,0001$, **Abb. 15 B**). Die *spp-1*-Mutante zeigte sowohl bei 25 °C ($p = 0,0086$, **Abb. 14 A**) als auch bei 20 °C ($p < 0,0001$, **Abb. 14 B**) eine signifikant verkürzte Lebensspanne. Auch die Doppelmutante erzielte bei 20 °C auf *E. coli* OP50 wie schon auf Sporen des nicht-pathogenen *B. thuringiensis*-Stammes keinen Unterschied in der Lebensspanne im Vergleich zum Wildtyp ($p = 0,9159$, **Abb. 16 B**). Lediglich bei 25 °C auf *E. coli* OP50 war eine Langlebigkeit der *spp-1;spp-12*-Mutante zu erkennen ($p < 0,0001$, **Abb. 16 A**).

Um zu testen, ob die beobachteten Abweichungen in der Lebensspanne auf die relativ nicht-pathogenen *E. coli* OP50 zurückzuführen sind, wurde die Lebensspanne der Mutanten und des Wildtyps ebenfalls auf hitzeinaktivierten Bakterien desselben Stammes bei 20 °C bestimmt. Während die Verkürzung der Lebensspanne der *spp-1*-Mutante auf lebenden *E. coli* OP50 im Vergleich zum Wildtyp auf hitzeinaktivierten Bakterien aufgehoben wurde ($p = 0,6872$, **Abb. 14 C**), wurde die Langlebigkeit der *spp-12*-Mutante auf lebenden *E. coli* OP50 ins Gegenteil gekehrt. Auf hitzeinaktivierten Bakterien desselben Stammes zeichnete sie sich durch eine kürzere Lebensspanne aus ($p = 0,0223$, **Abb. 15 C**). Die *spp-1;spp-12*-Doppelmutante zeigte auf hitzeinaktivierten Bakterien ebenfalls eine Verkürzung der Lebensspanne ($p < 0,0001$, **Abb. 16 C**).

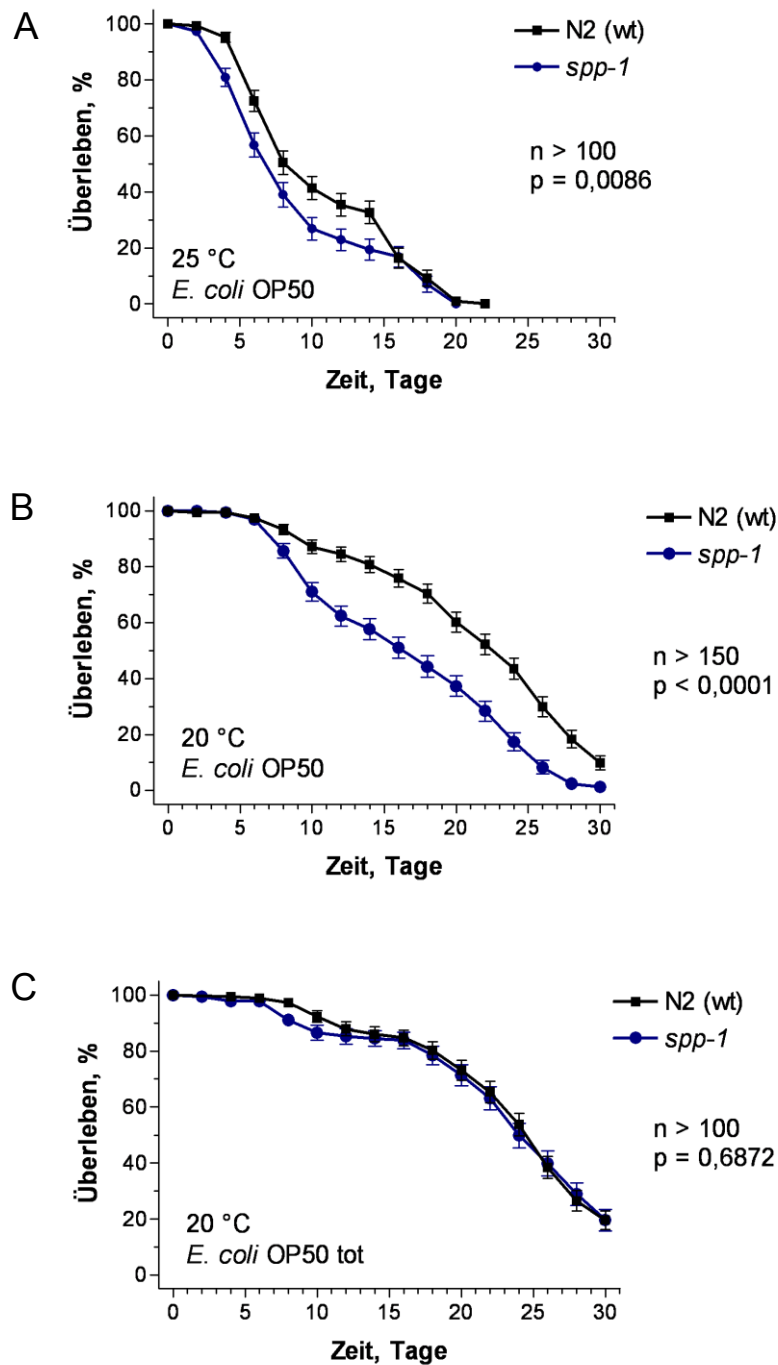


Abb. 14 Lebensspannen der *spp-1*-Mutante und des Wildtyps, **A)** und **C)** auf lebenden, **B)** auf hitzeinaktivierten *E. coli* OP50 auf NGM-Platten, **A)** und **B)** bei 20 °C, **C)** bei 25 °C. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardfehler der Mittelwerte von mindestens drei unabhängigen Experimenten. Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des Logrank-Tests: n ist die in den Test eingehende Individuenzahl pro Stamm, die Lebensspannen sind signifikant unterschiedlich, wenn $p < 0,05$.

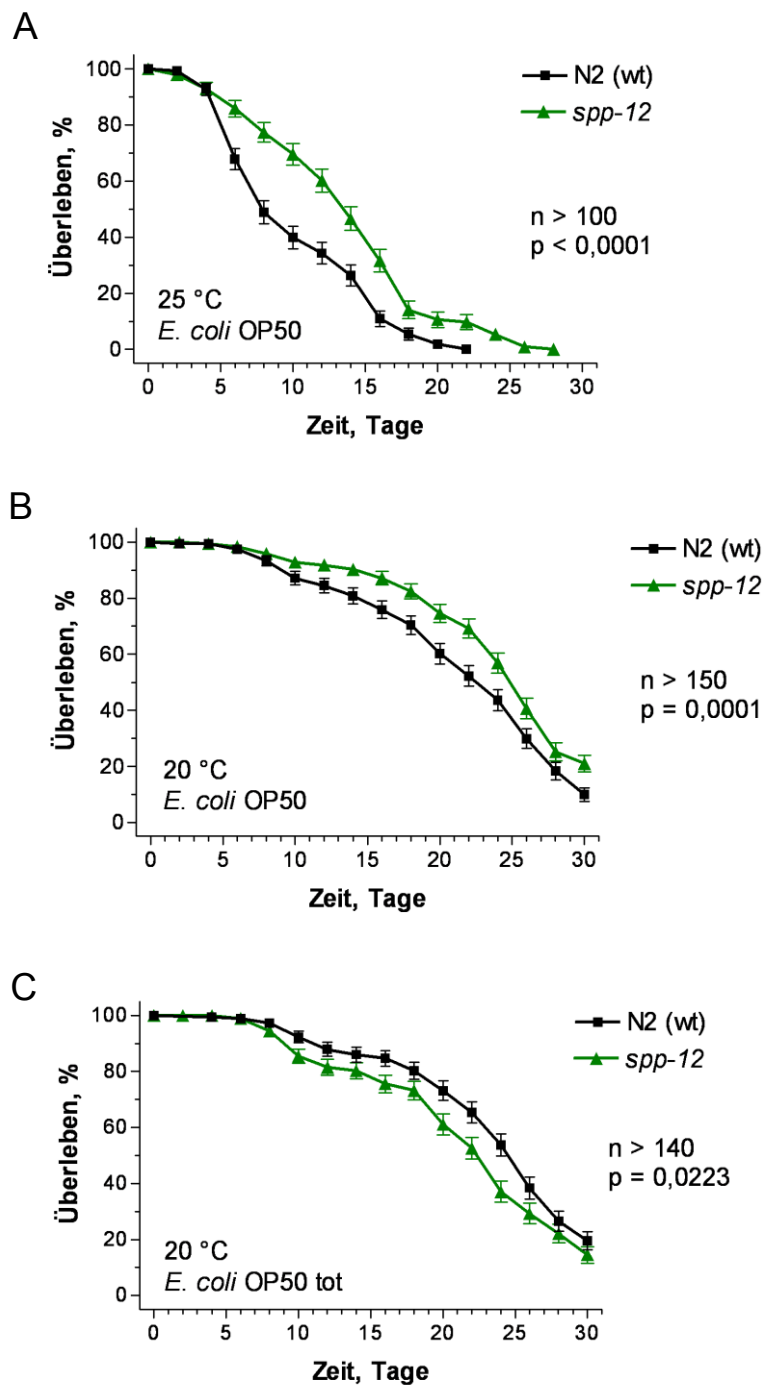


Abb. 15 Lebensspannen der *spp-12*-Mutante und des Wildtyps, **A**) und **C**) auf lebenden, **B**) auf hitzeinaktivierten *E. coli* OP50 auf NGM-Platten, **A**) und **B**) bei 20 °C, **C**) bei 25 °C. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardfehler der Mittelwerte von mindestens drei unabhängigen Experimenten. Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des Logrank-Tests: n ist die in den Test eingehende Individuenzahl pro Stamm, die Lebensspannen sind signifikant unterschiedlich, wenn $p < 0,05$.

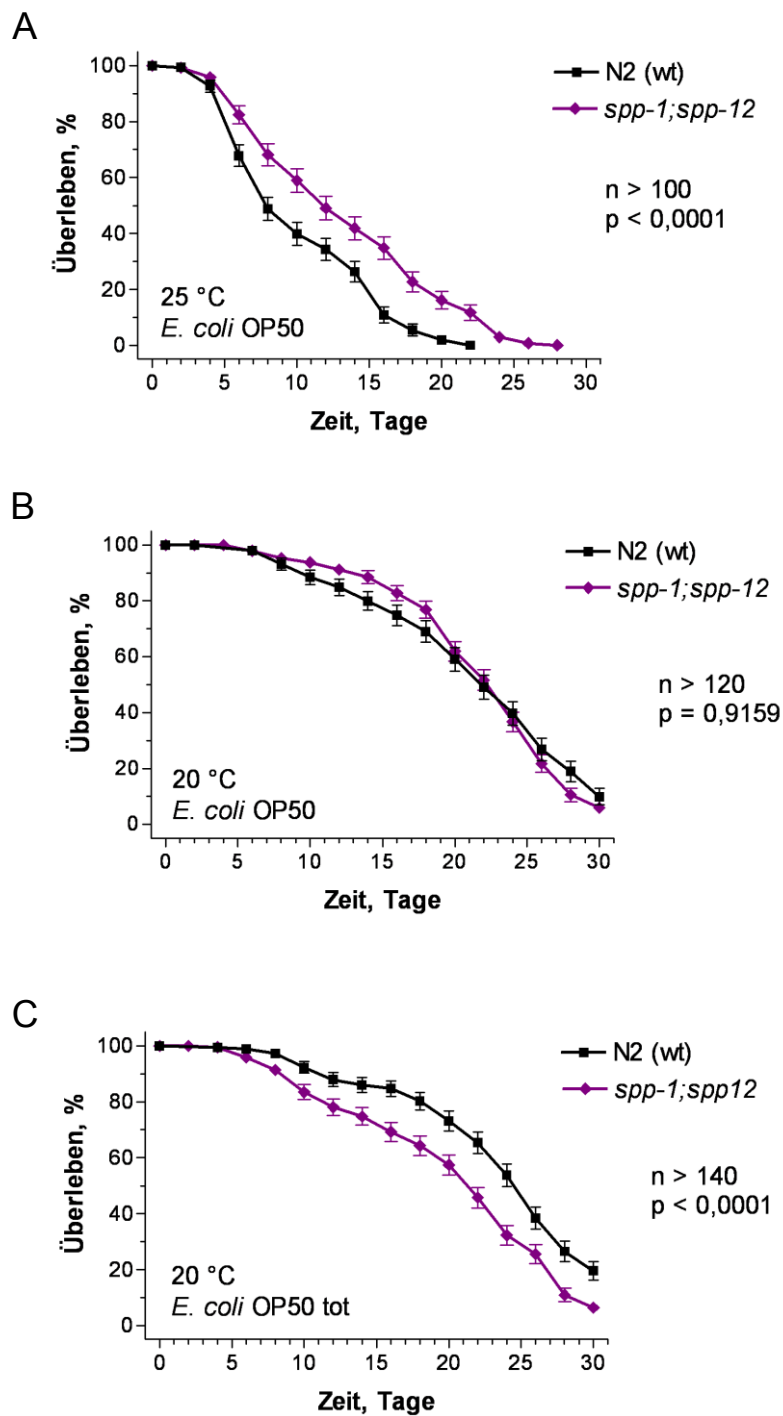


Abb. 16 Lebensspannen der *spp-1;spp-12*-Mutante und des Wildtyps, **A)** und **C)** auf lebenden, **B)** auf hitzeinaktivierten *E. coli* OP50 auf NGM-Platten, **A)** und **B)** bei 20 °C, **C)** bei 25 °C. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardfehler der Mittelwerte von mindestens drei unabhängigen Experimenten. Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des Logrank-Tests: n ist die in den Test eingehende Individuenzahl pro Stamm, die Lebensspannen sind signifikant unterschiedlich, wenn $p < 0,05$.

3.3.5 Einfluss ausgewählter *spp*-Gene auf die Fettreserven in Kontakt zu nicht-pathogenen Bakterien

Zumindest ein Vertreter der SAPLIP-Familie ist an der Verdauung beteiligt, so dass ohne das Mitwirken von SPP-5 die Würmer nicht an die Nährstoffe der Bakterien gelangen können (Roeder *et al.* 2010). Defizite in der Assimilation von Fetten können durch eine Fettfärbung sichtbar gemacht werden. Anfärben sämtlicher Fette der *spp-1*-, *spp-12*- und *spp-1;spp-12*-Mutante durch den Fluoreszenzfarbstoff BODIPY zeigte leicht erhöhte Fettspeicher der *spp-1*-Mutante (**Abb. 17**). Für die anderen beiden Mutanten wurde in der Fetteinlagerung kein Unterschied zum Wildtyp erkannt (**Abb. 17**).

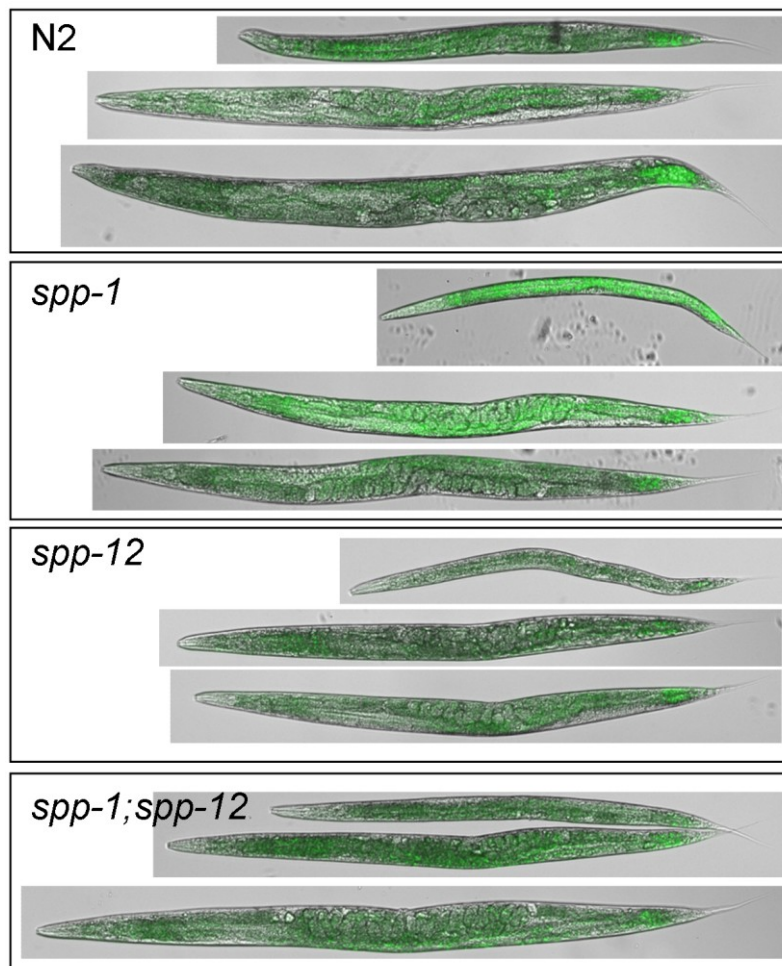


Abb. 17 Fettfärbung der *spp-1*-, *spp-12*-, *spp-1;spp-12*-Mutante und des Wildtyps (N2) mittels BODIPY. Gezeigt sind jeweils verschiedene Entwicklungsstadien. Die Aufnahmen wurden alle bei gleicher Belichtungszeit gemacht.

3.4 Antimikrobielle Aktivität von SPP-1 und SPP-12

Da die *spp-1*- und *spp-12*-Mutanten Abweichungen in ihrem Überleben auf *E. coli* OP50 und *B. thuringiensis* verglichen mit dem Wildtyp zeigten, stellte sich die Frage, ob die rekombinant hergestellten Proteine gegen diese Bakterien antimikrobiell aktiv sind.

