

Expressions- und Funktionsanalysen von „Tetraspan Vesicle Membrane Proteins“ in *Caenorhabditis elegans*

*Dissertation
zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften
am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg Universität*

in Mainz

von

Christian Abraham

geboren in Lahnstein

Mainz, April 2007

*Das Schönste, was wir erleben können, ist das Geheimnisvolle.
(The most beautiful experience we can have is the mysterious.)*

Albert Einstein (*14.03.1879-†18.04.1955)

-deutscher Physiker und Nobelpreisträger-

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	1
2	Einleitung	2
2.1	Exo- und Endozytose von synaptischen Vesikeln	2
2.1.1	Molekularer Mechanismus der Exozytose	3
2.1.2	Recycling der SNARE-Komponenten und der Vesikelmembran	5
2.2	Tetraspan vesicle membrane proteins (TVPs)	8
2.3	TVPs in Säugetieren	8
2.3.1	Synaptophysin 1 und Synaptoporin (Synaptophysin 2)	8
2.3.2	Synaptogyrin 1-4	10
2.3.3	Pantophysin und Mitsugumin 29	10
2.3.4	SCAMP 1-5	11
2.4	TVPs in <i>Caenorhabditis elegans</i>	11
2.5	<i>C. elegans</i> als Modellorganismus	12
2.5.1	Entwicklung von <i>C. elegans</i>	14
2.5.2	Das Nervensystem von <i>C. elegans</i>	15
2.5.3	Fortbewegung von <i>C. elegans</i>	16
2.5.4	Defäkation von <i>C. elegans</i>	17
2.5.5	Eiablage von <i>C. elegans</i>	17
2.5.6	Wahrnehmung von Umweltreizen	18
2.6	Zielsetzung	19
3	Material und Methoden	20
3.1	Materialien	20
3.2	Puffer und Nährmedien	25
3.3	DNA-Oligonukleotide	27
3.4	Plasmide und Cosmide	29
3.4.1	Plasmide	29
3.4.2	Cosmide	29
3.5	Restriktionsendonukleasen	29
3.6	Antikörper	29
3.7	Bakterienstämme und Kultivierung	31
3.7.1	Kultivierung von XL1-Blue und DH5 α	31
3.7.2	Kultivierung von HB101	31
3.7.3	Herstellung kompetenter Bakterien	32
3.8	<i>C. elegans</i> Stämme	32
3.9	<i>C. elegans</i> Stammhaltung	32
3.10	Cholesterinfreie NGM-Platten	32
3.11	Kryokonservierung und Auftauen von <i>C. elegans</i> Stämmen	33
3.12	Generierung von <i>C. elegans</i> Männchen	33

Inhaltsverzeichnis

3.13	Herstellung stadiensynchroner <i>C. elegans</i> Kultur	33
3.14	Herstellung stadiensynchroner <i>C. elegans</i> Flüssigkultur	34
3.15	Zellkultur	34
3.15.1	Zelllinien	34
3.15.2	Kryokonservierung und Auftauen von Zellen	34
3.15.3	Passagieren von Zellen	35
3.15.4	Zellbewachsene Deckgläser	35
3.15.5	Transiente Transfektion	35
3.15.6	Fixierung	36
3.16	Immunozytochemie	36
3.17	<i>C. elegans</i> Mikroskopie	37
3.17.1	Konfokale Laserscanmikroskopie	37
3.17.2	Elektronenmikroskopie	37
3.18	Agarosegelelektrophorese von DNA	37
3.19	Southern-Blot-Hybridisierung	38
3.20	Einzeltieranalyse (Duplex PCR)	39
3.21	RT-PCR	40
3.21.1	Probenvorbereitung	40
3.21.2	RT und PCR	40
3.21.3	Sequenzierung	41
3.22	Cladogramm	41
3.23	Klonierung	42
3.23.1	Plasmid-Konstrukte für die Mikroinjektion	42
3.23.2	Ligation	42
3.23.3	Transformation von Bakterien	42
3.24	RNAi	43
3.25	Aufreinigung von synaptischen Vesikeln	43
3.26	Isolierung von Synaptosomen	44
3.27	Proteinkonzentrationsbestimmung	44
3.27.1	Proteinfällung (Chloroform-Methanol)	44
3.27.2	Bradford	44
3.28	Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)	45
3.29	Coomassie-Färbung	45
3.30	Immuno-Blot und Immunodetektion	45
3.31	Immuno-Blot	45
3.31.1	Immunodetektion	46
3.32	Ponceau-S Färbung	47
3.33	Dot-Blot	47

Inhaltsverzeichnis

3.34	Photoaffinitätsmarkierung	47
3.35	Verpaarungen	48
3.36	Mikroinjektion	48
3.37	Färbung der Amphide und Phasmide	49
3.38	Elektrophysiologie	49
3.39	<i>C. elegans</i> Testverfahren zur Analyse neuronaler Mutanten	49
3.39.1	Berührungstest	50
3.39.2	Lokomotion	50
3.39.3	Defäkationszyklus	50
3.39.4	Pharyngeale Pumpbewegung	50
3.39.5	Brutgröße	50
3.39.6	Thermotaxis	50
3.39.7	Chemotaxis	51
3.39.8	Adaptation	52
3.39.9	Osmotisches Vermeidungsverhalten	53
3.39.10	Radialer Aldicarb Test	53
3.39.11	Pentylentetrazol (PTZ) Test	54
4	Ergebnisse	55
4.1	Phylogenetische Abstammung der <i>C. elegans</i> TVPs	55
4.1.1	Molekulare Analyse des 5'-Endes von Synaptophysin (<i>sph-1</i>)	55
4.1.2	Erstellung eines Cladogramms der TVPs von <i>C. elegans</i> und <i>Mus musculus</i>	57
4.2	Aufreinigung und Charakterisierung von Antikörpern gegen <i>C. elegans</i> TVPs	59
4.2.1	Aufreinigung und Titerbestimmung im Dot-Blot	59
4.2.2	Verteilung der <i>C. elegans</i> TVPs in humanen Zellen	60
4.2.3	Detektion der ektopisch exprimierten <i>C. elegans</i> TVPs mit den Antikörpern	61
4.2.4	Nachweis der TVPs mit den Antikörpern in <i>C. elegans</i>	65
4.3	Subzelluläres Verteilungsmuster in PLC-Zellen	66
4.4	Verteilung der TVPs in <i>C. elegans</i>	67
4.4.1	Verteilungsmuster im adulten <i>C. elegans</i> Stadium	67
4.4.2	Verteilung der TVPs in verschiedenen embryonalen Entwicklungsstadien von <i>C. elegans</i>	76
4.5	Expression der <i>C. elegans</i> TVPs in unterschiedlichen Geweben	79
4.6	Die <i>C. elegans</i> TVP-Mutanten	80
4.6.1	Isolierung der TVP-Mutanten	80
4.6.2	Charakterisierung der TVP-Mutanten durch PCR-Analyse	81
4.6.3	Charakterisierung der TVP-Mutanten mit Hilfe der Southern-Blot Methode	82
4.7	Verhaltensstudien an der TVP-Dreifachmutante	83
4.7.1	Lokomotion	83
4.7.2	Mechanozeption	84
4.7.3	Pharyngeale Pumpbewegung	84
4.7.4	Defäkationszyklus	85
4.7.5	Chemotaxis	85
4.7.6	Adaptationsverhalten	86
4.7.7	Lernverhalten von <i>C. elegans</i>	86

