

**Der Tyraminrezeptor des Fadenwurms
Caenorhabditis elegans (Maupas, 1900)**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereiches Biologie
der Universität Hamburg

vorgelegt von Mark Seifert
Hamburg, im März 2004

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	11
1.1	Der Nematode <i>C. elegans</i>	11
1.2	Das Nervensystem	13
1.3	Tyramin und Octopamin	16
1.4	Verhaltensprogramme	19
1.4.1	Eiablage	19
1.4.2	Defäkation	20
1.4.3	Lokomotion	22
1.4.3.1	Grundlagen	22
1.4.3.2	Verhaltenskontext ' <i>basal</i> ' und ' <i>enhanced slowing</i> '	27
1.5	Zielsetzung	28
2.	Material und Methoden	29
2.1	Bezugsfirmen	29
2.2	Geräte	30
2.3	Chemikalien	30
2.4	Lösungen, Puffer und Medien etc.	31
2.5	Versuchstiere	32
2.5.1	Haltung	32
2.5.2	Konservierung	33
2.5.3	Mutantenstämme	33
2.6	RNA-Interferenz (RNAi)	38
2.7	Verhaltenspharmakologie	39
2.7.1	Lokomotion	40
2.7.2	Eiablage	40
2.7.3	Defäkation	40
2.8	Erzeugung transgener Linien (<i>tub-1</i> Promotor:: <i>GFP</i> ; <i>pBX</i>)	41
2.8.1	<i>GFP</i> -Reporter Plasmid	41
2.8.2	Mikroinjektion	41
2.9	Heterologe Expression von <i>tub-1</i> :: <i>GFP</i> in eukaryotischen Zellen	43

2.10	Histologie	43
2.10.1	Immunhistochemie	43
2.10.2	Lipid-Nachweis mit Oelrot O	44
2.10.3	Lipid-Nachweis mit Nilrot	44
2.10.4	DiI-Färbung	45
3.	Ergebnisse	46
3.1	Immunhistochemischer Nachweis von Octopamin/Tyramin	46
3.2	Verhaltenspharmakologische Untersuchungen zur Charakterisierung der Funktion des Tyraminrezeptors von <i>C. elegans</i>	47
3.2.1	Der Tyraminrezeptor von <i>C. elegans</i> im Kontext des Eiablageverhaltens	48
3.2.2	Der Tyraminrezeptor von <i>C. elegans</i> im Kontext des Defäkationsverhaltens	49
3.2.3	Der Tyraminrezeptor von <i>C. elegans</i> im Kontext des Lokomotionsverhaltens	50
3.3.	Verhaltenspharmakologische Untersuchungen zur Charakterisierung der Signaltransduktion des Tyraminrezeptors von <i>C. elegans</i>	52
3.3.1.	Alpha-Untereinheiten von G-Proteinen	52
3.3.1.1	G-Protein α -Untereinheiten von <i>C. elegans</i> im Kontext des Defäkationsverhaltens	52
3.3.1.2	G-Protein α -Untereinheiten von <i>C. elegans</i> im Kontext des Lokomotionsverhaltens	53
3.3.2.	Die PhospholipaseC β und weitere Effektoren	55
3.3.2.1	PLC β (egl-8), CAPS (unc-31) und das <i>C.elegans Tubby</i> -Homolog (tub-1) im Kontext des Defäkationsverhaltens	55
3.3.2.2	unc-13 und pkc-2 im Kontext des Defäkationsverhaltens	56
3.3.2.3	egl-8, unc-31 und tub-1 im Kontext des Lokomotionsverhaltens	57
3.3.2.4	unc-13 und pkc-2 und itr-1 im Kontext des Lokomotionsverhaltens	58
3.4	Histologischer Nachweis der Akkumulation von Speicherlipiden in den intestinalen Zellen und im Pseudocoel von <i>C. elegans</i>	59
3.4.1	Lipid-Nachweis mit Oelrot O	60
3.4.2	Lipid-Nachweis mit Nilrot	61

3.5	Zelluläre Lokalisierung des Tyraminrezeptors von <i>C. elegans</i>	62
3.6	TUB-1, das <i>C. elegans</i> Tubby-Homolog	71
3.6.1	Subzelluläre Lokalisierung von TUB-1	71
3.6.2	Homologievergleich von Proteinen der Tubby-Familie	72
3.6.3	Zelluläre Lokalisierung von TUB-1	73
3.7	Gegenüberstellung der Expressionsmuster von CeTyrR und TUB-1	79
4.	Diskussion	80
4.1	Regulierung von Verhalten und Metabolismus durch Tyramin und Octopamin	80
4.2	Der Phänotyp des Tyraminrezeptor-Knockdowns in den verschiedenen Kontexten	81
4.3	Die Signaltransduktion des Tyraminrezeptors	82
4.4	Die zelluläre Lokalisation des Tyraminrezeptors	86
4.5	Zelluläre Lokalisation von Octopamin und Tyramin bei <i>C. elegans</i>	86
4.6	Verknüpfung von Lokalisation und Funktion	88
4.6.1	Zellen im Eiablage-Schaltkreis	88
4.6.2	Zellen, die das Defäkationsverhalten beeinträchtigen	89
4.6.3	Modulation des Lokomotionsverhaltens durch tyraminerge und octopaminerge Signale	91
4.6.4	Regulation des Lipidstoffwechsels	100
4.7	Physiologische Bedeutung	102
4.8	Zusammenfassung	104
4.9	Ausblick	105
5.	Literaturverzeichnis	106

Anhang I-VII

Tabellarische Zusammenstellung aller Zellen, die:

- den Tyraminrezeptor exprimieren	I
- Tyramin/Octopamin enthalten	V
- TUB-1 exprimieren	VI

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Die vier Larvalstadien und ein adulter Wurm im Vergleich	11
Abbildung 2:	Anordnung der Nervenstränge bei <i>C. elegans</i> (schematisch, Lateralansicht)	13
Abbildung 3:	Die Lage der anterioren Ganglien (schematisch, Lateralansicht)	14
Abbildung 4:	Die Lage der posterioren Ganglien (schematisch, Lateralansicht)	14
Abbildung 5:	Molekulare Struktur und Synthese der biogenen Amine Tyramin und Octopamin	16
Abbildung 6:	Schematische Darstellung des Eiablageapparats (Lateralansicht)	19
Abbildung 7:	Die für die Expulsion benötigten Muskeln (schematisch, Lateralansicht)	20
Abbildung 8:	Das Defäkations-Motorprogramm: a) Steuerung b) Ausführung	21
Abbildung 9:	Anordnung der hypodermalen Muskeln (schematisch, Querschnitt)	22
Abbildung 10:	Anordnung der hypodermalen Muskeln (schematisch, Sagittalschnitt)	23
Abbildung 11:	Reziproke Inhibition der Muskelkontraktion durch die D-Typ-Motoneuronen	24
Abbildung 12:	Steuerung der Lokomotion durch die Kommando-Interneuronen	25
Abbildung 13:	Verknüpfung von Sensorik und Motorik	26
Abbildung 14:	Die Entwicklung der Keimzellen vom L4-Stadium bis zum adulten Tier	42
Abbildung 15:	OA/TA-immunreaktive Zellen	46

Abbildung 16:	Eiablage (Verhaltenspharmakologie CeTyrR/OA/TA)	48
Abbildung 17:	Defäkation (Verhaltenspharmakologie CeTyrR/OA/TA)	49
Abbildung 18:	Lokomotion – ‘ <i>basal slowing response</i> ’ (Verhaltenspharmakologie CeTyrR/OA/TA)	50
Abbildung 19:	Lokomotion – ‘ <i>enhanced slowing response</i> ’ (Verhaltenspharmakologie CeTyrR/OA/TA)	51
Abbildung 20:	Defäkation (Gα-Mutanten)	52
Abbildung 21:	Lokomotion – ‘ <i>enhanced slowing response</i> ’ (goa-1/gqa-1)	53
Abbildung 22:	Lokomotion – ‘ <i>basal slowing response</i> ’ (goa-1/gqa-1)	54
Abbildung 23:	Defäkation (egl-8/unc-31/tub-1)	55
Abbildung 24:	Defäkation (unc-13/pkc-2)	56
Abbildung 25:	Lokomotion – ‘ <i>basal slowing response</i> ’ (egl-8/unc-31/tub-1)	57
Abbildung 26:	Lokomotion – ‘ <i>basal slowing response</i> ’ (unc-13/pkc-2/itr-1)	58
Abbildung 27:	Lipid-Nachweis (Oelrot O)	60
Abbildung 28:	Lipid-Nachweis (Nilrot)	61
Abbildung 29:	Expression des Tyraminrezeptors im ventralen Nervenstrang (CeTyrR)	63
Abbildung 30:	Expression in den lateralen Nervensträngen (CeTyrR)	64
Abbildung 31:	Expression in den anterioren Ganglien und im Pharynx (CeTyrR)	65
Abbildung 32:	Weitere Expression in den anterioren Ganglien und im Pharynx (CeTyrR)	66
Abbildung 33:	Expression in den posterioren Ganglien (CeTyrR)	67
Abbildung 34:	Weitere Expression in den posterioren Ganglien (CeTyrR)	68
Abbildung 35:	Männchen-spezifische Expression (CeTyrR)	69
Abbildung 36:	Zusammenfassende Darstellung (CeTyrR)	70
	a) Gesamtansicht (lateral, rechte Körperhälfte),	
	b) anteriore Ganglien (lateral, linke Körperhälfte),	
	c) posteriore Ganglien (lateral, linke Körperhälfte)	

Abbildung 37:	Subzelluläre Lokalisierung (TUB-1)	71
Abbildung 38:	Aminosäure-Sequenzvergleich von Tubby-ähnlichen Proteinen	72
Abbildung 39:	TUB-1-Expression	73
	a) Gesamtansicht, b) Detailansicht (PDE-Neuronen)	
Abbildung 40:	Expression in den Lumbarganglien (TUB-1)	74
Abbildung 41:	Expression in den anterioren Ganglien (TUB-1)	75
Abbildung 42:	Männchen-spezifische Expression (TUB-1)	76
Abbildung 43:	Weitere Männchen-spezifische Expression (TUB-1)	77
Abbildung 44:	Zusammenfassende Darstellung (TUB-1)	78
	a) Gesamtansicht (lateral),	
	b) anteriore Ganglien (lateral, linke Körperhälfte),	
	c) posteriore Ganglien (lateral, linke Körperhälfte)	
Abbildung 45:	Gegenüberstellung CeTyrR und TUB-1	79
	a) Gesamtansicht (lateral),	
	b) anteriore Ganglien (lateral, linke Körperhälfte),	
	c) posteriore Ganglien (lateral, linke Körperhälfte)	
Abbildung 46:	Die Signalkaskade des Tyraminrezeptors	85
Abbildung 47:	Modell für die Hemmung der Eiablage	88
Abbildung 48:	Beschleunigung	92
Abbildung 49:	Modulation der Verarbeitung sensorischer Eingänge	93
Abbildung 50:	Beispiel Thermotaxis	95
Abbildung 51:	Tyramin reguliert den Tonus der Halsmuskulatur	97
Abbildung 52:	Gegenseitige Kontrolle der verschiedenen modulatorischen Systeme?	98
Abbildung 53:	Die physiologische Rolle von Octopamin und Tyramin bei <i>C. elegans</i>	103

Abkürzungsverzeichnis

AKH	adipokinetisches Hormon
aBoc	<i>anterior body(muscle) contraction</i> (synchrone Kontraktion der anterioren Hypodermalmuskeln)
bp	Basenpaare
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat (3',5'-cyclo-AMP)
cDNA	<i>copy</i> -DNA
GTP	Guanosin-triphosphat
DAG	Diacylglycerin
DMP	Defäkationsmotorprogramm
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMFA	Dimethylformamid
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
DNS	dorsaler Nervenstrang
DRG	Dorsorektalganglion
DTT	Dithiotreithol
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia Coli</i>
EDTA	Ethylen-diamin-tetraacetat
EGTA	Ethylen-glycol-tetraacetat
EMC	<i>enteric muscle contraction</i> (Kontraktion der enterischen Muskeln)
ER	Endoplasmatisches Reticulum
exp	Expulsion
GABA	γ -Aminobuttersäure
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i> (das grün fluoreszierende Protein)
G-Protein	guanylnukleotid-bindendes Protein
GTP	Guanosinnukleotidtriphosphat
hypMU	hypodermale Muskulatur
IP ₃	Inositol-1,4,5-triphosphat
MCS	<i>multiple cloning site</i> (multiple Klonierungsstelle)
NGM	<i>Nematode Growth Medium</i>
NS	Nervenstrang
OA	Octopamin
pBoc	<i>posterior body(muscle) contraction</i> (synchrone Kontraktion der posterioren Hypodermalmuskeln)
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion)
PKC	ProteinkinaseC
PLC	PhospholipaseC
PIP ₂	Phosphatidyl-Inositol-bisphosphat
PIPES	Piperazin-N,N'-bis-2-ethansulfonsäure

PAG	Prä-Analganglion
RNA	<i>ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure)
RNAi	RNA-Interferenz
dsRNA	doppelsträngige RNA
rRNA	<i>ribosomal ribonucleic acid</i> (ribosomale Ribonukleinsäure)
rpm	<i>rounds per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RVG	Retrovesikularganglion
S	Sedimentationskoeffizient
SDS	<i>sodiumdodecylsulfat</i> (Natriumdodecylsulfat)
TA	Tyramin
Tris	Tris-hydroxymethyl-aminothan
VNS	ventraler Nervenstrang

Abkürzungen, die auf Empfehlungen der IFCC (International Federation for Clinical Chemistry) und IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) beruhen, werden nicht gesondert aufgeführt. Gleiches gilt für Abkürzungen des „Système Internationale d’Unités“. Die übrigen hier nicht aufgeführten Abk. (Abkürzungen) sind im Text erläutert.

1. Einleitung

1.1 Der Nematode *C. elegans*

Caenorhabditis elegans ist ein freilebender terrestrischer Nematode, der zur Familie der Rhabditidae gehört und im ausgewachsenen Zustand eine Länge von etwa einem Millimeter erreicht. Er lebt normalerweise auf sich zersetzendem organischen Material und ist bacterivor. Es gibt zwei Phänotypen, einen männlichen und einen zwittrigen. Die für Nematoden typische getrenntgeschlechtliche Fortpflanzung ist bei *C. elegans* jedoch eher die Ausnahme, dementsprechend gering ist der prozentuale Anteil der Männchen an einer durchschnittlichen (Labor-)Population. Die Hermaphroditen sind protandrisch und autogam. Nach erfolgter Selbstbefruchtung legen sie während ihres vier Tage andauernden reproduktiven Lebensabschnitts etwa 300 Eier. Die geschlüpften Nachkommen entwickeln sich innerhalb von 35 Stunden über vier durch Häutungen voneinander abgegrenzte Larvalstadien ohne Metamorphose zu adulten Tieren. Diese haben eine Lebensdauer von 14 bis 20 Tagen. Die vier Larvalstadien L1 bis L4 und die adulten Tiere sind leicht anhand ihrer Körpergröße voneinander zu unterscheiden (Wood, 1988).

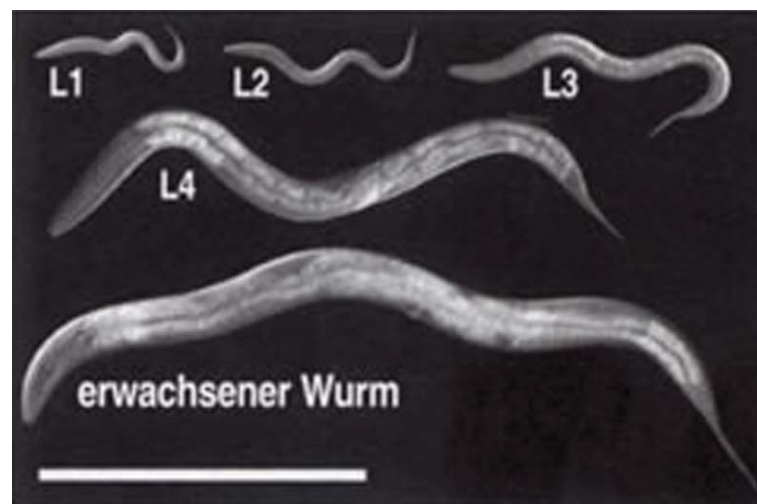


Abbildung 1: Die vier Larvalstadien und ein adulter Wurm im Vergleich
(Maßstab entspricht 0,4mm; © J. Ahringer)

Die phylogenetische Position der Nematoden ist bis heute umstritten. Traditionell wurden sie aufgrund des Fehlens einer sekundären Leibeshöhle (Coelom) den Tiergruppen mit einem Coelom (Coelomata) gegenübergestellt. Ende der 1990er Jahre wurden bei Sequenzvergleichen eines Gens (für 18S rRNA) Hinweise gefunden, die in Verbindung mit neuen morphologischen Erkenntnissen in die

Formulierung der Ecdysozoa-Hypothese mündeten (Aguinaldo et. al., 1997). Diese fasst die Nematoden mit den Arthropoden, welche ein Coelom besitzen, und einigen anderen Tierstämmen zu den ‚Häutungstieren‘ zusammen. Das gemeinsame Merkmal des Vorkommens von Larvalhäutungen machte die Hypothese plausibel, sodass sie in kürzester Zeit sehr populär wurde. Neuere Untersuchungen deuten nun aber darauf hin, dass die ursprüngliche Einordnung der Nematoden doch korrekt war. Der Vergleich hunderter orthologer Proteine verschiedenster Organismen zeigte unter anderem, dass die Arthropoden dem Menschen verwandtschaftlich näher stehen als den Nematoden (Blair et. al., 2002; Wolf et. al., 2004).

C. elegans ist seit seiner Einführung in die genetische Forschung durch Sydney Brenner vor rund 40 Jahren ein sehr beliebtes Forschungsobjekt und war der erste der drei großen Modellorganismen (mit *M. musculus* und *D. melanogaster*), dessen Genom vollständig sequenziert wurde.

Seine Beliebtheit beruht vor allem auf dem invarianten Zellstammbaum. Dieser ist von der Zygote bis zum adulten Hermaphroditen kartographiert und jede der 959 Körperzellen ist individuell ansprechbar. Die Entwicklung ist von der befruchteten Eizelle bis zum adulten Tier aufgrund der Transparenz des Organismus gut zu beobachten. Für die Identifizierung einzelner Zellen stehen zahlreiche Methoden zur Verfügung. Dazu kommt ein reichhaltiges Arsenal molekularbiologischer Techniken für Untersuchungen auf genetischer Ebene. Es existieren von zahllosen seiner 19099 Gene Mutanten. Mit Hilfe der RNAi-Technik wurden bereits mehrere Untersuchungen mit unterschiedlichen Fragestellungen durchgeführt, bei denen quasi jedes dieser Gene einzeln herabreguliert und der daraus folgende Phänotyp, wenn auch nur oberflächlich, beschrieben werden konnte (Ashrafi et al., 2003; Kamath et al., 2003; Pothof et al., 2003; Simmer et al., 2003). *DNA-Microarrays* werden eingesetzt um die Aktivitäten von Genen im Verlaufe der Entwicklung, unter besonderen Umweltbedingungen oder in Abhängigkeit der Aktivität bestimmter Gene zu untersuchen (Kim et al., 2001; Wang und Kim, 2003).

Trotz seines niedrigen Organisationsniveaus ist *Caenorhabditis elegans* durchaus zur Ausübung komplexer Verhaltensmuster in der Lage. Eine differenzierte Analyse der beteiligten Organe, Nervenzellen und Gene ist aus den genannten Gründen relativ einfach. Viele seiner Gene weisen Homologien zu denen des Menschen auf, was ihn auch für die medizinische Forschung interessant macht.

1.2 Das Nervensystem

Als Vertreter der Bilateria weisen Nematoden einen bilateralsymmetrischen Körperbau auf. Dieses zeigt sich auch in der Architektur des Nervensystems von *C. elegans*, welches aus einem Schlundring (Ringneuropil), sechs anterioren und vier posterioren Ganglien sowie zehn longitudinalen Nervensträngen aufgebaut ist. Wie alle Nematoden besitzt *C. elegans* einen prominenten ventralen und einen dorsalen longitudinalen Nervenstrang. Dazu kommen pro Körperhälfte je ein dorsal-sublateraler, zwei laterale und ein ventral-sublateraler Nervenstrang (siehe Abb. 2). Außerdem entsenden die sensorischen Labialneuronen ihre Fortsätze in jeweils drei Strängen versammelt in die Labiallappen am Vorderende des Wurms.

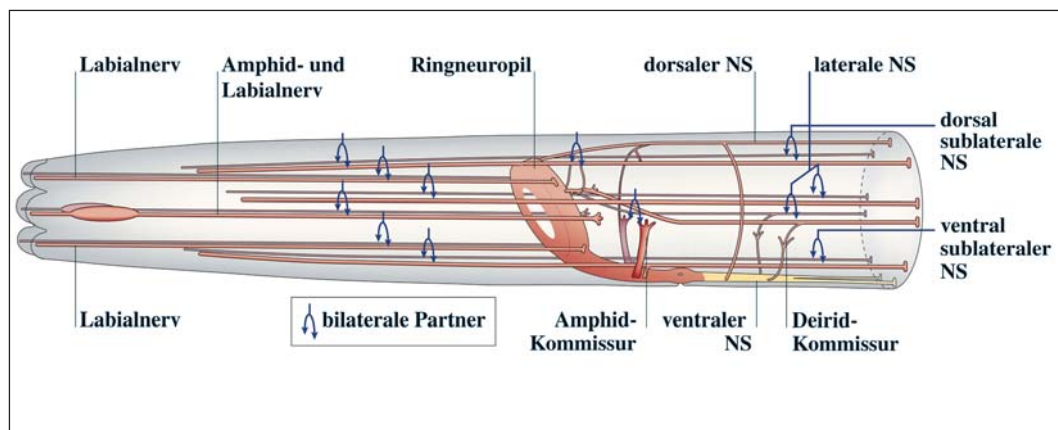


Abbildung 2: Anordnung der Nerventrakte bei *C. elegans* (schematisch, Lateralansicht)

Verändert nach Hobert et. al. (2002); ursprünglich aus White et al. (1986). NS = Nervenstrang

Die Hälfte aller Neuronen ist in den sechs Ganglien zu finden, die den Schlundring umgeben, eines davon ist anterior und fünf posterior des Schlundrings gelegen. Von diesen fünf sind zwei lateral, jeweils eines dorsal bzw. ventral und eines weiter posterior gelegen. Letzteres wird als Retrovesikularganglion (RVG) bezeichnet und überlappt teilweise mit dem anterioren Teil der Zellen des ventralen Nervenstranges (siehe Abb. 3). Jedes Ganglion ist von einer Basallamina umgeben.

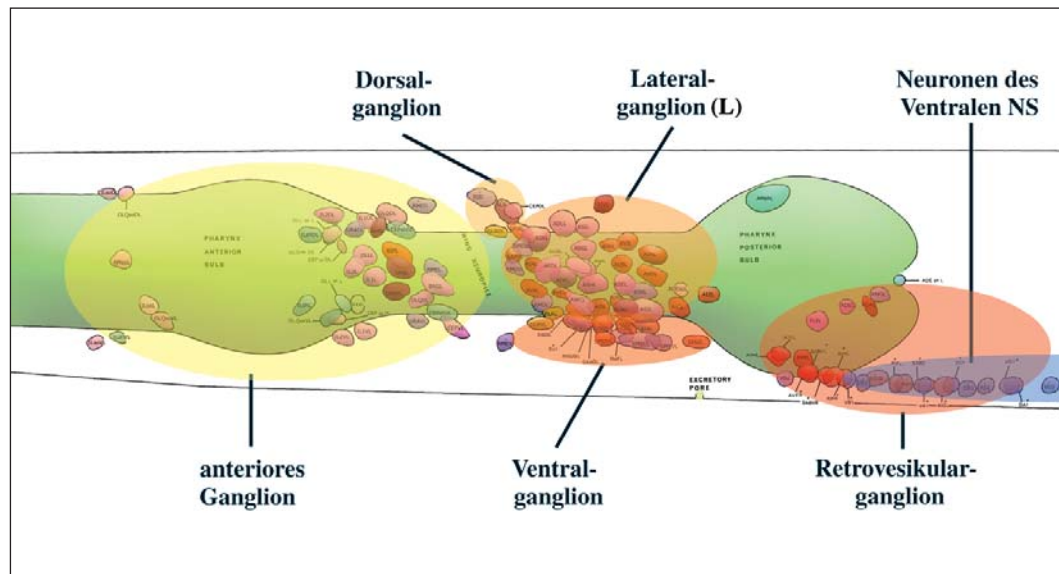


Abbildung 3: Die Lage der anterioren Ganglien (schematisch, Lateralansicht)

Verändert nach White et al., 1986. Von den lateralen Ganglien ist nur das linke dargestellt.

NS = Nervenstrang

Auch posterior sind Ansammlungen von Nervenzellen in Ganglien zu beobachten. Das Prä-Analganglion (PAG) ist ähnlich dem RVG mit Motoneuronen des ventralen Nervenstrangs durchsetzt und bildet seinen posterioren Endpunkt. Das Dorsorektalganglion setzt sich wie das anteriore Dorsalganglion aus nur sehr wenigen Neuronen zusammen. Die Lumbarganglien sind wie die anterioren Lateralganglien bilateralsymmetrisch angeordnet (siehe Abb. 4).

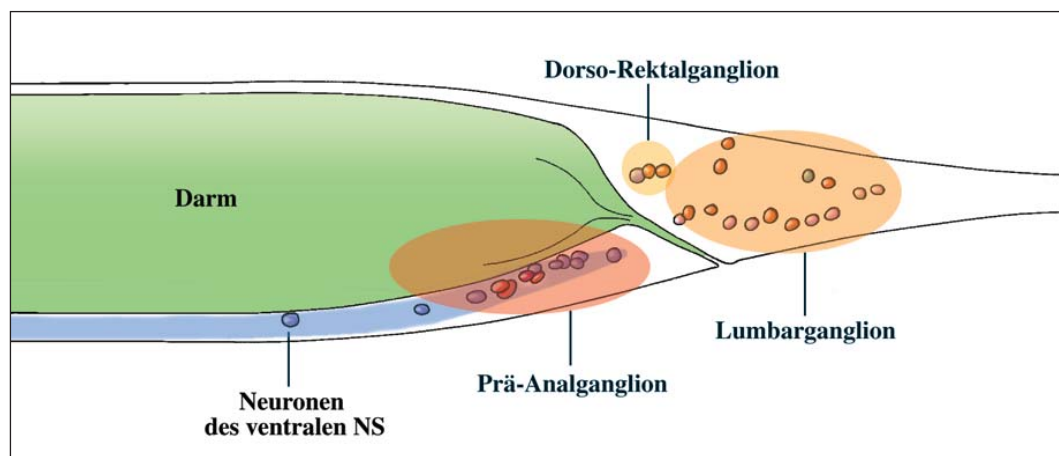


Abbildung 4: Die Lage der posterioren Ganglien (schematisch, Lateralansicht)

Verändert nach White et al., 1986. Von den Lumbarganglien ist nur das linke dargestellt.

Die Bilateralsymmetrie wird an einigen Stellen (z.B. in den dorsalen Ganglien und im VNS) unterbrochen. Streng determiniert ist hingegen die Anzahl der Neuronen. Bei adulten Hermaphroditen von *C. elegans* sind es exakt 302 Zellen. Grob werden diese aufgrund ihrer Funktion in sensorische Neuronen, Motoneuronen und Interneuronen unterteilt. Alle Neuronen, denen keine Funktion als Motoneuron oder sensorisches Neuron zugeschrieben werden konnte, werden vereinfachend als Interneuron bezeichnet. Manche Neuronen haben allerdings mehrere dieser Funktionen inne.

Die Auswertung elektronenmikroskopisch hergestellter Aufnahmen von Schnittserien ermöglichte eine differenziertere Einteilung. Auf der Basis ihrer invarianten morphologischen Eigenschaften und der Art ihrer synaptischen Verbindungen wurden die Neuronen in 118 verschiedene Klassen eingeteilt, die sich aus ein bis dreizehn Mitgliedern zusammensetzen. Aus den jeweiligen Charakteristika leitet sich auch die Nomenklatur ab, die White und andere (1986) für die Neuronen eingeführt haben. Jedes Neuron hat ein aus drei Buchstaben zusammengesetztes Kürzel, das seine Klassenzugehörigkeit angibt. Dieses wird gegebenenfalls durch weitere Buchstaben ergänzt, welche die Lage angeben (D = dorsal, V = ventral, R = rechts, L = links). Reicht dieses nicht aus, sind Neuronen derselben Klasse durch eine Nummerierung auseinander zu halten.

Die Kartierung der Verbindungen offenbarte 5000 chemische, 600 elektrische Synapsen und 2000 neuromuskuläre Synapsen. 75% aller Verbindungen haben sich bei dem Vergleich mehrerer Individuen als reproduzierbar erwiesen.

Diese außerordentliche Konstanz, in Verbindung mit einem relativ geringen Komplexitätsgrad, hat die Hoffnung aufkeimen lassen, eines Tages zu einem umfassenden Verständnis der Funktion des Nervensystems im Modellsystem *C. elegans* zu gelangen.

1.3 Tyramin und Octopamin

Die biogenen Amine Tyramin (TA) und Octopamin (OA) werden gemeinhin als die funktionellen Pendanten der Invertebraten für das Noradrenalin und Adrenalin der Wirbeltiere angesehen. Auch strukturell sind diese Substanzen sich sehr ähnlich (siehe Abb. 5).

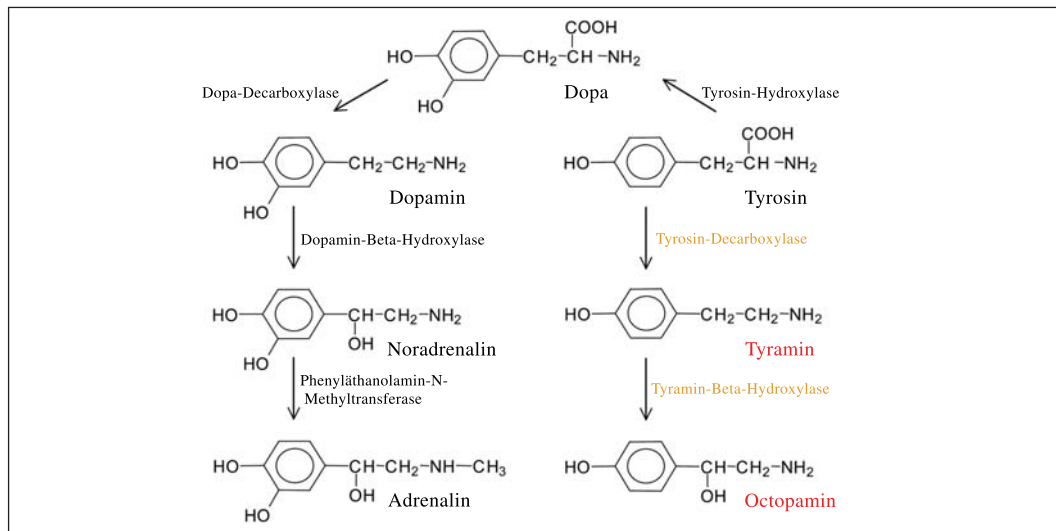


Abbildung 5: Molekulare Struktur und Synthese der biogenen Amine Tyramin und Octopamin
Wie aus der Grafik ersichtlich wird, haben die Katecholamine Noradrenalin und Adrenalin denselben Ursprung wie TA und OA. Die Synthese geht in beiden Fällen von der Aminosäure Tyrosin aus.

Der erste Nachweis von Octopamin gelang Erspamer und Boretti (1951) in einem Extrakt aus den Speicheldrüsen von *Octopus vulgaris*. Daraus leiteten sie den Namen dieser sehr bedeutsamen Substanz ab. Während Noradrenalin und Adrenalin bei Arthropoden nicht gefunden wurden, zeigte sich, dass Tyramin und Octopamin bei ihnen in vielen Geweben in hoher Konzentration vorliegen (Axelrod und Saavedra, 1977; Evans, 1978; Orchard, 1982). Octopamin ist wesentlich besser untersucht als Tyramin, was damit zusammenhängt, dass Tyramin als Vorstufe des Octopamins stets mit diesem co-lokalisiert ist und die Wirkungen der beiden Amine daher schwer zu differenzieren sind. Ob die Co-Lokalisierung auch mit einer (unkontrollierten) gleichzeitigen Freisetzung einhergeht, ist bis jetzt nicht geklärt. Die meisten der Wirkungen von Tyramin und Octopamin wurden bei Untersuchungen mit Arthropoden aufgedeckt, was einerseits damit zusammenhängt, dass sie dankbare Untersuchungsobjekte abgeben, andererseits sah man in den Octopaminrezeptoren aufgrund ihrer strukturellen Unterschiede gegenüber den α - und β -adrenergen Rezeptoren der Vertebraten einen geeigneten Ansatzpunkt für die Herstellung gezielt wirkender Insektizide.

Es wurde gezeigt, dass Octopamin als Neurotransmitter, Neuromodulator und als Neurohormon fungiert (Orchard, 1982). Zu den zahllosen modulatorischen Wirkungen des Octopamins gehören die Veränderung der Eigenschaften von Sinnesorganen (z.B. die Dunkeladaptation bei *Limulus polyphemus*; O'Day und Lisman, 1985) und der Eigenschaften von Skelettmuskeln (z.B. *extensor tibiae* Muskel bei Orthopteren; Evans und O'Shea, 1978). Große Bedeutung kommt ihm auch bei der Steuerung des Verhaltens zu: so konnten Sombati und Hoyle (1984) durch gezielte Applikation in diskreten Hirnarealen von Heuschrecken verschiedene Lokomotionsverhalten oder auch Grabverhalten auslösen, dass normalerweise im Kontext der Eiablage ausgeführt wird.

Die sogenannte *arousal*-Wirkung (Bacon et al., 1995; Stern, 1999) oder die Wirkungen im Rahmen des Aggressionsverhaltens, das Hervorrufen der '*fight or flight*' Reaktion (Adamo et al., 1995) sind Paradebeispiele für den Einfluss des Octopamins auf das Verhalten. Auch die metabolischen Wirkungen von Octopamin sind zahlreich. So wurde anhand der Heuschrecke *Locusta migratoria* gezeigt, dass es über die Förderung der Freisetzung des adipokinetischen Hormons (AKH) aus den *corpora cardiaca* die Lipolyse in den Fettkörpern stimuliert (Pannabecker und Orchard, 1986). Am gleichen Organismus wurde erst kürzlich auch die gezielte Regulierung der Glykolyse in der Flugmuskulatur zur Deckung des gesteigerten Energiebedarfs beim Abflug und in den ersten Minuten des Fluges nachgewiesen (Mentel et al., 2003).

Über die Wirkungen des Tyramins ist hingegen wenig bekannt. Erst die Klonierung eines Tyraminrezeptors von *Drosophila melanogaster* (Saudou et al., 1990) bewirkte das Heraustreten des Tyramins aus seinem Schattendasein. In der Folge wurden auch bei der Heuschrecke *Locusta migratoria* und der Honigbiene *Apis mellifera* Tyraminrezeptoren entdeckt (Van Den Broeck et al., 1995; Blenau et al., 2000). Zusätzlich stehen einige seit langem bekannte Octopaminrezeptoren – unter anderem aufgrund ihrer Sequenzhomologie zu den Tyraminrezeptoren – im Verdacht, eher dem Tyramin zugeordnet werden zu müssen (Roeder et al., 2003). Trotz all dieser Fortschritte konnten den genannten Rezeptoren noch keine spezifischen Funktionen zugeschrieben werden. Selbst eine *Drosophila*-Mutante mit verminderter Expression des Tyraminrezeptors (*honoka*) hat dazu keinen bedeutenden Beitrag geleistet. Es konnte hier lediglich eine Beeinträchtigung der olfaktorischen Leistungen festgestellt werden (Kutsukake et al., 2000).

Alle bisher gefundenen Tyramin- und Octopaminrezeptoren haben die Struktur von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren. Aus den relativ überschaubaren Daten hierzu geht hervor, dass Octopamin- und Tyraminrezeptoren über die Kopplung an unterschiedliche G-Proteine ein breites Spektrum an Signalkaskaden für die Transduktion der jeweiligen Signale nutzen (Gerhardt et al., 1997; Chang et al., 2000). Es gibt sogar Hinweise darauf, dass Octopamin und Tyramin bei ein und demselben Rezeptor unterschiedliche Kopplungen hervorrufen (Robb et al., 1994).

Für die pharmakologische Charakterisierung von Tyraminrezeptoren hat sich Yohimbin als sehr wertvoll erwiesen. Zusammen mit seinem Stereoisomer Rauwolscin ist dieses Alkaloid des Yohimbe-Strauches die einzige bekannte Substanz, welche die Eigenschaften eines spezifischen Tyramin-Antagonisten besitzt. Für Octopaminrezeptoren ist im Rahmen der Insektizidforschung eine ganze Reihe von Agonisten gefunden worden. Als Octopamin-Antagonist mit höchster Spezifität hat sich das Epinastin erwiesen (Roeder et al., 1998).

Ähnlich wie bei den anderen Invertebraten ist auch bei *C. elegans* der Focus der Forschung eher auf das Octopamin gerichtet – aber selbst darüber ist nicht viel bekannt. Ein Großteil des heutigen Wissens über die Wirkungen von Octopamin bei *C. elegans* basiert auf einer Arbeit von Horvitz und anderen (1982). Neben dem Nachweis des Vorkommens von Octopamin brachten die Autoren durch externe Applikation des Amins inhibitorische Effekte beim Eiablageverhalten, der Lokomotion und dem Pharynxpumpen zum Vorschein. Außerdem schrieben sie dem Octopamin die Funktion eines Hungersignals zu. Wie sich im Rahmen der vorliegenden Arbeit herausstellte, war die inhibierende Wirkung auf die Lokomotion offenbar das Artefakt einer Überdosierung.

In den letzten 20 Jahren hat sich an diesem Wissensstand nicht viel geändert, zumal bisher kein Rezeptor gefunden wurde, der die beobachteten Wirkungen vermittelt. Lediglich die inhibitorische Wirkung auf das Pharynxpumpen wurde nochmals untersucht (Rogers et al., 2001). Über Tyraminwirkungen bei *C. elegans* gab es vor dem Beginn der Untersuchungen der vorliegenden Arbeit keinerlei Informationen.

1.4 Verhaltensprogramme

Im Folgenden sollen die Grundlagen der in dieser Arbeit zur Analyse der octopaminergen und tyraminerger Signale herangezogenen Verhaltensprogramme kurz dargelegt werden.

1.4.1 Eiablage

Das Eiablageverhalten bei *C. elegans* ist ein recht gut untersuchtes Modellsystem. Die wichtigsten Komponenten dieses Systems sind die Vulva, die Vulva- und Uterusmuskulatur sowie die Hermaphroditen-spezifischen Neuronen (HSN) und die ebenfalls nur im Hermaphroditen vorkommenden Typ-C-Neuronen des ventralen Nervenstrangs (VC1-6). Nach kurzer Entwicklungszeit im Uterus werden die Eier durch die Vulva, einer ventralen Öffnung in der Hypodermis des Wurms entlassen. Dies wird durch die Kontraktion von 16 elektrisch gekoppelten Muskelzellen erreicht. Acht von diesen, die Uterusmuskeln (um), üben Druck auf den Uterus aus, während die acht Vulvamuskeln (vm) die Vulva öffnen. Die Kontraktion der Muskeln wird durch die Freisetzung von Serotonin aus den HSN-Neuronen reguliert (Trent et al., 1983; Desai et al., 1988). Acetylcholin-Agonisten stimulieren die Uterus- und Vulvamuskulatur, während Dopamin-Agonisten die Eiablage hemmen (Weinshenker et al., 1995). Die VC-Neuronen inhibieren hingegen durch die Freisetzung von Acetylcholin an ihren Synapsen mit den HSN-Neuronen die Eiablage (Bany et al., 2003). Es konnte gezeigt werden, dass Octopamin die Eiablage hemmt, während der Octopamin-Antagonist Phentolamin diese stimuliert (Horvitz et al., 1982). Eiablage und Lokomotionsverhalten sind auf neuronaler Ebene durch die Aktivität der HSN-Neuronen verknüpft und werden so miteinander koordiniert (Hardaker et al., 2001).

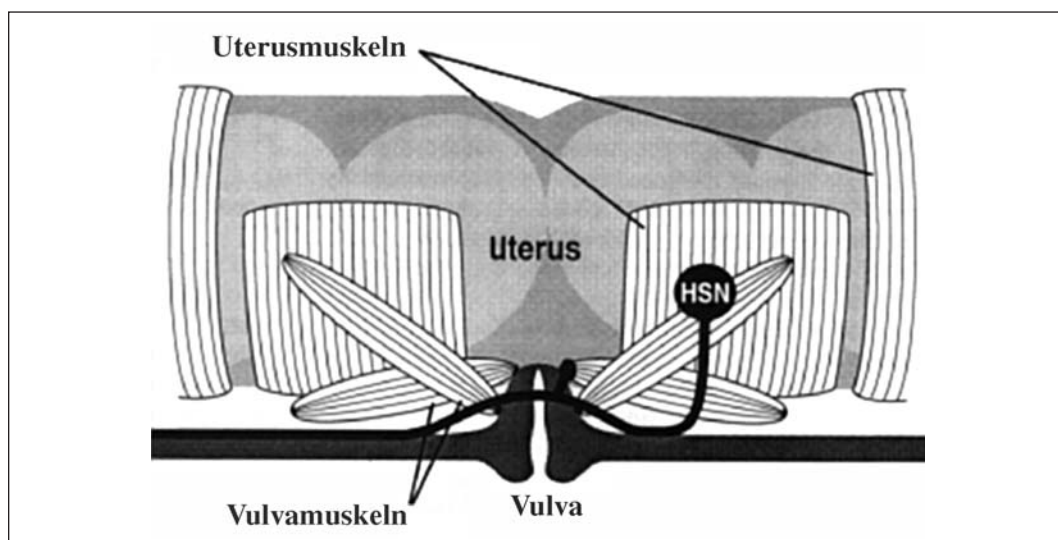


Abbildung 6: Schematische Darstellung des Eiablageapparats (Lateralansicht)

Die im Text erwähnten VC-Motoneuronen sind nicht berücksichtigt (nach Wood, 1988).

1.4.2 Defäkation

Das Defäkatonsverhalten bei *C. elegans* wird durch zyklische Aktivierung stereotyper Muskelkontraktionen erreicht. Ein Zyklus dauert bei ausreichend mit Nahrung versorgten Würmern durchschnittlich 50s und ist temperaturunabhängig (Liu und Thomas, 1994; Iwasaki et al., 1995). Dieser ultradiane Rhythmus wird in den Zellen des Darms in Form von Calciumoszillationen generiert, für deren Auftreten ITR-1, ein Inositoltrisphosphat-Rezeptor, essentiell ist (Dal Santo et al., 1999). Der Weg, auf dem dieses Signal an die Muskeln weitergegeben wird, ist bisher allerdings unbekannt. Es wird über die Calcium-vermittelte Ausschüttung eines Botenstoffes in das Pseudocoel spekuliert.

An der Ausführung des Defäkatons-Motorprogramms (DMP) sind drei verschiedene Muskelgruppen beteiligt, die posterioren und anterioren hypodermalen Muskeln sowie die enterischen Muskeln. Letztere sind vier spezialisierte Muskelzellen, von denen zwei den Darm umgeben und deshalb Intestinalmuskeln genannt werden, ein weiterer fungiert als Schließmuskel, und der vierte vergrößert bei Kontraktion die Analöffnung – alle vier sind durch elektrische Synapsen miteinander gekoppelt (siehe Abb. 7).

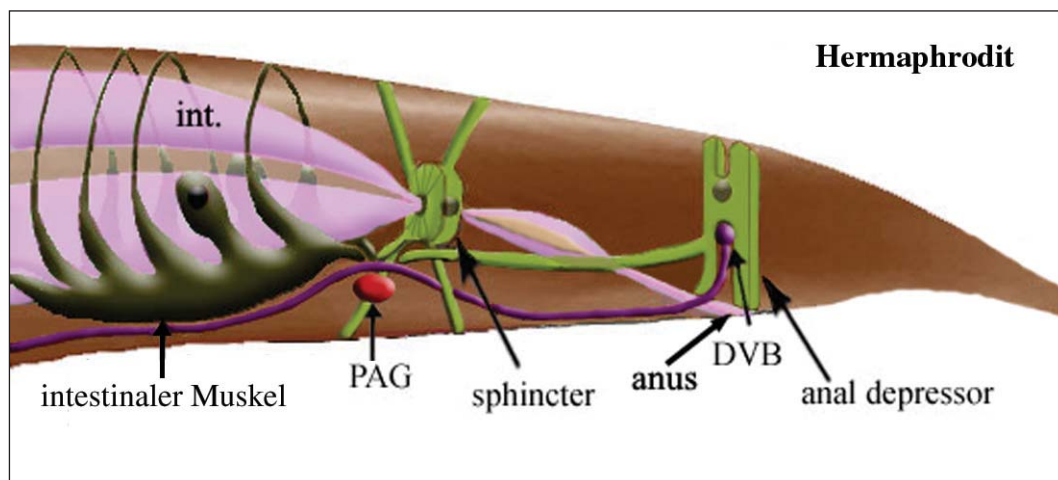


Abbildung 7: Die für die Expulsion benötigten Muskeln (schematisch, Lateralansicht)

PAG = Prä-Analganglion (verändert, ©2002 Wormatlas)

Jede Defäkation beginnt mit einer Kontraktion der posterioren Hypodermal-muskeln (pBoc), die den Darminhalt zurück in den vorderen Teil des Darms drückt. Eine Sekunde später tritt Relaxation ein und der Darminhalt beginnt wieder nach posterior zu fließen. Unterstützt wird dies durch die Kontraktion der anterioren Hypodermalmuskeln (aBoc), die den starren Pharynx wie einen Kolben nach hinten treibt, wodurch der Darminhalt am Darmausgang konzentriert wird. Schließlich führt die synchrone Kontraktion der enterischen Muskeln (EMC) zur Expulsion (exp) des Darminhalts (siehe Abb. 8b).