Die antimikrobielle Aktivität wurde mithilfe des Mikrosuszeptibilitätstests bewertet. Hierbei wird die minimale Konzentration eines Proteins bestimmt, bei welcher es Bakterien in seinem Wachstum inhibiert bzw. tötet. Man spricht dabei von der minimalen inhibitorischen Konzentration (MIC) bzw. von der minimalen bakteriziden Konzentration (MBC).

Sowohl SPP-1 als auch SPP-12 zeigten bei einer Konzentration von bis zu 10 µM für SPP-1 bzw. 20 µM für SPP-12 keine antimikrobielle Aktivität gegen *E. coli* OP50 (**Tab. 11**). Dagegen konnte SPP-12 bei einer minimalen Konzentration von 10 µM *B. thuringiensis* BT247 in seinem Wachstum inhibieren und auch töten (**Tab. 11**). SPP-1 war bis zu einer Konzentration von 10 µM nicht aktiv gegen dieses Bakterium (**Tab. 11**). Allerdings töteten beide *B. megaterium* in viel geringeren Konzentrationen. Die minimale inhibitorische und bakterizide Konzentration für dieses Bakterium lag für SPP-1 und SPP-12 bei 275 nM (**Tab. 11**).

Tab. 11 Minimale inhibitorische Konzentration (MIC) und minimale bakterizide Konzentration (MBC) des rekombinanten SPP-1 und SPP-12 gegen diverse Bakterien bei pH 5,2

Bakterienstamm	SPP-1		SPP-12	
	MIC, µM	MBC, µM	MIC, µM	MBC, µM
<i>E. coli</i> OP50	>10	>10	>20	>20
<i>B. thuringiensis</i> BT247	>10	>10	10	10
<i>B. megaterium</i> ATCC 14581	0,275	0,275	0,275	0,275

3.5 Transkriptionsregulation ausgewählter *spp*-Gene unter pathogenen und nicht-pathogenen Bedingungen

Nachdem das Fehlen einzelner *spp*-Gene im Wurm unter verschiedenen Bedingungen untersucht wurde, war es nun von Interesse die Auswirkung dieser Bedingungen auf die Transkription von *spp*-Genen im Wildtyp zu analysieren. Dafür wurden Wildtyp-Würmer für 24 h auf Sporen des pathogenen (BT247), bzw. nicht-pathogenen (DSM350) *B. thuringiensis*-Stammes, auf lebenden, bzw. hitzeinaktivierten *E. coli* OP50 oder auf Platten mit hitzeinaktiviertem Medium als Kontrolle inkubiert und die Änderung der Transkription ausgewählter *spp*-Gene durch quantitative *Real-time* PCR bestimmt. In die Analyse wurden alle *spp*-Gene von *spp-1* bis *spp-10* mit einbezogen, deren Genprodukt nur eine putative SAPLIP-Domäne besitzt (*spp-1* bis *spp-6*, *spp-9*), und außerdem noch *spp-12* und *spp-18*, welches in Microarrays unter vielen getesteten Bedingungen eine positive Veränderung der Transkriptionsrate gezeigt hat (O'Rourke *et al.* 2006, Shapira *et al.* 2006, Wong *et al.* 2007, Coolon *et al.* 2009, Irazoqui *et al.* 2010a).

In Kontakt zu Sporen des pathogenen *B. thuringiensis* im Vergleich zu Exposition mit Sporen des nicht-pathogenen Stammes wurde die Transkription von *spp-1* deutlich negativ reguliert, sowohl bei 20 °C als auch bei 25 °C. Außerdem wurde die Transkription von *spp-3* und *spp-6* bei 20 °C auf Sporen des pathogenen *B. thuringiensis* negativ reguliert. Die Transkriptionsrate von *spp-9* und *spp-18* war bei 25 °C auf pathogenen *B. thuringiensis* erhöht. Die Expression aller anderen Gene, wurde unter den verglichenen Bedingungen nicht transkriptionell reguliert (**Abb. 18**).

Vergleicht man die Transkription der *spp*-Gene von Würmern auf hitzeinaktivierten *E. coli* OP50 bezogen auch lebende *E. coli* OP50, so werden *spp-9* und *spp-12* in Kontakt zu den abgetöteten Bakterien stark positiv reguliert, die Transkriptionsrate von *spp-2*, *spp-4*, *spp-6* und *spp-18* ist leicht erhöht, *spp-1*, *spp-3* und *spp-5* zeigen dieselbe Transkriptmenge auf lebenden und toten *E. coli* OP50 (**Abb. 19**). Diese Effekte sind nicht abhängig von dem Prozess der Hitzeinaktivierung, da Würmer auf Medium, welches dem gleichen Verfahren unterzogen wurde, wie die Bakterien, keine Regulation der mRNA zeigen bezogen auf Tiere, welche lebenden *E. coli* OP50 ausgesetzt waren (**Abb. 19**).

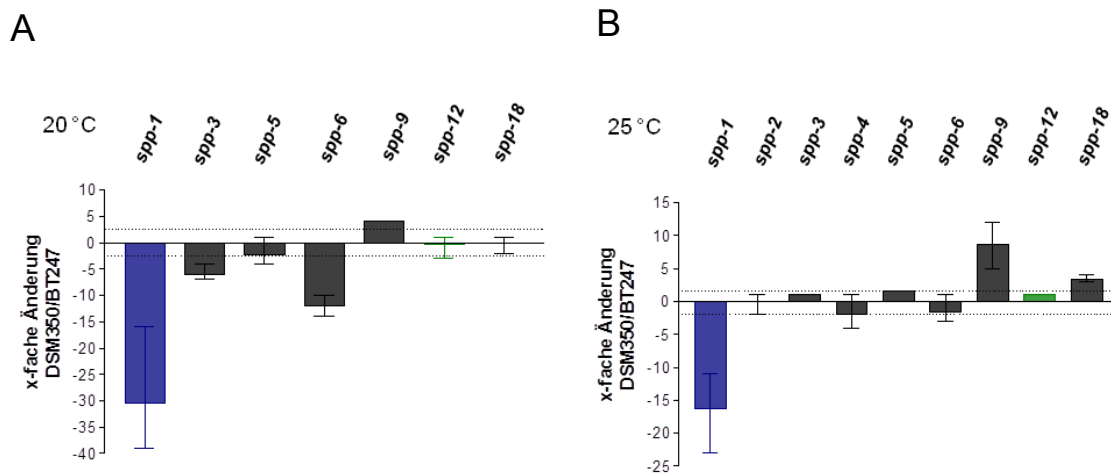


Abb. 18 Änderung der Transkriptionsrate von **A)** *spp-1*, *spp-3*, *spp-5*, *spp-12* und *spp-18* bei 20 °C und **B)** *spp-1*, *spp-2*, *spp-3*, *spp-5*, *spp-6*, *spp-9*, *spp-12* und *spp-18* bei 25 °C im Wildtyp-Hintergrund nach 24-stündigem Kontakt mit Sporen des pathogenen *B. thuringiensis* BT247 in Bezug auf Kontakt mit Sporen des nicht-pathogenen *B. thuringiensis*-Stammes DSM350 jeweils verdünnt in *E. coli* OP50. Die Sporenkonzentration betrug 2×10^8 Sporen in 6×10^9 *E. coli* OP50 je ml. Dargestellt sind drei biologische Replikate, der Median und die Extremwerte als Fehlerbalken. Die Skalierung wurde den Werten entsprechend angepasst.

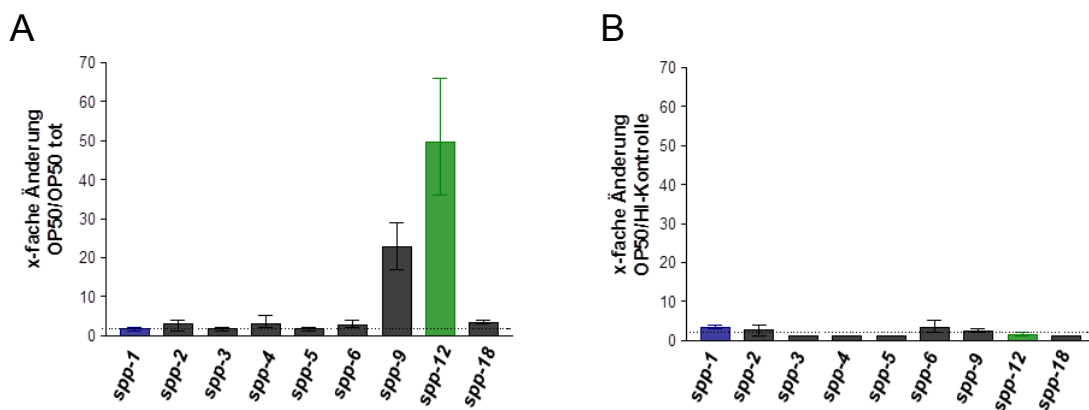


Abb. 19 Änderung der Transkriptionsrate von *spp-1*, *spp-2*, *spp-3*, *spp-4*, *spp-5*, *spp-6*, *spp-9*, *spp-12* und *spp-18* im Wildtyp-Hintergrund nach 24-stündiger Inkubation **A)** mit hitzeinaktivierten *E. coli* OP50, **B)** mit Medium, welches dem Hitzeinaktivierungs-Verfahren unterzogen wurde, bezogen auf Würmer in Kontakt zu lebenden *E. coli* OP50 bei 25 °C. Dargestellt sind drei biologische Replikate, der Median und die Extremwerte als Fehlerbalken. Die Skalierung wurde den Werten in **A)** angepasst und in **B)** beibehalten.

3.6 Charakterisierung von SPP-3

Da für SPP-3 noch keine Information über mögliche antimikrobielle oder porenbildende Aktivität vorhanden war, das zugehörige Gen allerdings durch Transkriptionsänderung in Antwort auf verschiedene Bakterien auffiel (Shapira *et al.* 2006, Wong *et al.* 2007, Roeder *et al.* 2010), wurde im abschließenden Teil dieser Arbeit das Protein rekombinant in Bakterien hergestellt und auf seine antimikrobiellen und porenbildenden Eigenschaften hin getestet.

3.6.1 Synthese und Reinigung von SPP-3

Das Protein SPP-3 wurde erfolgreich hergestellt, gereinigt und vom Fusionspartner getrennt mit einer Ausbeute von ca. 1 mg pro Liter Bakterienkultur.

Das SPP-3-Fusionsprotein mit einem theoretischen Molekulargewicht von 10663,2 Da wurde augenscheinlich in großen Mengen vom verwendeten Bakterienstamm synthetisiert. Beim Extrakt der Bakterien, welche den leeren Vektor enthielten, fehlte die entsprechende Bande im SDS-Gel (**Abb. 21**). Die Reinigung und Anreicherung über die Immobilisierte-Metall-Affinitäts-Chromatographie (IMAC) resultierte in einem sauberen Fusionsprotein, welches proteolytisch durch die Protease *Factor Xa* gespalten wurde. Allerdings war dieser Prozess nicht vollständig, so dass nur bei etwa der Hälfte des eingesetzten Proteins das SPP-3 mit einem theoretischen Molekulargewicht von 8791,2 Da vom Fusionspartner getrennt wurde. Die finale Reinigung des SPP-3 wurde über eine hydrophobe Matrix erreicht (**Abb. 21**) und Teile (37,5%) des gereinigten Proteins massenspektrometrisch identifiziert (**Abb. 20**). Das Protein bildete in 0,01% TFA vermutlich stabile Tetramere mit einem Molekulargewicht von ca. 35 kDa, welche sich auch nicht durch Reduktion mit DTT, Inkubation bei 100 °C und Alkylierung mit Iodacetamid auflösen ließen (**Abb. 21**). Allerdings war es möglich durch Behandlung mit 8 M Harnstoff, bzw. 1 M NaOH die Oligomere zu monomerisieren.

Das resultierende Protein besteht aus 80 Aminosäuren und besitzt 14 negativ geladene (Glutamat und Aspartat) und 10 positiv geladene (nur Lysin, kein Arginin) Aminosäure-Reste (**Abb. 20**). Auffällig ist, dass die Lysine an drei Stellen, jeweils als Paar benachbart in der Primärstruktur vorkommen (**Abb. 20**). Das Hydrophobizitäts-Profil zeigt einen größeren hydrophoben Bereich im ersten Viertel des Proteins, der restliche Teil ist eher hydrophil (**Abb. 22**).

```
1  GNGIECEMCK MSVKIVVPML GEDTESIKKA VDAECKKEFH SIPFGTQECK  
51 KFIDTKLDPI IHELENGTAP SDVCTKLGMC
```

Abb. 20 Aminosäuresequenz des SPP-3. Die rot markierten Bereiche wurden massenspektrometrisch identifiziert (*peptide mass fingerprint*, Sequenz-Abdeckung 37,5%).

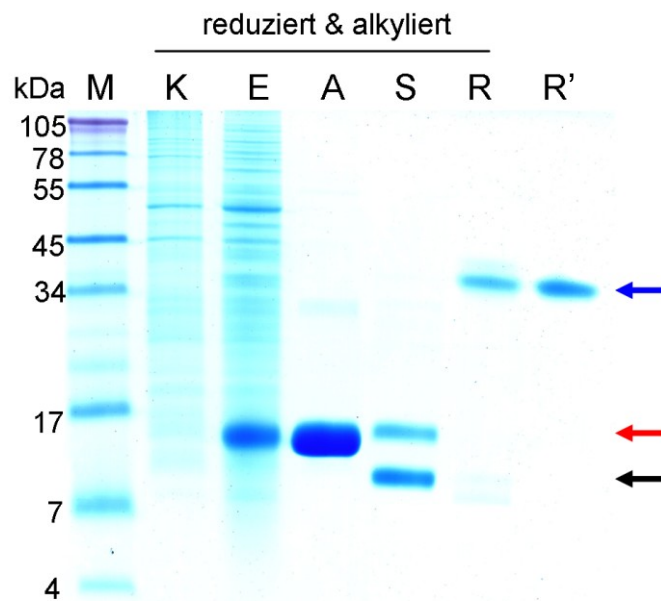


Abb. 21 Schritte der Herstellung des rekombinanten Proteins SPP-3, dargestellt mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung. Extrakte von *E. coli* BL21 pAPlac^Q transformiert mit *spp-3* in pIVEX2.4a (E) oder dem leeren Vektor (K) in TBS, pH 7,4, Anreicherung über IMAC (A), proteolytische Spaltung durch *Factor Xa* (S) und finale Reinigung über eine hydrophobe Matrix (R). Aufgetragen wurden je 10 μ l nach Reduktion und Alkylierung, vom finalen Protein nur 1 μ l, wobei dieses zusätzlich nicht reduziert und nicht alkyliert aufgetragen wurde (R'). Pfeile markieren die erwartete Größe des Fusionsproteins (rot) und des gespaltenen SPP-3 (schwarz). In 0,01% TFA bildet SPP-3 vermutlich stabile Oligomere (blau). Größenstandard (M): SeeBluePlus2 von Invitrogen.

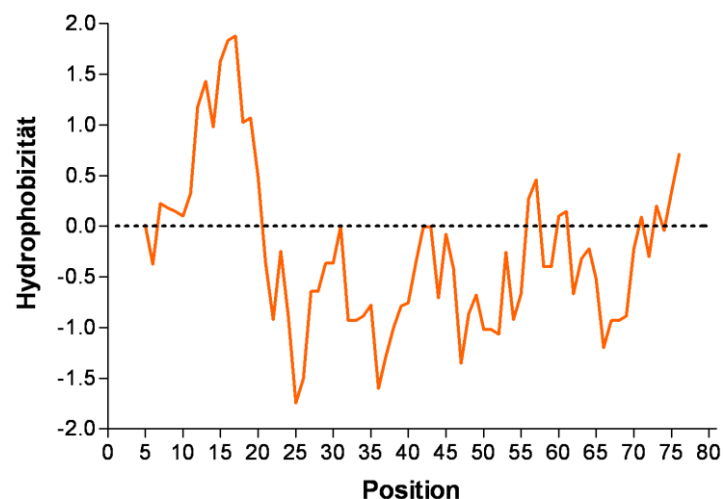


Abb. 22 Hydrophobizitäts-Profil von SPP-3, wobei positive Werte hydrophoben Aminosäuren entsprechen und negative Werte hydrophile Bereiche anzeigen. Die Berechnung wurde unter <http://web.expasy.org/protscale/> mit einer Fenstergröße von 9 durchgeführt (nach Kyte & Doolittle 1982).

3.6.2 Porenbildende Aktivität von SPP-3

Das gereinigte Protein wurde im Folgenden auf seine Eigenschaften hin untersucht. Als erstes wurde SPP-3 im Liposomen-Depolarisationstest eingesetzt und damit auf seine porenbildende Aktivität getestet. Hierbei wird mithilfe von Valinomycin ein Diffusionspotential über der Liposomenmembran aufgebaut, wodurch der verwendete Fluoreszenzfarbstoff DTDC gebunden wird und seine fluoreszierende Eigenschaft verliert. Der Zusatz des porenbildenden Proteins zerstört schließlich das Membranpotential und führt zu einem Anstieg der Fluoreszenz durch Freisetzung des Farbstoffs. Der Anstieg der Fluoreszenz ist somit ein Maß für die porenbildende Aktivität eines Stoffes, wobei ein Fluoreszenzanstieg innerhalb von einer Minute nach Zugabe des Porenbildners bei 25 °C um 5% als eine Aktivitätseinheit (Unit) definiert wird (Leippe *et al.* 1991).

