

**Metabotrope bioamine Rezeptoren bei
dem Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* (MAUPAS, 1899)
und der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* (MEIGEN, 1830)**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereichs Biologie
der Universität Hamburg

Vorgelegt von
Christian Kähler aus Hamburg

Hamburg 2004

1. Gutachter: PD Dr. Thomas Röder
2. Gutachter: Prof. Dr. Michael Gewecke

Widmung

Für Bruno Weber.
(1922-2002)

Danksagung

Ich danke herzlich Herrn PD Dr. Thomas Röder, daß er sich meiner angenommen hat und mir während der gesamten Doktorarbeit mit Rat und Tat zur Seite stand sowie Herrn Prof. Dr. Michael Gewecke für seine ständige Unterstützung.

Ohne die großzügige Hilfe von Frau PD Dr. Iris Bruchhaus, von Herrn Dr. Harald Hutter und Frau PD Dr. Eva Liebau wäre diese Arbeit sicherlich nicht zustande gekommen. Für die tagtägliche Unterstützung danke ich der Arbeitsgruppe Neurophysiologie, insbesondere Frau Dörte Heyden für die Betreuung der Zellkultur und Herrn Helge Marquardt für die kritische Durchsicht der vorliegenden Arbeit.

Ein großer Dank geht auch an Christine Seekamp und meine Familie.

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1	Einleitung 9
1.1	Signalübertragung zwischen Nervenzellen 9
1.2	Aufbau von ionotropen Rezeptoren 11
1.3	Aufbau von metabotropen Rezeptoren 13
1.4	Neurotransmitter 15
1.4.1	Biogene Amine 16
1.4.2	Weitere Transmitter 17
1.4.3	Acetylcholin 18
1.5	Der Fadenwurm <i>Caenorhabditis elegans</i> und die Fruchtfliege <i>Drosophila melanogaster</i> 19
1.6	Zielsetzung der Arbeit 22
2	Material und Methoden 23
2.1	Material 23
2.1.1	Verwendete Laborgeräte 23
2.1.2	Chemikalien, Lösungen und molekularbiologischer Bedarf 24
2.1.3	Nahrungsbrei für <i>Drosophila melanogaster</i> 24
2.1.4	NGM-Agar-Platten für <i>Caenorhabditis elegans</i> 25
2.1.5	Bakterienmedien und Bakterienstämme 25
2.1.6	Oligonukleotide 26
2.1.7	Puffer und Lösungen 27
2.1.8	Zelllinien 30
2.2	Methoden 30
2.2.1	Haltung der Versuchstiere 30
2.2.2	Reverse Transkription (cDNA-Synthese) 32
2.2.3	Polymerase-Kettenreaktion 34
2.2.4	Klonierung 35
2.2.5	Herstellung kompetenter Zellen und Transformation 36
2.2.6	Plasmidpräparation 37
2.2.7	Sequenzierung 37
2.2.8	RNA-Interferenz (RNAi) bei <i>C. elegans</i> 38
2.2.9	<i>In-situ</i> -Hybridisierung bei <i>D. melanogaster</i> 39
2.2.10	Immunhistologie bei Kryostatschnitten 42
2.2.11	Zellkultur und transiente Transfektion 43
2.2.12	SEAP Reportersystem 44
2.2.13	DNA-Transformation bei <i>C. elegans</i> 46
2.2.14	Radiorezeptor-Assay 47
2.2.15	Phylogenetische Analysen 47
2.2.16	Verhaltensversuche bei <i>C. elegans</i> 48
2.2.17	Ermittlung des Längen-Breiten-Index bei <i>C. elegans</i> 49
2.2.18	Das GAL4-System bei <i>Drosophila</i> 50

3	Ergebnisse	51
3.1	Muscarinische Acetylcholin-Neurotransmission in <i>C. elegans</i>	51
3.1.1	Phylogenetische Analyse	51
3.1.2	Radiorezeptor-Assay	52
3.1.3	Verhaltensanalyse	53
3.1.3.1	RNAi bei den drei Rezeptorgenen <i>gar-1</i> , <i>gar-2</i> und <i>gar-3</i>	53
3.1.3.2	Genomische Knock-outs der Rezeptorgene <i>gar-2</i> und <i>gar-3</i>	54
3.1.3.3	RNAi bei den vier G α -Proteingenen <i>gpa-12</i> (G ₁₂ α), <i>goa-1</i> (G _o α), <i>egl-30</i> (G _q α) und <i>gsa-1</i> (G _s α)	56
3.1.3.4	Genomische Knock-outs der G α -Proteingene <i>goa-1</i> (G _o α), <i>gpa-12</i> (G ₁₂ α) und <i>egl-30</i> (G _q α)	57
3.1.3.5	Genomische Knock-outs des Phospholipase C β -Genes <i>egl-8</i>	58
3.1.3.6	Genomischer Knock-out des IP ₃ -Rezeptorgenes <i>itr-1</i>	59
3.1.3.7	Genomische Knock-outs der Proteinkinase C-Gene <i>tpa-1</i> und <i>pkc-2</i>	60
3.1.3.8	Genomischer Knock-out des Diacylglycerolkinase-Genes <i>dgk-1</i>	61
3.1.3.9	Genomische Knock-outs der Gene für Vesikelexocytose <i>unc-13</i> und <i>unc-31</i>	62
3.1.3.10	Einflußnahme von Octopamin auf die Pharynxkontraktion	63
3.1.3.11	Verhaltensanalyse bei Nahrungsentzug	64
3.1.3.12	Möglicher Einfluß des muscarinischen Rezeptors GAR-3 auf weitere Verhaltensweisen	65
3.1.4	Lokalisation der Expression der beiden Rezeptorgene <i>gar-1</i> und <i>gar-3</i>	66
3.1.5	Konnektivität im Pharynx von <i>C. elegans</i>	69
3.2	Putative Octopaminrezeptoren	70
3.2.1	Der SER-3 Rezeptor bei <i>C. elegans</i>	70
3.2.1.1	SEAP-Assay	71
3.2.1.2	Transgene Linie von SER-3	72
3.2.2	Putativer Octopamin von <i>D. melanogaster</i>	73
3.2.2.1	Phylogenetische Analyse	73
3.2.2.2	SEAP-Assay	74
3.2.2.3	<i>In-situ</i> -Hybridisierung	75
3.2.2.4	Reverse Transkription	76
3.2.2.5	Immunhistologie	77
4	Diskussion	78
4.1	Muscarinische Neurotransmission bei <i>C. elegans</i>	78
4.1.1.	Der muscarinische Acetylcholinrezeptor GAR-3	79
4.1.2	<i>In vivo</i> Charakterisierung der Rezeptoren GAR-1, GAR-2 und GAR-3	79
4.1.3	Der Signalweg des GAR-3 Rezeptors	81
4.1.4	Diacylglycerol (DAG) steuert die Vesikelabgabe über die Proteinkinase C (PKC-2) und das regulative Vesikelexocytoseprotein UNC-13	83
4.1.5	Weitere Eigenschaften des GAR-3 Signalweges	85
4.1.6	Die Funktion des Pharynxnervensystems	86
4.2	Der SER-3-Rezeptor bei <i>C. elegans</i>	88
4.3	Der Octopaminrezeptor bei <i>Drosophila</i>	89

5	Zusammenfassung und Ausblick	91
6	Literatur	93
	Anhang	

Abkürzungsverzeichnis

A. bidest.	doppelt destilliertes, steriles Wasser
AC	Adenylylcyase
Ach	Acetylcholin
AP	Alkalische Phosphatase
ATP	Adenosintriphosphat
BCIP	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphat
Bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cDNA	komplementäre DNA (complementary DNA)
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
CGC	Caenorhabditis Genetic Center, University of Minnesota, Minneapolis, USA
CIAP	alkalische Phosphatase aus Kälberdarm (calf intestine alkaline phosphatase)
CRE	cAMP Reaktionselement (cAMP response element)
CREB	cAMP Reaktionselement-Bindeprotein (cAMP response element binding protein)
DAG	Diacylglycerol
DCMD	absteigender kontralateraler Bewegungsdetektor (descending contralateral movement detector)
DGK	Diacylglycerolkinase
DIG	Digoxigenin
<i>D. melanogaster</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ddNTP	Didesoxynucleotid
dNTP	2'-Desoxyribonucleosid-5'-triphosphat
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, D-38124 Braunschweig
DTT	Dithiothreitol (Cleland's Reagenz)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ER	Endoplasmatisches Reticulum
EtOH abs.	Ethanol absolut
FBS	fetales Kälberserum (Fetal Bovine Serum)
GABA	γ -Aminobuttersäure
GFP	grün fluoreszierendes Protein (Green Fluorescent Protein)
IP ₃	Inositoltrisphosphat
IPTG	Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranosid
LGMD	großer Lobulabewegungsdetektor (lobula giant movement detector)
mAChR	muscarinischer Acetylcholinrezeptor
mRNA	messenger RNA
4-MUP	4-Methylumbelliferylphosphat
NA	Noradrenalin
nAChR	nikotinischer Acetylcholinrezeptor
NBT	Nitro Blue Tetrazolium
NGM	natürliches Wachstumsmedium (natural growth medium)
NMDA	N-Methyl-D-aspartat
OA	Octopamin
PCR	Polymerase Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction)

PIP ₂	Phosphatidylinositol-bisphosphat
PKA	cAMP-abhängige Proteinkinase A
PLCβ	Phospholipase Cβ
QNB	Quinuclidinylbenzoat
RFU	Relative Fluoreszenzeinheiten
RISC	RNA induzierter Verstummungskomplex (RNA-induced silencing complex)
RNA	Ribonucleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz
SEAP	sekretierte alkalische Phosphatase (secreted alkaline phosphatase)
Triton X-100	t-Octylphenoxypolyethoxyethanol
Tween 20	Polyoxyethylensorbitan-monolaurat
u	Weiss-Einheit (Weiss unit)
UAS	stromaufwärts gelegene Aktivierungssequenz aus <i>Saccharomyces</i> (Upstream Activating Sequence)
U/min	Umdrehungen pro Minute
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranosid

Die Abkürzungen für gebräuchliche Maßeinheiten sind hier nicht aufgeführt

1 Einleitung

Die Kommunikation zwischen zwei Zellen läuft über Signalmoleküle, die von der signalisierenden Zelle abgegeben und von der Zielzelle erkannt werden oder über direkten cytoplasmatischen Kontakt zwischen benachbarten Nervenzellen, den Gap junctions (Proteinkanäle (Connexone), die einen schmalen Interzellularspalt überbrücken) (Zimmermann 1993).

Die Zielzelle verarbeitet das jeweilige Signal mit Hilfe eines speziellen Proteins, des sogenannten Rezeptors. Dieser bindet spezifisch das Signalmolekül, wodurch eine Signalantwort in der Zielzelle ausgelöst wird. Viele extrazelluläre Signalmoleküle wirken in sehr geringen Konzentrationen ($< 10^{-8}$ M) und werden mit einer großen Affinität vom jeweiligen Rezeptor gebunden. Bei den Rezeptoren handelt es sich meist um Transmembranproteinkomplexe (Kandel et al. 1996), die sich an der Oberfläche der Zielzelle befinden. Die Bindung eines extrazellulären Signalmoleküls (Ligand) bewirkt die Aktivierung des Rezeptors, die eine Kaskade intrazellulärer Signale auslöst und schließlich zu einer biochemischen Veränderung in der Zelle führt.

1.1 Signalübertragung zwischen Nervenzellen

Neuronale Rezeptoren haben zwei Hauptfunktionen: Zum einen die Erkennung spezifischer Transmitter und zum anderen die Aktivierung von Effektoren. Die bisher identifizierten Rezeptoren für Neurotransmitter lassen sich in zwei Hauptgruppen einteilen (Kandel et al. 1996). Die Rezeptoren der ersten Gruppe steuern Ionenkanäle auf unmittelbare Weise: Rezeptor- und Effektorfunktion werden hier von verschiedenen Domänen ein und desselben Makromolekülkomplexes übernommen. Diese ionotropen Rezeptoren bilden zwei Familien. Die eine Familie enthält Rezeptoren für Acetylcholin (ACh), γ -Aminobuttersäure (GABA), Glycin und Serotonin; die andere Gruppe umfaßt zwei Klassen von Glutamaterezeptoren, jene vom N-Methyl-D-aspartat-Typ (NMDA-Rezeptoren) sowie bestimmte non-NMDA-Rezeptoren (Kandel et al. 1996).

Die Rezeptoren der zweiten Gruppe steuern Ionenkanäle indirekt: Die Erkennung des Transmitters und die Aktivierung von Effektoren sind voneinander getrennt. Diese Gruppe zerfällt wiederum in zwei Familien.

In der ersten, der Familie der metabotropen Rezeptoren, sind die Rezeptormoleküle über Proteine, die ein Guanosinnukleotid binden und als G-Proteine bezeichnet werden, mit den Effektormolekülen gekoppelt. Die Rezeptoren dieser Familie heißen dementsprechend auch G-Protein-gekoppelte Rezeptoren. Dazu gehören die α - und β -adrenergen Rezeptoren, die muscarinischen ACh-Rezeptoren, eine Klasse von Rezeptoren für GABA, Glutamat und Serotonin, Rezeptoren für Neuropeptide sowie Geruchsstoffrezeptoren und das Rhodopsin (das Rezeptormolekül für Lichtsignale im Auge).

Die Effektorkomponente kann in diesen Rezeptorsystemen nur unter Beteiligung bestimmter weiterer Proteine aktiviert werden. Typischerweise ist der Effektor ein Enzym, das einen diffusionsfähigen sekundären Botenstoff, einen Second Messenger, erzeugt. Diese Second Messenger lösen dann ihrerseits eine Kaskade biochemischer Folgereaktionen aus: Entweder aktivieren sie spezifische Proteinkinasen, die daraufhin diverse Proteine der Zelle an Serin- und Threoninresten phosphorylieren oder sie mobilisieren Ca^{2+} -Ionen aus intrazellulären Speichern. Damit setzen sie Reaktionen in Gang, die den biochemischen Zustand der Zelle verändern. In manchen Fällen kann ein G-Protein oder ein Second Messenger allerdings auch direkt auf einen Ionenkanal wirken (Kandel et al. 1996).

Die zweite Familie von indirekt arbeitenden Rezeptoren umfaßt im wesentlichen die Rezeptortyrosinkinasen (Kandel et al 1996). Sie binden und erkennen eine Reihe von Peptiden, wie z.B. den Epidermiswachstumsfaktor (epidermal growth factor, EGF), den Fibroblastenwachstumsfaktor (fibroblast growth factor, FGF), den Nervenwachstumsfaktor (nerve growth factor, NGF) und Insulin. Sie unterscheiden sich von den typischen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren in zweierlei Hinsicht: Erstens durchspannen sie die Membran nur einmal und zweitens enthält ihre cytoplasmatische Domäne eine Kinaseaktivität, die Proteine an Tyrosinresten phosphoryliert. Das Tyrosinkinasesystem gehört nicht im engeren Sinne zu den Second-Messenger-Systemen, da keine Botenstoffe erzeugt werden, sondern direkt Proteine verändert werden. Sie steuern wie die serin- und threoninspezifischen Kinasen die Funktion der neuronalen Proteine, die sie phosphorylieren.

Die Substrate von Tyrosinkinase gehören üblicherweise einer Klasse von Proteinen an, von der man annimmt, daß sie zu langfristigen Veränderungen der Neuronenfunktion beitragen. Neben ihrer Transmembrandomäne und ihrer cytoplasmatischen Kinasedomäne besitzen Rezeptortyrosinkinase eine extrazelluläre Bindungsdomäne, die den Liganden erkennt.

Infolge der Ligandenbindung lagern sich zwei Rezeptormoleküle zu einem Dimer zusammen. Durch diese Dimerisierung wird die Kinasedomäne aktiv: Zunächst phosphorylieren sich die beiden Teile des Dimers an einem Tyrosinrest gegenseitig. Danach kann die Kinase weitere Proteine im Cytoplasma phosphorylieren, darunter auch cytoplasmatische Kinasen, die das Signal innerhalb der Zelle weitertragen und potenzieren.

Die strukturellen Unterschiede zwischen den Rezeptorfamilien spiegeln sich in den jeweiligen Funktionen wider. Bei der Transmitterwirkung auf Rezeptoren kann man zwischen schnell und langsam unterscheiden, wobei sich diese Einteilung nicht nur auf die Geschwindigkeit bezieht, mit der die postsynaptische Wirkung eintritt, sondern auch auf deren Dauer. Direkt gesteuerte Ionenkanäle arbeiten normalerweise schnell – im Bereich von Millisekunden – da hier nur ein einziges Makromolekül seine Konformation ändern muß. Dagegen setzt bei Rezeptoren, die über G-Proteine oder Tyrosinkinase wirken, die Antwort langsamer ein (in Zehntelsekunden bis Sekunden), da jede der Einzelreaktionen in der ausgelösten biochemischen Kaskade sich über einen gewissen Zeitraum hinzieht; sie hält aber auch länger an (für Sekunden bis Minuten) (Kandel et al. 1996).

1.2 Aufbau von ionotropen Rezeptoren

In den meisten Fällen öffnen sich Kanäle als Reaktion auf ein bestimmtes Signal hin. Die wichtigsten Reize, von denen man weiß, daß sie Ionenkanäle zum Öffnen veranlassen, sind Veränderungen in der Spannung zwischen den beiden Seiten der Membran (spannungskontrollierte Kanäle), mechanische Belastung (mechanisch-kontrollierte Kanäle) und die Bindung eines Signalmoleküls (Liganden-kontrollierte Kanäle oder auch ionotrope Rezeptoren). Das Signalmolekül kann entweder von außen an die Zelle gelangen, z.B. als Neurotransmitter (Transmitter-kontrollierte Kanäle) oder es kann ein intrazellulärer Botenstoff sein.

Ein Neurotransmitter wirkt direkt auf einen Ionenkanal, wenn der Transmitterrezeptor ein struktureller Bestandteil des Kanals ist. Diese Art von Rezeptoren werden als ionotrop bezeichnet. Sie sind also Bestandteile von Ionenkanälen, die sich unmittelbar als Antwort auf die Neurotransmitter Acetylcholin, Serotonin, GABA und Glycin öffnen.

Insgesamt besitzen diese Ionenkanäle strukturell ähnliche Untereinheiten, was auf entwicklungsgeschichtliche Verwandtschaft schließen läßt (Alberts et al. 1995). In allen Fällen bilden mehrere Polypeptid-Untereinheiten, die wahrscheinlich ein Pentamer ausbilden, einen Kanal. Beispielhaft sei hier auf die Struktur eines nikotinischen Acetylcholinrezeptors (nAChR) eingegangen, der zur Klasse der ionotropen Rezeptoren gehört. Diese Rezeptoren findet man auf Skelettmuskeln und Nervenzellen. Sie tragen ihren Namen daher, weil sie durch Nikotin aktivierbare Rezeptoren sind. Bei den nAChR lagern sich fünf Untereinheiten (α , α , β , γ , δ) zu einer wassergefüllten, die Membran durchquerenden Pore zusammen. Jede Untereinheit durchspannt viermal die Membran. Die Pore wird von fünf transmembranen α -Helices ausgekleidet, von denen jeweils eine von jeder Untereinheit beigesteuert wird (Abb. 1).

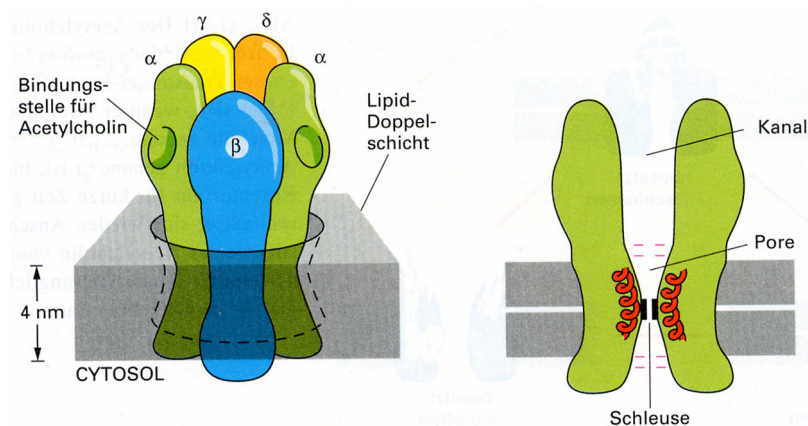


Abb. 1: Modell für die Struktur eines nikotinischen Acetylcholinrezeptors. Fünf Untereinheiten (α , α , β , γ , δ) lagern sich zu einem membrandurchquerenden Komplex zusammen. Die Pore wird von einem Ring aus fünf transmembranen α -Helices ausgekleidet, von denen jeweils eine von jeder Untereinheit beigesteuert wird. Im geschlossenen Zustand ist die Pore durch die hydrophoben Seitenketten von fünf Leucin-Resten, jede von einer α -Helix, versperrt, die etwa in der Mitte der Lipid-Doppelschicht ein Tor bilden. Negativ geladene Seitenketten an den beiden Eingängen der Pore sorgen dafür, daß nur positiv geladene Ionen den Kanal passieren können. Beide α -Untereinheiten enthalten eine Bindungsstelle für Acetylcholin (aus Alberts et al. 1995).

Spannungs-kontrollierte Kationenkanäle - Na^+ - und Ca^{2+} -Kanäle - sind dagegen aus vier Untereinheiten zusammengesetzt, wobei jede aus ca. 600 Aminosäuren aufgebaut ist. Jede Untereinheit besitzt sechs membranüberspannende α -Helices. K^+ -Kanäle bilden eine Ausnahme: Sie besitzen nur eine Untereinheit (Kandel et al. 1996).

1.3 Aufbau von metabotropen Rezeptoren

G-Protein-gekoppelte Rezeptoren stellen die größte Familie der Zelloberflächen-Rezeptoren dar. Ungeachtet der chemischen und funktionellen Unterschiede des gebundenen Signalmoleküls sind sich alle G-Protein-gekoppelten Rezeptoren hinsichtlich ihrer Struktur sehr ähnlich. Diese Proteine werden aus einer einzigen Polypeptidkette gebildet, die die Lipid-Doppelschicht siebenfach durchspannt. Der N-Terminus dieser Polypeptidkette ragt dabei aus der Membran heraus in den extrazellulären Raum hinein, wohingegen der C-Terminus im Cytoplasma liegt (Birnbauer 1990 u. Dohlman et al. 1991) (Abb. 2).

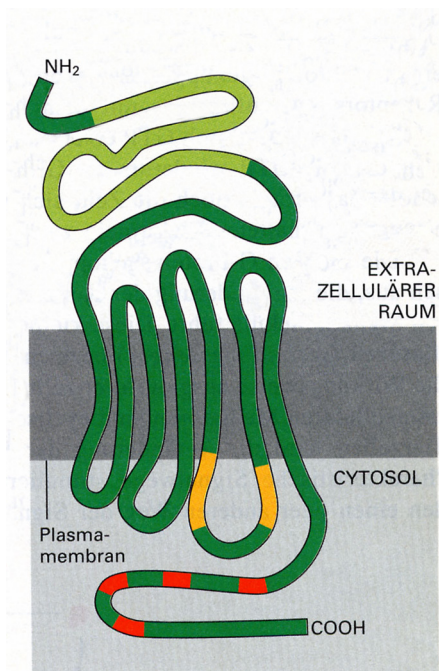


Abb. 2: Schematische Darstellung eines G-Protein-gekoppelten Rezeptors. G-Protein-gekoppelte Rezeptoren haben zur Bindung von Liganden große extrazelluläre Bindedomänen, die aus einem Teil (*hellgrün*) der Polypeptidkette gebildet werden. Die Teile der intrazellulären Domäne, an denen trimere G-Proteine binden, sind *orange* dargestellt. Die Bereiche des Rezeptors, die zur Desensibilisierung des Rezeptors phosphoryliert werden, sind *rot* abgebildet (aus Alberts et al. 1995).

Wenn ein extrazellulärer Ligand gebunden wurde, verändert sich die Konformation des Rezeptors, d.h. seine G-Protein-Bindestellen werden zugänglich. Diese membranständigen G-Proteine sind Heterotrimere, die aus drei verschiedenen Komponenten bestehen: α , β und γ . Die α -Untereinheit ist in der Lage, die Nucleotide Guanosintriphosphat (GTP) oder Guanosindiphosphat (GDP) zu binden. Im Ruhezustand trägt das G-Protein ein GDP. Diffusion in der Membran führt nun zur Assoziation des Liganden/Rezeptor-Komplexes mit dem G-Protein.

Dadurch sinkt aber gleichzeitig die Affinität des G-Proteins für GDP. GDP dissoziiert daher vom G-Protein und GTP bindet dann an die α -Untereinheit, die vom G-Protein dissoziiert. Die α -Untereinheit, die GTP gebunden hat, kann dann z.B. ein Enzym aktivieren. Wenn der Ligand vom Rezeptor dissoziiert, erhält er wieder seine ursprüngliche Konformation. Durch Hydrolyse des gebundenen GTP erhält die α -Untereinheit ihre ursprüngliche Konformation zurück, dissoziiert z.B. von dem Enzym, das dadurch inaktiv wird und bildet zusammen mit dem $\beta\gamma$ -Komplex wieder ein G-Protein.

G-Proteine können auf verschiedene Arten und Weisen wirken, die zur Bildung von Second messengern führen (Koolman et al. 1994) oder sie wirken direkt auf Kanäle.

(1) Die α -Einheit aktiviert eine membranständige Adenylylcyclase, welche Adenosintriphosphat (ATP) in zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) umwandelt. Als Folge steigt der intrazelluläre cAMP-Spiegel an. β -adrenerge Rezeptoren sind für ihre Stimulation der Adenylylcyclase bekannt. Sie vermitteln die Wirkung von Adrenalin und Noradrenalin. Das cAMP stimuliert dann z.B. eine cAMP-abhängige Proteinkinase.

(2) Die α -Einheit stimuliert eine cGMP-spezifische Phosphodiesterase. Durch dieses Enzym wird cGMP beschleunigt hydrolysiert, so daß seine Konzentration absinkt, was zum Beispiel zum Schließen von Ionenkanälen führt.

(3) Die α -Einheit bindet an einen Ionenkanal, z.B. für K^+ - oder Ca^{2+} -Ionen, der sich dadurch öffnet.

(4) Die α -Einheit aktiviert eine Phospholipase, die Membranlipide hydrolysiert, z.B. die Phospholipase, deren Substrat Phosphatidylinositol-bisphosphat (PIP_2) zu Inositoltrisphosphat (IP_3) und Diacylglycerol (DAG) gespalten wird. Es entstehen zwei Produkte mit Second-messenger-Funktion, IP_3 und DAG. Das hydrophile IP_3 wandert zum endoplasmatischen Retikulum (ER) und bewirkt dort die Freisetzung von Ca^{2+} aus dessen Speichern. Das lipophile DAG verbleibt dagegen in der Membran und aktiviert die Proteinkinase C, die in Gegenwart von Ca^{2+} -Ionen Serin- und Threonin-Reste von Proteinen phosphoryliert und dadurch deren Funktionszustand ändert (Alberts et al. 1995). Abschließend sei angemerkt, daß die Konzentration an freiem Ca^{2+} im Cytosol sehr niedrig ist, ca. $10^{-7}M$. Sie wird durch ATP-abhängige Calcium-Pumpen ständig niedrig gehalten. Im extrazellulären Raum und ER ist die Konzentration mit $10^{-3}M$ relativ hoch.

Über den hier beschriebenen Signalweg wirken die G-Protein-gekoppelten muscarinischen Acetylcholinrezeptoren, die ihren Namen daher haben, weil sie durch das Pilzalkaloid Muscarin aktiviert werden können.

Je nachdem an welchen Typ von Rezeptor es bindet, kann das gleiche Signalmolekül den cAMP-Spiegel entweder erhöhen oder senken. Beispielsweise führt Adrenalin zur Aktivierung der Adenylylclase, wenn es an einen β -adrenergen Rezeptor bindet. Bindet es jedoch an einen α_2 -adrenergen Rezeptor, inhibiert Adrenalin das Enzym. Dieses Phänomen läßt sich darauf zurückführen, daß es unterschiedliche G-Proteine gibt, die die jeweiligen Rezeptoren an das Enzym koppeln. Während der β -adrenerge Rezeptor über $G_s\alpha$ funktionell mit der Adenylylcyclase verbunden ist, werden α_2 -adrenerge Rezeptoren über ein inhibitorisches G-Protein ($G_i\alpha$) an das Enzym gekoppelt (Alberts et al. 1995).

Wie oben schon erwähnt, können von Rezeptoren aktivierte G-Proteine entlang der Membran wandern und selbst - ohne daß frei diffundierende Second Messenger oder Proteinkinasen dazwischengeschaltet sind - mit einem Ionenkanal interagieren, um ihn zu öffnen oder zu schließen. Ein derartiges G-Protein vermittelt wahrscheinlich die Wirkung der muscarinischen ACh-Rezeptoren im Herz, indem es einen K^+ -Kanal öffnet und so eine Hyperpolarisation herbeiführt. Je nach Kanaltyp wirkt entweder die α -Untereinheit oder der $\beta\gamma$ -Komplex des Proteins aktivierend oder inhibierend.

1.4 Neurotransmitter

Generell werden kleine Signalmoleküle, die von einer präsynaptischen Nervenzelle an einer chemischen Synapse abgegeben werden, um das Signal an die postsynaptische Zelle weiterzuleiten, als Neurotransmitter bezeichnet (Alberts et al. 1995). Ein Großteil der bekannten Neurotransmitter zählt zur Stoffgruppe der Amine, wovon wiederum viele Aminosäuren oder ihre Derivate sind. Nicht zu den Aminen gehören ATP und seine Abbauprodukte. Amintransmitter haben viele biochemische Gemeinsamkeiten: Es sind kleine, geladene Moleküle mit relativ kurzen Biosynthesewegen. Alle werden aus Vorläufermolekülen synthetisiert, die aus den wichtigsten organischen Verbindungen des intermediären Stoffwechsels hervorgehen. Die Synthese von Neurotransmittern wird fast ausnahmslos durch cytosolische Enzyme katalysiert (Kandel et al. 1996).

1.4.1 Biogene Amine

Biogene Amine sind Neurotransmitter, die als Decarboxylierungsprodukte von Aminosäuren abstammen. Diese Gruppe schließt die Katecholamine, das Serotonin und das Histamin, ein Imidazol, ein (Kandel et al. 1996). Die Katecholamintransmitter (haben einen Katecholkern (3,4-dihydroxylierter Benzolring) – Dopamin, Noradrenalin und Adrenalin – werden aus der Aminosäure Tyrosin durch Enzyme synthetisiert. Die Tyrosin-Hydroxylase ist eine Oxidase, die Tyrosin in L-Dihydroxyphenylalanin (L-DOPA) umwandelt. L-DOPA wird anschließend durch eine Decarboxylase zu Dopamin und CO₂ umgesetzt. Das nächste Enzym in dieser Reaktionskette ist die Dopamin-β-Hydroxylase, die Dopamin zu Noradrenalin umwandelt (Kandel et al. 1996).

Serotonin (5-Hydroxytryptamin, 5-HT) und die Aminosäure Tryptophan (Try), aus der Serotonin gebildet wird, gehören zur Gruppe aromatischer Verbindungen, den Indolen. Ihr typisches Strukturelement ist ein mit einem Benzolring verknüpfter Fünfering, der Stickstoff enthält. Zwei Enzyme sind an der Serotoninsynthese beteiligt: Die Tryptophan-Hydroxylase, eine Oxidase und die 5-Hydroxytryptophan-Decarboxylase (Kandel et al. 1996).

Histamin enthält wie die Aminosäure Histidin, von der es abstammt, einen charakteristischen Fünfering mit zwei Stickstoffatomen. Histamin wird aus Histidin über eine Decarboxylase synthetisiert. Histamin wirkt bei Wirbeltieren über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, wohingegen es bei Wirbellosen sein Signal über ionotrope Rezeptoren weitervermittelt (Kandel et al. 1996, Roeder 2003, Witte et al. 2002).

Ein weiterer Neurotransmitter, dessen Neurotransmittereigenschaften auf wirbellose Tiere beschränkt ist, ist das Octopamin (OA). Es wurde zuerst in den Speicheldrüsen bei *Octopus* entdeckt (Erspamer et al. 1951). Heute wird angenommen, daß OA nahezu jeden physiologischen Prozeß in Wirbellosen moduliert (Roeder et al. 1999 u. Roeder et al. 2003). Obwohl OA und Noradrenalin (NA) chemisch nicht identisch sind, scheint es so zu sein, daß das octopaminerge System der Wirbellosen homolog zum NA-System der Vertebraten ist. OA hat in Vertebraten selber keine physiologische Funktion und NA in Wirbellosen, so daß angenommen wird, daß OA der adrenerge Transmitter von Wirbellosen ist.

