

1. Summary

The nematode *Caenorhabditis elegans* has six distinct life stages, embryo, four larval stages (L1-L4) and adult that are defined by landmarks such as hatch, ecdysis, as well as associated stage-specific programs. Its development is strongly influenced by the environment: in favorable conditions, *C. elegans* develops rapidly to adult, whereas in unfavorable conditions the worm can enter an alternative, reversible third larval stage, the dauer diapause.

Metazoan development is articulated through positional and temporal patterning at all life stages. In *C. elegans*, a regulatory pathway, called the heterochronic circuit, has been identified that controls temporal patterning in diverse tissues. In this study, we focused on the temporal control of development of third and later larval stages.

The nuclear hormone receptor *daf-12* functions within this heterochronic pathway regulating L3 options of reproductive growth and dauer diapause. *daf-12* null mutants are fully dauer defective, but exhibit only weak heterochronic phenotypes suggesting that overlapping functions could act in concert with *daf-12* to specify developmental age.

We screened for *daf-12* parallel or redundant functions (*dre*'s) in a genetic screen for enhancement of the *daf-12* heterochronic gonadal migration phenotypes. This screen yielded two loci termed *dre-1* and *dre-2*.

dre-1 plays a novel role in *C. elegans* developmental timing of gonadal and extragonadal tissues. In the heterochronic epidermal seam cell circuit, it is part of the late timer regulating the larval to adult switch. In the seam cells, *dre-1* promotes L4 fates and prevents precocious expression of adult fates. Hence, absence of *dre-1* results in precocious adult development of seam cells. Genetic epistasis analysis revealed that *dre-1* functions between the microRNA *let-7* and the transcription factor *lin-29*, the latest acting gene that promotes adult development. The comparably weak precocious phenotype of *dre-1* mutants may reflect the activity of other regulators at this step. Indeed, the timing of the larval to adult switch is regulated by at least four genes (*lin-41*, *lin-42*, *hbl-1* and *dre-1*). We found that *dre-1* acts in parallel to *lin-41* and *lin-42* and may act in parallel or in the same pathway as *hbl-1*.

The gonad undergoes stage-specific migratory events (S1-S4 and SA) that are expressed in strict temporal sequence. However, little is known about the temporal control of gonadal development. We found that developmental timing of the gonad is regulated by certain heterochronic activities as well, but it is organized differently and independently from the seam cell circuit. We identified four heterochronic gene products that function together: in a simple model, DRE-1 together with DAF-12 specifies S3/S4 programs, LIN-29 specifies S4 and the microRNA *lin-4* specifies SA programs.

We cloned *dre-1* and found that it encodes an evolutionary conserved F-box protein. As an F-box protein containing a zinc finger (N-recognition class of zinc fingers of the UBR1 protein family), it is likely to be involved in protein degradation. Orthologs are found in *Caenorhabditis briggsae*, *Drosophila melanogaster*, *Rattus norvegicus* and humans. DRE-1 orthologs are uncharacterized proteins with unknown biological functions. Hence, the physiological role of DRE-1 in temporal control may be evolutionarily conserved. Moreover, genetic data suggest that DRE-1 functions in an SCF (Skp1, Cul1 and F-box) E3 ligase complex containing SKR-1 (*C. elegans* Skp1 homolog) and CUL-1. Notably, developmental timing is regulated by transcriptional and translational control mechanisms. Therefore, the finding that *dre-1* encodes an F-box seemingly involved in protein degradation adds a new dimension to the regulation of temporal development.

Remarkably, *dre-1* also affects a different developmental timer, the molt cycle, which is a measure of elapsed stages or chronological age. It could affect both heterochronic and molt circuits independently or act at the intersection of the two timers. *dre-1* null mutants develop to the three-fold stage of embryogenesis, but are unable to hatch, and partial reduction of *dre-1* results in molting defects at all larval molts. Thus, DRE-1 function may be required for hatching and molting, and suggests that key regulators of these processes may be targets of DRE-1 mediated degradation.

dre-1 was expressed prominently in the nucleus and reduced in the cytoplasm. It was expressed in phenotypically affected tissues such as epidermal seam cells and gonadal Distal Tip Cells that lead gonadal outgrowth, suggesting it could act cell autonomously. Expression was also seen in the nervous system, excretory cells, body and pharyngeal muscle, and vulva, as well as other tissues.

Since *daf-12* mutants affect *C. elegans* longevity, we asked whether *dre-1* influences life span as well. We found that *dre-1* influences life span in a manner similar to *daf-12*, but to a lesser extent.