Zur Ausführung des DMP sind die GABAergen Motoneuronen AVL und DVB notwendig (McIntire et al., 1993a; Avery und Thomas, 1997). Beide Motoneuronen geben an die enterischen Muskeln ein exzitatorisches GABAerges Signal ab. Das von AVL ausgehende exzitatorische Signal an die anterioren Muskeln hingegen ist nicht GABAerg, da es in Mutanten, denen der Transmitter GABA fehlt, noch Wirkung zeigt (Thomas, 1990). AVLs fehlende neuromuskuläre Kontakte in der Kopfregion (White et al., 1986) legen vielmehr nahe, dass dieses Signal über mindestens ein weiteres Interneuron auf die anterioren Muskeln verschaltet ist (siehe Abb. 8a).

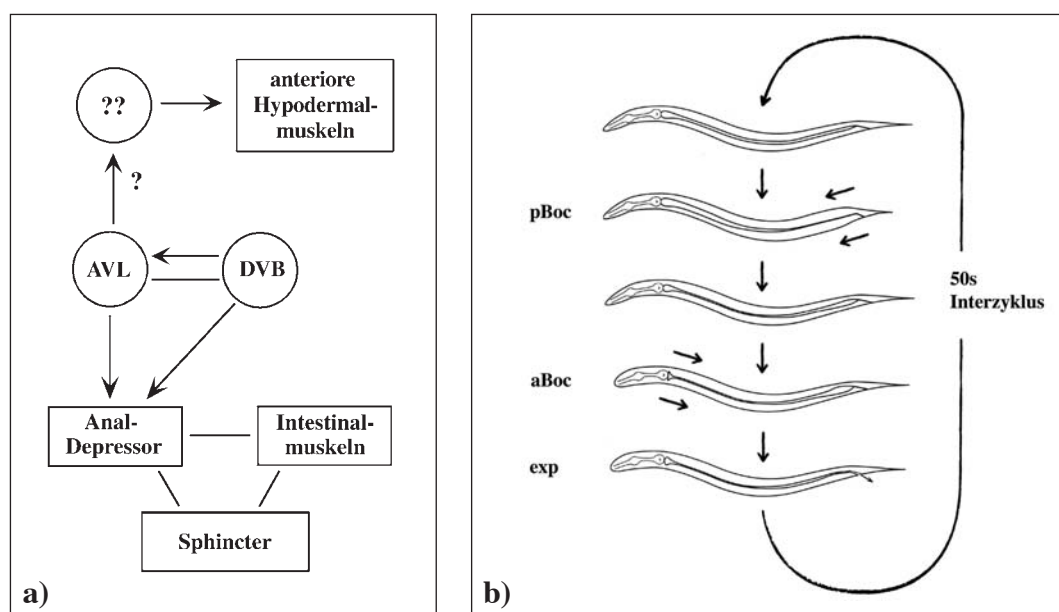


Abbildung 8: Das Defäkations-Motorprogramm: a) Steuerung b) Ausführung
a) verändert nach Thomas und Lockery, 1999; b) nach Avery und Thomas, 1997)

1.4.3 Lokomotion

1.4.3.1 Grundlagen

Die Lokomotion ist sicherlich das komplexeste der in dieser Arbeit betrachteten Verhaltensprogramme. Abgesehen von dem grundsätzlichen Problem der Erzeugung einer koordinierten Fortbewegung des Tieres, muss das Programm flexibel steuerbar sein, um die unterschiedlichen Aufgaben, denen sich das Tier in seiner natürlichen Umgebung gegenüberstellt, zu bewältigen.

Der Fortbewegungsapparat des Nematoden *C. elegans* besteht -vereinfacht ausgedrückt- aus einem flüssigkeitsgefüllten Hautmuskelschlauch. Die Anatomie der hypodermalen Muskulatur und ihre synaptischen Eingänge beschränken die Möglichkeiten der Lokomotionsbewegungen auf dorso-ventrale Bewegungen des Körpers. Nur der Kopf ist durch die Art der Innervierung zu Bewegungen in alle Raumrichtungen befähigt. Die Lokomotionsbewegungen werden vom Wurm quasi auf der Seite liegend ausgeführt und bestehen aus alternierenden ventralen und dorsalen Biegungen des Körpers, die eine sinusförmige Welle über die Längsachse laufen lassen.

Die Muskulatur liegt in Längsrichtung des Körpers in vier dorsalen und vier ventralen Reihen vor. Jede Reihe besteht aus zwölf Muskelzellen (mit einer Ausnahme), die in gestaffelter Anordnung den gesamten Körper durchziehen (siehe Abb. 9 und 10).

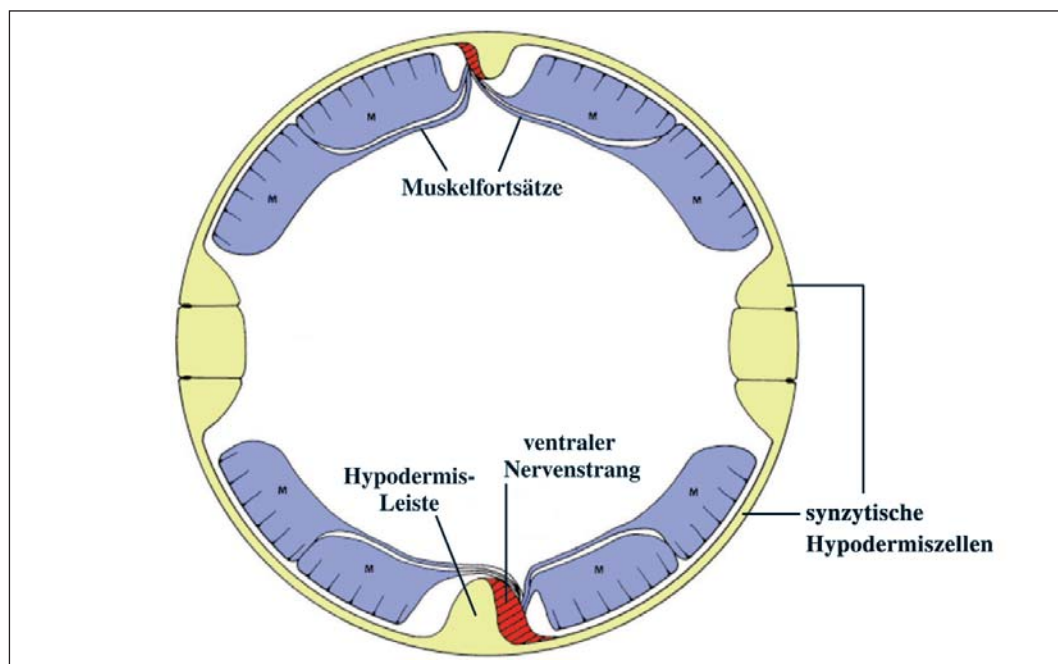


Abbildung 9: Anordnung der hypodermalen Muskeln (schematisch, Querschnitt)

(M = Muskel) Andere Organe wie Darm und Gonaden sind aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht abgebildet (verändert nach White et al., 1986).

Besonderheiten, die die Morphologie und Struktur der Muskelzellen betreffen, sind einerseits die Ausbildung keulenförmiger Arme, die -in Umkehrung der sonst auftretenden Verhältnisse- eine Verbindung zum Nervensystem herstellen (Kahnmuskelzellen) und andererseits die Anordnung der Filamente in den Zellen (schräg gestreifte Muskeln), die eine starke Verkürzung der Muskulatur ermöglicht. Während die Kahnmuskelzellen ein typisches Merkmal der Nematoden sind, ist die schräg gestreifte Muskulatur auch in anderen Phyla zu finden.

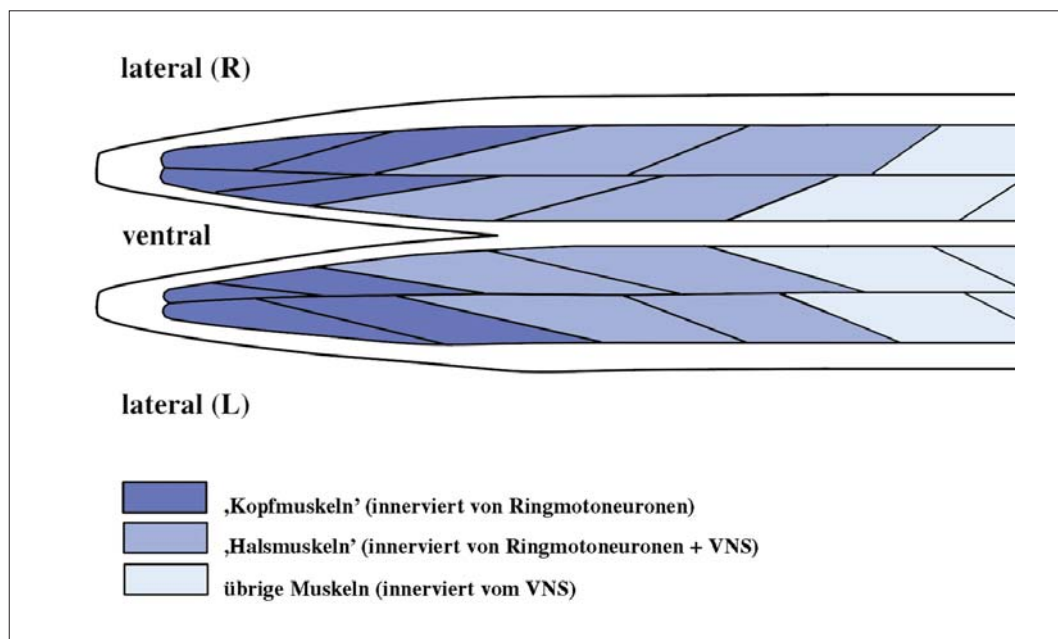


Abbildung 10: Anordnung der hypodermalen Muskeln (schematisch, Sagittalschnitt)

Es sind nur die ventral gelegenen Muskeln gezeigt (verändert nach White et al., 1986).

Die dorsalen und ventralen Muskeln werden von unterschiedlichen Motoneuronen kontrolliert. White und andere (1986) definierten aufgrund von Unterschieden in der Axonmorphologie und den synaptischen Verknüpfungsmustern fünf verschiedene Klassen von Motoneuronen (A, B, D, AS und VC). Zusätzlich wurde die Nomenklatur nach der Lage der Nerv-Muskel-Kontakte festgelegt. VA, VB, VC und VD innervieren die ventralen Muskeln, während AS, DA, DB und DD mit den dorsalen Muskeln Kontakte haben. Von jeder Motoneuron-Klasse existieren mehrere Mitglieder, die entlang des ventralen Nervenstrangs sequenziell angeordnet sind.

Zur Erzeugung der sinusförmigen Bewegung ist es notwendig, dass die Kontraktionen der ventralen und dorsalen Muskeln eine Phasenverschiebung bezüglich ihrer zeitlichen Abfolge aufweisen. Während der Kontraktion eines dorsalen Muskels muss also sein ventraler Gegenpart relaxiert sein.

Die A-, B- und AS-Motoneuronen enthalten den Transmitter Acetylcholin, welcher exzitatorisch auf die Muskeln wirkt. Die Motoneuronen vom D-Typ hingegen enthalten GABA, welches inhibierende Wirkung bezüglich der Kontraktion der Muskeln hat (McIntire et al., 1993b). Die Motoneuronen des A- und B-Typs bilden charakteristische *dyadische* Synapsen, mit denen sie gleichzeitig zwei verschiedene postsynaptische Ziele erreichen, nämlich einen Muskel und den Dendriten eines D-Typ-Motoneurons. Die GABAergen VD-Neuronen werden auf diese Weise synchron mit den jeweiligen dorsalen Muskeln von den A- und B-Typ-Motoneuronen aktiviert und zur Freisetzung von GABA an den ventralen Nerv-Muskel-Kontakten gebracht, was die jeweiligen ventralen Muskeln relaxiert. Der umgekehrte Fall gilt für die DD-Motoneuronen, die ihren *Input* auf der ventralen Seite bekommen und die dorsalen Muskeln relaxieren. Dieses Verschaltungsmuster nahmen sich White und andere (1986) zum Anlass die VD- und DD-Motoneuronen als reziproke Inhibitoren (*'cross-inhibitors'*) zu bezeichnen (siehe Abb. 11).

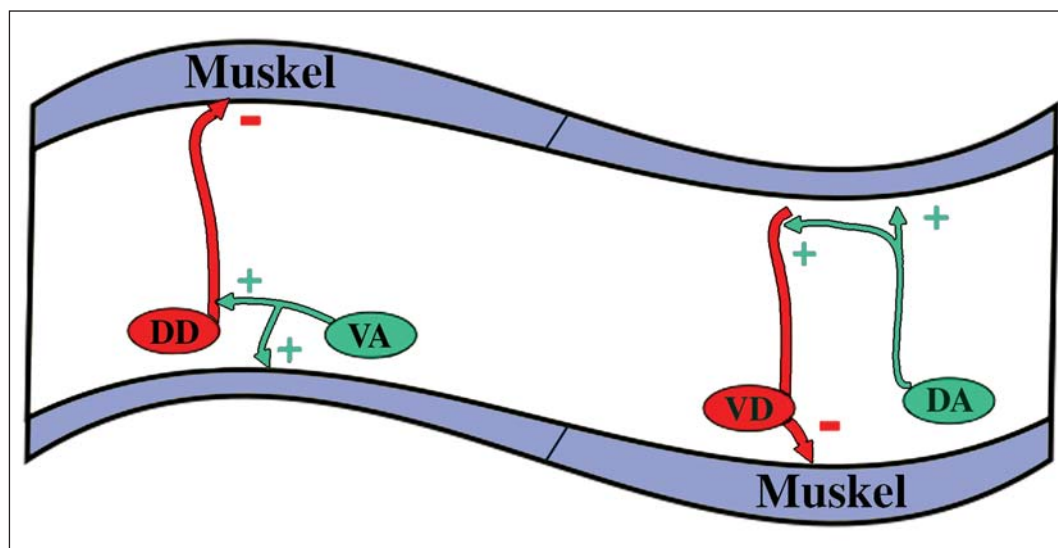


Abbildung 11: Reziproke Inhibition der Muskelkontraktion durch die D-Typ-Motoneuronen
grün = cholinerg, rot = GABAerg. Bei den anterioren Hypodermalmuskeln haben die ebenfalls GABAergen RME-Motoneuronen diese Funktion inne.

Der Mechanismus, mit dem unter Nutzung des eben erläuterten Netzwerkes eine sinnvolle zeitliche Abfolge in die Muskelkontraktionen gebracht wird, also die sinusförmige Bewegung generiert wird, ist noch unklar. Ein Erklärungsansatz geht davon aus, dass die Steuerung auf der Basis propriorezeptiver Informationen erfolgen könnte. Tatsächlich gibt es starke morphologische Hinweise auf die Funktion des Neurons PVD als Streckrezeptor (Way und Chalfie, 1989). Auch den A- und B-Typ-Motoneuronen selbst wird diese mögliche Funktion aufgrund ihrer Morphologie und Lage zugeschrieben – Beweise hierfür gibt es allerdings nicht. Gleiches gilt für die cholinergen Ringmotoneuronen SMB und SMD, welchen

diese Rolle im anterioren Bereich des Körpers zukommen könnte (Goodman und Schwarz, 2003).

Eine weitere Ansatzmöglichkeit bietet die Tatsache, dass sowohl die Muskeln als auch die einzelnen Klassen von Motoneuronen untereinander mit ihren jeweiligen Nachbarzellen durch 'gap-junctions' elektrisch gekoppelt sind. Es wäre denkbar, dass die sinusförmige Welle durch das Wandern der Erregung in Muskeln und/oder Motoneuronen über die Längsachse des Körpers erzeugt wird. Auch hier gibt es allerdings keine Erkenntnisse, die dieses Modell weiter stützen könnten.

Durch systematisches Eliminieren einzelner Neuronen mittels eines Laserstrahls war es möglich, den neuronalen Schaltkreis zur Steuerung der Lokomotion zu beschreiben (Chalfie et al., 1985). Demnach initiieren die Kommando-Interneuronen PVC und AVB zusammen mit den B-Typ-Motoneuronen die Vorwärtsbewegung des Wurms, die Rückwärtsbewegung hingegen wird von den Interneuronen AVA, AVE und AVD im Verbund mit den A-Typ-Motoneuronen erreicht (siehe Abb. 12). Die Kommando-Interneuronen wirken also quasi als 'bistabiler Schalter' der zwischen 'Vorwärtsgang' (B-Typ) und 'Rückwärtsgang' (A-Typ) schaltet (Tsalik et al., 2003). Die Motoneuronen vom D-Typ dienen, wie bereits dargelegt, der Koordination der Bewegungen.

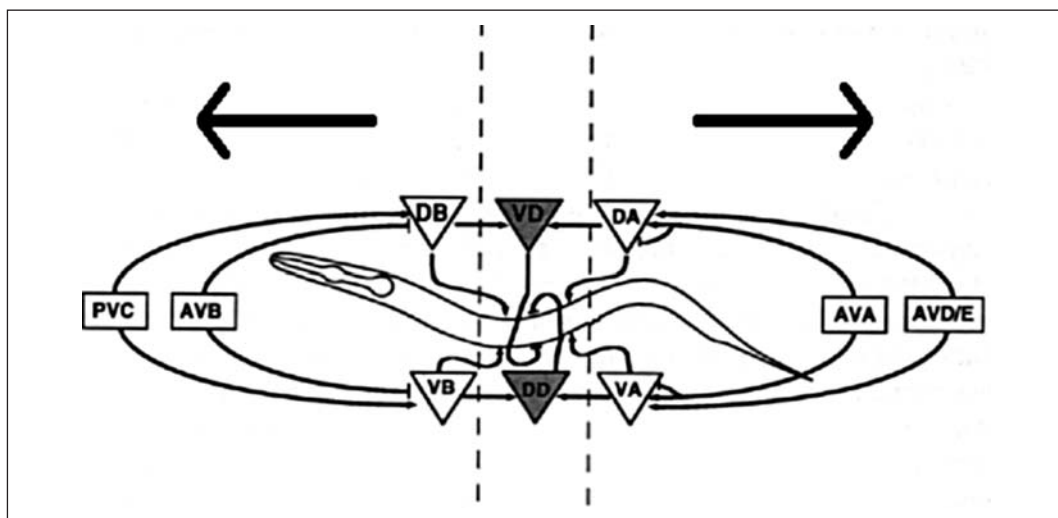


Abbildung 12: Steuerung der Lokomotion durch die Kommando-Interneuronen

(verändert nach Driscoll und Kaplan, 1997)

Die Interneuronen PVC und AVB initiieren zusammen mit den B-Typ-Motoneuronen die Vorwärtsbewegung des Wurms, AVA, AVD und AVE und die A-Typ-Motoneuronen die Rückwärtsbewegung. Die D-Typ-Motoneuronen gewährleisten den koordinierten Bewegungsablauf.

Auf ähnliche Weise sind inzwischen noch einige weitere Schaltkreise aus verschiedenen Verhaltenskontexten abgeleitet worden, die alle auf den Lokomotionsschaltkreis konvergieren (siehe Abb. 13). Viele Details liegen hier allerdings noch im Dunkeln.

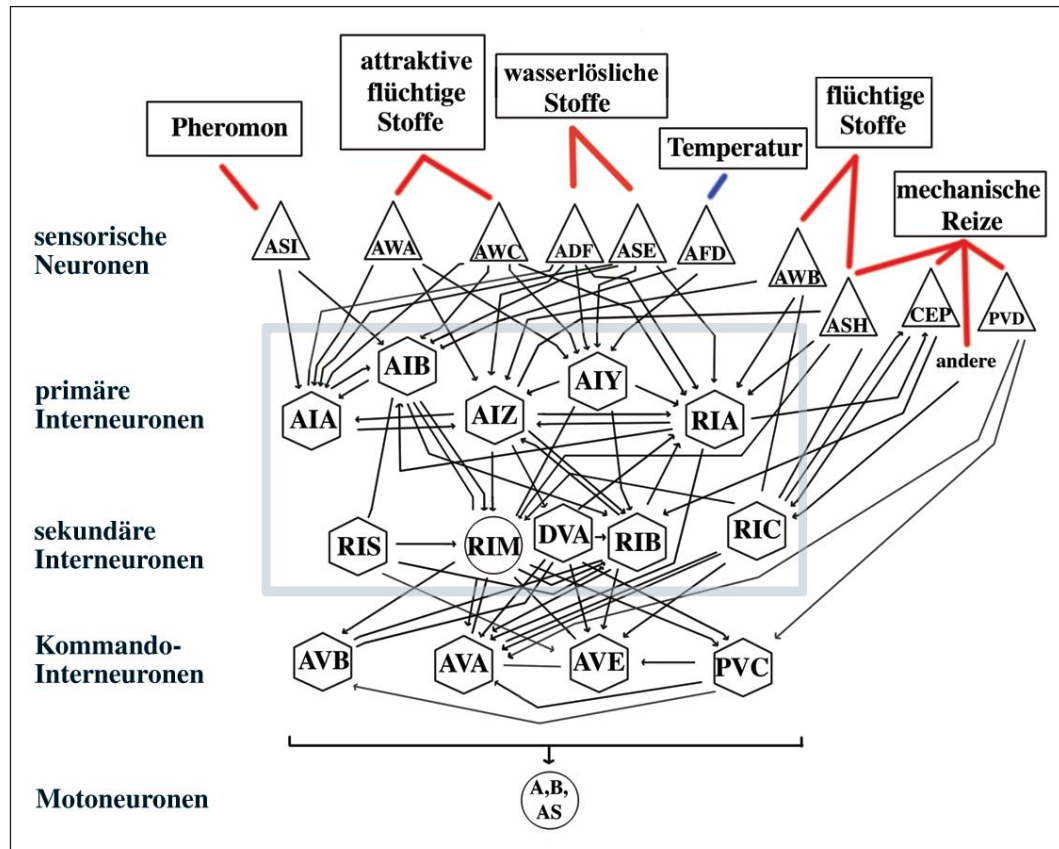


Abbildung 13: Verknüpfung von Sensorik und Motorik

(verändert nach Tsalik und Hobert, 2003, basierend auf White et al., 1986)

Sechsecke stehen für Interneuronen, Kreise für Motoneuronen und Dreiecke stehen für sensorische Neuronen. Pfeile stellen chemische, einfache Linien elektrische Synapsen dar. Grau umrahmt sind die Zellen, die zu diesem Zeitpunkt (noch) als *Black Box* behandelt werden müssen. Diese *Black Box* integriert multiple sensorische Eingänge und bestimmt den motorischen *Output*, welcher über die Kommando-Interneuronen an die Motoneuronen weitergegeben wird. Diese Grafik stellt eine Vereinfachung dar und erhebt in keiner Weise den Anspruch auf Vollständigkeit.

1.4.3.2 Verhaltenskontext 'basal' und 'enhanced slowing'

Dieser Verhaltenskontext soll hier genauer erläutert werden, da er den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit zum Einfluss tyraminerger und octopaminerger Signale auf das Lokomotionsverhalten von *C. elegans* zugrunde liegt.

Sawin und andere (2000) machten die Entdeckung, dass *C. elegans* in Abhängigkeit von seinem Ernährungszustand unterschiedlich stark auf die Anwesenheit seiner Nahrungsquelle – unter Laborbedingungen bestehend aus einem ‚Bakterienrasen‘ – mit einer Herabsetzung der Lokomotionsaktivitäten reagiert. In gutem Ernährungszustand befindliche Würmer reagieren demnach mit einer moderaten Verlangsamung, hungrige Würmer, d.h. solche, die mindestens 30min lang keine Nahrung aufgenommen haben, reagieren mit einer starken Verlangsamung ihrer Lokomotion. Die Autoren bezeichneten dieses Verhalten als 'basal slowing response' respektive 'enhanced slowing response'. Darüber hinaus stellten sie fest, dass ersteres Verhalten durch dopaminerge, letzteres hingegen durch serotonerge Signale gesteuert wird. Laser-Eliminierung aller acht dopaminergen Neuronen (4xCEP, 2xADE und 2xPDE, von Sulston und anderen bereits 1975 als dopaminerg erkannt) respektive eines der serotonergen Neuronenpaare (NSML/R, 1982 von Horvitz und anderen beschrieben) führte zu einem Ausbleiben der basalen und, im Falle der NSM-Neuronen, dem Ausbleiben der verstärkten Verlangsamung. Diese Erkenntnisse stehen im Einklang mit der verlangsamenden Wirkung von exogen verabreichtem Dopamin bzw. Serotonin auf das Lokomotionsverhalten. Die Wirkung des Serotonins wird in diesem Kontext über den u.a. in den Motoneuronen lokalisierten ionotropen Serotoninrezeptor MOD-1 vermittelt. Bei diesem handelt es sich um einen Chloridkanal mit inhibitorischer Wirkung (Ranganathan et al., 2000 und 2001).

Die Basis der beiden Verhaltensreaktionen ist nicht, wie vielleicht zu erwarten wäre, olfaktorischer Natur, sondern die Reaktionen erfolgen aufgrund von mechanorezeptiver Detektion der Bakterien. Die dopaminergen Neuronen CEP, ADE und PDE fungieren dabei als ‚äußere‘ Mechanosensoren (Ward, 1973; White et al., 1986), während die NSM-Neuronen möglicherweise als ‚innere‘ Mechanosensoren fungieren. Die strukturellen Voraussetzungen hierfür sind gegeben, denn sie bilden mit Cilien besetzte Fortsätze, die in das Lumen des Pharynx hineinragen (Albertson und Thomson, 1975).

Serotonin fungiert also als Signal für die Anwesenheit von Nahrung (Sawin et al., 2000). Octopamin hat bei *C. elegans* hingegen die Rolle eines Hungersignals (Horvitz et al., 1982), allerdings ist bis dato nichts Weiteres über die Mechanismen bekannt geworden, durch die das Octopamin diese Wirkung entfalten könnte; daher stellte die Untersuchung der basalen und verstärkten 'slowing response' einen idealen Kontext für die Gewinnung von Erkenntnissen über die physiologische Rolle des Tyraminrezeptors dar, der ja, wie in *Radioligandenassays* gezeigt wurde (Witte, 2000; Rex und Komuniecki, 2002), auch für Octopamin Affinität besitzt.

1.5 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war es, die physiologische Rolle und Wirkungsweise des Tyraminrezeptors von *C. elegans* zu erhellen. Dazu sollte zunächst der Phänotyp eines mit Hilfe der RNAi-Technik hergestellten Knockdowns des Tyraminrezeptors detailliert charakterisiert werden. In Kombination mit der pharmakologischen Untersuchung dieser Tiere sollte herausgefunden werden, ob der Tyraminrezeptor eine der bekannten Wirkungen des Octopamins oder weitere noch unbekannte Wirkungen vermittelt. Die Wirkungen des Tyramins sollten ebenfalls ermittelt werden. Die räumliche Verteilung von Tyramin/Octopamin produzierenden Zellen sollte bestimmt werden. Auf der Basis der gewonnen Erkenntnisse sollte unter Zuhilfenahme der breiten Palette der zur Verfügung stehenden Mutanten oder, falls notwendig, durch weitere RNAi-Experimente die Signaltransduktion des Tyraminrezeptors untersucht werden.

Das Expressionsmuster des Tyraminrezeptors von *C. elegans* sollte hinsichtlich der Aufklärung der Auswirkungen der Rezeptoraktivität auf interzellulärer Ebene bestimmt werden. Zur Bestätigung der Ergebnisse aus den Untersuchungen der Signalkaskade sollte die Co-Lokalisation der beteiligten Komponenten sichergestellt werden, gegebenenfalls durch die Herstellung transgener Linien von *C. elegans*.

2. Material und Methoden

2.1 Bezugsfirmen

Ambion, Henkelstrasse 15, D-65187 Wiesbaden
Amersham Buchler GmbH & Co. KG, D-30419 Hannover
Appligene Oncor, D-69120 Heidelberg
Beckmann Instruments GmbH, D-80807 München
Becton Dickinson GmbH, Tullastr. 8-12, D-69126 Heidelberg
Biometra GmbH, D-37079
BioRad Laboratories GmbH, D-80939 München
Biozym Diagnostik GmbH, D-31883 Hessisch Oldendorf
Boehringer Ingelheim Bioproducts Partnership, D-69112 Heidelberg
Carl Roth GmbH & Co., D-76185 Karlsruhe
Edge Biosystems, 19208 Orbit Drive, Gaithersburg, MD 20879-4149
Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, D-22331 Hamburg
Genomed GmbH, Wielandstrasse 28a, D-32545 Bad Oeynhausen
Gibco BRL Life Technology GmbH, D-76339 Eggenstein
Haereus Instruments GmbH, D-63450 Hanau
Invitrogen, San Diego, CA, USA
Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, D-64625 Bensheim
MBI Fermentas, D-68789 St.Leon-Rot
Macherey + Nagel GmbH & Co. KG, Postfach 101352, D-52313 Düren
Membra Pure, Reinstwasser, Am Kuemmerling 37a, D-55294 Bodenheim
Merck KG, D-64271 Darmstadt
Mo Bi Tec, Wagenstieg 5, D-37077 Göttingen
Molecular Probes, siehe Mo Bi Tec
PeqLab Biotechnologie GmbH, Am Weichselgarten 7, D-91058 Erlangen
Pharmacia Biotech Europe GmbH, D-79111 Freiburg
Promega GmbH, High-Tech-Park, D-68199 Mannheim
Qiagen GmbH, D-40724 Hilden
RothGmbH, D-76185 Karlsruhe
Science Products GmbH, Hofheimer Straße 63, D-65719 Hofheim
Serva Feinbiochemica & Co. KG, D-69042 Heidelberg
Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D-82039 Deisenhofen
Stratagene GmbH, D-69000 Heidelberg
TaKaRa Bio Whittaker Europe, D-82024 Taufkirchen

2.2 Geräte

Konfokales Laserscannermikroskop DM IRBE	Leica
Bildverarbeitungssystem TCS NT	Leica
Gel-Dokumentation	Biorad
Biofuge 13	Haereus
BioPhotometer	Eppendorf
Centrifuge 5415 D	Eppendorf
Dark Reader (Model DR-45 M)	Mo Bi Tec
J2-21 Zentrifuge	Beckman Instruments
Horizon 11-14 Horizontal Gel Electrophoresis Apparatus	Gibco BRL
Robocycler 40	Stratagene
Robocycler Gradient 96	Stratagene
PC-10 Elektrodenpuller	Narishge

2.3 Chemikalien

Alle hier nicht aufgeführten Chemikalien wurden über die Firma Merck bezogen.

DiI (1,1'-Diocadecyl-3,3,3',3'-Tetramethylindocarbocyanine-Perchlorate)	Molecular Probes
Nilrot (Diethylamino-5H-Benzo-a-Phenoxazin-5-on)	Sigma Aldrich
Oelrot O (1-8-[4-(Dimethylphenylazo)Dimethylphenylazo]-2-Naphthalenol)	Sigma Aldrich
Octopamin (p-Hydroxyphenylethanolamin-HCl)	Sigma Aldrich
Serotonin (5-Hydroxytryptamin-Maleat)	Sigma Aldrich
Tyramin (p-Hydroxyphenylethylamin-HCl)	Sigma Aldrich
U73122 (PhospholipaseC-Inhibitor)	Sigma Aldrich
Yohimbin (17a-Hydroxy-yohimban-16a-Carbonsäuremethylester-HCl)	Sigma Aldrich

2.4 Lösungen, Puffer und Medien etc.

Für die Wurmzucht:

M9-Puffer: 3g KH_2PO_4 , 6g Na_2HPO_4 , 5g NaCl ,
1ml Lösung C, ad 1l A. dest.

NGM-Agar:

Lösung A: 0.1g Cholesterol in 20ml EtOH abs.

Lösung B: 1 M CaCl_2 , autoklaviert

Lösung C: 0.8 M MgSO_4 , autoklaviert

Lösung D: 0.16 M KH_2PO_4 und K_2HPO_4 pH 6, autoklaviert

3g NaCl , 2.5g Peptone, 17g Agar ad 973ml A. dest., autoklaviert, + 1ml Lsg. A, 0.5ml Lsg. B, 1ml Lsg. C, 25ml Lsg. D. Die Lösungen A-D sind nach dem Abkühlen separat beizumengen und zu schütteln, um das Bilden von unlöslichen Salzen zu verhindern.

Freezing Medium: 20ml 1M NaCl , 10ml 1M KH_2PO_4 (pH 6.0), 60ml 100% Glycerol, ad 200 ml A. dest.. Nach dem Autoklavieren: 0,6ml (steril filtrierte) 0,1M MgSO_4

Für die Immunhistochemie:

PBS pH 7.2: 10,4mM Na_2HPO_4 , 1,8mM KH_2PO_4 ,
137mM NaCl , 4,4mM KCl , ad 500ml A. dest.

1% Paraformaldehyd: Für 5ml Lösung (immer frisch ansetzen):
1% Paraformaldehyd, 80mM KCl , 20mM NaCl ,
2mM EGTA, 0,5mM Spermidin-HCl, 0,2 mM Spermin,
15mM PIPES pH 7.4.
PFA in 2 Tropfen NaOH lösen und auf 65°C erwärmen und die restlichen Ingredienzen (bis auf EGTA) hinzugeben. Dann nacheinander 3ml A. dest., 1ml MeOH (90%) und 0,25M EGTA (pH 8.0) bis zu der Endkonzentration (2mM) hinzufügen.

Tris-Triton-Puffer: 100mM Tris-HCl pH 7.4, 1% Triton X-100, 1mM EDTA

100x Borat-Puffer: 1M H_3BO_3 und 0,5M NaOH

Antikörper-Puffer: 1x PBS, 0,5% Triton-X-100, 0,05% NaAzid, 1mM EDTA

2.5 Versuchstiere

Der Stamm Bristol N2 von *Caenorhabditis elegans* ist als Wildtyp (WT) definiert und diente auch dieser Arbeit als Grundlage. Genetisch veränderte Linien dieses Stammes mit Beeinträchtigungen von G-Protein- α -Untereinheiten, der Phospholipase C β (*egl-8*), den CAPS (*Ca²⁺-dependent activator protein for secretion*, *unc-31*) und UNC-13 wurden durch das *Caenorhabditis Genetics Center* (Universität von Minnesota, Minneapolis, USA) bereitgestellt, darunter die Linien NL585, NL594, MT2426, MT2609, MT1434, RM2221, JT73, CB928, CB1124, CB1370, CB1091 und VC127. Auch die für die Mikroinjektion eingesetzte Mutante GE24 (*pha-1(e2123)*) stammt von dort. Die GFP-Reporter-Linie DA1450 (C02D4.2 Promotor::GFP; *lin-15*) wurde freundlicherweise von Leon Avery zur Verfügung gestellt, die Tubby-Mutante *tub-1(nr2004)* von M. Basson und C. Johnson. Der Stamm VC127 wurde von der *C. elegans Reverse Genetics Core Facility*, eines Teils des Internationalen *C. elegans Gene-Knockout Consortiums*, in der Universität von British Columbia in Vancouver erzeugt.

2.5.1 Haltung

Die Haltung der Würmer erfolgte nach Angaben von Brenner (1974). Hierzu wurden sie in der Regel in 96mm-Petrischalen auf steril hergestelltem NGM-Agar in einem klimatisierten Brutschrank bei 20°C gelagert. Diese Temperatur bezieht sich in erster Linie auf die Haltungsbedingungen des Wildtyps. Einige Mutantenstämme haben jedoch andere Temperaturoptima und reproduzieren sich nur bei diesen in ausreichendem Maße. Die GFP-Linien, die mit Hilfe des *pha-1*-Systems selektiert wurden, müssen bei 25°C gehalten werden um die Selektion zu gewährleisten. Die *pha-1*-Mutanten selbst werden bei 15°C gehalten um das Auftreten von Spontanmutationen zu vermeiden, die ihren Defekt kompensieren und somit die Selektionsmethode unwirksam machen würden.

Die Schalen wurden präinkubiert mit *E. coli* OP50-Bakterien (Uracil-Mangelmutante mit geringer Teilungsrate), die den Tieren als Nahrungsquelle dienen. Eine Ausnahme hiervon bildeten die RNAi-Versuche (siehe Kapitel 2.6). Die Zucht war nicht synchronisiert, d.h. stets befanden sich die verschiedenen Entwicklungsstadien nebeneinander in den Kulturen. In regelmäßigen Abständen wurde der Zustand der Kulturen kontrolliert, und – wenn nötig – wurden Tiere unter sterilen Bedingungen auf frisch hergestellte Petrischalen überführt.

2.5.2 Konservierung

Da es sehr aufwändig ist viele verschiedene Linien gleichzeitig zu halten, wurde von der Möglichkeit Gebrauch gemacht, die Tiere bei -70°C einzufrieren. Es ist möglich *Caenorhabditis elegans* über mehrere Jahre hinweg in Tiefkühlschränken, oder besser noch, in flüssigem Stickstoff zu konservieren. Einige Mutantenstämme überleben diese Prozedur allerdings deutlich schlechter als der Wildtyp.

Es wurden ein bis zwei Petrischalen der zu konservierenden Würmer in M9-Puffer aufgenommen und im Verhältnis 1:1 mit einem Glycerol enthaltenden Puffer ('Freezing-Medium') gemischt (nach Sulston und Brenner, 1974). Die Tiere wurden dann in 2ml Reaktionsgefäßen in einen 5cm dicken Polystyrol-Block gepresst und mit einem Deckel aus Polystyrol versehen um einen langandauernden Abkühlungsprozess zu gewährleisten (idealerweise um $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$), wodurch die Überlebensrate erheblich höher ist als beim Schockgefrieren. Es hat sich gezeigt, dass das Volumen der eingefrorenen Lösung für optimale Ergebnisse mindestens 1ml betragen sollte (Inada und Mori, pers. Mitteilung).

2.5.3 Mutantenstämme

Bei der Anfertigung der vorliegenden Arbeit war es von großem Vorteil, dass bereits tausende von Mutantenstämmen von *C. elegans* mit mehr oder weniger gut charakterisierten Eigenschaften frei im *Caenorhabditis Genetics Center* erhältlich sind. Die Erzeugung solcher Mutanten mit Beeinträchtigungen in einem oder mehreren Genen kann auf unterschiedlichen Wegen erfolgen. Ein grundlegender Unterschied zwischen diesen Wegen besteht in der Wahl des Ausgangspunktes. Die Methodik der sogenannten klassischen Genetik besteht darin, chemisch und/oder physikalisch mutagenisierte Tiere aufgrund eines bestimmten Phänotyps zu selektieren (*forward genetics*) und die Position der zugrundeliegenden Mutation auf einem der sechs Chromosomenpaare mittels der Rekombinationshäufigkeit mit entsprechenden Markergenen in Kreuzungsexperimenten zu bestimmen. So ist es möglich, schließlich die Identität des Gens bzw. seine DNA-Sequenz zu ermitteln.

Dank der öffentlich zugänglichen Datenbank des vollständig sequenzierten Genoms von *C. elegans* ist es inzwischen möglich Mutanten gezielter zu selektieren, indem man die Sequenz eines Genes als Ausgangspunkt wählt (*reverse genetics*). Hilfreich bei diesem Ansatz ist auch die Nutzung von transponierbaren Elementen (*Transposons*) im Genom von *C. elegans* zur (allerdings ebenfalls ungezielten) Einführung von Deletions-Mutationen in das Genom. Weiterhin werden jedoch auch die chemische und physikalische Mutagenisierung hierfür eingesetzt.

Zum Finden von Deletionen in einem ausgewählten Gen ist es nötig mehrere tausend möglichst unterschiedliche Mutanten umfassende ‚Deletionsbibliotheken‘ mittels PCR zu sichten.

Beide Methoden haben ihre Vor- und Nachteile: Während die klassische Methode etwas langwieriger ist, so ist zumindest von vornherein sichergestellt, dass die erhaltene Mutante einen veränderten Phänotyp zeigt, dem jedoch eine Fehlfunktion in einem von vielen verschiedenen Genen zugrunde liegen kann. Der zweite, rückwärts gerichtete, Ansatz verheißt zwar die gezielte Isolierung einer Mutante mit Defekten in einem bestimmten Gen, ob diese Mutante aber auch einen detektierbaren Phänotyp aufweist oder die zugrundeliegende Mutation gar ein Null-Allel, also ein komplett ausgeschaltetes Gen (Knockout), darstellt, wird erst im Nachhinein deutlich.

Die gezielte Einführung von Mutationen mit Hilfe von transgener DNA und der homologen Rekombination, wie man sie vor allem in der Maus- aber auch in der Drosophila-Genetik sehr erfolgreich praktiziert, hat sich hingegen bei *C. elegans* aufgrund der geringen Rekombinationsfrequenz bisher nicht als praktikabel erwiesen. Erste Erfolge sind allerdings auch hier durch den Einsatz von Partikelkanonen zu verzeichnen. Mit diesen sind die erforderlichen DNA-Konstrukte (an Goldpartikel gebunden) mit wesentlich weniger Zeitaufwand in die Keimbahn zu bringen als durch die Mikroinjektion in die Gonaden einzelner Würmer.

Im Folgenden sollen nun die in dieser Arbeit für die verhaltenspharmakologischen Untersuchungen eingesetzten Mutantenstämme genauer beschrieben werden. Diese sind zum Teil mit Hilfe der klassischen Methode, teilweise aber auch unter Einsatz der reversen Methodik, isoliert worden.

Die Bezeichnung des Stammes setzt sich aus dem Kürzel des Herkunftslabors und einer fortlaufenden Nummer zusammen. Der Genotyp besteht in der Auflistung der beeinträchtigten Gene, in Klammern dahinter werden die Allele aufgeführt, gefolgt von einer römischen Ziffer, welche das Chromosom bezeichnet, auf dem das Gen liegt. Häufig gibt es für ein Gen viele verschiedene Mutantenstämme, deren Phänotypen unterschiedlich stark ausgeprägt sein können, je nachdem wo der Gendefekt liegt und wie umfangreich er ist. Die Informationen stammen aus der *C. elegans* Datenbank, in der auch die DNA-Sequenzinformationen abgelegt sind (www.wormbase.org) bzw. aus der Datenbank des *Caenorhabditis Genetics Centers* oder der des Internationalen *C. elegans Gene-Knockout Consortiums* (nur VC127).

Stamm: MT2609

Genotyp: *egl-30* (n715n1190) I. Fehlerhafte Spleissakzeptor-Sequenz.

Phänotyp: Lokomotion langsam, Uterus überfüllt mit Eiern, Eiablage bei Serotoningabe jedoch normal; ein Allel mit schwächerer Ausprägung des *egl-30*-Phänotyps. Null-Allele von *egl-30* bewirken vollständige Lähmung, nahezu vollständiges Ausbleiben der Eiablage, gestörte Defäkation trotz normaler Kontraktion der posterioren Hypodermalmuskulatur (pBoc) und, bei Homozygotie, Letalität.

Funktion des beeinträchtigten Proteins: Alpha-Untereinheit eines heterotrimeren G-proteins (Gq) mit sehr hoher Homologie zu der Klasse der $G\alpha_q$ -Untereinheiten der Mammalia.

Stamm: MT1434

Genotyp: *egl-30* (n686) I. Fehlerhafte Spleißakzeptor-Sequenz.

Phänotyp: Lokomotion sehr langsam, Uterus überfüllt mit Eiern, Eiablage trotz Serotoningabe reduziert; ein etwas stärker ausgeprägter Phänotyp als bei MT2609.

Funktion des beeinträchtigten Proteins: Alpha-Untereinheit eines heterotrimeren G-proteins (Gq) mit sehr hoher Homologie zu der Klasse der $G\alpha_q$ -Untereinheiten der Mammalia.

Stamm: MT2426

Genotyp: *goa-1* (n1134) I.

Phänotyp: Hyperaktive Lokomotion, hyperaktive Eiablage, verlangsamtes Pharynx-pumpen.

Funktion des beeinträchtigten Proteins: Alpha-Untereinheit eines heterotrimeren G-proteins (Go) mit sehr hoher Homologie zu der Klasse der $G\alpha_{i/o}$ -Untereinheiten der Mammalia.

Stamm: NL594

Genotyp: *gpa-12* (pk322) X.

Phänotyp: bisher wurden keine Veränderungen gegenüber dem Wildtyp detektiert.

Funktion des beeinträchtigten Proteins: Alpha-Untereinheit eines heterotrimeren G-proteins (G12) mit sehr hoher Homologie zu der Klasse der $G\alpha_{12}$ -Untereinheiten der Mammalia.