Der Liposomen-Depolarisationstest ergab, dass das rekombinante Protein SPP-3 Poren in der Membran von Liposomen bildet. Dieser Vorgang war allerdings stark abhängig vom pH-Wert. So wies das Protein bei pH 4,4 eine porenbildende Aktivität von ca. 8 Units/nmol auf, welche hin zu höheren pH-Werten stark abfiel, so dass bei pH 5,5 nur etwa 2,5 U/nmol und bei pH 6,2 und 7,4 nur noch ungefähr 0,5 U/nmol gemessen wurden (**Abb. 23**). Das Kontrollpeptid Alamethicin erreichte im Vergleich eine wesentlich höhere Aktivität von 50 bis 120 U/nmol (Daten nicht gezeigt).

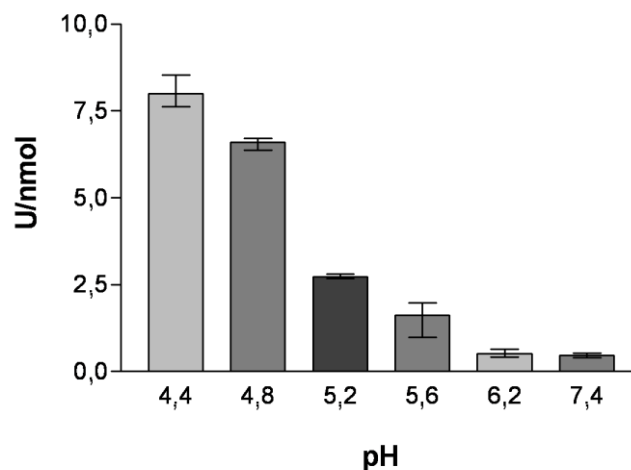


Abb. 23 Porenbildende Aktivität von SPP-3 abhängig vom pH-Wert. Dargestellt sind je 3 Replikate pro pH-Wert, wobei jeweils die für die Pufferkontrolle erhaltenen Werte abgezogen sind.

3.6.3 Antimikrobielle Aktivität von SPP-3

Auch für SPP-3 wurde die antimikrobielle Aktivität mithilfe des Mikrosuszeptibilitätstests bewertet.

Zusätzlich zur porenbildenden Aktivität, zeigte sich SPP-3 bei pH 5,2 antimikrobiell aktiv gegen verschiedenste Bakterien, sowohl gegen Gram-negative Bakterien wie *E. coli*, *P. aeruginosa*, *Ph. luminescence*, *X. nematophila* und *Y. enterocolitica*, als auch gegen Gram-positive Bakterien wie *B. megaterium* und *B. thuringiensis*. Von allen getesteten Bakterien beeinträchtigte SPP-3 bei Konzentrationen bis zu 36 µM lediglich *S. marcescens* und *Staph. aureus* nicht in ihrem Wachstum (**Tab. 12**). Auf alle anderen genannten Bakterien wirkte SPP-3 in Konzentrationen zwischen 3 und 36 µM wachstumshemmend. Allerdings wurden nur *B. megaterium*, *X. nematophilum* und *E. coli* in diesem Konzentrationsbereich auch getötet. Die minimale inhibitorische Konzentration und die minimale bakterizide Konzentration für die einzelnen Bakterien bei pH 5,2 kann der **Tab. 12** entnommen werden. Bei einem pH-Wert von 7,4 wirkte SPP-3 bis zu einer Konzentration von 36 µM weder bakteriostatisch noch bakterizid.

Tab. 12 Minimale inhibitorische Konzentration (MIC) und minimale bakterizide Konzentration (MBC) des rekombinanten SPP-3 gegen diverse Bakterien bei pH 5,2

Bakterienstamm	MIC, µM	MBC, µM
Gram-negative Bakterien		
<i>E. coli</i> K12 D31	9	27
<i>E. coli</i> OP50	18	36
<i>P. aeruginosa</i> PA01	36	>36
<i>S. marcescens</i> Db11	>36	>36
<i>Ph. luminescens</i> Hb	36	>36
<i>X. nematophila</i> F1	36	36
<i>Y. enterocolitica</i> 96C	18	>36
Gram-positive Bakterien		
<i>B. megaterium</i> ATCC 14581	3	3
<i>B. thuringiensis</i> BT247	9	>36
<i>Staph. aureus</i> ATCC 12600	>36	>36

3.6.4 Membranpermeabilisierende Aktivität von SPP-3

Mit dem Test auf membranpermeabilisierende Aktivität kann man die Ursache der antimikrobiellen Aktivität näher bestimmen. In diesem Test wird zusätzlich zum antimikrobiellen Protein und den zu testenden Bakterien der Fluoreszenzfarbstoff SYTOX Green gegeben, welcher nur fluoreszierende Eigenschaften aufweist, wenn er in DNA interkaliert. Da eine Interkalierung mit DNA nur möglich ist, wenn die bakterielle Membran zerstört ist, kann auftretende Fluoreszenz als ein Maß für die Permeabilisierung von Membranen gewertet werden.

Für *B. megaterium* wurde beispielhaft gezeigt, dass die Bakterien durch SPP-3 getötet werden, indem die Bakterienmembran permeabilisiert wird. Dabei war die membranpermeabilisierende Aktivität von SPP-3 geringer als die der Kontrollpeptide Cecropin P1 und Magainin II (**Abb. 24 A**). Betrachtet man die permeabilisierende Aktivität zu verschiedenen Zeitpunkten nach Inkubation des Proteins mit dem Bakterium, so fällt auf, dass nach 2 min so gut wie keine Aktivität vorhanden war, diese erhöhte sich nach 5 bis 10 min und stieg bei höheren Konzentrationen stark an, allerdings wurde erst nach 30 min die volle Aktivität auch bei geringeren Proteinkonzentrationen erreicht (**Abb. 24 B**).

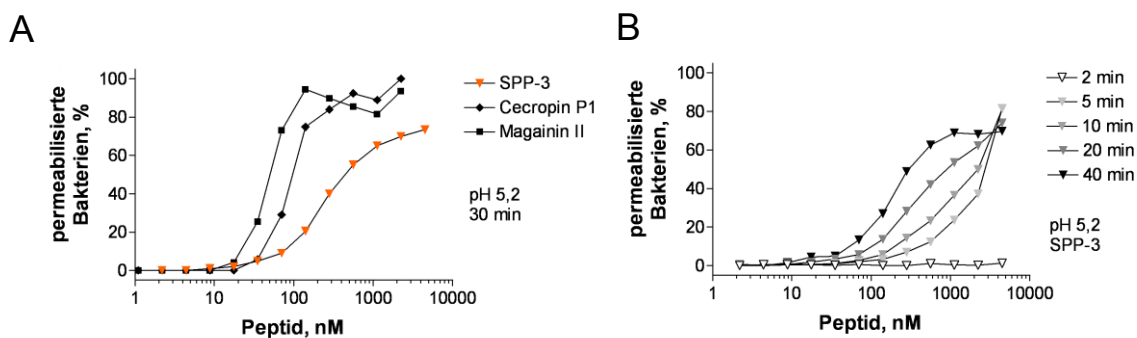


Abb. 24 Membranpermeabilisierende Aktivität von SPP-3 gegenüber *B. megaterium* ATCC 14581 bei pH 5,2 **A**) nach 30 min Inkubation, Cecropin P1 und Magainin II wurden als Kontrollpeptide eingesetzt, **B**) nach 2, 5, 10, 20 und 40 min Inkubation. Die permeabilisierende Aktivität ist als Prozentsatz der permeabilisierten Bakterien angegeben und ist abhängig von der Peptidkonzentration. Die Datenpunkte stammen von einem repräsentativen Experiment aus drei unabhängigen Messungen.

3.7 Gewebslokalisierung der Promotoraktivität von *spp-3*

Als ein induzierbarer Kandidat der SAPLIP-Familie mit ELT-2-Bindungsstelle in der Promotorregion (Shapira *et al.* 2006, Roeder *et al.* 2010) wurde *spp-3* für eine genauere Analyse ausgewählt. Wie auch schon für *spp-12* wurde Promotoraktivität im Wurm mithilfe eines *spp-3p::spp-3::gfp*-Konstrukts lokalisiert. Diese zeigte sich im Darm, wie auch in einem Kopfneuron namens SDQR (Anteriores laterales Interneuron) (**Abb. 25**).

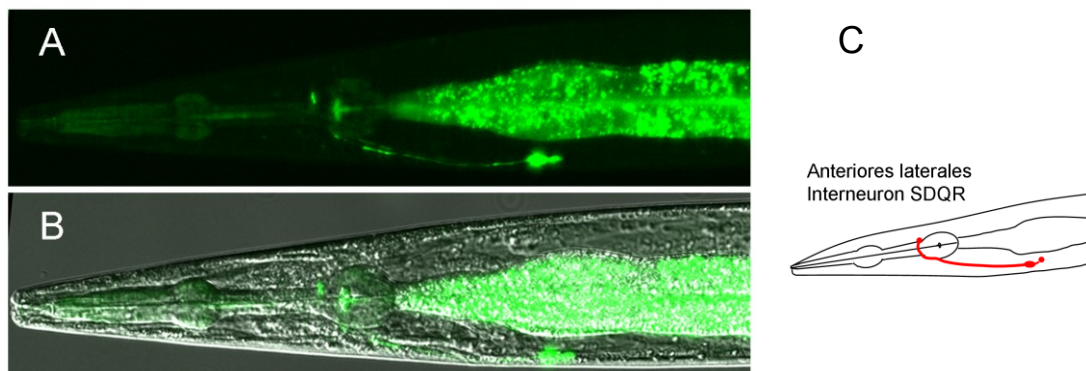


Abb. 25 Lokalisation der Promotoraktivität von *spp-3* im Gewebe mit Hilfe eines *spp-3p::spp-3::gfp*-Reporterkonstrukts. Hierfür sind der Promotor- und die Gensequenz fusioniert mit *gfp* in den Wurm eingebracht worden. Zu sehen ist der Bereich des Pharynx und der anteriore Abschnitt des Darms: *spp-3* wird im Darm und in einem Kopfneuron exprimiert. **A)** GFP-Kanal, **B)** Überlagerung DIC-Kanal und GFP-Kanal, **C)** schematische Darstellung des Neurons SDQR, in dem *spp-3* exprimiert wird (modifiziert nach www.wormatlas.org).

3.8 Charakterisierung *spp-3*-RNAi-behandelter Würmer

Da das Protein SPP-3 antimikrobielle und porenbildende Aktivität zeigte, stellte sich die Frage, welche Rolle *spp-3* im Wurm einnimmt. Um dieser nachzugehen wurde ein RNAi-Vektor für *spp-3* hergestellt, die RNAi-Bakterien *E. coli* HT115 damit transformiert und an Wildtyp-Würmer verfüttert. Als Kontrolle dienten Würmer, welche Bakterien mit dem leeren Vektor ausgesetzt waren.

Es wurden zwei grundlegende Experimente mit den RNAi-behandelten Würmern durchgeführt. Zum einen wurde die Eiablage rate und zum anderen die Anzahl lebender Bakterien im Darm bestimmt.

3.8.1 Eiablage rate von *spp-3*-RNAi-behandelten Würmern

Die Bestimmung der Eiablage von 5 jungen Hermaphroditen innerhalb von 24 h auf RNAi-Bakterien ergab eine signifikant ($p < 0,0001$) erhöhte Eiablage der *spp-3*-RNAi-behandelten Würmer im Vergleich zur Kontrolle (**Abb. 26 A**)

3.8.2 Anzahl lebender Bakterien im Darm von *spp-3*-RNAi-behandelten Würmern

In der Anzahl lebender Bakterien im Darm unterschieden sich Würmer mit stillgelegtem *spp-3* nicht von denen der Kontrolle ($p = 0,1051$, **Abb. 26 B**).

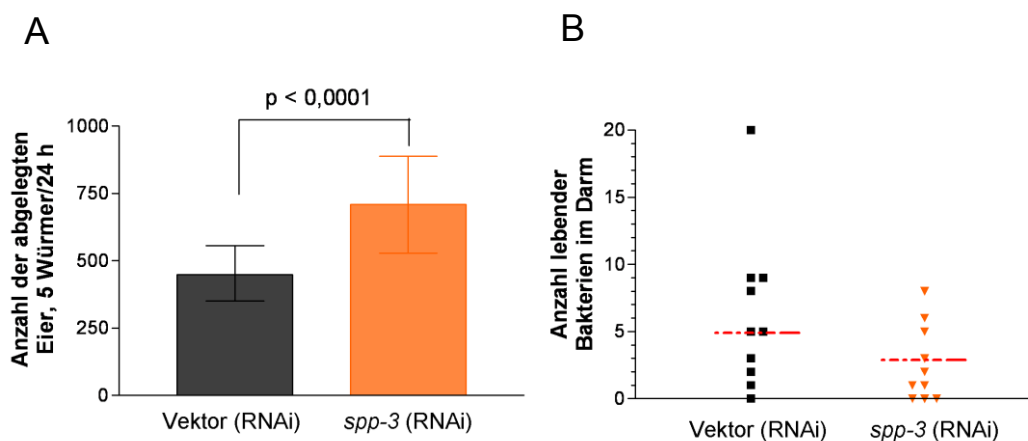


Abb. 26 Charakterisierung *spp-3*-RNAi-behandelter Würmer. **A)** Eiablage rate von fünf Würmern innerhalb von 24 h auf *E. coli* HT115 mit dem RNAi-Vektor mit *spp-3* oder dem leeren Vektor gelegte Eier bei 20 °C, $n = 10$, dargestellt ist der Median und die Extremwerte. **B)** Anzahl der lebenden Bakterien im Darm von 20 Würmern, $n = 10$, dargestellt sind alle Datenpunkte und der Median als horizontale Linie. Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des t-Tests. Die Unterschiede sind signifikant, wenn $p < 0,05$.

4 Diskussion

Der Nematode *C. elegans* ist in seinem natürlichem Habitat, frischem Kompost und verrottenden Früchten, ständig Mikroorganismen ausgesetzt. Diese dienen dem bakterivoren Wurm vor allem als Nahrungsquelle, können aber auch potentiell pathogen sein. Die Familie der Saposin-ähnlichen Proteine in *C. elegans*, die Caenopores, besteht, soweit bekannt, aus vor allem im Darm lokalisierten, antimikrobiellen und porenbildenden Proteinen, welche den Wurm im Zusammenspiel mit anderen antimikrobiellen Effektoren die Möglichkeit bieten sich gegen Pathogene zu verteidigen und Bakterien zur Nahrungsaufnahme zu töten. Die etwa 33 SPP-Proteine sind bis auf wenige Ausnahmen noch weitgehend unerforscht. Obwohl die zugehörigen Gene gelegentlich durch Transkriptionsänderung in Kontakt zu verschiedenen Bakterien auffallen, ist ihre Regulation noch nicht genau verstanden.

Regulation der spp-Transkription durch DAF-16

Das vollständig sequenzierte Genom von *C. elegans* ermöglicht die Durchführung von Promotoranalysen. Potentielle Bindungsstellen für verschiedene Transkriptionsfaktoren können durch die Suche nach ihren Konsensus-Sequenzen identifiziert werden. Besonderes Interesse gilt hierbei dem Transkriptionsfaktor DAF-16, welcher nach Aktivierung in den Kern wandert, um dort die Transkription seiner Zielgene zu aktivieren. So konnten Konsensus-Sequenzen für Bindungsstellen des Transkriptionsfaktors DAF-16 gefunden (Furuyama *et al.* 2000, Murphy *et al.* 2003) und diese Sequenzen *in-vitro* auf ihre Fähigkeit DAF-16 zu binden untersucht werden (Curran *et al.* 2009). Trotz intensiver Erforschung der Zielgene des DAF-2/DAF-16-Signalweges (Lee *et al.* 2003, McElwee *et al.* 2003, Murphy *et al.* 2003, Ookuma *et al.* 2003, McElwee *et al.* 2004, Halaschek-Wiener *et al.* 2005, Oh *et al.* 2006), sind wahrscheinlich viele Gene deren Transkription über DAF-16 reguliert wird unentdeckt geblieben. Der Grund hierfür könnte in der bisher nicht vollständig verstandenen Regulation des Transkriptionsfaktors DAF-16 liegen. Innerhalb der SAPLIP-Genfamilie wurden bereits für *spp-1*, *spp-5* und *spp-12* potentielle DAF-16-Bindungsstellen nachgewiesen (Murphy *et al.* 2003, Lee *et al.* 2009), so dass deren Transkription vermutlich durch DAF-16 reguliert wird.

In dieser Arbeit konnte auch für alle anderen SAPLIP-Gene mindestens eine putative DAF-16-Bindungsstelle gefunden werden (**Tab. 10**), so dass DAF-16 an der Transkriptionsregulation dieser Gene beteiligt sein könnte. Obwohl alle *spp*-Gene mindestens eine DAF-16-Bindungsstelle und die meisten eine ELT-2-Bindungsstelle (Roeder *et al.* 2010) in ihrer Promotorregion besitzen, existieren jedoch keine wesentlichen Übereinstimmungen in ihren Expressionsprofilen in Bezug auf die Induzierbarkeit durch verschiedene Mikroorganismen oder abiotische Faktoren (**Tab. 1**, **Tab. 2**) (Mallo *et al.* 2002, Huffman *et al.* 2004, Kwon *et al.* 2004, O'Rourke *et al.* 2006,

Shapira *et al.* 2006, Troemel *et al.* 2006, Wong *et al.* 2007, Alegado & Tan 2008, Coolon *et al.* 2009, Lee *et al.* 2009, Lewis *et al.* 2009, Irazoqui *et al.* 2010a, Rohlfing *et al.* 2010, Pukkila-Worley *et al.* 2011). Dies spricht für eine komplexe Regulation der Transkription dieser Gene, welche nötig ist, um spezifisch auf einzelne Faktoren, wie bestimmte Pathogene oder andere Stressoren, zu reagieren und gegen eine generelle Stressantwort, bei der viel Effektoren unspezifisch wirksam werden. Eventuell spielt auch die Position und die Anzahl der möglichen DAF-16-Bindungsstellen eine Rolle in der Regulation. Hinzu kommen sehr wahrscheinlich noch Bindungsstellen für andere Transkriptionsfaktoren, welche z.B. wie ELT-2 gewebespezifisch agieren, oder andere, die in den bisherigen Studien unerkannt blieben. Diese könnten sowohl die Lokalisation bestimmen, als auch auf äußere Einflüsse reagieren, welche die zugehörigen Genprodukte erforderlich machen. Ein gleicher Regulationsweg könnte z.B. auch in den verschiedenen Geweben ein unterschiedliches Transkriptionsprofil bedingen.

