

1 Summary

The lifecycle of the nematode *Caenorhabditis elegans* depends greatly on environmental conditions. Under favorable conditions, worms develop from egg to adult in three days, passing 4 larval stages (L1-L4). In unfavorable conditions, they arrest development at larval stage 1 or 3 and enter diapause. The L3 diapause form, the dauer larva, is stress resistant, long-lived and specialized for survival and dispersal. The nuclear hormone receptor DAF-12 regulates L3 developmental decision between reproductive growth and the dauer diapause. DAF-12 integrates signals from several endocrine pathways including serotonergic, insulin/IGF, TGF- β and cGMP signaling (the dauer pathways) via a postulated DAF-12 regulating hormone. In addition, DAF-12 has a role in specifying developmental stage programs in the heterochronic pathway, and in concert with genes from insulin/IGF signaling, it influences the life span of *C. elegans*.

In order to identify components of postulated DAF-12 regulator complexes, we screened for DAF-12 interacting factors using the yeast-two hybrid method. In total, we identified 22 candidates, seven of which were selected for further studies. For functional characterization of the putative DAF-12 interactors, we performed RNAi feeding assays. One of the candidates, F07A11.6 = *din-1* suppressed dauer constitutive (Daf-c) phenotypes of reduced insulin receptor (*daf-2*), TGF- β (*daf-7*), guanyl cyclase (*daf-11*), cytochrome P450 (*daf-9*) and nuclear receptor *daf-12* signalling. Moreover, *din-1RNAi* suppressed *daf-9* and *daf-12* heterochronic gonadal migration phenotypes (Mig), as well as *daf-12* heterochronic phenotypes in the epidermis. These results place DIN-1 downstream or parallel to the known dauer pathways, as well as downstream or at the same point as nuclear hormone receptor signal transduction. Protein. BLAST alignments revealed DIN-1 homologous, the nuclear repressor proteins SHARP and MINT in mammals, the Split ends protein SPEN in *Drosophila melanogaster*, and the *C. elegans* protein F29C4.7.

Gene finder analyses predict that the largest *din-1* product consists of 2784 aa which is organized in 21 exons. In contrast to gene finder prediction, analyses of *din-1* EST- cDNA clones and cDNA clones obtained by RT- PCR revealed that most of the *din-1* clones lacked exon 18 and harbored an additional exon 3. We found several lines of evidence for the

presence of a short *din-1* isoform, comprised of exons 18-22 (568 aa), suggesting that *din-1* isoforms originate from two transcriptional units.

EMS-mutagenesis screens for revertants of the gonadal Mig phenotype of *daf-12* ligand binding domain mutants revealed five *din-1* alleles. Representative alleles suppressed dauer pathway mutant *Daf-c* and heterochronic phenotypes, thus confirming our findings for *din-1 RNAi*. *din-1* mutants cluster in the exon 18, which corresponds to the DIN-1-DAF-12 interaction domain, suggesting that the DIN-1-DAF-12 association is disrupted, but also indicating that none of them is a null allele.

Aging experiments indicated that in *daf-2(e1370); din-1(dh127)* double mutants mean life span is increased by 35% compared to already long-lived *daf-2(e1370)* alone. *din-1* mutants alone lived as long as wild type. Expression studies with green fluorescence protein (gfp) tagged DIN-1 constructs uncovered wide spread expression in nuclei of different cell types throughout development. In particular, DIN-1 is seen in hypodermis, gonad, muscle, intestine, pharynx and nervous system, tissues remodeled during dauer formation. The nuclear localization of *din-1* is consistent with a function in transcriptional regulation.

We suggest that in unfavorable conditions where the production of a dauer diapause suppressing hormone is blocked, DIN-1 binds to DAF-12, assembling a corepressor complex that subsequently arrests reproductive development and promotes dauer diapause. In concordance with the homologues SHARP and MINT in mammals, SPEN in *Drosophila* and F29C4.7 in *C. elegans*, DIN-1 forms a class of large nuclear proteins involved in the coordination of basic developmental pathways.

ZUSAMMENFASSUNG

Der Lebenszyklus des Fadenwurms *Caenorhabditis elegans* hängt zum großen Teil von Umweltbedingungen ab. Unter günstigen Bedingungen entwickelt sich der Wurm innerhalb von drei Tagen vom Ei zum erwachsenen Tier, wobei er vier Larvalstadien (L1-L4) durchläuft. Unter ungünstigen Umweltbedingungen stoppt die Entwicklung im ersten oder im dritten Larvalstadium und geht in die Dauer-Diapause über. L3 Dauerlarven sind langlebig und resistent gegen oxidativen Stress. Die ontogenetische Alternative zwischen der Ausbildung der Dauerlarve und reproduktivem Wachstum wird vom Hormonrezeptor DAF-12

im Zellkern gesteuert. Dabei integriert DAF-12 Signale aus Serotonin-, Insulin / IGF-, TGF- β - und cGMP-Signaltransduktionswegen (den Dauer-Signalwegen) über ein postuliertes DAF-12-regulierendes Hormon. Zusätzlich fungiert DAF-12 im heterochronen Signaltransduktionsweg als spezifizierende Komponente von Entwicklungsstadien. Gemeinsam mit Genen aus dem Insulin/IGF- Signalweg beeinflusst DAF-12 auch die Lebensspanne von *C. elegans*.