Inhaltsverzeichnis

4.7.8	Osmotisches Vermeidungsverhalten	87
4.8	Entwicklung	88
4.9	Die Rolle von Cholesterin	89
4.10	Nervensystem	90
4.10.1	Neuronale Entwicklung	90
4.10.2	Verteilung von Synaptobrevin in der <i>C. elegans</i> TVP-Dreifachmutante	92
4.10.3	Ultrastruktur von Synapsen der TVP-Dreifachmutante	93
4.10.4	Aldicarb Resistenz	95
4.10.5	Elektrophysiologie	96
4.11	PTZ-Sensitivität	97
4.11.1	PTZ-Sensitivität der TVP-Dreifachmutante und TVP-Einzelmutanten	97
4.11.2	Induktion der PTZ-Sensitivität durch <i>sng-1</i> RNAi	99
4.11.3	„Rettung“ des PTZ-Phänotyps durch Mikroinjektion von <i>Psng-1:sng-1</i>	100
5	Diskussion	102
5.1	Die TVPs in <i>C. elegans</i> sind mit denen der Maus verwandt	103
5.2	Ektopisch in PLC-Zellen synthetisierte <i>C. elegans</i> TVPs sind vesikulär verteilt	103
5.3	Die <i>C. elegans</i> TVPs werden in unterschiedlichen Geweben exprimiert	104
5.3.1	Verteilungsmuster von Synaptophysin (SPH-1) in <i>C. elegans</i>	104
5.3.2	Verteilungsmuster von Synaptogyrin (SNG-1) in <i>C. elegans</i>	105
5.3.3	Verteilungsmuster von SCAMP (SCM-1) in <i>C. elegans</i>	105
5.3.4	Die <i>C. elegans</i> TVPs zeigen eine vesikuläre Verteilung	108
5.3.5	Es gibt Unterschiede in der Verteilung der Transkriptions- und Translationschimären	108
5.4	Die TVPs werden früh in der Entwicklung von <i>C. elegans</i> exprimiert	109
5.4.1	Expression von Synaptophysin (SPH-1) in verschiedenen Entwicklungsstadien	109
5.4.2	Expression von Synaptogyrin (SNG-1) in verschiedenen Entwicklungsstadien	109
5.4.3	Expression von SCAMP (SCM-1) in verschiedenen Entwicklungsstadien	109
5.5	Es gibt Gewebe in <i>C. elegans</i>, in denen keine TVPs exprimiert werden	110
5.6	Die Entwicklung der TVP-Mutanten ist auch in Abwesenheit von Cholesterin normal	110
5.7	Die Struktur der synaptischen Vesikel in den TVP-Mutanten ist normal	111
5.8	In der TVP-Dreifachmutante sind die Vesikel in cholinergen Synapsen normal verteilt	112
5.9	Hinweise auf eine mögliche Funktion der TVPs in einem alternativen Endozytoseweg	112
5.10	Keine Veränderungen in der neuronalen Entwicklung der TVP-Dreifachmutante	112
5.11	Die TVP-Mutanten zeigen eine normale Synaptobrevinverteilung an den Synapsen	113
5.12	Unter normalen Bedingungen zeigen TVP-Mutanten keinen neuronalen Phänotyp	113
5.13	Die cholinergen Motoneurone der TVP-Mutanten zeigen elektrophysiologisch normale Antworten	114
5.14	TVP-Mutanten zeigen eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber PTZ	114
5.15	Schlussfolgerung	116

Inhaltsverzeichnis

6	Referenzen	118
7	Anhang	129
7.1	Abkürzungsverzeichnis	129
7.2	Taxonomie von <i>Caenorhabditis elegans</i>	133
7.3	Webseiten	133
7.4	<i>C. elegans</i> Stämme	133
7.5	Datenbanknummern	135
7.6	Vektorkarten	136
7.7	Abbildungsverzeichnis	139
7.8	Tabellenverzeichnis	140
7.9	Formelverzeichnis	140
7.10	CD-Verzeichnis	141
7.11	Filmunterschriften	141

1 Zusammenfassung

Tetraspan vesicle membrane proteins (TVPs) sind ubiquitäre Komponenten von Transportvesikeln. Bei den Säugetieren unterscheidet man drei Familien, die Physine, Gyriane und SCAMPs (*secretory carrier-associated membrane proteins*). Ihre Funktion ist weitgehend unbekannt, es wird jedoch vermutet, dass sie eine Rolle bei der Vesikelbildung und der Vesikelrezirkulierung spielen. In *Caenorhabditis elegans* existiert von jeder Familie jeweils nur ein einziges Polypeptid: für die Physine Synaptophysin (SPH-1), für die Gyriane Synaptogyrin (SNG-1) und für die SCAMPs SCAMP (SCM-1). Ziel der Arbeit war es die Verteilung der *C. elegans* TVPs zu untersuchen und ihre Funktion unter besonderer Berücksichtigung der vesikelvermittelten synaptischen Kopplung zu bestimmen.

Wenn die *C. elegans* TVPs in humanen Epithelzellen synthetisiert werden, lokalisieren sie in zytoplasmatischen Vesikeln. In Kotransfektionsexperimenten wurde gezeigt, dass sie größtenteils in den gleichen Strukturen enthalten sind. In *C. elegans* synthetisierte TVP-Reporterkonstrukte können in unterschiedlichen Geweben nachgewiesen werden. Dabei ist SNG-1 fast ausschließlich in Neuronen zu finden. SPH-1 und SCM-1 hingegen weisen komplexe und teilweise überlappende Verteilungsmuster auf. Während für SPH-1 eine starke Fluoreszenz im Pharynx, auf der apikalen Seite der Darmzellen oberhalb des sog. *terminal webs* und in adluminalen Regionen von exkretorischen Geweben gefunden wurde, war SCM-1 stark in der Muskulatur und den Coelomozyten vertreten. Die Expression von SCM-1 in Pharynx und Darm war deutlich schwächer. Die *C. elegans* TVPs werden früh in der Entwicklung ab der Gastrulation (SPH-1 und SCM-1) bzw. ab der Neurulation im sog. Komma-Stadium (SNG-1) produziert.