Gewebslokalisierung der *spp*-Promotoraktivität in Neuronen

Die Infektion mit Bakterien erfolgt in den meisten Fällen über den Darm, so dass das Vorhandensein antimikrobieller Effektoren in dieser Region sinnvoll ist. Die meisten *spp*-Gene besitzen eine Bindungsstelle für den darmspezifischen Transkriptionsfaktor ELT-2 und die bereits untersuchten Vertreter *spp-1*, *spp-5* und *spp-7* zeigen tatsächlich Promotoraktivität im Darm (Kunitomo *et al.* 2005, Alper *et al.* 2007, Roeder *et al.* 2010). Die hier lokalisierten SPPs sind wahrscheinlich wichtig für die Abwehr von Pathogenen, so wurde für SPP-1 und SPP-5 antimikrobielle Aktivität nachgewiesen (Stanisak 2007, Roeder *et al.* 2010). Zumindest für SPP-5 wurde außerdem gezeigt, dass es für den Abbau der Bakterien nötig ist, damit die enthaltenen Nährstoffe in die Darmzellen aufgenommen werden können. Somit spielt dieses auch eine Rolle in der Verdauung (Roeder *et al.* 2010)

In dieser Arbeit konnte Promotoraktivität von *spp-3*, welches ebenfalls eine putative ELT-2-Bindungsstelle in seiner Promotorregion besitzt, im Darm und zusätzlich in einem Kopfneuron lokalisiert werden (**Abb. 25**).

Vier Vertreter der SAPLIP-Genfamilie besitzen keine ELT-2-Bindungsstelle, *spp-2*, *spp-12*, *spp-16* und *spp-19* (Stanisak 2007, Roeder *et al.* 2010). Für *spp-12* wurde bereits auf Transkriptionsebene gezeigt, dass es in Nicht-Darm-Zellen exprimiert ist, wobei die Frage nach der genauen Lokalisation offen blieb (Stanisak 2007). Promotoraktivität von *spp-12* konnte in dieser Arbeit tatsächlich nicht im Darm, aber dafür exklusiv in zwei pharyngealen Neuronen nachgewiesen werden (**Abb. 8**).

Eine Expression der Gene für antimikrobielle Effektoren in den Neuronen erscheint zunächst ungewöhnlich, wurde aber bereits in anderen Organismen und auch im Wurm gefunden. So wurde für *C. elegans* Promotoraktivität von zwei Lysozym-Genen, *lys-1*

und *lys-7*, in Kopfneuronen nachgewiesen, wobei vermutet wird, dass die zugehörigen Genprodukte in den Darm sezerniert werden (Mallo *et al.* 2002, Alper *et al.* 2007).

Auch die Neuronen, in denen *spp-12* Promotoraktivität zeigt, NSM und I6, produzieren einige Vertreter der Neuropeptid-ähnlichen-Proteine (NLPs), einer großen Familie von potentiell antimikrobiellen Proteinen. So werden *nlp-13*, *nlp-18* und *nlp-19* im NSM und *nlp-3* im I6 exprimiert (Nathoo *et al.* 2001). Für NLP-31, ein weiteres Mitglied der NLPs, wurde bereits antimikrobielle Aktivität gegen Pilze und Bakterien nachgewiesen (Couillault *et al.* 2004).

Ein anderer Organismus, welcher antimikrobielle Peptide in Neuronen produziert ist der medizinische Blutegel *Hirudo medicinalis*. Hier dienen die antimikrobiellen Proteine Neuromacin und *Hm-Lumbricin* wahrscheinlich für den Schutz des Nervensystems (Schikorski *et al.* 2008). Ebendiese Funktion könnten auch *spp-3* und *spp-12* in *C. elegans* in den Nerven übernehmen, in denen sie Promotoraktivität zeigen (**Abb. 8, Abb. 25**). Das pharyngeale neurosekretorische Motorneuron NSM/L, eins der beiden Neuronen in denen *spp-12* exprimiert ist, hat kleine synapsenfreie Fortsätze mit freien Endigungen direkt unter der Kutikula des pharyngealen Lumens, und auch das pharyngeale Interneuron I6, das andere Neuron in dem *spp-12* Promotoraktivität zeigt, hat eine freie subkutikuläre Endigung zwischen den pharyngealen Muskeln pm6 und pm7 (Albertson & Thomson 1976). Diese offenen Verbindungen könnten eventuell durch SPP-12 vor dem Eindringen von Mikroorganismen geschützt werden.

Die Rolle von SPP-12 in der Wahrnehmung von Bakterien

Aufgrund der räumlichen Nähe der freien Endigungen des NSM zum pharyngealen Lumen an der Grenze, zwischen Korpus und Isthmus, an welcher Bakterien akkumulieren, wird vermutet, dass das NSM an der Wahrnehmung von Bakterien beteiligt ist (Albertson & Thomson 1976). Es wird postuliert, dass die Wahrnehmung von Bakterien das NSM dazu anregt, Serotonin ins Pseudocoelom auszuschütten und so die Information zu verbreiten (Albertson & Thomson 1976, Horvitz *et al.* 1982). Das Vorhandensein von Futter führt zu gesteigertem pharyngealen Pumpen, abnehmender Lokomotion und gesteigertem Eiablageverhalten (Horvitz *et al.* 1982).

Um die Frage zu klären, ob SPP-12 im NSM an der Wahrnehmung der Bakterien beteiligt ist, wurde die Eiablage, die Populationsgröße und die pharyngeale Pumprate einer *spp-12*-Mutante mit der des Wildtyps verglichen.

Es ist nicht auszuschließen, dass SPP-12 eventuell in die Erkennung der Bakterien involviert ist, da Abweichungen der *spp-12* Mutante in der Eiablage, in der Populationsgröße und in der pharyngealen Pumprate in Kontakt zu verschiedenen Bakterien beobachtet wurden (**Abb. 9, Abb. 10, Abb. 11**).

So wurde für Würmer ohne *spp-12* in dieser Arbeit innerhalb von 24 h zu Beginn der Eiablageperiode eine deutlich verringerte Eiablage bei 25 °C im Vergleich zum Wildtyp beobachtet. Bei 15 °C und 20 °C, wie auch bei Betrachtung der Gesamteiablage einzelner Individuen bei allen drei Temperaturen ist kein Unterschied zum Wildtyp zu erkennen (**Abb. 9**). Allerdings bildet die *spp-12*-Mutante nach 5 Tagen bei 20 °C eine kleinere Population als der Wildtyp (**Abb. 10**). Dies könnte somit darauf hindeuten, dass auch bei 20 °C weniger Eier gelegt werden, der Unterschied aber erst durch die Summe der Eiablage mehrerer Generationen sichtbar wird. Wenn man davon ausgeht, dass die *spp-12*-Mutante die Bakterien nicht wahrnimmt, würde das eine verringerte Eiablage im Vergleich zum Wildtyp, welcher in Anwesenheit von Futterbakterien seine Eiablage erhöht, erklären.

Die Messung der pharyngealen Pumprate der *spp-12*-Mutante zeigt nach einer Stunde in Kontakt zu *E. coli* OP50 eine deutliche Erhöhung verglichen mit dem Wildtyp, ebenso nach Kontakt zu Sporen des nicht-pathogenen *B. thuringiensis*-Stammes (**Abb. 11**). Da die Sporen ebenfalls mit *E. coli* OP50 vermischt waren, könnte dieser Effekt in beiden Fällen auf die Anwesenheit dieses Bakteriums zurückzuführen sein.

Ginge man davon aus, dass die *spp-12*-Mutante die Futterbakterien schlechter wahrnehmen kann, würde man erwarten, dass die *spp-12*-Mutante in Reaktion auf *E. coli* OP50 langsamer pumpt als der Wildtyp, da dieser seine Pumprate in Antwort auf Futterbakterien erhöhen würde. Es gibt jedoch eine mögliche Erklärung für dieses Ergebnis, welche die Annahme, dass *spp-12* an der Wahrnehmung beteiligt ist stützt:

C. elegans pumpt auch in Abwesenheit von Futter und verhungerte Würmer pumpen schneller als gut genährte Würmer, wenn sie wieder mit Futter in Kontakt kommen (Avery & Horvitz 1990). Wenn *spp-12*-defiziente Würmer die Futterbakterien nicht richtig wahrnehmen können, denken sie eventuell sie würden verhungern und zeigen deshalb eine erhöhte Pumprate.

Allerdings ist dieser Effekt nur nach einer Stunde Inkubation zu beobachten und ist nach 6 h und nach 26 h nicht mehr sichtbar (**Abb. 11**). Auch hitzeinaktivierte Bakterien rufen keinen Effekt hervor, so dass dieses Ergebnis darauf schließen lässt, dass lebende Bakterien für diese Antwort nötig sind (**Abb. 11**).

Ein weiterer Unterschied der *spp-12*-Mutante in der pharyngealen Pumprate ergibt sich auf Sporen des pathogenen *B. thuringiensis*-Stammes BT247 nach 26 h. Hier ist die Pumprate bei Abwesenheit von *spp-12* deutlich erhöht (**Abb. 11**). Dies könnte dafür sprechen, dass SPP-12 an der Wahrnehmung schädlicher Bakterien beteiligt ist und in Antwort darauf die Pumprate reduziert wird. Bisher ist nicht bekannt wie *C. elegans* Bakterien erkennt, aber es ist unumstritten, dass sie erkannt werden (Shtonda & Avery 2006, Sicard *et al.* 2007). SPP-12 könnte eventuell zu erkennende Komponenten aufgrund seiner Lipid-interagierenden Eigenschaften (Stanisak 2007) binden oder durch

Permeabilisierung der Membran der Bakterien freisetzen, und so dem bisher unbekanntem Rezeptor zuführen.

Zwar zeigt die *spp-12*-Mutante Unterschiede in der Pumprate und in der Eiablage verglichen mit dem Wildtyp, jedoch konnte nicht abschließend geklärt werden, ob SPP-12 an der Wahrnehmung von Bakterien und der dazugehörigen Regulation der Eiablage und der Pumprate beteiligt ist. Eine Schwachstelle könnte dabei auch die Redundanz der NSM mit anderen Neuronen, vor allem dem MC (Avery & Horvitz 1989), in der Detektion von Bakterien sein, so dass mögliche Effekte nur abgeschwächt sichtbar werden.

Es ist möglich, dass SPP-12 seine Funktion auf zweierlei Weise ausübt. Zum einen könnten eindringende Mikroorganismen getötet werden und zum anderen die dadurch entstehenden Abbauprodukte den Erkennungsmolekülen zugeführt werden.

Transkriptionsregulation in Antwort auf *B. thuringiensis*

B. thuringiensis ist ein Gram-positives Bodenbakterium, welchem *C. elegans* wahrscheinlich in seinem natürlichen Umfeld begegnet (Borgonie *et al.* 1995, Schulenburg *et al.* 2004). Es existieren verschiedene *B. thuringiensis*-Stämme, welche für Nematoden unterschiedlich virulent sind, darunter auch nicht-pathogene Stämme. Die unterschiedliche Virulenz erklärt sich durch die Produktion von unterschiedlichen Crystal-Toxinen (BT-Toxine), die sich teilweise sehr spezifisch gegen *C. elegans* und andere Nematoden und auch gegen Insekten richten (Borgonie *et al.* 1995, Leyns *et al.* 1995, Wei *et al.* 2003). *B. thuringiensis* schädigt den Wurm sowohl über Infektion als auch über die Produktion porenbildender Toxine der Cry-Familie, welche während der Sporulation gebildet werden. Die Sporen werden zusammen mit der Nahrung aufgenommen und verursachen im Darm mithilfe der BT-Toxine eine Zerstörung der Membran der Darmzellen. Gleichzeitig keimen die Sporen im Darm aus und das Bakterium kann sich massiv vermehren. Dies führt meistens zum Tod des Wirtes (Borgonie *et al.* 1995). Die Nematoden sind fähig sehr spezifisch auf die von *B. thuringiensis*-produzierten Toxine zu antworten. So wird durch Exposition mit diesem Bakterium die Transkription einer Teilmenge von Genen sehr spezifisch aktiviert, welche nicht mit der generellen Stressantwort auf toxische Substanzen zu verwechseln ist (Huffman *et al.* 2004).

In dieser Arbeit wurde die Änderung der Transkriptionsrate ausgewählter *spp*-Gene nach Exposition mit Sporen des pathogenen *B. thuringiensis*-Stammes BT247 im Vergleich zu Kontakt mit Sporen des nicht-pathogenen *B. thuringiensis*-Stammes DSM350 untersucht. Bei 25 °C wurde unter diesen Bedingungen eine Induktion der Transkription von *spp-9* und *spp-18* beobachtet (**Abb. 18 B**). Die beiden Gene sind bekannt dafür, dass sie auch in Kontakt zu verschiedenen anderen Bakterien verstärkt transkribiert werden. So wird die Transkription von *spp-9* bei Exposition mit *E. carotovora* und *E.*

faecalis, die von *spp-18* bei Inkubation mit *P. aeruginosa*, *P. luminescence*, *Staph. aureus*, *M. nematophilum* und *B. megaterium* positiv reguliert (O'Rourke *et al.* 2006, Shapira *et al.* 2006, Wong *et al.* 2007, Coolon *et al.* 2009, Irazoqui *et al.* 2010a). Eine negative Regulation wurde für die Transkription dieser beiden Gene in keinem Fall beobachtet. Dies spricht für eine generell geringe Transkriptionsstärke, so dass die Genprodukte wahrscheinlich unter nicht-pathogenen Bedingungen nur in sehr geringen Mengen vorhanden sind und die Expression in Kontakt zu bestimmten Bakterien induziert wird, vermutlich in Antwort auf Bakterien, welche die Anwesenheit von SPP-9 und SPP-18 erfordern.

In Antwort auf Sporen des pathogenen *B. thuringiensis*-Stammes war die Transkriptionsrate von *spp-1* sowohl bei 20 °C als auch bei 25 °C stark erniedrigt, die von *spp-3* und *spp-6* wurde bei 20 °C leicht negativ reguliert (**Abb. 18**). Dieser Effekt könnte zum einen vom Bakterium *B. thuringiensis* ausgehen, welches durch Virulenzfaktoren die Immunantwort des Wurms beeinflusst, wie es für das Gram-negative Bakterium *P. aeruginosa* bekannt ist. In diesem Fall wurde gezeigt, dass die Transkription von Genen, welche für antimikrobielle Genprodukte kodieren, darunter *spp-1*, durch Aktivierung des DAF-2/DAF-16-Signalweges inhibiert wird (Shapira *et al.* 2006; Evans *et al.* 2008). Zum anderen kann die negative Regulation der Transkription von *spp-1* vom Wurm selbst ausgehen, z.B. falls das Genprodukt einen schädlichen Einfluss in Kontakt zu Sporen des pathogenen *B. thuringiensis*-Stammes ausübt. Beispielsweise könnte man sich vorstellen, dass das Bakterium beim Vorhandensein eines bestimmten antimikrobiellen Proteins verstärkt Pathogenitätsfaktoren produziert, welche dem Wurm schaden. Allerdings müsste die Regulation der *spp-1*-Transkription dann auf eine andere Weise als über DAF-16 reguliert werden, da DAF-16 dafür bekannt ist, durch den verwendeten *B. thuringiensis*-Stamm aktiviert zu werden (Wang *et al.* 2011).

Bei allen anderen untersuchten *spp*-Genen konnte keine Änderung der Transkription nach Sporenkontakt festgestellt werden (**Abb. 18**). Die Ursache dafür ist eventuell in der konstitutiven Expression dieser Gene begründet, so dass die Transkription bereits vor Kontakt zu diesem Bakterium aktiviert ist. Hinzu kommt, dass den Sporen, sowohl des pathogenen als auch des nicht-pathogenen Stammes *E. coli* OP50 beigemischt wurde. Dieses Bakterium wird zwar oft in Transkriptionsstudien als Referenz benutzt, da es das Futterbakterium von *C. elegans* im Labor darstellt, jedoch lässt sich vermuten, dass die Transkription zumindest einiger *spp*-Gene in Kontakt zu diesem Bakterium aktiviert ist. So zeigen die *spp*-Promotor-*gfp*-Konstrukte *spp-1*, *spp-3*, *spp-5*, *spp-7* und *spp-12* bereits auf *E. coli* OP50 eine Expression (**Abb. 6**, **Abb. 8**, **Abb. 25**).

Obwohl der Transkriptionsfaktor DAF-16, welcher durch *B. thuringiensis* aktiviert wird (Wang *et al.* 2011), die Transkription von *spp-12* reguliert (Murphy *et al.* 2003), konnte keine Änderung in der Transkriptionsrate von *spp-12* in Kontakt zu diesem Bakterium

nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis weist ebenfalls darauf hin, dass die *spp-12*-Transkription wahrscheinlich konstitutiv aktiviert ist und zeigt somit, dass die Transkription von *spp-12* zusätzlich unter der Kontrolle anderer Transkriptionsfaktoren stehen muss.