Unter Anwendung der Yeast-Two Hybrid Methode wurden 22 mögliche DAF-12 Interagierer identifiziert, von denen 7 weitergehend untersucht wurden. Eine erste Charakterisierung der Kandidaten auf funktioneller Ebene erfolgte durch RNAi-Experimente. In diesen Versuchen unterdrückte einer der Kandidaten, *din-1* (F07A11.6), Dauer-konstitutive (Daf-c) Phänotypen von Insulinrezeptormutanten, (*daf-2*), TGF- β -(*daf-7*), zyklischem GMP- (*daf-11*) und Cytochrom P450-(*daf-9*) Mutanten. Außerdem unterdrückte *din-1*RNAi auch Phänotypen von *daf-9*- und *daf-12*- Mutanten mit gestörter Migration der Gonaden (Mig-Phänotyp) sowie *daf-12*-Mutanten mit gestörten zeitlichen Abläufen in der Epidermisentwicklung (heterochroner Phänotyp). Aufgrund dieser Ergebnisse erfolgt die Einordnung von DIN-1 stromabwärts oder parallel zu den bekannten Dauer- Signaltransduktionswegen.

Protein BLAST-Analysen zufolge zeigt DIN-1 die größte Übereinstimmung mit den nuklearen Repressorproteinen SHARP (*H. sapiens*), MINT (*M. musculus*), dem split ends-Protein SPEN (*D. melanogaster*) und mit dem *C. elegans*- Protein F29C4.7. Das Programm „Gene Finder“ sagt ein aus 2784 Aminosäuren bestehendes *din-1* Genprodukt voraus, das in 21 Exons organisiert ist. Im Gegensatz dazu ergaben unsere Analysen von *din-1* cDNA Klonen, dass den meisten von ihnen das Exon 18 fehlte. Außerdem enthielten sie ein zusätzliches Exon 3. Wir fanden mehrere Anhaltspunkte für das Vorhandensein einer kurzen *din-1* Isoform, bestehend aus den Exons 18-22 (568 Aminosäuren) und dafür, dass DIN-1 von mindestens zwei transkriptionellen Einheiten gebildet wird.

EMS-Mutagenese Screens für Revertanten des Mig-Phänotyps von *daf-12*-Mutanten mit verkürzter Ligandenbindedomäne ergaben 5 *din-1* Allele. Heterochrone oder Daf-c Phänotypen von Mutanten mit Defekten in einem der Dauer-Signalwegsgene wurden von einer zusätzliche *din-1* Mutation aufgehoben und die Tiere entwickelten sich phänotypisch normal. Alle fünf *din-1* Mutanten kartierten im Exon 18, das gleichzeitig die DAF-12- DIN-1 Interaktionsdomäne bildet. Dies bedeutet einerseits, dass in *din-1* Mutanten die Assoziation von DAF-12 und DIN-1 aufgehoben ist, und andererseits, dass wahrscheinlich keines der *din-1* Allele ein Nullallel ist. Alterungsexperimente ergaben, dass *daf-2* (*e1370*); *din-1*(*dh127*)-

Doppelmutanten im Schnitt 35% länger leben als die bereits langlebige *daf-2(e1370)*-Mutante. Dagegen zeigten *din-1*- Mutanten alleine keine überdurchschnittliche Lebensdauer. Um die *din-1* Expression im lebenden Tier zu untersuchen, wurden *din-1* Konstrukte injiziert, die mit grünem Fluroessenzprotein (gfp) markiert waren. *din-1* wird während der gesamten Entwicklung im Zellkern exprimiert, und zwar in Hypodermis, Gonaden und Muskeln, Darm, Pharynx und im Nervensystem. Diese Gewebe werden auch während der Dauer Diapause morphologisch umgestaltet. Die Tatsache, daß DIN-1 im ganzen Tier nuklear expremiert wird, spricht für eine Funktion von *din-1* in der transkriptionellen Regulation.

Wir vermuten, dass die Produktion eines Dauer Diapause unterdrückenden Hormons unter ungünstigen Umweltbedingungen unterbrochen ist. Wir schlagen vor, dass infolgedessen DIN-1 an DAF-12 bindet, worauf ein Co- Repressorkomplex rekrutiert wird, der die reproduktive Entwicklung stoppt und die Dauer Diapause auslöst.

Zusammen mit den Säugerhomologen SHARP und MINT, SPEN aus *D. melanogaster* und dem *C. elegans*- Protein F29C4.7 bildet DIN-1 eine Klasse großer nuklearer Proteine, die grundlegende der Signaltransduktionswege während der Ontogenese koordinieren.