Um die Funktion der TVPs in *C. elegans* zu untersuchen, wurden TVP-Mutanten analysiert. Durch Kombination aller drei TVP-Gen-Mutanten wurden TVP-Dreifachmutanten generiert. Diese wiesen keinen offensichtlichen Defekt im Bewegungsmuster auf, entwickelten sich normal und bildeten ein normales Nervensystem aus. Auch auf unterschiedliche chemische und physikalische Reize in sensorischen Tests reagierten die TVP-Dreifachmutanten in gleicher Weise wie Wildtyptiere. Ebenso zeigen die TVP-Dreifachmutanten elektrophysiologisch unter normalen Bedingungen keine anormalen Reaktionsmuster. In ultrastrukturellen Untersuchungen wurde lediglich eine signifikant erhöhte Anzahl Clathrin-ummantelter Vesikel in cholinergen Synapsen gefunden. Erst unter Stressbedingungen, hervorgerufen durch den GABA-Antagonisten Pentylentetrazol (PTZ), wiesen sowohl die TVP-Dreifach- als auch die TVP-Einzelmutanten eine deutlich erhöhte Krampfbereitschaft auf. Zusammengefasst zeigen die Analysen, dass TVPs zwar für grundlegende neuronale Prozesse nicht notwendig sind, dass sie aber auf der anderen Seite vermutlich an alternativen redundanten Wegen der Neurotransmitterfreisetzung beteiligt sind.

2 Einleitung

Das Säugetiergehirn enthält eine enorme Anzahl an Neuronen, die ein komplexes Netzwerk bilden und darüber kommunizieren. Die Synapse ist die Verbindung, über die Neurone miteinander in Kontakt treten und Informationen austauschen. Dabei unterscheidet man zwei Typen von Synapsen, die elektrischen und chemischen. Die elektrischen Synapsen (sog. *gap junctions*) ermöglichen eine Zell-Zell-Verbindung über interzelluläre spannungsgesteuerte Kanäle, so dass ein direkter Austausch von kleinen Metaboliten (Molekülen < 1 kDa), *second messenger* und elektrischen Signalen erfolgen kann⁹⁵. Diese Kanäle werden von Molekülen mit vier Transmembrandomänen, den Connexinen gebildet, die zu einem homo- oder heteromeren Hexamer (*connexons*, *hemichannels*) oligomerisieren. Zwei sich auf der Plasmamembran gegenüberliegende *connexons* bilden eine homo- oder heterotypische *gap junction* mit einem Kanaldurchmesser von ca. 2 nm⁹⁵.

An chemischen Synapsen hingegen werden elektrische in chemische Signale umgewandelt und über komplexe Mechanismen an die nachfolgende Zelle übertragen. Diese Form der neuronalen Kommunikation oder Neurotransmission wird durch Neurotransmitterfreisetzung vermittelt, welche aus der Verschmelzung der neurotransmittertragenden Vesikel mit der Plasmamembran der Präsynapse resultiert. Dabei wird der Neurotransmitter in den synaptischen Spalt freigesetzt und kann mit dem entsprechenden Rezeptor der Postsynapse interagieren, wodurch das chemische wieder in ein elektrisches Signal umgewandelt wird. Für die Aufrechterhaltung der interzellulären Informationsübertragung ist es wichtig, dass die Moleküle und Vesikel, die an der Neurotransmission beteiligt sind, zu einem späteren Zeitpunkt wieder zur Verfügung stehen. Dies geschieht durch die anschließende Endozytose, dem *recycling* der synaptischen Vesikel und der Beladung mit Neurotransmitter.

2.1 Exo- und Endozytose von synaptischen Vesikeln

Die synaptischen Vesikel gehören zu den bestuntersuchten Organellen eukaryotischer Zellen²². So konnten zahlreiche synaptische Vesikelproteine ermittelt werden, die an der Regulation der synaptischen Exo- und Endozytose beteiligt sind¹⁵¹. Der „Lebenszyklus“ synaptischer Vesikel kann in drei Hauptaspekte unterteilt werden:

- (a) *de novo* Entstehung synaptischer Vesikel (Vesikel-Biogenese)
- (b) Fusion synaptischer Vesikel mit der präsynaptischen Membran (Exozytose)
- (c) *recycling* synaptischer Vesikelmembran und -proteine (Endozytose)²²

2. Einleitung

Synaptische Vesikel können mehrere Zyklen der Exo- und Endozytose durchlaufen, ohne dass sie retrograd zum Soma zurücktransportiert und neu befüllt bzw. ihre molekularen Komponenten neu sortiert werden müssen¹⁶⁴. Die synaptischen Vesikel verschmelzen bei der Exozytose entweder vollständig mit der präsynaptischen Membran (*full fusion*) und werden dann über Clathrin-vermittelte Endozytose wiedergewonnen^{68, 106}. Alternativ werden transiente Poren mit der präsynaptischen Membran gebildet, durch die der Neurotransmitter freigesetzt wird (*kiss and run*). Dabei kommt es zu keiner Durchmischung mit dem Axolemma und die synaptischen Vesikel stehen somit dem *ready-releasable pool* wieder zur Verfügung⁵¹. Eine Variante ist, dass das angedockte Vesikel an der Membran der aktiven Zone eine Pore bildet, die sich wieder schließt, ohne dass sich das Vesikel dabei von der gedockten Position löst (*kiss and stay*¹⁵¹; siehe Abbildung 2-1).