Stamm: NL585

Genotyp: *sgs-1* (pk301) III; *dpy-20* (e1362) IV; pkIs296 [*dpy-20*(+) *gsa-1* (QL)] X.

Phänotyp: bisher wurden keine Veränderungen gegenüber dem Wildtyp detektiert.

Funktion des beeinträchtigten Proteins: Alpha-Untereinheit eines heterotrimeren G-proteins (Gs) mit sehr hoher Homologie zu der Klasse der $G\alpha_s$ -Untereinheiten der Mammalia. Es handelt sich um eine Suppressor-Mutation. Das Gen für $G\alpha_s$ ist unbeeinträchtigt, nur die Aktivität des Proteins wird unterdrückt. Mutanten mit Null-Allelen des Gens *gsa-1* sind nicht überlebensfähig.

Stamm: RM2221

Genotyp: *egl-8* (md1971) V.

Phänotyp: Lokomotion sehr langsam, Eiablage defekt, Defäkation gestört (schwache pBoc) und Pharynxpumpen reduziert.

Funktion des beeinträchtigten Proteins: Phospholipase C Beta, Effektor von $G\alpha_q$.

Stamm: JT73

Genotyp: *itr-1* (sa73) IV.

Phänotyp: Defäkation stark beeinträchtigt (stark verlängerter Zyklus) dadurch starke Verstopfungserscheinungen, Pharynxpumpen reduziert (Serotoningabe bewirkt Beschleunigung auf Wildtyp-Niveau).

Funktion des beeinträchtigten Proteins: Inositol-(1,4,5)-Trisphosphat-Rezeptor. Subzellulär lokalisiert in der Membran des endoplasmatischen Retikulums; bewirkt bei Aktivierung die Freisetzung von Ca^{2+} -Ionen in das Cytoplasma.

Stamm: CB928

Genotyp: *unc-31* (e928) IV.

Phänotyp: Lokomotion sehr langsam, Eiablage defekt, Pharynxpumpen konstitutiv, reagiert nicht auf leichte mechanische Stimuli.

Funktion des beeinträchtigten Proteins: UNC-31 ist ein Ortholog des humanen Calcium-abhängigen Proteins zur Aktivierung der Sekretion (CADPS bzw. CAPS); es ist notwendig für die durch Calcium regulierte Fusion von *dense-core*-Vesikeln mit der Zellmembran und die daraus resultierende Exocytose des Vesikelinhalts, z.B. wird es für die Sekretion eines Insulin-ähnlichen Liganden benötigt.

Stamm: CB1091

Genotyp: *unc-13* (e1091)I.

Phänotyp: Lokomotion stark herabgesetzt, Pharynxpumpen gestört.

Funktion des beeinträchtigten Proteins: UNC-13 ist notwendig für die Initiation der Fusion von klaren synaptischen Vesikeln (*clear-core*-Vesikeln) mit der Zellmembran und die daraus resultierende Exocytose klassischer Neurotransmitter wie Acetylcholin und GABA. UNC-13 wird durch die Bindung von Diacylglycerin (DAG) aktiviert.

Stamm: VC127

Genotyp: *pkc-2* (ok328) X

Phänotyp: bisher wurden keine Veränderungen gegenüber dem Wildtyp detektiert.

Funktion des beeinträchtigten Proteins: *pkc-2* ist ein Ortholog des humanen Gens für die Proteinkinase C Alpha, der einzigen ‚konventionellen‘ Proteinkinase C im Genom von *C. elegans*.

Stamm: CB1124

Genotyp: *che-3* (e1124) I.

Phänotyp: Octopamin-defizient, Chemotaxis beeinträchtigt, Dauerformation defekt, Mechanorezeption und Thermotaxis hingegen normal.

Funktion des beeinträchtigten Proteins: *che-3* kodiert für die 1b Isoform der schweren Kette des Dyneins (DHC), welche für den Aufbau und Erhalt der strukturellen Integrität der sensorischen Cilien notwendig ist.

Eine Anmerkung zur Schreibweise der drei-Buchstaben-codierten Gen-Namen, nach den *C. elegans*-spezifischen Konventionen: Ist das Gen gemeint, so schreibt man dies klein und kursiv (z.B. *egl-1*); ist das Protein angesprochen, wird dieses durch Großschreibung gekennzeichnet (z.B. EGL-1); spricht man von einer Mutante, so wird es klein, jedoch nicht kursiv geschrieben (z.B. *egl-1*).

2.6 RNA-Interferenz (RNAi)

Die Methode der RNA-Interferenz wird zur gezielten temporären Herabregulierung der Expression einzelner Gene eingesetzt. In der angelsächsischen Literatur wird dies allgemein auch als '*gene-silencing*' oder, in Anlehnung an den Begriff '*gene knockout*' für auf genomischer Ebene ausgeschaltete Gene, als '*knockdown*' bezeichnet. Solche 'Knockdowns' besitzen gegenüber den genomischen Mutanten einige Vorteile. Der größte Vorteil liegt sicherlich darin, dass die RNA-Interferenz wesentlich weniger zeit- und arbeitsintensiv ist als die Erzeugung von genomischen Mutanten. Dazu kommt, dass die Auswirkungen von Mutationen auf genomischer Ebene unterschiedlich sein können. So gibt es Mutationen, welche die Funktion der entsprechenden Genprodukte sogar noch verstärken ('*gain of function*'), was bei einer Funktionsanalyse natürlich verwirrend, manchmal allerdings auch zur weiteren Charakterisierung erwünscht sein kann. Außerdem ist es häufig von Vorteil ein Gen nicht vollständig auszuschalten, da dies in vielen Fällen letale Auswirkungen hat, was eine Funktionsanalyse, sofern diese an adulten Tieren durchgeführt werden soll, dann gänzlich unmöglich macht. Auf der anderen Seite ist es bei der RNA-Interferenz schwierig zu unterscheiden, ob die möglicherweise fehlende Veränderung des Phänotyps darauf beruht, dass das entsprechende Gen in dem jeweiligen Kontext keine Funktion hat oder ob nur das RNAi-Experiment fehlgeschlagen ist, also die Genexpression nicht herunterreguliert wurde. Deshalb ist es ratsam, die entsprechenden Versuche häufig zu wiederholen, bevor der Phänotyp des Knockdowns als Wildtyp-identisch angesehen wird.

Die seit langem eingesetzte Methode der RNA-Interferenz hat Ende der 1990er Jahre eine Weiterentwicklung erfahren. Die Arbeitsgruppe von Andrew Fire fand heraus, dass doppelsträngige RNA (dsRNA) um ein vielfaches effektiver dabei ist, die Expression der korrespondierenden Genprodukte zu unterbinden, als die bis dahin eingesetzte einzelsträngige *antisense-RNA* (Fire et al., 1998). Zu einer weiteren Vereinfachung der Methode trug die Einführung spezieller bakterieller Vektoren bei. Hierzu wurde die Tatsache ausgenutzt, dass *C. elegans* sich von Bakterien ernährt. Statt also die für die Interferenz notwendige dsRNA *in vitro* zu erzeugen und dann den Würmern injizieren zu müssen, konnte man diese nun bequem von den mit diesen 'RNAi-Vektoren' transformierten Bakterien *in vivo* erzeugen lassen und die Würmer damit füttern. Es stellte sich nämlich heraus, dass zumindest ein Teil der in den Bakterien in großen Mengen produzierten dsRNA über den Verdauungstrakt der Würmer in die übrigen Körperzellen gelangt und dort die entsprechenden Gene sehr effektiv herabreguliert (Timmons und Fire, 1998).

Die RNAi Experimente wurden mit Hilfe eines modifizierten pSport1-Vektors durchgeführt. Dieser besitzt eine zusätzliche T7-Promotorsequenz, die invertiert am gegenüberliegenden Ende der 'multiple cloning site' (MCS) inseriert ist. Die untersuchten Gene wurden per PCR mit Hilfe von entsprechenden Oligonukleotiden ohne ihr Start-Codon aus *C. elegans*-WT-cDNA amplifiziert und zwischen die beiden T7-Promotoren des oben beschriebenen Vektors kloniert (Witte, 2000). Für die Anfertigung des *tub-1*-Konstruktes wurde in derselben Weise verfahren. Diese Konstrukte wurden dann zur Transformation von *E. Coli* Bakterien des Stamms HT115 (DE3) eingesetzt. Transformation und Anzucht der Bakterien erfolgte gemäß den Standardprotokollen. Für die Dauer der RNAi-Experimente dienten die transformierten und über Nacht induzierten Bakterien den Würmern als Nahrungsgrundlage. Die Analyse des Phänotyps wurde frühestens zwei Tage nach Beginn des Experiments begonnen. Um das Auftreten von Artefakten durch diese Behandlung auszuschließen, wurden parallele Ansätze mit einem Vektor gleicher Bauart durchgeführt, der die codierende Sequenz für das GFP enthielt.

2.7 Verhaltenspharmakologie

Die pharmakologischen Untersuchungen wurden mit jungen adulten Hermaphroditen von *C. elegans* durchgeführt. Es wurde das Verhalten des Wildtyps sowie RNAi-behandelter Würmer und zahlreicher Mutantenlinien von *C. elegans* mit und ohne die Verabreichung von Pharmaka quantitativ analysiert. Bei allen auf NGM-Agarplatten durchgeführten Versuchen wurden die Pharmaka in den entsprechenden Konzentrationen (1 bis 10mM) vor dem Gießen der Platten zu dem auf 50°C abgekühlten Agar hinzugegeben. Die Datenaufnahme begann in der Regel 30min nach dem ersten Kontakt der Würmer mit dem Agar, um zu gewährleisten, dass die Pharmaka ihren Wirkort erreicht hatten. Sie endete 30 bis 45min später, um eine Verfälschung der Ergebnisse durch die nach einiger Zeit möglicherweise auftretende Desensitivierung, also eine Abschwächung der Wirkung des Liganden aufgrund der Entkopplung des 'ternären Komplexes' aus Ligand, Rezeptor und G-Protein von seiner Signalkaskade, zu verhindern.

2.7.1 Lokomotion

Die Untersuchung der ‚basalen‘ und der ‚verstärkten Verlangsamung‘ wurde durchgeführt wie in Sawin et al. (2000) beschrieben. Diese definierten die Begriffe ‚*basal slowing response*‘ und ‚*enhanced slowing response*‘ für die unterschiedlich starke Reaktion von *C. elegans* auf die Anwesenheit von Bakterien in Abhängigkeit von seinem Ernährungszustand. Gemessen wurde die Anzahl der Bewegungen der anterioren Hälfte des Wurmkörpers über die gedachte Körpermittelachse hinweg – Sawin und Kollegen bezeichnen diese als ‚*body-bends*‘. Diese Bewegungen großer Amplitude dienen, im Gegensatz zu den ebenfalls auftretenden Bewegungen geringer Amplitude, welche dem Aufspüren von Bakterien dienen, der Lokomotion. Ein Messwert ist somit definiert als die Anzahl der innerhalb eines Zeitraums von 20 Sekunden beobachteten ‚*body-bends*‘ (bb/20s).

Für die Messung der ‚*enhanced slowing response*‘ wurden die Würmer einzeln von ihren Platten genommen und in einem Tropfen M9-Puffer ‚gewaschen‘ um die an ihnen haftenden Bakterien zu entfernen. Dann wurden sie für mindestens 30min auf sterilem NGM-Agar ‚ausgehungert‘ und in Gruppen von je fünf Tieren in Petrischalen ausgesetzt, die frisch mit Bakterien beimpften NGM-Agar enthielten. Nach 2-3min ‚Erholungszeit‘ für die transferierten Tiere wurden dann die Lokomotionsbewegungen wie oben beschrieben gezählt. Die ‚*basal slowing response*‘ wurde auf dieselbe Weise gemessen – mit dem Unterschied, dass die Würmer hier ohne Hungerperiode direkt auf die frisch beimpften Platten gesetzt wurden.

2.7.2 Eiablage

Die Quantifizierung der Eiablage ist nach dem Standardverfahren hierfür erfolgt (Trent et al., 1983). Dazu wurden jeweils fünf Tiere pro Kammer einer 96 Well Mikrotiterplatte mit 10mM Serotonin in M9 Puffer gesetzt und die Zahl der nach einer Stunde von ihnen abgelegten Eier ermittelt. Das Serotonin ist notwendig zur Aktivierung der Eiablage im Flüssigmedium.

2.7.3 Defäkation

Die Defäkation wurde an Würmern in gutem Ernährungszustand auf NGM-Agarplatten beobachtet. Vor einer Messung wurden die Würmer auf frisch mit Bakterien beimpfte Platten gesetzt und für 30min in Ruhe gelassen. Ein Messwert ist hier definiert als die durchschnittliche Zeitdauer zwischen zwei Defäkationen (= 1 Defäkationszyklus), errechnet aus zehn aufeinander folgenden Zyklen eines Tieres.

2.8 Erzeugung transgener Linien (*tub-1* Promotor::*GFP*; pBX)

2.8.1 GFP-Reporter Plasmid

Zur Klonierung des Promotors von *tub-1* in das Reporter-Plasmid wurden molekularbiologische Standardtechniken eingesetzt. 1,8kb der Promotorregion des *tub-1* Gens und die ersten 53 Codons wurden per PCR aus genomischer DNA von *C. elegans* amplifiziert. Dieses Amplifikat wurde im Leseraster mit dem GFP-Gen des Vektors pPD95.77 (der uns freundlicherweise von Andrew Fire überlassen wurde) fusioniert.

Für die Amplifikation kamen folgende Oligonukleotide (*Primer*) zum Einsatz:

Sinn-Oligonukleotid:

Tub-1 Sense (Pst I):

5'-GAGAGCTGCAGCTTCGATTTTCGCTGCCTTAT-3'

Gegensinn-Oligonukleotid:

Tub-1 half AS (Nhe I):

5'-GAGAGGCTAGCAAATGTTGGATAGTCTTTCATACT-3'

2.8.2 Mikroinjektion

Die Mikroinjektion wurde an einem Inversmikroskop mit Druckluftpulsen vorgenommen. Die Glaskapillar-Injektionsnadeln aus Borosilikatglas (GB150T8P, Science Products) wurden mit Hilfe eines Elektrodenpullers nach folgendem Protokoll hergestellt: Zwei-Schritt-Methode, H1: 67,0, H2: 51,5, Gewicht 117g.

Äquimolare Mengen des GFP-Reporter-Konstrukts und des als Selektionsmarker dienenden Plasmids pBX, welches eine Wildtyp-Kopie des *pha-1* Gens enthält (Granato et al., 1994), wurden in die Gonaden von *pha-1*-Mutanten co-injiziert. Fünf Stunden nach der Injektion wurden die Tiere zur Selektion in einen Brutschrank bei 25°C gebracht. Dort entwickeln sich nur die Nachkommen der Tiere, die ein Wildtyp-*pha-1*-Gen und somit aller Wahrscheinlichkeit nach auch das GFP-Reporter-Konstrukt erhalten haben, da die Nachkommen der *pha-1*-Mutanten bei 25°C Umgebungstemperatur normalerweise schon früh in ihrer Entwicklung eine Letalität von 100% aufweisen.

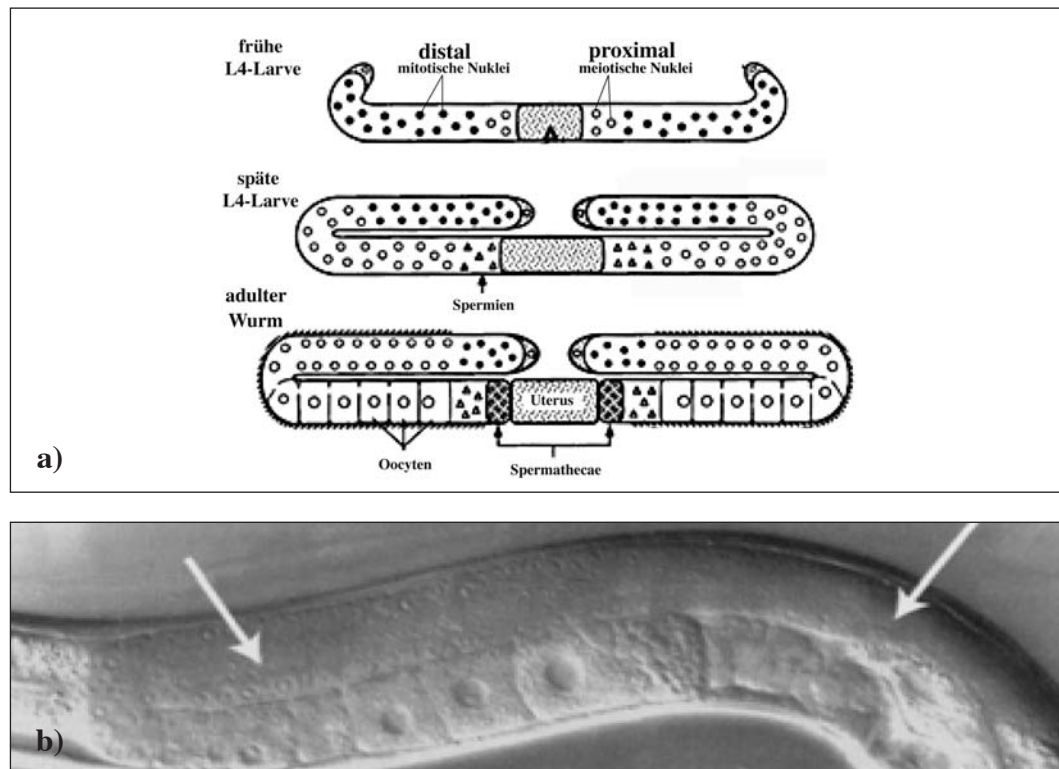


Abbildung 14a), b): Die Entwicklung der Keimzellen vom L4-Stadium bis zum adulten Tier
a) Bei der frühen L4-Larve überwiegen die mitotischen Kerne im Synzytium der Gonade. Mit fortschreitendem Alter des Wurms treten die Kerne vermehrt in die meiotische Phase ein. Im adulten Wurm sind lediglich an den distalen Enden der Gonadenarme noch mitotische Kerne zu finden (verändert nach Jin aus Hope, 1999).
b) Lichtmikroskopische Aufnahme des anterioren Gonadenarms eines jungen adulten Wurms. Die Region zwischen den Pfeilen kennzeichnet den distalen Arm der synzytischen Gonade, in welchem sich mitotische Nuklei befinden (reproduziert von Hope, 1999).

Als aussichtsreichste Methode hat sich die Injektion in die synzytischen Gonaden, und zwar in deren distale Teile, in denen sich Kerne in Mitose befinden, herausgestellt. Dafür sind Würmer im L4-Larvalstadium am besten geeignet, denn sie sind robuster als die früheren Entwicklungsstadien, haben einen großen Anteil mitotischer Kerne in ihren Gonaden und zudem keine so derbe Cuticula wie adulte Tiere (siehe Abb. 14a und b).

2.9 Heterologe Expression von *tub-1::gfp* in eukaryotischen Zellen

Zur Klonierung der kodierenden Sequenz von *tub-1* in den Expressionsvektor wurden molekularbiologische Standardtechniken eingesetzt. Zunächst wurde die Sequenz per PCR aus der cDNA von *C. elegans* amplifiziert. Dieses Amplifikat wurde im Leseraster mit dem GFP-Gen eines modifizierten pCI-Neo Vektors (Isermann, 2000) fusioniert. Dann wurde das Konstrukt in eine eukaryotische Zelllinie transfiziert. Hierbei handelte es sich um Zellen aus humanem embryonalem Nierengewebe (PEAK-Zellen, erworben von der Firma Edge-Biosystems).

Zur Amplifikation des *tub-1*-Transkriptes eingesetzte Oligonukleotide:

Sinn-Oligonukleotid:

Tubby GFP-Fusion Sense (EcoRV):

5'-GAGAG**GATATC**ACTGATACTAACTCACAATGGATTG-3'

Gegensinn-Oligonukleotid:

Tubby GFP-Fusion AS (Not I):

5'-GAGAG**GCGGCCGCTT**CACATGCAAGTTTCCG-3'

2.10 Histologie

2.10.1 Immunhistochemie

Die immunhistochemischen Untersuchungen wurden mit Hilfe eines Antiserums durchgeführt, welches gegen ein Octopamin-BSA-Konjugat in Ratten herangezogen worden war. Wie sich zuvor in 'dot blots' gezeigt hatte, wies das Antiserum gleichermaßen Affinität für Octopamin und Tyramin auf (Roeder, pers. Mitteilung). Die Immunfärbungen wurden abgesehen von einigen Modifikationen nach einem Protokoll von Gary Ruvkun (pers. Mitteilung) durchgeführt.

Dazu wurden frisch geerntete Würmer zunächst für zwei Stunden in M9-Puffer gewaschen und dann für 10min auf Eis gelegt (Pharynx hört auf zu pumpen) um dafür zu sorgen, dass sie innerlich und äußerlich möglichst frei von störenden Bakterien sind. Es folgten erst 10min starkes Schütteln der Würmer in der Paraformaldehyd-Fixierungslösung und dann Schockgefrieren auf Trockeneis. Danach wurden die Würmer mit warmem Wasser sofort wieder aufgetaut, nur um dann für eine Stunde bei Raumtemperatur stark geschüttelt zu werden. Die Prozedur setzte sich fort mit einmaligen Waschgängen: zunächst 2h bei 37°C in Tris-Triton-Puffer, dann 15min ebenfalls bei 37°C in 1x Boratpuffer + 10mM DTT,

dann noch einmal in 1xBorat-Puffer, darauf folgte eine einstündige Inkubation in 1xBorat-Puffer + 1% H₂O₂. Bevor das Antiserum hinzugegeben werden konnte, musste dann jeweils noch einmal mit 1x Borat-Puffer (1min) bzw. Antikörper-Puffer (15min oder mehr) gewaschen werden. Alle Waschgänge wurden durch Zentrifugieren bei 1000rpm mit der Tischzentrifuge beendet. Nach dem Einsatz des Tris-Triton-Puffers ist davon auszugehen, dass die Tiere sehr zerbrechlich sind – dementsprechend vorsichtig sollten sie behandelt werden.

Der primäre Antikörper wurde in einer 1:300 Verdünnung eingesetzt. Ein an das Fluorophor CY3 gekoppelter Schaf-anti-Ratte Antikörper wurde als sekundärer Antikörper in einer Verdünnung von 1:250 eingesetzt. Die Antikörper-Inkubationen (jeweils 4-24h) wurden durch 5-10-faches Waschen mit Antikörper-puffer beendet.

Die Analyse wurde, wie auch bei den GFP-Reporter-Linien und den übrigen histologischen Techniken, mit dem Konfokalmikroskop durchgeführt (Leica DM IRBE). Dafür wurden die Würmer in der Regel in M9-Puffer (bei Vitalfärbungen und den GFP-Linien mit 50mM Natriumazid zur Immobilisierung) auf einen Objektträger gegeben.

2.10.2 Lipid-Nachweis mit Oelrot O

Oelrot O Stammlösung: 5 mg/ml in Isopropylalkohol

Gebrauchslösung: Stammlösung 60%ig in A. dest.; der entstandene Niederschlag wurde nach 24h Inkubation abfiltriert.

Für die Färbung wurden die fixierten Würmer in 60% Isopropanol gebracht. Direkt anschließend wurde das Isopropanol wieder abgezogen und durch die Färbelösung ersetzt. Nach 10-30min Färbezeit wurde kurz mit Isopropanol ‚differenziert‘, um überschüssigen Farbstoff zu entfernen.

2.10.3 Lipid-Nachweis mit Nilrot

Der Fluoreszenzfarbstoff Nilrot eignet sich hervorragend zur Vitalfärbung von Lipiden, da er relativ gut in Wasser löslich ist, seine Fluoreszenz in wässriger Umgebung aber komplett verliert (Greenspan et al., 1985). Da Nilrot in wässriger Lösung eingesetzt werden kann, werden die Lipide selbst, anders als bei der Färbung mit Oelrot, nicht beeinträchtigt.

Nilrot Stammlösung: 1mg/ml in DMSO

Die Tiere wurden in 2 μ g/ml Nilrot/M9-Puffer aufgenommen und eine Stunde lang inkubiert. Danach wurden sie mehrfach mit M9-Puffer gewaschen und bei einer Anregung mit Licht der Wellenlänge von 488nm mit dem Konfokalmikroskop analysiert (Bandpass-Filter 530-550nm).

2.10.4 DiI-Färbung

Der Fluoreszenzfarbstoff DiI wurde als neuronaler *Tracer* eingesetzt. Seine lipophilen Eigenschaften ermöglichen ihm die leichte Integration in exponierte Zellmembranen. Durch laterale Diffusion verbreitet er sich in kürzester Zeit über die gesamte Oberfläche der Neuronen. Es ist bekannt, dass er selektiv einige der sensorischen Amphid- und die beiden Phasmidneuronen lebender Exemplare von *C. elegans* anfärbt; genauer: die Neuronen mit den Bezeichnungen ASK, ADL, ASI, AWB, ASH, ASJ und PHA sowie PHB. Dies beruht auf der Tatsache, dass diese Neuronen mit ihren Sensillen die Hypodermis durchbrechen und, bedingt durch ihre Funktion als Chemorezeptoren, zur äußeren Umgebung hin geöffnet sind.

DiI Stammlösung: 2mg/ml in DMFA

DiI wurde in der Konzentration von 4 μ g/ml in M9-Puffer appliziert. Die lebenden Würmer wurden für die Färbung 1-2h in der DiI-Lösung gelassen und anschließend mehrmals mit M9-Puffer gewaschen oder für 1h zur Entfärbung auf NGM-Agar gebracht.

3. Ergebnisse

3.1 Immunhistochemischer Nachweis von Octopamin/Tyramin

Die grundlegende Frage der zellulären Verteilung von Octopamin/Tyramin bei *C. elegans* war bisher nicht geklärt. Es konnte nur das Vorkommen von Octopamin in Extrakten über einen indirekten Enzymtest nachgewiesen werden (Horvitz et al., 1982). Mit Hilfe eines Octopamin/Tyramin-Antiserums wurden deshalb Immunfärbungen von *C. elegans* angefertigt.

Auf allen Abbildungen, die für diese Arbeit angefertigt wurden, sind die Tiere mit dem Kopfende nach links ausgerichtet; bei Lateralansichten befindet sich die dorsale Seite des Tieres oben; bei Dorso-Ventral- und intermediären-Ansichten ist die jeweilige Ausrichtung – falls nötig – durch Vektoren gekennzeichnet oder im Text erläutert.

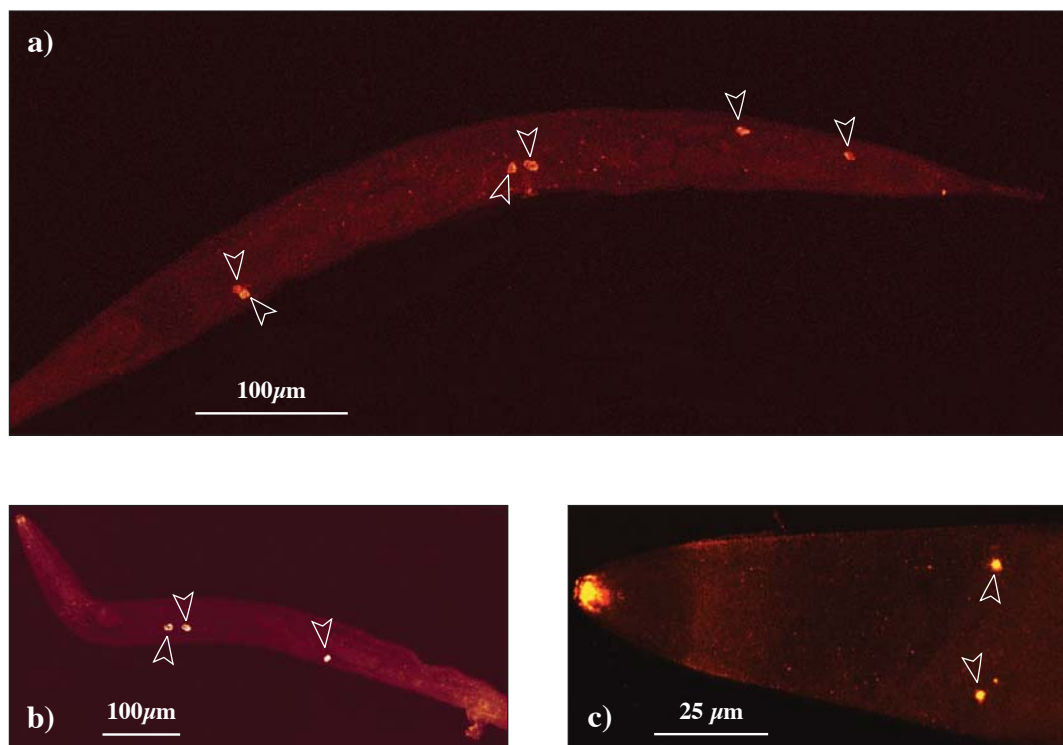


Abbildung 15a), b), c): OA/TA-immunreaktive Zellen

Lateralansichten a) eines Hermaphroditen und b) eines Männchens.

c) Ventralansicht eines Hermaphroditen. Zwei Octopamin-/Tyramin-immunreaktive Neuronen im Pharynxbereich sind zu sehen. Octopamin/Tyramin-Immunreaktivität zeigen beim Hermaphroditen acht verschiedene Zellen, beim Männchen (n=1!) offenbar nur drei.

Eine Benennung der Zellen auf der Grundlage dieser Färbung war nicht möglich. Auffällig ist jedoch, dass nur sehr wenige Zellen immunreaktiv sind.

3.2 Verhaltenspharmakologische Untersuchungen zur Charakterisierung der Funktion des Tyraminrezeptors von *C. elegans*

Neben dem bereits bekannten inhibierenden Einfluss von Octopamin auf die Eiablage und das bakterienstimulierte Pharynxpumpen (Horvitz et al., 1982) wurde im Rahmen dieser Arbeit die Wirkung von Octopamin und Tyramin in weiteren Verhaltenskontexten festgestellt. So ist auch das Defäkationsverhalten und die Lokomotion bei *C. elegans* durch diese biogenen Amine beeinflussbar.

Um festzustellen in welchem Maße der Tyraminrezeptor an der Vermittlung dieser Wirkungen beteiligt ist, wurden Tiere mit RNAi-induziertem Knockdown der Tyraminrezeptor-Expression (TyrR-Knockdown oder kurz: TyrR-KD) und Wildtyp-Würmer bezüglich ihrer Sensibilität gegenüber Octopamin beim Eiablageverhalten, der Lokomotion und dem Defäkationsverhalten untersucht. Zum Vergleich wurden Mutanten ohne nachweisbares Vorkommen von Octopamin/Tyramin (*che-3*) herangezogen.

In den folgenden drei Kapiteln sind die Ergebnisse dieser Untersuchungen in Säulendiagrammen zusammengefasst.

Die Säulen entsprechen dem Mittelwert von zehn oder mehr unabhängigen Experimenten, die Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler des Mittelwertes. Statistisch signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) sind durch einen Stern (*) markiert. Da sich in den meisten dieser Diagramme die Signifikanzen nicht ausschließlich nur auf einen Referenzwert beziehen, sind signifikante Unterschiede zwischen Säulen, deren Vergleich sinnvoll ist, durch Klammern gekennzeichnet. Ein Stern ohne Klammer bezieht sich automatisch auf die als Kontrolle deklarierte Säule.

3.2.1 Der Tyraminrezeptor von *C. elegans* im Kontext des Eiablageverhaltens

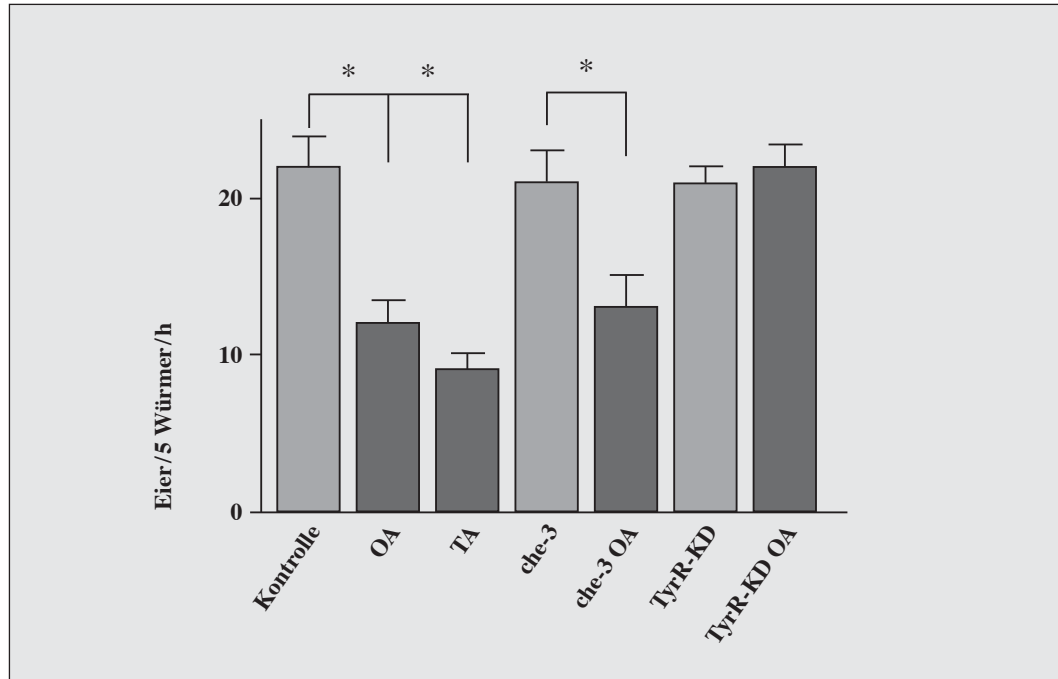


Abbildung 16: Eiablage

Das hier eingesetzte Standardverfahren zur Messung der Eiablage wird in flüssigem Medium unter Zusatz von Serotonin durchgeführt. Die Anzahl der von fünf Würmern in einem Zeitraum von einer Stunde gelegten Eier ist als ein Messwert definiert. Die Octopamin- und Tyramin-defizienten *che-3* Mutanten und Würmer mit RNAi-induziertem Knockdown der Tyraminrezeptor-Expression (TyrR-KD) und der Wildtyp wurden mit und ohne Zugabe von Octopamin (10^{-2}M) in das Flüssigmedium gebracht.

Der bereits bekannte inhibitorische Einfluss von Octopamin (OA) auf die Eiablage-rate des Wildtyps wurde durch diesen Versuch bestätigt. Erwartungsgemäß war dies auch bei den *che-3*-Mutanten der Fall. Bisher noch nicht bekannt war, dass Tyramin die Eiablage ebenso inhibiert.

Der Knockdown des Tyraminrezeptors machte die Würmer unempfindlich gegenüber der inhibierenden Wirkung des Octopamins (TyrR-KD+OA). Dies ist ein starker Hinweis darauf, dass eine der physiologischen Funktionen des Tyraminrezeptors in der Vermittlung der durch Octopamin- und/oder Tyramin-induzierten Inhibition der Eiablage bei *C. elegans* besteht.

3.2.2 Der Tyraminrezeptor von *C. elegans* im Kontext des Defäkationsverhaltens

Der Einfluss von Octopamin/Tyramin auf die Defäkation bei *C. elegans* war bisher unbekannt. Im Rahmen der Phänotypenanalyse des TyrR-Knockdowns stellte sich jedoch heraus, dass dieser einen verlängerten Defäkationszyklus aufweist. Daraufhin wurde auch die Wirkung von Octopamin, Tyramin und Yohimbin, einem hochspezifischen Antagonisten des Tyramins, auf die Defäkation untersucht.

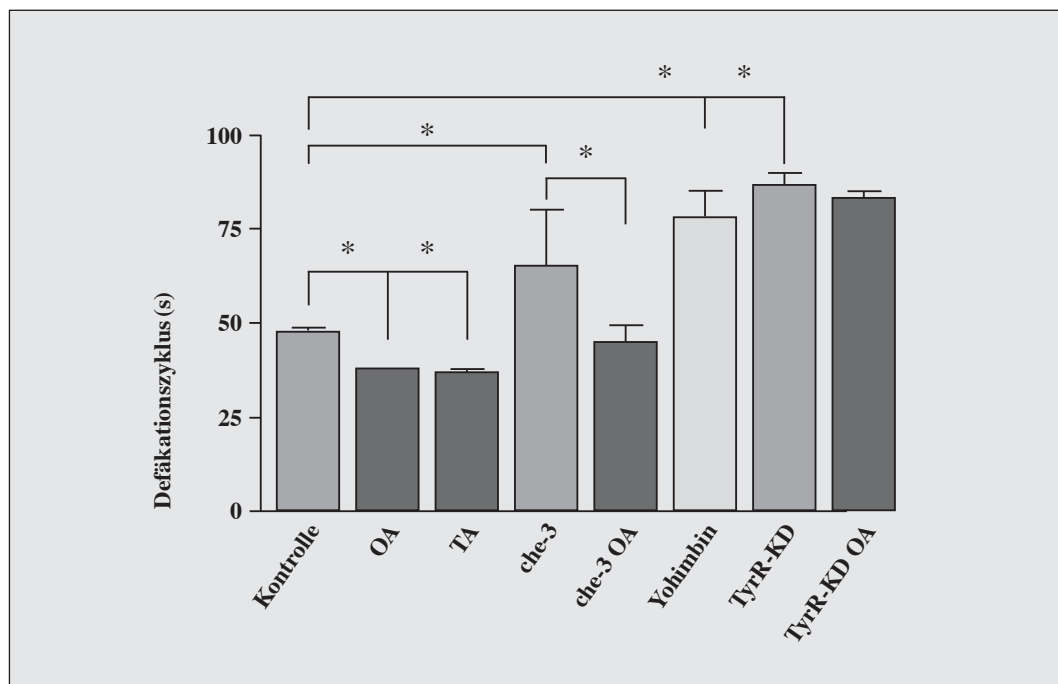


Abbildung 17: Defäkation

Die Gruppe der untersuchten Tiere ist die gleiche wie schon bei der Eiablage. Ein Messwert entspricht dem aus mindestens zehn Ereignissen gemittelten Zeitabstand zwischen zwei Expulsionen.

Octopamin und Tyramin beschleunigten den in Anwesenheit von Bakterien beim WT konstant 48 ± 3 s langen Defäkationszyklus signifikant auf weniger als 40s.

Die *che-3*-Mutanten zeigten einen auf etwa 68s verlängerten Defäkationszyklus, der durch die Gabe von Octopamin auf das vom Wildtyp gezeigte Niveau beschleunigt wurde. Die Applikation von Yohimbin bei Wildtyp-Würmern rief annähernd eine Verdopplung der Länge der Defäkationszyklen hervor. Eine Verdopplung war auch bei den Würmern mit herabgesetzter Tyraminrezeptor-Expression zu beobachten. Octopamin hatte bei diesen Tieren (TyrR-KD+OA) keinen Einfluss auf die Länge der Defäkationszyklen.

Diese Ergebnisse zeigen einerseits, dass Octopamin und Tyramin das Defäkationsverhalten von *C. elegans* beeinflussen, andererseits dass auch dieser Effekt durch den Tyraminrezeptor vermittelt wird.

3.2.3 Der Tyraminrezeptor von *C. elegans* im Kontext des Lokomotionsverhaltens

Der Einfluss von Octopamin und Tyramin auf das Lokomotionsverhalten von *C. elegans* war bisher nicht gut untersucht. Aus den bereits genannten Gründen (Kap. 1.4.3.1) bot sich diese Untersuchung im Verhaltenskontext 'basal slowing response' (*bsl*) bzw. 'enhanced slowing response' (*esl*) an.

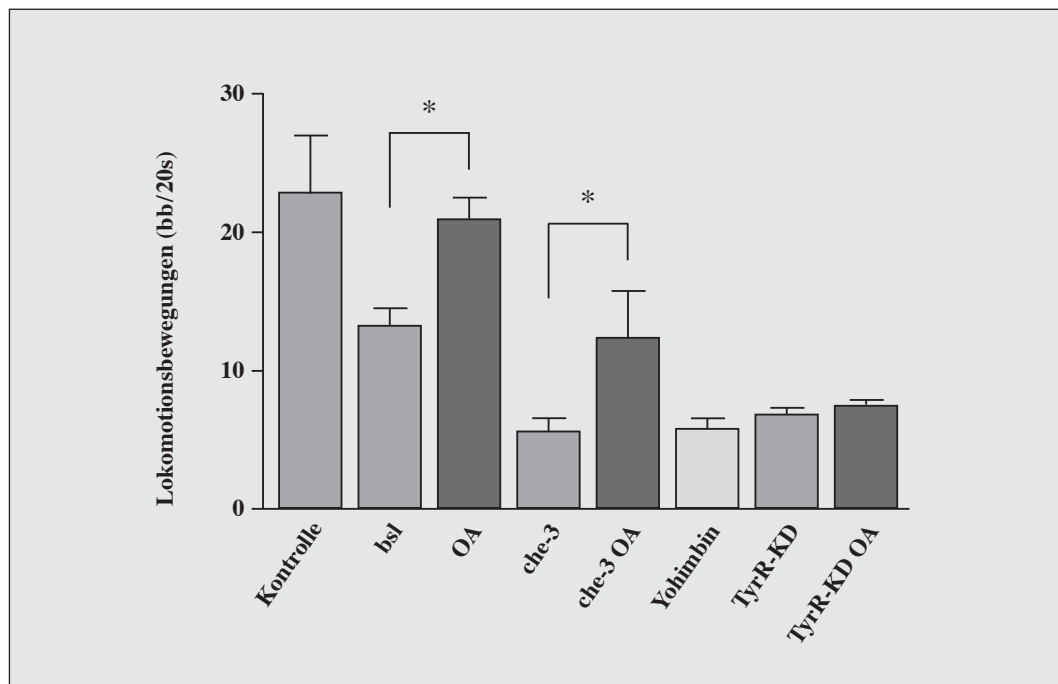


Abbildung 18: Lokomotion – 'basal slowing response'

Die Gruppe der beobachteten Tiere ist wieder die gleiche wie schon bei der Eiablage. Die Zahl der Lokomotionsbewegungen, die ein Wurm während einer Zeitspanne von 20 Sekunden vollzieht, ist als ein Messwert definiert. Die Kontrolle bestand darin, Wildtyp-Würmer nach dem Abwaschen von anhaftenden Bakterien (siehe Kap. 2.7.1) auf bakterienfreiem Agar auszusetzen. Alle anderen Tiere wurden nach dem Waschen wieder auf einem Bakterienrasen ausgesetzt.

Auf dem Bakterienrasen zeigte der Wildtyp unter der Wirkung des Octopamins (OA) eine signifikant erhöhte Lokomotionsaktivität gegenüber unbehandelten Würmern (*bsl*). Diese Wirkung blieb bei Tieren mit Knockdown des Tyraminrezeptors aus. Umgekehrt sinkt die Lokomotionsaktivität nach Verabreichung des Tyramin-Antagonisten Yohimbin beim Wildtyp auf das Niveau der Aktivität des Rezeptor-Knockdowns. Die Octopamin-/Tyramin-defizienten *che-3*-Mutanten zeigten eine dementsprechend niedrige Lokomotionsaktivität, die durch Octopamin-gabe signifikant erhöht wurde.

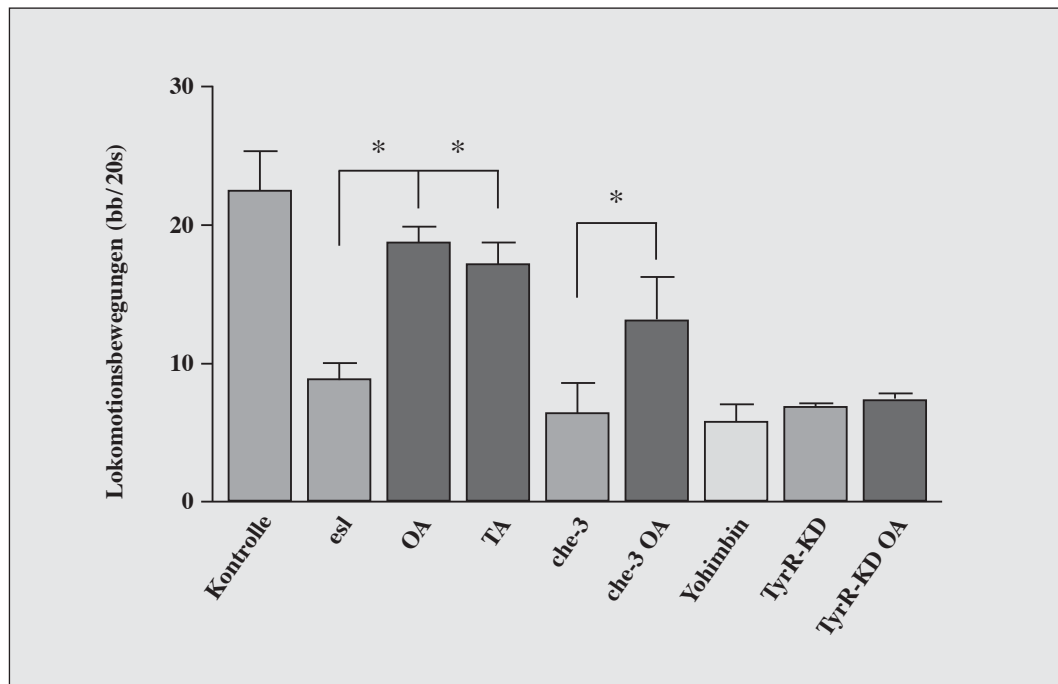


Abbildung 19: Lokomotion – ‘enhanced slowing response’

Nach einer halbstündigen Hungerperiode verringern WT-Würmer beim Antreffen eines Bakterienrasens ihre Lokomotionsaktivität noch stärker (*esl*) als im gut genährten Zustand. Die Blockade des Tyraminrezeptors mit Yohimbin, das Fehlen von Octopamin und Tyramin (*che-3*) und das Fehlen des Tyraminrezeptors (TyrR-KD) bringen die Lokomotionsaktivität auf etwa dasselbe Niveau. Auch die verstärkte Verlangsamungsreaktion wird also durch Octopamin und Tyramin aufgehoben.