Außerdem haben beide Substanzen eine ähnliche chemische Struktur, die sich nur dadurch unterscheidet, daß NA über eine zusätzliche Hydroxygruppe an Position drei des phenolischen Ringes verfügt. Es scheint auch so zu sein, daß OA und NA gleiche Aufgaben wahrnehmen; in der Peripherie sind beide als „Streßhormone“ tätig. NA erhöht die Muskelkontraktion sowie den energieliefernden Glucoseabbau, was darauf hindeutet, daß es bei energetisch aufwendigem Verhalten – wie dem Fluchtverhalten – eine tragende Rolle spielt. In Insekten wird der Stoffwechsel des Fettkörpers, das Hauptorgane für die Speicherung von Energiereserven, bei Gabe von OA aktiviert, so daß diese Antwort vergleichbar mit der auf NA bei Wirbeltieren ist (Orchard et al. 1984). Von beiden, NA und OA, wird angenommen, daß sie an der generellen neuronalen Aktivität, der sogenannten „Motivation“ von Organismen, beteiligt sind, also der allgemeinen Bereitschaft auf Sinneseindrücke Verhalten folgen zulassen. Außerdem sind alle adrenergen und octopaminergen Rezeptoren G-Protein-gekoppelt. Darüber hinaus sind pharmakologische Ähnlichkeiten zwischen α -adrenergen und octopaminergen Rezeptoren bekannt (Roeder et al. 1999).

Octopamin, das biogene Monoamin, wird von der Vorstufe Tyramin aus durch eine β -Hydroxylase synthetisiert. Dieses Enzym hat große Sequenzübereinstimmungen zur Dopamin- β -Hydroxylase von Vertebraten. Tyramin (TA) hingegen wird durch Decarboxylierung aus der Aminosäure Tyrosin synthetisiert. Zu TA sei kurz erwähnt, daß es zwar eine Synthesevorstufe des Octopamins darstellt, OA bzw. TA aber unabhängige Neurotransmitter sind, wobei beide auf unterschiedliche G-Protein-gekoppelte-Rezeptoren wirken. Die Eigenschaften von TA gleichen denen von Adrenalin (Roeder et al. 1999).

1.4.2 Weitere Transmitter

Abschließend sei noch auf hemmende Neurotransmitter eingegangen, wie die Aminosäuretransmitter GABA und Glycin. GABA wird aus der Glutaminsäure (Produkt des Citratzyklus) in einer durch die Glutaminsäure-Decarboxylase katalysierten Reaktion synthetisiert. Glycin ist eine Aminosäure und muß deshalb nicht extra synthetisiert werden (Kandel et al. 1996). GABA bindet darüber hinaus aber auch an metabotrope Rezeptoren und ist also nicht nur inhibitorisch aktiv.

Beide Transmitter öffnen Cl⁻-Kanäle und unterdrücken damit die elektrische Aktivität, indem sie die postsynaptische Membran polarisiert halten. Die Cl⁻-Konzentration ist außerhalb der Zelle sehr viel höher als innerhalb (extrazellulär 110 mM, intrazellulär 5-15 mM). Aus diesem Grund wird ein Öffnen der Cl⁻-Kanäle die Membran hyperpolarisieren, indem negativ geladene Cl⁻-Ionen in die Zelle eingelassen werden, bis das Membranpotential so negativ ist, daß es dem steilen Cl⁻-Gradienten entgegenwirkt (Alberts et al. 1995).

1.4.3 Acetylcholin

Acetylcholin (ACh), der Essigsäureester des Cholins, wird im Cytoplasma der Axone aus Acetyl-CoA und Cholin durch die Acetyltransferase gebildet. In den frühen dreißiger Jahren des letzten Jahrhunderts wurde es zuerst von Otto Loewi als Transmitter beschrieben, der aus den Endigungen des Vagusnervs am Froschherz austritt (Loewi et al. 1921). Wenn ACh nicht von einem Rezeptor gebunden wird, wird es durch die Acetylcholin-Esterase gespalten. Das Spaltprodukt Cholin wird von dem präsynaptischen Neuron wieder aktiv aufgenommen und erneut für die Acetylcholin-Synthese verwandt.

ACh ist der Neurotransmitter der Motoneurone, d.h. es spielt unter anderem eine Rolle bei der Muskelkontraktion. Hier ist nun dargestellt, wie im allgemeinen eine Muskelkontraktion ausgelöst wird. Bei Anregung einer Muskelzelle durch einen, müssen zur Kontraktion fünf verschiedene Gruppen von Ionenkanälen nacheinander aktiviert werden, und zwar innerhalb weniger Millisekunden. Wenn ein Nervenimpuls die Nervenendigung erreicht und dort die Plasmamembran depolarisiert, öffnen sich vorübergehend Spannungs-kontrollierte Ca²⁺-Kanäle in dieser Membran. Die steigende Ca²⁺-Konzentration im Cytoplasma der Nervenendigung (ca. 1000 mal höher) löst die Ausschüttung von ACh in den synaptischen Spalt aus. ACh bindet postsynaptisch an nikotinische ACh-Rezeptoren, wodurch Kationenkanäle geöffnet werden, Na⁺ einströmt und die postsynaptische Membran lokal depolarisiert. Wenn die postsynaptische Membran der Muskelzelle lokal depolarisiert wird, öffnen sich weitere Na⁺-Kanäle, und es entsteht eine sich selbst fortpflanzende Depolarisation (ein Aktionspotential), die sich über die gesamte Plasmamembran ausbreitet. Die allgemeine Depolarisation der Muskelzellmembran aktiviert spannungs-kontrollierte Ca²⁺-Kanäle in den transversalen-Tubuli (Membranfalten der Plasmamembran).

Von dort wird das Signal über einen kleinen Spalt auf das sarkoplasmatische Reticulum (SR) übertragen, denn die in den T-Tubuli aktivierten Ca^{2+} -Kanäle veranlassen wiederum Ca^{2+} -freisetzende Kanäle des SR sich zu öffnen, um das im SR gespeicherte Ca^{2+} ins Cytoplasma freizusetzen. Der plötzliche Anstieg der Ca^{2+} -Konzentration im Cytoplasma löst dann bei den Myofibrillen der Muskelzellen die Kontraktion aus.

1.5 Der Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* und die Fruchtfliege *Drosophila melanogaster*

Caenorhabditis elegans

Der Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) wurde zuerst 1899 von dem Zoologen Maupas beschrieben und stellt heute einen der bestuntersuchten Organismen dar (Maupas 1899). Dieser im Boden lebende Nematode offeriert dem Forscher für genetische Analysen viele Möglichkeiten, weil er über einen schnellen Lebenszyklus verfügt (ca. dreitägig; 14stündige Embryogenese und 36stündige postembryonale Entwicklung über vier Larvalstadien, L1 bis L4, zum adulten Tier bei +25°C), von geringer Größe (das adulte Tier ist nur 1,5 mm lang) und einfach im Labor zu kultivieren ist. Das adulte Tier hat eine Lebensdauer von 14 bis 20 Tagen.

Die Nachkommen von *C. elegans* sind größtenteils selbstbefruchtende Hermaphroditen (Gonosomen XX). Trotzdem kommen in Populationen noch ca. 0,1 % Männchen (Gonosomen X0) vor, was schließen läßt, daß während der Evolution von Hermaphroditen attraktive Sexualpheromone verloren gegangen sind, denn die Attraktivität zwischen Männchen und Hermaphroditen ist im Vergleich zu anderen Nematoden gering (Chasnov et al. 2002). Ein einziger Hermaphrodit kann 300 bis 350 Nachkommen zeugen, so daß eine schnelle Vermehrung gesichert ist (Riddle et al. 1997). Hermaphroditen produzieren ihre ersten Geschlechtszellen während des vierten Larvalstadiums (L4), die sich dann in Spermien differenzieren. Ungefähr 160 Spermien werden in jedem der beiden Arme der Gonade produziert, die in der Spermatheka gespeichert werden. Im adulten Tier wird die Spermatogenese abgeschaltet und alle weitere Gameten entwickeln sich dann zu Oocyten (Puoti et al. 2001 u. Riddle et al. 1997).

Brenner wurde aufgrund der genannten Eigenschaften auf diesen Organismus aufmerksam und setzte ihn dann gezielt als Modellorganismus ein, um die Entwicklung und das Verhalten dieser Tiere zu studieren (Brenner 1973). Brenner begann dann mit der Rekonstruktion des Nervensystems von *C. elegans* und seine Bemühungen gipfelten 1986 in einem Atlas des Nervensystems vom Nematoden (White et al. 1986). 1998 wurde dann von einem Sequenzierkonsortium die gesamte genomische Sequenz von *C. elegans* veröffentlicht, die über 19 000 Gene umfaßt, so daß *C. elegans* alle erdenklichen Möglichkeiten eines Modellorganismus bietet (*C. elegans* sequencing consortium 1998).

RNAi bei *C. elegans*

Eine der effektivsten Methoden, die biologische Funktion eines Proteins zu bestimmen, ist es, den Phänotyp von Organismen zu untersuchen, die Mutationen in dem Gen besitzen, das für das zu untersuchende Protein kodiert. Die Herstellung solcher Mutationen wird routinemäßig in *C. elegans* durchgeführt, sie ist aber zeitaufwendig. Als Alternativmethode konnte in verschiedenen Organismen gezeigt werden, daß doppelsträngige RNAs (dsRNA) Genexpression in sequenzspezifischer Manier inhibieren können (Hammond et al. 2001). Dieser biologische Prozeß nennt sich RNA-Interferenz (RNAi) und beruht auf post-transkriptionaler Genunterdrückung (Fire et al. 1998, Montgomery et al. 1998). Dabei wird die Transkription eines Genes nicht beeinflusst. Die Genexpression geht aber verloren, weil die mRNA-Moleküle instabil werden.

Die RNAi scheint ein zweistufiger Mechanismus zu sein: Ein Initiationschritt und ein Effektorschritt. In dem ersten Schritt wird in den Organismus hereingebrachte dsRNA in 21 bis 23 Nucleotide lange Führungssequenzen (guide sequences) zerlegt. Diese Führungssequenzen werden in einem zweiten Schritt in einen Nucleasekomplex inkorporiert (RNA induzierter Verstummungskomplex (RISC)). Dieser Komplex zerstört mRNAs, die durch Basenpaarinteraktionen von den Führungssequenzen erkannt werden.

Diese Fähigkeit von dsRNA, eine Genunterdrückung hervorzurufen, ist eine Antwort, die während des Evolutionsprozesses beibehalten worden ist, wodurch ihre biologische Relevanz hervorgehoben wird. Eine häufig vermutete Funktion ist ein allgemeiner Verteidigungsmechanismus gegen nicht erwünschte Nucleinsäuren, z.B. Viren-RNA (Hammond et al. 2001).

Der Pharynx von *C. elegans*

Wie viele im Boden lebende Nematoden ernährt sich *Caenorhabditis elegans* von Bakteriensuspensionen. Die Bakterien werden durch eine neuromuskuläre Röhre von der Mundöffnung in den Darm transportiert, die Pharynx heißt. Der Pharynx (ectodermaler Herkunft) ist eine Muskelpumpe, die beim Nahrungstransport Druck aufbaut, weil der innere Druck des Nematoden größer ist als der der Umgebung (Harris et al. 1957). Darüber hinaus ist der Pharynx mehr als eine einfache Pumpe. Er dient auch der Konzentrierung von Nahrung. Bakterien werden durch ihn posterior in das Lumen des Pharynx transportiert und gleichzeitig die meiste Flüssigkeit, in der sich die Bakterien befanden, ausgestoßen. Es findet also während der Nahrungsaufnahme eine Filtration statt (Avery et al. 2003).

Durch rhythmische Kontraktionen von acht Muskelzellen werden Bakterien in das Lumen eingesaugt, wobei die Muskeln entlang einer anterioren-posterioren Achse liegen. Sie können in drei funktionale Gruppen unterteilt werden. Der sogenannte Corpus besteht aus den Muskeln m1, m2, m3 und m4. Er dient der Aufnahme der Bakterien. Der Isthmus, Muskel m5, bildet den mittleren Teil des Pharynx. Er reguliert den Nahrungsfluß vom Corpus zum terminalen Bulbus. Der hintere Teil des Pharynx, Muskel m6 bis m8, ist der terminale Bulbus, der die Bakterien zermahlt (Riddle et al. 1997) (Abb. 3).

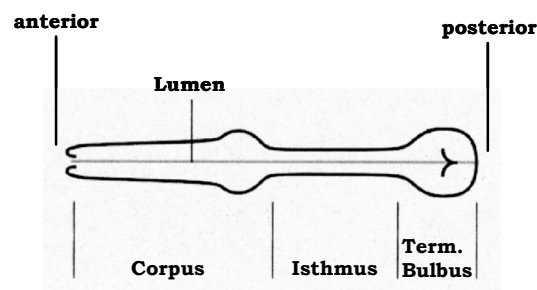


Abb. 3: Schematische Darstellung des Pharynx von *C. elegans*. Der Pharynx ist ein tubuläre Muskelpumpe, die in drei Regionen unterteilt ist: Den Corpus, der anterior mit der Mundöffnung verbunden ist, den Isthmus sowie den terminalen Bulbus, die mit dem Darm am posterioren Ende verbunden sind (nach Avery et al. 2003).

Drosophila melanogaster

Drosophila melanogaster wird seit ca. einem Jahrhundert als Modellorganismus genutzt, da die Fruchtfliege ein einfach zu manipulierendes genetisches System darstellt, das eine Komplexität besitzt, die vergleichbar mit der von Säugetieren ist. Die Fruchtfliege dient zur Untersuchung von Entwicklungs- und zellulären Prozessen, die bei höheren Eukaryoten anzutreffen sind. Seit dem Jahr 2000 ist die genomische Sequenz auch von *Drosophila* entschlüsselt, wobei festgestellt wurde, daß sie ungefähr 13 000 Gene enthält (Adams et al. 2000).

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Wie oben dargelegt, spielen G-Protein-gekoppelte Rezeptoren bei der Signalvermittlung eine tragende Rolle, und zwar bei Evertebraten genauso wie bei Vertebraten. Da es bei Evertebraten zwei prominente Modellorganismen gibt - *D. melanogaster* und *C. elegans* - sind ihre Vorzüge genutzt worden, um die Funktionsweise von Vertretern aus der Gruppe der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren zu untersuchen.

Anhand von *C. elegans* soll die muscarinische Neurotransmission dargestellt werden, d.h. ein Verhalten ausgemacht werden, daß durch solche Art von Neurotransmission hervorgerufen wird. Außerdem ist der Rezeptor zu bestimmen, der sich für das Verhalten verantwortlich zeigt, sowie seine Verteilung und genaue Wirkungsweise im Organismus zu klären. Desweiteren soll ein metabotroper Rezeptor, der aufgrund von Sequenzanalysen bislang dem octopaminergen Spektrum zugeordnet worden ist, pharmakologisch klassifiziert und sein Expressionsmuster bestimmt sowie mögliche von ihm hervorgerufene Verhaltensweisen untersucht werden.

Bei *D. melanogaster* ist weiterhin zu klären, welcher der bisher postulierten octopaminergen Rezeptoren wirklich in diese Klasse fällt. Ein aussichtsreicher Kandidat soll experimentell untersucht werden, ob er ein pharmakologisches Profil ausweist, das einem Octopaminrezeptor entspricht. Abschließend sind seine Expressionsorte zu klären, um Einblicke in die Funktionsweise dieses Rezeptors zu gewinnen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

Alle Verbrauchsmaterialien stammen von der Firma Sarstedt (D-51582 Nümbrecht), mit Ausnahme der Fliegengläser und Stopfen, die von der Firma Klühspieß (D-97282 Retzstedt) bezogen worden sind.

2.1.1 Verwendete Laborgeräte

Fluorometer FluoroCount (Canberra-Packard, D-63303 Dreieich)

Gel-Dokumentation (MWG-Biotech, D-85560 Ebersberg)

Hybridisierungsöfen APT Line (Whatman Biometra, D-37079 Göttingen)

Inverses Mikroskop (Leica, D-64625 Bensheim)

Konfokales Laserscannermikroskop DM IRBE (Leica, D-64625 Bensheim)

Kryostat HM 500 OM (WPI, D-10999 Berlin)

Laborfuge 400R (Kendro Laboratory Products, D-63450 Hanau)

PCR-Maschine RoboCycler 40 (Stratagene NL-1101 CB Amsterdam Zuidoost)

pH-Meter pH 523 (WTW Meß- und Analysegeräte, A-1110 Wien)

Photometer Biophotometer (Eppendorf AG, D-22339 Hamburg)

Radioisotopenzähler (Canberra-Packard, D-63303 Dreieich)

Schüttelinkubator Unimax 1010 (Heidolph-Instruments, D-93309 Kehlheim)

Sicherheitswerkbank Microflow Biological safety cabinet (Nunc, D-65083 Wiesbaden)

Tischzentrifuge 5415 D (Eppendorf AG, D-22339 Hamburg)

Ultrazentrifuge L-80 (Beckman Instruments, D-80807 München)

UV-Tisch Fluo_Link (Whatman Biometra, D-37079 Göttingen)

Wasserbad Thermostat 2761 (Eppendorf AG, D-22339 Hamburg)

Wasserbad mgw RM6 (Lauda Dr. R. Wobser, D-97922 Lauda-Königshofen)

Zellkulturschrank (Kendro Laboratory Products, D-63450 Hanau)

2.1.2 Chemikalien, Lösungen und molekularbiologischer Bedarf

Die Chemikalien sind alle von den Firmen Roche Deutschland (D-79639 Grenzach-Wyhlen), Sigma-Aldrich Chemie (D-82041 Deisenhofen) und Invitrogen (D-76131 Karlsruhe) bezogen worden. Der molekularbiologische Bedarf stammt von MBI fermentas (D-68789 St. Leon-Rot). Bei Abweichungen wird gesondert auf den Hersteller hingewiesen.

Die Enzymaktivitäten für die Polymerasen sind in Weiss-Einheiten angegeben (eine Unit entspricht der Menge an Enzym, die erforderlich ist, um 10 nmol dNTP's in eine saure unlösliche Form zu überführen, und zwar innerhalb von 30 Minuten bei +37°C).

2.1.3 Nahrungsbrei für *Drosophila melanogaster*

Ansatz für 3 Liter:

27 g Select Agar (Invitrogen) in kochendem A. bidest. lösen. In der Zwischenzeit 200 g Weizenmehl, 140 g Zucker und 50 g Trockenhefe in 2 Liter A. bidest. lösen. Wenn die Agarlösung kocht, wird nach und nach unter ständigem Rühren die Mehl-Zucker-Hefe-Lösung zugegeben. Nach 5 Minuten mäßigem Kochen die Hitze reduzieren und 10 ml Propionsäure sowie eine Spatelspitze Nipagin hinzugeben. Das noch heiße Medium danach in Fliegengläser füllen und auf Raumtemperatur abkühlen lassen. Anschließend wird ein Klecks frischer Hefe, die mit A. bidest. zu einer dicken Suspension verrührt wurde, in die Gläser gegeben. Dann können die Gläser mit einem Stopfen verschlossen werden.

2.1.4 NGM-Agar-Platten für *Caenorhabditis elegans* (Epstein et al. 1995)

3 g NaCl, 2,5 g Pepton aus Casein (pankreatisch verdaut, Merck) und 17 g Select Agar (Invitrogen) werden in 973 ml A. bidest. gelöst und anschließend bei +121°C für 15 Minuten autoklaviert. Danach auf +56°C im Wasserbad abkühlen lassen und folgende Lösungen unter sterilen Bedingungen hinzugeben:

+ 1 ml Lsg. A
+ 0,5 ml Lsg. B
+ 1 ml Lsg. C
+ 25 ml Lsg. D

(Nach jeder Zugabe vorsichtig schütteln)

Lsg. A 0,1 g Cholesterol in 20 ml EtOH abs.
Lsg. B 1 M CaCl₂-Lsg. (autoklaviert)
Lsg. C 0,8 M MgSO₄-Lsg (autoklaviert)
Lsg. D 1 M KH₂PO₄, pH 6,0 (pH-Wert mit konzentrierter KOH einstellen)

Die Platten werden nach dem Gießen abgeflammt und auf Raumtemperatur gekühlt. Danach wird auf den Platten der *E. coli* Stamm OP50 ausplattiert und die Platten getrocknet. Anschließend können die Platten mit *C. elegans* besetzt werden.

2.1.5 Bakterienmedien und Bakterienstämme

Die unten genannten Bakterienmedien sind Fertigmedien (außer SOB-Medium), die in A. bidest. gelöst und bei +121°C für 15 Minuten autoklaviert worden sind.

LB Agar (Lennox L Agar, 32,0 g/l)
LB Broth Base (Lennox L Broth Base, 20,0 g/l)
Terrific Broth (47,0 g/l)

SOB-Medium:

In 950 ml A. bidest. werden 20g Pepton aus Casein, 5 g Select Yeast Extract (Invitrogen) und 0,5 g NaCl gelöst. Dann werden 10 ml einer 250 mM KCl-Lösung hinzugefügt. Der pH-Wert von 7,0 wird danach mit 5 N NaOH eingestellt. Anschließend auf einen Liter mit A. bidest. auffüllen. Sterilisieren bei +121°C für 15 Minuten. Vor Gebrauch 5 ml sterile 2 M MgCl₂-Lösung dazugeben.

Selektionsplatten:

LB Agar wird nach Angaben des Herstellers zubereitet, autoklaviert und im Wasserbad auf +56°C heruntergekühlt. Vor dem Gießen wird die Ampicillin-Stammlösung (50 mg Ampicillin Natriumsalz (Roth) pro ml A. bidest., sterilfiltriert) hinzugegeben (Endkonzentration 100 µg/ml, bzw. 2 µl Ampicillin-Stammlösung pro ml LB Agar).

E. coli-Stamm OP50 :

Uracil-defizienter, auxoheterotropher Stamm; wächst gemäßigt, so daß die Nematoden in ihrem Wachstum nicht gehemmt sind (bezogen vom Caenorhabditis Genetic Center (CGC), University of Minnesota, Minneapolis, USA).

E. coli-Stamm DH5α:

Rekombinationsdefizienter, im Wachstum gehemmter Stamm für das Ausplattieren und das Wachstum von Plasmiden und Cosmiden, bezogen von Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ), D-38124 Braunschweig.

E. coli-Stamm HT115 (DE3):

RNase III-defizienter *E. coli* Stamm (RNase III normalerweise degeneriert die Mehrheit der dsRNAs). Das RNase III-Gen ist unterbrochen von einem Tn10 Transposon, das eine Tetracyclinresistenz trägt, bezogen vom Caenorhabditis Genetic Center (CGC), University of Minnesota, Minneapolis, USA.

2.1.6 Oligonukleotide

PCR-Oligonukleotide sollten normalerweise eine Länge von 18-30 Basen haben und einen Anteil von 40 bis 60 % Guanin und Cytosin. Der Oligonukleotid sollte nicht mehr als vier gleiche Basen nacheinander enthalten, um Fehlhybridisierungen und Leserasterverschiebungen (frameshifts) zu vermeiden. Die Schmelztemperatur sollte +55 bis +80°C betragen, um ausreichend hohe Annealingtemperaturen zu erlauben. Die Oligonukleotide sollten keine internen Sekundärstrukturen wie Haarnadeln (hair pins) bilden, weil diese die Wahrscheinlichkeit des Hybridisierens mit der Template-DNA reduzieren.

Die Primer dürfen nicht miteinander hybridisieren und sollten eine möglichst geringe Komplementarität an ihren 3'-Enden besitzen; der eine Primer kann sonst als Template für den anderen dienen (Oligonukleotidsequenzen siehe Anhang, Mülhardt 2002).

2.1.7 Puffer und Lösungen

Acetylierungslösung:

In 250 ml A. bidest. werden 4,63 g Triethanolamin gelöst und danach autoklaviert. Vor Gebrauch 625 µl Essigsäureanhydrid dazu geben.

Antikörper-Fixierlösung:

30 ml	gesättigte wäßrige Picrinsäure
10 ml	25%iges Glutaraldehyd
0,2 ml	100%ige Essigsäure
1 %	Natriummetabisulfit

Assay-Puffer (pH 10,4):

100 mM	Glycin
1 mM	MgCl ₂
1 mM	ZnCl ₂

pH-Wert mit NaOH einstellen. Nicht autoklavieren..

Biotinbindungspuffer:

10 mM	Tris/HCl pH 7,5
1 mM	EDTA
2 M	NaCl

Blockierlösung:

Maleinsäurepuffer + 0,5 % I-Block (Tropix)

5x cDNA-Synthesepuffer:

250 mM	Tris/HCl pH 8,3
30 mM	MgCl ₂

cDNA-Waschpuffer:

50 mM	Tris/HCl pH 8,3
75 mM	KCl

Fixierlösung:

150 mM	NaCl
100 mM	Na ₂ HPO ₄

Autoklavieren. Vor Gebrauch 4 % Paraformaldehyd bei +50°C bis +60°C lösen und anschließend sterilfiltrieren (0,2 µm). Danach pH-Wert kontrollieren (sollte bei pH 9,5 sein).

M9-Puffer:

3 g KH_2PO_4 , 6 g Na_2HPO_4 , 5g NaCl, 1 ml Lösung C ad 1 l A. bidest.

Maleinsäurepuffer (pH 7,5):

23,31 g Maleinsäure

17,53 g NaCl

16 g NaOH Pellets

Alles gleichzeitig in ca. 1,9 Liter A. bidest. lösen, pH-Wert auf 7,5 einstellen und auf zwei Liter auffüllen.

mRNA-Bindungspuffer:

20 mM Tris/HCl pH 7,5

2 mM EDTA

1 M LiCl

mRNA-Waschpuffer:

10 mM Tris/HCl pH 7,5

1 mM EDTA

0,15 mM LiCl

4-MUP-Stammlösung:

10 mM 4-Methylumbelliferylphosphat

PBS (pH7,4):

140 mM NaCl

2,7 mM KCl

10 mM Na_2HPO_4

1,8 mM KH_2PO_4

pH-Wert mit NaOH einstellen. Autoklavieren.

PBS (pH 7,4) + 0,3 % Triton X-100:

140 mM NaCl

2,7 mM KCl

10 mM Na_2HPO_4

1,8 mM KH_2PO_4

pH-Wert mit NaOH einstellen. Autoklavieren. Danach Triton X-100 dazu geben.

PBS-S (pH 7,5):

150 mM NaCl

100 mM Na_2HPO_4

? mM KH_2PO_4 (variabel)

Zuerst wird die basische Komponente (Na_2HPO_4) gelöst und durch Zugabe von KH_2PO_4 der pH-Wert eingestellt.

PBS-SB (pH 7,5):

PBS-S + 1 % I-Block (Tropix)

PBS-SN (pH 7,5):

PBS-S + 0,5 % Natriumborohydrat.

PBS-SX (pH 7,5):
PBS-S + 0,3 % Triton X-100.

2x Phosphatpuffer:
50 mM HEPES (pH 7,05)
1,26 mM Na₂HPO₄
140 mM NaCl
Sterilfiltrieren (0,2 µm). Bei -20°C lagern.

Radioligandenpuffer:
50 mM Tris/HCl (pH 7,2)
100 mM NaCl
5 mM MgSO₄
0,2 mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)

Reaktionspuffer:
100 mM Tris/HCl pH9,5
100 mM NaCl
50 mM MgCl₂
Sterilfiltrieren (0,2 µm). Immer frisch ansetzen.

20x SSC (pH 7,0):
3 M NaCl
0,3 M Natriumcitrat
Autoklavieren. Unterschiedliche Konzentrationen durch Verdünnung herstellen.

STE-Puffer:
0,1 M NaCl
10 mM Tris/HCl pH 8,0
1 mM EDTA pH 8,0

TFB1:
30 mM Kaliumacetat
10 mM CaCl₂
50 mM MnCl₂
100 mM RbCl
15 % Glycerol
pH-Wert auf 5,8 mit 1 M Essigsäure einstellen. Sterilfiltrieren (0,2 µm) und bei Raumtemperatur lagern.

TFB2:
10 mM MOPS, pH 6,5
75 mM CaCl₂
10 mM RbCl
15 % Glycerol
pH-Wert auf 6,5 mit 1 M KOH einstellen. Sterilfiltrieren (0,2 µm) und bei Raumtemperatur lagern.

TE-Puffer:
10 mM Tris/HCl pH 7,5
1 mM EDTA pH 8,0

2.1.8 Zelllinien

Zelllinie: 293

Zelltyp: Humane, embryonale Nierenzelllinie

Ursprung: Humane, primäre, embryonale Nierenzellen wurden mit dem Adenovirus-5 transformiert (Graham et al. 1977)
bezogen von Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ), D-38124 Braunschweig

Zelllinie: Schneider-2

Zelltyp: Insektenzelllinie (*D. melanogaster*)

Ursprung: Etabliert aus dem späten Embryonalstadium von *D. melanogaster* 1972 (Schneider et al. 1972)
bezogen von Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ), D-38124 Braunschweig

2.2 Methoden

2.2.1 Haltung der Versuchstiere

Für die Experimente wurde der Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* (Laborstamm Bristol N21) als Wildtyp eingesetzt. Außerdem sind verschiedene andere Stämme verwendet worden (siehe Tab. 1). Die Tiere sind bei Raumtemperatur auf NGM-Agar-Platten mit dem Bakterium *Escherichia coli* als Nahrung gehalten und mehrmals in der Woche umgesetzt worden. Weitere Methoden, die die Haltung betreffen (z.B. Einfrieren und Auftauen der Tiere), sind Epstein et al. (1995) zu entnehmen.

Tab. 1: Folgende *C. elegans*-Stämme sind in dieser Arbeit verwendet worden:

Stamm	Genotyp	Bezugsort
CB928	unc-31(e928) IV	CGC
CB1091	unc-13(e1091) I	CGC
DA1774	ser(ad1774) I	CGC
JT73	itr-1(sa73) IV	CGC
KP1097	dgk-1(nu62) X	CGC
KR1787	unc-13(e51) I	CGC
MJ563	tpa-1(k530) IV	CGC
MT1434	egl-30(n686) I	CGC
MT2426	goa-1(n1134) I	CGC
NL594	gpa-12(pk322) X	CGC
PS2627	dgk-1(sy428) X	CGC
RB756	gar-2(ok520) III	CGC
RM2221	egl-8(md1971) V	CGC
VC127	pkc-2(ok328) X	CGC
VU78	gar-3 Genotyp unbekannt	JD

CGC Caenorhabditis Genetic Center, University of Minnesota, Minneapolis, USA

JD Joseph Dent, McGill University, Montreal, Canada

Der zweite verwendete Modellorganismus war *Drosophila melanogaster* (Laborstamm Canton-S; bezogen vom Bloomington, Drosophila Stock Center, Indiana, USA). Die Fruchtfliege wurde in Fliegengläsern bei Raumtemperatur gehalten. In diesen Gläsern befand sich zur Ernährung der Fliegen Nahrungsbrei. Sie wurden je nach Bedarf in neue Kulturgläser überführt.

2.2.2 Reverse Transkription (cDNA-Synthese)

Die zur reversen Transkription nötige Total-RNA wurde mit Hilfe von Perfect RNA, Eukaryotic der Firma Eppendorf isoliert. Es wurde nach Angaben des Herstellers verfahren.

C. elegans

Die Nematoden werden vorbereitend für die reverse Transkription mit M9-Puffer von den Platten abgespült und in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß aufgenommen. Die Tiere werden mehrmals mit M9-Puffer gewaschen, um die Futterbakterien zu entfernen. Der Überstand an M9-Puffer wird danach verworfen und die Tiere in flüssigen Stickstoff getaucht. Es folgt der mechanische Aufschluß mit dem Glashomogenisator (2 ml).

Der Total-RNA-Gehalt wird dann photometrisch bestimmt und 0,1 bis 5 µg Total-RNA für die reverse Transkription eingesetzt. Die restliche Total-RNA dann mit EtOH abs. fällen und bei -70°C aufbewahren. Zu der Total-RNA werden 20 pmol Oligo (dT) Primer gegeben und der Gesamtansatz mit A. bidest. auf 11 µl aufgefüllt. Das ganze wird dann für 5 Minuten bei +70°C inkubiert, um die RNA zu linearisieren mit anschließendem Abkühlen auf Eis.

Dann wird in der unten aufgeführten Reihenfolge folgendes zugegeben:

4 µl 5x Reaktionspuffer (liegt reversen Transkriptase bei)
2 µl DTT (0,1 M)
1 µl Nucleotide (dNTP's, 10 mM Stammlösung, Endkonzentration 1,0 mM)
1 µl Rekombinanter Ribonuclease-Inhibitor „RNaseOUT (40 u/µl, Invitrogen)
mit A. bidest. auf 19 µl auffüllen.

Der Ansatz wird vorsichtig durchmischt und für 2 Minuten bei +42°C inkubiert. Dann wird 1 µl RNase H⁺ reverse Transkriptase Superscript II (200 u/µl) hinzugegeben und vorsichtig durch Pipettieren durchmischt. Es folgt eine 50minütige Inkubation bei +42°C. Die Reaktion wird inaktiviert durch Erhitzen des Ansatzes auf +70°C für 15 Minuten. Die fertige cDNA kann dann bei -20°C eingefroren, um sie später für eine PCR einzusetzen, oder gleich verwendet werden.

D. melanogaster (Festphasen-cDNA-Synthese, Schramm et al. 2000)

Die Fliegen werden auf Eis gestellt, um sie zu sedieren und anschließend werden sie mechanisch im Glashomogenisator aufgeschlossen. Aus der dann isolierten Total-RNA wird mit Hilfe von Avidin-Polystyrenpartikeln (Kisker), an die ein biotinylierter Oligo (dT) Primer gekoppelt wurde, die mRNA isoliert.