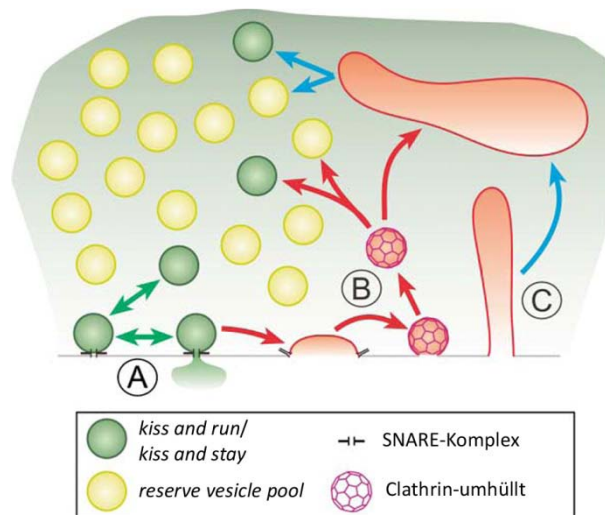


Abbildung 2-1 Hypothetische Fusionsarten und recycling synaptischer Vesikel¹⁰⁵.

Synaptische Vesikel können auf unterschiedliche Arten mit der präsynaptischen Membran fusionieren, um den Neurotransmitter in den synaptischen Spalt freizusetzen. **A**) fest verankertes Vesikel (*priming*) fusioniert nicht vollständig mit der Membran, sondern öffnet nur eine kleine Fusionspore und wird an Ort und Stelle über Clathrin-unabhängige Endozytose wiedergewonnen (*kiss and run*) oder verweilt in einem geschlossenen stationären Zustand (*kiss and stay*). **B**) fest verankertes Vesikel verschmilzt vollständig mit der Plasmamembran (*full fusion*) und die Vesikelmembran und -komponenten werden über Clathrin-vermittelte Endozytose wieder internalisiert. **C**) Vesikelmembran wird über einen Clathrin-unabhängigen Weg zurückgewonnen.

2.1.1 Molekularer Mechanismus der Exozytose

Damit Vesikel nicht unkontrolliert mit der präsynaptischen Membran verschmelzen, wird dieser Vorgang durch viele Moleküle reguliert. Nicht jedes elektrische Signal (Aktionspotential) wird in ein chemisches Signal umgewandelt. Das in der Präsynapse ankommende Signal muss einen bestimmten Schwellenwert erreichen, um in einer „Alles oder Nichts“ Reaktion, ähnlich der Entstehung eines Aktionspotentials am Axonhügel, eine Kaskade von Abläufen auszulösen, die zur Freisetzung des Vesikelinhaltes in den synaptischen Spalt führen. Wird dieser Schwellenwert des ankommenden Aktionspotentials überschritten, so werden spannungsgesteuerte Kalziumkanäle (*voltage-gated Ca²⁺*

2. Einleitung

channels, VGCCs) geöffnet, was zu einem Kalziumstrom in die Präsynapse führt. Der Anstieg des intrazellulären Kalziums setzt den Fusionsvorgang in Gang, der u. a. von Molekülen wie den SNARE-Proteinen (*soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment protein receptors*) auf der Vesikelmembran (v-SNARE/R-SNARE) und der Plasmamembran (t-SNARE/Q-SNARE) reguliert wird. Das v-SNARE synaptischer Vesikel ist Synaptobrevin 2 (VAMP2, *vesicle-associated membrane protein 2*), welches eine essentielle Funktion bei der Vesikelfusion hat¹³⁸. Syntaxin 1 und SNAP-25 (*synaptosome-associated protein of 25 kDa*) gehören zu den t-SNAREs und sind an der Plasmamembran der Präsynapse lokalisiert. Diese drei SNARE-Moleküle (ein v-SNARE und zwei t-SNAREs) bilden den SNARE-Komplex, wodurch das Vesikel an die Plasmamembran angedockt (*docking*) und fest an diese verankert wird (*priming*, Abbildung 2-2). Das verankerte Vesikel kann dabei durch Complexine, die mit dem SNARE-Komplex kalziumabhängig interagieren, stabilisiert werden. Die Fusion des Vesikels mit der Plasmamembran wird durch das vesikuläre Typ-I Transmembranprotein Synaptotagmin 1 reguliert, das als Kalziumsensor fungiert. Durch die Interaktion der einströmenden Ca^{2+} -Ionen mit den C2A- und C2B-Dömanen des Synaptotagmins, ändert dieses seine Konformation und interagiert mit der Zielmembran. Dieser Vorgang bringt die beiden Phospholipid-Doppelschichten noch näher zu einander, so dass es zu einer Fusion der Vesikelmembran mit der Plasmamembran kommt und der Vesikelinhalt freigesetzt wird (Abbildung 2-2).

2. Einleitung

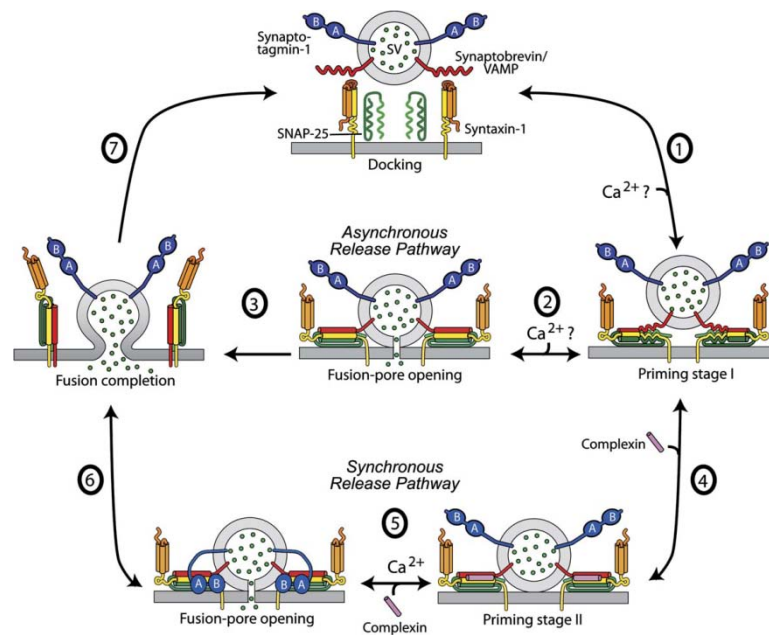


Abbildung 2-2 Hypothetisches Model der SNARE-vermittelten Vesikelfusion ¹⁵⁸.