The *dre* screen yielded a second gene, *dre-2* that is represented by a single allele. *dre-2* may play a role in *C. elegans* developmental timing as well. On its own it exhibited a modestly penetrant and strong delay in gonad migration, but no seam cell phenotypes. However, it enhanced the retarded epidermal and gonadal phenotypes of the *daf-12* null mutant and strongly suppressed *lin-42* precocious adult alae phenotypes. Hence, *dre-2* may represent a new heterochronic gene with auxillary functions. Alternatively, *dre-2* could simply delay development non-specifically. A future challenge will be to clarify whether *dre-2* represents a true heterochronic gene.

1. Zusammenfassung

Der Lebenszyklus des Fadenwurms *Caenorhabditis elegans* besteht aus sechs verschiedenen Lebensstadien: Ein Embryonalstadium, vier Larvalstadien (L1 bis L4) und das adulte Stadium. Diese Lebensstadien sind durch Schlüpf- und Häutungsprozesse voneinander getrennt und mit Stadium-spezifischen Entwicklungsprogrammen assoziiert. Die Entwicklung von *C. elegans* hängt in großen Teilen von Umweltbedingungen ab. Unter günstigen Bedingungen entwickelt sich der Wurm sehr schnell zum adulten Tier. Unter ungünstigen Bedingungen kann der Wurm in ein alternatives, reversibles Larvalstadium, die Dauer Diapause, übergehen.

Die Entwicklung der Metazoa wird durch positionelle und zeitliche Musterbildung aller Lebensstadien gesteuert. In *C. elegans* koordiniert der „heterochrone Signalweg“ die zeitliche Entwicklung verschiedener Gewebe.

Diese Studie befasst sich mit der Regulation der zeitlichen Entwicklung von Geweben dritter und späterer Larvalstadien.

Der nukleare Hormonrezeptor DAF-12 entscheidet als Teil dieses „heterochronen Signalweges“ über zwei Entwicklungsmöglichkeiten im dritten Larvalstadium: Reproduktives Wachstum und Dauer Diapause. *daf-12* Nullmutanten können nicht in die Dauer Diapause übergehen. Im Gegensatz dazu haben sie nur einen schwachen heterochronen Phänotyp. Daraus lässt sich folgern, daß Aktivitäten anderer Gene existieren, die parallel zu *daf-12* die zeitliche Entwicklung spezifizieren.

Wir führten genetische Screens nach diesen *daf-12* redundanten Funktionen (*dre*) durch, indem wir nach einer Verstärkung des heterochronen Defekts in der Gonadenmigration von *daf-12* Nullmutanten suchten. Wir fanden zwei verschiedene Loci, *dre-1* und *dre-2*.

dre-1 spielte eine Rolle in der zeitlichen Entwicklung der Gonade und anderer Gewebe, wie der Epidermis. Bei der zeitlichen Entwicklung epidermaler Saumzellen war *dre-1* an der Umstellung von der larvalen zur adulten Entwicklung beteiligt. *dre-1* fördert L4 Programme und verhinderte die frühzeitige Exprimierung adulter Programme. *dre-1* Mutanten wiesen sich durch eine verfrühte Entwicklung adulter Strukturen der Saumzellen aus. Epistasis Experimente platzierten *dre-1* zwischen die microRNA *let-7* und dem Transkriptionsfaktor *lin-29*, die letzte Komponente des heterochronen Weges, die adulte Programme fördert. Der Phänotyp der *dre-1* Mutanten war verhältnismäßig schwach, was auf Aktivitäten anderer Gene, die parallel zu *dre-1* agierten, hinweisen könnte. Tatsächlich wird die zeitliche Abfolge von larvaler zu adulter Entwicklung durch mindestens vier Gene (*lin-41*, *lin-42*, *hbl-1* und *dre-1*) reguliert. Wir fanden heraus, daß *dre-1* parallel zu *lin-41* und *lin-42*, und parallel oder in dem gleichen Weg wie *hbl-1* agierte.

Wie bereits erwähnt, war *dre-1* an der zeitlichen Entwicklung der Gonade beteiligt. Die Gonade entwickelt sich durch Stadium-spezifische Migrationsstufen (S1-S4 und SA), die in strikter zeitlicher Folge exprimiert werden. Über die zeitliche Entwicklung der Gonade war bisher nicht viel bekannt. Wir fanden heraus, daß die zeitliche Entwicklung der Gonade durch bestimmte heterochrone Aktivitäten reguliert wurde, die jedoch verschieden und unabhängig von denen des „heterochronen Signalweges“ der Saumzellen waren. Wir identifizierten vier heterochrone Aktivitäten, die parallel agieren, wobei DRE-1 und DAF-12 die S3/S4 Migrationsstufen, LIN-29 die S4 Migrationsstufen und *lin-4* die SA Migrationsstufen spezifizierten.