Die Kopplung des Oligo (dT) Primers an die Partikel erfolgt unter folgenden Bedingungen für 30 Minuten bei +37°C:

50 µl Avidin-Polystyrenpartikel (1% w/v) (Kisker, D-48543 Steinfurt)
50 µl Oligo (dT) Primer I
100 µl 2x Biotinbindungspuffer

Die mit dem Oligo (dT) Primer I gekoppelten Avidin-Polystyrenpartikel werden mit sterilem TE-Puffer zweimal gewaschen. Anschließend werden die Partikel in 2x mRNA-Bindungspuffer aufgenommen und die in A. bidest. gelöste Total-RNA hinzugegeben. Den Ansatz für 15 Minuten bei +37°C inkubieren. Die Total-RNA wurde vor der Bindung an die Polystyrenpartikel für 10 Minuten bei +65°C linearisiert.

Nach der Bindung der mRNA an die Partikel werden diese zweimal mit mRNA-Waschpuffer und zum Schluß noch einmal mit cDNA-Waschpuffer gewaschen. Direkt im Anschluß an die mRNA-Isolation erfolgt die cDNA-Synthese. Die gewaschenen Avidin-Polystyrenpartikel samt gebundener mRNA werden abzentrifugiert, der cDNA-Waschpuffer entfernt und die cDNA-Syntheselösung in der unten angegebenen Reihenfolge hinzugegeben.

cDNA-Syntheselösung

4 µl 5x cDNA-Synthesepuffer
2 µl DTT (0,1 M)
2 µl Nucleotide (dNTP's, 10 mM Stammlösung, Endkonzentration 1,0 mM)
0,2 µl BSA (10 mg/ml)
2 µl CapFinder CFBIrG
0,75 µl RNase H⁺ reverse Transkriptase „Superscript II (200 u / µl, Invitrogen)“
0,25 µl Rekombinanter Ribonuclease-Inhibitor „RNaseOUT (40 u/µl, Invitrogen)“
1 µl MnCl₂ (40 mM)
7,8 µl A. bidest.

Der Gesamtansatz inkubiert anschließend für 45 Minuten bei +42°C. Die Partikel samt gebundener cDNA zweimal in TE-Puffer waschen und in TE-Puffer bei +4°C im Kühlschrank lagern oder für eine PCR verwenden.

Es liegt nun cDNA mit definierten Enden vor, denn bei der reversen Transkription hat die reverse Transkriptase Cytosin-Überhänge generiert, an die der CapFinder CFBIrG gebunden hat (template switch). Der CapFinder CFBIrG Primer und der Oligo (dT) Primer I besitzen jeweils Bindungsstellen für einen weiteren Primer – CapFinder CFBII und Oligo (dT) Primer II – mit denen die erhaltenen Transkripte hochamplifiziert werden können. Nach diesem Schritt wird eine PCR mit spezifischen Primern für das jeweilige Gen durchgeführt.

2.2.3 Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction (PCR))

Für die PCR wurde folgender Ansatz gewählt:

5 µl	10x Taq Puffer mit 15 mM Mg ²⁺
1 µl	Nucleotide (dNTP's, 25 mM pro Nucleotid)
1 µl	Sense Oligonukleotidprimer (10 pmol)
1 µl	Antisense Oligonukleotidprimer (10 pmol)
1 µl	Ausgangs-DNA
0,2 µl	Taq DNA Polymerase (5 u/µl), eppendorf
40,8 µl	A. bidest.

Für die PCR wurde folgendes Standardprogramm gewählt:

	+95°C (Denaturierung)	+55°C (Annealing)	+72°C (Elongation)
1. Zyklus (1x)	1 Min.	0,30 Min.	1,30 Min.
2. Zyklus (30x)	0,25 Min.	0,30 Min.	1,30 Min.
3. Zyklus (1x)	0,25 Min.	0,30 Min.	5,00 Min.

2.2.4 Klonierung

Eine Klonierung ist die Einführung eines DNA-Fragmentes in einen Vektor, so daß die DNA massenhaft vermehrt werden kann. Vor der methodischen Neuerung der PCR war eine Klonierung unabdingbar, um DNA für weitere Anwendungen zu vermehren. Die Klonierung hat den Vorteil, daß ein Klon gegenüber einem PCR-Fragment stabiler und besser zu handhaben ist. Außerdem besitzen unterschiedliche Vektoren verschiedenste zusätzliche Eigenschaften für weitere Anwendungsmöglichkeiten.

Kloniert wird nach der Standardmethode von Sambrook et al. (1989) und Watson et al. (1993) in die Vektoren pcDNA3.1/Zeo (Invitrogen), pSPORT1 (Invitrogen) und pPD95.77 (Andrew Fire, Carnegie Institution of Washington, Department of Embryology, Baltimore, USA).

Die Klonierung von PCR-Produkten wird im allgemeinen folgendermaßen durchgeführt: An den 5'-Enden der beiden verwendeten Oligonukleotidprimer befinden sich vorher definiert Restriktionsstellen, die durch PCR bei dem PCR-Produkt eingeführt werden. Die Schnittstellen sind so gewählt, daß sie ebenfalls im Klonierungsvektor vorliegen, aber nicht intern im Fragment. Das PCR-Fragment und der Vektor werden mit den entsprechenden Enzymen geschnitten und danach ligiert.

TA-Klonierung

Wenn eine PCR mit einer Taq-DNA-Polymerase oder einer DNA-Polymerase durchgeführt worden ist, die keine Korrekturaktivität besitzt, dann können die Adenosin-Überhänge für die sogenannte TA-Klonierung genutzt werden (Mülhardt et al. 2002). Hierzu wurde auf das „PCR Cloning Kit (Qiagen)“ zurückgegriffen. Der hierbei mitgelieferte linearisierte Klonierungsvektor besitzt einen Thymin-Überhang an jedem Ende, welcher mit dem Adenosin-Überhang des DNA-Fragmentes hybridisiert. Nur besitzen solche TA-Klonierungsvektoren leider nicht alle Eigenschaften, die man sich für weitere Anwendungen wünscht. Aber wenn man z.B. schnell und einfach ein PCR-Produkt aus Stabilitätsgründen klonieren will, dann ist diese Anwendung sicherlich die Methode der Wahl.

2.2.5 Herstellung kompetenter Zellen und Transformation (Doyle et al. 1996)

Herstellung kompetenter Zellen

Eine einzelne Kolonie DH5 α -Bakterien wird von einer LB-Platte mit sterilisierten Zahnstochern aus Holz gepickt und in 2,5 ml LB Broth Base Medium über Nacht bei +37°C schüttelnd inkubiert. Mit der gesamten Übernachtskultur werden 250 ml LB Medium, das 20 mM MgSO₄ enthält, angeimpft. Die Bakterien werden dann in einem sterilen 1l Erlenmeyerkolben bei ebenfalls +37°C geschüttelt, und zwar bis die Kultur eine OD_{595nm} von 0,4 bis 0,6 aufweist (typischerweise nach fünf bis sechs Stunden). Die Zellen werden dann mit 4500x g für fünf Minuten bei +4°C abzentrifugiert. Alle weiteren Arbeitsschritte werden auf Eis durchgeführt.

Den Niederschlag vorsichtig in 100 ml eiskaltem TFB1 resuspendieren (0,4 Volumen der Ausgangskultur) und die Zellen für 5 Minuten auf Eis inkubieren. Danach die Zellen wieder mit 4500x g für 5 Minuten bei +4°C abzentrifugieren und in 10 ml TFB2 (1/25 der Ausgangskultur) aufnehmen. Die Zellen im Anschluß für 15 bis 60 Minuten auf Eis inkubieren und anschließend aliquotieren (200 μ l/Reagenzgefäß). Die Zellen werden dann mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C gelagert. Die kompetenten Zellen sind so für drei Monate haltbar.

Transformation

Kompetente Zellen werden auf Eis langsam aufgetaut. Jeweils 100 μ l von den aufgetauten kompetenten Zellen werden für eine Transformation in ein steriles Reagenzgefäß überführt. 1 μ l eines Ligationsansatzes wird hinzugeben. Beides vorsichtig mit der Pipettenspitze vermengen und 30 Minuten auf Eis inkubieren lassen. Das Reagenzgefäß anschließend im Wasserbad für 90 Sekunden bei +42°C erhitzen. Danach den Ansatz 2 Minuten auf Eis abkühlen lassen, anschließend 500 μ l SOB-Medium zugeben und 60 Minuten bei +37°C schüttelnd inkubieren. Nach der Inkubation werden die Zellen abzentrifugieren und so viel Überstand entfernen, daß 100 μ l bis 200 μ l auf Ampicillin-Selektionsplatten ausplattiert werden können. Die Platten trocknen lassen und über Nacht bei +37°C inkubieren.

2.2.6 Plasmidpräparation

Nachdem die Selektionsplatten über Nacht inkubiert haben, werden einzelne Kolonien gepickt und mit ihnen eine Übertagkultur angelegt. Dazu werden sie in 2,5 ml LB Broth Base Medium samt Ampicillin (100 µg/ml) aufgenommen und ca. acht Stunden bei +37°C geschüttelt. Die Übertagkulturen werden zu Plasmidpräparationen eingesetzt und diese danach mit Restriktionsenzymen verdaut. Bei einer sich anschließenden Gelkontrolle kann dann festgestellt werden, ob der Klon das gewünschte DNA-Fragment enthält.

Mit den positiven Übertagkulturen wird dann eine Übernachtskultur angelegt. Ebenfalls wird ein Selektionsdruck mit 100 µg/ml Ampicillin aufrechterhalten. Am nächsten Tag kann eine Plasmidpräparation im größeren Maßstab durchgeführt werden, um höhere Plasmidquantitäten für weitere Anwendungen zu erhalten. Für die Plasmidpräparationen wurde das „Jetstar Plasmid Purification System (Genomed)“ verwendet und nach den Angaben des Herstellers verfahren.

2.2.7 Sequenzierung

Wenn ein Klon als Plasmidpräparation vorliegt und es wichtig ist, seine gesamte Sequenz zu kennen, für z.B. Sequenzabgleiche, ist eine Sequenzierung vonnöten. Es wurde das gelgestützte DNA-Sequenzierungsverfahren nach Sanger verwendet: Das Didesoxyverfahren (auch Kettenabbruchverfahren, Terminatorverfahren), was auf der enzymatisch katalysierten Synthese einer Population von basenspezifisch terminierten DNA-Fragmenten basiert, die nach ihrer Größe gelelektrophoretisch getrennt werden können (Lottspeich et al. 1998).

Dazu wird eine Sequenzierreaktion angesetzt:

4 µl BigDye
1 µg DNA
1 µl Primer
mit A. bidest. auf 20 µl auffüllen

BigDye enthält alle für die Sequenzierreaktion notwendigen Komponenten, mit Ausnahme der DNA und des Primers. Es wird als BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) geliefert. Die Sequenzierreaktion läuft dann während folgendem PCR-Programm ab:

	+96°C (Denaturierung)	+50°C (Annealing)	+40°C (Elongation)
25 Zyklen	10 Sekunden	5 Sekunden	4 Minuten

Nach der PCR erfolgt eine Reinigung der Ansätze durch Ethanol-fällung, um nicht eingebaute markierte Didesoxynucleotide zu entfernen, damit es zu keinem starken Hintergrund kommt.

Die PCR-Reaktion wird dazu in ein Reagenzgefäß überführt mit 80 µl A. bidest., 10 µl 3 M Natriumacetat pH 4,6 und 250 µl EtOH abs. versetzt und sofort 15 Minuten bei 16 100x g zentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen und der Niederschlag mit 70%igem Ethanol gewaschen. Danach den Ansatz nochmals 5 Minuten bei 16 100x g zentrifugieren. Den Überstand wieder verwerfen. Es wird dann erneut zentrifugiert und danach der restliche Alkohol abgesaugt. Den Niederschlag dann für 10 Minuten bei +37°C trocknen. Die Proben können dann bei -20°C eingefroren oder zum Sequenzieren abgeben werden. Sequenziert wurden die Proben am Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin, Hamburg. Dort kam der DNA-Sequencer ABI Prism 377 zum Einsatz.

2.2.8 RNA-Interferenz (RNAi) bei *C. elegans*

Timmons et al. (1998 u. 2001) beschrieben zuerst, daß RNAi bei *C. elegans* durch Ingestion von *E. coli*-Bakterien, die dsRNA exprimieren, möglich ist. Durch RNAi beeinflusste Tiere zeigten dabei einen Phänotyp, der vergleichbar mit dem einer Mutante war, die in dem Gen durch Mutation einen Funktionsverlust besaß. Damit erleichtert sich die Anwendung der RNAi um etliches, wenn nicht mehr dsRNA injiziert werden muß.

Für die RNAi-Experimente wird ein Vektor gewählt, dessen Kasette von Restriktionsspaltsstellen vom T7 Bakteriophagenpromotoren flankiert ist (von pSport 1 (Invitrogen) abgeleiteter Vektor, selbst hergestellt). Dort hinein wird ein Gen kloniert, was unterdrückt werden soll. Dieses Konstrukt wird danach in den *E. coli* Bakterienstamm HT115 transformiert.

Des Weiteren wird nach Kamath et al. (2000) vorgegangen. Dazu transformierte Bakterien auf Tetracyclin (Tetracyclin-Stammlösung 5 mg/ml Ethanol abs.; Endkonzentration 12,5 µg/ml, bzw. 2,5 µl Stammlösung/ml NGM, Invitrogen) enthaltenen Selektionsplatten über Nacht bei +37°C inkubieren. Danach werden Kolonien gepickt und in 1 ml LB Broth Base Medium für 8 Stunden hochgezogen. Anschließend werden sie auf NGM Selektionsplatten mit 1 mM IPTG und 50 µg/ml Ampicillin ausplattiert. Die beimpften Platten werden bei Raumtemperatur getrocknet. Die Induktion erfolgt über Nacht ebenfalls bei Raumtemperatur. Erst danach werden die Platten mit *C. elegans* besetzt. Nach ein bis zwei Tagen ist ein veränderter Phänotyp am Verhalten zu erkennen.

2.2.9 *In-situ*-Hybridisierung bei *D. melanogaster*

Mit der *in-situ*-Hybridisierung wird RNA vor Ort (*in situ*) in der Zelle nachgewiesen. Es ist also möglich, die gewebs- oder zellspezifische Expression eines Gens nachzuweisen. Dafür benötigt man ein Präparat (Gewebedünnschnitte) und eine markierte RNA-Sonde.

Gewebedünnschnitte

Die Gewebe müssen möglichst zügig präpariert und danach in „Tissue-Tek (O.C.T.) (Sakura)“ eingebettet werden. Anschließend muß das Präparat sofort, in dem durch flüssigen Stickstoff auf -40°C gekühlten Kühlvermittler Isopentan, eingefroren werden. Es kann so bei -70°C zwei bis drei Wochen gelagert werden oder aber mit Hilfe des Kryostaten in 10 µm dicke Schnitte zerlegt werden. Diese Dünnschnitte werden mit Objektträgern (Superfrost Plus, Menzel-Gläser) aufgenommen und luftgetrocknet (20 Minuten bis 1 Stunde). Anschließend können die Schnitte bei -70°C gelagert oder direkt weiterverarbeitet werden.

RNA-Sonden

Einzelsträngige RNA-Sonden erhält man durch run-off in vitro-Transkription von Sequenzen, die vorher in einen Vektor kloniert wurden, der Promotoren der Bakteriophagen SP6 und T7 enthält. Dazu werden DNA-Fragmente in eine Klonierregion kloniert, die eine Kasette von Restriktionsspaltstellen enthält (multiple cloning site). Diese Region ist flankiert von den sogenannten Promotoren. Anschließend wird der rekombinante Vektor entweder direkt am 3'- oder 5'-Ende des DNA-Fragmentes geschnitten, um eine eindeutige Termination der Transkription zu erhalten (run-off transcription). Durch die starke Promotorselektivität und die eindeutige Termination werden gleichartige Transkripte einheitlicher Länge erzeugt. Die geringe Länge der Transkriptionseinheit (200 bis 400 Bp) erlaubt eine vielfache Wiederholung des Transkriptionszyklus, so daß dieser 100 bis 1000fach durchlaufen wird, wodurch man eine hohe Sondenausbeute erhält. Während der Transkription werden markierte Ribonucleotide zugegeben (Digoxigenin-UTP wird an jede 20. bis 25. Position des Transkripts eingebaut, DIG RNA Labeling Mix (Roche)), so daß die entstehenden RNA-Sonden markiert werden. Da der Vektor einen SP6- und einen T7-Promotor in unterschiedlicher Orientierung beidseits der Klonierregion enthält, können komplementäre RNA-Stränge unterschiedlicher Polarität transkribiert werden (sense/antisense-RNA).

Der Syntheseansatz wird mit STE-Puffer auf 50 µl aufgefüllt und mit Hilfe der ProbeQuant G-50 Micro Columns (Amersham Pharmacia) Säulen laut Angaben des Herstellers gereinigt und in Hybridisierungslösung ULTRA^{hyb} (Ambion) aufgenommen. Die Sonden bei -70°C einfrieren (sie sollten nicht älter als 10 Tage sein).

Um die Effektivität der Synthese zu testen, wird von den Sonden aber noch eine Verdünnungsreihe angelegt und diese auf eine Nylonmembran (Hybond-N+ (Amersham Pharmacia)) punktförmig aufgetragen (dotten). Nach dem Antrocknen der Proben wird die Nylonmembran mit UV-Licht bestrahlt, um die RNA kovalent an die Membran zu binden (cross-linking). Eine Bestrahlung mit 120 mJ reicht dazu aus.

Der RNA-Sondennachweis beruht auf der spezifischen Interaktion von Digoxigenin (DIG), das während der Synthese in die RNA eingebaut worden ist, mit einem hochaffinen, DIG-spezifischen Antikörper (Anti-Digoxigenin-AP (Roche)) als Bindungskomponente. Mit dem DIG-System ist die spezifische Detektion von Subpikogramm-Mengen von RNA möglich.

Als Reportergruppe wurde das Markierungsenzym Alkalische Phosphatase (AP) verwendet. Die Alkalische Phosphatase setzt katalytisch optische Substrate um (NBT/BCIP Color Development Substrate (Promega)). Die hohe Spezifität der Detektion und der geringe Hintergrund des DIG-Systems beruht auf der Tatsache, daß Digoxigenin als Naturstoff in Form der Lanatosid-Verbindungen ausschließlich in *Digitalis*-Pflanzen (Fingerhut) vorkommt.

Fixierung, Acetylierung und Prähybridisierung

Die Gewebedünnschnitte werden für mindestens 30 Minuten mit der Fixierlösung behandelt. Anschließend werden die Schnitte dreimal in PBS (pH 7,4) gewaschen. Danach folgt die Acetylierung. Die Lösung für die Acetylierung sollte immer frisch sein. Die Schnitte werden 10 Minuten in dieser Lösung inkubiert. Danach werden die Schnitte dreimal für jeweils 5 Minuten mit PBS (pH 7,4) + Triton X-100 gewaschen. Es folgt die Prähybridisierung, um einen möglichen Hintergrund zu minimieren. Dazu wird die Hybridisierungslösung bei +65°C inkubiert und dann in ihr 500 µg/ml frisch denaturierte, gescherte Heringssperma-DNA aufgenommen (Salmon Testes DNA, Sigma-Aldrich). Von diesem Ansatz werden 80 bis 100 µl pro Objektträger verteilt und diese mit einem Deckglas abgedeckt. Die Gewebsschnitte werden dann in einer feuchten Kammer 1 Stunde bei +65°C inkubiert.

Hybridisierung und Stringenzwaschung

Es schließt sich die Hybridisierung an, die über Nacht ebenfalls bei +65°C im Hybridisierungsofen erfolgt. Die Proben werden vorher bei +80°C für 5 Minuten denaturiert, dann werden 1 bis 2 µl der denaturierten Proben in 100 µl erwärmter Hybridisierungslösung aufgenommen und auf einen Objektträger gegeben. Dieser wird mit einem Objektträger abgedeckt. Inkubiert wird ebenfalls in einer feuchten Kammer. Die Stringenzwaschung schließt sich an, um nicht spezifisch gebundene Sonden zu entfernen. Die Objektträger werden dazu in +65°C warmer 5x SSC-Lösung in den +65°C warmen Hybridisierungsofen gestellt, und zwar so lange, bis die Deckgläser sich lösen. Dann wird mit ebenfalls +65°C warmer 0,2x SSC-Lösung dreimal für 20 Minuten im immer noch +65°C warmen Hybridisierungsofen gewaschen. Es folgt eine letzte Waschung mit 0,2x SSC-Lösung, die Raumtemperatur hat. Zuletzt werden die Objektträger in Maleinsäurepuffer bei Raumtemperatur äquilibriert.

Immunologischer Nachweis

Die Schnitte inkubieren für eine Stunde in der Blockierlösung. Anschließend wird der Anti-Digoxigenin-AP Antikörper 1:1000 mit frischer Blockierlösung verdünnt und davon 100 µl auf jeden Gewebeschnitt gegeben, die Schnitte mit einem Deckglas abgedeckt und in Frischhaltefolie eingewickelt, damit die Verdunstung verhindert wird. Nach der Antikörperinkubation wird dreimal für 15 Minuten mit Maleinsäurepuffer gewaschen. Es folgt eine weitere Waschung mit Reaktionspuffer + 0,1 % Tween 20. Gefärbt wird mit NBT/BCIP auf invertierten Objektträgern, damit keine Kristalle auf den Schnitten ausfallen. Endogene Phosphatasen werden mit Levamisole (100 mM) inhibiert. Die Färbung erfolgt, bis die gewünschte Intensität erreicht ist (mehrere Stunden bis über Nacht). Nachdem die Färbung abgeschlossen ist, werden die Objektträger kurz in PBS (pH 7,4) + 0,1 % Triton X-100 gewaschen und mit Aquatex (Merck) eingedeckelt.

2.2.10 Immunhistologie bei Kryostatschnitten (Monastirioti et al. 1995)

Für den Nachweis von Octopamin mit spezifischen Antikörpern müssen die präparierten Gewebe mit Glutaraldehyd fixiert werden, da der hier verwendete Antikörper (polyklonaler Anti-Octopamine Antikörper, IgG aus Kaninchen, MoBiTec) auf eine Immunisierung mit einem Octopamin-Glutaraldehyd-Carrier zurückgeht.

Fixiert wird für zwei Stunden bei +4°C in der Antikörper-Fixierlösung. Danach werden Gewebsektionen am Kryostaten durchgeführt und das Gewebe auf den Objektträgern in der Antikörper-Fixierlösung postfixiert.

Nach der Fixierung werden die Schnitte fünf- bis sechsmal für jeweils 15 Minuten mit PBS-S waschen. Danach wird mit PBS-SN für 20 bis 30 Minuten reduziert. Anschließend werden die Schnitte zweimal für jeweils 20 Minuten mit PBS-S und zweimal für 30 Minuten mit PBS-SX gewaschen. Vor der Antikörperzugabe wird eine Stunde bei Raumtemperatur mit PBS-SB blockiert. Den primären Antikörper (Anti-Octopamin) mit PBS-SB + 0,3 % Triton X-100 verdünnen (1:500) und hiervon jeweils ca. 100 µl auf einen Objektträger geben. Die Objektträger danach mit einem Deckglas bedecken und in eine feuchte Kammer geben. Die Inkubation erfolgt für 1 bis 2 Stunden bei Raumtemperatur.

Nach dieser Inkubation mit PBS-X sechsmal für jeweils 20 Minuten waschen und den sekundären Antikörper (monoklonaler Anti-Kaninchen IgG, AP-markiert, Sigma-Aldrich), 1:1000 mit PBS-SB + 0,3 % Triton X-100 verdünnt, für eine Stunde auf die Schnitte geben. Inkubiert wird wiederum unter Deckgläsern in einer feuchten Kammer.

Nachdem 30 Minuten mit PBS-SX und anschließend nochmal 30 Minuten mit PBS-S gewaschen wird, erfolgt ein Umpuffern für 30 Minuten in Reaktionspuffer. Das Färben der Schnitte erfolgt mit NBT/BCIP (siehe 2.2.9 *In-situ*-Hybridisierung). Die Schnitte nach dem Färben in PBS-SX und abschließend in PBS-S waschen und mit Aquatex (Merck) eindeckeln.

2.2.11 Zellkultur und transiente Transfektion (Chen et al. 1988)

Als Zellkulturmedium für humane Zelllinien wird Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) mit einem D-Glucoseanteil von 1000 mg/l (Invitrogen) eingesetzt, das mit 10 % fetalem Kälberserum (FBS, PAA Laboratories) versetzt wurde. Dem Medium ist zur Vermeidung bakterieller Kontamination als Antibiotikum Gentamycin (Stammlösung 10 mg/ml) zugefügt, und zwar 50 µl Stammlösung auf 10 ml Medium.

Die Zellen werden so bei +37°C und 3 % CO₂ in 75 cm³-Gewebekulturschalen (Nunc) im Zellkulturschrank kultiviert. Zweimal in der Woche werden die Zellen manuell geteilt, und zwar kurz bevor ein Monolayer von adhären Zellen entsteht (ca. 80 % Wachstum). Dazu das alte Medium entfernen und 10 ml neues Medium (auf +37°C erwärmt) hinzugeben. Die adhären Zellen dann mit einer Pipette abspülen und triturieren, damit die Zellverbände geteilt werden. Aus dieser Suspension wird eine Verdünnung (1:10 oder 1:20) mit neuem Medium hergestellt und in eine neue Gewebekulturschale überführt. Nach einer Stunde erfolgt eine optische Kontrolle mit Hilfe eines inversen Mikroskops, ob die Zellen adhären sind.

Die Insektenzelllinie Schneider-2 wird mit Schneider's Drosophila Medium (Invitrogen) kultiviert, das 12 % FBS enthält. Die Zellen wachsen einzeln und nicht adhären sowie befindet sich ein gewisser Teil der Zellen in Suspension. Sie werden bei +27°C und ohne CO₂-Begasung kultiviert.

Transiente Transfektionen werden mit der Calciumphosphatpräzipitation durchgeführt. Dazu werden 5×10^5 Zellen mit 10 ml Medium + 10 % dialysiertem FBS (enthält kein Serotonin mehr) ausplattiert und für 24 bis 48 Stunden kultiviert (das entspricht ein bis zwei Zellteilungen, Zellen sollten eine Dichte von 20 bis 30 % haben). Für diese 10 ml Zellkultur wird ein 1 ml Transfektionsansatz gewählt: 6 µg DNA werden mit A. bidest. auf 375 µl aufgefüllt und 125 µl 1 M CaCl_2 sowie 500 µl 2x Phosphat-Puffer hinzugegeben. Den Ansatz gut durchmischen und für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren, bis sich ein feines Präzipitat bildet. Das Calciumphosphat-DNA-Gemisch wird dann tropfenweise auf die Zellen gegeben, vorsichtig verteilt und die Zellen im Zellkulturschrank unter den schon genannten Bedingungen inkubiert. Am nächsten Tag findet ein Mediumwechsel statt, das immer noch dialysiertes FBS enthält. Bei transienter Transfektion erreichen die Zellen ihr Expressionsmaximum 48 bis 72 Stunden nach der Zugabe der DNA.

Um die Transfektionseffizienz genauer zu bestimmen, wird jedes Mal ein Reporter transfiziert, der darüber Auskunft gibt (yellow cameleon). Dies ist ein Fluoreszenzindikator für Ca^{2+} -Ströme in der Zelle, der auf dem grün fluoreszierenden Protein (GFP) der biolumineszenten Qualle *Aequorea victoria* beruht (Shimomura et al. 1962 u. Miyawaki et al. 1997).

2.2.12 SEAP Reportersystem

Berger et al. (1988) beschrieben zuerst, daß die sekretierte plazentale alkalische Phosphatase (SEAP) des Menschen als quantitatives Reportergen im eukaryotischen Zellkultursystem eingesetzt werden kann. Sie zeigten, daß diese Phosphatase nicht membranständig ist, sondern aus den Zellen ausgeschleust wird und sich im Kulturmedium anreichert. Da die SEAP sehr hitzeresistent ist, kann ein Hintergrund durch endogene alkalische Phosphatasen leicht beseitigt werden. Als Substrat für die SEAP wird eine Substanz verwendet, die nach der enzymatischen Zerlegung fluoresziert, nämlich 4-Methylumbelliferylphosphat (4-MUP). Diese Fluoreszenz wird dann im Fluorometer quantifiziert als relative Fluoreszenzeinheiten (RFU).

Durocher et al. (2000) lieferten einen Ansatz, um transient exprimierte G-Protein-gekoppelte Rezeptoren funktional mit Hilfe des SEAP-Systems zu charakterisieren. Dazu werden G-Protein-gekoppelte Rezeptoren in der Zelllinie 293 exprimiert (siehe 2.2.11 Zellkultur und transiente Transfektion). Gleichzeitig wird das Reportergen SEAP kotransfiziert, das unter der Kontrolle von cAMP Reaktionselementen (CRE) steht. In das Zellkulturmedium werden dann putative Liganden (Neurotransmitter) in unterschiedlichen Konzentrationen gegeben, d.h. es erfolgt eine Aktivierung. 48 bis 72 Stunden nach der Aktivierung ist in der Regel die maximale Menge an SEAP im Medium zu detektieren.

Wenn ein Rezeptor exprimiert und durch Zugabe des Liganden aktiviert worden ist, dann vermittelt er das Signal in diesem Reportersystem über das $G\alpha_s$ -Molekül an die Adenylylcyclase. Dieses membranständige Enzym katalysiert die Reaktion von Adenosintriphosphat (ATP) zu cyclischem Adenosinmonophosphat (cAMP). cAMP dient als intrazellulärer Vermittler und aktiviert die cAMP-abhängige Proteinkinase A (PKA). Die PKA wiederum phosphoryliert das cAMP Reaktionselement-Bindeprotein, welches dann an das CRE bindet, wodurch das SEAP-Gen transkribiert wird. Die SEAP wird dann ins Zellkulturmedium ausgeschleust. 110 μ l des Mediums wird abpipettiert und zentrifugiert, um mögliche Zellen zu entfernen. 100 μ l vom Überstand in ein steriles Reaktionsgefäß überführen. Der Überstand kann entweder bei -20°C eingefroren oder gleich für den Fluoreszenznachweis eingesetzt werden. Vor dem Fluoreszenznachweis werden mögliche endogene Phosphatasen durch eine Erwärmung auf $+65^\circ\text{C}$ für 30 Minuten inaktiviert. Die Proben danach auf Raumtemperatur abkühlen lassen. 25 μ l hitzeinaktivierte Probe werden mit 122 μ l Assay-Puffer in einer 96-Kavitäten-Platte versetzt, vorsichtig gemischt und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wird die 4-MUP-Stammlösung mit dem Assay-Puffer 1:10 verdünnt (Endkonzentration 1 mM). 3 μ l dieser gebrauchsfertigen Lösung zu jeder Probe in jede Kavität geben. Den Ansatz 60 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubieren lassen. Anschließend wird die Platte im Fluorometer ausgewertet. Zur Messung wird mit 360 ± 20 nm Wellenlänge angeregt und die Emission bei 460 ± 20 nm detektiert.

2.2.13 DNA-Transformation bei *C. elegans*

Mit Hilfe der DNA-Transformation in lebende Organismen kann die Genexpression *in vivo* bei *C. elegans* detektiert werden. Zu den am häufigsten verwendeten Reportermolekülen zählt hierbei die gfp-kodierende Region von *Aequorea victoria*, weil die Cuticula von *C. elegans* die Zugabe von Substraten, die für die Detektion anderer Reportergene notwendig sind, stark beeinträchtigt (Chalfie et al. 1994).

Um GFP als Marker nutzen zu können, ist es hilfreich, sogenannte chimäre Gene einzusetzen, welche die Funktion des originären Genproduktes sowie die fluoreszierenden Eigenschaften des GFP besitzen. Die dazu verwendeten Vektoren nennen sich GFP-Fusionsvektoren. Der schon erwähnte Vektor pPD95.77 ist so ein GFP-Fusionsvektor. In ihn wird die regulatorische Einheit (Promotor) des Genes kloniert, dessen Expressionsort lokalisiert werden soll. Dann erfolgt die Injektion dieses Vektors.

Experimente mit transgenen *Caenorhabditis elegans* beginnen in der Regel mit der DNA-Injektion in die adulte Gonade (Kimble et al. (1982), Stinchcomb et al. (1985), Fire (1986) u. Mello et al. (1991). Effekte, die den Phänotyp oder die Genexpression betreffen, können dann in der F1-Generation, die von den injizierten Tieren abstammen, beobachtet werden. Injiziert wurde von Frau PD Dr. Eva Liebau am Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin, Hamburg.

Um erfolgreich transformierte Linien selektieren zu können, wird mit einem Marker gearbeitet. In diesem Fall wird auf eine temperatursensitive, embryonal lethale Mutation des *pha-1* Genes zurückgegriffen (Granato et al. 1994), welche es den Tieren erlaubt, sich bei +15°C normal zu entwickeln. Bei +25°C ist diese Mutation aber zu 100 % embryonal lethal. Eine zweite Mutation (*lon-2(e678)*) resultiert in längeren Tieren, die einfacher injiziert werden können.