Für die Fusion der synaptischen Vesikel muss das v-SNARE Synaptobrevin über das t-SNARE SNAP-25 mit dem t-SNARE Syntaxin 1 interagieren und den sogenannten SNARE-Komplex bilden ①. Dabei geht das Vesikel vom gedockten (*docking*) in das fest verankerte Stadium (*priming*) über. Complexine stabilisieren den SNARE-Komplex kalziumabhängig ④. Durch das Öffnen spannungsgesteuerter Kalziumkanäle steigt die intrazelluläre Konzentration von Ca^{2+} -Ionen, welche mit der C2-Domäne (C2A und C2B) des Synaptotagmin 1 interagieren können. Dadurch wird eine Konformationsänderung des Moleküls hervorgerufen, die zur Fusion des Vesikels mit der präsynaptischen Membran ⑤–⑥ (*synchronous release pathway*) führt. Eine andere Hypothese geht von einem Synaptotagmin-unabhängigen Weg, der zur Vesikelfusion führt, aus ②–③ (*asynchronous release pathway*). Anschließend dissoziiert der SNARE-Komplex, so dass die t-SNARE Moleküle für ein weiteres *docking* von Vesikeln zur Verfügung stehen ⑦.

2.1.2 Recycling der SNARE-Komponenten und der Vesikelmembran

Nach der Vesikelverschmelzung müssen die Vesikel sowie v-SNARE und t-SNARE Moleküle wieder recycelt werden. An diesem *recycling* sind verschiedene Moleküle beteiligt. NSF (*N-ethylmaleimide-sensitive factor*) und SNAP (*soluble NSF attachment protein*) sind für die Dissoziation des SNARE-Komplexes verantwortlich. Durch Rekrutierung von Adaptormolekülen (z. B. AP2) kommt es zur Clathrin-vermittelten Endozytose. Für die Loslösung (*fission*) des Vesikels von der Plasmamembran ist die GTPase Dynamin I verantwortlich. Dieses Molekül polymerisiert am „Hals“ des entstehenden Vesikels und schnürt es unter Freisetzung von GDP von der Plasmamembran ab. Anschließend werden die Clathrintriskelien und Adaptormoleküle mit Hilfe anderer katalytischer Proteine (z. B. die ATPase Hsc70 ¹³²) wieder gelöst. Durch Ansäuerung der Vesikel mit Hilfe der Protonenpumpe (V-ATPase), werden die Vesikel über den entstandenen Protonengradienten und dem vesikulären Neurotransmittertransporter wieder mit Neurotransmitter befüllt.

Viele weitere Moleküle sind an der Exozytose, Endozytose und Vesikelbiogenese beteiligt (siehe Abbildung 2-3). Doch ist die Rolle einiger dieser Moleküle in diesen Prozessen noch nicht vollständig

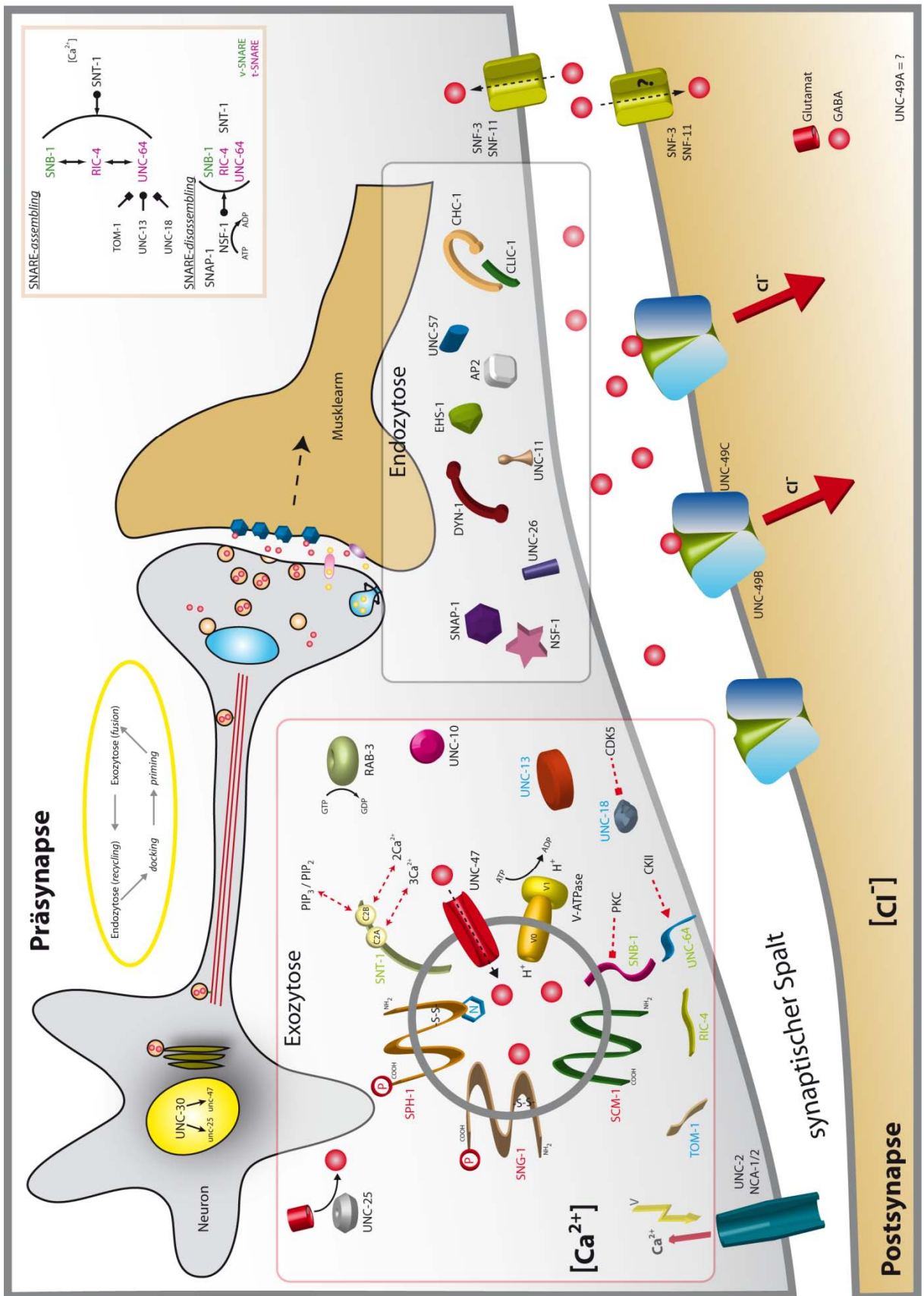
2. Einleitung

geklärt, wie auch die Rolle der auf Vesikeln befindlichen TVPs (*tetraspan vesicle membrane proteins*).

Abbildung 2-3 Komponenten eines GABAergen Neurons in *C. elegans*.