Mit der Beobachtung, dass Octopamin und Tyramin die basale und die verstärkte Verlangsamungsreaktion aufheben, die Würmer sich also bewegen, als ob keine Bakterien in ihrer Umgebung wären, wurde ein weiteres Kriterium geschaffen, welches für die Untersuchung der Signalkaskade des Tyraminrezeptors sehr hilfreich ist. Ist eine Mutante Octopamin- bzw. Tyramin-sensitiv, so kann das entsprechende Protein nicht an der Signalkaskade des Tyraminrezeptors beteiligt sein, da auch in diesem Kontext das Octopamin-/Tyramin-Signal durch den Tyraminrezeptor vermittelt wird.

3.3. Verhaltenspharmakologische Untersuchungen zur Charakterisierung der Signaltransduktion des Tyraminrezeptors von *C. elegans*

Die soeben dargelegten Erkenntnisse über die Funktionen des Tyraminrezeptors von *C. elegans* in verschiedenen Verhaltenskontexten haben die Perspektive eröffnet, die an der Signaltransduktion des Rezeptors beteiligten Proteine auf der Basis dieser Verhaltensbeobachtungen zu ermitteln.

3.3.1. Alpha-Untereinheiten von G-Proteinen

Da seine Aminosäuresequenz (siehe Witte, 2000) den Tyraminrezeptor ganz klar als G-Protein-gekoppelten Rezeptor ausweist, war es naheliegend, die Suche bei den bekanntermaßen für die Rezeptorbindung zuständigen α -Untereinheiten der transduzierenden heterotrimeren G-Proteine zu beginnen.

3.3.1.1 G-Protein α -Untereinheiten von *C. elegans* im Kontext des Defäkationsverhaltens

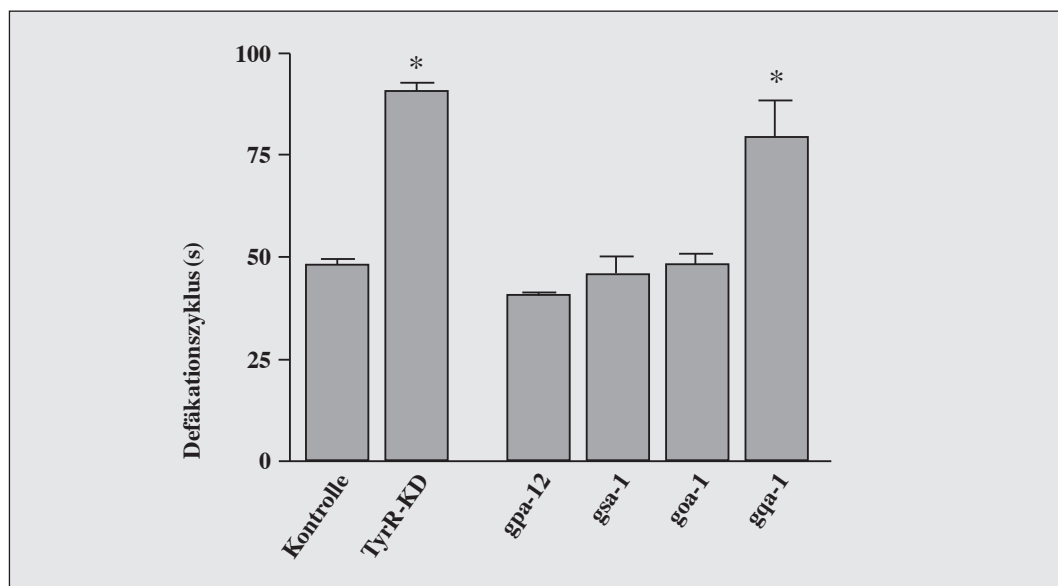


Abbildung 20: Defäkation ($G\alpha$ -Mutanten)

Die Länge der Defäkationszyklen von Mutanten mit Defekten in jeweils einem der vier *C. elegans*-Orthologe von $G\alpha_{12}$ (*gpa-12*), $G\alpha_s$ (*gsa-1*), $G\alpha_{i/o}$ (*goa-1*) und $G\alpha_q$ (*gqa-1*). Zum Vergleich sind noch einmal die Werte für den Wildtyp und für den Tyraminrezeptor-Knockdown dargestellt.

Als einzige der vier Mutanten weist die *gqa-1*-Mutante einen gegenüber dem Wildtyp signifikant verlängerten Defäkationszyklus auf. Dies ist ein Hinweis darauf, dass die Wirkung des Tyraminrezeptors intrazellulär über die Kopplung an die G-Protein Alpha-Untereinheit G_q vermittelt wird.

3.3.1.2 G-Protein α -Untereinheiten von *C. elegans* im Kontext des Lokomotionsverhaltens

Nachdem sich im Kontext des Defäkationsverhaltens ein starker Hinweis darauf ergeben hatte, dass von den vier in Frage kommenden Alpha-Untereinheiten *gqa-1* diejenige ist, welche die Signale des Tyraminrezeptors transduziert, wurde dieses im Kontext des Lokomotionsverhaltens überprüft.

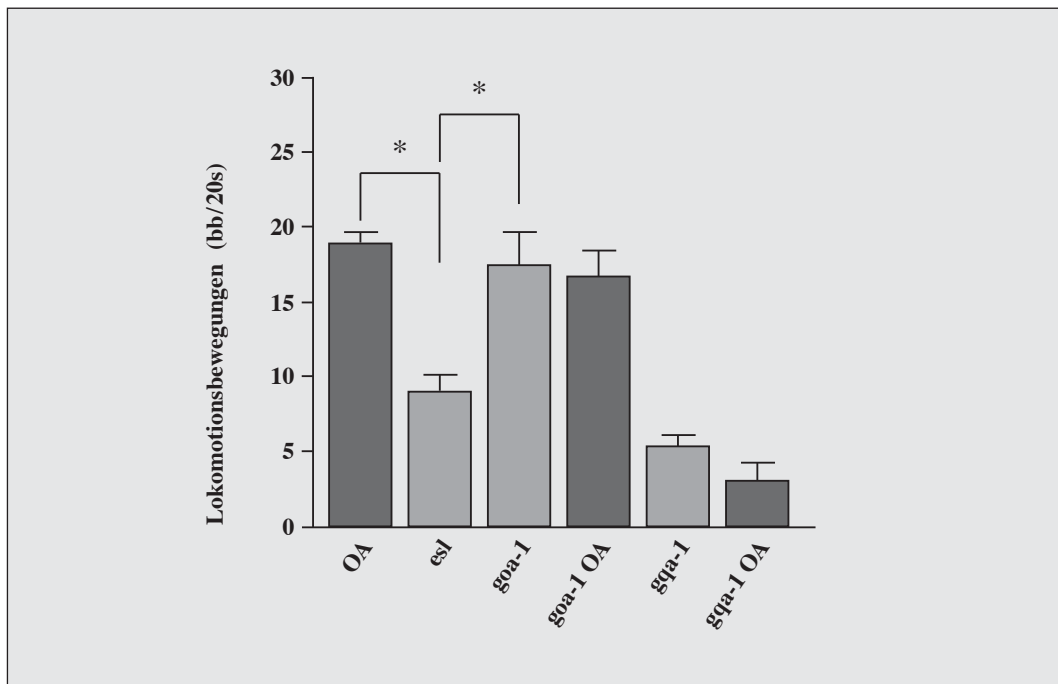


Abbildung 21: Lokomotion – ‘enhanced slowing response’ (*goa-1/gqa-1*)

Die *goa-1*-Mutante zeigt keine ‘enhanced slowing response’, die *gqa-1*-Mutante hingegen zeigt dieses Verhalten. Beide Mutanten verändern ihre Lokomotionsaktivitäten nach Octopamin-Applikation nicht. Im Fall der *goa-1*-Mutante ist dies allerdings auch nicht zu erwarten, da die Lokomotionsaktivität sich ohnehin bereits etwa auf dem Niveau befindet, welches durch die Behandlung von Würmern des Wildtyps mit Octopamin oder Tyramin erreicht wird.

Auch bei der Lokomotion brachte der Funktionsverlust von *gqa-1* einen Phänotyp hervor, welcher dem des Tyraminrezeptor-Knockdowns entspricht, während die entsprechende *goa-1*-Mutante einen gegensätzlichen Phänotyp aufweist.

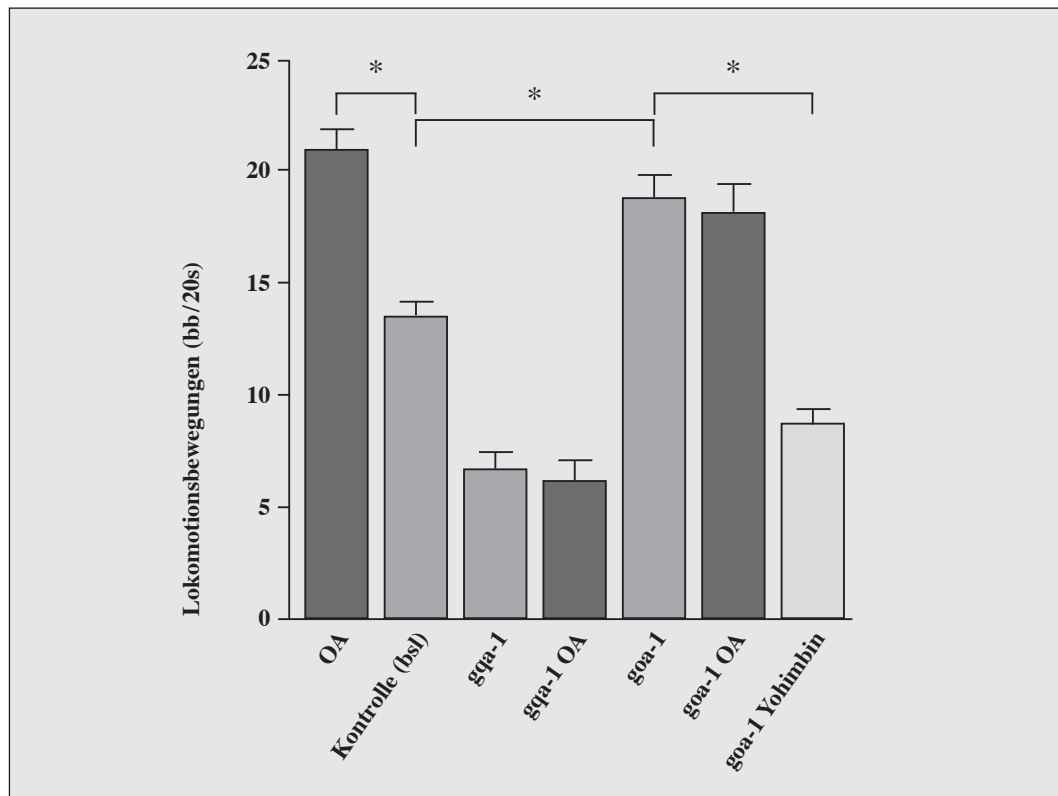


Abbildung 22: Lokomotion – ‘basal slowing response’ (goa-1/gqa-1)

Auch die ‚basale Verlangsamung‘ ist bei goa-1-Mutanten gestört. Sie zeigen ein Aktivitätsniveau, welches dem von Tyramin-/Octopamin-behandelten Würmern entspricht. Die Aktivität ist jedoch unter Einfluss von Yohimbine signifikant herabgesetzt, was zusätzlich dafür spricht, dass goa-1 kein Bestandteil der Signalkaskade des Tyraminrezeptors ist.

Die gqa-1-Mutante zeigte auch in diesem Kontext keine Sensitivität bezüglich der beschleunigenden Wirkung des Octopamins. Somit stellt sich G α q nach den vorliegenden Ergebnissen als der wahrscheinlichste Kandidat aller vier untersuchten Alpha-Untereinheiten von G-Proteinen für eine Kopplung an den Tyraminrezeptor von *C. elegans* heraus. Diese Tatsache war entscheidend bei der Auswahl von Mutanten für die Suche nach Proteinen, die weiter stromabwärts in der Signalkaskade des Tyraminrezeptors als Effektoren fungieren könnten.

3.3.2. Die PhospholipaseC β und weitere Effektoren

Die PhospholipaseC β ist als Effektor von G α_q bekannt. Lackner und andere (1999) konnten bereits zeigen, dass die homologen Proteine in *C. elegans*, EGL-8 und GQA-1 in einem Signalweg liegen und die entsprechenden Defekt-Mutanten ähnliche Phänotypen aufweisen. Alle weiteren in diesem Kapitel behandelten Proteine sind auf verschiedene Weise mit diesem Signalweg verbunden. Über die Beeinflussung dieser Kaskaden durch Octopamin/Tyramin war bisher nichts bekannt.

3.3.2.1 PLC β (egl-8), CAPS (unc-31) und das *C.elegans* Tubby-Homolog (tub-1) im Kontext des Defäkationsverhaltens

UNC-31 ist ein durch Ca²⁺ aktivierbares Protein, das für die Freisetzung von Peptidtransmittern und biogenen Aminen aus 'dense core'-Vesikeln notwendig ist. Von dem Transkriptionsfaktor Tubby ist aus dem Mausmodell bekannt, dass er durch die PLC β aktiviert wird.

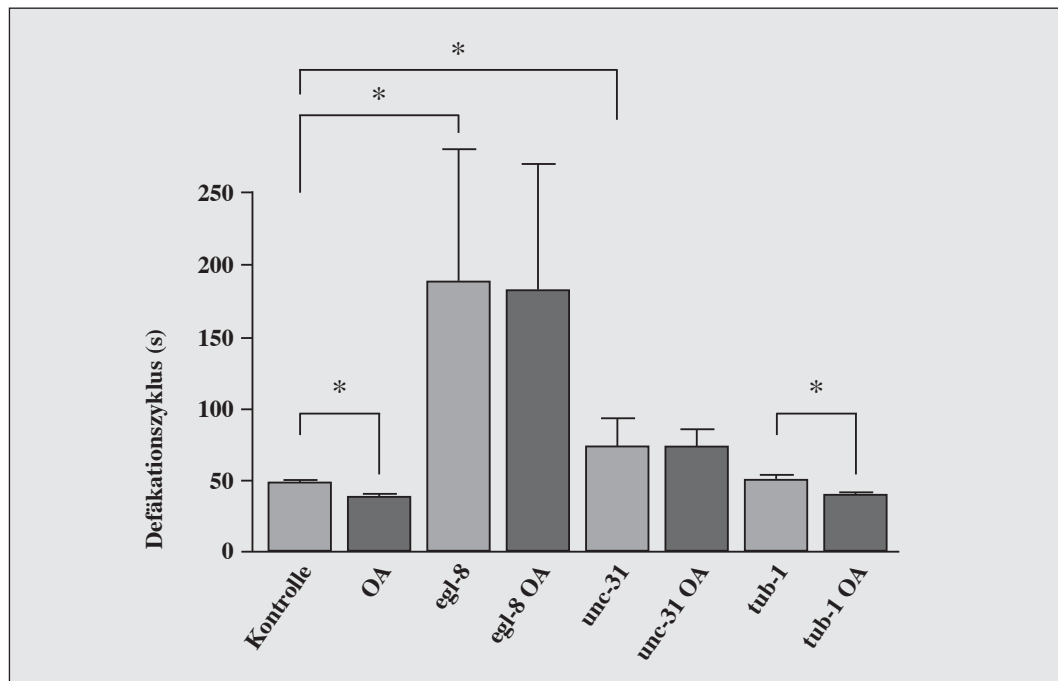


Abbildung 23: Defäkation (egl-8/unc-31/tub-1)

Die Defekt-Mutanten egl-8 und unc-31 weisen verlängerte Defäkationszyklen auf. Die Zyklusdauer von egl-8 ist vervierfacht, diejenige von unc-31 etwa verdoppelt. Bei beiden Mutanten lässt sich der Zyklus nicht wie beim Wildtyp durch Octopamin-Applikation beschleunigen. Einen gegenüber Wildtyp-Würmern unveränderten Phänotyp zeigt tub-1 in diesem Verhaltenskontext. Dies spricht für das Wirken von egl-8 und unc-31 in der Signalkaskade des Tyraminrezeptors, obwohl der Defekt von egl-8 (der Phospholipase) in diesem Kontext besonders schwerwiegend erscheint.

3.3.2.2 *unc-13* und *pkc-2* im Kontext des Defäkationsverhaltens

UNC-13 ist notwendig für die Freisetzung von Transmittern wie Acetylcholin, GABA oder Glutamat aus klaren synaptischen Vesikeln. Aktiviert wird es durch Diacylglycerin (DAG) und Ca^{2+} . PKC-2 ist ein *C. elegans*-Ortholog der Protein-kinase $\text{C}\alpha$, welche ebenfalls durch Ca^{2+} und DAG aktiviert wird. Sowohl DAG als auch Ca^{2+} sind bekanntlich Teile der PLC β -Kaskade.

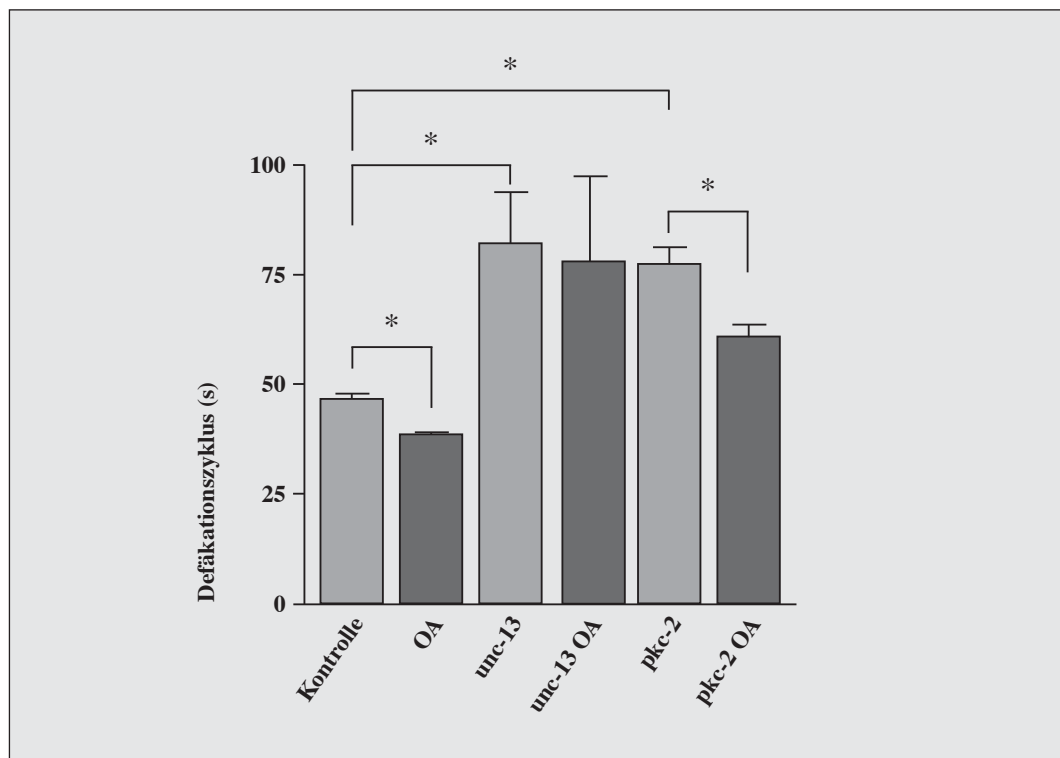


Abbildung 24: Defäkation (*unc-13*/*pkc-2*)

Die Defekt-Mutanten von *unc-13* und *pkc-2* haben verlängerte Defäkationszyklen.

Der auf das doppelte verlängerte Defäkationszyklus von *unc-13* wurde nicht durch die Einwirkung von Octopamin verkürzt, während derjenige der *pkc-2* Mutante unter dem Einfluss von Octopamin signifikant kürzer wurde.

In diesem Kontext ist *pkc-2* folglich nicht Teil der Signalkaskade des Tyramin-rezeptors, *unc-13* hingegen zeigt alle Anzeichen dafür.

3.3.2.3 *egl-8*, *unc-31* und *tub-1* im Kontext des Lokomotionsverhaltens

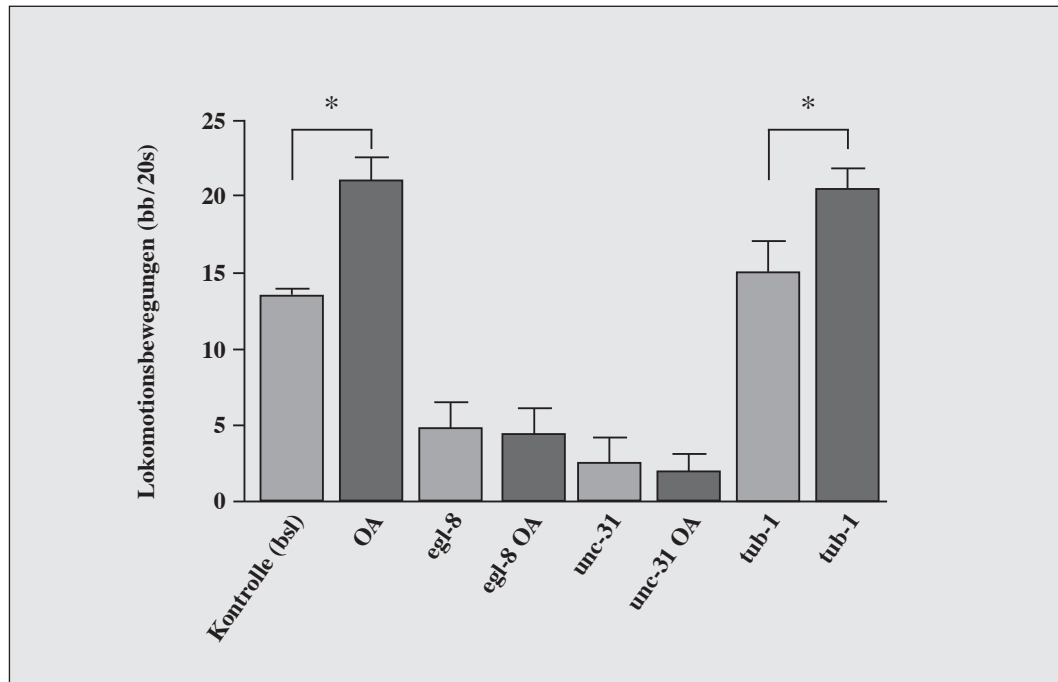


Abbildung 25: Lokomotion – 'basal slowing response' (*egl-8/unc-31/tub-1*)

Die Defekt-Mutanten von *egl-8* und *unc-31* zeigen eine durch Octopamin nicht beeinflussbare stark verminderte Lokomotionsaktivität. Diejenige von *tub-1* hingegen zeigt auch im Verhaltenskontext 'basal slowing response' einen dem Wildtyp entsprechenden Phänotyp, denn die Würmer verringern in Gegenwart eines Bakterienrasens ihre Lokomotionsaktivität und zeigen Sensitivität gegenüber Octopamin.

Die Mutanten *egl-8* und *unc-31* zeigen auch in ihrem Phänotyp bei der Lokomotion Übereinstimmung zu dem des Tyraminrezeptor-Knockdowns.

3.3.2.4 *unc-13*, *pkc-2* und *itr-1* im Kontext des Lokomotionsverhaltens

ITR-1 ist ein IP₃-Rezeptor, der in der Membran des endoplasmatischen Retikulums (ER) lokalisiert ist. Nach Aktivierung durch den von der PLC β freigesetzten *Second Messenger* Inositol-1,4,5-Trisphosphat bewirkt ITR-1 die Freisetzung von Ca²⁺ aus dem ER in das Cytoplasma.

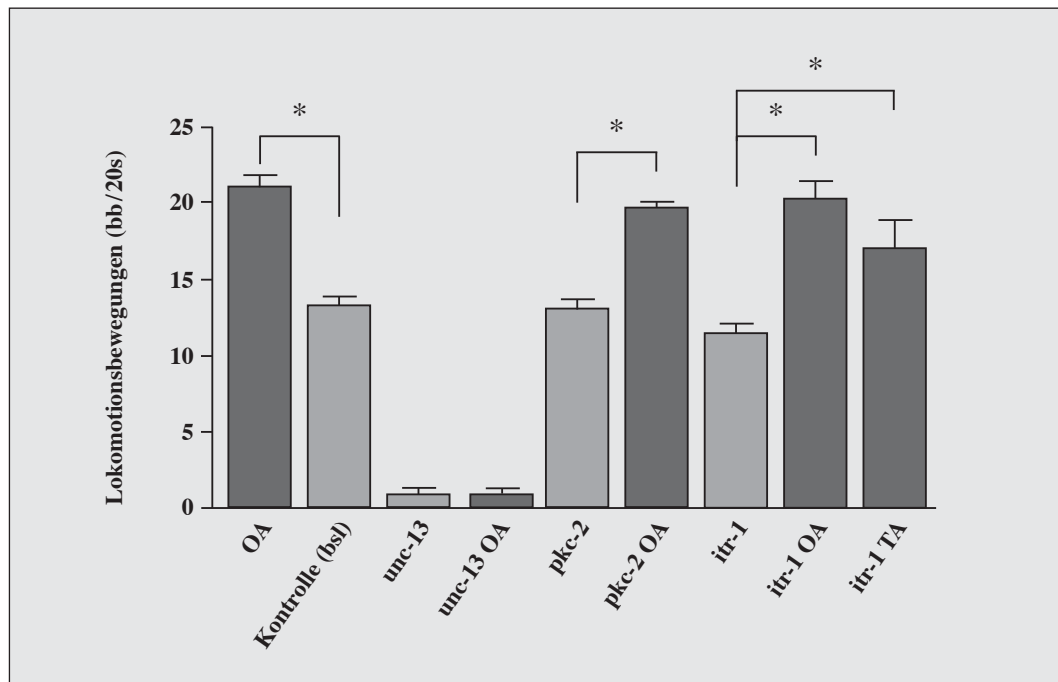


Abbildung 26: Lokomotion – 'basal slowing response' (*unc-13*/*pkc-2*/*itr-1*)

Die *unc-13*-Mutanten zeigten nur ein geringes Maß an Lokomotionsaktivität. Eine Steigerung der Lokomotionsaktivität aufgrund der Einwirkung von Octopamin fand nicht statt. Die Defekt-Mutanten von *pkc-2* und *itr-1* zeigten in dem Verhaltenskontext der 'basal slowing response' einen Phänotyp entsprechend dem des Wildtyps.

Die verhaltenspharmakologischen Untersuchungen dieses Kapitels legen die Beteiligung der PhospholipaseC β (EGL-8) und der beiden zur Fusion von klaren synaptischen- bzw. *dense core*-Vesikeln benötigten Proteine, UNC-13 und UNC-31 (CAPS) an der Signalkaskade des Tyraminrezeptors nahe.

Die ProteinkinaseC α (PKC-2) und der IP₃-Rezeptor (ITR-1) sowie der Transkriptionsfaktor TUB-1 sind offenbar, zumindest in den hier betrachteten Verhaltenskontexten der Lokomotion und Defäkation, nicht an der Transduktion tyraminerger/octopaminerger Signale beteiligt.

Möglicherweise sind sie dies aber an anderer Stelle, denn der Phänotyp des Tyraminrezeptor-Knockdowns äußerte sich nicht nur durch Defekte auf motorischer Ebene, sondern es waren auch Hinweise auf metabolische Veränderungen zu beobachten, wie im nächsten Kapitel zu sehen ist.

3.4 Histologischer Nachweis der Akkumulation von Speicherlipiden in den intestinalen Zellen und im Pseudocoel von *C. elegans*

Der Phänotyp des Tyraminrezeptor-Knockdowns äußerte sich zusätzlich zu den beobachteten Verhaltensdefekten auch durch das massive Auftreten von granulösen Objekten in den Darmzellen und im Pseudocoel. Eine entsprechende Literaturrecherche ergab, dass *C. elegans* in den intestinalen Zellen sogenannte Speichergranula beherbergt, welche diverse Speicherstoffe, wie z.B. Glykogen und Lipide enthalten. Die frei im Pseudocoel flottierenden Tröpfchen hingegen stellen extrazelluläre Lipidspeicher dar. Aus diesem Grund wurden Lipidfärbungen der Tyraminrezeptor-defizienten Tiere zum Nachweis dieser Speicherlipide angefertigt. Zum Vergleich wurden Tiere herangezogen, die bekanntermaßen solche Lipide akkumulieren. Diese Tiere (*daf-2*) haben einen Defekt in einem den bekannten Insulinrezeptoren ähnelndem Rezeptor, welcher jedoch Wirkungen vermittelt, die den vom Insulin bekannten entgegenwirken.

Außerdem wurde das Ausmaß der Fettspeicher bei Wildtyp-Würmern dokumentiert.

Auch die pharmakologische Blockade des Tyraminrezeptors bei Wildtyp-Würmern mit Hilfe von Yohimbin wurde zum Vergleich herangezogen.

Da in diesem Zusammenhang ebenfalls die Frage aufkommt, welcher intrazelluläre Weg für diesen Phänotyp verantwortlich ist, wurden die bereits in den verschiedenen Verhaltenskontexten verwendeten Mutanten auf die Akkumulation von Speicherlipiden hin untersucht. Waren Mutanten in dieser Hinsicht auffällig, so wurden auch von ihnen Lipidfärbungen angefertigt.

Die Defekt-Mutante des Transkriptionsfaktors Tubby war im Mausmodell durch starke Akkumulation von Speicherfett aufgefallen; daraus leitet sich auch der Name ab (*tub*, engl. für Fass, in Anlehnung an die füllige Körperform der betroffenen Mäuse). Da kürzlich von Santagata und anderen (2001) gezeigt wurde, dass Tubby bei der Maus (*Mus musculus*) durch die PhospholipaseC β aktiviert wird, lag es nahe, das homologe Protein bei *C. elegans* (TUB-1) ebenfalls bezüglich des Phänotyps einer Defekt-Mutante und auf eine mögliche Beteiligung an der Signalkaskade des Tyraminrezeptors hin zu untersuchen.

3.4.1 Lipid-Nachweis mit Oelrot O

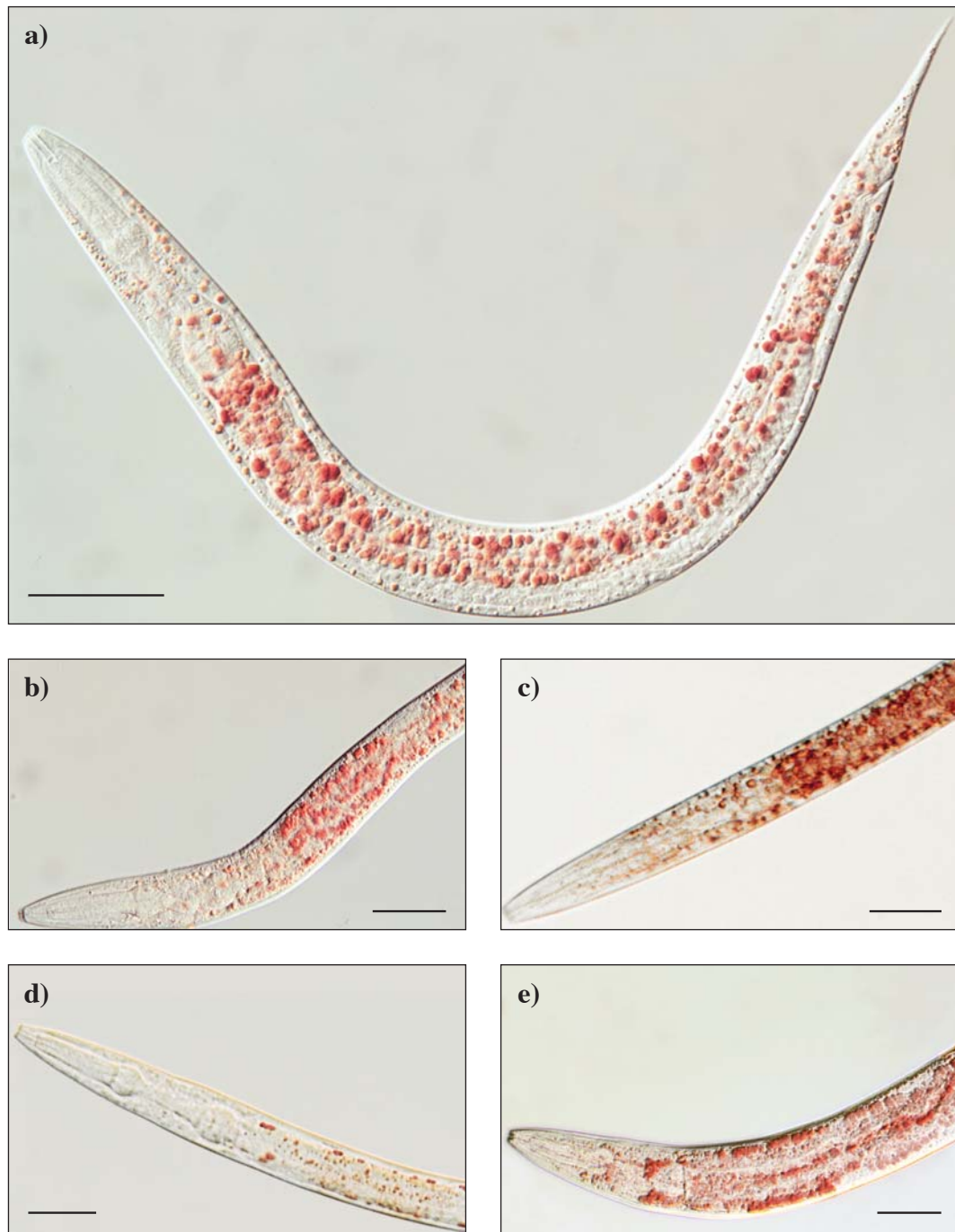


Abbildung 27a), b), c), d), e): Lipid-Nachweis (Oelrot O)

(Maßstab = 50 µm)

Akkumulation von Lipiden in den intestinalen Zellen und im Pseudocoelom von a) TyrR-Knockdown, b) *gqa-1*, c) einem mit Yohimbin (10^{-4} M) behandelten Wurm, d) dem Wildtyp und e) *che-3* (der OA/TA-defizienten Mutante). Der gegenüber dem WT stark veränderte Phänotyp ist deutlich zu erkennen.

3.4.2 Lipid-Nachweis mit Nilrot

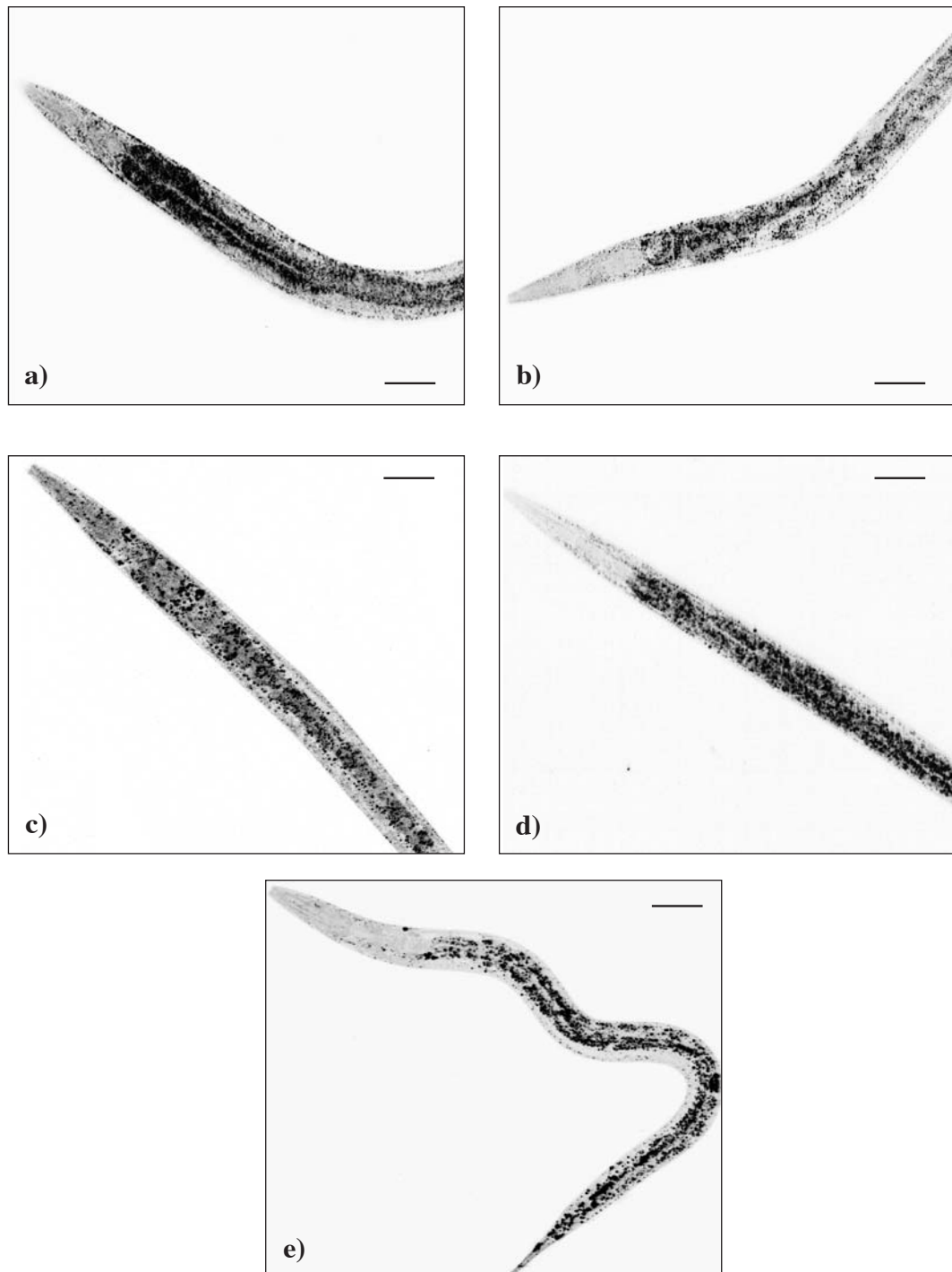


Abbildung 28a), b), c), d), e): Lipid-Nachweis (Nilrot)

(Maßstab = 50 µm)

a) TyrR-Knockdown, b) tub-1-Knockdown, c) egl-8, d) daf-2 und e) unc-31. Alle hier zu sehenden Mutanten zeigen starke Akkumulation von Speicherlipiden.

3.5 Zelluläre Lokalisierung des Tyraminrezeptors von *C. elegans*

Zur Gewinnung von Erkenntnissen über die Funktionen des Tyraminrezeptors ist es von großem Nutzen seine zelluläre Expression zu untersuchen. Wie erwähnt, konnten bereits vielen Zellen im Nervensystem von *C. elegans* spezifische Funktionen zugeschrieben werden. Darüber hinaus werden seit geraumer Zeit Daten zur zellspezifischen Genexpression gesammelt, welche das Wissen über das Transkriptom jeder einzelnen Zelle – und damit über ihre molekulare Ausstattung – ständig erweitern. Bei vielen Proteinen ist neben dem räumlichen auch das zeitliche Muster der Expression von großem Interesse. Im Rahmen dieser Arbeit wurde vor allem das räumliche und weniger das zeitliche Expressionsmuster des Tyraminrezeptors untersucht. Horvitz und andere (1982) konnten in L4-Larven und adulten Exemplaren von *C. elegans* wesentlich größere Konzentrationen von Octopamin nachweisen als bei den ersten drei Larvalstadien. Eine Erklärung dafür bietet die Tatsache, dass Octopamin eine wichtige Rolle im Rahmen von ‚erwachsenen‘ Verhaltensweisen (wie z.B. der Eiablage) spielt. Ungeachtet dessen konnte die Expression des Tyraminrezeptors in allen Larvalstadien beobachtet werden, wenn auch nicht im gleichen Maße wie bei adulten Tieren.

Auf den folgenden Seiten sind konfokalmikroskopische Aufnahmen einer transgenen Linie von *C. elegans* zu sehen (Abb. 29-36), die einen mit dem Promotor des Tyraminrezeptors fusionierten GFP-Reporter tragen (CeTyrR-Prom::GFP).

Die erste dieser Aufnahmen ist ein Beispiel für die starke Expression des Tyraminrezeptors im ventralen Nervenstrang von adulten Würmern.

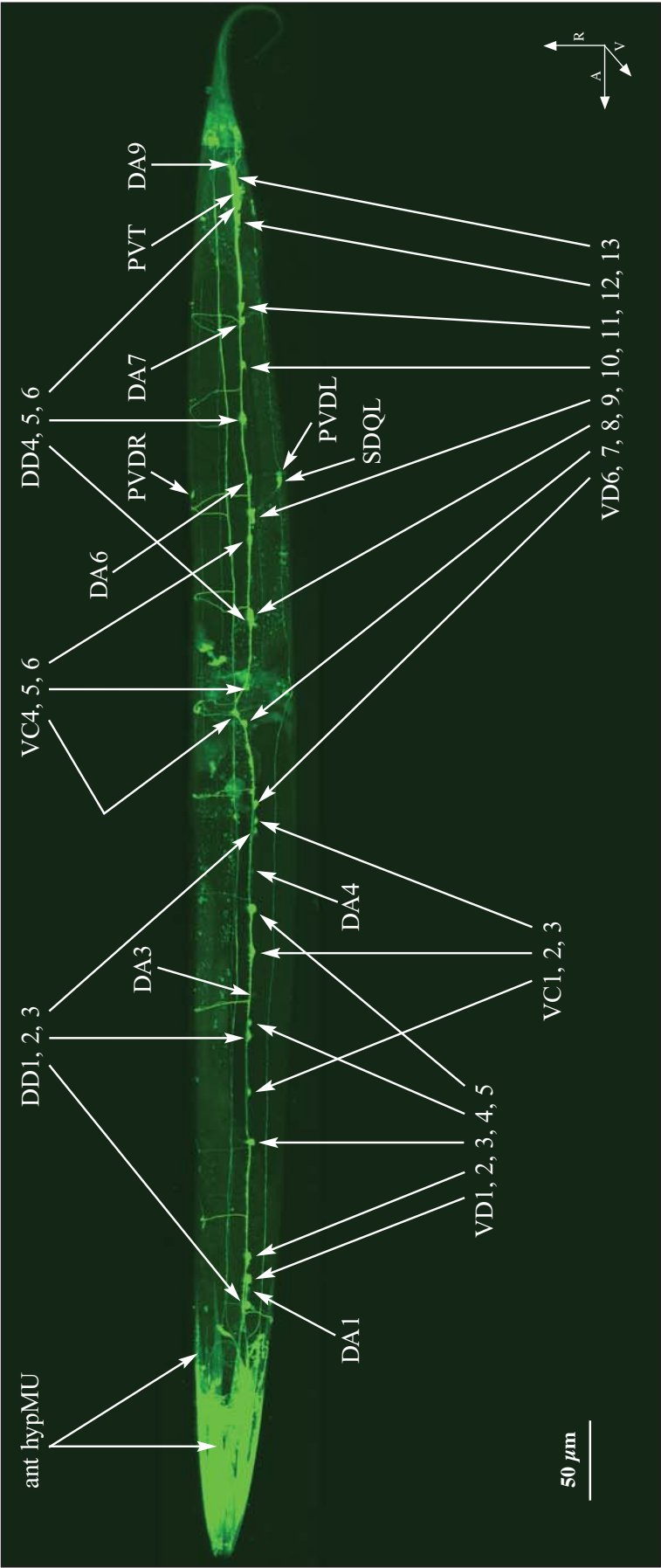


Abbildung 29: Expression des Tyraminrezeptors im ventralen Nervenstrang (CeTyrR)

Die Expression des GFP-Reporters für CeTyrR bei einem adulten Hermaphroditen in Dorso-Ventralansicht („quasi-dorsal“). Deutlich sichtbar ist die Expression in der anterioren hypodermalen Muskulatur (ant hypMU) und in vielen Neuronen des ventralen Nervenstranges, und zwar in allen D-Typ-Motoneuronen (VD1-13 und DD1-6), den A-Typ-Motoneuronen DA1, DA3, DA4, DA6, DA7 und DA9 und schließlich in den für Hermaphroditen spezifischen C-Typ-Motoneuronen VC1-6. Dazu kommen noch einige lateral liegende Neurone (SDQL, PVDL und PVDR) und das unpaare Interneuron PVT.