Koinjiziert wird das Plasmid pBX, das eine Kopie des Wildtypgenes von *pha-1* enthält. Bei einer Temperatur von +25°C hebt das Plasmid die Lethalität auf, d.h. die transgenen Tiere überleben. Zur Erhaltung des Stammes müssen die Tiere einfach nur bei +25°C gehalten werden. Die Auswertung der GFP-Expression wurde mit Hilfe von Herrn Dr. Harald Hutter, MPI für medizinische Forschung, Heidelberg, durchgeführt.

2.2.14 Radiorezeptor-Assay

Der Radiorezeptor-Assay dient dem Nachweis über die pharmakologische Spezifität der Bindung eines Liganden an den untersuchten Rezeptor. Untersucht wird die Kinetik der Verdrängung des Radioliganden durch einen unmarkierten Liganden. Zuerst wird der zu untersuchende Rezeptor in der Zelllinie 293 transient exprimiert. Anschließend ist nach Degen et al. (2000) weiterverfahren worden. Die Daten sind mit der Software GraphPadPrism 4.0 ausgewertet worden. Die ermittelten Werte werden als K_i -Werte (inhibitorische Konstante, Maß für die Dissoziation des Enzym-Inhibitor-Komplexes) angegeben.

2.2.15 Phylogenetische Analysen

Phylogenetische Analysen der Sequenzdaten sind mit MEGA version 2.1 (Kumar et al. 2001) durchgeführt worden. Signifikanztests (Neighbor-Joining Analysen (Saitou et al. 1987) der erhaltenen Phylogenien umfassen 1000 Replikate des jeweiligen Datensatzes (Bootstrapping-Verfahren).

Als Sequenzen sind für alle Untersuchungen Aminosäuresequenzen eingesetzt worden, da direkt auf Proteinebene Sequenzen verglichen werden sollten. Die Sequenzen sind vor der Analyse einer softwaregestützten multiplen Ausrichtung (multiple alignment) mit Clustal W unterworfen worden (Thompson et al. 1994). Alle Sequenzen entstammen der Datenbank des National Center for Biotechnology Information, Bethesda, USA (Datenbank-Identifikationsnummern der verwendeten Sequenzen siehe Anhang)). Aus dem ursprünglichen Datensatz wird ein phylogenetischer Baum berechnet, dessen verschiedenen Verzweigungen Prozentwerte zugeordnet werden, die ein Maß für die Stabilität einzelner Verzweigungen sind.

2.2.16 Verhaltensversuche bei *C. elegans*

Für die Verhaltensversuche wird die Pharynxkontraktion der Nematoden ermittelt, indem man sie in einem Zeitraum von 20 Sekunden erfaßt. Zum Ausgleich individueller Schwankungen wird die Pharynxkontraktion dreimal pro Tier gemessen und diese Werte anschließend gemittelt. Für die Beobachtung ist ein inverses Mikroskop verwendet worden, um die Kontraktionen genau auflösen zu können. Die Quantifizierungen sind unter gleich bleibenden Temperaturbedingungen in einer Klimakammer bei +20°C durchgeführt worden.

Dieser Quantifikationsansatz ist um einen pharmakologischen Aspekt erweitert worden, indem das Zählen der Pharynxkontraktion auf NGM-Agar-Platten erfolgt, die eine pharmakologisch aktive Substanz enthält: Entweder den Agonisten von muscarinischen Acetylcholinrezeptoren (Oxotremorin) oder deren Antagonisten (Atropin). Vor dem Gießen der Platten werden die genannten Substanzen zugegeben. Die Endkonzentration pro Platte entspricht bei Atropin 0,1 mM und bei Oxotremorin 0,3 mM. Diese Werte sind vorher in einer Versuchsreihe ausgetestet worden (Daten nicht dargestellt). Niedrigere Konzentrationen erwiesen sich als nicht mehr aktiv und höhere als toxisch.

Für die pharmakologischen Untersuchungen werden die Tiere auf die Platten mit den entsprechenden Substanzen transferiert und dort für 10 Minuten adaptiert. Dann erst wird mit der Quantifizierung begonnen. Es hat sich auch gezeigt, daß die Quantifizierung auf pharmakologischen Platten einem Zeitfenster von ca. 20 Minuten unterliegt. Danach reagieren die Tiere nicht mehr. Auch nicht mehr auf äußere Reize. Die pharmakologischen Platten werden vor jeder Benutzung durch Zugabe des Wildtyps getestet, damit bei Ausbleiben von Effekten fehlerhafte NGM-Agar-Platten ausgeschlossen werden können und von einem Ergebnis ausgegangen werden kann.

Für die Quantifizierung der Pharynxkontraktion bei RNAi-Experimenten wird immer mit einer Kontrolle gearbeitet. Als Kontrolle wird ein GFP-Konstrukt eingesetzt, um mögliche Einflüsse der Methode auf das Verhalten der Tiere auszuschließen. Um sicherzugehen, daß RNAi als Methode erfolgreich den Phänotyp der Tiere beeinflusst, ist immer bei RNAi-Experimenten das Gen für $G_q\alpha$ (*egl-30*) supprimiert worden.

In diesem Fall tritt ein eindeutiger Phänotyp auf (die Tiere haben einen Eiablagedefekt und erscheinen durch die nicht abgelegten Eier als „aufgeblasen“). Brundage et al. (1996) beobachteten diesen Phänotyp an Tieren, die im Gen *egl-30* eine Mutation besaßen.

Für die Hungerversuche werden die Tiere mit M9-Puffer frei von Bakterien gewaschen (zwei Waschschritte) und danach auf NGM-Agar-Platten, auf denen keine Bakterien ausplattiert sind, transferiert (Sawin et al. 2000). Der Puffertropfen ist dann mit Kimwipes (Kimberly-Clark) entfernt worden. Die Nematoden inkubieren anschließend 30 Minuten bei Raumtemperatur auf den bakterienfreien Platten. Die Tiere werden dann auf Platten mit Bakterien und/oder pharmakologisch aktiven Substanzen überführt. Alle Verhaltensversuche sind statistisch mit der Software GraphPadPrism 4.0 und SigmaStat 2.0 ausgewertet und anschließend Graphiken damit erstellt worden. Als signifikant werden Werte angenommen, bei denen $P < 0,05$ ist.

2.2.17 Ermittlung des Längen-Breiten-Index bei *C. elegans*

Zur Ermittlung des Längen-Breiten-Index werden die Tiere mit M9-Puffer von den Platten gewaschen und anschließend die Bakterien durch mehrmaliges Waschen mit M9-Puffer entfernt. Sie werden anschließend mit Natriumazid (1 M) betäubt und danach auf einen Objektträger überführt. Den Objektträger vorsichtig mit einem Deckglas abgedeckt, um die Tiere nicht zu zerdrücken. Damit die Tiere während des Mikroskopierens nicht austrocknen wird das Deckgläschen mit Klarlacknagellack abgedichtet. Von den so vorbereiteten Tieren werden mit einer Digitalkamera (Canon G3) Photos gemacht. Gleichzeitig ist bei derselben Einstellung ein Maßstab photographiert worden, so daß die Digitalphotos samt Maßstab im Anschluß ausgedruckt und die Tiere dann vermessen werden können. Zunächst wird die Länge, anschließend die Breite bestimmt, und zwar genau in der Mitte der Tiere. Danach kann ein Quotient aus Länge und Breite bestimmt werden.

2.2.18 Das GAL4-System bei *Drosophila*

Brand et al. (1993) veröffentlichten ein zweiteiliges *in vivo* Genexpressionssystem für *Drosophila*. In diesem System wird die Promotorregion des zu untersuchenden Genes in demselben Leserahmen vor GAL4 kloniert. GAL4 kodiert nun für ein Protein, das bei der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* als Genregulator identifiziert worden ist.

Als Vektor wird pPTGAL verwendet, der ein P-Elementvektor der CaSpeR-Familie ist (Sharma et al. 2002). Dieses Konstrukt wird in die Eier von der *Drosophila*-Linie BL-10010 (Bloomington, Drosophila Stock Center, Indiana, USA; Allel white¹¹¹⁸ defekt) injiziert. Dieser Stamm besitzt einen rezessiven Augenfarbendefekt (der Phänotyp hat weiße Augen). Wenn das Konstrukt erfolgreich in das Genom integriert wird, wechselt die Augenfarbe als Marker in der F1-Generation von weiß zu rot. Diese transgene Linie kann dann mit einer sogenannten Responderlinie (Antwortlinie) eingekreuzt werden. Die Responderlinie besitzt eine stromaufwärts gelegene Aktivierungssequenz (Upstream Activating Sequence (UAS)), die in demselben Leserahmen wie GFP kloniert worden ist (Duffy 2002).

Beim Einkreuzen wird in der nachfolgenden Generation das Genkonstrukt aus Promotorregion von zu detektierendem Gen und GAL4 abgelesen. Das GAL4-Protein bindet wiederum an UAS, und GFP wird an den Stellen exprimiert, wo das zu detektierende Gen *in vivo* exprimiert wird. GFP ist dann durch Fluoreszenzmikroskopie nachweisbar. In diesem Fall wurde die Promotorregion von Droso-1B (GI: 4468166) und der Tyramin- β -Hydroxylase (GI: 17737291) in den Vektor pPTGAL kloniert (GI-Nummern sind Datenbank-Identifikationsnummern der Datenbank des National Center for Biotechnology Information, Bethesda, USA).

3 Ergebnisse

Die Wirkungsweise und Funktion von muscarinischen Acetylcholinrezeptoren liegen bei *C. elegans* noch im Dunkeln. Es kann aber stark vermutet werden, daß sie die Muskelkontraktion sowie die allgemeine Aktivität des Tieres bedingen. Um sich hier Klarheit zu verschaffen, wurde die Muskelkontraktion am Beispiel des Pharynx von *C. elegans* untersucht. Desweiteren werden die Eigenschaften jeweils eines Vertreters metabotroper Rezeptoren bei *D. melanogaster* bzw. *C. elegans* beleuchtet.

3.1. Muscarinische Neurotransmission bei *C. elegans*

3.1.1. Phylogenetische Analyse

Zur phylogenetischen Analyse der potentiellen muscarinischen Sequenzen von *C. elegans* sind die Sequenzen GAR-1, GAR-2 und GAR-3 von *C. elegans*, die experimentell bestätigten Proteinsequenzen der fünf humanen muscarinischen Acetylcholinrezeptoren und die zwei potentiellen muscarinischen Acetylcholinrezeptor-Sequenzen von *Drosophila* verwendet worden sowie die drei humanen Histaminrezeptoren der H₁-Gruppe (Abb. 4).

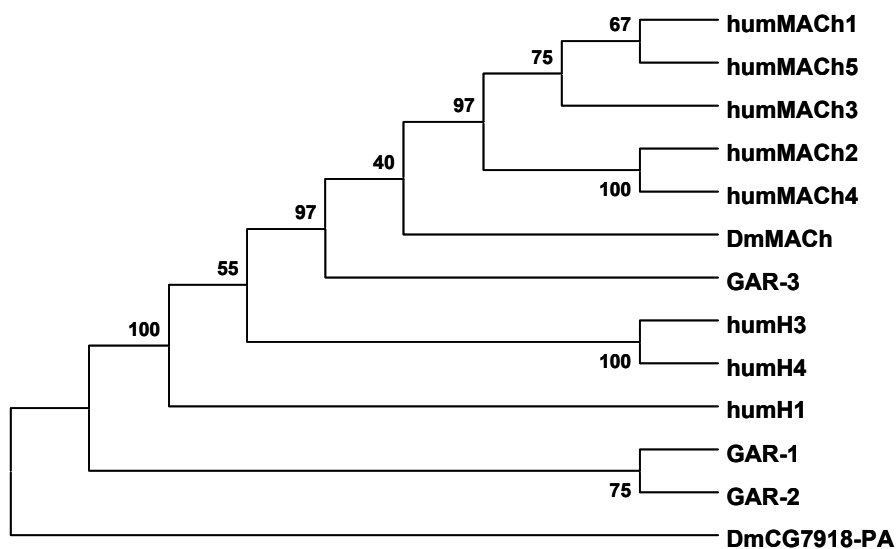


Abb.4: Phylogenetische Analyse von putativen muscarinischen Acetylcholinrezeptoren (mAChR) bei *C. elegans* mit Hilfe von MEGA version 2.1 (Kumar et al. 2001). humMACH humane mAChR-Sequenzen, DmMACH u. DmCG7918-PA *Drosophila* mAChR-Sequenzen, humH humane Histaminrezeptoren der H₁-Gruppe.

Es zeigt sich, daß nur eine der putativen muscarinischen Sequenzen, nämlich GAR-3, zur näheren Verwandtschaft der muscarinischen Acetylcholinrezeptoren gehört. Diese Gruppe ist durch einen Bootstrapwert von 100 abgesichert. Für GAR-1, GAR-2 und DmCG7918-PA waren keine Signifikanzen berechenbar, die sie mit der oben erwähnten Gruppe in Verbindung bringen. Diese Analyse ist durch das Minimum-Evolution- und das Maximum-Parsimony-Kriterium ebenfalls bestätigt worden.

3.1.2 Radiorezeptor-Assay

Mit den drei transient, heterolog exprimierten putativen muscarinischen Acetylcholinrezeptoren von *C. elegans* ist ein Radiorezeptor-Assay durchgeführt worden. Eine Bindung von ^3H -QNB konnte nur bei GAR-3 beobachtet werden (Abb .5). Hier war daher eine kompetitive Verdrängung von ^3H -QNB durch den eigentlichen Liganden Acetylcholin ($K_i=390$ nM), den Antagonisten Atropin ($K_i=0,8$ nM) und den Agonisten Oxotremorin ($K_i=17$ nM) möglich.

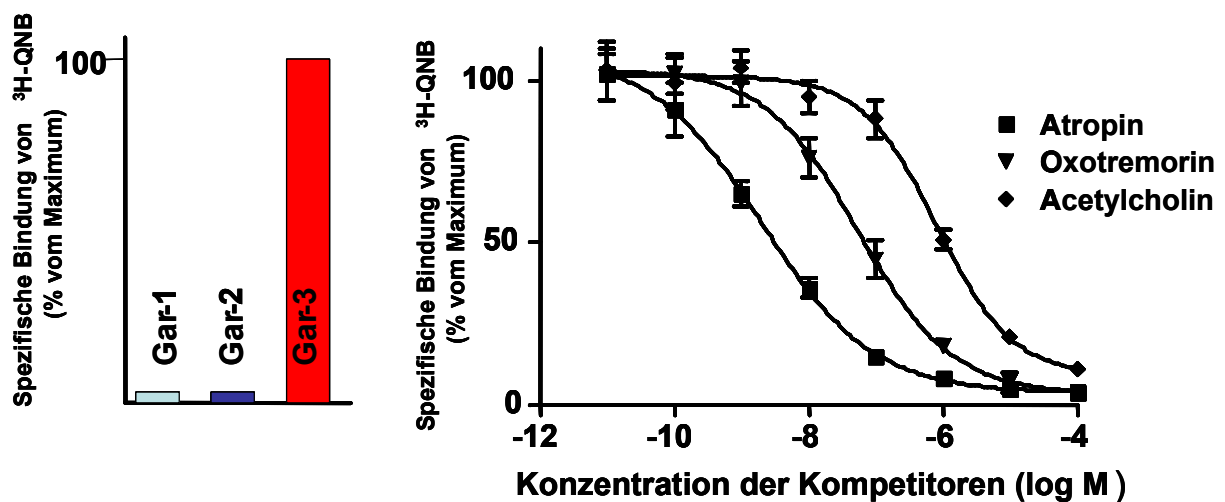


Abb.5: Radiorezeptor-Assay der drei heterolog exprimierten putativen muscarinischen Acetylcholinrezeptoren von *C. elegans*, QNB = Quinuclidinylbenzoat

3.1.3 Verhaltensanalyse

3.1.3.1 RNAi bei den drei Rezeptorgenen *gar-1*, *gar-2* und *gar-3*

Durch die Quantifizierung der Pharynxkontraktion pro Zeiteinheit (20 Sekunden) wurde bei der Kontrollgruppe (N=40) ein Wert von 50 Kontraktionen (50 ± 1) ermittelt (Abb. 6). Wenn die Tiere der Kontrollgruppe auf NGM-Agar-Platten mit dem muscarinischen Antagonisten Atropin (0,1 mM) gesetzt wurden, sank die Pharynxkontraktion um ca. 25 % auf ungefähr 38 Kontraktionen (38 ± 1) pro Zeiteinheit. Wurden die Tiere hingegen auf Platten mit dem Agonisten Oxotremorin (0,3 mM) gesetzt, stieg die Pharynxaktivität um ca. 15 % gegenüber dem Normalwert. Die Pharynxkontraktionen lagen dann bei nahezu 60 Kontraktionen (59 ± 1) pro Zeiteinheit. Das beschriebene Bild galt darüber hinaus auch für *gar-1* (N=40, Normalwert 48 ± 1 , Atropin 39 ± 1 , Oxotremorin 60 ± 1) und *gar-2* (N=40, Normalwert 49 ± 1 , Atropin 40 ± 1 , Oxotremorin 59 ± 1). Die Werte für Atropin und Oxotremorin waren gegenüber den Normalwerten bei der Kontrollgruppe, bei *gar-1* und bei *gar-2* signifikant unterschiedlich ($P < 0,0001$).

Nur *gar-3* (N=40) reduzierte die Pharynxkontraktion gegenüber der Kontrolle um ca. 22 % im allgemeinen. Die Kontraktionen wurden nach dem Einsatz der RNAi-Methode reduziert und diese Nematoden reagierten auch nicht mehr auf Atropin und Oxotremorin (Normalwert 39 ± 1 , Atropin 39 ± 1 , Oxotremorin 39 ± 1). Sie behielten ihren erniedrigten Wert bei. *Gar-3* zeigte gegenüber seinem Normalwert bei Atropin ($P < 0,7$) und Oxotremorin ($P < 0,07$) keine signifikanten Veränderungen.

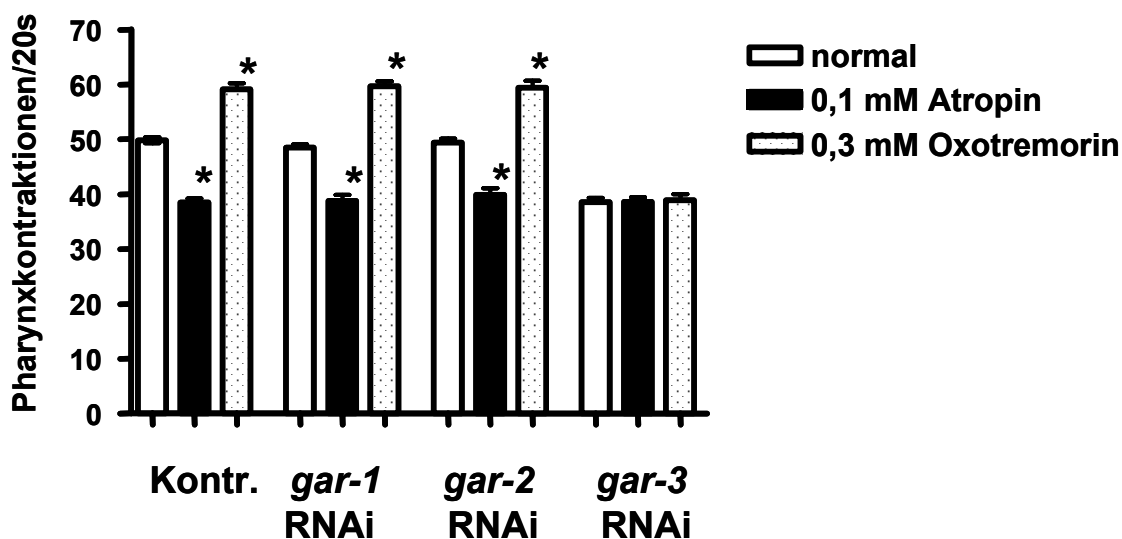


Abb.6: Pharynxkontraktionen der Kontrolle, *gar-1* RNAi, *gar-2* RNAi und *gar-3* RNAi pro Zeiteinheit sowie unter Einwirkung von Atropin bzw. Oxotremorin.

3.1.3.2 Genomische Knock-outs der Rezeptorgene *gar-2* und *gar-3*

Da von den Rezeptoren GAR-2 und GAR-3 Stämme bestehen, in denen das jeweilige Gen aktiv mutiert und damit dessen Funktion ausgeschaltet worden ist, wurden diese ebenfalls für die Verhaltensversuche nach dem Muster der RNAi-Versuche herangezogen (Stamm RB756, betroffenes Gen *gar-2*, Genotyp *gar-2(ok520)* III; Stamm vu78, betroffenes Gen *gar-3*, Genotyp unbekannt (freundlicherweise von Dr. Joseph A. Dent, Department of Biology, McGill University, Kanada zur Verfügung gestellt). So konnte ein Vergleich in Bezug auf die Methodik aufgestellt und die Ergebnisse noch einmal abgesichert werden.

Es zeigte sich, daß die Pharynxkontraktionen pro 20 Sekunden von RB756 (*gar-2* defizient, N=20) ungefähr 20 % höher liegen (63 ± 1) als der Wildtyp und als die RNAi-Werte von *gar-2* (Abb. 7). Wurden diese Tiere auf NGM-Agar-Platten mit Atropin (0,1 mM) transferiert, so verringerte sich die Pharynxkontraktion signifikant gegenüber dem Normalwert um ca. 57 % auf einen Wert von 27 ± 1 pro Zeiteinheit ($P < 0,0001$). Sobald diese Tiere aber auf Oxotremorinplatten gesetzt wurden, verringerte sich die Pharynxkontraktion nochmals, so daß nur noch Werte um die 16 ± 2 Kontraktionen je 20 Sekunden (ca. 25 % des Ausgangswertes) erreicht wurden ($P < 0,0001$). Um sicherzustellen, daß Oxotremorin in der Konzentration von 0,3 mM für diesen Stamm nicht toxisch ist, wurden die Tiere auf Platten mit nur 0,15 mM Oxotremorin gesetzt. Auch die erniedrigte Konzentration an Oxotremorin zeigte einen vergleichbaren Effekt. Die Pharynxkontraktionen lagen bei Werten um 20 ± 2 Kontraktionen pro Zeiteinheit ($P < 0,0001$). Alle für *gar-2* ermittelten Werte sind signifikant unterschiedlich gegenüber dem Normalwert des Wildtyps ($P < 0,0001$).

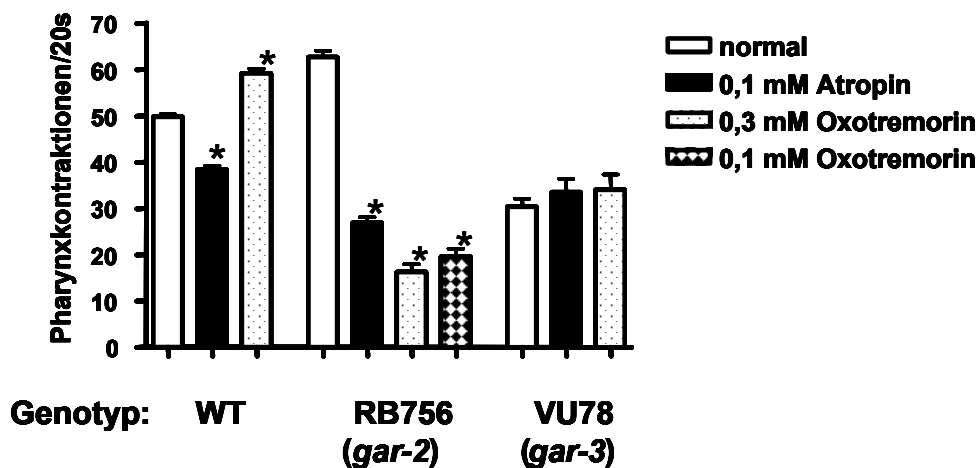


Abb. 7: Pharynxkontraktionen des Wildtyps (WT) und der Mutanten RB756 (*gar-2* defizient) und VU78 (*gar-3* defizient) pro Zeiteinheit sowie unter Einwirkung von Atropin bzw. Oxotremorin.

Es stellte sich im Anschluß die Frage, ob sich die Pharynxkontraktion der *gar-2*-Mutante im Laufe der Entwicklung eines Tieres ändert. Daher wurde sie ebenfalls für Tiere des zweiten Larvalstadiums (L2) ermittelt (Abb. 8). Die Pharynxkontraktion der Tiere (N=10) des zweiten Larvalabschnitt entsprach annähernd der des adulten Wildtyps (50 ± 1), nämlich 49 ± 2 Kontraktionen pro 20 Sekunden. Die Unterschiede in der Pharynxkontraktion bei der *gar-2*-Mutante zwischen adulten Tieren und L2 sind signifikant ($P < 0,0001$). Beim Wildtyp (N=10) sind die Unterschiede zwischen adulten Tieren und dem zweiten Larvalstadium signifikant unterschiedlich ($P = 0,0234$).

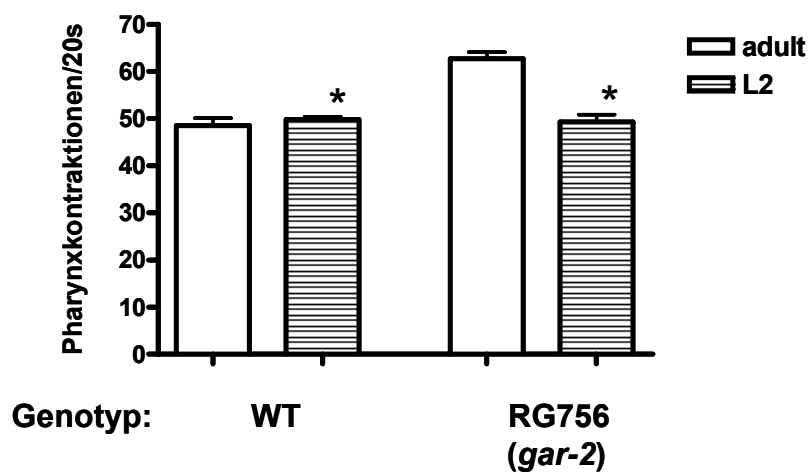


Abb. 8: Pharynxkontraktionen des Wildtyps (WT, adult u. Larvalstadium 2 (L2) und der Mutante RG756 (*gar-2* defizient, adult u. L2).

Der Phänotyp des Stammes RB756 schien darüber hinaus schlanker zu sein als der Wildtyp. Von beiden wurde daher zum Vergleich der Längen-Breiten-Index bestimmt (N=10) (Abb. 9). Die Werte für den Längen-Breiten-Index beim Wildtyp und bei der *gar-2*-Mutante waren signifikant unterschiedlich (Wildtyp 20 ± 3 , *gar-2*-Mutante 23 ± 3 , $P = 0,0176$)

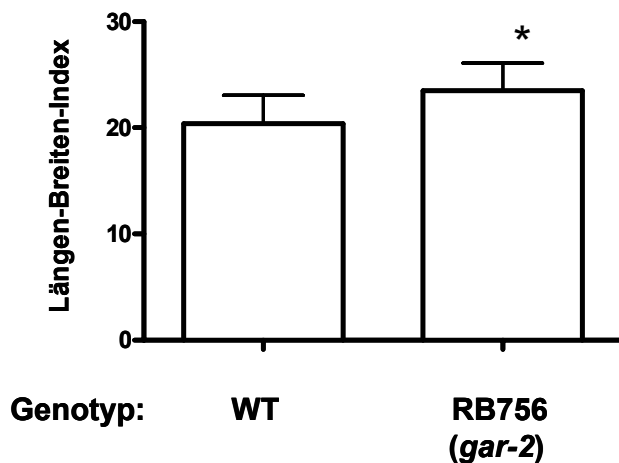


Abb. 9: Längen-Breiten-Index des Wildtyps (WT) und der Mutante RB756 (*gar-2* defizient).

Gar-3 defiziente Tiere (Stamm VU78) zeigten 30 ± 2 Kontraktionen pro Zeiteinheit (Abb. 7). Atropin (34 ± 2 , $P=0,083$) bzw. Oxotremorin (34 ± 3 , $P=0,680$) hatten keinen signifikanten Einfluß auf die Pharynxkontraktion.

3.1.3.3 RNAi bei den vier $G\alpha$ -Proteingenen *gpa-12* ($G_{12}\alpha$), *goa-1* ($G_o\alpha$), *egl-30* ($G_q\alpha$) und *gsa-1* ($G_s\alpha$)

Zur Weiterverfolgung des Signalweges wurden diese vier $G\alpha$ -Proteine mit Hilfe der RNAi-Technik supprimiert (Abb. 10). *gpa-12* ($G_{12}\alpha$, $N=40$, Normalwert 50 ± 1 , Atropin 37 ± 1 , Oxotremorin 60 ± 1), *goa-1* ($G_o\alpha$, $N=40$, Normalwert 49 ± 3 , Atropin 35 ± 2 , Oxotremorin 59 ± 1) und *gsa-1* ($G_s\alpha$, $N = 40$, Normalwert 49 ± 1 , Atropin 38 ± 1 , Oxotremorin 60 ± 1) zeigten dabei einen sehr ähnlichen Phänotyp wie die Kontrolle in Bezug auf die Pharynxkontraktionen.

Nur *egl-30* ($G_q\alpha$) hatte einen veränderten Phänotyp: Die Pharynxkontraktion war gegenüber der Kontrolle deutlich reduziert (29 ± 1 Kontraktionen pro Zeiteinheit) und die Tiere reagieren nicht signifikant auf Atropin (25 ± 1 , $P=0,113$) und physiologisch nicht relevant auf Oxotremorin (27 ± 1 , $P=0,002$). Die Pharynxkontraktion blieb auf dem genannten niedrigen Niveau.

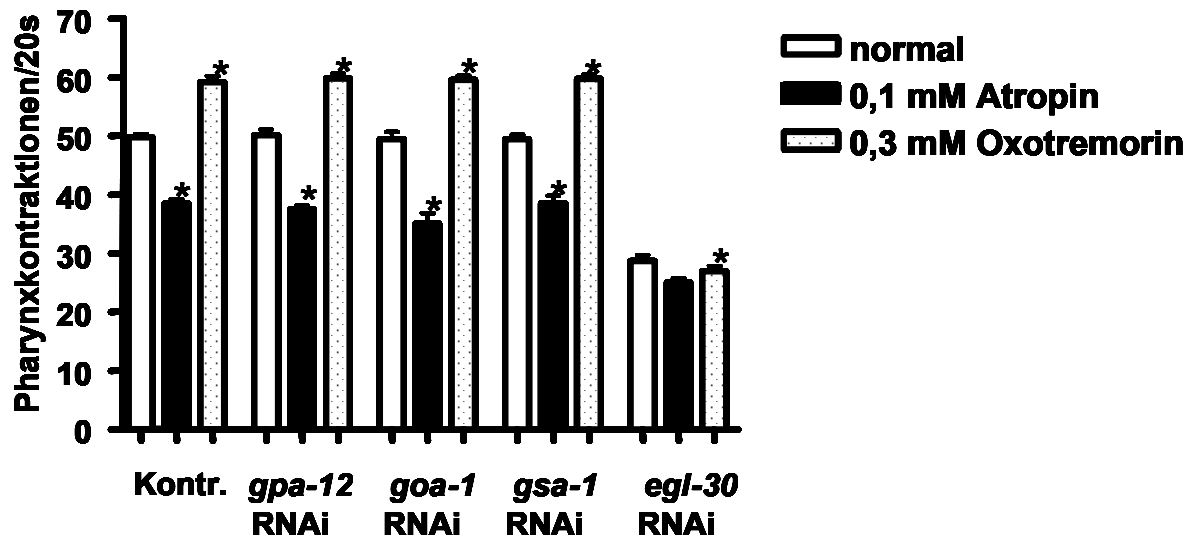


Abb. 10: Pharynxkontraktionen der Kontrolle, *gpa-12* (RNAi), *goa-1* (RNAi), *gsa-1* (RNAi) und *egl-30* (RNAi) pro Zeiteinheit sowie unter Einwirkung von Atropin bzw. Oxotremorin.

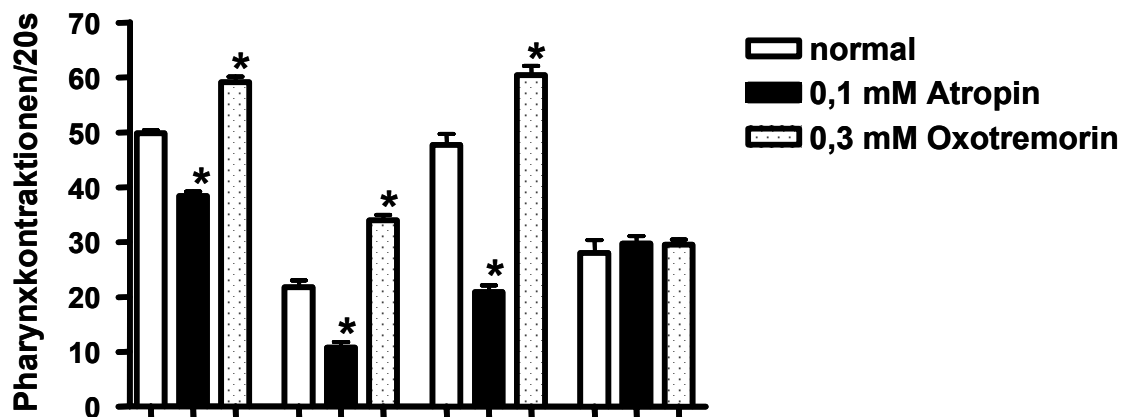
3.1.3.4 Genomische Knock-outs der $G\alpha$ -Proteingene *goa-1* ($G_o\alpha$), *gpa-12* ($G_{12}\alpha$), und *egl-30* ($G_q\alpha$)

Bei den hier verwendeten Stämmen (Stamm MT2426, betroffenes Gen *goa-1*, Genotyp *goa-1*(n1134) I; Stamm NL594, betroffenes Gen *gpa-12*, Genotyp *gpa-12*(pk322) X; Stamm MT1434, betroffenes Gen *egl-30*, Genotyp *egl-30*(n686) I) handelt es sich um mutagenisierte Tiere, die in den angegebenen Genen einen Funktionsverlust aufweisen. Somit konnten die durch RNAi erlangten Ergebnisse nochmals überprüft werden (Abb. 11).