Durch die Aktivität des Transkriptionsfaktors UNC-30 wird die Expression der GABA-spezifischen Gene *unc-25* und *unc-47* induziert. Dabei codiert das translatierte Genprodukt des *unc-25* für die Glutamatdecarboxylase, die Glutamat in γ -Aminobuttersäure (GABA) umwandelt. *Unc-47* hingegen codiert für den vesikulären GABA-Transporter (*vesicular GABA-transporter*, VGAT), der GABA entlang des Protonengradientens, erzeugt von der V-ATPase, in das Vesikel schleust⁸⁸. Die synaptischen Vesikel entstehen am TGN (*trans-golgi network*) und werden anschließend u. a. mit Hilfe des Motorproteins Kinesin über die Mikrotubuli (Minusende nach Plusende) anterograd transportiert. Dort interagieren die Vesikel über Synapsin I (SNN-1) mit dem Aktinzytoskelett und stellen den *ready-releasable pool* dar²⁰ (nicht gezeigt). Die Vesikel durchlaufen verschiedene Stadien, *docking* und *priming*. Dabei interagiert das v-SNARE Synaptobrevin (SNB-1) über das t-SNARE SNAP-25 (RIC-1) mit dem t-SNARE Syntaxin (UNC-64, *SNARE-assembly*). Die SNARE-Komplexbildung wird dabei durch Tomosyn (TOM-1), welches mit RIC-1 und UNC-64 interagiert, reguliert⁶⁰. Verschiedene Kinasen (z. B. PKC, CKII und CDK5) und Moleküle fungieren dabei als Regulatoren (RAB-3, Rim-ortholog UNC-10 usw.). UNC-13 (Munc13) stabilisiert den offenen Zustand von UNC-64 im *priming*-Stadium, in dem es mit der autoinhibierenden N-terminal gelegenen Domäne des UNC-64 interagiert. Während UNC-18 (Munc18-1) mit UNC-64 im geschlossenen Zustand interagieren kann⁵⁸. Durch Einstrom von Ca^{2+} -Ionen in die Präsynapse über den spannungsgesteuerten Kalziumkanal (UNC-2 und NCA-1/2¹³²) steigt die präsynaptische Kalziumkonzentration. Dieser Konzentrationsunterschied wird von dem vesikulären Synaptotagmin (SNT-1) detektiert, wobei Phosphatidylinositolderivate (PIP2 und PIP3) als Co-Aktivatoren für die Ca^{2+} -Bindung dienen¹⁰⁰. Durch Konformationsänderung des SNT-1 kommt es zur Verschmelzung des synaptischen Vesikels mit der Plasmamembran. Der dadurch freigesetzte Neurotransmitter GABA bindet an den postsynaptischen GABA-Rezeptor (UNC-49B/C). Durch die Aktivierung des GABA-Rezeptors kommt es zu einem Einstrom von Cl^- -Ionen. Anschließend wird der Neurotransmitter über den GABA-Transporter (SNF-3 und SNF-11) zurück in die Präsynapse bzw. vermutlich auch in die Postsynapse transportiert^{83, 115}. Die Komponenten des SNARE Komplexes werden mit Hilfe von α -SNAP (SNAP-1) und NSF (NSF-1) wieder befreit (*SNARE-disassembly*)⁷⁷. Die v-SNARE Moleküle und die Membran werden durch Clathrin-vermittelte Endozytose wieder rezirkuliert. An dem *recycling* sind u. a. Synaptojanin (UNC-26), Endophilin A (UNC-57), Adaptorproteine AP2 und AP180 (UNC-11), Clathrin (*clathrin heavy chain* CHC-1 und *clathrin light chain* CLIC-1) sowie Dynamin 1 (DYN-1) beteiligt¹³². Anschließend wird das Vesikel wieder mit Neurotransmitter befüllt oder verschmilzt mit dem Endosom. Die Rollen der vesikulären Moleküle Synaptophysin (SPH-1), Synaptogyrin (SNG-1) und SCAMP (SCM-1) sind noch unbekannt.

2. Einleitung



2.2 Tetraspan vesicle membrane proteins (TVPs)

Tetraspan vesicle membrane proteins (TVPs) sind integrale Membranproteine mit vier Transmembrandomänen, deren N- und C-Termini ins Zytoplasma ragen. Sie sind ubiquitär verteilt und besonders häufig auf Vesikeln lokalisiert. Die TVPs sind in allen Schritten der Vesikelbiogenese, Endo- und Exozytose zu finden. Aufgrund ihrer genomischen Organisation und ihrer Aminosäuresequenz können die TVPs in drei große Familien gruppiert werden: die Physine, Gyri- und SCAMPs (*secretory carrier-associated membrane proteins*). Die Polypeptide der TVPs werden von individuellen Genen codiert und exprimiert. So kommen einige TVP-Vertreter universell in verschiedenen Geweben vor, während andere lediglich in neuronalen und neuroendokrinen Zellen oder der quergestreiften Muskulatur vorhanden sind⁷³.

2.3 TVPs in Säugetieren

Innerhalb der Säugetiere gehören die TVPs Synaptophysin 1, Synaptoporin (auch als Synaptophysin 2 bekannt), Pantophysin und Mitsugumin 29 zu den Physinen, Synaptogyrin 1-4 zu den Gyri- und SCAMP 1-5 zu den SCAMPs. Mitglieder jeder Familie weisen dabei ein zelltypisches Expressionsmuster auf. TVP-Orthologe wurden in einer Reihe vielzelliger Organismen gefunden. Sie bilden multimere Komplexe und werden u. a. durch Phosphorylierung modifiziert⁷³.

2.3.1 Synaptophysin 1 und Synaptoporin (Synaptophysin 2)

Synaptophysin 1 ist das Hauptprotein synaptischer Vesikel und SLMVs (*synaptic-like microvesicles*)^{78, 117, 171}. Auf einem einzigen synaptischen Vesikel sind durchschnittlich 31,5 Kopien des Synaptophysin 1 zu finden¹⁵⁶. Das Gen Synaptophysin 1 ist in Mensch, Maus und Ratte auf dem X-Chromosom lokalisiert^{119, 155} und besitzt ein zusätzliches Intron in der 3'-nichttranslatierten Region^{12, 119}. Studien an *Xenopus laevis* Oozyten führten zur Annahme, dass Synaptophysin eine Rolle bei der Neurotransmitterfreisetzung spielt^{3, 4, 141, 152}. Durch Mikroinjektion von Gesamt-mRNA aus Rattenkleinhirn oder aus dem elektrischen Organ von *Torpedo californica* in diese Oozyten konnte gezeigt werden, dass kalziumabhängig Glutamat und Acetylcholin bzw. Dopamin freigesetzt werden, wobei die Freisetzung durch gleichzeitige Injektion von *antisense* RNA bzw. Antikörper gegen Synaptophysin zu einer Reduktion der kalziumvermittelten Neurotransmitterfreisetzung führt^{4, 141}. Synaptophysin 1 wird an C-terminal gelegenen Tyrosinen phosphoryliert⁴⁹ und ist das Haupttyrosinphosphoprotein auf synaptischen Vesikeln¹²², welches sowohl durch Src- als auch Fyn-Kinasen phosphoryliert wird^{13, 80}. Obwohl immunopräzipitiertes Synaptophysin 1 aus Gehirnhomogenaten depolarisationsunabhängig tyrosinphosphoryliert ist, ist die *in vivo*