Empfindlichkeit der *spp-12*-Mutante gegenüber *B. thuringiensis*

Es wurde eine erhöhte Sterblichkeit der *spp-12*-Mutante auf Sporen des pathogenen *B. thuringiensis*-Stammes BT247 im Vergleich zum Wildtyp beobachtet (**Abb. 12 B**). Dieses Ergebnis deckt sich mit den *in-vitro* Experimenten, welche antimikrobielle Aktivität des rekombinanten Proteins SPP-12 gegenüber *B. thuringiensis* zeigten (**Tab. 11**), so dass Würmer, welchen dieses antimikrobielle Protein fehlt, empfindlicher im Kontakt zu *B. thuringiensis* sind.

Dabei könnte SPP-12 entweder direkt die Neuronen in denen es produziert wird vor *B. thuringiensis* schützen, oder ins Lumen des Pharynx sezerniert werden und sich zusammen mit den Sporen in Pharynx und Darm verteilen. Auf diese Weise wäre SPP-12 sofort zur Stelle, wenn die Sporen auskeimen.

Des Weiteren kann die im Vergleich zum Wildtyp erhöhte pharyngeale Pumprate der *spp-12*-Mutante nach 26-stündiger Exposition mit diesem Bakterium (**Abb. 11**) dazu beitragen, dass verstärkt Sporen aufgenommen werden, welche dann zu einer erhöhten Sterblichkeit führen.

Grundsätzlich zeigt die Verkürzung der Lebensspanne auf Sporen des pathogenen *B. thuringiensis*-Stammes eindeutig, dass SPP-12 eine wichtige Rolle in der Abwehr von *B. thuringiensis* spielt.

Lebensverlängerung der *spp-12*-Mutante auf nicht-pathogenen Bakterien

Obwohl SPP-12 in Kontakt mit pathogenem *B. thuringiensis* wichtig ist, hat es unter nicht-pathogenen Bedingungen nachteiligen Effekt, welcher sich in einer leicht verlängerten Lebensspanne der *spp-12*-Mutante auf Sporen des nicht-pathogenen *B. thuringiensis*-Stammes im Vergleich zum Wildtyp andeutet (**Abb. 12**) und auf *E. coli* OP50 bei 20 °C und 25 °C verifiziert werden konnte. Hier zeigte die *spp-12*-Mutante eine deutliche Langlebigkeit, welche allerdings durch die vorherige Tötung der Futterbakterien ins Gegenteil gekehrt wurde (**Abb. 15**).

Für eine verlängerte Lebensspanne der *spp-12*-Mutante gibt es verschiedene Erklärungsansätze, wobei eine Kombination der einzelnen Punkte nicht auszuschließen ist. Auf drei mögliche Ansätze wird im Folgenden im Detail eingegangen.

1. Verminderte Wahrnehmung von Bakterien täuscht diätetische Restriktion vor

Es ist bekannt, dass Defekte in sensorischen Neuronen eine lebensverlängernde Wirkung haben können. Daher kann angenommen werden, dass die Wahrnehmung von

Umweltsignalen an der Regulation der Lebensspanne beteiligt ist und diese damit wahrscheinlich durch äußere Einflüsse kontrolliert wird (Apfeld & Kenyon 1999).

Auch das NSM, eins der Neuronen in welchem *spp-12* exprimiert wird, ist vermutlich an der Wahrnehmung von Faktoren der Außenwelt beteiligt. Es steht mit dem Lumen des Pharynx in Kontakt und antwortet wahrscheinlich auf die Anwesenheit von Futter mit der Modulation der Serotonin-Sekretion, welche dann die Eiablage, die pharyngeale Pumprate und die Lokomotion entsprechend anpasst (Albertson & Thomson 1976, Horvitz *et al.* 1982).

Außerdem zeigen Mutanten des DAF-2-Signalweges eine verlängerte Lebensspanne (Kenyon *et al.* 1993), welche durch eine Einbringung von DAF-2 in Neuronen normalisiert werden kann (Wolkow *et al.* 2000). Daraus lässt sich schließen, dass DAF-2-Aktivität in den Neuronen für die Regulation der Lebensspanne ausreichend ist.

Weiterhin wird der Insulin-ähnliche Signalweg unter anderem durch den Einfluss externer Stimuli reguliert (Lin *et al.* 2001), indem die DAF-16-Aktivität durch Serotonin kontrolliert wird, welches in Antwort auf die An- bzw. Abwesenheit von Futter aus serotonergen Neuronen freigesetzt wird. Unter Hungerbedingungen wird DAF-16 durch Serotonin-Freisetzung aus den pharyngealen NSM gesteigert, wohingegen Serotonin-Sekretion aus den chemosensorischen Neuronen ADF die Anwesenheit von Futter signalisiert und die Akkumulation von DAF-16 im Nukleus vermindert (Liang *et al.* 2006).

In diesem Kontext fällt auf, dass *spp-12* transkriptionell über DAF-16 reguliert wird (Murphy *et al.* 2003) und in einem pharyngealen Neuron exprimiert wird, welches Serotonin sezerniert (**Abb. 8**). Es ist daher nicht unwahrscheinlich, dass *spp-12* eine Rolle in der Wahrnehmung bzw. Signalweiterleitung spielt und dadurch die Lebensspanne kontrolliert.

Die *spp-12*-Mutante besitzt auf lebenden Bakterien eine Lebensspanne vergleichbar mit der des Wildtyps auf hitzeinaktivierten Bakterien (**Abb. 15**), wobei bekannt ist, dass der Wildtyp sowohl auf im Wachstum gehemmten als auch auf toten *E. coli* OP50 eine längere Lebensspanne als auf lebenden Bakterien desselben Stammes aufweist (Garigan *et al.* 2002). Es ist nicht auszuschließen, dass die *spp-12*-Mutante durch ein Defizit in der Wahrnehmung der Bakterien reagiert, als ob kein Futter vorhanden wäre und deshalb eine Lebensverlängerung vergleichbar mit der durch diätetische Restriktion zeigt.

Auf hitzeinaktivierten *E. coli* OP50 weist die *spp-12*-Mutante dagegen eine verkürzte Lebensspanne im Vergleich zum Wildtyp auf (**Abb. 15**). Unter der Annahme, dass die *spp-12*-Mutante die Futterbakterien nicht wahrnehmen kann, wäre es möglich, dass der anscheinende Mangel an Nahrung und die schlechtere Nahrungsquelle, welche die hitzeinaktivierten Bakterien darstellen, im Endeffekt zu einer kürzeren Lebensspanne der

spp-12-Mutante führen. Ein Defizit in der Wahrnehmung könnte auf diese Weise das erzielte Ergebnis erklären.

2. Änderung der Fettsäure-Zusammensetzung

Es ist bekannt, dass die Fettsäure-Zusammensetzung eine Auswirkung auf die Lebensspanne hat (Shmookler Reis *et al.* 2011). Obwohl im Gesamtfettgehalt der *spp-12*-Mutante kein Unterschied zum Wildtyp erkannt wurde (**Abb. 17**), ist es doch möglich, dass die Fettsäure-Zusammensetzung beim Fehlen von SPP-12 verändert ist und somit zu einer verlängerten Lebensspanne führt.

3. Ausgleich durch Überproduktion anderer antimikrobieller Effektoren

Das Fehlen der Thioredoxin-Peroxidase PRDX-2 von *C. elegans*, welche den Wildtyp-Wurm gegen hydrogene Peroxide schützt, führt zu erhöhter Resistenz von *C. elegans* gegen einige Agenzien, welche oxidativen Stress hervorrufen, wie beispielsweise Arsenit, durch einen Mechanismus der andere Antioxidantien und Detoxifikationsenzyme einbezieht (Olahova *et al.* 2008). Genauso könnte ein Fehlen des antimikrobiellen Proteins SPP-12 zu einem Anstieg der Aktivität anderer Effektoren der Immunabwehr führen, welche das Fehlen nicht nur ausgleichen, sondern die eigentliche Wirkung übertreffen und dadurch eine Verlängerung der Lebensspanne bewirken.

Toleranz der *spp-1*-Mutante gegenüber *B. thuringiensis*

Als ein typischer im Darm exprimierter Vertreter mit antimikrobieller Aktivität des Genprodukts taucht *spp-1* immer wieder in verschiedenen Publikationen auf (Banyai & Patthy 1998, Murphy *et al.* 2003, Alper *et al.* 2007, Alper *et al.* 2008, Evans *et al.* 2008, Nandakumar & Tan 2008, Anyanful *et al.* 2009, Kawli *et al.* 2010b, Roeder *et al.* 2010). Jedoch bleibt seine Regulation weiter ungeklärt.

In dieser Arbeit wurde *spp-1* in Bezug auf seine Empfindlichkeit gegenüber *B. thuringiensis* und *E. coli* OP50 untersucht (**Abb. 12 A**, **Abb. 14**).

Die *spp-1*-Mutante überlebte auf Sporen des pathogenen *B. thuringiensis*-Stammes deutlich länger als der Wildtyp (**Abb. 12 A**) und das obwohl sie nach 26 h Infektion deutlich schnelleres pharyngeales Pumpen zeigte (**Abb. 11**). Demzufolge erscheint die Anwesenheit des antimikrobiellen Proteins SPP-1 für den Wurm bei Kontakt mit pathogenem *B. thuringiensis* nicht förderlich, sondern sogar nachteilig.

Es war aufgrund des *in-vitro*-Experiments, in welchem SPP-1 keine antimikrobielle Aktivität gegen den pathogenen *B. thuringiensis*-Stamm zeigte (**Tab. 11**), zu erwarten, dass SPP-1 in Kontakt zu diesem Bakterium nicht förderlich ist. Erstaunlich war es jedoch, dass das Vorhandensein des Proteins sich sogar negativ auswirkte.

Hierzu werden im Folgenden zwei mögliche Erklärungen angeführt:

Erstens, auch in anderen Fällen kann das Fehlen eines ansonsten antimikrobiellen Proteins in erhöhter Toleranz resultieren. Ein bekanntes Beispiel dafür ist *lys-7*, dessen Fehlen zwar zu einer erhöhten Empfindlichkeit gegen *Cryptococcus neoformans* führt, aber gleichzeitig auch für eine gesteigerte Toleranz gegenüber *S. enterica* Serotyp Thyphimurium sorgt. Diese wird durch die reziproke Aktivität der Tyrosin-Kinase ABL-1 hervorgerufen (Marsh *et al.* 2011). Daher ist es nicht auszuschließen, dass im Fall der *spp-1*-Mutation ebenfalls andere Effektoren dem Fehlen des antimikrobiellen Proteins entgegenwirken und so die erhöhte Toleranz gegenüber *B. thuringiensis* bedingen.

Zweitens, sollte es als Antwort auf das antimikrobielle Protein SPP-1 zu einer Bildung von Pathogenitätsfaktoren des Bakteriums kommen, so könnte auch das Fehlen von SPP-1 eine erhöhte Toleranz gegenüber pathogenen *B. thuringiensis* in Vergleich zum Wildtyp erzielen. Dies würde auch eine Erklärung dafür liefern, dass eine gesteigerte Pumprate nicht zu erhöhter Sterblichkeit der *spp-1*-Mutante auf Sporen des pathogenen *B. thuringiensis*-Stammes im Vergleich zum Wildtyp führt, da die durch die Mutante aufgenommenen Bakterien weniger virulent wären.

Desweiteren lassen sich mit diesem Ansatz die Ergebnisse der Transkriptionsänderung im Wildtyp auf Sporen des pathogenen im Vergleich zu Sporen des nicht-pathogenen *B. thuringiensis* erklären. Hier war die *spp-1*-Transkription im Wildtyp deutlich negativ reguliert (**Abb. 18**). Daher dürfte der Wildtyp unter diesen Bedingungen auch eine stark reduzierte SPP-1-Menge aufweisen. Es erscheint in diesem Zusammenhang plausibel, dass der Wurm die *spp-1*-Transkription in Antwort auf Exposition mit pathogenen *B. thuringiensis* inhibiert, um sich vor der vermehrten Produktion der Pathogenitätsfaktoren des Bakteriums zu schützen. Dies ließe auf ein Wechselspiel zwischen Bakterium und Wurm schließen, welches im Laufe der gemeinsamen Evolution entstanden sein könnte.

Empfindlichkeit der *spp-1*-Mutante gegenüber *E. coli* OP50

Auf *E. coli* OP50 überlebte die *spp-1*-Mutante deutlich schlechter als der Wildtyp, wobei dieser Effekt durch eine Hitzeinaktivierung der Bakterien aufgehoben wurde (**Abb. 14**). Daraus lässt sich schließen, dass lebende Bakterien für die verkürzte Lebensspanne verantwortlich sind und somit SPP-1 für die Bewältigung von lebenden *E. coli* nötig ist. Da SPP-1 *in-vitro* nicht antimikrobiell aktiv gegen *E. coli* ist (**Tab. 11**), hilft es eventuell anderen antimikrobiellen Effektoren dabei dieses Bakterium zu töten.

Mit der Annahme, dass SPP-1 an der Verdauung der Bakterien beteiligt ist, ergäbe sich eine Benachteiligung der *spp-1*-Mutante gegenüber dem Wildtyp. Auf diese Weise lässt sich sowohl die verringerte Populationsgröße (**Abb. 10**) als auch die kürzere Lebensspanne (**Abb. 14**) der *spp-1*-Mutante erklären. Der leicht erhöhte Fettspeicher der Mutante (**Abb. 17**) könnte auf deren verringerte Reproduktion (**Abb. 10**) zurückgeführt werden, welche die verringerte Nährstoffaufnahme mehr als kompensiert.

Auf hitzeinaktivierten Bakterien ist keine Veränderung der Lebensspanne der *spp-1*-Mutante im Vergleich zum Wildtyp zu beobachten (**Abb. 14 C**). Die in Folge der Behandlung veränderte Bakterienoberfläche müsste daher auch ohne SPP-1 verdaut werden können, so dass die Vorzugsstellung des Wildtyps aufgehoben ist.

Herstellung von rekombinatem SPP-3

Mit der Herstellung eines rekombinanten Proteins ist es möglich, die Aktivität des interessierenden Vertreters *in-vitro* losgelöst von allen anderen Effektoren des Wurms zu analysieren. Von den 33 potentiellen Saposin-ähnlichen Proteinen des Wurms sind bisher nur drei *in-vitro* (SPP-1, SPP-5, SPP-12) auf ihre antimikrobielle Aktivität hin getestet worden. Die untersuchten Vertreter zeigten sowohl porenbildende als auch antimikrobielle Aktivität, wobei das Zielzellspektrum variierte (Bányai & Patthy 1998, Stanisak 2007, Roeder *et al.* 2010). Für alle anderen Mitglieder dieser Familie waren zu Beginn der Arbeit noch keine Informationen über ihre funktionalen Eigenschaften vorhanden, auch war fraglich, ob jedes Protein antimikrobielle und porenbildende Aktivität aufweist und ob diese jeweils ein spezifisches Zielzellspektrum besitzen.

In dieser Arbeit wurde erstmals das rekombinante Protein SPP-3 *in-vitro* untersucht. Da für *spp-3* zu Beginn der Arbeit zwar Informationen über die Transkriptionsänderung nach Bakterienkontakt (Shapira *et al.* 2006, Wong *et al.* 2007, Roeder *et al.* 2010) vorlagen, nicht aber über die Eigenschaften des Genprodukts, wurde SPP-3 in großen Mengen hergestellt, gereinigt und vom Fusionspartner abgetrennt (**Abb. 21**). Dabei konnte nur etwa die Hälfte des SPP-3-Fusionsproteins durch die Protease *Factor Xa* proteolytisch gespalten werden (**Abb. 21**). Dies deutet auf eine ebenso enge Faltung des Proteins wie bei SPP-5 (Stanisak 2007) hin, so dass möglicherweise die Erkennungsstelle der Protease durch die kompakte Struktur von SPP-3 versteckt war und somit einen effektiven Spaltprozess verhinderte.

Antimikrobielle und porenbildende Aktivität von SPP-3

Das rekombinante Protein SPP-3 zeigte porenbildende Aktivität (**Abb. 23**) und kann somit als wahres Caenopore bezeichnet werden. Allerdings blieb es in den Aktivitätstests weit hinter den bereits getesteten SPPs zurück. Im Liposomen-Depolarisations-Test erzielte SPP-3 bei pH 5,2 gerade 2,5 U/nmol (**Abb. 23**). Die bisher getesteten rekombinant hergestellten Caenopores SPP-1, SPP-5 und SPP-12 zeigten dagegen eine Aktivität von ca. 30 U/nmol (Stanisak 2007, Roeder *et al.* 2010). Auch im Vergleich zu Alamethicin, dem Prototyp eines porenbildenden Peptids, welches zwischen 50 und 120 U/nmol im Liposomen-Depolarisationstest aufwies, war die Aktivität von SPP-3 als gering anzusehen.

Wie auch für SPP-1, SPP-5 und SPP-12 bereits bekannt (Stanisak 2007), war die porenbildende Aktivität von SPP-3 stark vom pH-Wert abhängig mit abnehmender

Aktivität hin zu höheren pH-Werten (**Abb. 23**). Auch die Amoebapores A, B und C zeigen dieses Muster (Andrä *et al.* 2003).

Die pH-Abhängigkeit von SPP-3 ist sehr wahrscheinlich auf die Aminosäurezusammensetzung des Proteins zurückzuführen. Es ist bekannt, dass positive Ladungen eine Assoziation mit Membranlipiden begünstigen (Andrä & Leippe 1994). Anionische Aminosäure-Reste wie Glutamat und Aspartat, von welchen SPP-3 14 aufweist, werden bei sinkendem pH-Wert protoniert und damit neutralisiert, so dass das Protein bei niedrigem pH-Wert ohne Störung durch negative Ladungen mit den negativ geladenen Phospholipiden der Membran interagieren kann. Auch Histidin-Reste, von denen SPP-3 zwei aufweist, können verantwortlich für die pH-Abhängigkeit sein, wie es für die Amoebapores angenommen wird (Hecht *et al.* 2004). Durch Protonierung der Imidazolgruppe der Histidin-Reste bei niedrigen pH-Werten, ist diese im Sauren positiv geladen und kann die Interaktion mit den Phospholipiden der Membran begünstigen.