Der *goa-1* ($G_o\alpha$) defiziente Stamm MT2426 (N = 20) wies bei den Verhaltensversuchen eine deutlich erniedrigte Pharynxkontraktion auf; er pumpte 22 ± 1 mal. Unter Einwirkung von Atropin reduzierte sich die Pharynxkontraktion auf 11 ± 1 pro 20 Sekunden und Oxotremorin erhöhte die Rate signifikant auf 34 ± 1 Kontraktionen. Die Werte veränderten sich also signifikant gegenüber dem Normalwert (Atropin $P < 0,0001$ und Oxotremorin $P < 0,0001$).

Die *gpa-12*-Mutante ($G_{12}\alpha$ defizient, N = 10) zeigte Pharynxkontraktionen von 48 ± 2 Kontraktionen je 20 Sekunden. Die Tiere senkten signifikant ($P < 0,0001$) auf Atropinplatten ihre Pharynxkontraktion (21 ± 1) um mehr als die Hälfte.

Die Tiere sprachen ebenfalls signifikant auf den Agonisten Oxotremorin an ($P < 0,0001$), d.h. die Kontraktionen erhöhten sich auf 60 ± 2 Kontraktionen pro Zeiteinheit. MT1434 ($G_q\alpha$ defizient, $N = 20$) pumpt 28 ± 2 mal innerhalb von 20 Sekunden. Atropin (30 ± 1 , $P = 0,653$) bzw. Oxotremorin (30 ± 1 , $P = 0,354$) beeinflusste die Tiere im Hinblick auf die Pharynxkontraktion nicht signifikant. Sie blieb nahezu bei dem genannten Ausgangswert.



Genotyp: WT NL594 MT2426 MT1434
(*gpa-12*) (*goa-1*) (*egl-30*)

Abb. 11: Pharynxkontraktionen des Wildtyps (WT) und der Mutanten NL594 (*gpa-12* defizient), MT2426 (*goa-1* defizient) und MT1434 (*egl-30* defizient) pro Zeiteinheit sowie unter Einwirkung von Atropin bzw. Oxotremorin.

3.1.3.5 Genomische Knock-outs des Phospholipase C β -Genes *egl-8*

Zur Weiterverfolgung der Signalkaskade wurde der Stamm RM2221 (betroffenes Gen *egl-8*, Genotyp *egl-8(md1971)* V) hinsichtlich des Pharynxpumpens untersucht (Abb. 12). Die PLC β -defizienten Tiere ($N = 20$) pumpten nur 33 ± 1 mal pro Zeiteinheit, was einer Reduzierung um ungefähr 34 % gegenüber dem Wildtyp entspricht. Dieser Stamm reagierte nicht mehr signifikant auf Atropin (33 ± 1 , $P = 0,5383$) und physiologisch nicht relevant auf Oxotremorin (32 ± 1 , $P = 0,02$) hinsichtlich der Verhaltensäußerung Pharynxkontraktion.

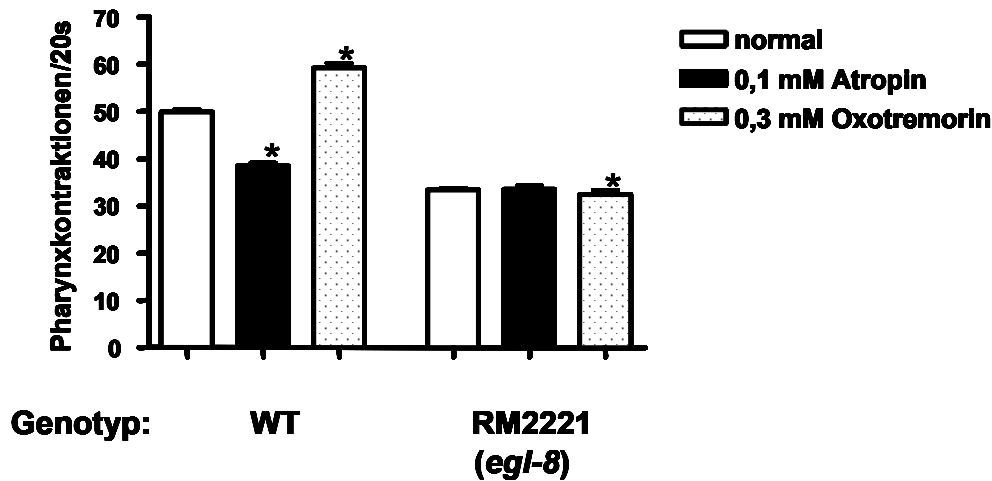


Abb. 12: Pharynxkontraktionen des Wildtyps (WT) und der Mutante RM2221 (*egl-8* defizient) pro Zeiteinheit sowie unter Einwirkung von Atropin bzw. Oxotremorin.

3.1.3.6 Genomischer Knock-out des IP₃-Rezeptorgenes *itr-1*

Es wurde darüber hinaus mit einer Mutante des einzigen z.Z. bekannten IP₃-Rezeptors gearbeitet (Dal Santo et al. 1999), dem Stamm JT73 (betroffenes Gen *itr-1*, Genotyp *itr-1* (sa73) IV). Bei den Verhaltensversuchen stellte sich heraus, daß die Pharynxkontraktion dieser Tiere (N=20) sehr wohl erniedrigt war (31±1 Kontraktionen pro 20 Sekunden), sie aber auf den Antagonisten Atropin (21±1 Kontraktionen, P<0,0001) und den Agonisten Oxotremorin (52±2 Kontraktionen, P<0,0001) signifikant ansprachen (Abb. 13).

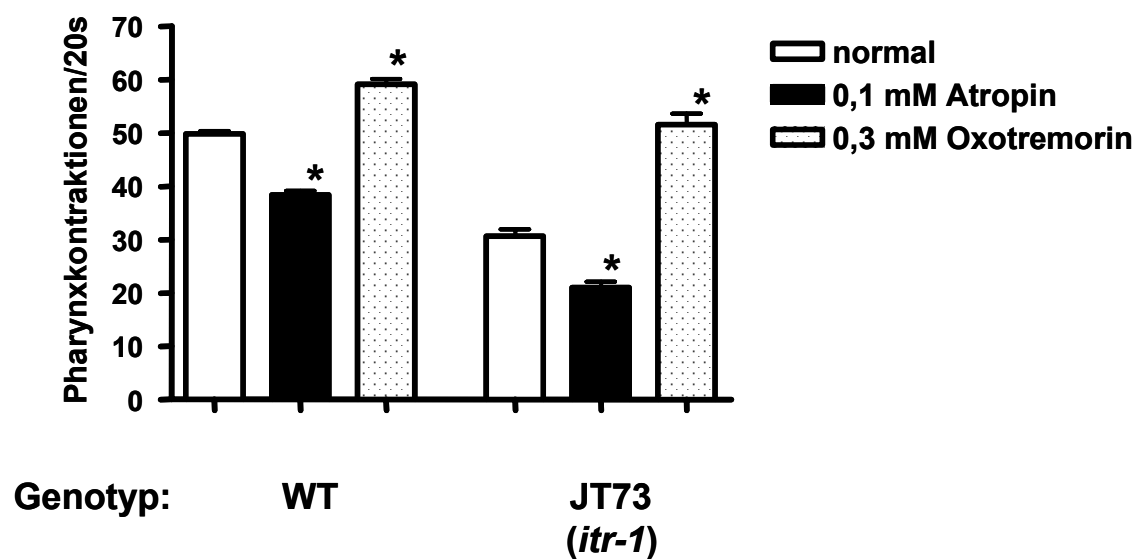


Abb. 13: Pharynxkontraktionen des Wildtyps (WT) und der Mutante JT73 (*itr-1* defizient) pro Zeiteinheit sowie unter Einwirkung von Atropin bzw. Oxotremorin.

3.1.3.7 Genomische Knock-outs der Proteinkinase C-Gene *tpa-1* und *pkc-2*

Im Genom von *C. elegans* existieren vier Sequenzen, die für potentielle Proteinkinasen C kodieren: *Tpa-1*, *pkc-1*, *pkc-2* und *pkc-3* (Tabuse 2002). Zwei von ihnen sind experimentell als Proteinkinase C verifiziert: *Tpa-1* und *pkc-2* (Sano et al. 1995 u. Islas-Trejo et al. 1997). Von diesen beiden existieren Mutanten, nämlich der Stamm MJ563 (betroffenes Gen *tpa-1*, Genotyp *tpa-1(k530)* IV) und der Stamm VC127 (betroffenes Gen *pkc-2*, Genotyp *pkc-2(ok328)* X). Mit diesen beiden Stämmen sind ebenfalls Verhaltensversuche durchgeführt worden, um den Signalweg nachvollziehen zu können (Abb. 14).

MJ563 (*tpa-1* defizient, N=20) zeichnete sich durch eine reduzierte Pharynxkontraktion gegenüber dem Wildtyp aus (30±2 Kontraktionen). Die Tiere zeigten auf Atropin- und Oxotremorinplatten das gleiche Verhalten wie der Wildtyp: Atropin reduzierte das Pumpen nochmals signifikant auf 20±2 Kontraktionen (P<0,0001) pro Zeiteinheit, und Oxotremorin erhöhte die Kontraktion signifikant gegenüber dem Normalwert auf 62±2 (P<0,0001). VC127 unterschied sich bei den Verhaltensversuchen zunächst kaum vom Wildtyp (49±2 Kontraktionen je 20 Sekunden). Aber weder Atropin (51±2, P=0,628) noch Oxotremorin (49±2, P=0,567) konnten großen Einfluß auf das Verhalten nehmen. Die Pharynxkontraktion blieb nahezu gleich.

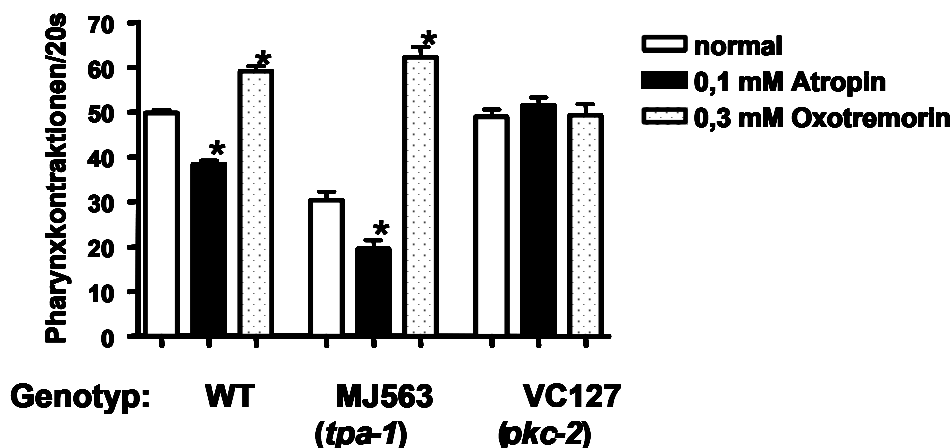


Abb. 14: Pharynxkontraktionen des Wildtyps (WT) und der Mutanten MJ563 (*tpa-1* defizient) und VC127 (*pkc-2* defizient) pro Zeiteinheit sowie unter Einwirkung von Atropin bzw. Oxotremorin.

3.1.3.8 Genomischer Knock-out des Diacylglycerolkinase-Genes *dgk-1*

Bei *C. elegans* existiert im Genom eine Diacylglycerolkinase. Dieses Gen wird *dgk-1* genannt (Miller et al. 1999). Zwei defiziente Stämme sind für die Verhaltensversuche eingesetzt worden: KP1097 (betroffenes Gen *dgk-1*, Genotyp *dgk-1(nu62)* X) und PS2627 (betroffenes Gen *dgk-1*, Genotyp *dgk-1(sy428)* X) (Abb. 15).

KP1097 (N=10) pumpte auf einem niedrigen Niveau 17 ± 2 mal pro Zeiteinheit. Atropin erhöhte die Zahl der Kontraktionen signifikant auf Werte von 23 ± 2 ($P < 0,0001$). Oxotremorin steigerte die Pharynxkontraktionen signifikant auf 50 ± 3 ($P < 0,0001$). PS2627 (N=10) pumpte 50 ± 2 mal. Unter Einfluß von Atropin senkte sich die Kontraktion signifikant auf Werte von 22 ± 2 ($P < 0,0001$) ab. Oxotremorin erhöhte die Pharynxkontraktion ebenfalls signifikant auf 64 ± 2 ($P < 0,0001$) je 20 Sekunden.

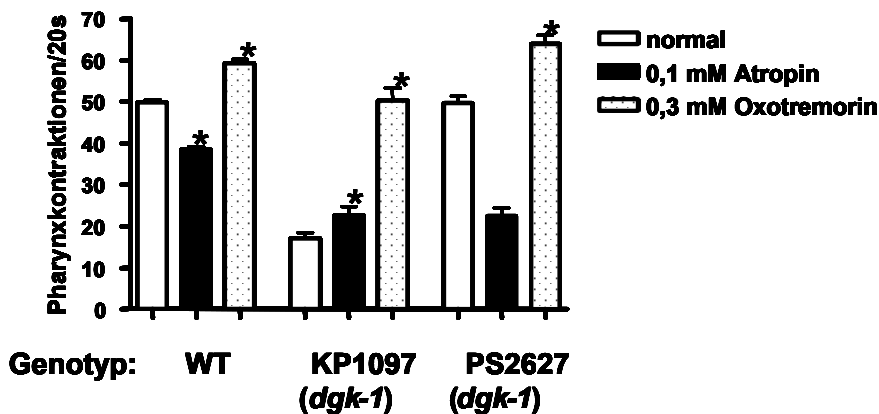


Abb. 15: Pharynxkontraktionen des Wildtyps (WT) und der beiden Mutanten KP1097 (*dgk-1* defizient) und PS2627 (*dgk-1* defizient) pro Zeiteinheit sowie unter Einwirkung von Atropin bzw. Oxotremorin.

3.1.3.9 Genomische Knock-outs der Gene für Vesikelexocytose *unc-13* und *unc-31*

Hierzu wurden zwei Stämme herangezogen, die Mutationen im Gen *unc-13* enthalten, CB1091 (betroffenes Gen *unc-13*, Genotyp *unc-13* (e1091) I) und KR1787 (betroffenes Gen *unc-13*, Genotyp *unc-13* (e51) I). *Unc-13* soll bei der Vesikelexocytose eine Rolle spielen (Lackner et al. 1999 u. Richmond 2001). KR1787 pumpte 19 ± 2 mal pro 20 Sekunden (Abb.16). Atropin (21 ± 2 , $P=0,825$) und Oxotremorin (20 ± 1 , $P=0,797$) änderten das Pumpverhalten dieser Tiere nicht signifikant. CB1091 zeigte 22 ± 2 Pharynxkontraktionen und änderte dieses Verhalten ebenfalls nicht signifikant durch den Antagonisten Atropin (21 ± 2 , $P=0,858$) und den Agonisten Oxotremorin (20 ± 2 , $P=0,514$).

Außerdem wurde ein Stamm untersucht, der defizient für das Gen *unc-31* ist (Abb. 16). *Unc-31* soll ebenfalls bei der Vesikelexocytose eine Rolle spielen (Berwin et al. 1998). Der dazu verwendete Stamm CB928 (betroffenes Gen *unc-31*, Genotyp *unc-31* (e928) IV) pumpte 38 ± 1 mal. Atropin erniedrigte diese Werte signifikant auf 28 ± 2 ($P < 0,0001$), wobei Oxotremorin sie ebenfalls signifikant auf 48 ± 2 ($P < 0,0001$) erhöhte.

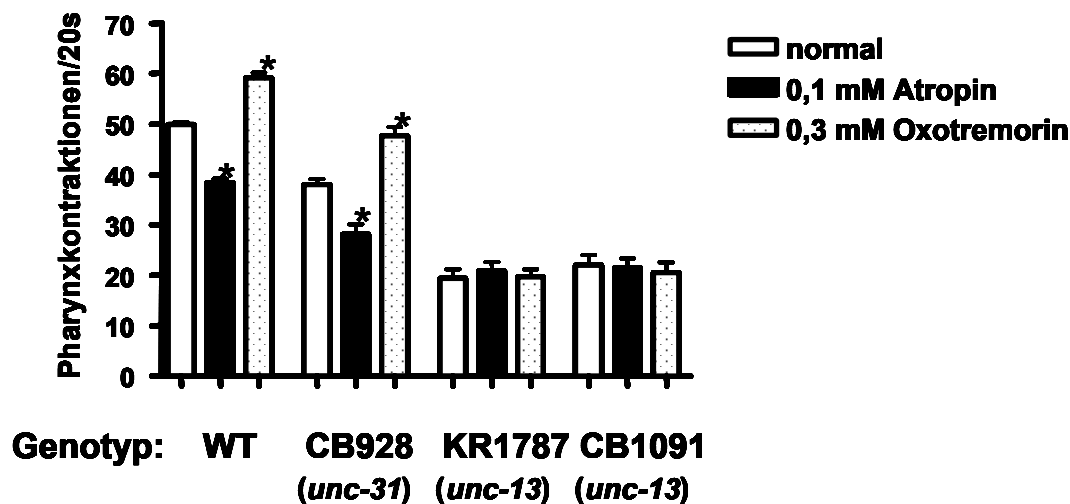


Abb. 16: Pharynxkontraktionen des Wildtyps (WT) und der Mutanten CB928 (*unc-31* defizient), KR1787 (*unc-13* defizient) und CB1091 (*unc-13* defizient) pro Zeiteinheit sowie unter Einwirkung von Atropin bzw. Oxotremorin.

3.1.3.10 Einflußnahme von Octopamin auf die Pharynxkontraktion

Beim Wildtyp (N=20) reduzierte Octopamin (10 mM) die Pharynxkontraktion je Zeiteinheit signifikant im Vergleich zum Normalwert auf 39 ± 1 ($P < 0,0001$) und bei Tyramin (10 mM) ebenfalls auf signifikante Werte von 35 ± 1 ($P = 0,0004$) (Abb. 35). Der Antagonist für Octopaminrezeptoren – Yohimbin (0,1 mM) – hatte beim Wildtyp im Vergleich zum Normalwert keinen Einfluß auf die Pharynxkontraktion (49 ± 1 Pharynxkontraktionen pro 20 Sekunden, $P = 0,074$) (Abb. 17).

Außerdem sind Tiere des Stammes RM2221 (siehe oben), die PLC β -defizient (*egl-8*) sind, auf Octopamin-, Tyramin- und Yohimbin-Platten gesetzt worden, und auch hier wurde die Pharynxkontraktion ermittelt (Abb. 17). Bei Octopamin (N=20) lag die Pharynxkontraktion bei 34 ± 1 , bei Tyramin (N=20) bei 37 ± 2 und bei Yohimbin (N=20) bei 36 ± 1 . Die Werte für Octopamin waren im Vergleich mit dem Normalwert nicht signifikant ($P = 0,368$). Tyramin ($P = 0,02$) und Yohimbin ($P = 0,02$) wiesen physiologisch nicht relevante Signifikanzen auf.

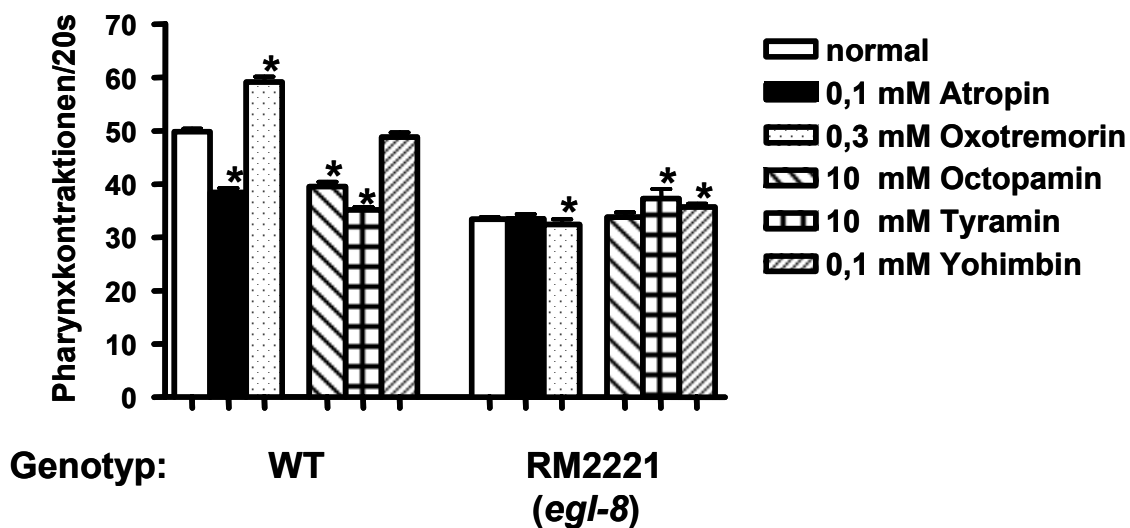


Abb. 17: Pharynxkontraktionen des Wildtyps (WT) und der Mutante RM2221 (*egl-8* defizient) pro Zeiteinheit sowie unter Einwirkung von Atropin, Oxotremorin, Octopamin, Tyramin und Yohimbin.

3.1.3.11 Verhaltensanalyse bei Nahrungszug

Verglichen wurden zwei Gruppen von Tieren: Die eine Gruppe hatte gehungert, die andere Gruppe nicht. Beide Male wurde der Wildtyp und *gar-3* unter RNAi-Bedingungen verwendet (Abb. 18). Es zeigte sich, daß die Pharynxkontraktionen beim Wildtyp (N=40) ohne Nahrungszug (50 ± 1) und mit Nahrungszug (50 ± 1) sich nicht signifikant unterschieden ($P=0,9514$). Bei *gar-3* (RNAi) (N=40) ohne Nahrungszug (39 ± 1) und mit Nahrungszug (39 ± 1) konnten ebenfalls keine Signifikanzen festgestellt werden ($P=0,153$). Der Agonist Oxotremorin hatte einen physiologisch zu vernachlässigenden Effekt auf Tiere des Wildtyps (N=40), die nicht gehungert hatten (59 ± 1) und solche, die gehungert hatten (59 ± 1), wenn man die beiden genannten Gruppen miteinander verglich ($P=0,04$).

Die *gar-3* (RNAi) Tiere (N=40) zeigten unter Einfluß von Oxotremorin vor dem Hungern eine Pharynxkontraktion von 39 ± 1 und nach dem Hungern von 40 ± 1 . Auch bei einem Vergleich dieser beiden Gruppen traten keine physiologisch relevanten Effekte auf ($P=0,011$).

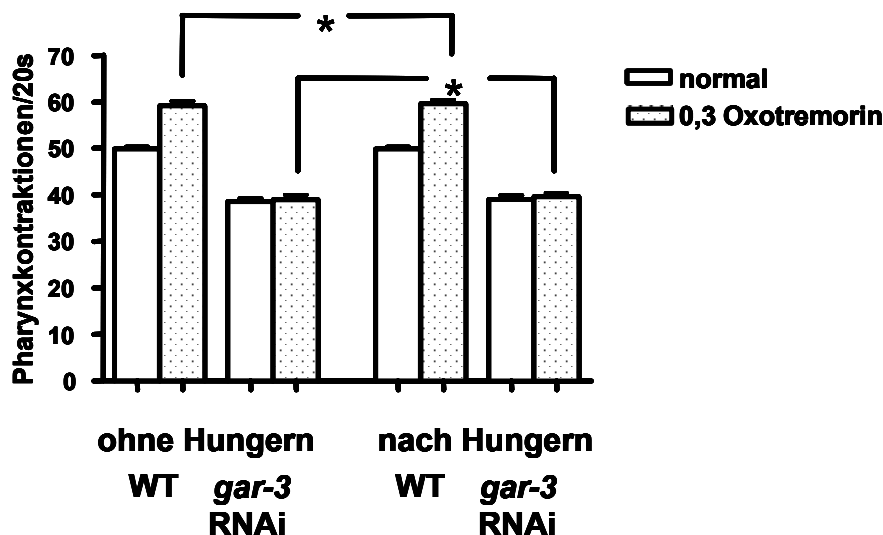


Abb. 18: Pharynxkontraktionen des Wildtyps (WT) und *gar-3* RNAi pro Zeiteinheit ohne bzw. nach Hunger sowie unter Einwirkung von Oxotremorin.

3.1.3.12 Möglicher Einfluß des muscarinischen Rezeptors GAR-3 auf weitere Verhaltensweisen

Ein weiteres prominentes Verhalten bei *C. elegans* ist die Lokomotion in Form von Schlängelbewegungen. Daher wurden bei Wildtyptieren die Schlängelbewegungen pro 20 Sekunden quantifiziert (Abb. 19). Sie zeigten 17 ± 1 Schlängelbewegungen pro Zeiteinheit. Der Antagonist Atropin nahm auf dieses Verhalten keinen signifikanten Einfluß (15 ± 2 Bewegungen, $P=0,223$). Auch der Agonist Oxotremorin konnte diese Verhaltensäußerung nicht signifikant verändern (19 ± 1 Bewegungen pro Zeiteinheit, $P=0,451$).

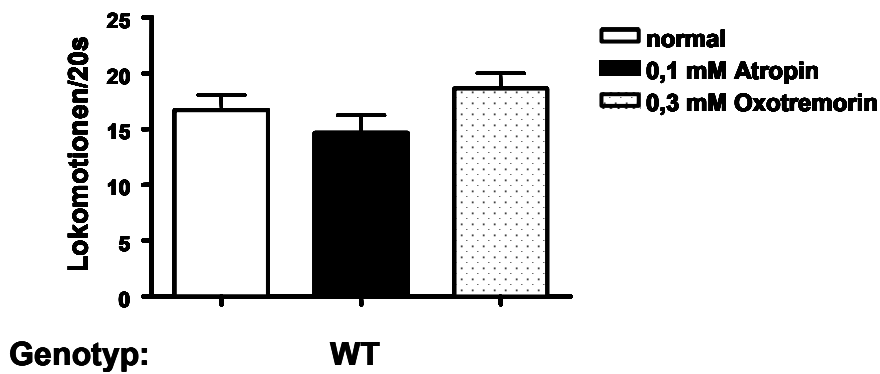


Abb. 19: Lokomotion des Wildtyps (WT) pro Zeiteinheit sowie unter Einwirkung von Atropin bzw. Oxotremorin.

3.1.4 Lokalisation der Expression der beiden Rezeptorgene *gar-1* und *gar-3*

Mit Hilfe der Expression von *gar-1::gfp* (Linie von Guido Schramm im Rahmen einer Diplomarbeit in der Arbeitsgruppe Gewecke erstellt) und *gar-3::gfp* konnte in den jeweiligen transgenen Linien die Lokalisation von *gar-1* und *gar-3* nachgewiesen werden. *Gar-1* wurde nur in den IL1- oder IL2-Neuronen exprimiert (Abb. 20). Man erkennt zweifelsfrei drei einzelne Neuronenpaare (Sechsnuronensymmetrie). Da sowohl die IL-1- und die IL-2-Neurone diese Sechsfachsymmetrie besitzen und sie räumlich dicht beieinander liegen, sind sie kaum zu unterscheiden.

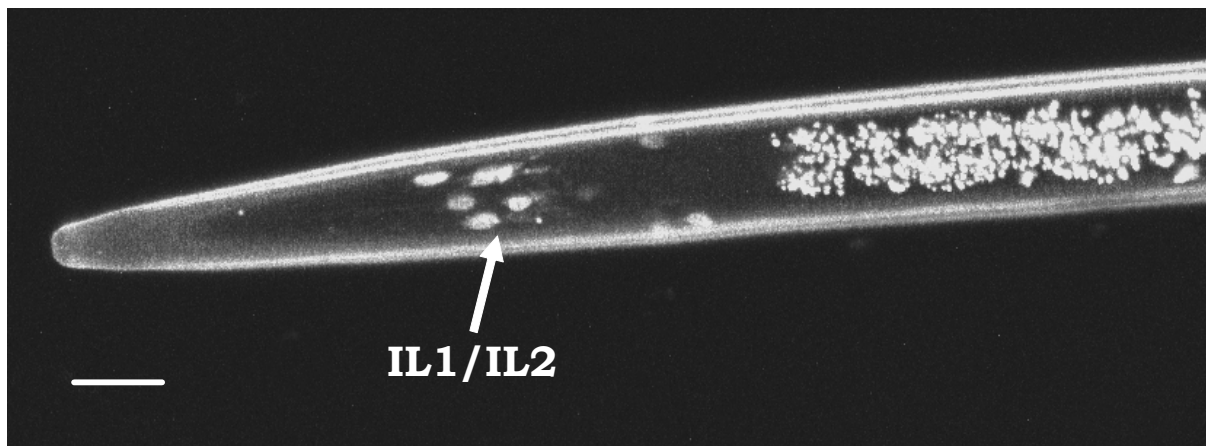


Abb. 20: Konfokale Aufnahme (Ventralansicht) des Expressionsortes von *gar-1::gfp* des Larvalstadiums von *C. elegans*, (Maßstab: 10 μm).

Gar-3 wird in einer größeren Anzahl von Zellen exprimiert (Abb. 21), und zwar im Schwanz im PLM-Neuron (stark exprimiert), im mittleren Teil des Tieres im ALM-Neuron (schwach exprimiert) und im RIF-Neuron. Im Kopfbereich wurde *gar-3* in den Neuronen AVK, RME (wahrscheinlich) und IL1 oder IL2 sowie wenigen weiteren unidentifizierten Neuronen exprimiert. Im anterioren Bulbus des Pharynx war *gar-3* in folgenden Neuronen lokalisiert: I3, M4, I2 und NSM. Im posterioren Bulbus findet man *gar-3* in den Neuronen I5, M2 und I6 (schwach exprimiert).

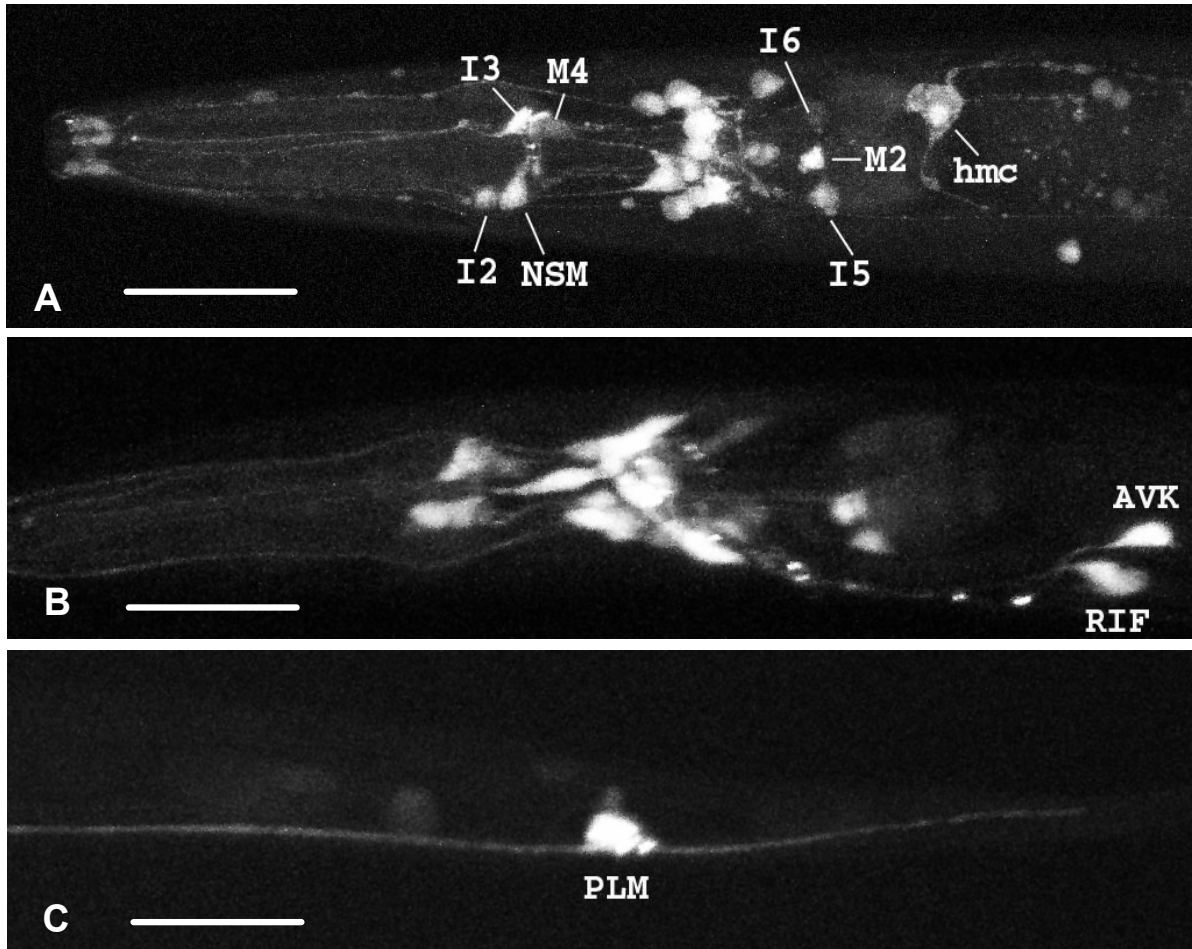


Abb. 21: Konfokale Aufnahmen der Expressionsorte von *gar-3::gfp* in Larvalstadien von *C. elegans*. A: Pharynx (Ventralansicht). B: Hinterer Pharynxbereich (Ventralansicht). C: Posteriorer Bereich (Schwanz, Lateralansicht), (Maßstab: 10 µm).