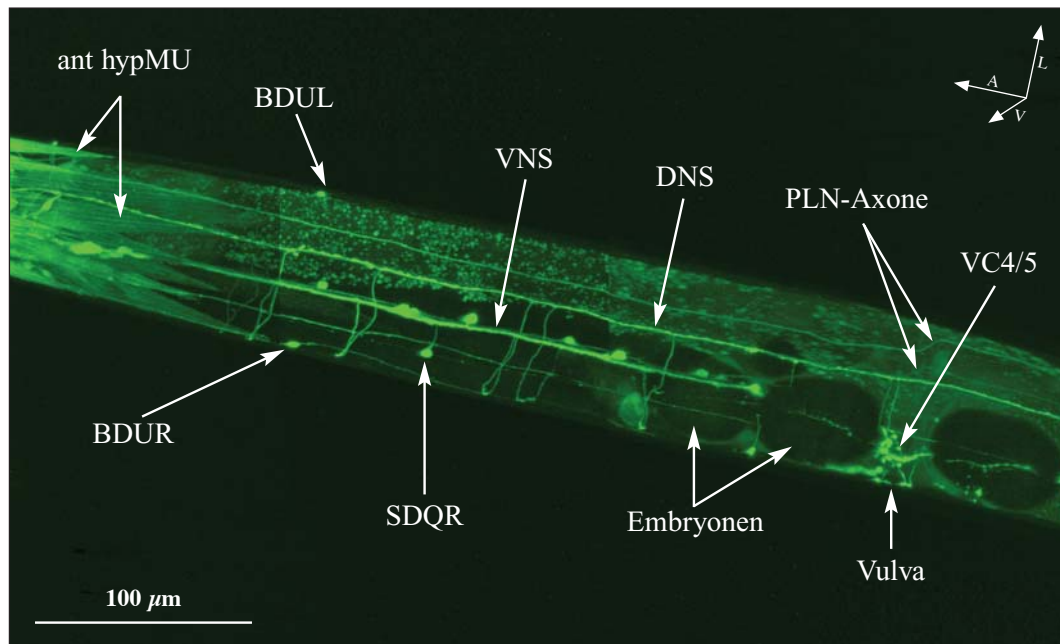


Abbildung 30: Expression in den lateralen Nervensträngen (CeTyrR)

Adulter Hermaphrodit in Dorso-Ventralansicht („quasi-dorsal“). Es ist der Körperabschnitt zwischen Pharynx und Vulva zu sehen.

Etwas posterior des Pharynx gelegen befinden sich lateral die Somata der BDU-Neurone. Das Neuron SDQR liegt, anders als sein kontralaterales Schwesterneuron SDQL, in der anterioren Körperhälfte. Die SDQ-Axone verlaufen dorsal-sublateral, die Somata jedoch liegen lateral in einem benachbarten Nervenstrang, die kurze Kommissur zur Überbrückung dieser Strecke ist ein charakteristisches Merkmal der SDQ-Neurone.

Vergleicht man die Zahl und Anordnung der Kommissuren zwischen ventralem und dorsalem Nervenstrang in Abbildung 30 mit denen, die in Abb. 29 Expression des Tyraminrezeptors zeigen, so ist festzustellen, dass in Abb. 30 zusätzliche Kommissuren auftauchen. Diese sind den AS-Motoneuronen zuzuordnen. Bei dem Vergleich zahlreicher ähnlicher Aufnahmen zeigten die Motoneuronen der Klassen DA und AS stets eine Variabilität in der Expression des Reporterplasmids, während die Motoneuronen der Klassen VD und DD eine größere Konstanz in dieser Hinsicht aufwiesen. Generell war die Expression in den Motoneuronen überwiegend in adulten Würmern oder L4-Larven zu beobachten.

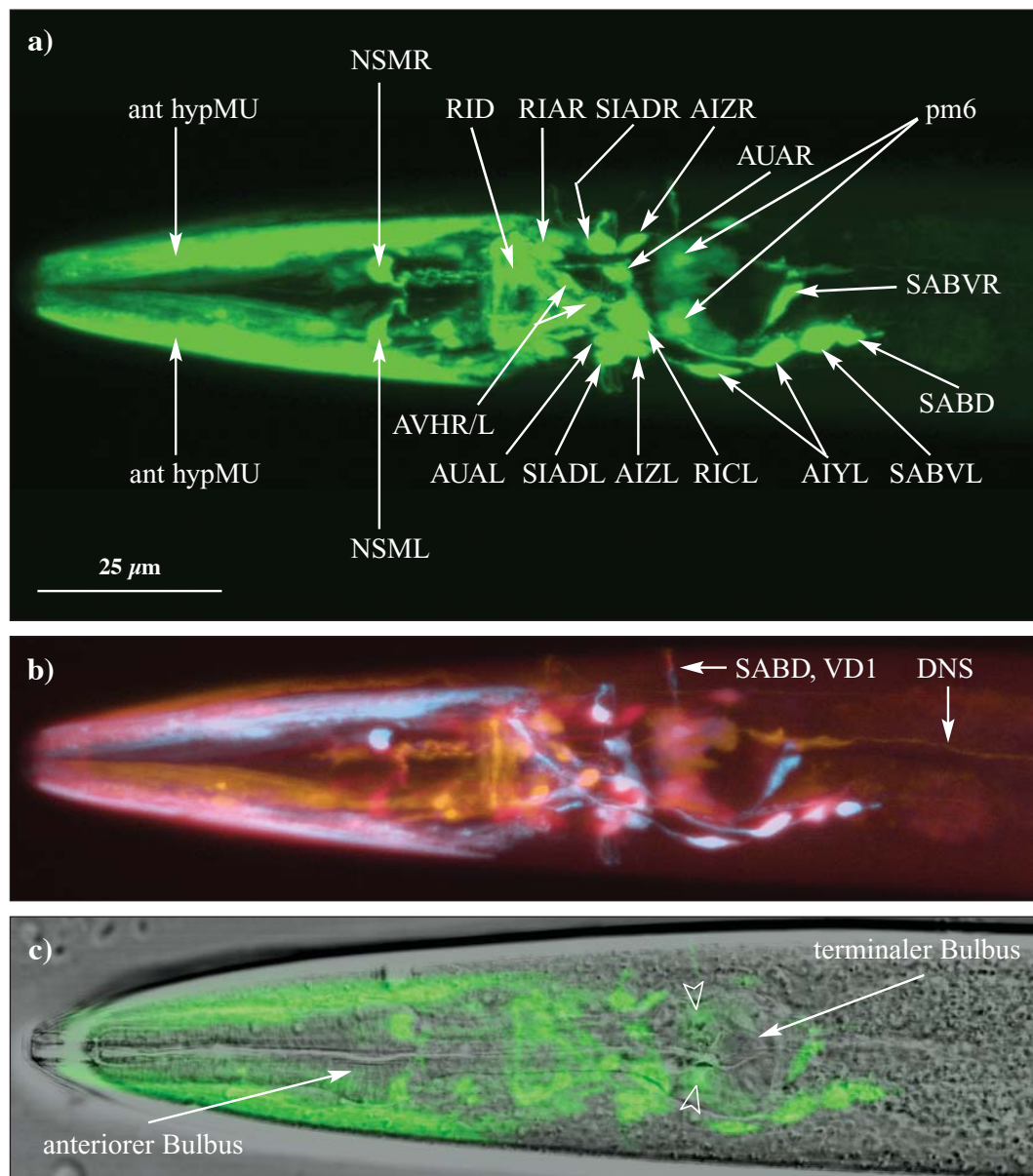


Abbildung 31a), b), c): Expression in den anterioren Ganglien und im Pharynx (CeTyrR)

Pharynxregion einer L3-Larve in Dorso-Ventralansicht („quasi-dorsal“); konfokalmikroskopische Aufnahme in drei verschiedenen Darstellungsmodi.

a) Zahlreiche Neuronen des anterioren Nervenrings exprimieren den Tyraminrezeptor. Auch einige Pharynxmuskelzellen (pm6) sowie die neurosekretorischen Pharynxneuronen (NSML/R) tun dies. Deutlich zu sehen ist die Expression auch in den hypodermalen Muskeln des Kopfes (ant hypMU). Zur Verdeutlichung der räumlichen Verhältnisse ist in b) eine farbkodierte Version von a) zu sehen; das Bild ist in drei Ebenen unterteilt: von orange (dorsal) über rot (median) bis blau (ventral). Die Kommissur des Motoneurons VD1 ist gekennzeichnet. Der Neurit des unpaaren Interneurons SABD verläuft über eben diese Kommissur rechts um den Pharynx herum.

c) Überlagerung von a) mit einer im Transmissionsmodus des Konfokalmikroskops hergestellten Aufnahme. Die Lageverhältnisse relativ zum Pharynx werden dadurch ersichtlich. Zu erkennen ist auch die Lage von zwei der drei Pharynxmuskelzellen im anterioren Teil des posterioren Bulbus (pm6, transparente Pfeilspitzen).

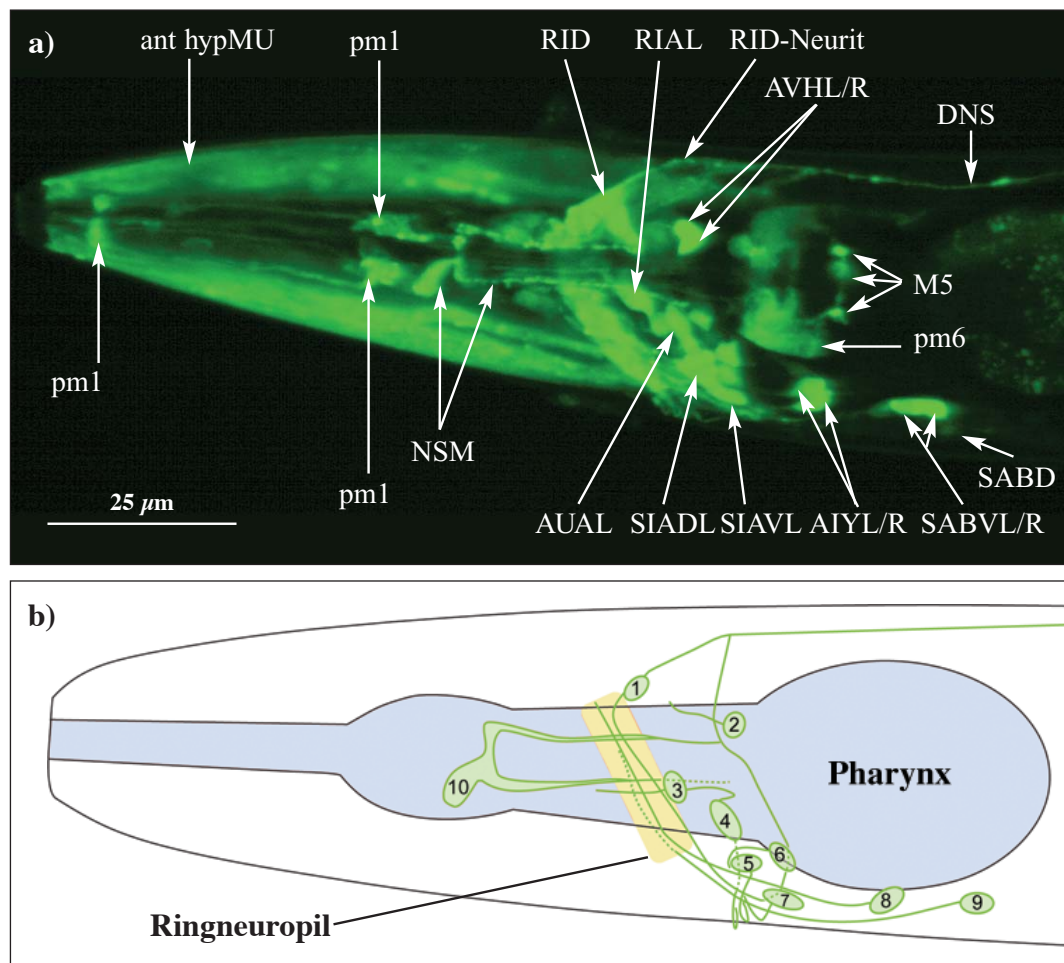


Abbildung 32a, b): Weitere Expression in den anterioren Ganglien und im Pharynx (CeTyrR)

a) Der Pharynxbereich einer L4-Larve in Lateralansicht. Für diese Abbildung wurden laterale Teile der (konfokalen) Sagittalschnittserie entfernt, um die Übersichtlichkeit zu erhöhen. Dadurch ist die synzytische Pharynxmuskulzelle pm1 zu erkennen. Auch der in den dorsalen Nervenstrang (DNS) mündende Neurit des unpaaren Neurons RID ist sichtbar. Im terminalen Bulbus zeigt das Pharynxmotorneuron M5 die Expression des GFP-Reporters.

b) Zellen der anterioren Neuropile und im Pharynx, die den Tyraminrezeptor exprimieren. Die Abbildung ist eine Rekonstruktion der Neurone und ihrer Neuriten aus der gesamten Schnittserie. Zur Wahrung der Übersichtlichkeit sind nur die Neurone der linken Körperhälfte berücksichtigt. 1 = RID, 2 = AVH, 3 = RIA, 4 = AUA, 5 = SIAD, 6 = RIC, 7 = SIAV, 8 = AIY, 9 = SABV, 10 = NSM

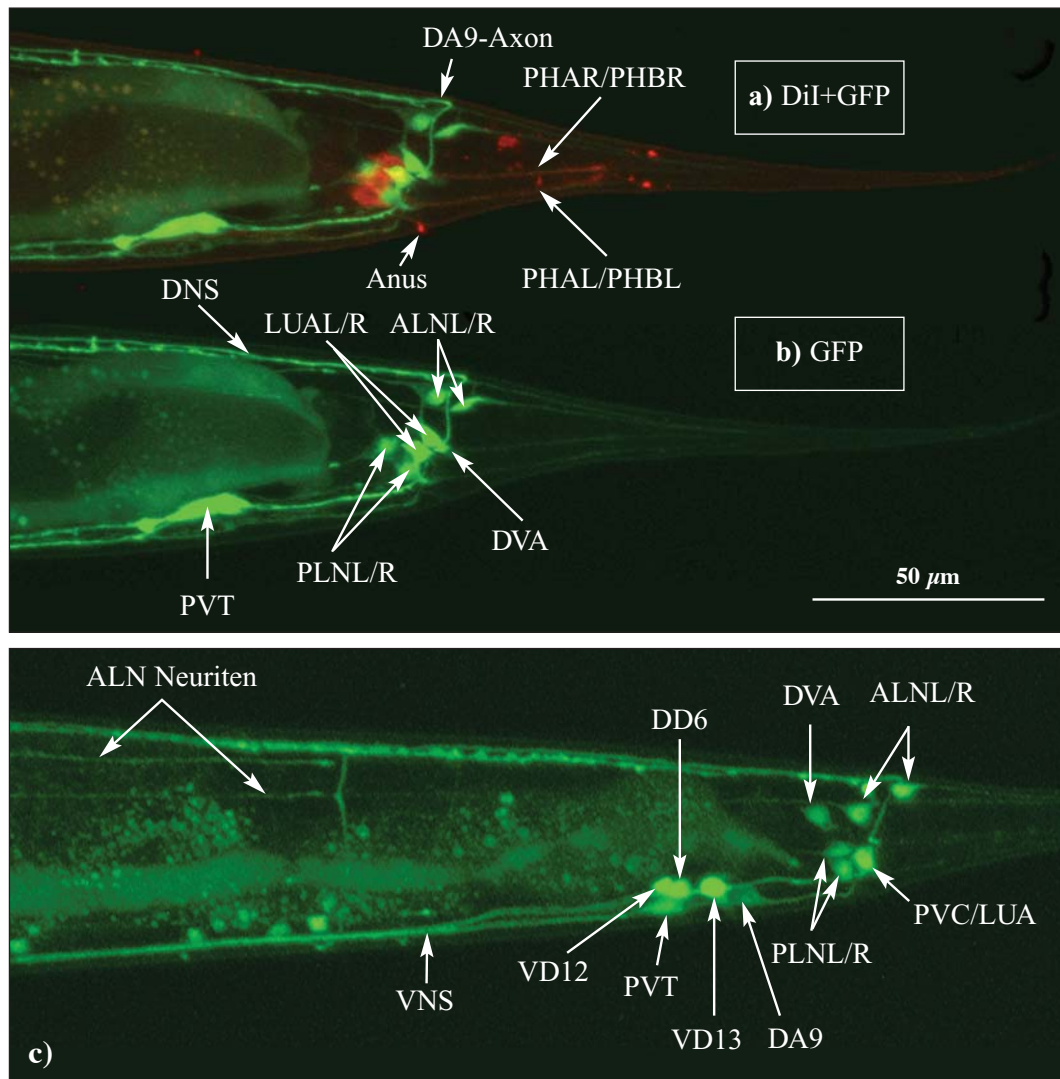


Abbildung 33a), b), c): Expression in den posterioren Ganglien (CeTyrR)

Expression des GFP-Reporters für CeTyrR in den posterioren Ganglien zweier adulter Hermaphroditen in Lateralansicht (gleicher Maßstab). a) und b) zeigen dieselbe Aufnahme; zur Orientierung ist in a) eine DiI-Gegenfärbung (rot) überlagert, welche die Neuronen PHA und PHB markiert.

Der ventrale Nervenstrang (VNS) mündet in das Prä-Analganglion, in dem die Motoneuronen VD12/13 DD6 und DA9 (c) und das große Soma des unpaaren Interneurons PVT GFP-Expression zeigen. Das ebenfalls unpaare Neuron DVA im Dorso-Rektalganglion und die Neurone ALNL/R, PLNL/R sowie LUAL/R und PVCL/R in den Lumbarganglien exprimieren ebenso den TyrR-GFP-Reporter. Die Neuriten von ALN liegen subdorsal und reichen vom Pharynx bis in die Schwanzspitze (c). Parallel dazu verlaufen die Neuriten der ventral gelegenen PLN Neurone sublateral (nicht gekennzeichnet). a) Das Axon von DA9 verläuft über eine Kommissur auf der rechten Seite vorbei am Lumbarganglion in den dorsalen Nervenstrang (DNS).

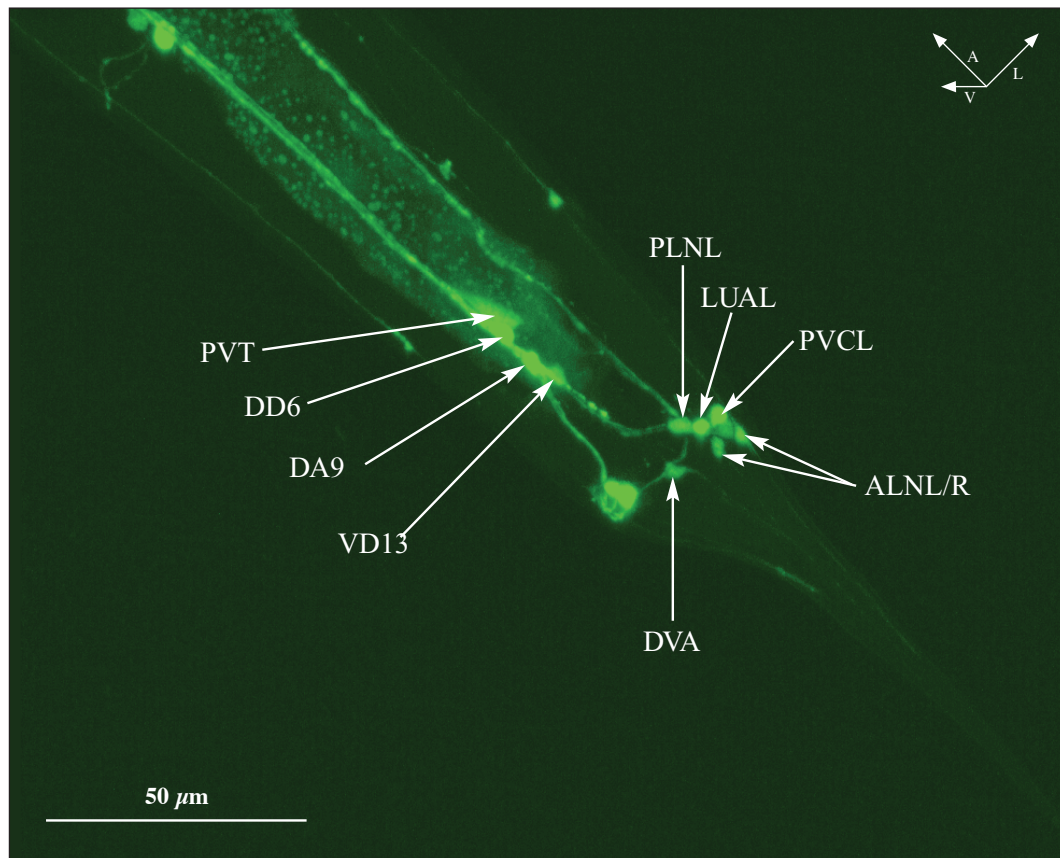


Abbildung 34: Weitere Expression in den posterioren Ganglien (CeTyrR)

Eine weitere Abbildung, welche die Expression des GFP-Reporterkonstrukts für den Tyraminrezeptor in den posterioren Ganglien von *C. elegans* verdeutlichen soll. Es handelt sich wieder um einen adulten Hermaphroditen, diesmal in Ventralansicht. Aus dieser Perspektive sind die Somata der Neuronen des Lumbarganglions PLN, LUA und PVC, zumindest deren Vertreter auf der linken Seite des Tieres, im Gegensatz zur Lateralansicht (Abb. 33), gut erkennbar, da sie sich nicht gegenseitig verdecken.

Wie in den meisten anderen auf Fluoreszenz basierenden Abbildungen von *C. elegans* ist hier die unspezifische Färbung des Intestinums zu beobachten. Diese basiert auf der Autofluoreszenz des Darminhalts, die auch in anderen Wellenlängenbereichen erkennbar ist. Deshalb erscheint der autofluoreszente Darminhalt auf den DiI-Gegenfärbungen aufgrund der Überlagerung des grünen Kanals mit dem roten Kanal gelblich.

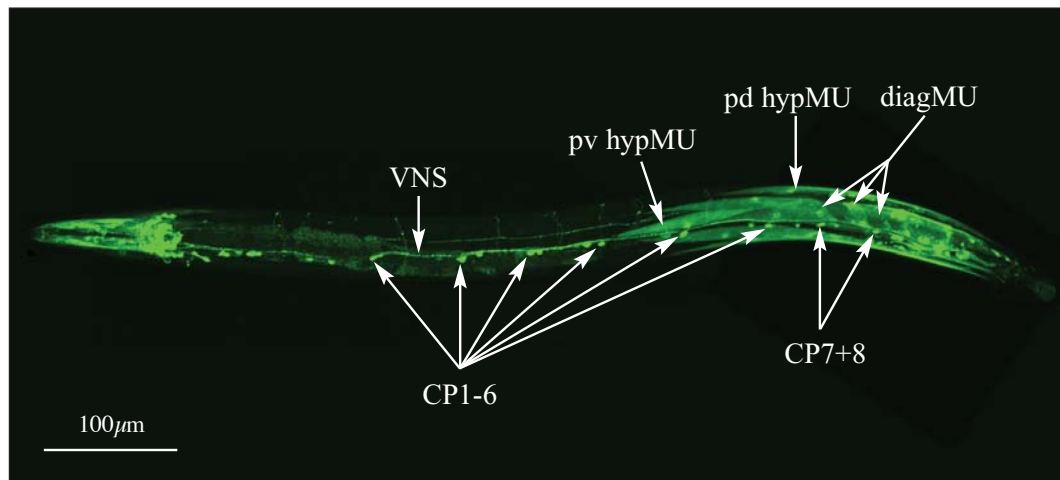


Abbildung 35: Männchen-spezifische Expression (CeTyrR)

Adultes Männchen in Dorso-Ventralansicht („quasi-dorsal“).

Das Expressionsmuster des Tyraminrezeptors bei Männchen weicht von dem bei Hermaphroditen gefundenen Muster etwas ab. So zeigen sie zusätzliche Expression in den posterioren dorsalen und ventralen Hypodermalmuskeln (pd hypMU, pv hypMU) sowie in den männchenspezifischen diagonalen Muskeln (diagMU) und den ebenfalls nur beim Männchen vorkommenden zum Teil (CP1-6) serotonergen CP-Neuronen im ventralen Nervenstrang (VNS). Umgekehrt fehlen dem Männchen die VC-Neuronen, die beim Hermaphroditen den Tyraminrezeptor exprimieren.

Ein Teil der CP-Neuronen sind Motoneuronen (CP4-7), welche die diagonalen Muskeln innervieren, andere sind Interneuronen (CP8/9), den übrigen (CP0-3) konnte noch keine Funktion zugewiesen werden. Die diagonalen Muskeln sind im Rahmen des Paarungsverhaltens von Bedeutung.

Zusammenfassende schematische Darstellung des Expressionsmusters beim Hermaphroditen:

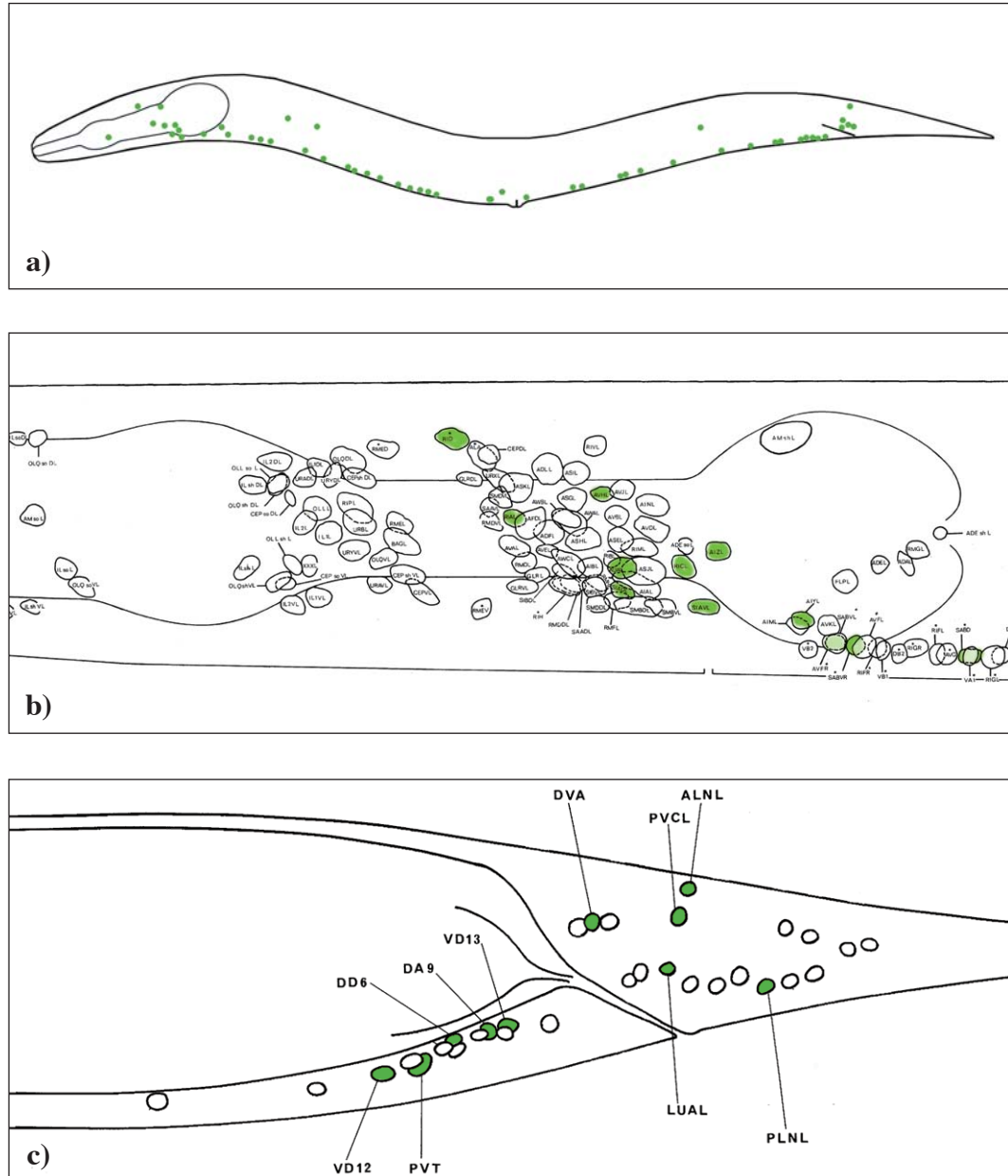


Abbildung 36a): Gesamtansicht (lateral, rechte Körperhälfte), b): anteriore Ganglien (lateral, linke Körperhälfte), c): posteriore Ganglien (lateral, linke Körperhälfte)

Eine tabellarische Zusammenstellung aller identifizierten Zellen ist dem Anhang zu entnehmen.

3.6 TUB-1, das *C. elegans*-Tubby-Homolog

Obwohl die Tubby-Mutante der Maus (*Mus musculus*) bereits 1990 anhand ihres Phänotyps beschrieben wurde (Coleman und Eicher), dauerte es sechs Jahre, bis das dafür zuständige Gen entdeckt wurde (Kleyn et al., 1996). Drei weitere Jahre dauerte es, bis ihm die Funktion eines Transkriptionsfaktors zugeschrieben werden konnte (Boggon et al., 1999). Inzwischen ist bekannt, dass es eine ganze Reihe von homologen Proteinen bei der Maus, beim Menschen, *Drosophila* und anderen Organismen gibt: die Familie der Tubby-ähnlichen Proteine. Trotz der stetig anwachsenden Zahl von Publikationen ist immer noch nicht geklärt, wie es zu dem Tubby-Phänotyp kommt. Zudem rufen nicht alle Knockouts von Tubby-ähnlichen Proteinen einen adipösen Phänotyp hervor. Man konnte jedoch immerhin herausfinden, dass es sich um ein membranassoziiertes Protein handelt, welches durch die Aktivität der PLC β in den Kern transloziert wird (Santagata et al., 2001). Da es nicht selbstverständlich ist, dass all dies auch für das Tubby-Homolog von *C.elegans* gilt, war es notwendig eben jene Eigenschaften nachzuweisen. Mittels der Lipidfärbungen war bereits der Nachweis des adipösen Phänotyps erbracht. Zum Nachweis des Aktivierungsweges wurde nun die codierende Sequenz des *tub-1*-Gens in einen GFP-Fusionsvektor kloniert und heterolog in einer humanen Zelllinie (PEAK) exprimiert, um die subzelluläre Lokalisierung zu untersuchen.

3.6.1 Subzelluläre Lokalisierung von TUB-1

Das Ergebnis dieser heterologen Expression ist in Abbildung 37a) und b) zu sehen. Zunächst war die Fluoreszenz des GFP nur im Zellkern zu beobachten (b). Dies ist auf die Aktivität einer Phospholipase zurückzuführen, denn die Zugabe von U73122, einem spezifischen Phospholipase-Inhibitor, zu den kultivierten Zellen führte dazu, dass das Fusionsprotein aus TUB-1 und dem GFP überwiegend in der Membran verblieb (a).

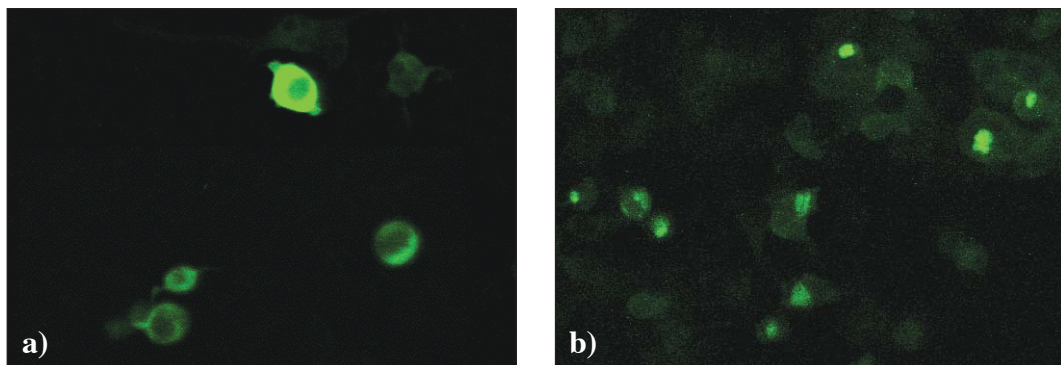


Abbildung 37a), b): Subzelluläre Lokalisierung (TUB-1)

In PEAK-Zellen exprimiertes *tub-1::gfp*-Konstrukt. a) mit PLC-Inhibitor, b) ohne PLC-Inhibitor.

Figure 1. Multiple sequence alignment of TULP domain proteins from various species. The alignment is shown in blocks of 100 residues, with positions 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440, 450, 460, 470, 480, 490, 500, 510, 520, 530, 540, 550, 560, 570, 580, 590, 600, 610, 620, 630, 640, 650, 660, 670, 680, 690, 700, 710, 720, 730, 740, 750, 760, 770, 780, 790, 800, 810, 820, 830, 840, 850, 860, 870, 880, 890, 900, 910, 920, 930, 940, 950, 960, 970, 980, 990, 1000, 1010, 1020, 1030, 1040, 1050, 1060, 1070, 1080, 1090, 1100, 1110, 1120, 1130, 1140, 1150, 1160, 1170, 1180, 1190, 1200, 1210, 1220, 1230, 1240, 1250, 1260, 1270, 1280, 1290, 1300, 1310, 1320, 1330, 1340, 1350, 1360, 1370, 1380, 1390, 1400, 1410, 1420, 1430, 1440, 1450, 1460, 1470, 1480, 1490, 1500, 1510, 1520, 1530, 1540, 1550, 1560, 1570, 1580, 1590, 1600, 1610, 1620, 1630, 1640, 1650, 1660, 1670, 1680, 1690, 1700, 1710, 1720, 1730, 1740, 1750, 1760, 1770, 1780, 1790, 1800, 1810, 1820, 1830, 1840, 1850, 1860, 1870, 1880, 1890, 1900, 1910, 1920, 1930, 1940, 1950, 1960, 1970, 1980, 1990, 2000, 2010, 2020, 2030, 2040, 2050, 2060, 2070, 2080, 2090, 2100, 2110, 2120, 2130, 2140, 2150, 2160, 2170, 2180, 2190, 2200, 2210, 2220, 2230, 2240, 2250, 2260, 2270, 2280, 2290, 2300, 2310, 2320, 2330, 2340, 2350, 2360, 2370, 2380, 2390, 2400, 2410, 2420, 2430, 2440, 2450, 2460, 2470, 2480, 2490, 2500, 2510, 2520, 2530, 2540, 2550, 2560, 2570, 2580, 2590, 2600, 2610, 2620, 2630, 2640, 2650, 2660, 2670, 2680, 2690, 2700, 2710, 2720, 2730, 2740, 2750, 2760, 2770, 2780, 2790, 2800, 2810, 2820, 2830, 2840, 2850, 2860, 2870, 2880, 2890, 2900, 2910, 2920, 2930, 2940, 2950, 2960, 2970, 2980, 2990, 3000, 3010, 3020, 3030, 3040, 3050, 3060, 3070, 3080, 3090, 3100, 3110, 3120, 3130, 3140, 3150, 3160, 3170, 3180, 3190, 3200, 3210, 3220, 3230, 3240, 3250, 3260, 3270, 3280, 3290, 3300, 3310, 3320, 3330, 3340, 3350, 3360, 3370, 3380, 3390, 3400, 3410, 3420, 3430, 3440, 3450, 3460, 3470, 3480, 3490, 3500, 3510, 3520, 3530, 3540, 3550, 3560, 3570, 3580, 3590, 3600, 3610, 3620, 3630, 3640, 3650, 3660, 3670, 3680, 3690, 3700, 3710, 3720, 3730, 3740, 3750, 3760, 3770, 3780, 3790, 3800, 3810, 3820, 3830, 3840, 3850, 3860, 3870, 3880, 3890, 3900, 3910, 3920, 3930, 3940, 3950, 3960, 3970, 3980, 3990, 4000, 4010, 4020, 4030, 4040, 4050, 4060, 4070, 4080, 4090, 4100, 4110, 4120, 4130, 4140, 4150, 4160, 4170, 4180, 4190, 4200, 4210, 4220, 4230, 4240, 4250, 4260, 4270, 4280, 4290, 4300, 4310, 4320, 4330, 4340, 4350, 4360, 4370, 4380, 4390, 4400, 4410, 4420, 4430, 4440, 4450, 4460, 4470, 4480, 4490, 4500, 4510, 4520, 4530, 4540, 4550, 4560, 4570, 4580, 4590, 4600, 4610, 4620, 4630, 4640, 4650, 4660, 4670, 4680, 4690, 4700, 4710, 4720, 4730, 4740, 4750, 4760, 4770, 4780, 4790, 4800, 4810, 4820, 4830, 4840, 4850, 4860, 4870, 4880, 4890, 4900, 4910, 4920, 4930, 4940, 4950, 4960, 4970, 4980, 4990, 5000, 5010, 5020, 5030, 5040, 5050, 5060, 5070, 5080, 5090, 5100, 5110, 5120, 5130, 5140, 5150, 5160, 5170, 5180, 5190, 5200, 5210, 5220, 5230, 5240, 5250, 5260, 5270, 5280, 5290, 5300, 5310, 5320, 5330, 5340, 5350, 5360, 5370, 5380, 5390, 5400, 5410, 5420, 5430, 5440, 5450, 5460, 5470, 5480, 5490, 5500, 5510, 5520, 5530, 5540, 5550, 5560, 5570, 5580, 5590, 5600, 5610, 5620, 5630, 5640, 5650, 5660, 5670, 5680, 5690, 5700, 5710, 5720, 5730, 5740, 5750, 5760, 5770, 5780, 5790, 5800, 5810, 5820, 5830, 5840, 5850, 5860, 5870, 5880, 5890, 5900, 5910, 5920, 5930, 5940, 5950, 5960, 5970, 5980, 5990, 6000, 6010, 6020, 6030, 6040, 6050, 6060, 6070, 6080, 6090, 6100, 6110, 6120, 6130, 6140, 6150, 6160, 6170, 6180, 6190, 6200, 6210, 6220, 6230, 6240, 6250, 6260, 6270, 6280, 6290, 6300, 6310, 6320, 6330, 6340, 6350, 6360, 6370, 6380, 6390, 6400, 6410, 6420, 6430, 6440, 6450, 6460, 6470, 6480, 6490, 6500, 6510, 6520, 6530, 6540, 6550, 6560, 6570, 6580, 6590, 6600, 6610, 6620, 6630, 6640, 6650, 6660, 6670, 6680, 6690, 6700, 6710, 6720, 6730, 6740, 6750, 6760, 6770, 6780, 6790, 6800, 6810, 6820, 6830, 6840, 6850, 6860, 6870, 6880, 6890, 6900, 6910, 6920, 6930, 6940, 6950,

Abbildung 38: Aminosäure-Sequenzvergleich von Tubby-ähnlichen Proteinen

Vergleich der Primärstruktur von neun Proteinen der Tubby-Familie. Farblich hervorgehoben sind besonders hoch konservierte Teile der Sequenz. Auffällig ist die Häufung der Übereinstimmungen am C-Terminus. Die umrahmte Sequenz dient mit hoher Wahrscheinlichkeit als Kernlokalisierungssignal.

3.6.3 Zelluläre Lokalisierung von TUB-1

Um herauszufinden welche Zellen den Transkriptionsfaktor TUB-1 exprimieren, wurden durch die Injektion eines GFP-Reporterkonstrukts in die Gonaden von Hermaphroditen transgene Tiere hergestellt. Die Abbildungen 39 bis 44 zeigen das Expressionsmuster des *tub-1*-Promotor::*gfp*-Reporterkonstruktes.

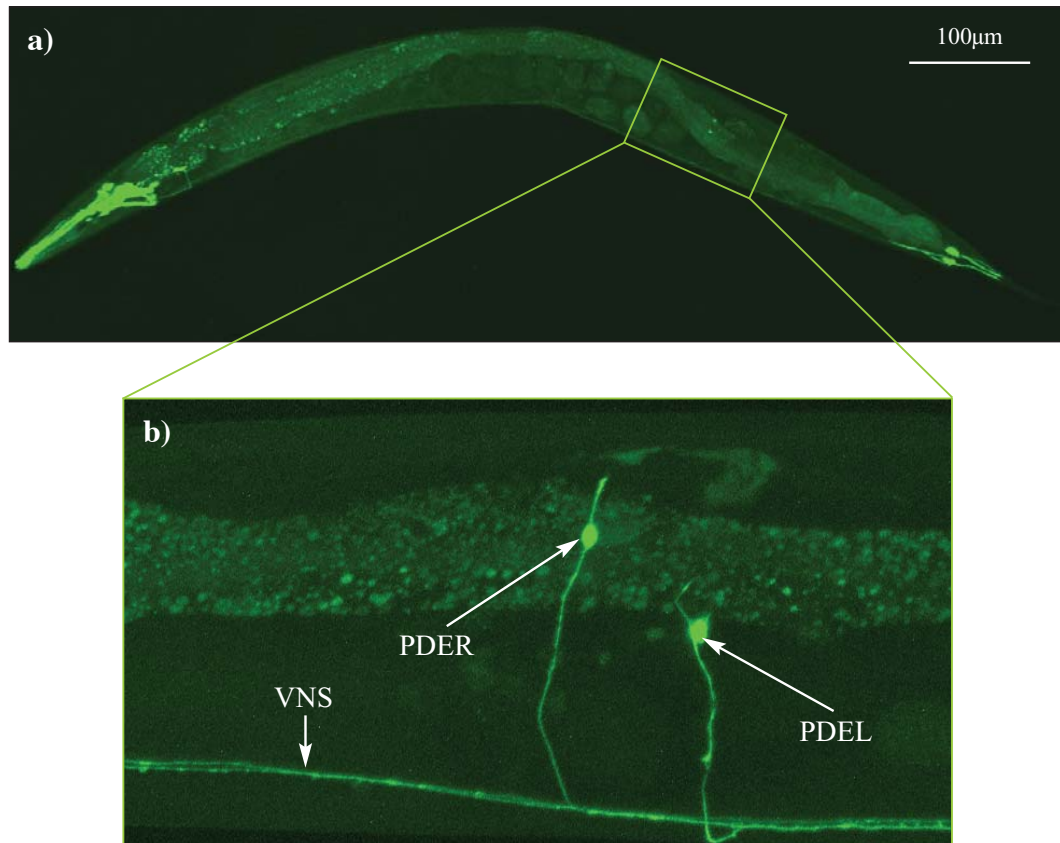


Abbildung 39a): Gesamtansicht, b): Detailansicht (PDE-Neuronen)

Adulter Hermaphrodit in Lateralansicht. Es wird die ausschließlich neuronale Expression deutlich. PDEL und PDER, die posterioren Deirid-Neuronen, laterale sensorische Neuronen, exprimieren TUB-1.

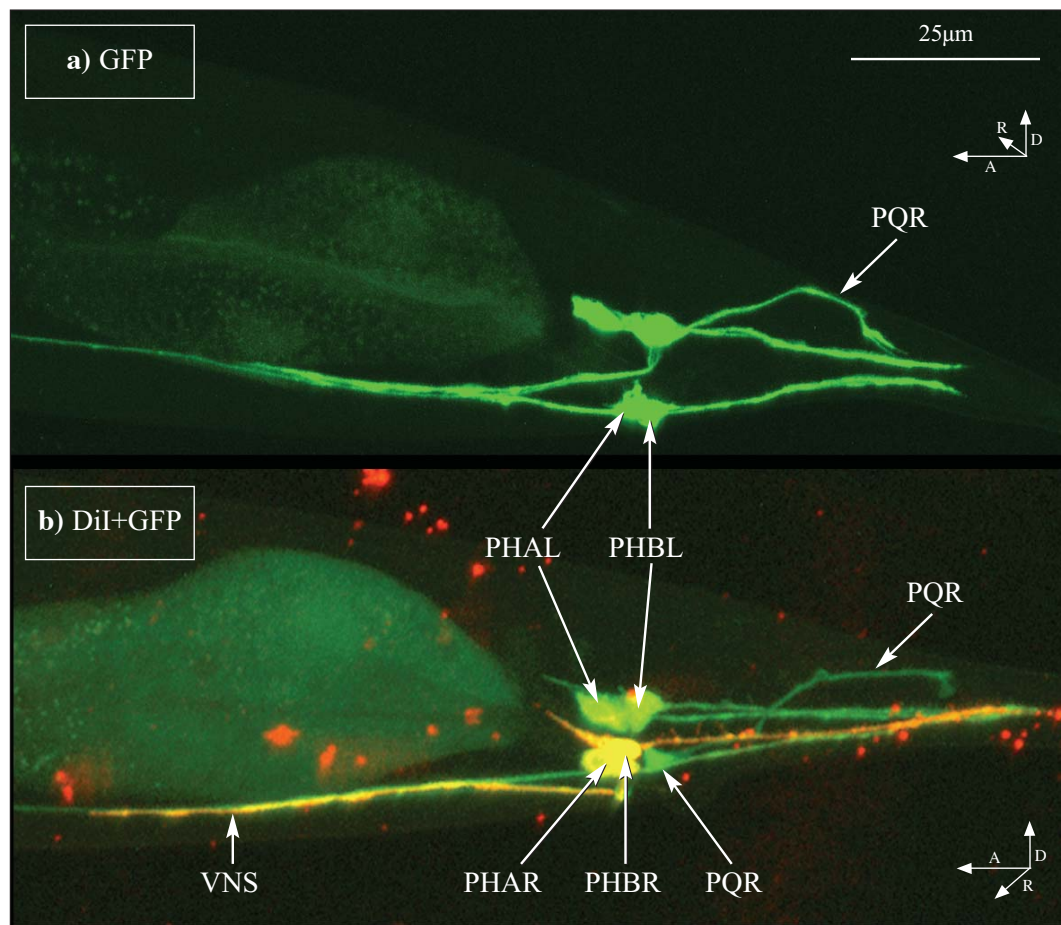


Abbildung 40 a), b): Expression in den Lumbarganglien (TUB-1)

Zwei adulte Hermaphroditen in lateraler Ansicht.

a) Leicht nach ventral verdrehte Lateralansicht. Die sensorischen Phasmidneurone PHAL/R PHBL/R und das ebenfalls sensorische unpaare Neuron PQR exprimieren *tub-1*.

b) Leicht nach dorsal verdrehte Lateralansicht. DiI-Färbung von PHAR und PHBR bei einem anderen Tier; die homologen Partner auf der linken Seite PHAL und PHBL wurden zufällig nicht gefärbt. PHAR und PHBR erscheinen hier gelb, da sich die rote Farbe des DiI mit dem Grün des GFP überlagert. Das Soma des unpaaren sensorischen Neurons PQR wird durch die DiI-Färbung der Phasmidneurone isoliert und ist dadurch einfacher zu erkennen.