Die porenbildende Aktivität bei pH 5,2 spricht dafür, dass SPP-3 in den Darm sezerniert und dort aktiv sein könnte, da im Darm ein pH-Wert zwischen 4 und 6 angenommen wird (Pfeiffer *et al.* 2008).

Im Bezug auf die minimal inhibitorische und bakterizide Konzentration bewegt sich das SPP-3 im μM -Bereich (**Tab. 12**), wohingegen die bereits getesteten SPPs in submikromolaren Größenordnungen antibakterielle Aktivität zeigten (Stanisak 2007, Roeder *et al.* 2010). Im Gegensatz zu SPP-1 und SPP-12 ist SPP-3 allerdings aktiv gegen *E. coli*, jedoch in höheren Konzentrationen, als die beiden erstgenannten getestet wurden. Außerdem hat SPP-3 eine wachstumshemmende Wirkung auf ein breites Spektrum an anderen Gram-negativen wie auch einigen Gram-positiven Bakterien.

Von allen getesteten Bakterien konnten lediglich *S. marcescens* und *Staph. aureus* bis zu einer Proteinkonzentration von $36 \mu\text{M}$ nicht in ihrem Wachstum inhibiert werden (**Tab. 12**). Interessant ist, dass zuvor gezeigt wurde, dass *spp-3* in Antwort auf *S. marcescens* negativ reguliert wird (Wong *et al.* 2007), möglicherweise da das Genprodukt keine antimikrobielle Aktivität gegen dieses Bakterium zeigt und er Wurm dadurch die Kosten der Produktion des Proteins spart.

Von allen getesteten Bakterien konnten nur *E. coli*, *X. nematophila* und *B. megaterium* getötet werden (**Tab. 12**).

Dies deutet darauf hin, dass das Zielzellspektrum von SPP-3 spezifisch für diese Bakterien ist und nur bestimmte Bakterien inhibiert bzw. getötet werden können. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass die eingesetzte Proteinkonzentration zu gering war und höhere Konzentrationen die zuvor inhibierten Bakterien auch töten könnten.

Da SPP-3 dabei sowohl gegen für den Wurm harmlose Bakterien, wie *E. coli* oder *B. megaterium* als auch gegen *C. elegans*-Pathogene, wie *B. thuringiensis*,

P. aeruginosa oder *X. nematophila* wirkt (**Tab. 12**), ist es möglich, dass es sowohl am Abbau der Bakterien zur Nahrungsaufnahme beteiligt ist als auch an der Inhibition und Abtötung von Pathogenen, um sich vor einer Infektion mit diesen Bakterien zu schützen.

SPP-3 hat außerdem wie auch die anderen bisher getesteten Caenopores SPP-1, SPP-5 und SPP-12 membranpermeabilisierende Aktivität (Stanisak 2007, Roeder *et al.* 2010), welche in dieser Arbeit beispielhaft für *B. megaterium* gezeigt wurde (**Abb. 24**). Damit ist bewiesen, dass SPP-3 die Membran der Bakterien stört und sie dadurch tötet.

Mechanismen der Porenbildung und Oligomerisierung

Es gibt verschiedene Möglichkeiten auf welche Weise die Störung der Membran erfolgen kann. Die amphipatische Struktur des antimikrobiellen Proteins bildet eine wichtige Voraussetzung für die Insertion in die bakterielle Membran, da hydrophobe Bereiche direkt mit den Lipiden der Membran, hydrophile Bereiche dagegen entweder mit den Kopfgruppen der Phospholipide oder mit dem wässrigen Lumen der so gebildeten Pore interagieren. Verschiedene Mechanismen der Porenbildung werden diskutiert. Einen Überblick über die verschiedenen Modelle bietet Jenssen *et al.* 2006. Die wichtigsten werden hier kurz zusammengefasst. Cecropin und Dermaseptin stören die Membran möglicherweise durch das *Carpet*-Modell, indem sich mehrere Moleküle mit positiven Seitenketten wie ein Teppich auf die Membran legen, ohne in diese zu integrieren. Bei ausreichenden Peptidkonzentrationen wirken sie als Detergenz und lösen größere Teile der Membran als Mizellen aus der Membran (Shai 1995). Magainin bildet wahrscheinlich eine transiente Pore nach dem *Torodial-pore*-Modell, dabei inserieren die Proteine senkrecht zur Membran unter Einbeziehung der Membran in die Porenbildung, indem die Kopfgruppen der Phospholipide zusammen mit den Peptiden das Innere der Pore auskleiden (Ludtke 1996). Bei diesem, wie auch beim folgenden Modell interagieren die hydrophoben Bereiche des Peptids mit dem unpolaren Lipidanteil der Membran und die hydrophilen Bereiche mit den geladenen Phospholipidköpfen. Im Unterschied zu dem *Toroidal-pore*-Modell, werden im *Barrel-stave*-Modell stabile Poren ausgebildet, bei welchen die Pore ausschließlich durch Proteine gebildet wird, welche sich wie die Dauben eines Fasses zusammenlagern. Für Alamethicin, und Amoebapore A wird ein solches Modell für die Porenbildung vorgeschlagen (Sansom 1993, Andrä & Leippe 1994, Hecht *et al.* 2004). Beim letztgenannten Modell aggregieren die Monomere bei Kontakt aber vor Insertion in die Membran, da der Eintritt des Monomers in die Membran energetisch ungünstig ist (Shai 1995).

SPP-3 bildet ebenso wie SPP-1 und SPP-12 stabile Oligomere aus (**Abb. 23**). Diese lassen sich nur unter extrem denaturierenden Bedingungen wie 8 M Harnstoff, bzw. unter basischen Bedingungen destabilisieren und sind im Gegensatz zu SPP-1 und SPP-12 nicht unter reduzierenden Bedingungen aufzulösen (Stanisak 2007). Dies deutet darauf hin, dass der Zusammenhalt unabhängig von den Disulfidbrücken ist und die

Oligomerisierung auf andere, wahrscheinlich vor allem ionische Wechselwirkungen zurückzuführen ist. Auch hier könnten die Histidin-Reste von Bedeutung sein, welche bei basischem pH-Wert deprotoniert werden und somit nicht mehr geladen sind. Die positive Ladung könnte für das Oligomer essentiell sein, wie es auch bei den Amöbapores beobachtet wurde (Hecht *et al.* 2004).

Es stellt sich die Frage, ob das von SPP-3 gebildete Tetramer der aktiven Form entspricht, da es sich unter sauren Bedingungen bildet, in denen das Protein antimikrobielle und porenbildende Aktivität zeigt. Demnach würden die Monomere schon ohne Membraninteraktion aggregieren, es ist aber möglich, sollte das Tetramer in die Membran integrieren, dass sich dort mehrere Oligomere zusammenlagern. Die hydrophoben Bereiche (**Abb. 22**) könnten dabei in Richtung der Lipide der Membran, oder zum hydrophoben Teil des benachbarten Proteins orientiert sein, wohingegen die hydrophilen Bereiche das Innere der Pore bilden könnten. Dies würde für transiente oder stabile Porenbildung sprechen. Abschließend kann nicht festgestellt werden, welchem Wirkmechanismus das SPP-3 bei der Störung der Membranintegrität folgt.

Charakterisierung *spp-3*-defizienter Würmer

Würmer mit einem Defizit an *spp-3*-Transkripten zeigten nach Exposition mit *E. coli* keine erhöhte Anzahl lebender Bakterien im Darm (**Abb. 26 B**), woraus man schließen kann, dass SPP-3 in Bezug auf dieses Bakterium redundant ist, da z.B. SPP-5 vorhanden ist. Zusätzlich wiesen diese Würmer eine deutlich erhöhte Eiablage auf (**Abb. 26 A**). Der Umstand, dass die Eiablage nicht reduziert ist, wie bei *spp-5*-RNAi-behandelten Würmern deutet darauf hin, dass SPP-3 für den Abbau von *E. coli* zur Nahrungsaufnahme nicht essentiell ist. Es bleibt allerdings offen, ob SPP-3 bei einem Kontakt der Würmer zu anderen Bakterien ebenso entbehrlich ist.

Die erhöhte Eiablage der *spp-3*-RNAi-behandelten Würmer (**Abb. 26 A**) war unerwartet, deutet aber darauf hin, dass *spp-3* neben seiner Rolle in der Permeabilisierung von Bakterienmembranen noch eine andere Funktion erfüllt. Da Transkripte von *spp-3* außer im Darm auch in dem Kopfneuron SDQR vorhanden sind (**Abb. 25**), besteht die Möglichkeit, dass SPP-3 durch seine Wirkung in diesem Neuron auch an der Regulation der Eiablage beteiligt ist. Leider ist über das betreffende Neuron im Gegensatz zum NSM bisher wenig bekannt. Es handelt sich um ein Interneuron.

Demnach hätte SPP-3 womöglich verschiedene Funktionen, zum einen die Regulation der Eiproduktion im Kopfneuron und zum anderen die Permeabilisierung der Membranen von eindringenden Bakterien im Darm.

Identifizierung natürlicher SPPs aus dem Wurm

Bisher war es nicht möglich SPPs aus dem Wurm zu reinigen, bzw. deren Existenz nachzuweisen. In einem Kooperationsprojekt mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Tholey, gelang es im Rahmen dieser Doktorarbeit in Zusammenarbeit mit Christian Treitz sieben SPPs (SPP-2, SPP-3, SPP-4, SPP-5, SPP-10, SPP-14, SPP-17) aus *C. elegans* zu extrahieren, massenspektrometrisch zu identifizieren und damit ihre Existenz zu verifizieren. Dies ist der erste Beweis dafür, dass zumindest diese sieben *spp*-Gene tatsächlich Genprodukte erzeugen. Obwohl nicht alle Genprodukte für sämtliche SAPLIP-Gene gefunden wurden, ist nicht auszuschließen, dass auch die anderen in Proteinform vorliegen. Im Fall von SPP-12 ist es z.B. möglich, da es nur in zwei pharyngealen Neuronen vorkommt, dass die Proteinmenge für die Detektion nicht ausreichend war. Im Gegenzug kann man für die detektierten Proteine feststellen, dass diese unter den gegebenen Umständen in ausreichenden Mengen vorhanden sind und wahrscheinlich unter nicht infektiösen Bedingungen eine Funktion erfüllen. Es ist zu vermuten dass dies die Teilmenge an *spps* ist, welche auch unter nicht-pathogenen Voraussetzungen konstitutiv exprimiert sind, und andere in Antwort auf Pathogenexposition verstärkt exprimiert werden. Die veränderte Proteinzusammensetzung in Kontakt zu *B. thuringiensis* ist Gegenstand andauernder Untersuchungen.

Bedeutung dieser Arbeit

Die Ergebnisse dieser Arbeit führen zu dem Schluss, dass antimikrobielle Proteine nicht nur im Darm wichtig sind, sondern auch in den Nerven.

Diese Arbeit zeigt, dass *spp-12* exklusiv in zwei Neuronen des Pharynx exprimiert wird und dort wahrscheinlich an der Wahrnehmung sowohl pathogener als auch nicht-pathogener Bakterien beteiligt ist, wodurch die Eiablage und die pharyngeale Pumprate reguliert werden. Außerdem hat *spp-12* einen Einfluss auf die Lebensspanne.

Weiterhin wurde gezeigt, dass *spp-1* zwar im Umgang mit nicht-pathogenen Bakterien essentiell ist, in Kontakt zu pathogenem *B. thuringiensis* allerdings von Nachteil, wodurch vermutlich die verringerte *spp-1*-Transkription unter diesen Bedingungen hervorgerufen wird.

Darüber hinaus wurde für *spp-3* neben der Expression im Darm auch Promotoraktivität in einem Kopfneuron nachgewiesen. In dieser Arbeit wurde das zugehörige Protein erstmals rekombinant hergestellt und zeigte sich antimikrobiell aktiv gegen ein weites Spektrum an Gram-negativen und Gram-positiven Bakterien. Es wies membran-permeabilisierende und pH-abhängige porenbildende Aktivität auf und kann somit als wahres Caenopore bezeichnet werden.

Damit leistet diese Arbeit einen wichtigen Beitrag zu einem besseren Verständnis der Funktion der untersuchten Caenopores in *C. elegans*.

5 Literaturverzeichnis

Aballay A, Yorgey P, Ausubel FM. 2000. *Salmonella typhimurium* proliferates and establishes a persistent infection in the intestine of *Caenorhabditis elegans*. *Curr Biol.* 10:1539-42.

Aballay A, Ausubel FM. 2002. *Caenorhabditis elegans* as a host for the study of host-pathogen interactions. *Curr Opin Microbiol.* 5:97-101.

Ahringer J. 2006. Reverse genetics. *WormBook*, ed The *C. elegans* Research Community, WormBook, doi/10.1895/wormbook.1.47.1, <http://www.wormbook.org>.

Akira S. 2006. TLR signalling. *Curr Top Microbiol Immunol.* 311:1-16.

de Alba E, Weiler S, Tjandra N. 2003. Solution structure of human saposin C: pH-dependent interaction with phospholipid vesicles. *Biochemistry.* 42:14729-40.

Albertson DG, Thomson JN. 1976. The pharynx of *Caenorhabditis elegans*. *Phil Trans Royal Soc. London.* 275B:299-325.

Alegado RA, Campbell MC, Chen WC, Slutz SS, Tan MW. 2003. Characterization of mediators of microbial virulence and innate immunity using the *Caenorhabditis elegans* host-pathogen model. *Cell Microbiol.* 5:435-44.

Alegado RA, Tan MW. 2008. Resistance to antimicrobial peptides contributes to persistence of *Salmonella typhimurium* in the *C. elegans* intestine. *Cell Microbiol.* 10:1259-73.

Alper S, McBride SJ, Lackford B, Freedman JH, Schwartz DA. 2007. Specificity and complexity of the *Caenorhabditis elegans* innate immune response. *Mol Cell Biol.* 27:5544-53.

Alper S, Laws R, Lackford B, Boyd WA, Dunlap P, Freedman JH, Schwartz DA. 2008. Identification of innate immunity genes and pathways using a comparative genomics approach. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105:7016-21.

Anderson KV, Bokla L, Nüsslein-Volhard C. 1985. Establishment of dorsal-ventral polarity in the *Drosophila* embryo: the induction of polarity by the Toll gene product. *Cell.* 42:791-8.

Andersson M, Gunne H, Agerberth B, Boman A, Bergman T, Sillard R, Jörnvall H, Mutt V, Olsson B, Wigzell H, Dagerlind A, Boman H, Gundmundsson GH. 1995. NK-lysin, a novel effector peptide of cytotoxic T and NK cells. Structure and cDNA cloning of the porcine form, induction by interleukin 2, antibacterial and antitumour activity. *EMBO J.* 14:1615-25.

Andrä J, Berninghausen O, Leippe M. 2004. Membrane lipid composition protects *Entamoeba histolytica* from self-destruction by its pore-forming toxins. *FEBS Lett.* 564:109-15.

-
- Andrä J, Herbst R, Leippe M. 2003. Amoebapores, archaic effector peptides of protozoan origin, are discharged into phagosomes and kill bacteria by permeabilizing their membranes. *Dev Comp Immunol.* 27:291-304.
- Andrä J, Leippe M. 1994. Pore-forming peptide of *Entamoeba histolytica*. Significance of positively charged amino acid residues for its mode of action. *FEBS Lett.* 354:97-102.
- Anyanful A, Easley KA, Benian GM, Kalman D. 2009. Conditioning protects *C. elegans* from lethal effects of enteropathogenic *E. coli* by activating genes that regulate lifespan and innate immunity. *Cell Host Microbe.* 5:450-62.
- Apfeld J, Kenyon C. 1999. Regulation of lifespan by sensory perception in *Caenorhabditis elegans*. *Nature.* 402:804-9.
- Avery L, Horvitz HR. 1987. A cell that dies during wild-type *C. elegans* development can function as a neuron in a *ced-3* mutant. *Cell.* 51:1071-8.
- Avery L, Horvitz HR. 1989. Pharyngeal pumping continues after laser killing of the pharyngeal nervous system of *C. elegans*. *Neuron.* 3:473-85.
- Avery L, Horvitz HR. 1990. Effects of starvation and neuroactive drugs on feeding in *Caenorhabditis elegans*. *J Exp Zool.* 253:263-70.
- Avery L, Shtonda BB. 2003. Food transport in the *C. elegans* pharynx. *J Exp Biol.* 206:2441-57.
- Bányai L, Patthy L. 1998. Amoebapore homologs of *Caenorhabditis elegans*. *Biochim Biophys Acta.* 1429:259-64.
- Barrière A, Félix MA. 2005. High local genetic diversity and low outcrossing rate in *Caenorhabditis elegans* natural populations. *Curr Biol.* 15:1176-84.
- Barrière A, Félix MA. 2007. Temporal dynamics and linkage disequilibrium in natural *Caenorhabditis elegans* populations. *Genetics.* 176:999-1011.
- Beale E, Li G, Tan MW, Rumbaugh KP. 2006. *Caenorhabditis elegans* senses bacterial autoinducers. *Appl Environ Microbiol.* 72:5135-7.
- Berninghausen O, Leippe M. 1997. Necrosis versus apoptosis as the mechanism of target cell death induced by *Entamoeba histolytica*. *Infect Immun.* 65:3615-21.
- Borgonie G, Van Driessche R, Leyns F, Arnaut G, De Waele D, Coomans A. 1995. Germination of *Bacillus thuringiensis* spores in bacteriophagous nematodes (Nematoda: Rhabditida). *J Invertebr Pathol.* 65:61-7.
- Boulin T, Etchberger JF, Hobert O. 2006. Reporter gene fusions. *WormBook*, ed. The *C. elegans* Research Community, WormBook, doi/10.1895/wormbook.1.106.1, <http://www.wormbook.org>.
- Brogden KA. 2005. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat Rev Microbiol.* 3:238-50.