2. Einleitung

Phosphorylierung noch nicht eindeutig bewiesen^{81, 114, 122, 134}. Interessanterweise ist die Tyrosinphosphorylierung von Synaptophysin 1 während LTPs (*long-term potentiations*) gesteigert¹⁸³. Neben der Phosphorylierung der Tyrosinreste werden auch die C-terminalen Serinreste des Synaptophysin 1 in Abhängigkeit von der Kalziumkonzentration phosphoryliert^{13, 61, 122, 134}.

Ein Hauptbindepertner von Synaptophysin 1 auf synaptischen Vesikeln im Gehirn und in neuroendokrinen PC12-Zellen ist Cholesterin^{74, 159}. Diese Bindung ist essentiell für die Biogenese von SLMVs in den neuroendokrinen PC12-Zellen¹⁵⁹.

Neben Synaptophysin 1 wird auch Synaptoporin in Neuronen exprimiert⁹³. Doch wird Synaptoporin nicht tyrosinphosphoryliert⁸⁰. Sowohl Synaptophysin als auch Synaptoporin bilden Homomultimere^{52, 63, 65, 87, 129, 162}, jedoch wurde keine Heteropolymerisierung zwischen beiden beobachtet⁵². Beide werden in der ersten intravesikulären Schleife (*Loop 1*, L1) N-glykosyliert^{86, 99, 128, 171} und besitzen jeweils eine Disulfid-Bindung in den intravesikulären Schleifen (L1, L2)⁸⁷. Sowohl Synaptophysin 1 als auch Synaptoporin interagieren mit dem v-SNARE Synaptobrevin 2^{25, 28, 38, 45, 55, 167}. Dabei spielen die Disulfid-Brücken eine entscheidende Rolle bei der Interaktion von Synaptophysin 1 mit Synaptobrevin 2^{28, 45}, wobei diese Interaktion von der neuronalen Reifung, von posttranslationellen Modifikationen und von der neuronalen Stimulation abhängig ist^{15, 124}. So kommt es zu einem Anstieg der Komplexbildung nach einer Stimulation⁹². Durch die Synaptophysin 1/Synaptobrevin 2 Heterodimerbildung wird die Verfügbarkeit von Synaptobrevin 2 für die t-SNARE-Komplexbildung reduziert^{92, 151, 165}. Der Synaptophysin/Synaptobrevin-Komplex ist in Gegenwart von Serin/Threonin- und Tyrosin-Kinaseinhibitoren stabil⁹². Es ist gezeigt worden, dass die durch die Membran spannenden Domänen für die Interaktion notwendig sind¹⁸⁰. Mit diesem Synaptophysin/Synaptobrevin-Komplex ist die V_0 -Untereinheit der V-ATPase assoziiert^{55, 161}.

Weitere interessante Synaptophysin Interaktionspartner sind u. a. Myosin V¹²⁷, welches am Vesikeltransport beteiligt ist und AP1⁷¹, ein Adaptorprotein, welches bei der Clathrin-Rekrutierung mitwirkt.

Synaptophysin 1 und Synaptoporin ist gemeinsam, dass sie eine kalziumabhängige Interaktion mit der GTPase Dynamin I eingehen und diese durch steigende Kalziumkonzentration stimuliert wird⁴¹. Synaptophysin 1 weist dabei die stärkste Interaktion mit Dynamin I auf⁴¹. Die Interaktion ist von GTP und der Phosphorylierung von Synaptophysin 1 abhängig, da das Tyrosin-Pentapeptid-Motiv am C-Terminus des Synaptophysin 1 die Bindungsstelle von Dynamin I⁴¹ und die GTPase-Aktivität von Dynamin für die Endozytose essentiell ist¹⁰³. Dieses Tyrosin-Pentapeptid-Motiv ist auch bei Synaptoporin und Synaptogyrin zu finden⁴¹. Durch Mikroinjektion eines C-terminalen Synaptophysin-GST-Fusionsproteins in Tintenfischsynapsen kommt es zu einer Blockade der Dynamin I vermittelten Endozytose und zu einer signifikanten Inhibition synaptischer Neurotransmitterfreisetzung⁴⁰. Diese Synapsen enthalten außerdem eine Anhäufung von Clathrin-umhüllten Vesikeln⁴⁰. Eine solche

Anhäufung von Clathrin-umhüllten Vesikeln wurde auch in den Terminalen der Photorezeptoren von Synaptophysin 1-*knockout* Mäusen gefunden, was auf einen Endozytosedefekt an der Synapse hinweisen könnte und in einem Widerspruch mit den vorangegangenen Ergebnissen steht¹⁴⁶. Doch zeigen die Synaptophysin 1-*knockout* Mäuse keine offensichtlichen funktionellen Defizite^{47, 109}. Der Grund dafür könnte die Redundanz anderer neuronaler TVPs (Synaptoporin und Synaptogyrin 1) sein¹⁶⁵. Die Verteilung von Synaptoporin im Gehirn ist sehr begrenzt (so wird es z. B. nicht in den Photorezeptorterminals exprimiert¹⁴⁶). Vergleiche in *microarray* Analysen von Wildtyp und Synaptophysin 1-*knockout* Maus Netzhäuten erwiesen unerwarteterweise jedoch keine signifikanten Änderungen in der Genexpression⁹.