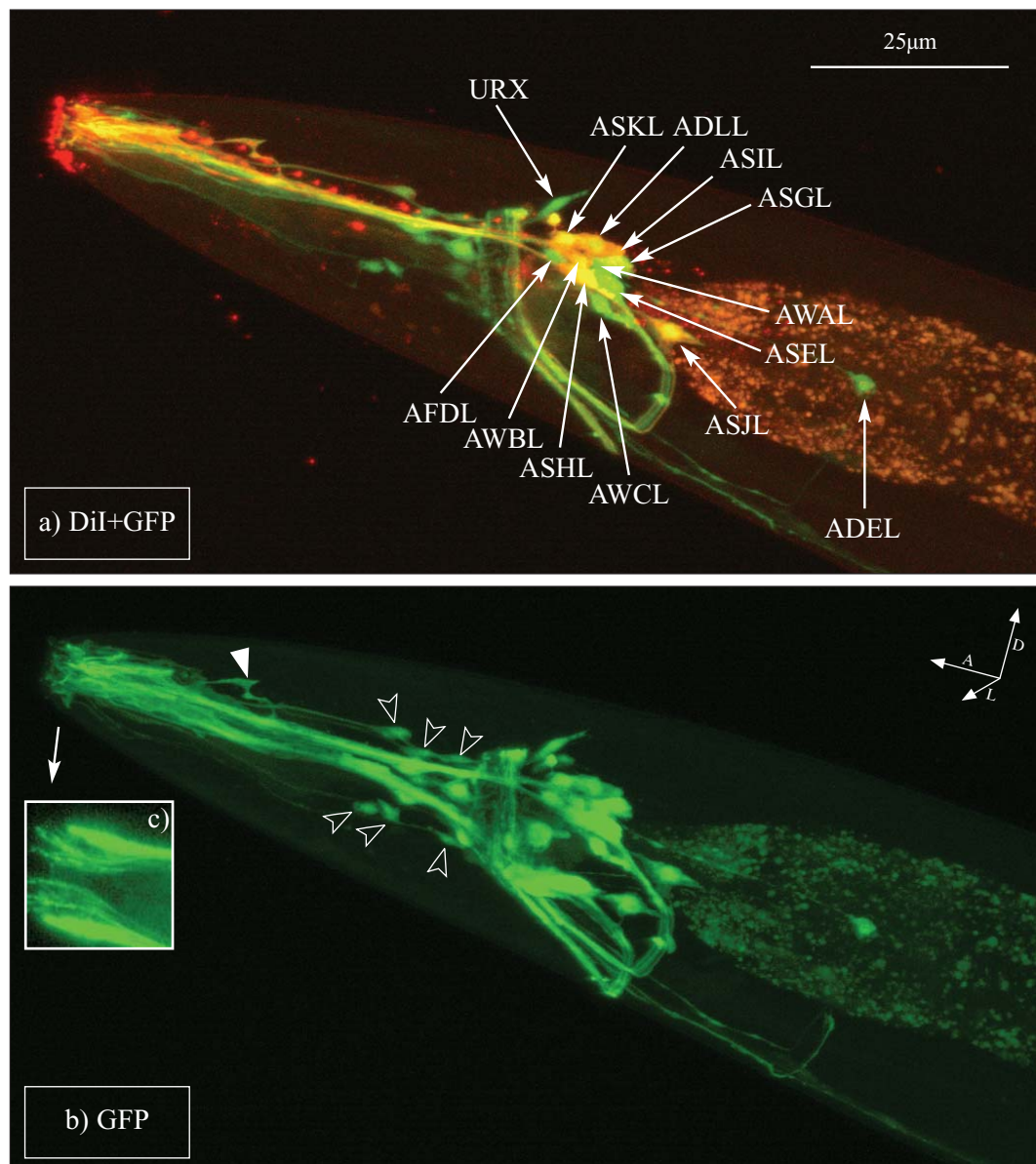


Abbildung 41a), b), c): Expression in den anterioren Ganglien (TUB-1)

Das Kopfende einer L4-Larve in Lateralansicht. In a) ist aus Gründen der Übersichtlichkeit nur die linke Körperhälfte des Tieres dargestellt. Die sensorischen Neuronen ASK, ADL, ASI, AWB, ASH und ASJ (gelb, da sie GFP und DiI enthalten) sowie AFD, AWA, AWC, ASG, URX und ASE exprimieren *tub-1*. Auch die anterioren Deirid-Neuronen (ADE) exprimieren den Transkriptionsfaktor. b) Weiter anterior, zwischen Nervenring und anteriorem Bulbus gelegen, zeigen insgesamt 16 ebenfalls sensorische Neuronen *tub-1*-Expression; sechs davon sind durch transparente Pfeilspitzen gekennzeichnet. Vermutlich handelt es sich dabei um die inneren Labialneuronen IL1 und IL2, von denen es jeweils sechs Exemplare gibt, und die vier OLQ-Neuronen, welche die äußeren Labialsensillen innervieren. Die OLQ-Neuronen besitzen charakteristische verbreiterte und abgeflachte terminale Differenzierungen ihrer Neuriten; eine davon ist mit einer opaken Pfeilspitze markiert.

c) Die Endigungen aller oben genannten sensorischen Neurone (bis auf ADE) in den verschiedenen Sensillen des Kopfes sind in dorso-ventraler Ansicht gut zu erkennen.

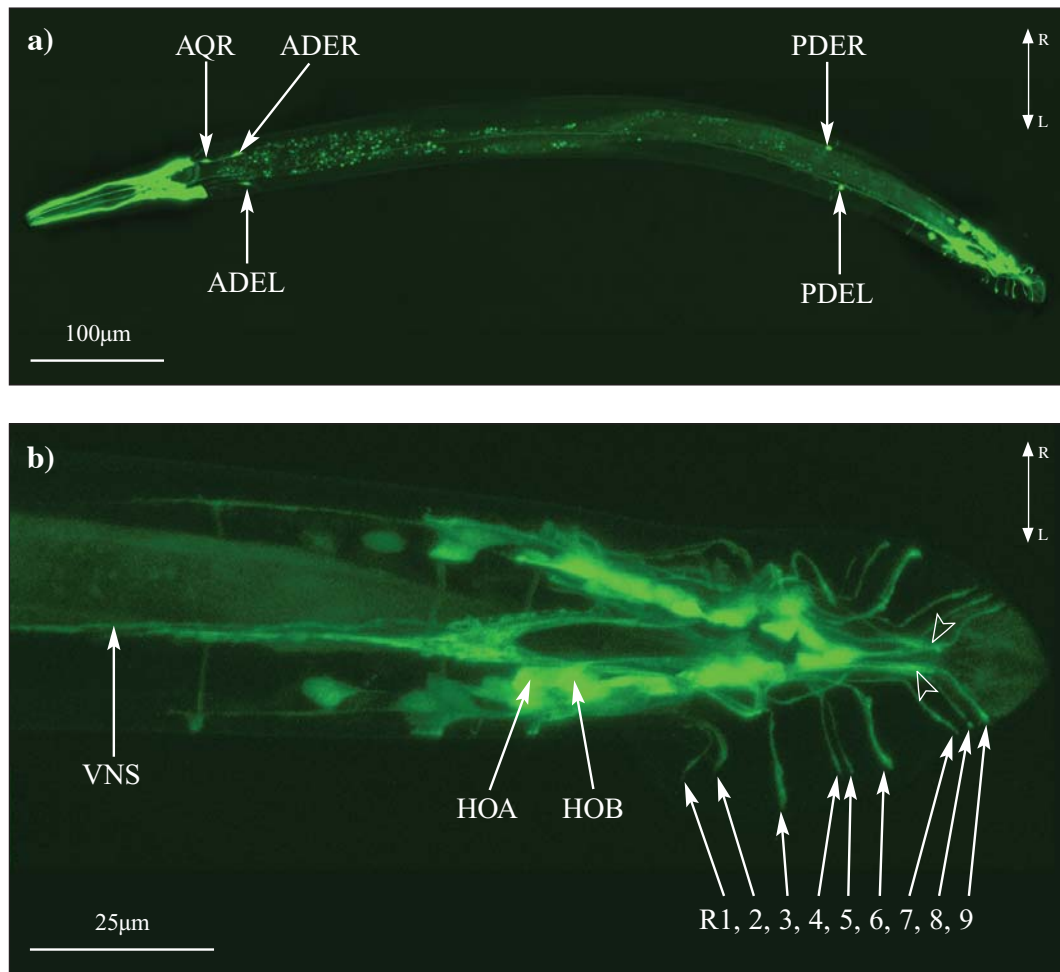


Abbildung 42a), b): Männchen-spezifische Expression (TUB-1)

Dorso-Ventralansicht (,quasi-dorsal').

a) Das Männchen zeigt Expression in dem gleichen Set von sensorischen Neuronen, das schon beim Hermaphroditen vorgefunden wurde.

b) Darüber hinaus ist in den posterioren Ganglien Expression von *tub-1* in weiteren, für das Männchen spezifischen, sensorischen Neuronen zu beobachten. Neben den fünf Neuronen, die auch beim Hermaphroditen vorkommen, PHAL/R, PHBL/R – deren Neuriten an ihrer Mündung in die Phasmidsensillen durch transparente Pfeilspitzen gekennzeichnet sind – und PQR, sind es insgesamt 24 Neuronen. Davon innervieren 18 die sensorischen Kaudalpapillen (R1-9L/R), vier die Spicula (SPDL/R und SPVL/R, siehe Abb. 43) und zwei das Hakensensillum (HOA und HOB). Die Kaudalpapillen dienen der Abtastung des Hermaphroditen während der Paarung. Jedes Papillum wird von zwei Neuronenklassen innerviert (RA und RB). Welche von diesen *tub-1* exprimiert, kann nicht mit Sicherheit gesagt werden. Das Hakensensillum und die sensorischen Neuronen der Spicula dienen der Ertastung der Vulva.

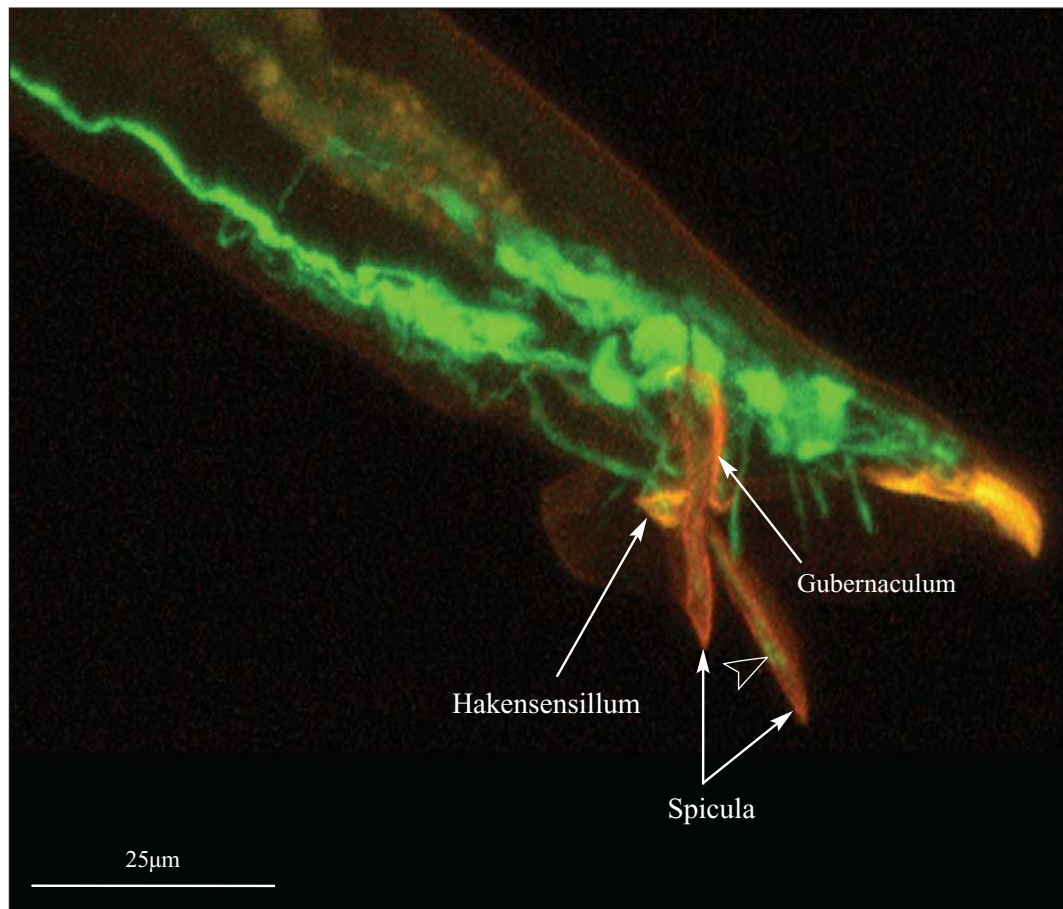


Abbildung 43: Weitere Männchen-spezifische Expression (TUB-1)

Lateralansicht. Die sensorischen Neuronen SPD und SPV (transparente Pfeilspitze) innervieren die Spicula, welche über ihre Autofluoreszenz sichtbar gemacht sind (rot). Die unpaaren sensorischen Neuronen HOA und HOB innervieren das Hakensensillum.

Zusammenfassende schematische Darstellung des Expressionsmusters beim Hermaphroditen:

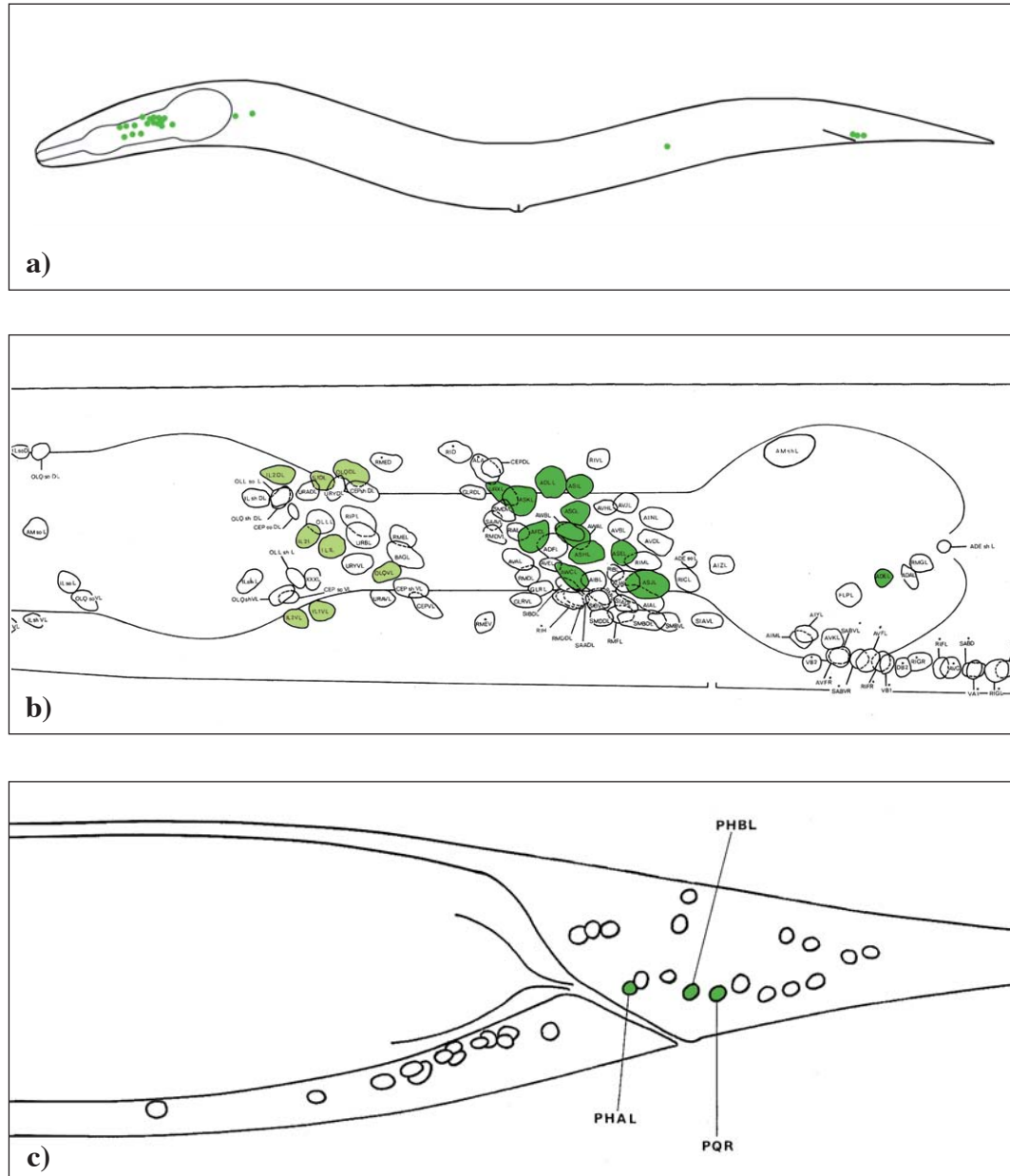


Abbildung 44a): Gesamtansicht (lateral), b): anteriore Ganglien (lateral, linke Körperhälfte), c): posteriore Ganglien (lateral, linke Körperhälfte)

Zellen, bei denen Unsicherheit bezüglich ihrer Identität besteht, sind im Halbtönen dargestellt.

a)

b)

c)

Aus diesen Abbildungen geht hervor, dass die Expression in den identifizierten Zellen nicht überlappend ist.

4. Diskussion

4.1 Regulierung von Verhalten und Metabolismus durch Tyramin und Octopamin

Octopamin und Tyramin gelten bezüglich ihrer physiologischen Rolle als die Invertebratenanaloge von Adrenalin und Noradrenalin. Die Wirkungen von Octopamin bei Invertebraten weisen, wie eingangs schon beschrieben, erstaunlich viele Parallelen zu den Wirkungen des Adrenalsystems der Vertebraten auf. Das Wissen über die Wirkungen von Tyramin ist allerdings, verglichen mit der breiten Palette an Publikationen über die des Octopamins, sehr spärlich. Das liegt einerseits daran, dass es – als Vorstufe bei der Synthese des Octopamins – quasi ein Schattendasein führt. Andererseits ist es auf die geringe Anzahl bekannter Tyraminrezeptoren und den limitierten Erkenntnissen über deren Funktionsweise zurückzuführen. Bekannt ist, dass Octopaminsignale generell durch Stresssituationen ausgelöst werden und aktivitätssteigernde Wirkungen ausüben. Gleichzeitig sorgen diese Signale auf metabolischer Ebene dafür, dass der durch die hohe Aktivität gesteigerte Bedarf an Energie bereitgestellt wird. Dieselben stressauslösenden ungünstigen Umweltbedingungen (vor allem Nahrungsmangel) lassen auch die hemmende Wirkung von Octopamin auf die Eiablage (Lange und Orchard, 1986; Horvitz et al., 1982) sinnvoll erscheinen, denn der Nachwuchs braucht schließlich eine Ernährungsgrundlage. Die Steigerung der Lokomotionsaktivität durch Octopamin dient folglich dem Erreichen neuer Nahrungsquellen. Wie bei Noradrenalin und Adrenalin im Adrenalsystem der Vertebraten sind die Wirkungen von Tyramin und Octopamin bei Invertebraten in vielerlei Hinsicht offenbar synergistisch und in qualitativer Hinsicht kaum zu unterscheiden. Dementsprechend bewirkte der Knockdown des Tyraminrezeptors bei *C. elegans* das Ausbleiben der inhibierenden Wirkung von Octopamin auf die Eiablage. Auch die herabgesetzte lokomotorische Aktivität und die Anhäufung von Speicherlipiden ist auf das Fehlen eines Effektors für Octopamin und Tyramin zurückzuführen. Die gehemmte Defäkation steht genauso damit in Zusammenhang und ist eine weitere Analogie zu der Wirkung von Adrenalin und Noradrenalin, in diesem Fall die Wirkung auf die viszerale glatte Muskulatur der Vertebraten.

4.2 Der Phänotyp des Tyraminrezeptor-Knockdowns in den verschiedenen Kontexten

Wie bereits 1982 von Horvitz und anderen beschrieben, wirkt sich die externe Applikation von Octopamin hemmend auf das Eiablageverhalten von *C. elegans* aus. Die in Kap. 3.2 abgebildeten Versuchsergebnisse zeigen, dass diese Hemmung in gleichem Maße durch die Applikation von Tyramin erreicht wird. Die Hemmung der Eiablage durch Octopamin entfällt bei Würmern, denen der Tyraminrezeptor fehlt. Nach den *in vitro* Radioligandenassays von Witte (2000; reproduziert durch Rex und Komuniecki, 2002), war dies eine *in vivo* Bestätigung dafür, dass es sich bei dem untersuchten Rezeptor um den Tyraminrezeptor von *C. elegans* handelt, der diese bekannte Wirkung von Octopamin vermittelt.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Octopamin eine stimulierende Wirkung bezüglich der Defäkation hat. Der Tyraminrezeptor-Knockdown bewirkte eine ungefähre Verdopplung der Zeit zwischen zwei Expulsionen. Diese Verdopplung der Zyklusdauer liegt nicht darin begründet, dass der Tyraminrezeptor Einfluss auf die Darmzellen ausübt, welche den Rhythmus generieren. Was aus der bloßen Zeitmessung nicht hervorgeht, ist die Tatsache, dass nur ein Teil des Defäkationsmotorprogramms (DMP) gestört ist, nämlich die Kontraktion der anterioren Muskulatur (*aBoc*) und die darauf folgende Kontraktion der (glatten) enterischen Muskulatur (EMC), die zur Expulsion des Darminhalts führt. Der erste Schritt des DMPs jedoch, die Kontraktion der posterioren Muskulatur, läuft auch bei Tieren mit Tyraminrezeptor-Knockdown in der gleichen Regelmäßigkeit wie beim Wildtyp ab. Dadurch, dass die Expulsion nur in etwa jedem zweiten Zyklus ausbleibt, ergibt sich bei der Zeitmessung, die ja nur die Expulsion erfasst, die doppelte Zyklusdauer gegenüber dem Wildtyp.

Im Rahmen dieser Arbeit hat sich herausgestellt, dass die externe Applikation von Octopamin die aus der Literatur bekannte Verlangsamungsreaktion von *C. elegans* beim Antreffen eines Bakterienrasens aufhebt. Damit war der Rahmen für die weitere Untersuchung octopaminerner/tyraminerger Signale bei *C. elegans* geschaffen. Die mit RNAi-Technik herabgesetzte Expression des Tyraminrezeptors machte die Tiere unempfindlich gegenüber der Wirkung des Octopamins. Ihre Lokomotionsaktivität befand sich mit und ohne Octopamin stets auf dem Niveau der '*enhanced slowing response*'. Der Tyraminrezeptor-Knockdown stellt in diesem Zusammenhang, wie auch bei der Eiablage und dem Defäkationsverhalten, eine Phänokopie der Octopamin- und Tyramin-defizienten *che-3*-Mutanten und der mit Yohimbin behandelten Würmer dar.

Eine weitere Entdeckung war die Anhäufung von tropfenförmigen Einschlüssen in den intestinalen Zellen und im Pseudocoel der Tiere mit fehlendem Tyraminrezeptor. Durch die Färbung mit spezifischen lipidsensitiven Farbstoffen konnte die Vermutung bestätigt werden, dass es sich bei diesen tatsächlich um Speicherlipide handelt. Zum Vergleich wurde eine Mutante herangezogen, die bereits für diesen Phänotyp bekannt war.

4.3 Die Signaltransduktion des Tyraminrezeptors

Für das Verständnis der Wirkungsweise von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren ist es essenziell Informationen über die Identität der Proteine zu sammeln, mit deren Hilfe die jeweiligen Signale transduziert werden. Zum Standard der dabei eingesetzten Methoden zählt die heterologe Expression in einem Zellkultursystem. Da bisher keine Zellkultur von *C. elegans* für diese Zwecke etabliert werden konnte und die Expression in humanen oder anderen Zelllinien aufgrund der phylogenetischen Distanz in diesem Zusammenhang nur bedingt Rückschlüsse erlaubt, ist es erforderlich eine andere Herangehensweise zu wählen. Ein simpler und sehr erfolgreich betriebener Ansatz beruht auf dem Vergleich der Phänotypen von Mutantenstämmen in streng definiertem Kontext. Auf diese Weise haben sich in den letzten 30 Jahren zahllose Interaktionen belegen lassen. Die in diesem Rahmen erzeugten Mutantenstämme bilden einen enormen Fundus, auf den jederzeit zurückgegriffen werden kann (siehe Kap. 2.5.3).

Für die Charakterisierung des Tyraminrezeptors boten sich zwei Verhaltenskontexte an, ein weiterer zeigte sich bei der Analyse des Phänotyps von Tyraminrezeptor-defizienten Würmern.

Die Verfügbarkeit von Mutanten mit Defekten entweder auf präsynaptischer oder postsynaptischer Seite des Tyramin/Octopamin-Signalsystems barg die Möglichkeit in voneinander unabhängigen Experimenten Vergleiche anzustellen.

Für die Charakterisierung der Signalkaskade des Tyraminrezeptors wurden die jeweiligen Mutanten bezüglich ihres Phänotyps und dessen pharmakologischer Beeinflussbarkeit bei der Defäkation und Lokomotion untersucht.

G-Protein α -Untereinheiten

Die Kopplung von heterotrimeren G-Proteinen an unterschiedliche metabotrope Rezeptoren wird durch die Identität ihrer α -Untereinheiten festgelegt. Das Genom von *C. elegans* enthält vier verschiedene Gene für Orthologe der vier ‚klassischen‘ α -Untereinheiten der Mammalia ($G_{i/o}$, G_q , G_s und G_{12}) mit breiter Expression im Nervensystem (Jansen et al., 1999).

Kapitel 3.3.1 zeigt die Ergebnisse der Verhaltensversuche mit den entsprechenden Mutanten (*goa-1*, *gqa-1*, *gsa-1* und *gpa-12*). Aus diesen ist abzuleiten, dass der Tyraminrezeptor an die $G_{\alpha q}$ -Untereinheit gekoppelt ist. Die *gqa-1*-Mutanten zeigten ein mit dem Tyraminrezeptor-Knockdown identischen Phänotyp, der nicht durch Octopamin zu beeinflussen war. Die Akkumulation von Lipiden in den Darmzellen und im Pseudocoel der *gqa-1*-Mutanten zeigt, dass die Kopplung auch hinsichtlich der metabolischen Veränderungen von Bedeutung ist (Kap. 3.4). Die Defekt-Mutanten der anderen α -Untereinheiten zeigten bezüglich ihres Lokomotions- oder Defäkationsverhaltens entweder einen WT-Phänotyp (*gsa-1* und *gpa-12*) oder einen gegensätzlichen Phänotyp, der durch das Blockieren des Tyraminrezeptors zu beeinflussen war (Abb. 20, S. 52 und Abb. 22, S. 54).

Weitere Effektoren

Weiter stromabwärts in der Signalkaskade ist die PhospholipaseC β ein wirkungsvoller Effektor des Tyraminrezeptors, da durch ihre Aktivierung eine Reihe weiterer Signaltransduktionsprozesse hervorgerufen werden. Auch der Phänotyp des PLC β -Knockouts (*egl-8*) entsprach bezüglich der Defäkation und Lokomotion dem des Tyraminrezeptor-Knockdowns und war durch Octopamin nicht beeinflussbar.

Diese Beobachtung fügt sich passend in das Bild ein, das aus den bisherigen Erkenntnissen über die antagonistischen Wirkungen von Octopamin und Serotonin hervorgeht. Obwohl die zugehörigen G-protein-gekoppelten Serotoninrezeptoren noch nicht identifiziert worden sind, hat sich durch zahlreiche Untersuchungen herausgestellt, dass Serotoninsignale über die $G_{\alpha o}$ -Untereinheit vermittelt werden (Segalat et al., 1995) und über eine Reihe von RGS-Proteinen die $G_{\alpha q}$ -vermittelte Aktivierung der PLC β inhibieren (Hajdu-Cronin et al., 1999; Dong et al., 2000). Die Tatsache, dass *egl-8*-Mutanten den gleichen adipösen Phänotyp aufweisen wie die anderen in der Vermittlung von Tyramin-/Octopamin-Signalen gestörten Würmer (durch Yohimbin-Behandlung, OA/TA-Defizienz (*che-3*), TyrR-Knockdown oder $G_{\alpha q}$ -Defekt) unterstreicht dies zusätzlich.

Die Auswirkungen der PLC β -Aktivität sind vielfältig. Eine davon ist die Aktivierung der Inositidkaskade durch Katalyse der Spaltung von PiP_2 (Phosphatidyl-Inositol-bisphosphat) in die *Second Messenger* IP_3 (Inositol 1,4,5-trisphosphat) und DAG (Diacylglycerol). Die Wirkungen des IP_3 wiederum werden normalerweise durch entsprechende IP_3 -Rezeptoren vermittelt.

Das Genom von *C.elegans* enthält nach dem derzeitigen Kenntnisstand nur ein Gen für einen IP₃-Rezeptor (*itr-1*), welches nur eine begrenzte neuronale Expression zeigt. Diese Tatsache spiegelt sich in einem WT-ähnlichen Phänotyp der *itr-1*-Mutanten hinsichtlich ihres Lokomotionsverhaltens wieder, bei dem die normalerweise durch IP₃-Rezeptoren vermittelte Freisetzung von Ca²⁺ aus dem endoplasmatischen Retikulum keine Rolle zu spielen scheint.

Bei der Defäkation jedoch kommt dem IP₃-Rezeptor grosse Bedeutung zu. Die entsprechenden Defekt-Mutanten haben kein auf Muskelkontraktionen zurückzuführendes Defäkationsverhalten. Ihre (passive) Defäkation ist vollkommen arhythmisch, da durch das Fehlen von ITR-1 der ‚Rhythmusgenerator‘ in den Darmzellen ausfällt, weshalb für *itr-1* in diesem Zusammenhang auch keine Messwerte in die Auswertung aufgenommen wurden. Da der Tyraminrezeptor-Knockdown einen normalen Rhythmus aufweist und nur in Teilen des DMP gestört ist, kann man davon ausgehen, dass auch hier kein Zusammenhang zwischen den beiden Proteinen besteht, zumal der Tyraminrezeptor in den Epithelzellen des Darms nicht exprimiert wird.

Der zweite durch die PLC β aktivierte Effektor, das Diacylglycerin, sorgt durch seine Bindung an UNC-13 für die Fusion von Vesikeln mit der Zellmembran (Richmond et al., 1999; Lackner et al., 1999).

Ein Protein mit ähnlicher Funktion wie UNC-13 ist UNC-31, das *C. elegans*-Ortholog von CAPS, dem Calcium-abhängigen Protein zur Aktivierung der Sekretion. Während UNC-13 klare synaptische Vesikel zur Fusion bringt, ist UNC-31 für die Fusion von *dense core*-Vesikeln notwendig (Ann et al., 1997). Beide Mutanten wurden bereits 1974 von Sydney Brenner beschrieben. Sie zeigten sowohl bei der Defäkation als auch bei der Lokomotion den Phänotyp, der einem Fehlen von TA-/OA-Signalen entspricht, und waren gegenüber der Behandlung mit Octopamin resistent. Beide scheinen also eine Rolle bei der Übermittlung der Signale des Tyraminrezeptors zu spielen.

Sowohl UNC-13 als auch UNC-31 führen ihre Funktion nur in Anwesenheit von Calciumionen aus. Da der IP₃-Rezeptor offensichtlich im Nervensystem von *C. elegans* nur eine untergeordnete Rolle spielt, ist also derzeit davon auszugehen, dass die Ca²⁺-Ionen überwiegend aus dem extrazellulären Raum stammen und über den ‚klassischen‘ Weg, also durch Aktivierung von spannungsabhängigen Calciumkanälen infolge einer Depolarisation der Zellmembran, in die Zelle gelangen. Ob von der Inositidkaskade noch weitere Signale ausgehen, welche die Calciumkanäle beeinflussen, kann zum derzeitigen Zeitpunkt nicht gesagt werden. Die Existenz weiterer IP₃-Rezeptoren ist zwar unwahrscheinlich, sofern man von einer Sequenzhomologie ausgeht, aber nicht unmöglich, da nicht auszuschließen ist, dass noch weitere IP₃-Rezeptormoleküle mit einer unterschiedlichen Struktur gefunden werden.

Der Transkriptionsfaktor Tubby wird ebenfalls durch die Aktivität von Phospholipasen aktiviert (Santagata et al., 2001). Seiner Funktion entsprechend ist der Phänotyp von Defekt-Mutanten des Transkriptionsfaktors TUB-1 bezüglich des Verhaltens identisch mit dem des Wildtyps. TUB-1 stellt lediglich für die metabolischen Wirkungen des Tyraminrezeptors einen potentiellen Effektor dar, was sich auch in der Akkumulation von Lipiden bei den Mutanten zeigt. Das Expressionsmuster von *tub-1* spricht allerdings weniger für ein intrazelluläres Zusammenwirken mit dem Tyraminrezeptor von *C. elegans* (vgl. Kap. 4.6.4 und 3.7).

Proteinkinasen sind an der Übermittlung von intrazellulären Signalen verschiedenster Art beteiligt. Sie können durch Phosphorylierung von Proteinen deren Aktivität beeinflussen und somit zur Kontrolle der Aktivitäten in der Zelle beitragen. Eine dieser Proteinkinasen wurde anhand einer Defekt-Mutante (*pkc-2*) auf die Beteiligung an der Kaskade des Tyraminrezeptors hin untersucht. Sie zeigte in den Kontexten Lokomotion und Defäkation keinerlei Anzeichen hierfür. Aus all diesen Erkenntnissen lässt sich die Signalkaskade des Tyraminrezeptors in ihren Grundzügen bereits modellieren (siehe Abb. 46).

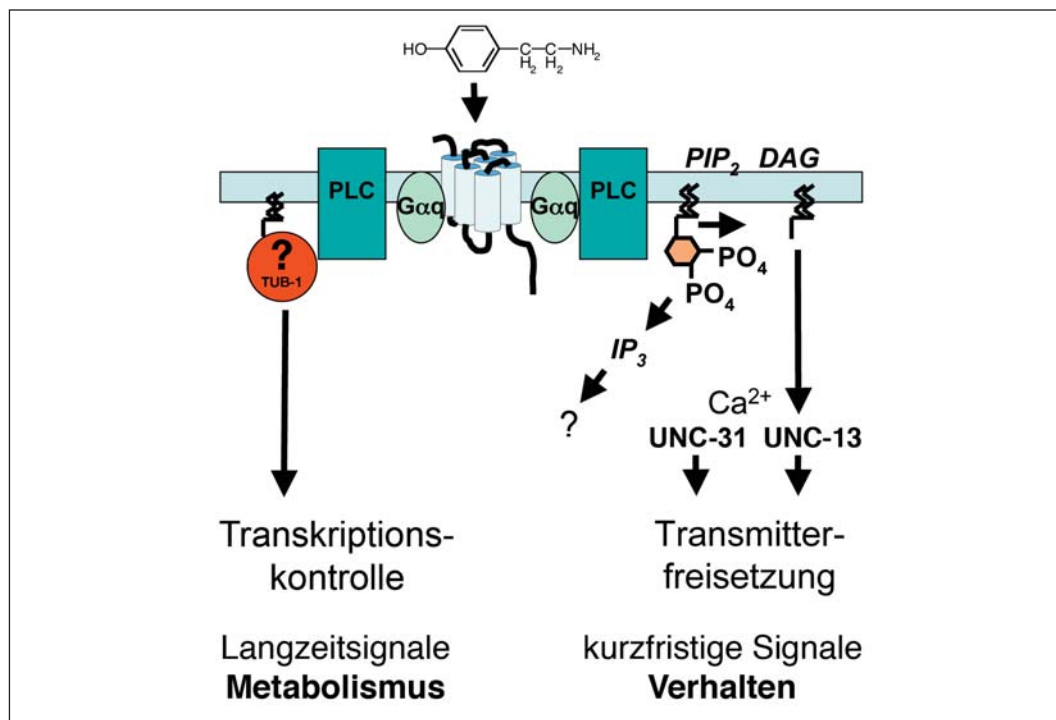


Abbildung 46: Die Signalkaskade des Tyraminrezeptors

4.4 Die zelluläre Lokalisation des Tyraminrezeptors

Die Expression des Tyraminrezeptors konnte beim Hermaphroditen in 69 der 302 neuronalen Zellen sowie in zwei verschiedenen Muskelzelltypen des Pharynx (pm1/6) und in 16 der 32 anterioren Hypodermalmuskeln (der ‚Halsmuskulatur‘) nachgewiesen werden.

Etwa die Hälfte der identifizierten Neuronen sind Interneuronen: AIYL/R, AIZL/R, ALNL/R, AUAL/R, AVHL/R, BDUL/R, DVA, LUAL/R, PLNL/R, PVCL/R, PVT, RIAL/R, RICL/R, SABD, SABVL/R, SIADL/R sowie SIAVL/R und SDQL/R. Bei den meisten anderen handelt es sich um Motoneuronen, welche die Hypodermalmuskulatur innervieren: RID, VD1-13, DD1-6, VC1-6, DA1, 3, 4, 7 und 9 sowie einige der AS-Motoneuronen. Außerdem wird der Rezeptor in drei Pharynxmotoneuronen (M5, NSML/R) und in zwei Neuronen mit vermuteter Streckrezeptorfunktion (PVDL/R) exprimiert.

4.5 Zelluläre Lokalisation von Octopamin und Tyramin bei *C. elegans*

Der breiten Expression des Tyraminrezeptors in mehr als 20% aller Neuronen des Nervensystems von *C. elegans* steht ein nur spärliches Vorkommen an Octopamin und/oder Tyramin produzierenden Zellen gegenüber. Die in Kapitel 3.1 gezeigten Abbildungen des immunhistochemischen Nachweises von Octopamin/Tyramin zeigen acht immunreaktive Zellen beim Hermaphroditen.

Zur genauen Bestimmung der octopaminergen und tyraminergen Zellen eigneten sich die Färbungen allerdings nicht. Jedoch war ein solcher Nachweis bei *C. elegans* bis dato noch nicht erbracht. Die Existenz von Octopamin in *C. elegans* war, wie bereits erwähnt, bisher lediglich durch radioenzymatischen Nachweis in einem Extrakt aus vielen Tieren belegt (Horvitz et al., 1982). Durch Untersuchung des Expressionsmusters der für die Synthese von Octopamin und Tyramin notwendigen Enzyme, der Tyramin-Beta-Hydroxylase und der Tyrosindecaboxylase konnte kürzlich eine noch genauere Angabe zu der zellulären Distribution dieser biogenen Amine bei *C. elegans* gemacht werden (Alkema, pers. Mitteilung). So ist die neuronale Expression der Synthesenzyme auf die beiden Ringinterneuronen RIC und RIM beschränkt. Während RIC beide Enzyme enthält, ist RIM auf die Expression der Tyrosindecaboxylase beschränkt und enthält demnach nur Tyramin und kein Octopamin. Die RIC-Neuronen dürften hingegen sowohl Octopamin als auch Tyramin enthalten. Eines der beiden Neurone dürfte in Abb.15c, Seite 46 Immunreaktivität zeigen. Weitere Vorkommen von Tyramin sind vier der sechs

neuroendokrinen uv-Zellen (uterine-yulval, so genannt, weil sie die Verbindung zwischen Uterus und Vulva herstellen); zwei davon sind möglicherweise in Abb. 15a zu sehen. Sowohl Tyramin als auch Octopamin produzieren die Hüllzellen, welche die Gonadenarme umgeben (Alkema, pers. Mitteilung). Dies bestätigt die Annahme, dass Octopamin und Tyramin bei *C. elegans* sowohl die Funktion eines klassischen Transmitters/Modulators als auch die eines Neurohormones innehaben. Denn da lange nicht alle den Tyraminrezeptor exprimierenden Zellen synaptischen Eingang von RIC oder RIM erhalten, ist zu erwarten, dass Tyramin und/oder Octopamin als Neurohormon(e) fungieren, wie es auch für Serotonin und Dopamin aufgrund derselben Sachlage postuliert wird. Bisher konnten auf elektronenmikroskopischer Ebene jedoch – außer bei den pharyngealen neurosekretorischen NSM-Neuronen (White et al., 1986) – keine Hinweise hierfür bei neuronalen Zellen gefunden werden. Lediglich nichtneuronalen Zellen wie den uv1- und uv2-Zellen (Schinkman and Li, 1992) und den beiden exkretorischen Drüsenzellen (Nelson et al., 1983, Nelson und Riddle, 1984) konnte man diese Funktion zuschreiben. Die uv1- und uv2-Zellen exprimieren die Tyrosin-Decarboxylase aber nicht die Tyrosin-Beta-Hydroxylase, somit ist zumindest für Tyramin die humorale Funktion nicht nur zu postulieren, sondern auch auf der Basis gesicherter Erkenntnisse als wahrscheinlich zu erachten.

Ob neben den NSM-Zellen noch weiteren Neuronen sekretorische Funktionen zugeschrieben werden können bleibt abzuwarten. Erste Hinweise darauf wurden bereits gefunden (Sanyal et al., 2004).

Kontrollierte Freisetzung oder Autostimulation?

Da die RIC-Neuronen sowohl TA/OA als auch den Tyraminrezeptor enthalten, liegt die Schlussfolgerung nahe, dass die Zelle über Autorezeptoren verfügt. Die Autorezeptoren können zweierlei Funktion haben. Entweder die Zelle kontrolliert über einen negativen Rückkopplungsmechanismus die Freisetzung seines/seiner Transmitter(s) – dieser Mechanismus ist unter anderem auch von den Alpha2-adrenergen Rezeptoren bekannt –, oder es kommt zu einer Autostimulation, wie sie von Dopaminrezeptoren bekannt ist. Welches Modell hier realisiert ist, lässt sich nicht ohne weitere Informationen sagen. Die Selbstinhibition wäre nur zu erwarten, wenn RIC postsynaptische Partner mit Octopamin- oder Tyraminrezeptoren hat, was nach dem derzeitigen Wissenstand nicht der Fall ist. Es ist aber nicht auszuschließen, dass es einen Octopamin- oder einen anderen Tyraminrezeptor auf postsynaptischer Seite gibt.

4.6 Verknüpfung von Lokalisation und Funktion

4.6.1 Zellen im Eiablage-Schaltkreis

Der Phänotyp des Tyraminrezeptor-Knockdowns bezüglich des Eiablageverhaltens und die Expression des Tyraminrezeptors in den C-Typ Neuronen des ventralen Nervenstrangs VC1-6 (siehe Abb. 29/30, Seiten 63 und 64) macht die folgende Modellvorstellung, die eine Erweiterung des Modells von Bany, Dong und Koelle (2003) darstellt, plausibel:

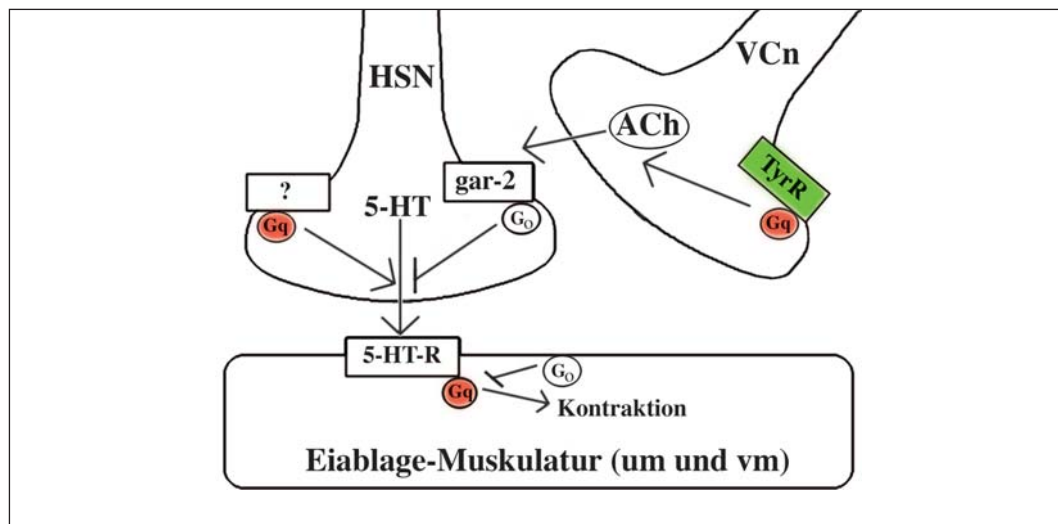


Abbildung 47: Modell für die Hemmung der Eiablage

In den VC-Neuronen fördert der aktivierte Tyraminrezeptor die Freisetzung von Acetylcholin. In den HSN-Zellen bewirkt das Acetylcholin über den G_o-gekoppelten muscarinischen Acetylcholinrezeptor GAR-2 eine Hemmung der Freisetzung von Serotonin. Dadurch bleibt die Kontraktion der für die Eiablage zuständigen Muskulatur aus.