-
- Bruhn H. 2005. A short guided tour through functional and structural features of saposin-like proteins. *Biochem J.* 389:249-57.
- Bush K. 2010. Alarming β -lactamase-mediated resistance in multidrug-resistant Enterobacteriaceae. *Curr Opin Microbiol.* 13:558-64.
- C. elegans* Sequencing Consortium. 1998. Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology. *Science.* 282:2012-8.
- Cassada RC, Russell RL. 1975. The dauerlarva, a post-embryonic developmental variant of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol.* 46:326-42.
- Chen CS, Bellier A, Kao CY, Yang YL, Chen HD, Los FC, Aroian RV. 2010. WWP-1 is a novel modulator of the DAF-2 insulin-like signaling network involved in pore-forming toxin cellular defenses in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS One.* 5:e9494.
- Chen S, Whetstone JR, Ghosh S, Hanover JA, Gali RR, Grosu P, Shi Y. 2009. The conserved NAD(H)-dependent corepressor CTBP-1 regulates *Caenorhabditis elegans* life span. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106:1496-501.
- Coolon JD, Jones KL, Todd TC, Carr BC, Herman MA. 2009. *Caenorhabditis elegans* genomic response to soil bacteria predicts environment-specific genetic effects on life history traits. *PLoS Genet.* 5:e1000503.
- Couillault C, Pujol N, Reboul J, Sabatier L, Guichou JF, Kohara Y, Ewbank JJ. 2004. TLR-independent control of innate immunity in *Caenorhabditis elegans* by the TIR domain adaptor protein TIR-1, an ortholog of human SARM. *Nat Immunol.* 5:488-94.
- Curran SP, Wu X, Riedel CG, Ruvkun G. 2009. A soma-to-germline transformation in long-lived *Caenorhabditis elegans* mutants. *Nature.* 459:1079-84.
- Darby C, Cosma CL, Thomas JH, Manoil C. 1999. Lethal paralysis of *Caenorhabditis elegans* by *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96:15202-7.
- Darby C, Hsu JW, Ghori N, Falkow S. 2002. *Caenorhabditis elegans*: plague bacteria biofilm blocks food intake. *Nature.* 417:243-4.
- Driscoll M, Kaplan J. 1997. Mechanotransduction. In: Riddle DL, Blumenthal T, Meyer BJ, Priess JR (eds), *C. elegans* II. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, New York, pp. 1–22.
- Evans TC. 2006. Transformation and microinjection. *WormBook*, ed The *C. elegans* Research Community, WormBook, doi/10.1895/wormbook.1.108.1, <http://www.wormbook.org>.
- Evans EA, Kawli T, Tan MW. 2008. *Pseudomonas aeruginosa* suppresses host immunity by activating the DAF-2 insulin-like signaling pathway in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS Pathog.* 4:e1000175.
- Ewbank JJ. 2006. Signaling in the immune response. *WormBook.* 23:1-12.

Ewbank JJ, Zugasti O. 2011. *C. elegans*: model host and tool for antimicrobial drug discovery. *Dis Model Mech.* 4:300-4.

Fekete C, Tholander M, Rajashekar B, Ahrén D, Friman E, Johansson T, Tunlid A. 2008. Paralysis of nematodes: shifts in the transcriptome of the nematode-trapping fungus *Monacrosporium haptotylum* during infection of *Caenorhabditis elegans*. *Environ Microbiol.* 10:364-75.

Félix MA, Ashe A, Piffaretti J, Wu G, Nuez I, Bécicard T, Jiang Y, Zhao G, Franz CJ, Goldstein LD, Sanroman M, Miska EA, Wang D. 2011. Natural and experimental infection of *Caenorhabditis* nematodes by novel viruses related to nodaviruses. *PLoS Biol.* 9:e1000586.

Fire AZ. 2007. Gene silencing by double-stranded RNA. *Cell Death Differ.* 14:1998-2012.

Furuyama T, Nakazawa T, Nakano I, Mori N. 2000. Identification of the differential distribution patterns of mRNAs and consensus binding sequences for mouse DAF-16 homologues. *Biochem J.* 349:629-34.

Garigan D, Hsu AL, Fraser AG, Kamath RS, Ahringer J, Kenyon C. 2002. Genetic analysis of tissue aging in *Caenorhabditis elegans*: a role for heat-shock factor and bacterial proliferation. *Genetics.* 161:1101-12.

Garsin DA, Sifri CD, Mylonakis E, Qin X, Singh KV, Murray BE, Calderwood SB, Ausubel FM. 2001. A simple model host for identifying Gram-positive virulence factors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98:10892-7.

Garsin DA, Villanueva JM, Begun J, Kim DH, Sifri CD, Calderwood SB, Ruvkun G, Ausubel FM. 2003. Long-lived *C. elegans daf-2* mutants are resistant to bacterial pathogens. *Science.* 300:1921.

Gottlieb S, Ruvkun G. 1994. *daf-2*, *daf-16* and *daf-23*: genetically interacting genes controlling Dauer formation in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics.* 137:107-20.

Greenwald I. 1997. Development of the Vulva. In: Riddle DL, Blumenthal T, Meyer BJ, Priess JR (eds), *C. elegans* II. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, New York.

Gutsmann T, Riekens B, Bruhn H, Wiese A, Seydel U, Leippe M. 2003. Interaction of amoebapores and NK-lysin with symmetric phospholipid and asymmetric lipopolysaccharide/phospholipid bilayers. *Biochemistry.* 42:9804-12.

Halaschek-Wiener J, Khattra JS, McKay S, Pouzyrev A, Stott JM, Yang GS, Holt RA, Jones SJ, Marra MA, Brooks-Wilson AR, Riddle DL. 2005. Analysis of long-lived *C. elegans daf-2* mutants using serial analysis of gene expression. *Genome Res.* 15:603-15.

Hall DH, Russell RL. 1991. The posterior nervous system of the nematode *Caenorhabditis elegans*: serial reconstruction of identified neurons and complete pattern of synaptic interactions. *J Neurosci.* 11:1-22.

-
- Hancock RE, Diamond G. 2000. The role of cationic antimicrobial peptides in innate host defences. *Trends Microbiol.* 8:402-10.
- Hart AC. 2006. Behavior. *WormBook*, ed The *C. elegans* Research Community, WormBook, doi/10.1895/wormbook.1.87.1, <http://www.wormbook.org>
- Hasshoff M, Böhnisch C, Tonn D, Hasert B, Schulenburg H. 2007. The role of *Caenorhabditis elegans* insulin-like signaling in the behavioral avoidance of pathogenic *Bacillus thuringiensis*. *FASEB J.* 21:1801-12.
- Hecht O, Van Nuland NA, Schleinkofer K, Dingley AJ, Bruhn H, Leippe M, Grötzinger J. 2004. Solution structure of the pore-forming protein of *Entamoeba histolytica*. *J Biol Chem.* 279:17834-41.
- Henderson ST, Johnson TE. 2001. *daf-16* integrates developmental and environmental inputs to mediate aging in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Curr Biol.* 11:1975-80.
- Herbst R, Ott C, Jacobs T, Marti T, Marciano-Cabral F, Leippe M. 2002 Pore-forming polypeptides of the pathogenic protozoon *Naegleria fowleri*. *J Biol Chem.* 277:22353-60.
- Herndon, LA, Hall DH. 2010. Glossary P. In *WormAtlas*. doi:10.3908/wormatlas.6.16
- Hodgkin J, Doniach T. 1997. Natural variation and copulatory plug formation in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics.* 146:149-64.
- Horvitz HR, Chalfie M, Trent C, Sulston JE, Evans PD. 1982. Serotonin and octopamine in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Science.* 216:1012-4.
- Huffman DL, Abrami L, Sasik R, Corbeil J, van der Goot FG, Aroian RV. 2004. Mitogen-activated protein kinase pathways defend against bacterial pore-forming toxins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101:10995-1000.
- Ideo H, Fukushima K, Gengyo-Ando K, Mitani S, Dejima K, Nomura K, Yamashita K. 2009. A *Caenorhabditis elegans* glycolipid-binding galectin functions in host defense against bacterial infection. *J Biol Chem.* 284:26493-501.
- Irazoqui JE, Troemel ER, Feinbaum RL, Luhachack LG, Cezairliyan BO, Ausubel FM. 2010a. Distinct pathogenesis and host responses during infection of *C. elegans* by *P. aeruginosa* and *S. aureus*. *PLoS Pathog.* 6:e1000982.
- Irazoqui JE, Urbach JM, Ausubel FM. 2010b. Evolution of host innate defence: insights from *Caenorhabditis elegans* and primitive invertebrates. *Nat Rev Immunol.* 10:47-58.
- Janeway CA Jr, Medzhitov R. 2002. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol.* 20:197-216.
- Jansson HB. 1994. Adhesion of Conidia of *Drechmeria coniospora* to *Caenorhabditis elegans* Wild Type and Mutants. *J Nematol.* 26:430-5.
- Jenssen H, Hamill P, Hancock RE. 2006. Peptide antimicrobial agents. *Clin Microbiol Rev.* 19:491-511.

-
- Joshua GW, Karlyshev AV, Smith MP, Isherwood KE, Titball RW, Wren BW. 2003. A *Caenorhabditis elegans* model of *Yersinia* infection: biofilm formation on a biotic surface. *Microbiology*. 149:3221-9.
- Kang D, Gho YS, Suh M, Kang C. 2002. Highly sensitive and fast protein detection with coomassie brilliant blue in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. In: *Bull. Korean Chem. Soc.* Bd. 23, Nr. 11, S. 1511-1512.
- Kato Y, Aizawa T, Hoshino H, Kawano K, Nitta K, Zhang H. 2002. *abf-1* and *abf-2*, ASABF-type antimicrobial peptide genes in *Caenorhabditis elegans*. *Biochem J*. 361:221-30.
- Kawli T, Tan MW. 2008. Neuroendocrine signals modulate the innate immunity of *Caenorhabditis elegans* through insulin signaling. *Nat Immunol*. 9:1415-24.
- Kawli T, He F, Tan MW. 2010a. It takes nerves to fight infections: insights on neuro-immune interactions from *C. elegans*. *Dis Model Mech*. 3:721-31.
- Kawli T, Wu C, Tan MW. 2010b. Systemic and cell intrinsic roles of Gqalpha signaling in the regulation of innate immunity, oxidative stress, and longevity in *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 107:13788-93.
- Kenyon C, Chang J, Gensch E, Rudner A, Tabtiang R. 1993. A *C. elegans* mutant that lives twice as long as wild type. *Nature*. 366:461-4.
- Kerry S, TeKippe M, Gaddis NC, Aballay A. 2006. GATA transcription factor required for immunity to bacterial and fungal pathogens. *PLoS One*. 1:e77.
- Kim DH, Feinbaum R, Alloing G, Emerson FE, Garsin DA, Inoue H, Tanaka-Hino M, Hisamoto N, Matsumoto K, Tan MW, Ausubel FM. 2002. A conserved p38 MAP kinase pathway in *Caenorhabditis elegans* innate immunity. *Science*. 297:623-6.
- Kishimoto Y, Hiraiwa M, O'Brien JS. 1992. Saposins: structure, function, distribution, and molecular genetics. *J Lipid Res*. 33:1255-67.
- Kramer JM, French RP, Park EC, Johnson JJ. 1990. The *Caenorhabditis elegans rol-6* gene, which interacts with the *sqt-1* collagen gene to determine organismal morphology, encodes a collagen. *Mol Cell Biol*. 10:2081-9.
- Kunitomo H, Uesugi H, Kohara Y, Iino Y. 2005. Identification of ciliated sensory neuron-expressed genes in *Caenorhabditis elegans* using targeted pull-down of poly(A) tails. *Genome Biol*. 6:R17.
- Kwon JY, Hong M, Choi MS, Kang S, Duke K, Kim S, Lee S, Lee J. 2004. Ethanol-response genes and their regulation analyzed by a microarray and comparative genomic approach in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Genomics*. 83:600-14.
- Kyte J, Doolittle RF. 1982. A simple method for display the hydrophobic character of a protein. *J Mol Biol*. 157:105-132
- Labrousse A, Chauvet S, Couillault C, Kurz CL, Ewbank JJ. 2000. *Caenorhabditis elegans* is a model host for *Salmonella typhimurium*. *Curr Biol*. 10:1543-5.

-
- Lee SJ, Murphy CT, Kenyon C. 2009. Glucose shortens the life span of *C. elegans* by downregulating DAF-16/FOXO activity and aquaporin gene expression. *Cell Metab.* 10:379-91.
- Leippe M. 1995. Ancient weapons: NK-lysin, is a mammalian homolog to pore-forming peptides of a protozoan parasite. *Cell.* 83:17-8.
- Leippe M. 1999. Antimicrobial and cytolytic polypeptides of amoeboid protozoa--effector molecules of primitive phagocytes. *Dev Comp Immunol.* 23:267-79.
- Leippe M, Ebel S, Schoenberger OL, Horstmann RD, Müller-Eberhard HJ. 1991. Pore-forming peptide of pathogenic *Entamoeba histolytica*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 88:7659-63.
- Leippe M, Andrä J, Nickel R, Tannich E, Müller-Eberhard HJ. 1994. Amoebapores, a family of membranolytic peptides from cytoplasmic granules of *Entamoeba histolytica*: isolation, primary structure, and pore formation in bacterial cytoplasmic membranes. *Mol Microbiol.* 14:895-904.
- Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart JM, Hoffmann JA. 1996. The dorsoventral regulatory gene cassette *spätzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell.* 86:973-83.
- Lewis JA, Szilagyi M, Gehman E, Dennis WE, Jackson DA. 2009. Distinct patterns of gene and protein expression elicited by organophosphorus pesticides in *Caenorhabditis elegans*. *BMC Genomics.* 10:202.
- Leyns F, Borgonie G, Arnaut G, De Waele D. 1995. Nematicidal activity of *Bacillus thuringiensis* isolates. *Fundam. Appl. Nematol.* 18:211-218
- Liang B, Moussaif M, Kuan CJ, Gargus JJ, Sze JY. 2006. Serotonin targets the DAF-16/FOXO signaling pathway to modulate stress responses. *Cell Metab.* 4:429-40.
- Liepinsh E, Andersson M, Ruyschaert JM, Otting G. 1997. Saposin fold revealed by the NMR structure of NK-lysin. *Nat Struct Biol.* 4:793-5.
- Lin K, Hsin H, Libina N, Kenyon C. 2001. Regulation of the *Caenorhabditis elegans* longevity protein DAF-16 by insulin/IGF-1 and germline signaling. *Nat Genet.* 28:139-45.
- Lin K, Dorman JB, Rodan A, Kenyon C. 1997. *daf-16*: An HNF-3/forkhead family member that can function to double the life-span of *Caenorhabditis elegans*. *Science.* 278:1319-22.
- Lin K, Hsin H, Libina N, Kenyon C. 2001. Regulation of the *Caenorhabditis elegans* longevity protein DAF-16 by insulin/IGF-1 and germline signaling. *Nat Genet.* 28:139-45.
- Ludtke SJ, He K, Heller WT, Harroun TA, Yang L, Huang HW. 1996. Membrane pores induced by magainin. *Biochemistry.* 35:13723-8.
- Mahajan-Miklos S, Tan MW, Rahme LG, Ausubel FM. 1999. Molecular mechanisms of bacterial virulence elucidated using a *Pseudomonas aeruginosa*-*Caenorhabditis elegans* pathogenesis model. *Cell.* 96:47-56.

-
- Mallo GV, Kurz CL, Couillault C, Pujol N, Granjeaud S, Kohara Y, Ewbank JJ. 2002. Inducible antibacterial defense system in *C. elegans*. *Curr Biol*. 12:1209-14.
- Marroquin LD, Elyassnia D, Griffiths JS, Feitelson JS, Aroian RV. 2000. *Bacillus thuringiensis* (Bt) toxin susceptibility and isolation of resistance mutants in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*. 155:1693-9.
- Marsh EK, van den Berg MC, May RC. 2011. A two-gene balance regulates *Salmonella typhimurium* tolerance in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *PLoS One*. 6:e16839.
- McElwee J, Bubb K, Thomas JH. 2003. Transcriptional outputs of the *Caenorhabditis elegans* forkhead protein DAF-16. *Aging Cell*. 2:111-21.
- McElwee JJ, Schuster E, Blanc E, Thomas JH, Gems D. 2004. Shared transcriptional signature in *Caenorhabditis elegans* Dauer larvae and long-lived *daf-2* mutants implicates detoxification system in longevity assurance. *J Biol Chem*. 279:44533-43.
- McGhee JD. 2007. The *C. elegans* intestine. *WormBook*, ed The *C. elegans* Research Community, WormBook, doi/10.1895/wormbook.1.133.1, <http://www.wormbook.org>.
- Means TK, Mylonakis E, Tampakakis E, Colvin RA, Seung E, Puckett L, Tai MF, Stewart CR, Pukkila-Worley R, Hickman SE, Moore KJ, Calderwood SB, Hacoheh N, Luster AD, El Khoury J. 2009. Evolutionarily conserved recognition and innate immunity to fungal pathogens by the scavenger receptors SCARF1 and CD36. *J Exp Med*. 206:637-53.
- Mello C, Fire A. 1995. DNA Transformation. *Methods Cell Biol*. 48:451-82.
- Mello CC, Kramer JM, Stinchcomb D, Ambros V. 1991. Efficient gene transfer in *C.elegans*: extrachromosomal maintenance and integration of transforming sequences. *EMBO J*. 10:3959-70.
- Miteva M, Andersson M, Karshikoff A, Otting G. 1999. Molecular electroporation: a unifying concept for the description of membrane pore formation by antibacterial peptides, exemplified with NK-lysin. *FEBS Lett*. 462:155-8.
- Morris JZ, Tissenbaum HA, Ruvkun G. 1996. A phosphatidylinositol-3-OH kinase family member regulating longevity and diapause in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 382:536-9.
- Munford RS, Sheppard PO, O'Hara PJ. 1995. Saposin-like proteins (SAPLIP) carry out diverse functions on a common backbone structure. *J Lipid Res*. 36:1653-63.
- Murakami S, Johnson TE. 1996. A genetic pathway conferring life extension and resistance to UV stress in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*. 143:1207-18.
- Murphy CT, McCarroll SA, Bargmann CI, Fraser A, Kamath RS, Ahringer J, Li H, Kenyon C. 2003. Genes that act downstream of DAF-16 to influence the lifespan of *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 424:277-83.
- Mysliwy J, Dingley AJ, Stanisak M, Jung S, Lorenzen I, Roeder T, Leippe M, Grötzinger J. 2010. Caenopore-5: the three-dimensional structure of an antimicrobial protein from *Caenorhabditis elegans*. *Dev Comp Immunol*. 34:323-30.