Aufgrund eines Literaturabgleiches (Alfonso et al. 1993 u. Riddle et al. 1997) wurde dann festgestellt, daß die *gar-3* exprimierenden Pharynxneurone M4, M2 und I6 ebenfalls cholinerg sind, weil sie die Cholin-Acetyltransferase (CHA-1) exprimieren, die Acetylcholin synthetisiert (siehe Tab. 2).

Zelle	Zelltyp	Lage	Neurotransmitter Acetylcholin	Cholinerge Coexpression
PLM (post. laterale Mikrotubulizellen)	sensory Neuron	Schwanz	unbekannt	
ALM (ant. laterale Mikrotubulizellen)	sensory Neuron	mittlerer Körperbe- reich	unbekannt	α -Untereinheit von nAChR (DEG-3)
RIF	Ring- inter- neuron	mittlerer Körperbe- reich	unbekannt	
AVK	Inter- neuron	Kopf	unbekannt	
RME	Ring- moto- neuron	Kopf	unbekannt	
IL1/IL2 (innerlabiales Neuron)	sensory Neuron	Kopf	unbekannt	α -Untereinheit von nAChR (DEG-3)
I3	Inter- neuron	Pharynx (ant. Bulbus)	unbekannt	
M4	Moto- neuron	Pharynx (ant. Bulbus)	ja	choline Acetyltrans- ferase (CHA-1)
I2	Inter- neuron	Pharynx (ant. Bulbus)	unbekannt	
NSM (neurosekre- torisches Motor- neuron)	Moto- neuron	Pharynx (ant. Bulbus)	unbekannt	
I5	Inter- neuron	Pharynx (post. Bulbus)	unbekannt	
M2	Moto- neuron	Pharynx (post. Bulbus)	ja	choline Acetyltrans- ferase (CHA-1)
I6	Interne uron	Pharynx (post. Bulbus)	ja	choline Acetyltrans- ferase (CHA-1)
hmc (mesodermale Kopfzelle)	Funk- tion unbe- kannt	Pharynx (post. Bulbus)	unbekannt	

Tab. 2. : *Gar-3* exprimierende Neurone und deren weiteren Eigenschaften (Tabelle zusammengestellt aus den Datenbanken <http://www.wormbase.org> und <http://www.wormatlas.org> sowie den Veröffentlichungen von Riddle et al. 1997 und Alfonso et al. 1993).

3.1.16 Konnektivität im Pharynx von *C. elegans*

Im Pharynx von *C. elegans* befinden sich 20 Neurone, deren Verschaltung untereinander und auf die entsprechenden pharyngealen Muskeln bekannt ist (Albertson et al. 1976, siehe Tab. 3). Deshalb ist es möglich, ein Verschaltungsdiagramm der *gar-3* exprimierenden Neurone aufzuzeichnen (Abb. 22). Hieraus ergibt sich dann das neurale Netz, das die Verhaltensweise „Pharynxkontraktion“ bedingt.

	Anzahl der Zellen		Anzahl der Zellen
Motoneurone		Interneurone	
M1	1	I1	2
M2	2	I2	2
M3	2	I3	1
M4	1	I4	1
M5	1	I5	1
		I6	1
andere Neurone			
NSM (neurosekretorisches Motoneuron)	2		
M1 (Moto-Interneuron)	1		
MC (Marginalzellneuron)	2		

Tab. 3: Anzahl und Art der Neurone, die im Pharynx von *C. elegans* vorliegen (Albertson et al. 1976).

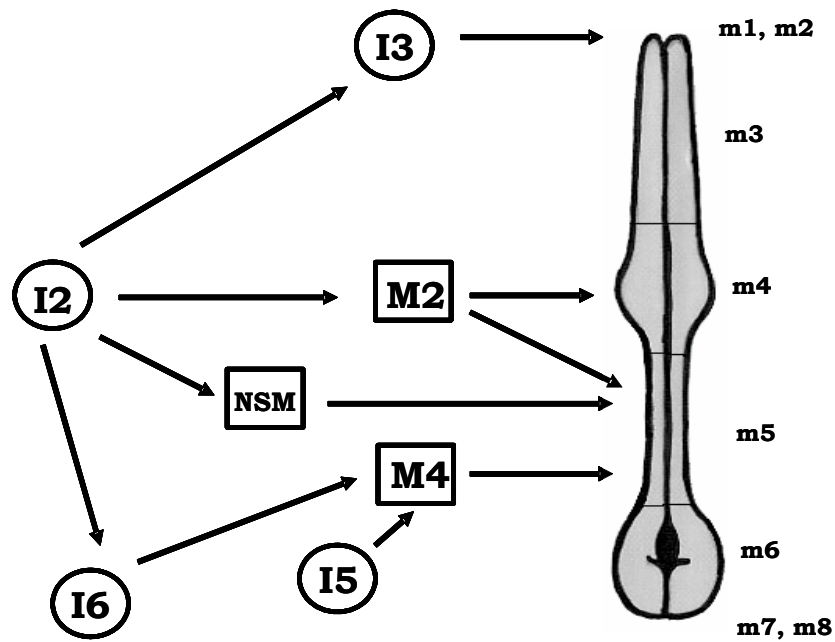


Abb. 22: Verschaltung der *gar-3* exprimierenden Neurone im Pharynx von *C. elegans*: M Motoneuron, Interneuron, m Muskelzelle.

I

3.2 Putative Octopaminrezeptoren

3.2.1 Der SER-3 Rezeptor bei *C. elegans*

Außerdem wurde mit dem Rezeptor SER-3 gearbeitet. Für eine eindeutige Klassifizierung des Rezeptors sind experimentelle Daten vonnöten. Deshalb ist zunächst eine phylogenetische Analyse mit Aminosäuresequenzen verschiedener Octopaminrezeptoren von Evertibraten durchgeführt worden (Abb. 23). Es zeigte sich hierbei, daß die Sequenz von SER-3 in Beziehung zur Gruppe der klassischen Octopaminrezeptoren steht (Bootstrap von 73).

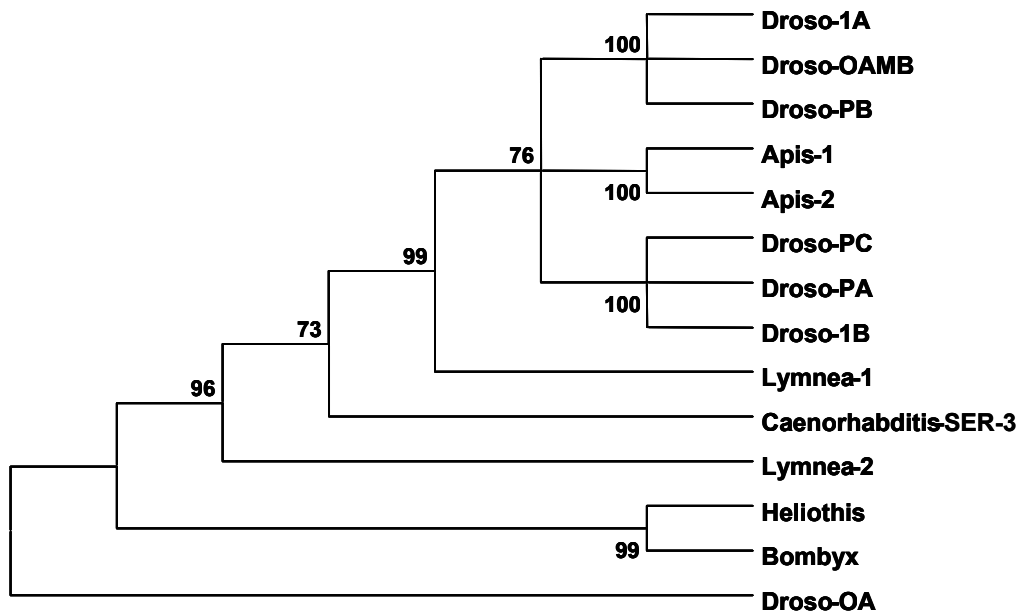


Abb. 23: Phylogenetische Analyse von putativen Octopaminrezeptoren mit Hilfe von MEGA version 2.1 (Kumar et al. 2001). *Droso Drosophila*.

3.2.1.1 SEAP-Assay

Um die pharmakologischen Eigenschaften von SER-3 näher zu bestimmen, wurde der Rezeptor heterolog exprimiert und seine pharmakologischen Eigenschaften sind mit Hilfe des SEAP-Assays untersucht worden (Abb. 24). Dabei wurden verschiedene Liganden getestet: Octopamin, Tyramin, Dopamin, Serotonin und Histamin.

Es zeigte sich, daß es nur bei der Aktivierung des Rezeptors durch den Liganden Dopamin ein signifikantes Signal im Vergleich zur Kontrolle gab ($10\ 465 \pm 684$ (RFU), und zwar bei den Dopaminkonzentrationen 10^{-8} M ($22\ 541 \pm 1210$ relative Fluoreszenzeinheiten (RFU), $P = 0,008$) und 10^{-10} M (20510 ± 732 RFU, $P = 0,001$).

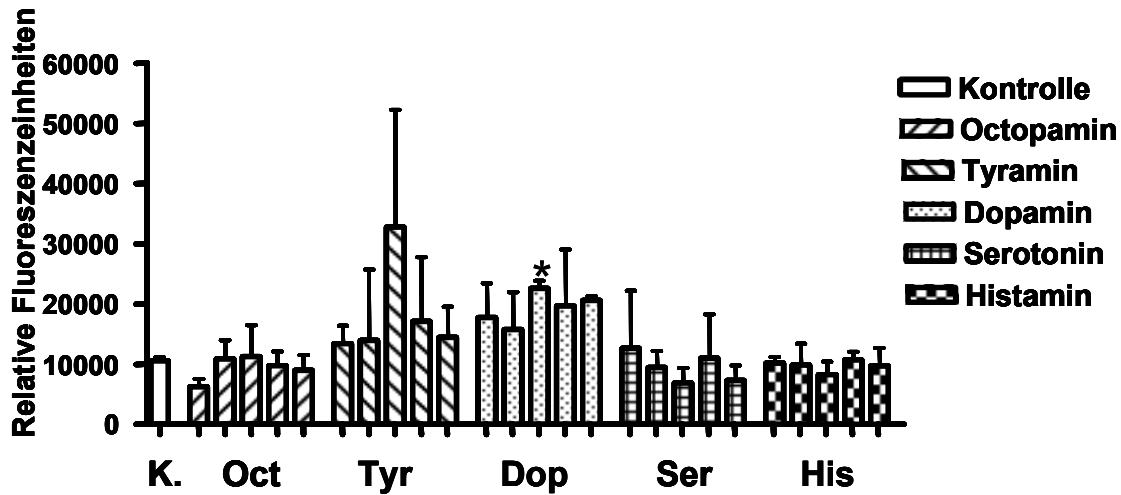


Abb. 24: Pharmakologisches Profil von SER-3 (alle Neurotransmitter in Konzentrationen von 10^{-6} M bis 10^{-10} M); K Kontrolle, Oct Octopamin, Tyr Tyramin, Dop Dopamin, Ser Serotonin, His Histamin.

3.2.1.2 Transgene Linie von SER-3

Der Expressionsort von *ser-3* wurde ebenfalls mit einer *ser-3::gfp*-Linie bestimmt, die Herr Dr. Leon Avery (University of Texas Southwestern Medical Center, Department of Molecular Biology) zur Verfügung gestellt hat. Es wurde hierbei deutlich, daß eine Vielzahl von Neuronen im vorderen Teil des hinteren Bulbus markiert sind (Abb. 25). Darunter sind einige Amphid-Neurone und Interneurone. Desweiteren steht für SER-3 ein Stamm zur Verfügung, der im Gen *ser-3* mutiert wurde (betroffenes Gen *ser-3*, Genotyp *ser(ad1774)* I). Leider zeigte diese Mutante keinen prägnanten Phänotyp.

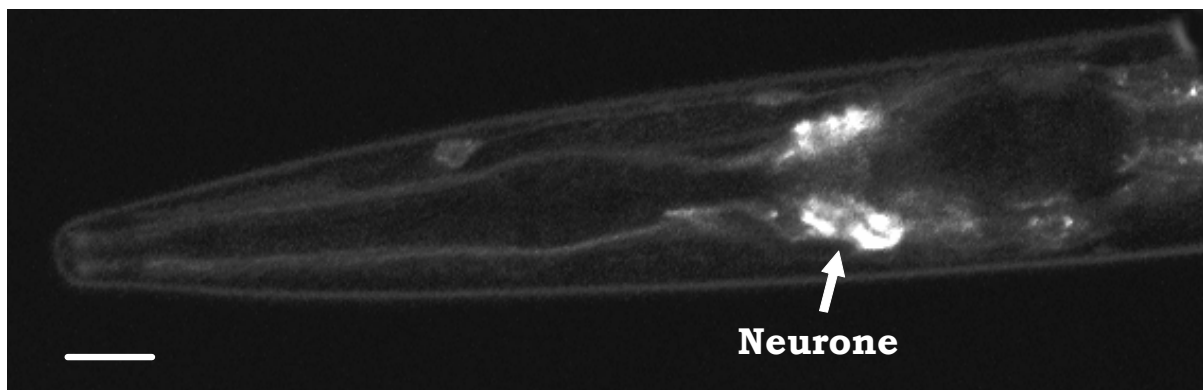


Abb. 25: Konfokale Aufnahme (Ventralansicht) des Expressionsortes von *ser-3::gfp* in zwei Neuronenclustern des Larvalstadiums von *C. elegans*, (Maßstab: 10 μ m).

3.2.2 Putativer Octopaminrezeptor von *D. melanogaster*

3.2.2.1 Phylogenetische Analyse

In der Datenbank des National Center for Biotechnology Information, Bethesda, USA existieren mehrere Sequenzen, die als Octopaminrezeptor bei *Drosophila* und anderen Evertebraten geführt werden. Einige davon gelten als experimentell bestätigte Octopaminrezeptoren. Die prominentesten unter ihnen wurden daher herausgegriffen und phylogenetisch analysiert (Abb. 23).

Es zeigte sich, daß es für *Drosophila* zwei Gruppen von Sequenzen gibt. Die eine Gruppe – im weiteren Verlauf mit Droso-OAMB benannt - setzt sich aus den hier folgendermaßen benannten Sequenzen zusammen: Droso-1A (von Baumann, Forschungszentrum Jülich in der Datenbank abgelegt), Droso-OAMB (Han et al. 1998) , Droso-PB (Adams et al. 2000). Diese Gruppe wird mit einem Bootstrapwert von 100 gestützt.

Auf der anderen Seite gibt es eine Gruppierung von folgenden Sequenzen, die im weiteren Verlauf als Droso-1B benannt wird: Droso-PA, Droso-PC (beide Adams et al. 2000) und Droso-1A (von Baumann Forschungszentrum Jülich in der Datenbank abgelegt). Dieser Zweig des Baumes ist ebenfalls mit einem Wert von 100 abgesichert.

Untereinander sind die beiden Gruppen mit einem ebenfalls hohen Wert miteinander verbunden, der bei 76 liegt. Zwei von *Apis* abgelegte Sequenzen sind untereinander wiederum sehr selbstähnlich, da sie auch einen Bootstrapwert von 100 besitzen. Eine Sequenz von *Lymnea* – Lymnea-1 – hat zur gesamten Octopaminrezeptorgruppe von *Drosophila* ebenfalls einen hohen Bootstrapwert (99).

Die Sequenzen Lymnea-2, ein weiterer putativer Octopaminrezeptor von *Drosophila* (Droso-OA) sowie jeweils eine Sequenz von *Heliothis* und *Bombyx* besitzen nach dieser Analyse keinen Bootstrap zur Gruppe der klassischen Octopaminrezeptoren.

3.2.2.2 SEAP-Assay

Die pharmakologische Untersuchung des Rezeptors Droso-1B ergab, daß dieser Octopamin als Ligand bindet. Es kommt dadurch zur einer signifikanten Signalerhöhung gegenüber der Kontrolle (466 ± 40 RFU), wenn Octopamin in einer Konzentration von 10^{-6} M (824 ± 157 , $P = 0,0188$) angeboten wurde (Abb. 26). Bei Zugabe des Liganden NC7, der ein synthetischer Agonist für Octopaminrezeptoren aus der Stoffklasse der Phenyliminoimidazolidine (Roeder et al. 1990) ist, ergab sich ebenfalls eine signifikante Signalerhöhung gegenüber der Kontrolle (2049 ± 91 , $P < 0,0001$), und zwar bei einer Gabe von 10^{-5} M NC7.

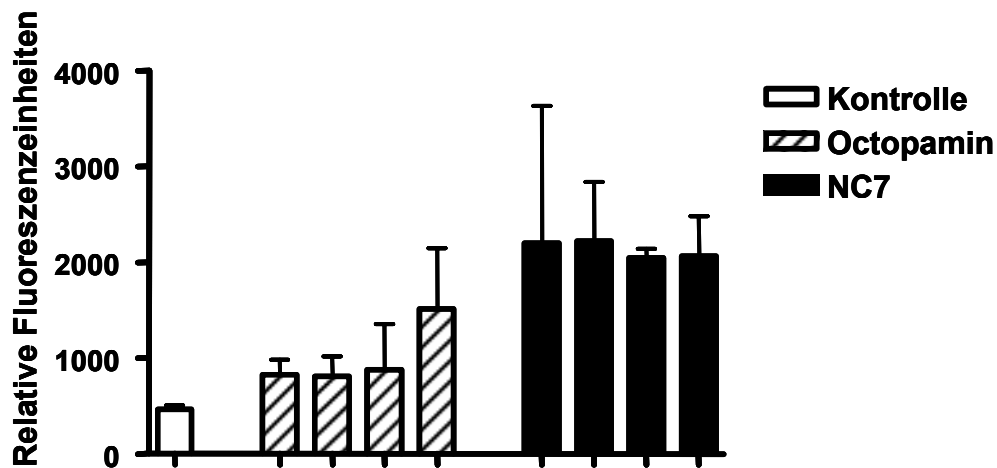


Abb. 26: Pharmakologische Untersuchung des Octopaminrezeptors Droso-1B von Drosophila (beide Liganden in Konzentrationen von 10^{-3} M bis 10^{-6} M).

3.2.2.3 *In-situ*-Hybridisierung

Zur Lokalisation des Octopaminrezeptors Drosophilin-1B im Modell *Drosophila* wurde mit diesem Rezeptor eine *in-situ*-Hybridisierung durchgeführt. Es zeigte sich auf frontalen Kopfschnitten von *Drosophila*, daß Drosophilin-1B ubiquitär im Nervensystem verteilt ist (Abb. 27). Als besonderer Vorkommensort sei hier die Retina, Medulla und Lobula erwähnt. Die Kontrollen waren negativ (Ergebnis nicht gezeigt).

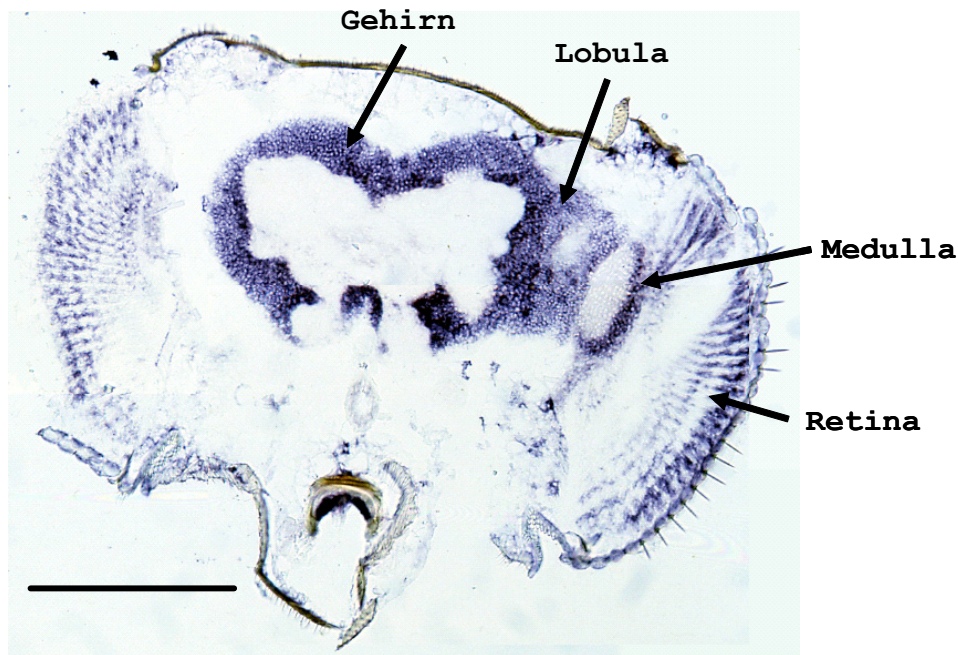


Abb. 27: *In-situ*-Hybridisierung auf einem frontalen Kopfschnitt von *Drosophila* mit der Sonde für den Rezeptor Drosophilin-1B, (Maßstab: 50 μ m).

3.2.2.4 Reverse Transkription

Zur Absicherung der durch *in-situ*-Hybridisierung gewonnenen Ergebnisse wurden einzelne Gehirnapartee von *Drosophila* präpariert (Fujita et al. 1987) und aus diesem Material cDNA angefertigt. Aus dieser cDNA wurde dann mit spezifischen Primern für Droso-1B amplifiziert (Abb. 28). Droso-1B zeigte bei allen sieben Gewebetypen ein Signal, d.h. dieser Rezeptor wurde hier exprimiert, was sehr gut mit den Ergebnissen der *in-situ*-Hybridisierung harmonisiert, die ja eine ubiquitäre Verteilung im Nervensystem lieferte.

Die hier dargestellten Gehirnbereiche sind der mittlere Gehirnbereich (hier liegen die Pilzkörper), die Medulla, die Lamina und die Retina. Auch im Antennengewebe sowie in der embryonalen Schneider-2 Zelllinie von *Drosophila* tritt Droso-1B auf.

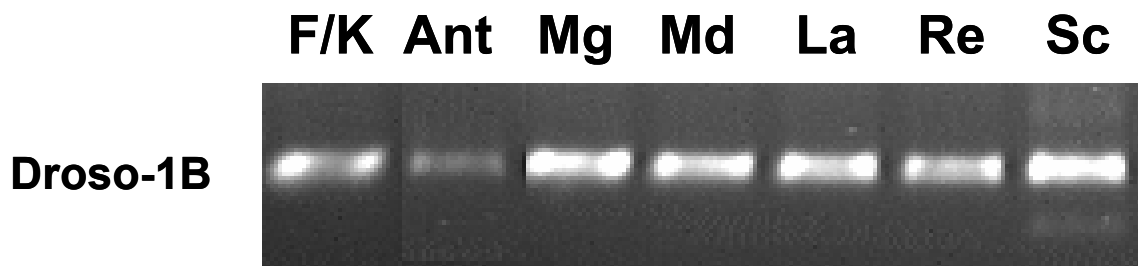


Abb. 28: Nachweis des Octopaminrezeptors Droso-1B in unterschiedlichen Geweben von *Drosophila*. F/K Fliege ohne Kopf, Ant Antennen, Mg mittlerer Gehirnbereich, Md Medulla, La Lamina, Re Retina, Sc Schneider-2 Zelllinie.

3.2.2.5 Immunhistologie

Nach der Beschreibung der Lage der Octopaminrezeptoren im zentralen Nervensystem einer adulten *Drosophila*, war es noch von Interesse zu klären, wo die Octopamin sezernierenden Zellen liegen. Es wurde dazu mit einem handelsüblichen Antikörper gegen Octopamin gearbeitet. Die Ergebnisse sind vergleichbar mit denen, die Monastirioti et al. (1995) mit einem nicht kommerziell erwerbbaeren Antikörper erreicht haben (Abb. 29). Die Kontrollen waren negativ (Ergebnis nicht gezeigt).

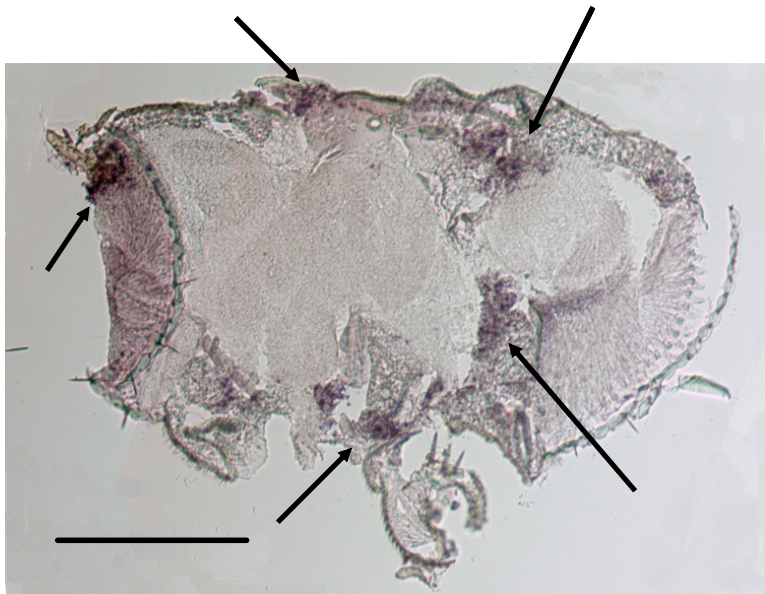


Abb. 29: Immunhistologie auf einem frontalen Kopfschnitt von *Drosophila* mit einem Anti-Octopamin Antikörper, (Maßstab: 50 μm). Cluster der octopaminhaltigen Zellen mit Pfeilen gekennzeichnet.

4 Diskussion

4.1 Muscarinische Neurotransmission bei *C. elegans*

C. elegans besitzt die Fähigkeit, in Form einer Diapause sich verschlechterten Umweltbedingungen - wie z.B. wenig Nahrung und hohen Temperaturen - zu entziehen, indem *C. elegans* den Stoffwechsel reduziert. Wenn sich während des Larvalstadiums 1 (L1) die Umweltbedingungen verschlechtern, sekretieren die Tiere ein Pheromon, was dazu führt, daß das Larvalstadium 3 (L3) zu einem Dauerlarvenstadium wird. Tissenbaum et al. (2000) konnten ganz allgemein zeigen, daß die muscarinische Neurotransmission bei *C. elegans* diese Diapause beendet. Sie machten aber keine Aussagen dazu, wie dies detailliert funktioniert.

Lackner et al. (1999) werden da genauer. Sie haben ein Modell vorgestellt, daß die Neurotransmitterabgabe an der neuromuskulären Synapse bei *C. elegans* erklärt. Dies wird ihrer Ansicht nach durch einen präsynaptischen Signalweg vermittelt, bei dem die G-Protein-Untereinheit $G_q\alpha$ (EGL-30), die Phospholipase $C\beta$ (EGL-8) und das Diacylglycerol (DAG) bindende Protein UNC-13 eine Rolle spielen. UNC-13 bindet dazu direkt an das Protein Syntaxin (Richmond et al. (2001) - welches Teil des SNARE-Komplexes ist, der die Vesikelexocytose einleitet – und überführt es in eine aktive, geöffnete Konformation. Dieser Effekt wird ihrer Meinung nach durch die Proteinkinase C unterstützt (Stevens et al. 1998).

Von den Autoren wird angenommen, daß DAG diese Exocytose direkt reguliert. Ausschlaggebend für diesen Prozeß ist nach ihrer Ansicht ein muscarinischer Acetylcholinrezeptor. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, daß GAR-3 dieser Rezeptor ist und bestätigen den von Lackner et al. (1999) vorgezeichneten Signalweg.

4.1.1 Der muscarinische Acetylcholinrezeptor GAR-3

Die phylogenetische Analyse der potentiellen muscarinischen Acetylcholinrezeptoren (mAChR) bei *C. elegans* weist nur GAR-3 sicher als mAChR aus, denn für GAR-1 und GAR-2 waren keine Signifikanzen in Form eines Bootstrapwertes berechenbar.

Lee et al. (2000) mußten feststellen, daß GAR-1 und GAR-2 sich in der Affinität zu muscarinischen Liganden gegenüber GAR-3 unterscheiden. Der Antagonist muscarinischer Acetylcholinrezeptoren Atropin wirkte ebenso wie der Agonist Oxotremorin effektiver bei GAR-3 als bei GAR-1 und GAR-2. Weiterhin wurde GAR-2 nicht von Atropin inhibiert.

Die hier vorgestellten pharmakologischen Eigenschaften der drei putativen muscarinischen Acetylcholinrezeptoren schienen also mehr als ungewiß zu sein. Sie wurden daher transient, heterolog exprimiert und es wurde mit ihnen ein Radiorezeptor-Assay durchgeführt. Da nur GAR-3 ³H-QNB band und hier dann eine kompetitive Verdrängung von ³H-QNB durch den eigentlichen Liganden Acetylcholin, den Antagonisten Atropin und den Agonisten Oxotremorin möglich war, ist es eindeutig, daß GAR-3 der einzige Rezeptor unter diesen dreien ist, der ein muscarinisches Profil besitzt. Hwang et al. (1999) haben für GAR-3 mit Hilfe eines Radioliganden-Assays ein vergleichbares Profil erstellt.

Lee et al. (2000) konnten außerdem zeigen, daß die drei Kandidaten, wenn sie in *Xenopus* Oocyten mit GIRK1-Kanälen koexprimiert worden sind, unterschiedliche Eigenschaften besaßen. GAR-1 und GAR-2 aktivierten diese Kanäle, wohingegen GAR-3 die endogenen Cl⁻ Kanäle der *Xenopus* Oocyten stimulierte.

4.1.2 *In vivo* Charakterisierung der Rezeptoren GAR-1, GAR-2 und GAR-3

Um die gesammelten Erkenntnisse *in vivo* zu überprüfen, sind mit Hilfe der RNAi-Technik die drei Kandidaten für muscarinische Acetylcholinrezeptoren durch post-transkriptionale Genunterdrückung supprimiert worden. Es folgten anschließend Verhaltensversuche, um dokumentieren zu können, ob sich der Phänotyp verändert hat. Es zeigte sich, daß sich die Pharynxkontraktion veränderte.

Hierbei wurde deutlich, daß GAR-3 als einziger der drei untersuchten Rezeptoren Einfluß auf die Pharynxkontraktion nimmt. Sobald GAR-3 durch die RNAi-Technik supprimiert wurde, konnte bei den Tieren keine Verhaltensveränderung durch Oxotremorin bzw. Atropin hervorgerufen werden. Diese Effekte waren nicht mit einer Supprimierung von GAR-1 oder GAR-2 zu erreichen. Sie zeigten also auch *in vivo* keine Eigenschaften, die muscarinischen Acetylcholinrezeptoren zugeschrieben werden können.

Die *gar-2* defizienten Tiere (Stamm RB756) reagierten auf Atropin, was auch wieder dafür spricht, daß GAR-2 nicht der Kandidat für die muscarinische Neurotransmission in *C. elegans* ist, denn sonst hätte das Signal nicht weitergeleitet werden dürfen. Die Tiere hätten nicht mit Verhaltensänderungen auf Atropin bzw. Oxotremorin reagieren dürfen. Die bei diesem Stamm auftretende unerwartende Reduktion der Kontraktionen bei Gabe von Oxotremorin unterhalb des Atropin-Wertes belegt, daß die maximale Kontraktionsleistung bei 63 ± 1 Kontraktionen pro 20 Sekunden liegt, denn die zeigte RB756 als Ausgangswert. Bei Gabe des Agonisten – auch in einer niedrigeren Konzentration - war eine weitere Steigerung nicht mehr möglich und die Werte sanken rapide. Es scheint so zu sein, daß GAR-2 das System Pharynxkontraktion stabil hält bzw. begrenzt: Wenn dieses Gen nicht mehr aktiv ist, nähert sich die Pharynxkontraktion dem maximal möglichen Wert, was die hohen Ausgangswerte belegen. In diesem Fall war es aber von Vorteil, sich nicht nur auf die RNA-Interferenz als Methode zu verlassen, denn der Phänotyp wurde nur durch einen kompletten Funktionsverlust von GAR-2 sichtbar.