Dieses Modell beseitigt auch den Widerspruch, der sich aus dem gegensätzlichen Phänotyp der gqa-1-Mutanten bezüglich der Eiablage ergab (Brundage et al., 1996). Wie zuvor schon erläutert (siehe Kap. 4.3) ergibt sich als Schlussfolgerung aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit, dass der Tyraminrezeptor seine Wirkung über die Kopplung mit der G-Protein Alpha-Untereinheit G_q entfaltet. Wie in Abbildung 47 skizziert, ist G_q aber – ganz im Gegensatz zum Tyraminrezeptor – in allen an der Eiablage beteiligten Zellen exprimiert (Bastiani et al., 2003) und fehlt somit bei den gqa-1-Mutanten an mehreren Stellen des Motorprogramms. Wie Bastiani und andere herausgefunden haben, ist die fehlende Förderung der Kontraktion in den Muskelzellen des Eiablageapparates für den Phänotyp der gqa-1-Mutanten ausschlaggebend. So kommt es, dass der Phänotyp

des Tyraminrezeptor-Knockdowns, obwohl der Rezeptor Gq-gekoppelt ist, sich durch fehlende (Tyramin-/Octopamin-induzierte) Hemmung auszeichnet, während bei den Mutanten mit Null-Allelen von *gqa-1* die Eiablage fast vollständig ausbleibt, sodass sich der Nachwuchs häufig innerhalb des Uterus weiterentwickelt und seinen Erzeuger schließlich das Leben kostet.

4.6.2 Zellen die das Defäkationsverhalten beeinträchtigen

Die Beeinflussung des Defäkationsmotorprogramms (DMP) durch das Fehlen des Tyraminrezeptors ist evident. Weniger evident ist die Antwort auf die Frage, wie dies passiert.

Kontraktion der anterioren Muskeln – ‘*aBoc*-Phänotyp’

Da der Tyraminrezeptor-Knockdown, wie beschrieben, neben dem Ausbleiben der Expulsion (exp) einen ‘*aBoc*-Phänotyp’, also ausbleibende Kontraktionen der anterioren Muskeln, aufweist, liegt es zunächst nahe festzustellen, dass der Tyraminrezeptor eben dort exprimiert wird, und zwar in 16 der 32 ‘Kopf- und Halsmuskeln’.

Wie in Kap 1.4.2 beschrieben, ist das Neuron AVL für die Ausführung dieser gleichzeitigen Kontraktion aller anterioren Muskeln, die zur Verkürzung der Kopfregion führt, essenziell. Da es aber selbst keine Kontakte zu den anterioren Muskelzellen ausbildet, muss es seine Wirkung über Interneuronen ausüben. Neben elektrischen Synapsen mit dem sensorischen Neuron ADEL ist der einzige Ausgang des AVL-Neurons eine chemische Synapse auf PVP. PVP wiederum bildet eine chemische Synapse mit RIM, welches Tyramin enthält und synaptische Endplatten mit den anterioren Muskeln bildet. Da der aktivierte Tyraminrezeptor über die Inositid-Kaskade den Tonus der Muskeln des Kopfes normalerweise erhöht (siehe Kap. 4.6.3), könnte so das Fehlen/die Abschwächung von ‘*aBoc*’ durch den Knockdown des Tyraminrezeptors erklärt werden.

Abgesehen davon, dass diese Erklärung auf der nicht bestätigten Annahme beruht, dass AVL (vielleicht unter anderem) über das Neuron RIM den ‘*aBoc*’-Schritt auslöst, gibt es auch eine einfachere Erklärung für den ‘*aBoc*-Phänotyp’. Dieselben Muskeln, die beim ‘*aBoc*’-Schritt des DMP kontrahieren, werden nämlich auch für die Lokomotion gebraucht. Es ist also gar nicht notwendig zu postulieren, dass der Tyraminrezeptor bzw. die Freisetzung von Tyramin ein Teil des DMP ist. Die Störung der Defäkation bei Tieren mit Tyraminrezeptor-Knockdown kann auch schlicht darauf beruhen, dass die verminderte Wirkung des Tyraminrezeptors im Rahmen der Lokomotion den Tonus der anterioren Muskeln so herabsetzt, dass dies mit dem korrekten Ablauf des DMP interferiert.

Kontraktion der enterischen Muskeln – ‘*exp*-Phänotyp’

Ein anderer Erklärungsansatz betrifft sowohl den ‘*aBoc*’-Schritt als auch die Expulsion. Da der Tyraminrezeptor in keiner der beiden für die Auslösung des Expulsionsschrittes notwendigen GABAergen Zellen (AVL und DVB) exprimiert wird und allem Anschein nach auch in den enterischen Muskeln nicht vorkommt, kann seine Wirkung auch hier nur indirekt erfolgen. Unter den nur sehr spärlich vorkommenden präsynaptischen Partnern von AVL befinden sich auch die serotonergen HSN-Neurone. Nach dem in Kapitel 4.6.1 vorgeschlagenen Modell hemmt der aktivierte Tyraminrezeptor über die Förderung der Acetylcholin-freisetzung aus den Neuronen VC4 und VC5 die serotonerge Aktivität der HSN-Neuronen. Dies könnte auch bei der Defäkation eine Rolle spielen. So ist es denkbar, dass die Hemmung der Serotoninausschüttung aus den HSN-Neuronen die Defäkation beeinflusst. Denn auf bisher noch nicht geklärte Weise hemmt Serotonin bekanntermaßen die Kontraktion der enterischen Muskulatur (Segalat et al., 1995). Ob allerdings die Synapsen der HSN-Neuronen mit dem AVL-Neuron auch serotonerg sind, so wie die Synapsen mit der Vulva- und Uterusmuskulatur (vm und um), ist ungewiss. Nichtsdestoweniger wäre durch das Ausbleiben oder die Verminderung der Acetylcholinausschüttung aus den VC-Neuronen an den Synapsen mit AVL und/oder DVB eine Störung der Kontraktion von anteriorer und enterischer Muskulatur zu erklären.

Die mögliche Beeinflussung der Kontraktion der enterischen Muskeln durch die Neuronen VCn und HSN würde auch die Tatsache erklären, dass auffallend häufig Mutanten mit Defekten bei der Eiablage (*egl-d*) gleichzeitig ein im Expulsionsschritt gestörtes DMP besitzen (*exp*-Mutanten).

Sollte sich herausstellen, dass AVL einen Serotoninrezeptor exprimiert, der die hemmende Wirkung des Serotonins auf die Expulsion ausübt, würde es helfen dieses noch recht spekulative Modell für den Einfluss des Tyraminrezeptors auf die Kontraktion der enterischen Muskeln etwas zu untermauern.

4.6.3 Modulation des Lokomotionsverhaltens durch tyraminerge und octopaminerge Signale

Die in dieser Arbeit gesammelten Fakten belegen, dass der Tyraminrezeptor auf verschiedenen Ebenen in das Lokomotionsverhalten von *C. elegans* eingreift. Auf jeder dieser Ebenen besteht die Wirkung von Tyramin und Octopamin darin, den Organismus auf die Überwindung der auslösenden Stressfaktoren einzustellen, im Sinne von 'fight or flight'. Das offensichtlichste Anzeichen der stressinduzierten Tyramin- und Octopaminsignale ist die Steigerung der Lokomotionsaktivität. Um die Art und Weise zu verstehen, wie die Lokomotionsaktivität durch den Tyraminrezeptor reguliert wird, ist es sinnvoll die Komponenten, aus denen das Fortbewegungsverhalten von *C. elegans* besteht, genauer zu betrachten.

Beobachtet man den Bewegungsablauf der Würmer, so stellt man fest, dass die Tiere in gewissen Zeitabständen ihre vorwärtsgerichtete Lokomotion abrupt einstellen um für eine kurze Strecke dieselben Bewegungen unter umgekehrten Vorzeichen, also rückwärts gerichtet, durchzuführen. Unmittelbar danach wird die vorwärtsgerichtete Lokomotion in einem variablen Winkel zur ursprünglichen Bewegungsrichtung fortgesetzt (Croll, 1975; Shingai, 2000; Zheng et al., 1999). Den wellenförmigen Lokomotionsbewegungen des Körpers überlagert werden bei der vorwärts gerichteten Lokomotion (und nur da) höherfrequente Bewegungen des Kopfes mit niedriger Amplitude durchgeführt, die dem Aufspüren von Bakterien dienen.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Verhaltensversuche (siehe Kap. 3.2.3) beschränkten sich auf die Beobachtung der durch die Körpermuskulatur verursachten sinusförmigen Bewegungen des Körpers, die für die Geschwindigkeit der Lokomotion ausschlaggebend ist und ließ die Bewegungsrichtung sowie die durch die Halsmuskulatur verursachten oszillierenden Kopfbewegungen außer acht. Dementsprechend soll zunächst auf die Präsenz des Tyraminrezeptors in denjenigen neuronalen Strukturen eingegangen werden, welche die nach Octopamingabe beobachtete Erhöhung der Geschwindigkeit verursachen.

Beschleunigung

Bei der Betrachtung des Expressionsmusters fällt zunächst einmal auf, dass der Rezeptor in den GABAergen Motoneuronen VD und DD vertreten ist. Basierend auf den in Kapitel 4.3 dargelegten Erkenntnissen über die intrazelluläre Kopplung des Rezeptors ist davon auszugehen, dass TA-/OA-Signale eine vermehrte Freisetzung von GABA an den neuromuskulären Synapsen dieser Neuronen zur Folge haben.

Die GABAergen Motoneuronen des Typs VD und DD fungieren, wie in Kapitel 1.4.3.1 bereits erläutert, als reziproke Inhibitoren der Lokomotionsmuskulatur (White et al., 1986). Schon auf dieser Ebene ist so eine Voraussetzung für die durch Tyramin/Octopamin erhöhte Lokomotionsaktivität geschaffen. Denn wird an den neuromuskulären Kontakten vermehrt GABA freigesetzt, ist der eben noch kontrahierte Muskel schneller wieder relaxiert und bereit für die nächste Kontraktion. Dies allein ist allerdings nicht ausreichend zur Beschleunigung der Lokomotion wie es nach externer Applikation von Octopamin und Tyramin zu beobachten war. Es gewährleistet lediglich den koordinierten Ablauf der beschleunigten Bewegung – parallel dazu muss natürlich auch eine Aktivierung der Muskulatur erfolgen.

Dies scheint auf der Ebene der Motoneuronen des ventralen Nervenstrangs nicht im gleichen Maße der Fall zu sein. Es konnte zwar die Expression des Tyraminrezeptors in einigen der cholinergen Motoneuronen vom A- und AS-Typ nachgewiesen werden, welche die dorsalen Muskeln innervieren, und auch die VC-Motoneuronen mit ventral gelegenen neuromuskulären Synapsen zeigten Expression des GFP-Reporters, doch nicht alle der insgesamt 62 cholinergen Neuronen vom A-, B- VC- und AS-Typ taten dies.

Eine mögliche Erklärung hierfür bietet das Verschaltungsmuster der Motoneuronen. Denn im Gegensatz zu den GABAergen D-Typ Neuronen, deren präsynaptische Partner sich fast ausschließlich aus den übrigen Motoneuronen rekrutieren, haben die A-, B- und AS-Motoneuronen auf breiter Front Eingänge von den Kommando-Interneuronen. Eines der Neuronen, die den Tyraminrezeptor exprimieren, ist ein solches Kommando-Interneuron: PVC. Es ist eines der beiden auf die B-Typ-Motoneuronen verschalteten Kommando-Interneuronen, welche für eine vorwärts gerichtete Beschleunigung der Lokomotion sorgen (Abb. 48).

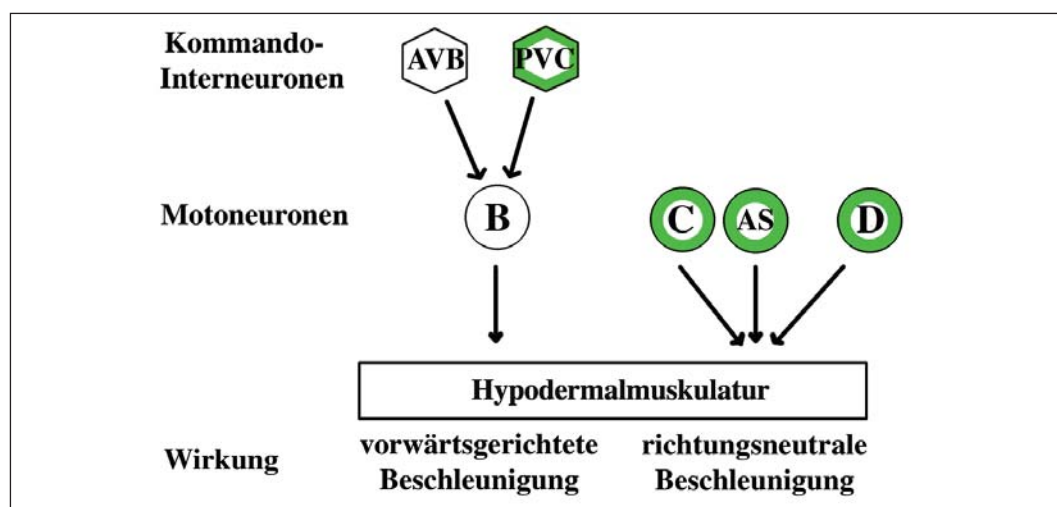


Abbildung 48: Beschleunigung

Sechsecke stehen für Interneuronen, Kreise für Motoneuronen, chemische Synapsen sind durch Pfeile dargestellt. Die TA/OA-bedingte Beschleunigung der Lokomotion wird a) durch die direkte Stimulierung der Transmitterausschüttung an den neuromuskulären Synapsen erreicht und b) durch die indirekte Stimulierung der B-Typ Motoneuronen durch das Kommandointerneuron PVC.

RIC ist auf RIM und beide Neuronenpaare sind auf die Kommando-Interneuronen verschaltet und kommen damit für eine wichtige Rolle bei der Steuerung der Lokomotion durch Tyramin und Octopamin in Betracht.

Nicht ohne Grund werden die primären und sekundären Interneuronen jedoch (noch) als *Black Box* bezeichnet, denn aufgrund der vielfältigen synaptischen Interaktionen, die zwischen ihnen und der Ebene der Kommando-Interneuronen liegen, wird ein hoher Komplexitätsgrad erreicht, der zu diesem Zeitpunkt in seiner Gesamtheit nicht durchschaubar ist.

Die Bedeutung der einzelnen Zellen wurde, wie eingangs erwähnt, durch Eliminierungsexperimente in den entsprechenden Verhaltenskontexten ermittelt.

Einer dieser Kontexte ist das Thermotaxisverhalten, welches ein gutes Beispiel für die Modulation der Verarbeitung sensorischer Eingänge durch Octopamin- und Tyramin-Signale ist.

Der sogenannte Thermotaxis-Schaltkreis (Abb. 50) steuert das Lokomotionsverhalten von *C. elegans* in Abhängigkeit von seiner Umgebungstemperatur (Mori und Ohshima, 1995; Mori, 1999). Das Aufsuchen diskreter Temperaturbereiche auf einem künstlich erzeugten radialen Temperaturgradienten war das entsprechende Kriterium für die Untersuchung dieses thermo- bzw. kryotaktischen Verhaltens. Hedgecock und Russell (1975) haben festgestellt, dass das thermotaktische Verhalten hungriger Würmer stark von dem Verhalten der Würmer in gutem Ernährungszustand abweicht. Würmer, die bei einer bestimmten Kultivierungstemperatur Hungerstress ausgesetzt worden waren, vermieden in der Folge – einem Temperaturgradienten ausgesetzt – diesen Temperaturbereich, während normal gefütterte Würmer sich genau gegenteilig verhielten. Da der Ernährungszustand bekanntermaßen durch Octopamin- respektive Serotoninsignale auf physiologischer Ebene in *C. elegans* repräsentiert wird (Horvitz et al., 1982), liegt es auf der Hand, dass auch im Thermotaxis-Schaltkreis octopaminerge Signale von Bedeutung sind. Und tatsächlich konnte die von Hedgecock und Russell beschriebene negative Thermotaxis hungriger Würmer durch die externe Applikation von Octopamin hervorgerufen werden (Mori, 1999). Diese Art der Konditionierung funktioniert offenbar auch in anderem Kontext. So konnten Saeki und andere (2001) die normalerweise positive Chemotaxis gegenüber NaCl durch Hungerstress dramatisch absenken. Die gleichzeitige Gabe von Serotonin hingegen stellte das normale Chemotaxisverhalten annähernd wieder her. Die Involvierung des Tyraminrezeptors auf der integrativen Ebene dieses Schaltkreises macht es möglich, dass die motorische Antwort der Würmer unter Hungerstress verändert ist.

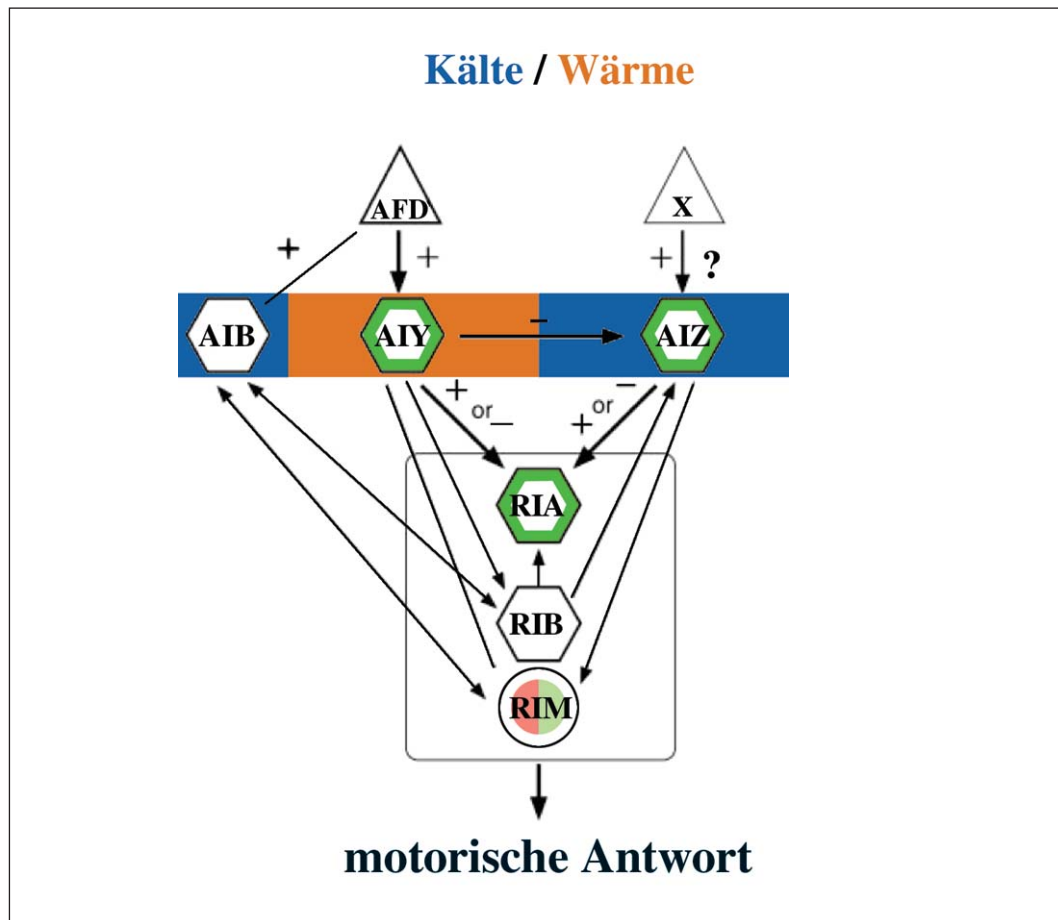


Abbildung 50: Beispiel Thermotaxis

Das Modell des Thermotaxis-Schaltkreises (nach Mori, 1999). Pfeile stehen für chemische, einfache Linien für elektrische Kopplung. RIM enthält sowohl Tyramin (grün) als auch Acetylcholin (rot). Das thermosensorische Neuron AFD und ein (hypothetisches) zweites sensorisches Neuron sind auf die Interneuronen AIY (Thermotaxis) und AIZ (Kryotaxis) verschaltet, welche ebenso wie RIA, das an der Signalintegration beteiligt ist, den Tyraminrezeptor exprimieren. Wie aus Abbildung 49 hervorgeht, sind diese Neuronen an der Integration der Signale aus verschiedenen sensorischen Eingängen beteiligt. Die motorische Antwort wird durch das Motoneuron RIM vermittelt.

Neuere Untersuchungen (Yamada und Ohshima, 2003) deuten darauf hin, dass es sich nicht um positive Taxis (Aufsuchen des Temperaturoptimums), sondern negative Taxis (Vermeidung von extremen Temperaturen) handelt. Bei der Beobachtung größerer Populationen auf einem linearen Temperaturgradienten stellten die Autoren fest, dass Würmer in gutem Ernährungszustand einen relativ eng umgrenzten Temperaturbereich besiedeln, während hungrige Würmer sich auf einen weiter gefassten Temperaturbereich ausbreiten. Dies könnte man natürlich auch als Ergebnis der gesteigerten Lokomotionsaktivität infolge des ‚Hungersignals‘ Octopamin deuten. Da ein humorales OA/TA-Signal aber auch die Zellen des Thermotaxis-Schaltkreises betrafte, die den übrigen Zellen vorgeschaltet sind, ist zu erwarten, dass die Modulation der Zellen des Thermotaxis-Schaltkreises maßgeblich an der Verhaltensänderung beteiligt ist.

Da auch die Verarbeitung weiterer Sinnesmodalitäten – durch die entsprechenden sensorischen Neuronen vermittelt – unter anderem den Neuronen RIA, AIZ und AIY obliegt, könnte man vermuten, dass der Organismus auf diese Weise seine Sensorik auf die überlebenswichtigen Modalitäten fokussiert. ‚Auf der Flucht‘ würden also nur noch jene Modalitäten verstärkt, die eine Besserung der (z.B. Nahrungs-) Situation versprechen. Wie dies im Detail realisiert wird, ist allerdings noch in der schon erwähnten *Black Box* verborgen.

Weitere durch Tyramin und Octopamin modulierte Verhaltenskomponenten

Das Lokomotionsverhalten von *C. elegans* weist, wie vorher erwähnt, zwei weitere Komponenten auf. Zum einen kann sich *C. elegans* quasi durch ‚Schubumkehr‘, also durch das Propagieren der sinusförmigen Welle in umgekehrter Richtung, rückwärts bewegen. Zum anderen können die Tiere mithilfe ihrer Kopf- und Halsmuskeln die Fortbewegung lenken. Zusammen dienen diese Komponenten der Taxis, also der gerichteten Lokomotion (Zhao et al, 2003). Die oszillatorischen Kopfbewegungen im Dienste der Nahrungssuche stellen eine weitere Komponente im Verhaltensrepertoire dar.

Wie schon beschrieben, wurde keine von diesen Bewegungen bei den Verhaltensbeobachtungen der Tyraminrezeptor-defizienten Würmer im Rahmen der vorliegenden Arbeit berücksichtigt. Untersuchungen mit *tdc-1*- und *tbh-1*-Mutanten, die aufgrund einer defekten Tyramin-Decarboxylase bzw. Tyramin- β -Hydroxylase keines der beiden Amine oder nur Tyramin produzieren können, haben gezeigt, dass auch diese Komponenten unter dem Einfluss tyraminerger/octopaminerger Signale stehen. Das Fehlen von Tyramin/Octopamin führte dazu, dass die Würmer wesentlich häufiger als gewöhnlich rückwärts gerichtete Lokomotion zeigten. Dazu kommt, dass sie die normalerweise dabei unterdrückten oszillatorischen Kopfbewegungen weiterhin ausführten (Alkema, pers. Mitteilung).

In Kombination mit dem Wissen über das Expressionsmuster des Tyraminrezeptors, lässt sich auch für diesen Phänotyp ein Modell vorschlagen.

Suppression der rückwärtsgerichteten Lokomotion

Das vermehrte Auftreten von rückwärtsgerichteter Lokomotion in Abwesenheit von Tyramin/Octopamin bedeutet im Umkehrschluss, dass tyraminerge/octopaminerge Signale auf die Kommando-Interneuronen so einwirken, dass sich eine Bevorzugung der vorwärts gerichteten Lokomotion ergibt. Die Zellen, die aufgrund der Expression des Tyraminrezeptors dafür in Frage kommen, wurden bereits in Abbildung 49 aufgeführt.

Tyramin reguliert den Tonus der Halsmuskulatur

Das unkontrollierte Auftreten der oszillierenden Kopfbewegungen in Abwesenheit von Tyramin/Octopamin ist vermutlich der fehlenden Wirkung tyraminerger Signale auf den Tyraminrezeptor in der Halsmuskulatur zurückzuführen. Wenn die intrazelluläre Kopplung, wie in Kap. 4.3 dargelegt, in den Muskelzellen ebenfalls über die Inositidkaskade verläuft, würde das bedeuten, dass eine fehlende Anhebung des Calciumspiegels durch den Ausfall der Tyraminwirkung zu einem – gegenüber dem Normalzustand – verminderten Muskeltonus führt. Trifft dies zu, dann setzen die Würmer offenbar zur Unterdrückung der oszillierenden Kopfbewegungen eine Versteifung des Halses ein, die sie durch einen erhöhten Muskeltonus erreichen. Da das Motoneuron RIM, welches nur Tyramin enthält, die Halsmuskeln innerviert, kann dieser Effekt eindeutig der Wirkung des Tyramins zugeschrieben werden (siehe Abb. 51).

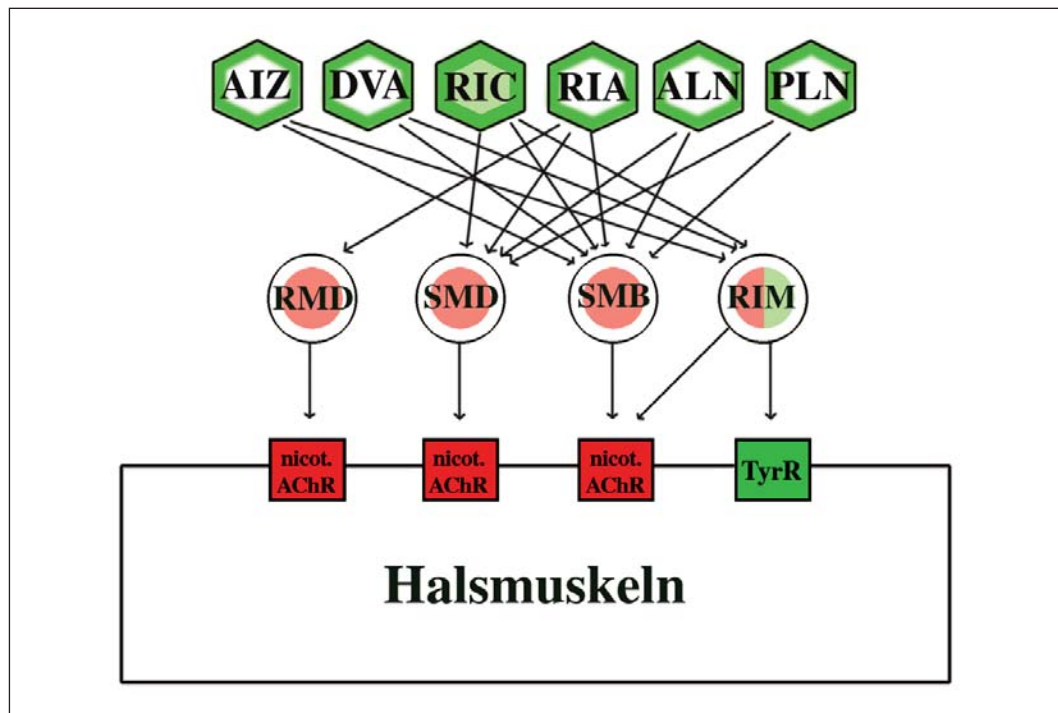


Abbildung 51: Tyramin reguliert den Tonus der Halsmuskulatur

Acetylcholin = hellrot, Tyamin = hellgrün

Vernetzung der modulatorischen Systeme

Betrachtet man die Schaltkreise zur Steuerung der Lokomotion (und Eiablage), so fällt auf, dass zusätzlich zu den gerade aufgezeigten Mechanismen ein weiterer Faktor die Effektivität der Steuerung erhöhen könnte. Die Tatsache, dass das zu Tyramin und Octopamin antagonistisch wirkende Serotonin nur in einer eng umgrenzten Zahl von Zellen synthetisiert wird, führt dazu, dass wenige synaptische Verbindungen ausreichen, um deren Freisetzung und/oder Synthese zu stoppen. Gleiches gilt natürlich auch für den umgekehrten Fall, da Tyramin und Octopamin, wie bereits ausgeführt, auch nur in wenigen Neuronen enthalten sind. Dopamin wird ebenfalls nur in einer eng begrenzten Anzahl – ausnahmslos sensorischer – Neuronen gebildet.

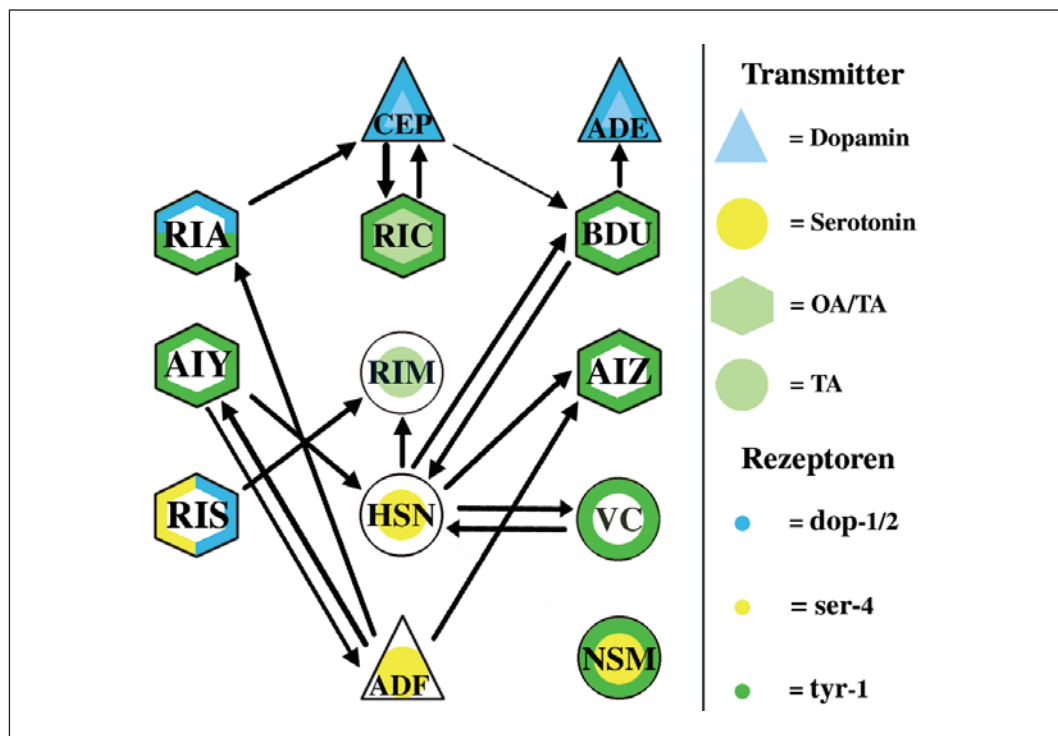


Abbildung 52: Gegenseitige Kontrolle der verschiedenen modulatorischen Systeme?

Während die Kontrolle der Serotoninfreisetzung aus den Hermaphroditen-spezifischen Neuronen (HSN) schon in den Modellen für den Einfluss von tyraminergergen und octopaminergen Signalen auf die Eiablage (und Defäkation) angesprochen wurde, wird aus dieser Grafik deutlich, dass dies auch an anderer Stelle möglich wäre. Erwähnt werden sollte auch, dass die hier nicht aufgeführten Männchen-spezifischen serotonergen CP-Motoneuronen ebenfalls den Tyraminrezeptor exprimieren.

Ein besonders interessanter Aspekt ist in diesem Zusammenhang jedoch die Lokalisierung des Tyraminrezeptors in den neurosekretorischen Motoneuronen (NSM). Da diese zum pharyngealen Nervensystem gehören, haben sie keinerlei synaptische Verbindungen zum übrigen Nervensystem. Neben einer elektrischen Synapse zwischen den RIP-Neuronen und dem pharyngealen Motoneuron I1 (Durbin, 1987) besteht die einzige bisher gefundene Möglichkeit zur Kommunikation zwischen dem pharyngealen und dem somatischen Nervensystem in der Sekretion von Signalmolekülen aus den NSM-Zellen. Da diese neben dem Insulin-Homolog von *C. elegans* (INS-1), einer Reihe von Neuropeptiden und Glutamat, auch Serotonin enthalten, besteht die Möglichkeit, dass TA-/OA-Signale hier sogar intrazellulär die Freisetzung von Serotonin beeinflussen. Hieraus ergäbe sich in logischer Konsequenz ein Erklärungsansatz für die Wirkmechanismen während der *‘enhanced slowing response’*, denn die NSM-Zellen sind notwendig für das Auftreten dieses Verhaltens (siehe Kap. 1.4.3.2).

Modell *‘enhanced slowing response’*

Eine durch Hungerstress ausgelöste Erhöhung des TA-/OA-Niveaus wirkt über die Aktivierung des Tyraminrezeptors stimulierend auf die neurosekretorischen Motoneuronen. Treffen nun im Lumen des Pharynx Bakterien(-bestandteile) auf die mit Cilien versehenen Fortsätze der NSM-Zellen, so wird das dadurch ausgelöste Serotoninsignal stärker ausfallen als in Abwesenheit von TA/OA – oder möglicherweise überhaupt erst möglich. Das Serotonin ‚durchflutet‘ den Körper des Wurms und wirkt in antagonistischer Weise auf die in diesem Kapitel behandelten Schaltkreise ein.

All dies ist, so einleuchtend es auch klingen mag, noch sehr hypothetisch. Zusätzliche Hinweise zur Verifizierung dieser Hypothese könnten sich aus der Charakterisierung und der Kenntnis des Expressionsmusters weiterer Serotonin- bzw. Octopaminrezeptoren ergeben. Die antagonistische Wirkung des ionotropen Serotoninrezeptors MOD-1 und des Tyraminrezeptors auf die Aktivität der Motoneuronen im ventralen Nervenstrang ist schon jetzt, nicht zuletzt dank der im Rahmen der vorliegenden Arbeit gewonnenen Erkenntnisse, als gegeben anzusehen.

Abschließende Bemerkungen

Wie soeben gezeigt werden konnte, stellen die über den Tyraminrezeptor vermittelten tyraminergen und octopaminergen Signale das Lokomotionsverhalten des Wurmes auf vielfache Weise im Sinne der *'fight or flight'*-Reaktion um. Die Lokomotion wird beschleunigt und Verhaltensweisen, die der Nahfelderkundung dienen, werden unterdrückt. Darüber hinaus wird die Verarbeitung sensorischer Informationen verändert und möglicherweise sogar fokussiert.

Die zumindest teilweise belegte funktionelle Interaktion der an diesen Verhaltensmodulationen beteiligten Neuronen mit jenen, die für die antagonistisch wirkenden serotonergen Signale verantwortlich sind, könnte zum besseren Verständnis der neuronalen Steuerung des Verhaltens bei *C. elegans* beitragen. Außerdem impliziert die Expression des Tyraminrezeptors in den neurosekretorischen Motoneuronen neben der vorgeschlagenen Wirkung im Rahmen der *'enhanced slowing response'* mögliche weitere Funktionen des Tyraminrezeptors bei der Kontrolle endokriner Signale.

4.6.4 Regulation des Lipidstoffwechsels

Die durch tyraminerge und octopaminerge Signale verursachte Steigerung der Lokomotionsaktivität hat einen ebenso gesteigerten Energiebedarf zur Folge, da die hierfür benötigten Muskeln ein größeres Maß an Arbeit verrichten müssen. Dies wird kurzfristig vermutlich durch die vermehrte Bereitstellung von Glucose bewerkstelligt, längerfristig wird der Energiebedarf der Muskeln jedoch durch die β -Oxidation von freien Fettsäuren gestillt (vgl. Mentel et. al., 2003). Dazu werden mit der Nahrung aufgenommene Triacylglyceride mithilfe von Lipasen hydrolysiert. Reichen die mit der Nahrung aufgenommenen Mengen nicht aus, greift der Organismus auf zuvor angelegte Speicherreservoirs zurück. Diese Reservoirs befinden sich bei *C. elegans* primär in den Zellen des Darms und, beim Anfallen größerer Mengen, als frei flottierende Lipidtropfen im Pseudocoel.

Nach dem Ausfall tyraminerger und octopaminерger Signale, also dem Fehlen des Tyraminrezeptors oder einer pharmakologischen Blockade desselben durch Yohimbin, war eine Volumenzunahme der Lipidspeicher in den Darmzellen und das massive Auftreten extrazellulärer Speichervorkommen zu beobachten. Dies ist einerseits vermutlich auf die geringe Lokomotionsaktivität und andererseits womöglich auf das Fehlen der durch TA/OA stimulierten Lipolyse zurückzuführen. Es ist von der Maus (*Mus musculus*) und auch vom Menschen bekannt, dass die Aktivität der hormonsensitiven Lipase durch adrenerge Rezeptoren im Fettgewebe stimuliert wird. Da die Lipolyse bei *C. elegans* vermutlich hauptsächlich in den Darmzellen stattfindet, wo der Tyraminrezeptor nicht exprimiert wird, muss der Phänotyp des

Knockdowns entweder allein durch den verminderten Energieverbrauch hervorgerufen werden, oder es sind weitere Signale im Spiel, die durch die Aktivierung des Tyraminrezeptors hervorgerufen werden.

Um dieser Möglichkeit nachzugehen wurde das *C. elegans* Tubby-Homolog *tub-1* in die Untersuchungen aufgenommen. Denn Tubby-Knockout-Mäuse haben, wie schon erwähnt, einen adipösen Phänotyp (Coleman und Eicher, 1990; Kleyn et al., 1996; Stubdal et al., 2000). Zudem hat sich herausgestellt, dass sie als Transkriptionsfaktoren fungieren und durch G-Protein-gekoppelte Rezeptoren aktiviert werden, welche die PhospholipaseC β als Effektor benutzen (Santagata et al., 2001). Die vergleichende Analyse der Aminosäuresequenzen der Familie der Tubby-ähnlichen Proteine ergab, dass die Sekundärstrukturen, die zur Bindung der DNA dienen, einzigartig sind und sich grundlegend von den bisher bekannten unterscheiden, während die Bindedomänen, die der Initiation der Transkription dienen, strukturell die gleichen sind wie bei anderen Transkriptionsfaktoren (Boggon et al., 1999). Tubby-ähnliche Proteine können, wie alle Transkriptionsfaktoren, je nachdem welche Gene sie ‚anschalten‘ und in welchen Zellen sie lokalisiert sind, unterschiedlichste Wirkungsbereiche haben. Von der Maus war bekannt, dass Mutationen der verschiedenen Tubby-Proteine Taubheit und Blindheit hervorrufen können (North et al., 1997). Das für diese Familie namensgebende Protein Tubby zeigt gar alle drei Phänotypen.

Da diese Transkriptionsfaktoren bei der Maus und beim Mensch fast ausschließlich in neuronalem Gewebe exprimiert werden, war es ein logischer Schritt das *C. elegans* Tubby-Homolog auf eine mögliche Kopplung an den Tyraminrezeptor hin zu untersuchen, denn die Voraussetzung zur Aktivierung von Tubby durch Tyramin- bzw. Octopaminsignale mittels der Signalkaskade des Tyraminrezeptors war gegeben. Zunächst musste allerdings festgestellt werden, ob das Fehlen von TUB-1 bei *C. elegans* ebenfalls einen adipösen Phänotyp hervorruft. Auch die Translokation von der Zellmembran in den Nukleus musste erst einmal für TUB-1 nachgewiesen werden.

Der adipöse Phänotyp konnte an einem RNAi-induzierten Knockdown im Rahmen dieser Arbeit (siehe Abb. 28b, Seite 61) und später auch bei einem genomischen Knockout gezeigt werden (Ashrafi et al., 2003). Die Translokation von der Zellmembran in den Nukleus wurde mit einem in PEAK-Zellen heterolog exprimierten GFP-Konstrukt nachgewiesen. Es zeigte sich, dass TUB-1 in diesen Zellen durch PhospholipaseC-Aktivität in den Kern transloziert wurde. Durch Zugabe eines PLC-Inhibitors (U73122) wurde dies verhindert, und das TUB-1-GFP-Fusionsprotein verblieb überwiegend in der Zellmembran (siehe Abb. 37, Seite 71).

Postuliert man das Zusammenwirken von Proteinen innerhalb einer intrazellulären Signalkaskade, so stellt die Co-Lokalisation dieser Proteine logischerweise ein notwendiges Kriterium dar. Im Unterschied zu allen anderen in dieser Arbeit untersuchten an der Signaltransduktion beteiligten Proteinen, von denen bekannt ist, dass sie im gesamten Nervensystem und in vielen Muskelzellen von *C. elegans* exprimiert werden, war das Expressionsmuster des Transkriptionsfaktors TUB-1 bis dato noch unbekannt. Deshalb war die Herstellung einer GFP-Reporter-Linie von *tub-1* (siehe Kapitel 2.8) ein Beitrag von großer Wichtigkeit für die Verifikation der Hypothese, dass TUB-1 durch seine Funktion als Transkriptionsfaktor die metabolischen Langzeitwirkungen der octopaminergen bzw. tyraminerger Signale umsetzt.

Die Analyse des Expressionsmusters von *tub-1* zeigte, dass der Transkriptionsfaktor ausnahmslos in sensorischen Neuronen exprimiert wird. Eine Überlappung des Expressionsmusters mit dem des Tyraminrezeptors konnte nicht nachgewiesen werden. Obwohl die meisten *tub-1* exprimierenden Zellen benannt werden konnten, besteht bei den anterior des Schlundrings gelegenen sensorischen Neuronen, die in Abbildung 41a/b gekennzeichnet sind, keine endgültige Sicherheit bezüglich ihrer Identität. Somit ist die Möglichkeit des Zusammenwirkens der beiden Proteine in einer intrazellulären Signalkaskade zwar nicht völlig auszuschließen, aber als sehr unwahrscheinlich anzusehen.

4.7 Physiologische Bedeutung

Betrachtet man den Phänotyp der in dieser Arbeit untersuchten Würmer mit Ausfällen in der Übermittlung tyraminerger und octopaminерger Signale in seiner Gesamtheit und stellt ihnen die ebenfalls untersuchten physiologischen Auswirkungen der Octopamin- und Tyraminapplikation auf Wildtyp-Würmer gegenüber, so ergibt sich ein klares Bild von der Bedeutung dieser Signale für *C. elegans* in seiner natürlichen Umgebung (siehe Abb. 52).

Hunger und andere stressauslösende Faktoren haben eine Erhöhung des OA/TA-Spiegels im Pseudocoel des Wurms zur Folge. Die dadurch verstärkte Aktivierung des Tyraminrezeptors führt über die in den vorigen Kapiteln erläuterten Mechanismen zu einer gesteigerten Lokomotionsaktivität, einem Ausbleiben der Eiablage und der vermehrten Bereitstellung von Energieträgern. Der Wurm ist in seinem Verhalten auf die Überwindung der stressauslösenden Faktoren eingestellt, was in seinem Fall vermutlich meist das Ergreifen der Flucht bedeutet. Die Bereitstellung von freien Fettsäuren ermöglicht die Ausführung dieses Verhaltens auch über einen längeren Zeitraum. Vermutlich ist seine Sensorik und/oder die Verarbeitung von Reizen ebenfalls verändert, was zur Folge haben könnte, dass nur

relevante Reize eine Verhaltensänderung hervorrufen. Trifft der Wurm auf einen solchen relevanten Reiz, also ein Reiz der ein Überwinden der Stresssituation bedeutet (z.B. Bakterien), so ändert sich sein Verhalten abrupt. Vermutlich geschieht dies durch die Förderung der Ausschüttung des antagonistisch wirkenden Serotonins. Nach Überwindung des Stresses wäre somit für ein schnelles Umschalten gesorgt. Der Wurm verringert seine Lokomotionsaktivität und läuft somit nicht Gefahr, die gerade erreichte freundlichere Umweltsituation wieder zu verlassen.