Nandakumar M, Tan MW. 2008. Gamma-linolenic and stearidonic acids are required for basal immunity in *Caenorhabditis elegans* through their effects on p38 MAP kinase activity. *PLoS Genet.* 4:e1000273.

Nathoo AN, Moeller RA, Westlund BA, Hart AC. 2001. Identification of neuropeptide-like protein gene families in *Caenorhabditis elegans* and other species. *Proc Natl Acad Sci USA.* 98:14000-5.

Neidig N, Paul RJ, Scheu S, Jousset A. 2011. Secondary metabolites of *Pseudomonas fluorescens* CHA0 drive complex non-trophic interactions with bacterivorous nematodes. *Microb Ecol.* 61:853-9.

Nemoto-Sasaki Y, Hayama K, Ohya H, Arata Y, Kaneko MK, Saitou N, Hirabayashi J, Kasai K. 2008. *Caenorhabditis elegans* galectins LEC-1-LEC-11: structural features and sugar-binding properties. *Biochim Biophys Acta.* 1780:1131-42.

Nicholas HR, Hodgkin J. 2004. Responses to infection and possible recognition strategies in the innate immune system of *Caenorhabditis elegans*. *Mol Immunol.* 41:479-93.

Nickel R, Jacobs T, Leippe M. 1998. Molecular characterization of an exceptionally acidic lysozyme-like protein from the protozoon *Entamoeba histolytica*. *FEBS Lett.* 437:153-7.

O'Rourke D, Baban D, Demidova M, Mott R, Hodgkin J. 2006. Genomic clusters, putative pathogen recognition molecules, and antimicrobial genes are induced by infection of *C. elegans* with *M. nematophilum*. *Genome Res.* 16:1005-16.

Oh SW, Mukhopadhyay A, Dixit BL, Raha T, Green MR, Tissenbaum HA. 2006. Identification of direct DAF-16 targets controlling longevity, metabolism and diapause by chromatin immunoprecipitation. *Nat Genet.* 38:251-7.

Oláhová M, Taylor SR, Khazaipoul S, Wang J, Morgan BA, Matsumoto K, Blackwell TK, Veal EA. 2008. A redox-sensitive peroxiredoxin that is important for longevity has tissue- and stress-specific roles in stress resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105:19839-44.

Ookuma S, Fukuda M, Nishida E. 2003. Identification of a DAF-16 transcriptional target gene, *scl-1*, that regulates longevity and stress resistance in *Caenorhabditis elegans*. *Curr Biol.* 13:427-31.

Pálffy R, Gardlík R, Behuliak M, Kadasi L, Turna J, Celec P. 2009. On the physiology and pathophysiology of antimicrobial peptides. *Mol Med.* 15:51-9.

Pfeiffer J, Johnson D, Nehrke K. 2008. Oscillatory transepithelial H(+) flux regulates a rhythmic behavior in *C. elegans*. *Curr Biol.* 18:297-302.

Peña SV, Krensky AM. 1997. Granulysin, a new human cytolytic granule-associated protein with possible involvement in cell-mediated cytotoxicity. *Semin Immunol.* 9:117-25.

Pick U. 1981. Liposomes with a large trapping capacity prepared by freezing and thawing of sonicated phospholipid mixtures. *Arch Biochem Biophys.* 212:186-94.

-
- Portman DS. 2006. Profiling *C. elegans* gene expression with DNA. *WormBook*, ed The *C. elegans* Research Community, WormBook, doi/10.1895/wormbook.1.104.1, <http://www.wormbook.org>.
- Pradel E, Zhang Y, Pujol N, Matsuyama T, Bargmann CI, Ewbank JJ. 2007. Detection and avoidance of a natural product from the pathogenic bacterium *Serratia marcescens* by *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 104:2295-300.
- Pujol N, Link EM, Liu LX, Kurz CL, Alloing G, Tan MW, Ray KP, Solari R, Johnson CD, Ewbank JJ. 2001. A reverse genetic analysis of components of the Toll signaling pathway in *Caenorhabditis elegans*. *Curr Biol*. 11:809-21.
- Pujol N, Cypowyj S, Ziegler K, Millet A, Astrain A, Goncharov A, Jin Y, Chisholm AD, Ewbank JJ. 2008. Distinct innate immune responses to infection and wounding in the *C. elegans* epidermis. *Curr Biol*. 18:481-9.
- Pukkila-Worley R, Ausubel FM, Mylonakis E. 2011. *Candida albicans* infection of *Caenorhabditis elegans* induces antifungal immune defenses. *PLoS Pathog*. 7:e1002074.
- Ren M, Feng H, Fu Y, Land M, Rubin CS. 2009. Protein kinase D is an essential regulator of *C. elegans* innate immunity. *Immunity*. 30:521-32.
- Riddle DL, Blumenthal T, Meyer BJ, Priess JR. 1997. Introduction to *C. elegans*. In: Riddle DL, Blumenthal T, Meyer BJ, Priess JR (eds), *C. elegans* II. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, New York, pp. 1–22.
- Roeder T, Stanisak M, Gelhaus C, Bruchhaus I, Grötzinger J, Leippe M. 2010. Caenopores are antimicrobial peptides in the nematode *Caenorhabditis elegans* instrumental in nutrition and immunity. *Dev Comp Immunol*. 34:203-9.
- Rohlfing AK, Miteva Y, Hannenhalli S, Lamitina T. 2010. Genetic and physiological activation of osmosensitive gene expression mimics transcriptional signatures of pathogen infection in *C. elegans*. *PLoS One*. 5:e9010.
- Ruvkun G, Hobert O. 1998. The taxonomy of developmental control in *Caenorhabditis elegans*. *Science*. 282:2033-41.
- Sansom MS. 1993. Alamethicin and related peptaibols—model ion channels. *Eur Biophys J*. 22:105-24.
- Schägger H, von Jagow G. 1987. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem*. 166:368-379.
- Schedl T. 1997. Developmental Genetics of the Germ Line In: Riddle DL, Blumenthal T, Meyer BJ, Priess JR (eds), *C. elegans* II. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, New York.
- Schikorski D, Cuvillier-Hot V, Leippe M, Boidin-Wichlacz C, Slomianny C, Macagno E, Salzet M, Tasiemski A. 2008. Microbial challenge promotes the regenerative process of

the injured central nervous system of the medicinal leech by inducing the synthesis of antimicrobial peptides in neurons and microglia. *J Immunol.* 181:1083-95.

Schulenburg H, Boehnisch C. 2008. Diversification and adaptive sequence evolution of *Caenorhabditis* lysozymes (Nematoda: Rhabditidae). *BMC Evol Biol.* 8:114.

Schulenburg H, Hoepfner MP, Weiner J 3rd, Bornberg-Bauer E. 2008. Specificity of the innate immune system and diversity of C-type lectin domain (CTLN) proteins in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Immunobiology.* 213:237-50.

Schulenburg H, Kurz CL, Ewbank JJ. 2004. Evolution of the innate immune system: the worm perspective. *Immunol Rev.* 198:36-58.

Schulenburg H, Müller S. 2004. Natural variation in the response of *Caenorhabditis elegans* towards *Bacillus thuringiensis*. *Parasitology.* 128:433-43.

Shai Y. 1995. Molecular recognition between membrane-spanning polypeptides. *Trends Biochem Sci.* 20:460-4.

Shapira M, Hamlin BJ, Rong J, Chen K, Ronen M, Tan MW. 2006. A conserved role for a GATA transcription factor in regulating epithelial innate immune responses. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103:14086-91.

Shmookler Reis RJ, Xu L, Lee H, Chae M, Thaden JJ, Bharill P, Tazearslan C, Siegel E, Alla R, Zimniak P, Ayyadevara S. 2011. Modulation of lipid biosynthesis contributes to stress resistance and longevity of *C. elegans* mutants. *Aging.* 3:125-47.

Shtonda BB, Avery L. 2006. Dietary choice behavior in *Caenorhabditis elegans*. *J Exp Biol.* 209:89-102.

Sicard M, Hering S, Schulte R, Gaudriault S, Schulenburg H. 2007. The effect of *Photorhabdus luminescens* (Enterobacteriaceae) on the survival, development, reproduction and behaviour of *Caenorhabditis elegans* (Nematoda: Rhabditidae). *Environ Microbiol.* 9:12-25.

Sifri CD, Begun J, Ausubel FM, Calderwood SB. 2003. *Caenorhabditis elegans* as a model host for *Staphylococcus aureus* pathogenesis. *Infect Immun.* 71:2208-17.

Stanisak M. 2007. Molekulare Basis des antimikrobiellen Systems von *Caenorhabditis elegans*. Dissertation. Zoophysiology. Christian-Albrechts-Universität zu Kiel.

Stenger S, Hanson DA, Teitelbaum R, Dewan P, Niazi KR, Froelich CJ, Ganz T, Thomas-Uszynski S, Melián A, Bogdan C, Porcelli SA, Bloom BR, Krensky AM, Modlin RL. 1998. An antimicrobial activity of cytolytic T cells mediated by granulysin. *Science.* 282:121-5.

Stiernagle T. 2006. Maintenance of *C. elegans*. *WormBook*, ed The *C. elegans* Research Community, *WormBook*, doi/10.1895/wormbook.1.101.1, <http://www.wormbook.org>.

Sulston J, Dew M, Brenner S. 1975. Dopaminergic neurons in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *J Comp Neurol.* 163:215-26.

-
- Sun J, Singh V, Kajino-Sakamoto R, Aballay A. 2011. Neuronal GPCR controls innate immunity by regulating noncanonical unfolded protein response genes. *Science*. 332:729-32.
- Suttman H, Retz M, Paulsen F, Harder J, Zwergel U, Kamradt J, Wullich B, Unteregger G, Stöckle M, Lehmann J. 2008. Antimicrobial peptides of the Cecropin-family show potent antitumor activity against bladder cancer cells. *BMC Urol*. 8:5.
- Tamaru T, Fujibayashi S, Brown WR, Wenger DA. 1986. Immunocytochemical localization of sphingolipid activator protein-1, the sulfatide/GM1 ganglioside activator, to lysosomes in human liver and colon. *Histochemistry*. 86:195-200.
- Tan MW, Mahajan-Miklos S, Ausubel FM. 1999a. Killing of *Caenorhabditis elegans* by *Pseudomonas aeruginosa* used to model mammalian bacterial pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 96:715-20.
- Tan MW, Rahme LG, Sternberg JA, Tompkins RG, Ausubel FM. 1999b. *Pseudomonas aeruginosa* killing of *Caenorhabditis elegans* used to identify *P. aeruginosa* virulence factors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 96:2408-13.
- Tan MW, Shapira M. 2011. Genetic and molecular analysis of nematode-microbe interactions. *Cell Microbiol*. 13:497-507.
- Tenor JL, Aballay A. 2008. A conserved Toll-like receptor is required for *Caenorhabditis elegans* innate immunity. *EMBO Rep*. 9:103-9.
- Tracey KJ. 2011. Cell biology. Ancient neurons regulate immunity. *Science*. 332:673-4.
- Troemel ER, Chu SW, Reinke V, Lee SS, Ausubel FM, Kim DH. 2006. p38 MAPK regulates expression of immune response genes and contributes to longevity in *C. elegans*. *PLoS Genet*. 2:e183.
- Uccelletti D, Zanni E, Marcellini L, Palleschi C, Barra D, Mangoni ML. 2010. Anti-*Pseudomonas* activity of frog skin antimicrobial peptides in a *Caenorhabditis elegans* infection model: a plausible mode of action in vitro and in vivo. *Antimicrob Agents Chemother*. 54:3853-60.
- Wang J, Nakad R, Schulenburg H. 2011. Activation of the *Caenorhabditis elegans* FOXO family transcription factor DAF-16 by pathogenic *Bacillus thuringiensis*. *Dev Comp Immunol*. Epub ahead of print.
- Wang Z, Wang G. 2004. APD: the Antimicrobial Peptide Database. *Nucleic Acids Res*. 32:D590–D592.
- Wang G, Li X, Wang Z. 2009 APD2: the updated antimicrobial peptide database and its application in peptide design. *Nucleic Acids Res*. 37:D933-D937.
- Wei JZ, Hale K, Carta L, Platzer E, Wong C, Fang SC, Aroian RV. 2003. *Bacillus thuringiensis* crystal proteins that target nematodes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 100:2760-5.

-
- White JG, Southgate E, Thomson JN, Brenner S. 1986. The structure of the nervous system of the nematode *Caenorhabditis elegans*. Phil Trans Royal Soc. London. B314:1-340.
- Wilcox FH, Cole RK. 1957. The Inheritance of Differences in the Lysozyme Level of Hens' Egg White. Genetics. 42: 264–272.
- Winkelmann J, Leippe M, Bruhn H. 2006. A novel saposin-like protein of *Entamoeba histolytica* with membrane-fusogenic activity. Mol Biochem Parasitol. 147:85-94.
- Wolkow CA, Kimura KD, Lee MS, Ruvkun G. 2000. Regulation of *C. elegans* life-span by insulin like signaling in the nervous system. Science. 290:147-50.
- Wong D, Bazopoulou D, Pujol N, Tavernarakis N, Ewbank JJ. 2007. Genome-wide investigation reveals pathogen-specific and shared signatures in the response of *Caenorhabditis elegans* to infection. Genome Biol. 8:R194
- WormAtlas, Altun ZF, Herndon LA, Crocker C, Lints R, Hall DH. (eds) 2002-2010. <http://www.wormatlas.org>.
- Youngman MJ, Rogers ZN, Kim DH. 2011. A decline in p38 MAPK signaling underlies immunosenescence in *Caenorhabditis elegans*. PLoS Genet. 7:e1002082.
- Zasloff M. 2002. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. Nature. 415:389-95.
- Zhang Y, Lu H, Bargmann CI. 2005. Pathogenic bacteria induce aversive olfactory learning in *Caenorhabditis elegans*. Nature. 438:179-84.
- Zugasti O, Ewbank JJ. 2009. Neuroimmune regulation of antimicrobial peptide expression by a noncanonical TGF-beta signaling pathway in *Caenorhabditis elegans* epidermis. Nat Immunol. 10:249-56.

Danksagung

An erster Stelle gilt mein Dank Prof. Dr. Leippe für die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, für die Überlassung des interessanten Themas sowie für die vielen konstruktiven Ratschläge und Diskussionen.

Prof. Dr. Schulenburg danke ich für die Bereitstellung zahlreicher *C. elegans*-Pathogene, und seiner Arbeitsgruppe für den wissenschaftlichen Austausch. Ein großer Dank geht in diesem Zusammenhang an Dr. Katja Dierking und Rania Nakad für ihre nicht abbreißende Hilfsbereitschaft.

Prof. Dr. Roeder danke ich für die Beratung bezüglich einiger verwendeter Methoden und die Bereitstellung von Wurmstämmen und RNAi-Bakterien.

An Dr. Silja Fuchs geht mein Dank für die Einführung in die Welt der Würmer.

Bei Dr. Christoph Gelhaus möchte ich mich für die massenspektrometrische Analyse und sein offenes Ohr in Sachen Proteinreinigung bedanken und bei Dr. Kerstin Isermann für unzählige Mikroinjektions-Nachmittage und ihre Hilfe bei der Herstellung der Fusions-Konstrukte für die Injektion.

Ich bedanke mich bei der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Döring für die Einweisung und Bereitstellung des Wormsorters und Tipps für die Fettfärbung.

Ich danke Dr. Mareike Stanisak, welche im Zuge ihrer Doktorarbeit die rekombinanten Proteine SPP-1 und SPP-12 hergestellt hat, und Dr. Marko Rohlf für die Einführung in die Statistik der Überlebensversuche.

Heidrun Ließegang danke ich für die Durchführung des Tests auf membranpermeabilisierende Aktivität.

Meinen Büronachbarn Tasja Rahn und Moritz Bitzhenner möchte ich meinen Dank aussprechen für die zahlreichen Diskussionen über Ergebnisse und Methoden, sowie für schnelle Problemlösungen.

Vielen Dank an alle Mitarbeiter der Arbeitsgruppe für ihre Hilfsbereitschaft und die angenehme Arbeitsatmosphäre.

Zu guter Letzt schicke ich einen besonderen Dank an meine Familie und dabei vor allem an meinen Mann Robert, für die immerwährende Unterstützung.