Das Larvalstadium L2 von RB756 zeigte noch nicht diese erhöhten Pharynxkontraktionswerte, so daß davon ausgegangen werden kann, daß das System, das aus den Teilen Induzieren (GAR-3) und Stabilisieren (GAR-2) besteht, erst im Adultstadium zum Tragen kommt, obwohl sowohl GAR-2 als auch GAR-3 in allen Entwicklungsstadien von *C. elegans* vorkommen (Suh et al. (2001) und Park et al. (2003)). Die erhöhte Pharynxkontraktion hat keinesfalls den Ernährungszustand der Tiere verbessert, denn ihr Längen-Breiten-Index war signifikant größer als der des Wildtyps. Dies könnte dadurch begründet sein, daß die Tiere hektischer als der Wildtyp erschienen und infolge mehr Energie verbrauchten. Die *gar-3* defizienten Tiere (Stamm VU78) folgten wieder der Logik, daß GAR-3 der gesuchte muscarinische Acetylcholinrezeptor ist, denn diese Tiere zeigten keine Verhaltensveränderung bei Gabe von Atropin bzw. Oxotremorin.

4.1.3 Der Signalweg des GAR-3 Rezeptors

Da muscarinische Rezeptoren G-Protein-gekoppelte Rezeptoren sind, schließt sich die Frage an, welches $G\alpha$ -Protein an der Signaltransduktion beteiligt ist. Man weiß von humanen muscarinischen Acetylcholinrezeptoren (M_1 und M_3), daß sie mit den G-Proteinen $G_q\alpha$ und $G_o\alpha$ interagieren (Gudermann et al. 1997).

Bei *C. elegans* ist nun schon seit längerem bekannt, daß $G_o\alpha$ (GOA-1) im Zusammenspiel mit Serotonin vielfältige Verhaltensweisen moduliert. Serotonin inhibiert die Lokomotion sowie die Defäkation, aber gleichzeitig stimuliert es die Pharynxkontraktion und die Eiablage (Mendel et al. (1995) u. Segalat et al. (1995)). Lackner et al. (1999) postulieren aufgrund wissenschaftlicher Arbeiten von Miller et al. (1999), daß der von ihnen aufgezeigte $G_q\alpha$ (EGL-8)- Signalweg durch Serotonin über $G_o\alpha$ (GOA-1) negativ reguliert wird.

Nurrish et al. (1999) konnten dann ebenfalls zeigen, daß die synaptische Transmission durch Serotonin inhibiert und dieser Effekt über $G_o\alpha$ (GOA-1) und die Diacylglycerolkinase (DGK) vermittelt wird. Hierzu kann Diacylglycerol (DAG) nun seinerseits phosphoryliert werden, und zwar durch die DGK, so daß Phosphatidsäure entsteht und das DAG-Signal damit unterbrochen ist. An dieser Stelle ist also eine Regulierung des aufgezeichneten Signalweges möglich (Van Blitterswijk et al. 2000).

Es ist bekannt, daß im Genom von *C. elegans* 20 verschiedene $G\alpha$ -Proteine existieren, wovon vier Proteine Homologien zu entsprechenden humanen Proteinen aufweisen, und zwar GPA-12 (humanes Homolog: $G_{12}\alpha$), GOA-1 (humanes Homolog: $G_{o2}\alpha$), EGL-30 (humanes Homolog: $G_q\alpha/G_{11}\alpha$) und GSA-1 (humanes Homolog: $G_{s3}\alpha$) (Jansen et al. 1999). Außerdem ist EGL-30 experimentell als funktionale $G_q\alpha$ -Einheit ausgewiesen worden (Brundage et al. 1996). Diese vier Proteine - $G_{12}\alpha$, $G_o\alpha$, $G_s\alpha$ und $G_q\alpha$ – spielen eine Rolle bei Muskelaktivitäten, so daß sie in den Mittelpunkt der weiteren Untersuchungen rücken, da die Pharynxkontraktion auf Muskelkontraktion zurückzuführen ist (Jansen et al. 1999).

Es zeigte sich, daß $G_q\alpha$ (EGL-30) der Kandidat ist, über den GAR-3 sein Signal weitervermittelt, da die Tiere unter RNAi-Bedingungen in Bezug auf die Pharynxkontraktion physiologisch nicht relevant auf den Agonisten Oxotremorin und nicht auf den Antagonisten Atropin reagierten. Auch die Verhaltensversuche mit den Deletionsmutanten bestätigten dies, weil nur der *egl-30* defiziente Stamm (MT1434) keine Verhaltensveränderung bei Gabe von Atropin oder Oxotremorin zeigte.

Aus dem humanen System ist weiterhin bekannt, daß die G-Protein-Untereinheiten von Rezeptoren verschiedene Funktionen wahrnehmen: $G_s\alpha$ stimuliert das Enzym Adenylylcyclase (AC), $G_q\alpha$ aktiviert die Phospholipase C β (PLC β), $G_o\alpha$ inhibiert die AC und $G_{12}\alpha$ aktiviert ebenfalls die PLC β (Neubig et al. 2002).

Es wurde daher experimentell der Frage nachgegangen, wie das Signal, daß von GAR-3 über $G_q\alpha$ (EGL-30) weitergeleitet wird, weitervermittelt wird und ob die PLC β dabei eine tragende Rolle spielt, was Lackner et al. (1999) und Hwang et al. (1999) vermuten lassen. Die Verhaltensversuche mit dem PLC β /*egl-8* defizienten Stamm zeigten deutlich, daß die Tiere das Signal über EGL-8 weiterleiten, denn auch in diesem Fall reagierten sie nicht physiologisch relevant auf Oxotremorin und nicht signifikant auf Atropin. Das Signal konnte also nicht mehr weitergeleitet werden, da die Tiere in Bezug auf *egl-8* defizient sind.

Von der PLC β ist bekannt, daß sie Phosphatidylinositol-bisphosphat (PIP $_2$) in die beiden Produkte Inositoltrisphosphat (IP $_3$) und Diacylglycerol (DAG) spaltet. IP $_3$ könnte dann an IP $_3$ -abhängige Ca $^{2+}$ -Kanäle der Membran des Endoplasmatischen Reticulum (ER) binden und dadurch die Ausschüttung von Ca $^{2+}$ auslösen. Auch in *C. elegans* gibt es einen IP $_3$ -Rezeptor, der ITR-1 heißt. Da dieser Rezeptor im Pharynx exprimiert wird (Baylis et al. 1999), könnte er ebenfalls eine Rolle bei der Pharynxkontraktion spielen.

Walker et al. (2000) sind nach RNAi-Experimenten bezüglich *itr-1* der Auffassung, daß IP $_3$ über den IP $_3$ -Rezeptor die Pharynxkontraktion in Anwesenheit von Nahrung nach oben reguliert. Was sie bei diesen Experimenten definitiv zeigen konnten, war, daß die Pharynxkontraktion gegenüber dem Wildtyp reduziert ist. Nach wie vor sprechen die Tiere aber auf Serotonin an, d.h. sie erhöhen bei Serotoningabe die Pharynxkontraktion, so daß *itr-1* nicht ursächlich an der Modulation der Pharynxkontraktion beteiligt sein kann.

Hwang et al. (1999) konnten im Zellkultursystem nachweisen, daß GAR-3 wahrscheinlich an die Phospholipase C β (PLC β) gekoppelt ist, da GAR-3 in ihrer Versuchsanordnung die Hydrolyse von Phosphatidylinositol zu Inositolphosphat aktiviert, was dafür sprechen würde, daß IP $_3$ die Ca $^{2+}$ -Ausschüttung aus Ca $^{2+}$ -Speichern bedingt, also wahrscheinlich über den einzigen z. Z. bekannten IP $_3$ -Rezeptor ITR-1 (Dal Santo et al. 1999).

Zur Überprüfung dieser Annahmen sind Verhaltensversuche mit Tieren durchgeführt worden, die keinen IP $_3$ -Rezeptor besitzen. Es zeigte sich, daß diese Tiere auf Oxotremorin und Atropin reagierten, die Pharynxkontraktion also entweder erniedrigten oder erhöhten, so daß IP $_3$ über den Rezeptor ITR-1 und daraus resultierender Ca $^{2+}$ -Freisetzung aus dem Endoplasmatischen Reticulum (ER) wahrscheinlich nicht direkt die Pharynxkontraktion steuert. IP $_3$ wird aber die Freisetzung von Ca $^{2+}$ aus Ca $^{2+}$ -Speichern befördert. Dieser Speicher kann auch das ER sein und auch ITR-1 der entsprechende Rezeptor. Dies hat aber nur einen indirekten Einfluß auf die Pharynxkontraktion (siehe unten).

4.1.4 Diacylglycerol (DAG) steuert die Vesikelabgabe über die Proteinkinase C-2 (PKC-2) und das regulative Vesikelexocytoseprotein UNC-13

Eine weitere Möglichkeit der Signalübermittlung ist die Signaltransduktion über Diacylglycerol (DAG). DAG kann zwei mögliche Signalfunktionen ausüben: Zum einen kann es weiter zersetzt werden, wobei Arachidonsäure entsteht, die als Signalmolekül oder zur Synthese von Eicosanoiden dient (Alberts et al. 1995). Die bedeutendere Funktion ist aber die Aktivierung der Proteinkinase C (PKC), die ihren Namen daher hat, weil sie Ca $^{2+}$ -abhängig arbeitet: Der oben beschriebene Anstieg des cytosolischen Ca $^{2+}$ -Spiegels durch IP $_3$ führt zur Veränderung der PKC im Cytosol, so daß sie sich an der Innenseite der Plasmamembran anlagern kann. Dort wird sie durch Hilfe von Ca $^{2+}$, DAG und Phosphatidylserin aktiviert (Alberts et al. 1995). DAG wird außerdem die Fähigkeit zugeschrieben, das UNC-13 Protein, was zur Neurotransmitterabgabe vonnöten ist, an der präsynaptischen Membran zu akkumulieren, was auch als sehr wahrscheinlich scheint, da UNC-13 eine DAG-Bidungsstelle besitzt (Kazanietz et al. 1995). PKC und UNC-13 könnten also die beiden Kandidaten sein, die DAG aktivieren und die dann im Konzert die Vesikelabgabe steuern. Damit wäre DAG das zentrale Molekül in diesem Zusammenhang.

An diesem Punkt ist es möglich *in vivo* (durch Verhaltensversuche) zu klären, ob DAG das eigentliche zentrale Molekül in dem Signalweg des GAR-3 Rezeptors ist. Im Genom von *C. elegans* liegen zwei Genfamilien vor, dessen Vertreter experimentell verifiziert als Proteinkinasen fungieren: TPA-1 und PKC-2 (Sano et al. (1995) u. Islas-Trejo (1997)). Die *tpa-1* Mutante veränderte aber ihr Verhalten bei Gabe von Oxotremorin und Atropin, so daß sehr wahrscheinlich ausgeschlossen werden kann, daß das Signal von DAG an TPA-1 weitergeleitet wird. Die *pkc-2* Mutante hingegen zeigte das zu erwartende Verhalten: Die Pharynxkontraktion änderte sich auch nach Gabe des Agonisten bzw. des Antagonisten nicht. Hier wird also deutlich, daß Diacylglycerol (DAG) die Proteinkinase C (PKC) bei *C. elegans* aktiviert.

Um zu überprüfen, ob DAG Einfluß auf UNC-13 nimmt, wurden zwei *unc-13* Mutanten untersucht. Beide reagierten nicht mehr auf Oxotremorin oder Atropin, so daß DAG auch auf diesem Wege Einfluß nimmt. Die PKC und UNC-13, die beide von DAG aktiviert werden, sind also essentiell an der Vesikelexocytose beteiligt.

Ein weiterer Kandidat für die Steuerung der Exocytose von Vesikeln ist das Protein UNC-31 (Avery et al. 1995). Das hierzu homologe Protein der Säugetiere ist das Ca^{2+} -bindene Protein (CAPS), das eine Rolle bei der Exocytose von Vesikeln spielt, die durch die Erhöhung der cytoplasmatischen Ca^{2+} -Konzentration ausgelöst wird (Berwin et al. 1998). Es ist daher vorstellbar, daß auch UNC-31 bei der Neurosekretion von Vesikeln eine Rolle spielt. Doch der Phänotyp der *unc-31* Mutante sprach auf Oxotremorin sowie Atropin an. Wäre UNC-31 ein entscheidendes Protein in diesem Prozeß, dann wäre der Signalweg an dieser Stelle unterbrochen und die Tiere hätten deshalb nicht mehr auf den muscarinischen Agonisten bzw. Antagonisten reagieren dürfen.

4.1.5 Weitere Eigenschaften des GAR-3 Signalweges

Zur Bestätigung der Vermutung, daß die Diacylglycerolkinase (DGK-1) nicht über den GAR-3 Signalweg sondern über einen anderen Signalweg aktiviert wird, wurden zwei *dgk-1* Mutanten untersucht. Beide reagierten nach wie vor auf den muscarinischen Agonisten, so daß es möglich ist, daß der Rezeptor GAR-3 hier keine Rolle spielt.

Zur Überprüfung der Aussage, daß Octopamin einen antagonistischen Effekt auf die Pharynxkontraktion haben soll (Horvitz et al. 1982), wurden ebenfalls Verhaltensversuche mit Octopamin, Tyramin und dem Antagonisten eines Octopaminrezeptors, Yohimbin, gemacht. Die Ergebnisse entsprachen denen von Horvitz et al. (1982): Octopamin und Tyramin reduzierten die Pharynxkontraktion, wohingegen Yohimbin keinen Einfluß zu haben schien. Außerdem wurde der *egl-8* (PLC β) defiziente Stamm auf Octopamin, Tyramin und Yohimbin-Platten untersucht. Er zeigte in Bezug auf die Pharynxkontraktion keine Verhaltensänderung, so daß stark vermutet werden kann, daß der Octopaminrezeptor sein Signal über EGL-8 vermittelt.

Um sicherzugehen, daß GAR-3 die Pharynxkontraktion nicht moduliert sondern steuert, wurden sogenannte Hungerversuche durchgeführt. Der Wildtyp und die Tiere, bei denen *gar-3* durch RNAi supprimiert worden ist, zeigten mit oder ohne Hungern dieselbe Kontraktionsrate. Der Agonist konnte weder beim Wildtyp noch bei den *gar-3* RNAi Tieren die Kontraktionen nach dem Hungern gegenüber der Gruppe ohne Hungern physiologisch relevant verändern, so daß eine Adaptation der Verhaltensweise von anderer Seite her organisiert werden muß, was wieder für Octopamin/Serotonin spricht. GAR-3 ist also allem Anschein nach der Rezeptor, der das Verhalten „Pharynxkontraktion“ initiiert.

Um einen weiteren Hinweis zu bekommen, daß GAR-3 ursächlich nur für die Verhaltensweise Pharynxkontraktion verantwortlich ist, wurde ebenfalls die Lokomotion untersucht, die auch durch Muskelaktivität erfolgt. Da sie sich nicht unter Gabe von Oxotremorin oder Atropin signifikant änderte, kann davon ausgegangen werden, daß GAR-3 hierfür nicht verantwortlich ist. Die Lokomotion scheint anders hervorgerufen zu werden und durch Dopamin bzw. Serotonin moduliert zu werden (Sawin et al. 2000).

4.1.6 Die Funktion des Pharynxnervensystems

Das Nervensystem von *C. elegans* besteht aus zwei Teilen mit unterschiedlichen Funktionen: Das somatische Nervensystem besteht im adulten Hermaphrodit aus 282 Neuronen und das Nervensystem des Pharynx, das aus 20 Neuronen besteht. Die beiden Teile des Nervensystems sind durch Gap-Junctions zwischen den somatischen RIP Neuronen und den Pharynxneuronen I1 verbunden. Wenn die RIP Neurone zerstört werden, hat das aber kaum einen Effekt auf die Pharynxkontraktion (Riddle et al. 1997). Es mag zwar eine humorale Kommunikation zwischen den beiden Teilen des Nervensystems geben, aber jeder Teil funktioniert auch ohne Interaktion. Die nervöse Kontrolle der Pharynxkontraktion unterliegt allein dem Nervensystem des Pharynx. Wenn im Pharynx alle Neurone - mit Ausnahme von M4, MC und M3 - durch Laserablation zerstört werden, ist die Kontraktion noch annähernd normal (Avery et al. (1989); Avery (1993); Raizen et al. (1995)). Es ist daher wahrscheinlich, daß diese Neurone die prinzipielle Funktion des Pharynxnervensystems ausüben.

Avery et al. (1989) konnten ebenfalls zeigen, daß bei Zerstörung von M4 die Isthmusperistaltik stoppt und die Pharynxkontraktionen langsamer und irregulär werden. Wenn laut Avery et al. (1989) alle Neurone im Pharynx, mit Ausnahme von M4, zerstört werden, dann kontrahiert sich der Pharynx weiterhin und die Tiere entwickeln sich anschließend zu fertilen Adulten. Diese Ergebnisse belegen die zentrale Stellung von M4 in der Verhaltensäußerung „Pharynxkontraktion“. Da M4 GAR-3 exprimiert (siehe transgene Linie), deckt sich diese Erkenntnis sehr gut mit den vorher gemachten Beobachtungen, daß GAR-3 die Pharynxkontraktion ursächlich initiiert.

Weiterhin wird GAR-3 auch in den neurosekretorischen Motoneuronen (NSM) exprimiert, die Albertson et al. (1976) in Verdacht hatten, einen „humoralen Faktor“ in das Pseudocoelom abzugeben, wenn ihre sensorischen Endigungen Bakterien im Lumen des Pharynx wahrnehmen. Heute ist bekannt, daß die NSM Serotonin enthalten und damit eine wichtige Rolle bei der Modulation der Pharynxkontraktion spielen dürften, denn Serotonin steigert die Kontraktion. Dieses Phänomen haben Horvitz et al. (1982) erstmals nachgewiesen. Sie wiesen außerdem darauf hin, daß Octopamin als Bioamin einen Einfluß auf die Pharynxkontraktion hat. Sie zeigten, daß die Gabe von Octopamin die Pharynxkontraktion erheblich reduzierte.

Niacaris et al. (2003) haben dann elektrophysiologisch nachgewiesen, daß Serotonin und Octopamin eine wechselseitige Modulation des Pharynx hervorrufen. Sie gehen davon aus, daß dieser Mechanismus eine Anpassung an die Verhältnisse Anwesenheit oder Abwesenheit von Nahrung ermöglicht.

Es ist also sehr gut vorstellbar, daß die NSM durch Serotoninausschüttung die Pharynxkontraktion steigern. Da die NSM ebenfalls GAR-3 exprimieren, kommt diesem Rezeptor eine größere Bedeutung auch in diesem Zusammenhang zu. GAR-3 könnte innerhalb der NSM die Ausschüttung von Serotonin anregen und so die Pharynxkontraktion erhöhen. Niacaris et al. (2003) hingegen sind der Auffassung, daß Serotonin auf die beiden Motoneurone MC und M3 Einfluß nimmt und sich dadurch das Aktionspotential des Pharynx ändert, ohne daß sie einen geeigneten Kandidaten für einen Serotoninrezeptor in diesen Zellen benennen konnten, so daß diese Aussage nicht tragfähig ist. Interessant ist auch, daß die GAR-3 exprimierenden Neurone M2, M4 und I6 die sogenannte Cholin-Acetyltransferase (CHA-1) exprimieren, das Enzym, welches Acetylcholin synthetisiert. Es kann also davon ausgegangen werden, daß GAR-3 ein stimulatorischer Autorezeptor ist.

Es bleibt festzuhalten, daß GAR-3 als exzitatorischer Autorezeptor präsynaptisch die ACh-Abgabe stimuliert. Das ACh bindet dann postsynaptisch an einen nikotinischen Acetylcholinrezeptor (nAChR). Proteine (RIC-3), die zur Reifung des nAChR nötig sind, wurden laut Angaben von Halevi et al. (2002) und Schafer (2002) in den Muskeln des Pharynx gefunden. Diese nAChR lösen dann in der Muskelmembran ein Aktionspotential aus. Lee et al. (1997) konnten zeigen, daß $\alpha 1$ Untereinheiten von spannungs-kontrollierten Ca^{2+} -Kanälen in den Pharynxmuskeln m3, m4, m5 und m7 exprimiert werden, so daß es hier zur Ausbildung eines Aktionspotentials mit Ausschüttung von Ca^{2+} und folgender Muskelkontraktion kommen kann.

Da nun bekannt ist, in welchen Neuronen GAR-3 exprimiert wird, läßt sich mit Hilfe von morphologischen Daten (Albertson et al. 1976) ein Netzwerk der GAR-3 Neurone aufzeigen, daß die Pharynxkontraktion bestimmt, wobei – wie schon erwähnt – M4 die zentrale Rolle zukommt. M4 verschaltet auf den Muskel m5. Dort wird ein spannungs-kontrollierter Ca^{2+} -Kanal exprimiert. Das ebenfalls GAR-3 exprimierende Motoneuron M2 verschaltet auf die Muskeln m4 und m5, die gleichfalls spannungs-kontrollierte Ca^{2+} -Kanäle exprimieren. So wird das Modell mit GAR-3 als vorgeschaltetem Initiator der Pharynxkontraktion abgerundet.

Abschließend sei auf die Expression der beiden anderen Rezeptoren, GAR-1 und GAR-2, hingewiesen. Die selbst angefertigte transgene GAR-1-Linie zeigte die Expression von GAR-1 in den innerlabialen Neuronen 1 oder 2 mit ihrer typischen Sechsfachsymmetrie. Diese Neurone gehören nicht zu den Pharynxneuronen und können daher keinen Einfluß auf die Pharynxkontraktion nehmen. Die vorangegangenen Versuche bestätigen dies.

Lee et al. (2000) haben eine transgene Linie vorgestellt, die die Expressionsorte von GAR-2 zeigt. Es scheint bei dieser Linie so zu sein, daß GAR-2 nicht in Pharynxneuronen exprimiert wird. Damit ist GAR-3 der einzige Kandidat, der wirklich in Pharynxneuronen exprimiert wird.

4.2 Der SER-3 Rezeptor bei *C. elegans*

Bislang wird der Rezeptor SER-3 aufgrund von Sequenzabgleichen als G-Protein-gekoppelter Rezeptor der Serotonin/Octopamin-Familie klassifiziert. Da dies zwei völlig unterschiedliche Rezeptoren sind, bedurfte es der experimentellen Klärung, zu welcher Klasse er wahrscheinlich gehört. Der Genname *ser-3* impliziert außerdem die Nähe zur serotonergen Gruppe.

Die phylogenetische Analyse erlaubt es, den Rezeptor SER-3 als octopaminergen Rezeptor zu klassifizieren, da mit bekannten Rezeptoren aus der Octopamingruppe hohe Bootstrapwerte erreicht wurden. Somit entsprach diese Analyse den Vorhersagen der Datenbanken. Für eine größere Klarheit sind dann noch Zellkulturexperimente durchgeführt worden. Der Rezeptor zeigte ganz deutlich ein Signal bei Dopamin, aber nicht bei Serotonin oder Octopamin. Es erscheint also als viel wahrscheinlicher, daß es sich hier um einen Dopaminrezeptor handelt.

Der Expressionsort von *ser-3* konnte aufgrund der transgenen Linie nicht genau bestimmt werden, da die Zellkörper der *ser-3* exprimierenden Neurone dicht nebeneinander lagen und eine genaue Auflösung bzw. Zuordnung der einzelnen Zellen nicht eindeutig möglich war. Im Vorderbereich (anterior) des Tieres sind aber einige sogenannte Amphid-Neurone und Interneurone markiert. Der Stamm, bei dem *ser-3* mutiert worden ist und der damit seine Funktion verloren hat, zeigte leider keinen Phänotyp, so daß nicht geklärt werden konnte, welches Verhalten SER-3 beeinflusst.

4.3 Der Octopaminrezeptor bei *Drosophila*

Phylogenetische Analysen von putativen Octopaminrezeptorsequenzen ergaben, daß es im Modellorganismus *Drosophila* nur zwei Spleißvarianten eines Octopaminrezeptorgens gibt: Droso-OAMB und Droso-1B. Da es also bei *Drosophila* zwei Spleißvarianten von Octopaminrezeptoren gibt und eine davon schon beschrieben wurde, nämlich Droso-OAMB (Han et al. 1998), wurde mit Droso-1B weitergearbeitet.

Pharmakologische Untersuchungen haben deutlich gezeigt, daß Droso-1B ein Octopaminrezeptor ist, da er – heterolog exprimiert – sowohl auf Octopamin als auch auf NC7, ein synthetischer Agonist für Octopaminrezeptoren der Stoffklasse der Phenyliminoimidazolidine (Roeder et al. 1990), anspricht.

Die Verteilung von Droso-1B im zentralen Nervensystem von *Drosophila* zeigt, daß Droso-1B ubiquitär im Nervensystem exprimiert wird. Zur Interpretation dieser Ergebnisse wird auf eine Beobachtung von Bacon et al. (1995) zurückgegriffen, die sie an der Wanderheuschrecke *Locusta* gemacht haben. Tiere – so auch Heuschrecken - werden durch sensorische Informationen bombardiert, die sie nicht komplett prozessieren können, da dies zu zeitintensiv und energetisch zu aufwendig ist. Das Nervensystem gewöhnt (habituiert) sich also an nicht wechselnde oder repetitive Stimuli, bzw. es ignoriert sie auf effektive Art und Weise: Das Tier läßt auf diese Art von Reizen keine Verhaltensantwort folgen. Neue Stimuli, die eine lebensbedrohliche Situation bedeuten könnten, erregen (dishabituierten) das Nervensystem, so daß das Tier z.B. die Flucht antreten kann.

Bacon et al. (1995) legten dar, daß ein einfacher Schaltkreis von visuellen Interneuronen die Dishabituation auslöst. Dieser Schaltkreis besteht aus dem großen Lobulabewegungsdetektor (LGMD, lobula giant movement detector), der von dem optischen Lobus in das Gehirn projiziert, wo er Synapsen mit dem absteigenden kontralateralen Bewegungsdetektor (DCMD, descending contralateral movement detector) bildet, der ebenfalls ein Interneuron ist. Aktionspotentiale des DCMD, die durch den LGMD induziert worden sind, werden schnell an das Thorakalganglion weitergeleitet, wo sie das Fluchtverhalten auslösen. Die Autoren führten dann weiter aus, daß Octopamin den DCMD dishabituiert und damit das Fluchtverhalten auslöst. Im weiteren benennen sie dann noch die protocerebralen Medulla 4 Neurone (PM4) als Octopaminquelle.

Da Dros-1B in der Retina, Medulla und Lobula exprimiert wird, könnte angenommen werden, daß der Octopaminrezeptor Dros-1B eine Rolle bei der Dishabituation spielt. Es könnten also neue Reizformen wahrgenommen und mit Hilfe von Octopamin über den Dros-1B-Rezeptor weitervermittelt werden, was letztendlich zu einer Verhaltensänderung, z.B. Flucht, führen könnte.

Han et al. (1998) haben gezeigt, daß Dros-OAMB in den Pilzkörpern exprimiert wird und haben diesen Rezeptor mit olfaktorischem Lernen in Verbindung gebracht. Somit zeigen die beiden Spleißvarianten des Octopaminrezeptorgens bei *Drosophila* eine unterschiedliche Verteilung und besitzen wahrscheinlich auch eine unterschiedliche Funktion.

Die Immunhistologie zeigte dann die Zellpopulationen auf, die im Gehirnbereich von *Drosophila* octopaminerg sind, also Octopamin abgeben und die Dishabituation vermitteln könnten. Die Verteilung ist vergleichbar mit der, die Monastirioti et al. (1995) zeigen konnten.

5 Zusammenfassung und Ausblick

Bislang hat sich in der Literatur die Hypothese behauptet, daß bei dem Modellorganismus *C. elegans* drei muscarinische Acetylcholinrezeptoren – GAR-1, GAR-2 und GAR-3 - vorkommen (Park et al. (2000), Hwang et al. (1999), Lee et al. (2000)). Auch Lee et al. (2000) mussten zusammenfassend zu der Annahme gelangen, daß es sich hierbei um keine einheitliche Rezeptorfamilie handelt. Die vorliegende Arbeit konnte nach pharmakologischen Untersuchungen zeigen, daß GAR-3 der einzige muscarinische Acetylcholinrezeptor in dieser Gruppe ist. Weiterhin wurde gezeigt, daß GAR-3 als exzitatorischer Autorezeptor bei *C. elegans* das Verhalten „Pharynxkontraktion“ maßgeblich steuert und aufgrund des erarbeiteten Expressionsmusters war es möglich, das Netzwerk zu beschreiben, was die Pharynxkontraktion auslöst.

Die pharmakologischen Versuche zum bislang als serotonergen Rezeptor klassifizierten SER-3 gaben Hinweise darauf, daß dieser wahrscheinlich ein dopaminergere Rezeptor ist. Um sich hier größere Klarheit zu verschaffen, wird SER-3 derzeit mit GIRK-Kanälen koexprimiert, denn es hat sich gezeigt, daß die Bindung eines Agonisten an einen heterolog exprimierten G-Protein-gekoppelten Rezeptor zur Aktivierung der koexprimierten GIRK-Kanäle führt (Birgül et al. 1999). Dies kann im Ganzzellmodus durch das Voltage-Clamp-Verfahren aufgezeichnet werden. Somit können Liganden für den Rezeptor bestimmt und dieser damit einer Klasse zugeordnet werden.

Ebenfalls konnten die Expressionsorte von SER-3 beschrieben werden. Leider war es bis jetzt nicht möglich, aufgrund der Verhaltensanalyse einer *ser-3* Funktionsverlust-Mutanten einen vom Wildtyp differentiellen Phänotyp zu beschreiben. Hier bietet es sich an, RNAi-Experimente durchzuführen.

Bei *Drosophila* konnte gezeigt werden, daß nur zwei Spleißvarianten eines Octopaminrezeptorgens existieren, nämlich *Droso-OAMB* und *Droso-1B*. Auch die pharmakologischen Eigenschaften wiesen *Droso-1B* als Octopaminrezeptor aus. *Droso-1B* wird im gesamten Nervensystem, d.h. in nahezu allen Neuronen exprimiert, so auch in der Retina, Medulla und Lobula.

Um die verhaltenssteuernden Eigenschaften von Droso-1B und Droso-OAMB näher beschreiben zu können, wäre es wichtig, RNAi-Experimente durchzuführen. Das Konstrukt hierfür ist angefertigt und wird z. Z. injiziert, aber das Ergebnis, also eine transgene Linie, die auf Verhaltensveränderungen hin untersucht werden kann, liegt noch nicht vor. Zur Absicherung der Expressionsergebnisse ist es weiterhin sinnvoll, einen Antikörper gegen Droso-1B zu erzeugen. Die notwendigen Konstrukte hierzu liegen ebenfalls vor. Die Experimente zur Herstellung von rekombinantem Protein werden z. Z. durchgeführt. Weiterhin werden GFP-Reporterkonstrukte in die Fliegeneier injiziert, um auch von dieser Seite die Expressionsorte abzusichern.

6 Literatur

- Adams, M. D.; Celniker, S. E.; Holt, R. A. (2000). The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* 287, 2185-2195.
- Alberts, B.; Bray, D.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Watson, J. D. (1995). *Molekularbiologie der Zelle*. VCH Verlagsgesellschaft mbH. Weinheim.
- Albertson, D. G.; Thomson J. N. (1976). The pharynx of *Caenorhabditis elegans*. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 275, 299-325.
- Alfonso, A.; Grundahl, K.; Duerr, J. S.; Han, H.-P.; Rand, J. B. (1993). The *Caenorhabditis elegans* unc-17 Gene: A putative vesicular acetylcholine transporter. *Science* 261, 617-619.
- Avery, L. (1993). Motor neuron M3 controls pharyngeal muscle relaxation timing in *Caenorhabditis elegans*. *J. exp. Biol.* 175, 283-297.
- Avery, L.; Horvitz, H. R. (1989). Pharyngeal pumping continues after laser killing of the pharyngeal nervous system of *C. elegans*. *Neuron* 3, 473-485.
- Avery, L.; Bargmann, C. I.; Horvitz, H. R. (1995). The *Caenorhabditis elegans* unc-31 gene affects multiple nervous system-controlled functions. *Genetics* 134, 455-464.
- Avery, L.; Shtonda, B. B. (2003). Food transport in the *C. elegans* pharynx. *J. Exp. Biol.* 206, 2441-2457.
- Bacon, J. P.; Thompson, K. S. J.; Stern, M. (1995). Identified octopaminergic neurons provide an arousal mechanism in the Locust brain. *J. Neurophysiol.* 74, 2739-2743.
- Baylis, H. A.; Furuichi, T.; Yoshikawa, F.; Mikoshiba, K.; Sattelle, D. B. (1999). Inositol 1,4,5-trisphosphate receptors are strongly expressed in the nervous system, pharynx, intestine, gonad and excretory cell of *Caenorhabditis elegans* and are encoded by a single gene (*itr-1*). *J. Mol. Biol.* 294, 467-476.
- Berger, J.; Hauber, J.; Hauber, R.; Geiger, R.; Cullen, B. R. (1988). Secreted placental alkaline phosphatase: a powerful new quantitative indicator of gene expression in eukaryotic cells. *Gene* 66, 1-10.
- Berwin, B.; Floor, E.; Martin, T. F. J. (1998). CAPS (Mammalian UNC-31) protein localizes to membranes involved in dense-core vesicle exocytosis. *Neuron* 21, 137-145.
- Birnbaumer, L. (1990). G proteins in signal transduction. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 30, 675-705.
- Brand, A. H.; Perrimon, N. (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* 118, 401-415.
- Brenner, F. R. S. (1973). The genetics of behavior. *Br. Med. Bull.* 29, 269-271.