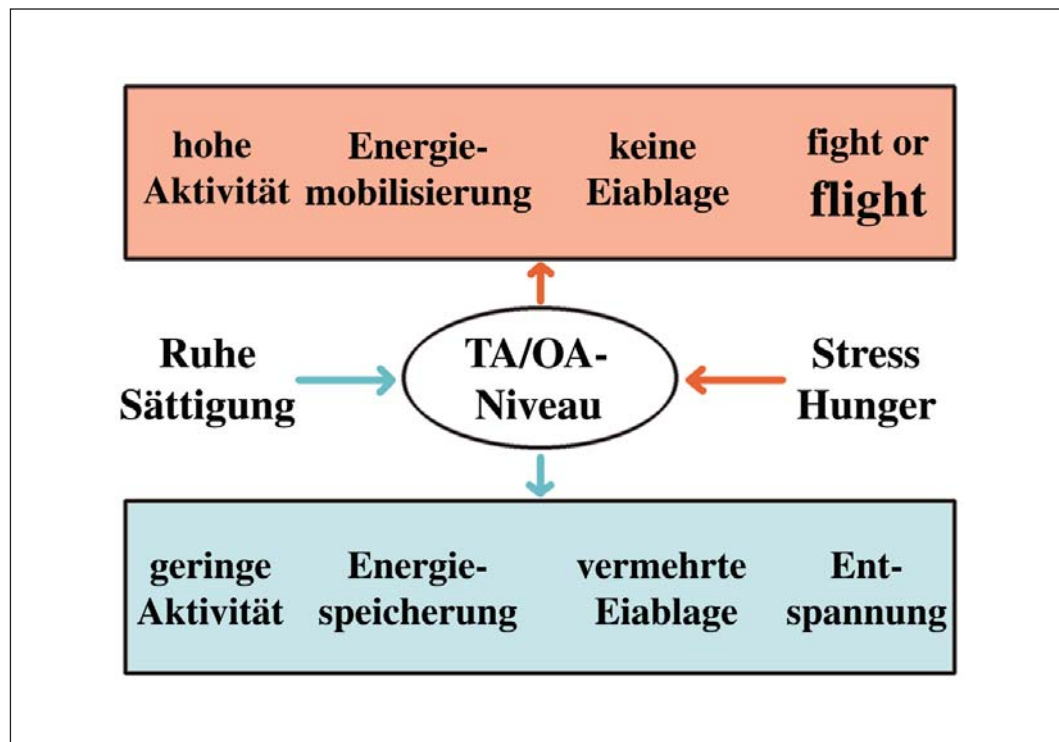


Abbildung 53: Die physiologische Rolle von Octopamin und Tyramin bei *C. elegans*

4.8 Zusammenfassung

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die meisten der bei *C. elegans* bekannten Wirkungen des Octopamins durch den G-Protein gekoppelten Tyraminrezeptor (CeTyrR) transduziert werden. Damit einher geht die Beobachtung, dass dieselben Wirkungen durch die externe Applikation von Tyramin erzielt werden. Außerdem konnten weitere Wirkungen von Octopamin und Tyramin festgestellt werden. Parallelen zwischen den Tyramin- und Octopaminwirkungen bei *C. elegans* und dem Adrenalsystem der Wirbeltiere wurden deutlich.

Der immunhistochemische Nachweis zeigte, dass Tyramin und Octopamin in nur sehr wenigen Zellen vorkommen. Es ist neben einer Transmitter- bzw. Modulatorfunktion auch von einer humoralen Wirkung auszugehen.

Die Blockade der Tyramin- und Octopaminsignale auf prä- oder postsynaptischer Seite förderte einen Phänotyp zutage, der sich durch verminderte Lokomotions- und Defäkationsaktivität, fehlende Inhibition der Eiablage und der Akkumulation von Lipidspeichern in Darm und Pseudocoel der Tiere äußerte. Der entgegengesetzte Phänotyp, der alle Anzeichen einer 'fight or flight'-Reaktion aufweist, ist bei Tyramin- oder Octopaminapplikation zu beobachten.

Auf der Basis von verhaltenspharmakologischen Versuchen und der Aufklärung seines zellulären Expressionsmusters konnten Modelle für die Wirkungsweise des Tyraminrezeptors in den verschiedenen Kontexten vorgeschlagen werden.

Über die intrazelluläre Signalkaskade des Tyraminrezeptors fördern Tyramin und Octopamin die Freisetzung von Transmittern aus Neuronen, die auf verschiedenen Ebenen an der Steuerung der Lokomotion beteiligt sind. Die Effekte auf die Eiablage und Defäkation werden unter anderem vermutlich durch die indirekte Beeinflussung der Serotoninausschüttung hervorgerufen.

Der Tyraminrezeptor aktiviert über die G α q-Untereinheit eines heterotrimeren G-Proteins die PhospholipaseC β . Diese setzt weitere *Second Messenger* frei, welche über die Bindung an die Proteine UNC-13 bzw. UNC-31 die Fusion von *clear-* oder *dense-core*-Vesikeln mit der Zellmembran bewirken, also die Freisetzung von Transmittern fördern.

Die vermutete Beteiligung des *C. elegans*-Tubby-Homologs TUB-1, eines durch Phospholipasen aktivierbaren Transkriptionsfaktors der Tubby-Familie, an der Vermittlung der metabolischen Wirkungen des Tyraminrezeptors konnte nicht bestätigt werden.

4.9 Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit konnte nicht auf eine mögliche differenzielle Wirkung von Tyramin und Octopamin eingegangen werden. Die vorausgegangene pharmakologische Charakterisierung des Tyraminrezeptors (Witte, 2000) hat belegt, dass sowohl Tyramin als auch Octopamin mit hoher Affinität an diesen binden. Obwohl Tyramin eine höhere Bindungsaffinität aufweist, wurden durch den Knockdown des Tyraminrezeptors alle bekannten Wirkungen des Octopamins aufgehoben und konnten weder durch externe Applikation von Octopamin noch durch Tyramin wiederhergestellt werden. Gleichwohl ist zu erwarten, dass differenzielle Wirkungen von Tyramin und Octopamin bei *C. elegans* auftreten. Schon allein die Tatsache, dass die Expression eines zusätzlichen Enzyms (zur Synthese von Octopamin) dem Organismus energetische Kosten verursacht, die ihm auch einen Nutzen bringen müssten, spricht dafür. Differenzielle Wirkungen sind – unter anderem aufgrund des methodischen Ansatzes dieser Arbeit – nicht detektierbar gewesen.

Gegenüber den hormonellen Signalen ist die räumlich und zeitlich einzugrenzende Rolle als Neurotransmitter experimentell sicher besser zugänglich, wie die Analyse des Phänotyps der *tdc-1*- und *tbh-1*-Mutanten in einem sehr eng gefassten Verhaltenskontext gezeigt hat. Es wäre interessant zu wissen, ob noch weitere Octopamin- oder Tyraminrezeptoren exprimiert werden, die möglicherweise nur einen geringen Beitrag zu den bisher festgestellten Wirkungen des Octopamins leisten oder noch unentdeckte Wirkungen transduzieren. Auch die Beantwortung der Frage, ob unterschiedliche Spleißvarianten des Tyraminrezeptors möglicherweise unterschiedliche Affinitäten zu Octopamin und Tyramin besitzen, wäre ein Beitrag zur differenzierteren Betrachtung der Wirkungen von Tyramin und Octopamin.

Ein möglicher Kandidat für einen Octopaminrezeptor, der aufgrund seiner DNA-Sequenz den vorläufigen Namen *ser-3* (G-Protein gekoppelter Rezeptor mit Serotoninrezeptor-Ähnlichkeit) erhalten hat, zeigt breite Expression in den Zellen des Darms, was ihn dazu befähigen würde, über eine intrazelluläre Kaskade die Aktivität der hormonsensitiven Lipase, und damit die Lipolyse zu beeinflussen. Zusätzlich zeigt er, oberflächlich betrachtet, ein mit *tub-1* überlappendes Expressionsmuster. Um dies zu verifizieren, müsste es allerdings genauer analysiert werden. Da weder der genomische Knockout noch der RNAi-induzierte Knockdown einen offensichtlichen Phänotyp zeigte, fand *ser-3* bisher keine weitere Beachtung. Die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse sprechen dafür, dass es sich lohnen könnte, dieses Gen etwas detaillierter zu untersuchen und seine physiologische Bedeutung zu charakterisieren.

Desweiteren wäre ein GFP-Konstrukt mit funktionellem *tub-1*-Gen von großem Nutzen. Eine damit erzeugte transgene Linie von *C. elegans* würde eine Untersuchung der pharmakologischen Beeinflussbarkeit der Translokation von TUB-1 *in vivo* ermöglichen, womit sich ein direkter Nachweis der Aktivierung durch Tyramin/Octopamin erbringen ließe.

5. Literaturverzeichnis

Adamo SA, Linn CE und Hoy RR (1995) The role of neurohormonal octopamine during 'fight or flight' behaviour in the field cricket *Gryllus bimaculatus*. J Exp Biol 198: 1691-1700.

Aguinaldo AM, Turbeville JM, Linford LS, Rivera MC, Garey JR, Raff RA und Lake JA (1997) Evidence for a clade of nematodes, arthropods and other moulting animals. Nature 387: 489-493.

Albertson DG und Thomson JN (1975) The pharynx of *Caenorhabditis elegans*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 275: 299-325.

Ann K, Kowalchuk JA, Loyet KM und Martin TF (1997) Novel Ca²⁺-binding protein (CAPS) related to UNC-31 required for Ca²⁺-activated exocytosis. J Biol Chem 272: 19637-19640.

Ashrafi K, Chang FY, Watts JL, Fraser AG, Kamath RS, Ahringer J und Ruvkun G. (2003) Genome-wide RNAi analysis of *Caenorhabditis elegans* fat regulatory genes. Nature 421: 268-272.

Avery L und Thomas JH (1997) Feeding and defecation. In: *C. elegans II* (Hrsg. Riddle DL, Blumenthal T, Meyer BJ und Priess JR), 679-716. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

Axelrod J und Saavedra JM (1977) Octopamine. Nature 265: 501-504.

Bacon JP, Thompson KS und Stern M (1995) Identified octopaminergic neurons provide an arousal mechanism in the locust brain. J Neurophysiol 74: 2739-2743.

Bany IA, Dong MQ und Koelle MR (2003) Genetic and cellular basis for acetylcholine inhibition of *Caenorhabditis elegans* egg-laying behavior. J Neurosci 23: 8060-8069.

Blair JE, Ikeo K, Gojobori T, Hedges SB. (2002) The evolutionary position of nematodes. BMC Evol Biol 2: 7.

Blenau W, Balfanz S und Baumann A (2000) Amtyr1: characterization of a gene from honeybee (*Apis mellifera*) brain encoding a functional tyramine receptor. J Neurochem 74: 900-908.

Bastiani CA, Gharib S, Simon MI und Sternberg PW (2003) *Caenorhabditis elegans* Galphaq regulates egg-laying behavior via a PLCbeta-independent and serotonin-dependent signaling pathway and likely functions both in the nervous system and in muscle. Genetics 165: 1805-1822.

Boggon TJ, Shan WS, Santagata S, Myers SC und Shapiro L (1999) Implication of tubby proteins as transcription factors by structure-based functional analysis. Science 286: 2119-2125.

- Brenner S (1974) The genetics of *Caenorhabditis elegans*. Genetics 77: 71–94.
- Brockie PJ, Madsen DM, Zheng Y, Mellem J und Maricq AV (2001a) Differential expression of glutamate receptor subunits in the nervous system of *Caenorhabditis elegans* and their regulation by the homeodomain protein UNC-42. J Neurosci 21: 1510-1522.
- Brockie PJ, Mellem JE, Hills T, Madsen DM und Maricq AV (2001b) The *C. elegans* glutamate receptor subunit NMR-1 is required for slow NMDA-activated currents that regulate reversal frequency during locomotion. Neuron 31: 617-630.
- Brundage L, Avery L, Katz A, Kim UJ, Mendel JE, Sternberg PW und Simon MI (1996) Mutations in a *C. elegans* Gq α Gene Disrupt Movement, Egg Laying and Viability. Neuron 16: 999–1009.
- Chalfie M, Sulston JE, White JG, Southgate E, Thomson, JN und Brenner S (1985) The neural circuit for touch sensitivity in *C. elegans*. J Neurosci 5: 956-964.
- Chang DJ, Li XC, Lee YS, Kim HK, Kim US, Cho NJ et al. (2000) Activation of a heterologously expressed octopamine receptor coupled only to adenylyl cyclase produces all the features of presynaptic facilitation in aplysia sensory neurons. Proc Natl Acad Sci 97: 1829-1834.
- Coleman DL und Eicher EM (1990) Fat (fat) and tubby (tub): two autosomal recessive mutations causing obesity syndromes in the mouse. J Hered 81: 424-427.
- Croll N (1975) Components and patterns in the behavior of the nematode *Caenorhabditis elegans*. J Zool (Lond) 176: 159-176.
- Dal Santo P, Logan MA, Chisholm AD und Jorgensen EM (1999) The inositol trisphosphate receptor regulates a 50-second behavioral rhythm in *C. elegans*. Cell 98: 757-767.
- Desai C, Garriga G, McIntire SL und Horvitz HR (1988) A genetic pathway for the development of the *Caenorhabditis elegans* HSN motor neurons. Nature 336: 638-646.
- Driscoll M und Kaplan J (1997) Mechanotransduction. In: *C. elegans* II (Hrsg. Riddle DL, Blumenthal T, Meyer BJ und Priess JR), 679-716. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Dong MQ, Chase D, Patikoglou GA und Koelle MR (2000) Multiple RGS proteins alter neural G-protein signaling to allow *C. elegans* to rapidly change behavior when fed. Genes Dev 14: 2003-2014.
- Duerr JS, Frisby DL, Gaskin J, Duke A, Asermely K, Huddleston D et al. (1999) The cat-1 gene of *Caenorhabditis elegans* encodes a vesicular monoamine transporter required for specific monoamine-dependent behaviors. J Neurosci 19: 72-84.

- Durbin RM (1987) Studies on the development and organisation of the nervous system of *Caenorhabditis elegans*. Dissertation am King's College der Universität Cambridge.
- Epstein HF und Shakes DC (Hrsg.) (1995) *C. elegans: Modern Biological Analysis of an Organism*. Methods in Cell Biology Vol. 48, Academic Press, San Diego.
- Erspamer V und 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 Ther 88: 296-332.
- Evans PD (1978) Octopamine distribution in the insect nervous system. J Neurochem 30: 1109-1113.
- Evans PD und O'Shea M (1978) The identification of an octopaminergic neurone and the modulation of a myogenic rhythm in the locust. J Exp Biol 73: 235-260.
- Fire A, Xu S und Montgomery MK (1998) Potent and specific genetic interference of double stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. Nature 391: 19-26.
- Forrester WC und Garriga G (1997) Genes necessary for *C. elegans* cell and growth cone migrations. Development 124: 1831-1843.
- Gerhardt CC, Lodder HC, Vincent M, Bakker RA, Planta RJ, Vreugdenhil E et al. (1997) Cloning and expression of a complementary DNA encoding a molluscan octopamine receptor that couples to chloride channels in HEK293 cells. Biol Chem J 272: 6201-6207.
- Granato M, Schnabel H und Schnabel R (1994) *pha-1*, a selectable marker for gene transfer in *C. elegans*. Nucleic Acid Res 22: 1762-1763.
- Greenspan P, Mayer EP, und Fowler SD (1985) Nile red: a selective fluorescent stain for intracellular lipid droplets. J Cell Biol 100: 965-973.
- Goodman MB und Schwarz EM (2003) Transducing Touch in *Caenorhabditis elegans*. Ann Rev Physiol 65: 429-452.
- Hajdu-Cronin YM, Chen WJ, Patikoglou G, Koelle MR und Sternberg PW (1999) Antagonism between G(o)alpha and G(q)alpha in *Caenorhabditis elegans*: the RGS protein EAT-16 is necessary for G(o)alpha signaling and regulates G(q)alpha activity. Genes Dev 13: 1780-1793.
- Hardaker LA, Singer E, Kerr R, Zhou G und Schafer WR (2001) Serotonin modulates locomotory behavior and coordinates egg-laying and movement in *Caenorhabditis elegans*. J Neurobiol 49: 303-313.
- Hedgecock E und Russell R (1975) Normal and mutant thermotaxis in the nematode *Caenorhabditis elegans*. Proc Natl Acad Sci 72: 4061-4065.

- Hobert O, Johnston RJ und Chang S (2002) Left-right asymmetry in the nervous system: the *Caenorhabditis elegans* model. *Nat Rev Neurosci* 3: 629-640.
- Hope IA (1999) *C. elegans* - A practical approach. Oxford University Press, New York.
- Horvitz HR, Chalfie M, Trent C, Sulston JE und Evans PD (1982) Serotonin and octopamine in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Science* 216: 1012-1014.
- Isermann K (2000) Muscarinische Acetylcholinrezeptoren des Nematoden *C.elegans*. Diplomarbeit am Fachbereich Biologie der Universität Hamburg.
- Iwasaki K, Liu DW und Thomas JH (1995) Genes that control a temperature-compensated ultradian clock in *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci* 92: 10317-10321.
- Jansen G, Thijssen KL, Werner P, van der Horst M, Hazendonk E und Plasterk RH (1999) The Complete Family of Genes Encoding G Proteins of *Caenorhabditis elegans*. *Nat Genet* 21: 414-419.
- Jin Y (1999) Transformation. In: *C. elegans: A Practical Approach* (Hrsg.: Hope IA), Oxford University Press, Oxford.
- Kamath RS, Fraser AG, Dong Y, Poulin G, Durbin R, Gotta M et al. (2003) Systematic functional analysis of the *Caenorhabditis elegans* genome using RNAi. *Nature* 421: 231-237.
- Kim SK, Lund J, Kiraly M, Duke K, Jiang M, Stuart JM et al. (2001) A gene expression map for *Caenorhabditis elegans*. *Science* 293: 2087-92.
- Kleyn PW, Fan W, Kovats SG, Lee JJ, Pulido JC, Wu Y et al. (1996) Identification and characterization of the mouse obesity gene *tubby*: a member of a novel gene family. *Cell* 85: 281-290.
- Kutsukake M, Komatsu A, Yamamoto D und Ishiwa-Chigusa S (2000) A tyramine receptor gene mutation causes a defective olfactory behavior in *Drosophila melanogaster*. *Gene* 245: 31-42.
- Lackner MR, Nurrish SJ und Kaplan JM (1999) Facilitation of synaptic transmission by EGL-30 Gqalpha and EGL-8 PLCbeta: DAG binding to UNC-13 is required to stimulate acetylcholine release. *Neuron* 24: 335-346.
- Lange AB und Orchard I (1986) Identified octopaminergic neurons modulate contractions of locust visceral muscle via adenosine 3',5'-monophosphate (cyclic AMP). *Brain Res* 363: 340-349.
- Liu DWC und Thomas JH (1994) Regulation of a periodic motor program in *C. elegans*. *J. Neurosci* 14: 1953-1962.
- McIntire SL, Jorgensen EM und Horvitz HR (1993a) Genes required for GABA function in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 364: 334-337.

- McIntire SL, Jorgensen EM, Kaplan JM und Horvitz HR (1993b) The GABAergic nervous system of *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 364: 337-341.
- Mentel T, Duch C, Stypa H, Wegener G, Müller U und Pflüger HJ (2003) Central modulatory neurons control fuel selection in flight muscle of migratory locust. *J Neurosci* 23: 1109-1113.
- Mori I (1999) Genetics of chemotaxis and thermotaxis in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Annu Rev Genet* 33: 399-422.
- Mori I und Ohshima Y (1995) Neural regulation of thermotaxis in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 376: 344-348.
- Nelson FK, Albert PS und Riddle DL (1983) Fine structure of the *Caenorhabditis elegans* secretory-excretory system. *J Ultrastruct Res* 82: 156-171.
- Nelson FK und Riddle DL (1984) Functional study of the *Caenorhabditis elegans* secretory-excretory system using laser microsurgery. *J Exp Zool* 231: 45-56.
- North MA, Naggert JK, Yan Y, Noben-Trauth K und Nishina PM (1997) Molecular characterization of TUB, TULP1 and TULP2, members of the novel tubby gene family and their possible relation to ocular diseases. *Proc Natl Acad Sci* 94: 3128-3133.
- O'Day PM und Lisman JE (1985) Octopamine enhances dark-adaptation in *Limulus* ventral photoreceptors. *J Neurosci* 5: 1490-1496.
- Orchard I (1982) Octopamine in insects: Neurotransmitter, neurohormone and neuromodulator. *Can J Zool* 60: 659-669.
- Pannabecker T und Orchard I (1986) Octopamine and cyclic AMP mediate release of adipokinetic hormone I and II from isolated locust neuroendocrine tissue. *Mol Cell Endocrinol* 48: 153-159.
- Pothof J, van Haften G, Thijssen K, Kamath RS, Fraser AG, Ahringer J et al. (2003) Identification of genes that protect the *C. elegans* genome against mutations by genome-wide RNAi. *Genes Dev* 17: 443-448.
- Rex E und Komuniecki RW (2002) Characterization of a tyramine receptor from *Caenorhabditis elegans*. *J Neurochem* 82: 1352-1359.
- Ranganathan R, Cannon SC und Horvitz HR (2000) MOD-1 is a serotonin-gated chloride channel that modulates locomotory behaviour in *C. elegans*. *Nature* 408: 470-475.
- Ranganathan R, Sawin ER, Trent C und Horvitz HR (2001) Mutations in the *Caenorhabditis elegans* Serotonin Reuptake Transporter MOD-5 Reveal Serotonin-Dependent and -Independent Activities of Fluoxetine. *J Neurosci* 21: 5871-5884.
- Richmond JE, Davis WS und Jorgensen EM (1999) UNC-13 is required for synaptic vesicle fusion in *C. elegans*. *Nat Neurosci* 2: 959-964.

Robb S, Cheek TR, Hannan FL, Hall LM, Midgley JM und Evans PD (1994) Agonist-specific coupling of a cloned *Drosophila* octopamine/tyramine receptor to multiple second messenger systems. *EMBO J* 13: 1325-1330.

Roeder T, Degen J und Gewecke M (1998) Epinastine, a highly specific antagonist of insect neuronal octopamine receptors. *Eur J Pharmacol* 349: 171-177.

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

Rogers CM, Franks CJ, Walker RJ, Burke JF und Holden-Dye L (2001) Regulation of the pharynx of *Caenorhabditis elegans* by 5-HT, octopamine and FMRFamide-like neuropeptides. *J Neurobiol* 49: 235-244.

Saeki S, Yamamoto M und Iino Y (2001) Plasticity of chemotaxis revealed by paired presentation of a chemoattractant and starvation in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *J Exp Biol* 204: 1757-1764.

Santagata S, Boggon TJ, Baird CL, Gomez CA, Zhao J, Shan WS et al. (2001) G-protein signaling through tubby proteins. *Science* 292: 2041-2050.

Sanyal S, Wintle RF, Kindt KS, Nuttley WM, Arvan R, Fitzmaurice P et al. (2004) Dopamine modulates the plasticity of mechanosensory responses in *Caenorhabditis elegans*. *EMBO J* 23: 473-482.

Saudou F, Amlaiky N, Plassat JL, Borrelli E und Hen R (1990) Cloning and characterization of a *Drosophila* tyramine receptor. *EMBO J* 9: 3611-3617.

Sawin ER, Ranganathan R und Horvitz HR (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.

Segalat L, Elkes DA und Kaplan JM (1995) Modulation of serotonin-controlled behaviors by Go in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 267: 1648-1651.

Schinkmann K und Li C (1992) Localization of FMRFamide-like peptides in *Caenorhabditis elegans*. *J Comp Neurol* 316: 251-260.

Shingai R (2000) Durations and frequencies of free locomotion in wild type and GABAergic mutants of *Caenorhabditis elegans*. *Neurosci Res* 38: 71-83.

Simmer F, Moorman C, Van Der Linden AM, Kuijk E, Van Den Berghe PV, Kamath R et al. (2003) Genome-wide RNAi of *C. elegans*: Using the hypersensitive rrf-3 strain reveals novel gene functions. *PLoS Biol* 2003 1: E12.

Sombati S und Hoyle G (1984) Generation of specific behaviors in a locust by local release into neuropil of the natural neuromodulator octopamine. *J Neurobiol* 15: 481-506.

Stern M (1999) Octopamine in the locust brain: cellular distribution and functional significance in an arousal mechanism. *Microsc Res Tech* 45: 135-141.

- Stubdal H, Lynch CA, Moriarty A, Fang Q, Chickering T und Deeds JD (2000) Targeted deletion of the tub mouse obesity gene reveals that tubby is a loss-of-function mutation. *Mol Cell Biol* 20: 878-882.
- Sulston JE und Brenner S (1974) The DNA of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 77: 95-104.
- Sulston J, Dew M und Brenner S (1975) Dopaminergic neurons in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *J Comp Neurol* 163: 215-226.
- Timmons L und Fire A (1998) Specific interference by ingested dsRNA. *Nature* 395: 854.
- Thomas JH (1990) Genetic analysis of defecation in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 124: 855-872.
- Thomas JH und Lockery S (1999) Neurobiology. In: *C. elegans: A Practical Approach* (Hrsg.: Hope IA), Oxford University Press, Oxford.
- Trent C, Tsung N und Horvitz HR (1983) Egg-laying defective mutants of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 104: 619-647.
- Tsalik EL und Hobert O (2003) Functional mapping of neurons that control locomotory behavior in *Caenorhabditis elegans*. *J Neurobiol* 56: 178-197.
- Van Den Broeck J, Vulsteke V, Huybrechts R und De Loof A (1995) Characterization of a cloned locust tyramine receptor cDNA by functional expression in permanently transformed *Drosophila* S2 cells. *J Neurochem* 64: 2387-2395.
- Wang J und Kim SK (2003) Global analysis of dauer gene expression in *Caenorhabditis elegans*. *Development* 130: 1621-1634.
- Ward S (1973) Chemotaxis by the nematode *Caenorhabditis elegans*: identification of attractants and analysis of the response. *J Neurosci* 14: 6094-6101.
- Way JC und Chalfie M (1989) The *mec-3* gene of *Caenorhabditis elegans* requires its own product for maintained expression and is expressed in three neuronal cell types. *Genes Dev* 3: 1823-1833.
- Weinshenker D, Garriga G und Thomas JH (1995) Genetic and pharmacological analysis of neurotransmitters controlling egg laying in *C. elegans*. *J Neurosci* 10: 6975-6985.
- White JG, Southgate E, Thomson JN und Brenner S (1986) The structure of the nervous system of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Phil Trans Roy Soc London* 314: 1-340.
- Wicks SR und Rankin CH (1996) The integration of antagonistic reflexes revealed by laser ablation of identified neurons determines habituation kinetics of the *Caenorhabditis elegans* tap withdrawal response. *J Comp Physiol* 179: 675-685.

Witte I (2000) Metabotrope Bioamin-Rezeptoren des Nematoden *Caenorhabditis elegans*. Diplomarbeit am Fachbereich Biologie der Universität Hamburg.

Wolf YI, Rogozin IB und Koonin EV (2004) Coelomata and not Ecdysozoa: evidence from genome-wide phylogenetic analysis. *Genome Res* 14: 29-36.

Wood WD (1988) The nematode *Caenorhabditis elegans*. Cold Spring Harbor Lab Press, Cold Spring Harbor, New York.

Yamada Y und Ohshima Y (2003) Distribution and movement of *Caenorhabditis elegans* on a thermal gradient. *J Exp Biol* 206: 2581-2593.

Zhao B, Khare P, Feldman L und Dent JA (2003) Reversal Frequency in *C. elegans* Represents an Integrated Response to the State of the Animal and Its Environment. *J Neurosci* 23: 5319-5328.

Zheng Y, Brockie PJ, Mellem JE, Madsen DM und Maricq AV (1999) Neuronal control of locomotion in *C. elegans* is modified by a dominant mutation in the GLR-1 ionotropic glutamate receptor. *Neuron* 24: 347-361.

Die folgenden Seiten enthalten eine tabellarische Auflistung aller im Rahmen der vorliegenden Arbeit identifizierten Zellen, die den Tyraminrezeptor oder den Transkriptionsfaktor TUB-1 exprimieren. Ebenfalls aufgelistet sind die Zellen, die Octopamin und/oder Tyramin enthalten (Alkema, pers. Mitteilung).

Desweiteren sind den jeweiligen Zellen weitere Informationen über Funktion, Transmitterinhalt, Rezeptorbesatz und Konnektivität beigelegt, welche den derzeitigen Wissensstand dokumentieren. Als Quellen hierfür dienten überwiegend die Veröffentlichung von White et al. (1986) sowie die WWW-Datenbanken wormbase.org und wormatlas.org (Stand: April 2004). Zur Ergänzung wurden weitere Publikationen herangezogen (Brockie et al., 2001a und 2001b; Duerr et al., 1999; Forrester und Garriga, 1997; Schinkmann und Li, 1992).

Zellen, welche den Tyraminrezeptor exprimieren								
Zelltyp	Name (Anzahl)	Beschreibung	Funktion	Transmitter	zusätzliche Rezeptoren	Eingänge	Ausgänge	Gap-Junctions
Interneuronen	AIY (2)	Amphid-Interneuron	Integration sensorischer Eingänge; u.a. bei Thermotaxis	Acetylcholin NPR-1-Ligand FLP-18	Glutamatrezeptor-UE glr-5 und -7	AFD, ASE, AWC	AIZ, RIA, ASE	RIM
	AIY (2)	Amphid-Interneuron	Integration sensorischer Eingänge; u.a. bei Thermotaxis	?		ADF, AIY, AWA, AWB	RIA, RIM, DVA, AVE, AIB, RIG, SMB	ASG, ASH
	ALN/PLN (2x2)	Somata im Lumbarganglion, Fortsätze in das Ringneuropil und in die Schwanzspitze	?	Acetylcholin	Dopaminrezeptor dop-1		ADE, SMD, SMB	SMB
	AUA (2)	Fortsätze verlaufen entlang denen der Amphidneurone	?	Glutamat Neuropeptid FLP-18	Glutamatrezeptor-UE glr-4 Neuropeptid-Y- Rezeptor npr-1	ADF, IL2, URX, DVA	RIA, RIB, AVA	
	AVH (2)	postsynaptisch im VNC präsynaptisch im Ringneuropil	?	?	Glutamatrezeptor-UE glr-4 Glycin-/GABA-ähnlicher Rezeptor ggr-1	ADF, PVP, URX	RIC, RIM, URX, AVB, AVJ, RIR	
	BDU (2)	lateral gelegene Somata, Fortsätze verlaufen entlang des Exkretionskanals		Neuropeptide NLP-1 und NLP-15	Glutamatrezeptor-UE glr-8	ALM, AVM, CEP, PVN	ADE, HSN, PVC, PVN, RIM	
	DVA (1)	Soma im Dorsorektalganglion, Fortsatz zum Ringneuropil	Mechanosensorische Integration	?	Glutamatrezeptor-UE glr-4 und-5 Glycin-/GABA- ähnlicher Rezeptor ggr-3 NMDA-Rezeptor nmr-1 nAChR?	AIZ, RID, SDQ,	AQR, AVA, AVE, RIA, SMB,	AVB, DBI
	LUA (2)	Somata im Lumbarganglion	verbindet mechanorezeptive PLM-Neuronen und AVA/AVD	Glutamat Neuropeptid NLP-13	Glutamatrezeptor-UE glr-5 IP3-Rezeptor itr-1	AVA	AVA, AVD, PVC	PLM

Zelltyp	Name (Anzahl)	Beschreibung	Funktion	Transmitter	zusätzliche Rezeptoren	Eingänge	Ausgänge	Gap-Junctions
	PVC (2)	Somata im Lumbarganglion	Initiiert die vorwärtsgerichtete Lokomotion	?	Glutamatrezeptor-UE glr-1, glr-2 NMDA-Rez. nmr-1 u.2 nAChR?	ALM, AVM, PVP, AQR, LUA, DVA, PHB, PHC, PVD, CAN	AVB, AVD, RID, AVA, B-Typ Motoneurone	
	PVD (2)	lateral gelegene Somata, Fortsätze verlaufen entlang des Exkretionskanals	mechanosensorische Eigenschaften (Streckrezeptor?)	Glutamat Neuropeptid NLP-11	Glutamatrezeptor-UE glr-4 nAChR-UE des-4 und deg-3	PVC	PVC, AVA, DVA	
	PVT (1)	Soma im Präanalganglion Fortsatz zum Ringneuropil	?	?	Serotoninrezeptor ser-4	PVN, PVW		PVP
	RIA (2)	Ringinterneurone	Integration sensorischer Eingänge	?	Glutamatrezeptor-UE glr-2, -3, -6 Dopaminrezeptor dop-2	ADE, AIZ, AIY, AUA, DVA, AQR, URX, RIB, ASH, AWB, ASE, AWC	SMD, RMD, AVA	
	RIC (2)	Ringinterneurone	?	Octopamin und Tyramin	Glutamatrezeptor-UE glr-5	CEP, OLQ, URB, URX	AVA, CEP, RIM, RIV, SMD	ASH
	SABD (1)	Ringinterneuron mit subdorsal gelegenen, anterior ausgerichteten Fortsätzen	?	Acetylcholin	Glutamatrezeptor-UE glr-4 exzitatorischer GABA-Rezeptor exp-1	AVD, AVE, AVA	Während der Larvalstadien mit neuromuskulären Synapsen auf anterioren Hyp MU	A-TYP Motoneurone
	SABV (2)	Ringinterneurone mit sublateral gelegenen, anterior ausgerichteten Fortsätzen	?	Acetylcholin	Glutamatrezeptor-UE glr-5	AVD, AVE, AVA	Während der Larvalstadien mit neuromuskulären Synapsen auf antHyp MU	A-TYP Motoneurone
	SDQL	lateral gelegenes Interneuron mit posterior gelegenen Soma	?	Acetylcholin	Neuropeptid-Y Rezeptor npr-1	ALM	AVA, RIC	
	SDQR	lateral gelegenes Interneuron mit anterior gelegenen Soma	?	Acetylcholin	Neuropeptid-Y Rezeptor npr-1	BDU	AVA, AVB, DVA	

Zelltyp	Name (Anzahl)	Beschreibung	Funktion	Transmitter	zusätzliche Rezeptoren	Eingänge	Ausgänge	Gap-Junctions
	SIAD (2)	Ringinterneurone mit sublateral gelegenen, posterior ausgerichteten Fortsätzen	?	Acetylcholin	Glycin-/GABA- ähnlicher Rezeptor ggr-2 Dopaminrezeptor dop-2	CEP, RIA		RIB
	SIAD (2)	Interneurone mit sublateral gelegenen posterior ausgerichteten Fortsätzen	?	Acetylcholin	Glycin-/GABA- ähnlicher Rezeptor ggr-2 Dopaminrezeptor dop-2	CEP, RIA		RIB
Motoneuronen	RID (1)	Ringmotoneuron	innerviert die dorsalen Hypodermalmuskeln	?	exzitatorischer GABA-Rezeptor exp-1 Dopaminrezeptor dop-2	PVC	DDn dorsale Muskeln	AVB, ALA
Pharynx-motoneuronen	NSM (2)	Fortsätze verlaufen vom anterioren bis zum posterioren Bulbus entlang der Basallamina, die das Pseudocoel umschließt	neurosekretorisch Mechanorezeption von Bakterien im inneren des Pharynx – notwendig für esl Pharynxkontraktion?	Serotonin Glutamat Neuropeptide NLP-3,-13,-18,-19	Glutamatrezeptor-UE glr-7 und -8	–	?	?
	M5 (1)	Im terminalen Bulbus gelegen	Pharynxkontraktion?	Acetylcholin	?	–	?	?
Motoneuronen des ventralen Nervenstrangs	ASn (?)	innervieren die dorsalen Muskeln	exzitatorische Wirkung auf die Muskeln	Acetylcholin	itr-1?	AVA, AVB, AVD, AVE	dorsale Muskeln VDn	untereinander
	DAn (?)	innervieren die dorsalen Muskeln	exzitatorische Wirkung auf die Muskeln	Acetylcholin	itr-1?	AVA, AVD, AVE PHC (nur DA9) DVB (nur DA8)	dorsale Muskeln VDn	SAB, untereinander
	DDn (6)	innervieren die dorsalen Muskeln	inhibitorische Wirkung auf die Muskeln	GABA	Neuropeptid-Y-Rezeptor npr-1 Glycin-/GABA-ähnlicher Rezeptor ggr-2 itr-1?	VAn VBn VCn	dorsale Muskeln	VDn
	VCn (6)	hermaphroditenspezifisch, innervieren die ventralen Muskeln	exzitatorische Wirkung auf die Muskeln	Acetylcholin Serotonin (nur 4&5)	Glutamatrezeptor-UE glr-5 itr-1?	HSN	vm2 Vulvamuskeln (nur VC4&5) HSN ventrale Muskeln DDn, VDn DVB (nur VC5)	vm2 untereinander

Zelltyp	Name (Anzahl)	Beschreibung	Funktion	Transmitter	zusätzliche Rezeptoren	Eingänge	Ausgänge	Gap-Junctions
	VDn (13)	innervieren die ventralen Muskeln	inhibitorische Wirkung auf die Muskeln	GABA	Neuropeptid-Y-Rezeptor npr-1 itr-1?	DAn DBn ASn	ventrale Muskeln	PVP, DDn
Hypodermalmuskeln	anterior (Hals) (16)	Die 16 posterior der Kopfmuskeln liegenden Muskeln; gestaffelt angeordnet in jedem der 4 Quadranten des Körpers	Kopfbewegungen, aBoc	-	?	RIM, Ringmotoneurone, VNC-Motoneurone	-	untereinander
Pharynxmuskeln	pm1 (1)	1 syncytiale Zelle mit 6 Nuclei	Pharynxpumpen	nlp-3	Neuropeptid-Y-Rezeptor npr-1 Serotoninrezeptor ser-1	M1	-	?
	pm6 (3)		Pharynxpumpen	nlp-8	Neuropeptid-Y-Rezeptor npr-1 Serotoninrezeptor ser-1 IP3-Rezeptor itr-1	M5	-	?
männchenspezifische Expression								
Motoneuronen	CP1-6 (6)	serotonerge Motoneuronen	?	Serotonin	?	?	?	?
	CP7 und 8 (2)	?	?	?	?	?	?	?
Hypodermalmuskeln	posterior	dorsal und ventral	Lokomotion Paarung?	?	?	?	?	?
	männchen-spezifische diagonale Muskeln		Paarung	?	?	?	?	?

Zellen, die Tyramin/Octopamin enthalten								
Zelltyp	Name (Anzahl)	Beschreibung	Funktion	Transmitter/ Neurohormon	Rezeptorbesatz	Eingänge	Ausgänge	Gap-Junctions
Interneuron	RIC (2)	Ringinterneuron	Lokomotion?	Octopamin, Tyramin,	Glutamatrezeptor-UE glr-5	CEP, OLQ, URB, URX	AVA, CEP, RIM, RIV, SMD	ASH
Motoneuron	RIM (2)	Ringmotoneuron	Lokomotion, Kopfbewegungen	Acetylcholin, Tyramin, NPR-1-Ligand FLP-18	Glutamatrezeptor-UE glr-1,-4 und -5 NMDA-Rezeptoren nmr-1 und nmr-2	AIB, AIZ, BDU, HSN, RIC, RIS, SAAD, SAAV	AVA, AVB, RMD, SMD, RIB, SAAD, SAAV	AIB, AIY, AVB, AVE, RIS
Nicht-neuronal	uv (4)		sekretorisch	Tyramin				
	myogene Hüllzellen der Gona- denarne		Ovulation	Tyramin und Octopamin				

Zellen, die TUB-1 exprimieren								
Zelltyp	Name (Anzahl)	Beschreibung	Funktion	Transmitter	Rezeptorbesatz	Eingänge	Ausgänge	Gap-Junctions
sensorische Neuronen	ADL (2)	Amphid-Neuron	chemo- und odorsensorisch (aversive Stimuli)	Neuropeptide NLP-7, -8, -10	osm-9, ocr-1, ocr-2, sre-1, sro-1, srb-6	–	AIA, AIB	OLQ
	AFD (2)	Amphid-Neuron	thermosensorisch	Neuropeptide NLP-7, -21	?	AIN, AWA	A1Y	AIB
	ASE (2)	Amphid-Neuron	chemosensorisch (attraktive Stimuli)	Neuropeptide NLP-3, -7, -14	gcy -5, gcy-6, gcy -7, osm-9, npr-1	AIN, AWA, ASI	AWC, A1Y, AIA, AIB, RIA	–
	ASG (2)	Amphid-Neuron	chemosensorisch (attraktive Stimuli) Eintritt in das Dauerstadium	?	osm-9, npr-1	AIM	AIA, AIB	AIZ, AIN
	ASH (2)	Amphid-Neuron	chemosensorisch odorsensorisch mechanosensorisch (aversive Stimuli)	Glutamat Neuropeptide NLP-3, -15	osm-9, ocr-2, sra-6, srb-6, npr-1	–	AIA, AIB, RIA, AVA, AVB, AVD	AIZ, RIC, ADA, RMG
	ASI (2)	Amphid-Neuron	chemosensorisch Eintritt in das Dauerstadium	Neuropeptide NLP-1, -5, -6, -7, -9, -14, -18, -24, -27	srd-1, str-2, str-3, daf-11	–	AIA, AIB, AWC, ASE	–
	ASJ (2)	Amphid-Neuron	chemosensorisch Verlassen des Dauerstadiums	Neuropeptid NLP-3	osm-9, sre-3, daf-11	AIM	PVQ, ASK	ASK
	ASK (2)	Amphid-Neuron	chemosensorisch odorsensorisch	Glutamat NLP-8, -10, -14	osm-9, sra-7, sra-9, srg-2, srg-8, daf-11	ASJ, PVQ, AIM	AIA	ASJ, PVQ
	AWA (2)	Amphid-Neuron	chemosensorisch odorsensorisch	?	ocr-1, ocr-2, odr-10, osm-9	–	A1Y, AIZ, AFD, ASE	AIA
	AWB (2)	Amphid-Neuron	odorsensorisch (aversive Stimuli)	Neuropeptide NLP-3, -9	str-1, daf-11	–	AIZ, ADF, RIA, AVB	AUA, RMG
	AWC (2)	Amphid-Neuron	chemosensorisch odorsensorisch	Neuropeptid NLP-3	osm-9, daf-11, str-2	ASE, ASI	A1Y, AIA, AIB	–

Zelltyp	Name (Anzahl)	Beschreibung	Funktion	Transmitter	Rezeptorbesatz	Eingänge	Ausgänge	Gap- Junctions
sensorische Neuronen	ADE (2)	anteriore Deitrid-Neuronen	Mechanorezeption basal slowing response	Dopamin	?	BDU, FLP, AVM, IL2	RIG, AVA, OLL, CEP	AVK
	PDE (2)	posteriore Deitrid-Neuronen	Mechanorezeption basal slowing response	Dopamin	Dopaminrezeptor dop-2	PVM, PLN, AVK	DVA, AVK	PVC, PVM
	PHA (2)	Phasmid-Neuron	chemosensorisch (aversive Stimuli)	Neuropeptide NLP-7, -21	gcy-12, osm-9, ocr-2, srg-13, strb-6, npr-1	–	PHB, AVG, PVQ, DVA, AVF, AVH	PVP
	PHB (2)	Phasmid-Neuron	chemosensorisch (aversive Stimuli)	Neuropeptid NLP-1	osm-9, ocr-2, strb-6, npr-1	PHA	PVC, AVA, AVD	AVH
	AQR (1)	Soma ragt in das Pseudocoelom	NP-Y gesteuertes 'Sozialverhalten'	?	npr-1, gcy-32	DVA	RIA, PVC, AVA, AVB, AVD, BAG	PVP, AVK, RIG
	PQR (1)	Soma ragt in das Pseudocoelom	NP-Y gesteuertes 'Sozialverhalten'	?	npr-1, gcy-32	LUA, PVN, AVD	LUA, PVN, AVA, AVD	PVP
	URX (2)	Soma ragt in das Pseudocoelom	NP-Y gesteuertes 'Sozialverhalten'	?	npr-1	URB, RIR, RIG, AVB, AVE	RIA, AUA, RIC	AUA, RMG, IL2
männchenspezifische Expression								
sensorische Neuronen	HOA (1)	innerviert das Hakensensillum	Ertastung der Vulva bei der Paarung	?	?	?	?	?
	HOB (1)	innerviert das Hakensensillum	Ertastung der Vulva bei der Paarung	?	?	?	?	?
	SPD (2)	innervieren die Spicula	Ertastung der Vulva bei der Paarung	?	?	?	?	?
	SPV (2)	innervieren die Spicula	Ertastung der Vulva bei der Paarung	?	?	?	?	?
	RA oder RB 1-9 (18)	innervieren die Caudalpapillen	Abtasten des Hermaphroditen bei der Paarung	?	?	?	?	?