Wir klonierten *dre-1* und identifizierten es als evolutionär konserviertes F-Box Protein. Zusätzlich enthielt DRE-1 einen Zink-Finger (N-recognin Klasse von Zink-Fingern der UBR-1 Protein Familie), was auf Funktionen in der Degradierung von Proteinen hindeutete. Orthologe von DRE-1 finden sich in *Caenorhabditis briggsae*, *Drosophila melanogaster*, *Rattus norvegicus* und *Homo sapiens*. Alle DRE-1 Orthologe sind nicht charakterisiert, und daher könnte die physiologische Rolle von DRE-1 konserviert sein. Zusätzlich implizierten genetische Daten, dass DRE-1 eine Komponente eines SCF (Skp1, Cul1, F-box) E3 Ligase Komplexes sein könnte, der aus SKR-1 (*C. elegans* Skp1 Homolog) und CUL-1 besteht. E3 Ligase Komplexe sind an der Degradierung von Proteinen der verschiedensten zellulären Prozesse beteiligt.

Die zeitliche Entwicklung von Geweben wurde bisher nur durch Transkriptions- und Translationsmechanismen kontrolliert. Mit der Identifizierung von DRE-1 als F-Box Protein wurde der zeitlichen Entwicklung von Geweben eine neue Dimension hinzugefügt.

Bemerkenswerterweise beeinflusste *dre-1* gleichzeitig einen anderen entwicklungspezifischen Zeitgeber, den Häutungszyklus, welcher die Anzahl vergangener Lebensstadien aufzeigt. *dre-1* könnte somit sowohl den „heterochronen Signalweg“, als auch den Häutungszyklus unabhängig voneinander beeinflussen oder aber an der Schnittstelle beider Wege agieren. *dre-1* Nullmutanten entwickelten sich bis zum 3-fach gefalteten Stadium der Embryogenese, konnten jedoch nicht schlüpfen. Die partielle Reduktion von *dre-1* durch RNAi führte zu Häutungsdefekten aller Larvalstadien. Daher könnte DRE-1 eine Funktion in Schlüpf- und Häutungsprozessen zukommen. DRE-1 könnte dabei für die Degradierung von Proteinen, die Schlüsselfunktionen in diesen Prozessen ausüben, verantwortlich sein.

DRE-1 wurde hauptsächlich im Kern und in geringerem Maße im Zytoplasma exprimiert. Die Expression wurde in phänotypisch beeinflussten Geweben, wie den Saumzellen und den „Distal-Tip“-Zellen der Gonade, aber auch im Nervensystem, den exkretorischen Zellen, Körper- und Rachenmuskelzellen, der Vulva und anderen Geweben nachgewiesen.

Da *daf-12* Mutanten die Lebensspanne von *C. elegans* beeinflussen, hinterfragten wir, ob *dre-1* eine ähnliche Funktion ausüben könnte. Wir fanden heraus, daß *dre-1* die Lebensspanne in ähnlicher Weise wie *daf-12*, jedoch in geringerem Maße, beeinflusste.

dre-2 ist das zweite Gen, welches wir in Screens nach *daf-12* redundanten Funktionen fanden, und ist durch ein Allel repräsentiert. Auch *dre-2* könnte eine Rolle in der zeitlichen Entwicklung von *C. elegans* spielen. *dre-2* Mutanten wiesen eine zeitliche Verzögerung in der Gondadenmigration, jedoch keinen Phänotyp in den Saumzellen auf. Im Gegensatz dazu verstärkte *dre-2* die zeitliche Verzögerung epidermaler und gonadaler Gewebe von *daf-12*. *lin-42* Mutanten weisen sich durch eine verfrühte Entwicklung adulter Strukturen der Saumzellen aus. *dre-2* unterdrückte diesen Phänotyp von *lin-42*. Folglich könnte *dre-2* eine neue Klasse von heterochronen Genen mit Hilfsfunktionen repräsentieren. Alternativ könnte *dre-2* die Entwicklung von Geweben unspezifisch verzögern. Der Nachweis, ob es sich bei *dre-2* tatsächlich um ein heterochrones Gen handelt, ist eine Herausforderung für zukünftige Forschungsarbeiten.