Brundage, L.; Avery, L.; Katz, A.; Kim, U.-J.; Mendel, J. E.; Sternberg, P. W.; Simon, M. I. (1996). Mutations in a *C. elegans* G_qα gene disrupt movement, egg laying, and viability. *Neuron* 16, 999-1009.

Birgöl, N.; Weise, C.; Kreienkamp, H.-J.; Richter, D. (1999). Reverse physiology in *Drosophila*: identification of a novel allatostatin-like neuropeptide and its cognate receptor structurally related to the mammalian somatostatin/galanin/opoid receptor family. *EMBO* 18, 5892-5900.

C. elegans sequencing consortium (1998). Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology. The *C. elegans* sequencing consortium. *Science* 282, 2012-2080.

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

Chasnov, J. R.; Chow, K. L. (2002). Why are there males in the hermaphrodite species *Caenorhabditis elegans*? *Genetics* 160, 983-994.

Chen, C.; Okayama, H. (1988). Calcium phosphate-mediated gene transfer: A highly efficient system for stably transforming cells with plasmid DNA. *BioTechniques* 6, 632-638.

Dal Santo, P.; Logan, M. A.; Chisholm, A. D.; Jorgensen, E. M. (1999). The inositol trisphosphate receptor regulates a 50-second behavioral rhythm in *C. elegans*. *Cell* 98, 757-767.

Degen, J.; Gewecke, M.; Roeder, T. (2000). The pharmacology of a dopamine receptor in the locust nervous tissue. *Eur. J. Pharmacol.* 396, 59-65.

Dohlman, H. G.; Thorner, J.; Caron, M. G.; Lefkowitz, R. J. (1991). Model systems for the study of seven-transmembrane-segment receptors. *Annu. Rev. Biochem.* 60, 653-688.

Doyle, K.; Miles, J. (1996). *Promega protocols and application guide* (3. Aufl.). Selbstverlag.

Duffy, J. B. (2002). GAL4 System in *Drosophila*: A fly geneticist's swiss army knife. *Genesis* 34, 1-15.

Durocher, Y.; Perret, S.; Thibaudeau, E.; Gaumond, M.-H.; Kamen, A.; Stocco, R.; Abramovitz, M. (2000). A reporter gene assay for high-throughput screening of G-protein-coupled receptors stably or transiently expressed in HEK293 EBNA cells grown in suspension culture. *Analytical Biochemistry* 284, 316-326.

Epstein, H. F.; Shakes, D. C. (Hrsg.) (1995). *Methods in Cell Biology* (Volume 48): *Caenorhabditis elegans*: Modern biological analysis of an organism. Academic Press. San Diego. New York. Boston.

Erspamer, V.; Boretti, G. (1951). Identification and characterization by paper chromatography of enteramine, octopamine, tyramine, histamine, and allied substances in extracts of posterior salivary glands of Octopoda and in other tissue extracts of vertebrates and invertebrates. *Arch. Int. Pharmacodyn.* 88, 296-332.

- Fire, A. (1986). Integrative transformation of *Caenorhabditis elegans*. EMBO 5, 2673-2680.
- Fire, A.; Xu, S.; Montgomery, M. K.; Kostas, S. A.; Driver, S. E.; Mello, C. C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. Nature 391, 806-811.
- Fujita, S. C.; Inoue, H.; Yoshioka, T.; Hotta, Y. (1987). Quantitative tissue isolation from *Drosophila* freeze-dried in acetone. Biochem. J. 243, 97-104.
- Graham, F. L.; Smiley, J.; Russell, W. C.; Nairn, R. (1977). Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human Adenovirus Type 5. J. Gen. Virol. 36, 59-74.
- Granato, M.; Schnabel, H.; Schnabel, R. (1994). *Pha-1*, a selectable marker for gene transfer in *C. Elegans*. Nucleic Acids Research 22, No. 9.
- Gudermann, T.; Schöneberg, T.; Schultz, G. (1997). Functional and structural complexity of signal transduction via G-protein-coupled receptors. Annu. Rev. Neurosci. 20, 399-427.
- Halevi, S.; McKay, J.; Palfreyman, M.; Yassin, L.; Eshel, M.; Jorgensen, E.; Treinin, M. (2002). The *C. elegans ric-3* gene is required for maturation of nicotinic acetylcholine receptors. EMBO Journal 21, 1012-1020.
- Hammond, S. M.; Caudy, A. A.; Hannon, G. J. (2001). Post-transcriptional gene silencing by double-stranded RNA. Nature Reviews Genetics 2, 110-119.
- Han, K.-A.; Millar, N. S.; Davis, R. L. (1998). A novel octopamine receptor with preferential expression in *Drosophila* mushroom bodies. Journal of Neuroscience 18, 3650-3658.
- Harris, J.; Crofton, H. (1957). Structure and function in the nematodes: Internal pressure and cuticular structure in *Ascaris*. J. Exp. Biol. 34, 116-130.
- Hwang, J. M.; Chang, D.-J.; Kim, U. S.; Lee, Y.-S.; Park, Y.-S.; Kaang, B.-K.; Cho, N. J. (1999). Cloning and functional characterization of a *Caenorhabditis elegans* muscarinic acetylcholine receptor. Receptors and Channels 6, 415-424.
- Horvitz, H. R.; Chalfie, M.; Trent, C. ; Evans, P. D. (1982). Serotonin and octopamine in the nematode *Caenorhabditis elegans*. Science 216, 1012-1014.
- Islas-Trejo, A.; Land, M.; Tcherepanova, I.; Freedman, J. H.; Rubin, C. S. (1997). Structure and expression of the *Caenorhabditis elegans* protein kinase C2 Gene. J. Biol. Chem. 272, 6629-6640.
- Jansen, G.; Thijssen, K. L.; Werner, P.; van der Horst, M.; Hazendonk, E.; Plasterk, R. H. A. (1999). The complete family of genes encoding G proteins of *Caenorhabditis elegans*. Nature genetics 21, 414-419.
- Kamath, R. S.; Martinez-Campos, M.; Zipperlen, P.; Fraser, A. G.; Ahringer, J. (2000). Effectiveness of specific RNA-mediated interference through double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. Genome Biology 2, 1-10.

- Kandel, E. R.; Schwartz, J. H.; Jessell, T. M. (1996). Neurowissenschaften. Spektrum Akademischer Verlag. Heidelberg. Berlin. Oxford.
- Kazanietz, M. G.; Lewin, N. E.; Bruns, J. D.; Blumberg, P. M. (1995). Characterization of the cysteine-rich region of the *Caenorhabditis elegans* protein Unc-13 as a high affinity phorbol ester receptor. *J. Biol. Chem.* 270, 10777-10783.
- Kimble, J.; Hodgkin, J.; Smith, T.; Smith, J. (1982). Suppression of an amber mutation by microinjection of suppressor tRNA in *C. elegans*. *Nature* 299, 456-458.
- Koolman, J.; Röhm, K.-H. (1994). Taschenatlas der Biochemie. Georg Thieme Verlag. Stuttgart.
- Kumar, S.; Tamura, K.; Jacobsen, I. B.; Nei, M. (2001). MEGA2 : molecular evolutionary genetics analysis software. *Bioinformatics* 17, 1244-1245.
- Lackner, M. R.; Nurrish, S. J.; Kaplan, J. M. (1999). Facilitation of synaptic transmission by EGL-30 G_qα and EGL-8 PLCβ: DAG binding to UNC-13 is required to stimulate acetylcholine release. *Neuron* 24, 335-346.
- Lee, R. Y. N.; Lobel, L.; Hengartner, M.; Horvitz, H. R.; Avery, L. (1997). Mutations in the α1 subunit of an L-type voltage-activated Ca²⁺ channel cause myotonia in *Caenorhabditis elegans*. *EMBO Journal* 16, 6068-6076.
- Lee, Y.-S.; Park, Y.-S.; Nam, S.; Suh, S.; Lee, J.; Kaang, B.-K.; Cho, N.-J. (2000). Characterization of GAR-2, a novel G protein-linked acetylcholine receptor from *Caenorhabditis elegans*. *J. Neurochemistry* 75, 1800-1809.
- Loewi, O; Navratil, E. (1921). Über humorale Übertragbarkeit der Herznervenwirkung. *Pflügers Archiv für die gesamte Physiologie* 189, 239-242.
- Lottspeich, F; Zorbas, H. (Hrsg.) (1998). Bioanalytik. Spektrum Akademischer Verlag. Heidelberg. Berlin.
- Maupas, E. (1899). La mue et l'enkystement chez les nematodes. *Arch. Zool. Exer. et Gen.* 7, 563-628.
- Mello, C. C.; Kramer, J. M.; Stinchcomb, D.; Ambros, V. (1991). Efficient gene transfer in *C. elegans*: Extrachromosomal maintenance and integration of transforming sequences. *EMBO* 10, 3959-3970.
- Mendel, J. E.; Korswagen, H. C.; Liu, K. S.; Hajdu-Cronin, Y. M.; Simon, M. I.; Plasterk, R. H. A.; Sternberg, P. W. (1995). Participation of the protein G_o in multiple aspects of behavior in *C. elegans*. *Science* 267, 1652-1655.
- Miller, K. G.; Emerson, M. D.; Rand, J. B. (1999). G_oα and diacylglycerol kinase negatively regulate the G_qα Pathway in *C. elegans*. *Neuron* 24, 323-333.
- Monastirioti, M.; Gorczyca, M.; Rapus, J.; Eckert, M.; White, K.; Budnik, V. (1995). Octopamine immunoreactivity in the fruit fly *Drosophila melanogaster*. *J. Comp. Neurol.* 356, 275-287.

- Montgomery, M. K.; Xu, S.; Fire, A. (1998). RNA as a target of double-stranded RNA-mediated genetic interference in *Caenorhabditis elegans*. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 95, 15502-15507.
- Mülhardt, C. (2002). Der Experimentator: Molekularbiologie/Genomics (3. Aufl.). Spektrum Akademischer Verlag. Heidelberg. Berlin.
- Miyawaki, A.; Llopis, J.; Heim, R.; McCaffery, J. M.; Adams, J. A.; Ikura, M.; Tsien, R. Y. (1997). Fluorescent indicators for Ca²⁺ based on green fluorescent proteins and calmodulin. Nature 388, 882-887.
- Neubig, R. R.; Siderovski, D. P. (2002). Regulators of G-protein signalling as new central nervous system drug targets. Nature Reviews Drug Discovery 1, 187-197.
- Niacaris, T.; Avery, L. (2003). Serotonin regulates repolarization of the *C. elegans* pharyngeal muscle. J. Exp. Biol. 206, 223-231.
- Nurrish, S.; Segalat, L.; Kaplan, J. M. (1999). Serotonin inhibition of synaptic transmission: α_6 decreases the abundance of UNC-13 at release sites. Neuron 24, 231-242.
- Orchard, I.; Lange, A. B. (1984). Cyclic AMP in Locust fat body: correlation with octopamine and adipokinetic hormones during flight. J. Insect. Physiol. 30, 901-904.
- Park, Y.-S.; Lee, Y.-S.; Cho, N. J.; Kaang, B.-K. (2000). Alternative splicing of *gar-1*, a *Caenorhabditis elegans* G-protein-linked acetylcholine receptor gene. Biochem. Biophys. Res. Communications 268, 354-358.
- Park, Y.-S.; Kim, S.; Shin, Y.; Choi, B.; Cho, N. J. (2003). Alternative splicing of the muscarinic acetylcholine receptor GAR-3 in *Caenorhabditis elegans*. Biochem. Biophys. Res. Communications 308, 961-965.
- Puoti, A.; Pugnale, P.; Belfiore, M.; Schläppi, A.-C.; Saudan, Z. (2001). RNA and sex determination in *Caenorhabditis elegans*. EMBO reports 2, 899-904.
- Raizen, D. M.; Lee, R. Y. N.; Avery, L. (1995). Interacting Genes Required for pharyngeal excitation by motor neuron MC in *Caenorhabditis elegans*. Genetics 141, 1365-1382.
- Richmond, J. E.; Weimer, R. M.; Jorgensen, E. M. (2001). An open form of syntaxin bypasses the requirement for UNC-13 in vesicle priming. Nature 412, 338-341.
- Riddle, D. L.; Blumenthal, T.; Meyer, B. J.; Priess, J. R. (1997). *C. elegans* II. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York.
- Roeder, T. (2003). Metabotropic histamine receptors - nothing for invertebrates ?. Eur. J. Pharmacol. 466, 85-90.
- Roeder, T.; Gewecke, M. (1990). Octopamine receptors in locust nervous tissue. Biochem. Pharmacol. 39, 1793-1797.
- Roeder, T.; Gewecke, M. (1999). Octopamine in invertebrates. Progr. Neurobiol. 59, 533-561.

- Roeder, T.; Seifert, M.; Kähler, C.; Gewecke, M. (2003). Tyramine and octopamine: antagonistic modulators of behavior and metabolism. *Arch. Ins. Biochem. Physiol.* 54, 1-13.
- Saitou, N.; Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Evol.* 4, 406-424.
- Sambrook, J.; Fritsch, E. F.; Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor.
- Sano, T.; Tabuse, Y.; Nishiwaki, K.; Miwa, J. (1995). The *tpa-1* Gene of *Caenorhabditis elegans* encodes two proteins similar to Ca²⁺-independent protein kinase Cs: Evidence by complete genomic and complementary DNA sequence of the *tpa-1* gene. *J. Mol. Biol.* 251, 477-485.
- Sawin, E. R.; Ranganathan, R.; Horvitz, R. (2000). *C. elegans* locomotory rate is modulated by the environment through a dopaminergic pathway and by experience through a serotonergic Pathway. *Neuron* 26, 619-631.
- Schafer, W. R. (2002). Genetic analysis of nicotinic signaling in worms and flies. *J. Neurobiol.* 53, 535-541.
- Schneider, J. (1972). Cell lines derived from late embryonic stages of *Drosophila melanogaster*. *J. Embryol. Exp. Morph.* 27, 353-365.
- Schramm, G.; Bruchhaus, I.; Roeder, T. (2000). A simple and reliable 5'-RACE approach. *Nucleic Acids Research* 28: No.22.
- Segalat, L.; Elkes, D. A.; Kaplan, J. M. (1995). Modulation of serotonin-controlled behaviors by G_o in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 267, 1648-1651.
- Sharma, Y.; Cheung, U.; Larsen, E. W. ; Eberl, D. F. (2002). pPTGAL, a Convenient Gal4 P-element vector for testing expression of enhancer fragments in *Drosophila*. *Genesis* 34, 115-118.
- Shimomura, O.; Johnson, F. H.; Saiga, Y. (1962). Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*. *J. Cell. Comp. Physiol.* 59, 223-239.
- Stevens, C.; Sullivan, J. M. (1998). Regulation of the readily releasable vesicle pool by protein kinase C. *Neuron* 21, 885-893.
- Stinchcomb, D. T.; Shaw, J. E.; Carr, S. H.; Hirsh, D. (1985). Extrachromosomal DNA transformation of *Caenorhabditis elegans*. *Mol. Cell. Biol.* 5, 3484-3496.
- Suh, S.-J.; Park, Y.-S.; Lee, Y.-S.; Cho, T.-J.; Kaang, B.-K.; Cho, N. J. (2001). Three functional isoforms of GAR-2, a *Caenorhabditis elegans* G-protein-linked acetylcholine receptor, are produced by alternative splicing. *Biochem. Biophys. Res. Communications* 288, 1238-1243.
- Tabuse, Y. (2002). Proteinkinase C isotypes in *C. elegans*. *J. Biochem. (Tokyo)* 132, 519-522.

- Thompson, J. D.; Higgins, D. G.; Gibson, T. J. (1994). CLUSTALW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22, 4673-4680.
- Timmons, L.; Fire, A. (1998). Specific interference by ingested dsRNA. *Nature* 395, 854.
- Timmons, L.; Court, D. L.; Fire, A. (2001). Ingestion of bacterially expressed dsRNAs can produce specific and potent genetic interference in *Caenorhabditis elegans*. *Gene* 263. 103-112.
- Tissenbaum, H. A.; Hawdon, J.; Perregaux, M.; Hotez, P.; Guarente, L.; Ruvkun, G. (2000). A common muscarinic pathway for diapause recovery in the distantly related nematode species *Caenorhabditis elegans* and *Ancylostoma caninum*. *PNAS* 97, 460-465.
- Van Blitterswijk, W. J.; Houssa, B. (2000). Properties and functions of diacylglycerol kinases. *Cellular Signalling* 12, 595-605.
- Walker, D. S.; Gower, N. J. D.; Ly, S.; Bradley, G. L.; Baylis, H. A. (2002). Regulated disruption of inositol 1,4,5-trisphosphate signaling in *Caenorhabditis elegans* reveals new functions in feeding and embryogenesis. *Mol. Biol. Cell* 13, 1329-1337.
- Watson, D. J.; Gilman, M.; Witkowski, J.; Zoller, M. (1993). *Rekombinierte DNA* (2. Aufl.). Spektrum Akademischer Verlag. Heidelberg. Berlin.
- White, J. G.; Southgate, E.; Thompson, J. N.; Brenner, F. R. S. (1986). The structure of the nervous system of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 314, 1-340.
- Witte, I; Kreienkamp, H. J.; Gewecke, M.; Roeder, T. (2002). Putative histamine-gated chloride channel subunits of the insect visual system and thoracic ganglion. *J. Neurochem.* 83, 504-514.
- Zimmermann, H. (1993). *Synaptic transmission*. Georg Thieme Verlag. Stuttgart. Oxford.

Anhang

I Oligonucleotidsequenzen

Oligonukleotide für die cDNA-Synthese:

Oligo (dT)Primer I: 5'-ACT CTA TGA GAATTC GAT GAG CGA TCT G₂₅(T)G/A/C-3'

CapFinder CFBIrG : 5'-GAG AGA ACGCGT GAC GAG AGA CTG ACA rGrGrG-3'

Oligo (dT)Primer II: 5'-ACT CTA TGA GAATTC GAT GAG CGA TCT G-3'

CapFinder CF BII: 5'-GAG AGA ACGCGT GAC GAG AGA CTG ACA G-3'

Klonierungsoligonucleotide *D. melanogaster*:

Octopaminrezeptor Vorwärtsprimer: 5'-GAGA AAGCTT ATG AAT GAA ACA GAG TGC GAG GAT CTC ATC A-3'

Octopaminrezeptor Rückwärtsprimer: 5'-GAGA GAATTC TCA CCT GGG GTC GTT GCT CAT CTC AGA ATG-3'

Promotorregion Octopaminrezeptor Vorwärtsprimer (3kb, pPTGAL): 5'-GAGA GCGGCCGC GAT TGC CCT GTG ACC TAA TCA-3'

Promotorregion Octopaminrezeptor Rückwärtsprimer (3kb, pPTGAL): 5'-GAGA GGTACC GGC GGT ACT TTT GAG ATG GGT-3'

Promotorregion Tbh-Rezeptor Vorwärtsprimer (3kb, pPTGAL): 5'-GAGA GCGGCCGC GTT GAGTTG CTG CCT GCT GAT-3'

Promotorregion Tbh-Rezeptor Rückwärtsprimer (3kb, pPTGAL): 5'-GAGA GGTACC TTT GAG ATT TGA GAT TGC ACG-3'

Octopaminrezeptor *in-situ*-Sonde A Vorwärtsprimer (pSport): 5'-GAGA GGATCC GCA TCC GTG TCG GGA TCG GGA C-3'

Octopaminrezeptor *in-situ*-Sonde A Rückwärtsprimer (pSport): 5'-GAGA GAATTC CTC AGC GAC TAA TAC ATG TAC-3'

Octopaminrezeptor *in-situ*-Sonde B Vorwärtsprimer (pSport): 5'-GAGA GGATCC ATG ATC TAC GCC CTG TTC TCA AAG-3'

Octopaminrezeptor *in-situ*-Sonde B Rückwärtsprimer (pSport): 5'-GAGA GAATTC GAT GCG AAC CAC GCG CCT TGG T-3'

Klonierungsoligonukleotide *C. elegans*:

SER-3-Rezeptor Vorwärtsprimer (pcDNA): 5'-GAGA GGATCC CCA CCA TGG AAT GGA TGA GAA ATA CGT T-3'

SER-3-Rezeptor Rückwärtsprimer (pcDNA): 5'-GAGA GCGGCCGC TTA GTT GGT TGG AGT GTT AAA TGT C-3'

SER-3-Rezeptor Vorwärtsprimer (pGEMHE+5HT3): 5'-GAGA GATATC GAA TGG ATG AGA AAT ACG TTA AAC GGC C-3'

SER-3-Rezeptor Rückwärtsprimer (pGEMHE+5HT3): 5'-GAGA GGATCC TTA GTT GGT TGG AGT GTT AAA TGT C-3'

Gar-1 Rezeptor Vorwärtsprimer (pcDNA): 5'-GAGA CAGCTG ATG CCG AAC TAC ACG GTA CCT CCA GAT C-3'

Gar-1 Rezeptor Rückwärtsprimer (pcDNA): 5'-GAGA GAATTC CTA TGC AAC TTT GTT AAA GTT CCC G-3'

Gar-2 Rezeptor Vorwärtsprimer (pcDNA): 5'-GAGA GTTAAC ATG GCG GTT GCA AGT GTG CTC-3'

Gar-2 Rezeptor Rückwärtsprimer (pcDNA): 5'-GAGA TCTAGA TCA AAC TCT TCG AAA ATC TCC TTT-3'

Gar-3 Rezeptor Vorwärtsprimer (pcDNA): 5'-GAGA GATATC ATG CAG TCC TCT TCG TTG GGG AAT GCT G-3'

Gar-3 Rezeptor Rückwärtsprimer (pcDNA): 5'-GAGA GGATCC CCA CCA TGC AGT CCT CTT CGT TGG GGA ATG-3'

Gar-1 Rezeptor Vorwärtsprimer (pGEMHE+5HT3): 5'-GAGA CAGCTG CCG AAC TAC ACG GTA CCT CCA GAT C-3'

Gar-1 Rezeptor Rückwärtsprimer (pGEMHE+5HT3): 5'-GAGA GAATTC CTA TGC AAC TTT GTT AAA GTT CCC G-3'

Gar-2 Rezeptor Vorwärtsprimer (pGEMHE+5HT3): 5'-GAGA GTTAAC GCG GTT GCA AGT GTG CTC-3'

Gar-2 Rezeptor Rückwärtsprimer (pGEMHE+5HT3): 5'-GAGA TCTAGA TCA AAC TCT TCG AAA ATC TCC TTT-3'

Gar-3 Rezeptor Vorwärtsprimer (pGEMHE+5HT3): 5'-GAGA GATATC CAG TCC TCT TCG TTG GGG AAT GCT G-3'

Gar-3 Rezeptor Rückwärtsprimer (pGEMHE+5HT3): 5'-GAGA GGATCC CCA CCA TGC AGT CCT CTT CGT TGG GGA ATG-3'

Promotorregion gar-3 Vorwärtsprimer (pPD95.77): 5'-GAGA CTGCAG GTA GGC AGG AAC GTA CAC CCA ATT TCT-3'

Promotorregion gar-3 Rückwärtsprimer (pPD95.77): 5'-GAGA GGATCC TGT CTT TGT CGC ATT TTC GGC CGA CGT-3'

RNAi-Oligonukleotide:

GFP Vorwärtsprimer (pSport1/T7): 5'-GAGA GGATCC ATG AGT AAA GGA GAA GAA CTT-3'

GFP Rückwärtsprimer (pSport1/T7): 5'-GAGA GAATTC TTA TTT GTA TAG TTC ATC CA-3'

Gar-1 Rezeptor Vorwärtsprimer (pSport1/T7): 5'-GAGA GGATCC ATG CCG AAC TAC ACG GTA CCT CCA GAT C-3'

Gar-1 Rezeptor Rückwärtsprimer (pSport1/T7): 5'-GAGA GCGGCCGC CTA TGC AAC TTT GTT AAA GTT CCC G-3'

Gar-2 Rezeptor Vorwärtsprimer (pSport1/T7): 5'-GAGA GGATCC ATG GCG GTT GCA AGT GTG CTC-3'

Gar-2 Rezeptor Rückwärtsprimer (pSport1/T7): 5'-GAGA TCTAGA TCA AAC TCT TCG AAA ATC TCC TTT-3'

Gar-3 Rezeptor Vorwärtsprimer (pSport1/T7): 5'-GAGA GGATCC ATG CAG TCC TCT TCG TTG GGG AAT GCT G-3'

Gar-3 Rezeptor Rückwärtsprimer (pSport1/T7): 5'-GAGA TCTAGA CCA CCA TGC AGT CCT CTT CGT TGG GGA ATG-3'

Goa-1 Vorwärtsprimer (pSport1/T7): 5'-GAGA GAATTC CAC CAT GGG TTG TAC CAT GT-3'

Goa-1 Rückwärtsprimer (pSport1/T7): 5'-GAGA GAGCGG CCG CTT AAT ACA AGC CGC AT-3'

Gsa-1 Vorwärtsprimer (pSport1/T7): 5'-GAGA ACGCGT GGG TGC GTC GGC GCT GGC GC-3'

Gsa-1 Rückwärtsprimer (pSport1/T7): 5'-GAGA GCGGCCGC TTA TAG AAG CTC GTA CTG-3'

Egl-30 Vorwärtsprimer (pSport1/T7) : 5'-GAGA ACGCGT GCC TGC TGT TTA TCC GAA G-3'

Egl-30 Rückwärtsprimer (pSport1/T7) : 5'-GAGA GAGCGG CCG CTT ACA CCA AGT TGT AC-3'

Gpa-12 Vorwärtsprimer (pSport1/T7) : 5'-GAGA ACGCGT CCA CCA TGG TAT GCT GTT T-3'

Gpa-12 Rückwärtsprimer (pSport1/T7) : 5'-GAGA GCGGCCGC TTA CTG CAT CAT GAC AGT-3'

Sequenzieroligonukleotide:

M13- Vorwärtsprimer: 5'-CCC AGT CAC GAC GTT GTA AAA CG-3'

M13- Rückwärtsprimer: 5'-GGC AAC TAG AAG GCA CAG TCG AGG-3'

pcDNA 3.1 Vorwärtsprimer: 5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA G-3'

pcDNA 3.1 Rückwärtsprimer: 5'-GGC AAC TAG AAG GCA CAG TCG AGG-3'

pPTGAL Rückwärtsprimer: 5'-TCA GGA GGC TTG CTT CAA-3'

pPTGAL Rückwärtsprimer 1: 5'-AAT TGA ATT GTC GCT CCG-3'

SER-3Seq1: 5'-GAG AAA TAC GTT AAA CGG C-3'

SER-3Seq2: 5'-CTA ATT TTG AGC TTG GCG-3'

SER-3Seq3: 5'-TTT CTT GGC AAG TTC C-3'

SER-3Seq4: 5'-TGT ACA TCG TGG CTC TTC C-3'

SER-3Seq5: 5'-TTC ATA TTC TGC CAC TCC-3'

SER-3Seq6: 5'-CTA GAG ATT AAA GCA GCG-3'

SER-3Seq7: 5'-ATT CGA TCC ACA AAT GCC-3'

Droso-1BSeq1: 5'-CGC TAT GTG GCG GTC ACA CGA CCC-3'

Droso-1BSeq2: 5'-CGA CAG CGT CCA GCT CGA GCA CCA-3'

Droso-1BSeq3: 5'-ACC ACC CTG GGC ACC CCC TCC CCG-3'

Droso-1BSeq4: 5'-GCC AAA ACA CTG GCC ATC ATC GTG-3'

II Datenbank-Identifikationsnummern der verwendeten Sequenzen
Datenbank des National Center for Biotechnology Information, Bethesda, USA
(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)

Sequenzname	Identifikationsnummer
Muscarinischer Baum	
humaner mACh 1	GI: 37622909
humaner mACh 2	GI: 38232110
humaner mACh 3	GI: 4502818
humaner mACh 4	GI: 4502820
humaner mACh 5	GI: 20373105
Drosophila MACh	GI: 24762609
GAR-1	GI: 6714902
GAR-2	GI: 21728353
GAR-3	GI: 6425162
humaner H1	GI: 38174244
humaner H3	GI: 6005781
humaner H4	GI: 14251204
Dm CG 7918-PA	GI: 24644965
Octopaminerger Baum	
CG3856-PA	GI: 24648486
CG3856-PB	GI: 24648490
CG3856-PC	GI: 24648488
Droso-1A	GI: 4468168
Droso-1B	GI: 4468166
Droso-OA	GI: 158002
OAMB	GI: 3153890
Apis-1	GI: 37987892
Apis-2	GI: 30016931
Caenorhabditis-SER-3	GI: 21281568
Lymnea-1	GI: 3650453
Lymnea-2	GI: 2047310
Heliothis	GI: 1197329
Bombyx	GI: 1197191

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Kähler, Christian
Geburtsdatum: 26. Februar 1972
Geburtsort: Rendsburg
Familienstand: ledig

Schulbildung:

1979 - 1983 Grundschule Emil Nolde, Büdelsdorf
1983 - 1992 Kronwerk-Gymnasium, Rendsburg

Zivildienst:

Juli 1992 - Sept. 1993 Schutzstation Wattenmeer, Hörnum (Sylt)

Studium / Abschluß:

Sommersemester 1994 – 2000
Lehramt Oberstufe „Allgemeinbildende Schulen“, Universität Hamburg
Fächerkombination:
- Biologie
- Geographie
- Erziehungswissenschaften

Examensarbeit:
„Die Bedeutung von Stressproteinen in tierischen Zellen unter besonderer Berücksichtigung der Hitzeschockproteine Hsp60 und Hsp70 und Versuche zum Nachweis von Hsp70 in Hämozyten aus *Helix pomatia* L. und *Mytilus edulis* L.“, bei Herrn Prof. Dr. L. Renwranz, Zoologisches Institut und Museum der Universität Hamburg

Disputation:
30. Januar 2004

Beruflicher Werdegang / Nebentätigkeiten:

- Juli 1996 – Aug. 1996 Werkstudent Norddeutsche Affinerie (Hauptlabor)
- Juli 1996 – Dez. 1997 Studentische Hilfskraft am Zoologischen Institut der Universität Hamburg bei Frau Dr. H. Ruhberg (Betreuung und Pflege der wissenschaftlichen Sammlung Niedere Tiere I)
- Okt. 1999 – Dez. 1999 Wissenschaftliche Hilfskraft am Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin, Hamburg, bei Herrn Dr. P. Zipfel („Charakterisierung des Transkriptionsfaktors EGR-4“)

- Juni 2000 – Dez. 2000 Wissenschaftliche Hilfskraft mit abgeschlossener wissenschaftlicher Hochschulbildung bei Herrn Dr. P. Zipfel (Klonierung und Charakterisierung des Transkriptionsfaktors EGR-2, molekularbiologische Ausbildung: Zellkulturtechniken, Klonierungen, Cotransfektionen (Reporter-Gen-Assay), Baculovirus-System, Proteinchemie, Gel-Shifts)
- Feb. 2001 - Jan. 2004 Wissenschaftlicher Mitarbeiter/Doktorand bei PD T. Röder, Zoologisches Institut und Museum, AG Neurophysiologie, der Universität Hamburg („Metabotrope Bioaminrezeptoren der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* und des Nematoden *Caenorhabditis elegans*“)
Aufgaben / Tätigkeiten:
- Bioinformatische Tätigkeiten
 - Sichtung komplexer Datenbanken
 - Allgemeine molekularbiologische Tätigkeiten:
 - Anfertigung von Northern u. Southern-Blots
 - Expression der Rezeptoren in heterologen Systemen
 - Pharmakologische Charakterisierung der Rezeptoren
 - Durchführung von RNAi-Experimenten
 - Insitu-Hybridisierungen (Histologie)
 - Tierzucht und Pflege (Analyse der Mutanten und Stämme)

Stipendium:

Apr. 1996 – Apr. 2000 Stipendiat der Friedrich-Ebert-Stiftung

Kongreßbeiträge:

- 2001** 28. Göttinger Neurobiologen-Konferenz:
Göttingen Neurobiol. Report 2001, Georg Thieme, Stuttgart, New York, 28: 64
Göttingen Neurobiol. Report 2001, Georg Thieme, Stuttgart, New York, 28: 828
- 2002** 95. Jahresversammlung der „Deutschen Zoologische Gesellschaft“,
Halle/Saale: Kurzvortrag
13. Neurobiologischer Doktorandenworkshop; MPI Martinsried: Vortrag
- 2003** 96. Jahresversammlung der „Deutschen Zoologischen Gesellschaft“,
Berlin: Kurzvortrag
29. Göttinger Neurobiologen-Konferenz:
Göttingen Neurobiol. Report 2003, Georg Thieme, Stuttgart, New York, 29: 839
Göttingen Neurobiol. Report 2003, Georg Thieme, Stuttgart, New York, 29: 840

Veröffentlichungen:

Roeder, T.; Seifert, M.; Kähler, C.; Gewecke, M. (2003). Tyramine and octopamine: antagonistic modulators of behavior and metabolism. *Arch. Ins. Biochem. Physiol.* 54, 1-13.

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides Statt, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Hamburg, den 16.12.03

Christian Kähler