2.3.2 Synaptogyrin 1-4

Neben Synaptophysin 1 sind durchschnittlich 2,0 Kopien des Synaptogyrin 1 Moleküls auf synaptischen Vesikeln zu finden¹⁵⁶. Der humane Synaptogyrin 1-Locus enthält 6 Exone, die durch alternatives Spleißen zu den drei Varianten a-c führen, die von 4 Exonen codiert werden⁹¹. Dadurch enthalten die Synaptogyrin 1 Varianten unterschiedliche N- und C-Termini. *Nonsense*-Mutationen im menschlichen Synaptogyrin 1-Genlocus sind potentielle Kandidaten für Schizophrenie^{33, 166}. Gyriene sind nicht N-glykosyliert¹⁴. Synaptogyrin Para- und Orthologe besitzen in der ersten intravesikulären Schleife (L1) eine Disulfid-Brücke, nicht aber in der kurzen zweiten Schleife (L2)⁷³. Für die Gyriene gibt es ein neuronales Paralog, das Synaptogyrin 3 und die nichtneuronale ubiquitäre Isoform, das Cellugyrin (Synaptogyrin 2)^{18, 79, 91, 152}. Synaptogyrin 4 wurde bisher nicht näher untersucht. Außerdem ist nicht bekannt, ob die Gyriene Oligomere bilden⁷³. Ähnlich wie Synaptophysin 1 sind auch Synaptogyrin 1 und 2^{79, 80} Substrate der Tyrosinkinase Src⁷⁹. Synaptogyrin 1 interagiert auch kalziumabhängig mit Dynamin I⁴¹. Während Synaptogyrin 1-*knockout* Mäuse keinen neuronal detektierbaren Defekt aufweisen, zeigen Mäuse, denen Synaptophysin 1 und Synaptogyrin 1 fehlt, eine veränderte synaptische Plastizität (reduzierte LTP und STP, *short-term potentiation*)⁸⁰. Evozierte Neurotransmitterfreisetzung ist jedoch weiterhin normal⁸⁰. Durch ektopisch exprimiertes Synaptophysin 1 und Synaptogyrin 1 wird, ähnlich wie durch Zugabe der leichten Kette des Tetanustoxins, das Synaptobrevin proteolytisch spaltet, die Exozytose in PC12-Zellen inhibiert¹⁵².

2.3.3 Pantophysin und Mitsugumin 29

Nichtneuronale Mitglieder der Physinfamilie sind Pantophysin⁶² und Mitsugumin 29¹⁵⁷. Es gibt jeweils zwei alternative Transkripte des murinen Pantophysins⁶² und Mitsugumins 29¹⁴², die das Resultat alternativer Polyadenylierung sind⁷³. Wie Synaptophysin wird auch Pantophysin N-glykosyliert⁹⁹, während Mitsugumin 29 nicht glykosyliert wird¹⁵⁷. Beiden fehlen Tyrosinreste in ihren zytoplasmatischen C-Termini²⁵, wie sie für Synaptophysin charakteristisch sind. Pantophysin

2. Einleitung

interagiert ähnlich den neuronalen Physinen mit Synaptobrevin⁷³. Pantophysin-*knockout* Mäuse sterben in der frühen Embryogenese (Eshkind und Leube unveröffentlicht). Mitsugumin 29 ist ein 29 kDa Transmembranprotein in der Triade der quergestreiften Muskulatur¹²¹. Es ist relevant für die Reifung und Entwicklung der Triade. Mäusen, denen Mitsugumin 29 fehlt, haben geschwollene T-Tubuli, ein vakuolisiertes sarkoplasmatisches Retikulum (SR) und eine Fehlanordnung der Triade (*triad junction*)¹²¹.

2.3.4 SCAMP 1-5

Die geringste Kopienzahl auf synaptischen Vesikeln weist SCAMP 1 mit durchschnittlich 0,8 Kopien pro Vesikel auf¹⁵⁶. SCAMPs werden in zwei Gruppen nach ihrer molekularen Größe eingeteilt: ~38 kDa (SCAMP 1-3) und ~25 kDa (SCAMP 4 und 5)³¹. SCAMPs sind nicht N-glykosyliert²³, auch fehlen ihnen die Disulfid-Bindungen⁷³. Dagegen bilden SCAMPs Homo- und Heteromultimere^{145,177}. SCAMP 1 und 3 werden tyrosinphosphoryliert, jedoch nicht SCAMP 2¹⁷⁸. In der Tat ist die höchstwahrscheinliche Phosphorylierungsseite der SCAMPs strategisch am N-Terminus in der Nähe der NPF-Wiederholungen lokalisiert, die mit EH-domänentragenden Proteinen interagieren, welche für den intrazellulären Transport von Bedeutung sind⁷³. Die Endozytose von Transferrin wird in Zellen inhibiert, die SCAMP 1-Mutanten synthetisieren, bei denen die NPF-Wiederholungen fehlen⁵⁰. Außerdem zeigt die Interaktion von SCAMP 1 mit γ -Synergien, einem AP1 adaptorassoziierten post Golgi Protein⁵⁰, dass SCAMP 1 am Prozess der Vesikelbildung beteiligt sein könnte. Punktmutationen innerhalb der zytoplasmatischen Schleife (E Peptid) von SCAMP 2 üben einen inhibierenden Effekt auf späte Ereignisse der regulierten Exozytose aus¹⁰².

2.4 TVPs in *Caenorhabditis elegans*

Das komplett sequenzierte Genom von *C. elegans* enthält 23.996 Gene (*Wormbase Release WS172*). Drei dieser Gene wurden als TVP-Orthologe identifiziert, wobei jeweils ein Ortholog einem der drei TVP-Familien zuzuordnen ist⁷³ (Tabelle 2-1). Das Physinortholog in *C. elegans* ist Synaptophysin (Gen: *sph-1*, Protein: SPH-1), das Gyrinortholog ist Synaptogyrin (Gen: *sng-1*, Protein: SNG-1) und das SCAMP-Ortholog ist SCAMP (Gen: *scm-1*, Protein: SCM-1)^{73,118}. Das *C. elegans* Synaptophysin SPH-1 unterscheidet sich vom Synaptophysin 1 der Säugetiere durch das Fehlen der Disulfid-Bindung in der zweiten intravesikulären Schleife (L2)⁷³. Zudem hat es mit den Mitgliedern der Physin-Familie der Maus nur eine < 50 %-ige Sequenzähnlichkeit. Ähnliches gilt auch für SNG-1, während SCM-1 eine Sequenzähnlichkeit von < 60 % aufweist (Tabelle 2-2).

2. Einleitung

Tabelle 2-1 Mitglieder der TVPs in *Mus musculus*, *Caenorhabditis elegans* und *Drosophila melanogaster*.

Art TVP-Familie	<i>M. musculus</i>		<i>C. elegans</i>		<i>D. melanogaster</i>	
Physin	Synaptophysin Synaptoporin Pantophysin Mitsugumin 29	Chromosom X Chromosom 14 Chromosom 12 Chromosom 3	SPH-1	Chromosom IV	∅	
Gyrin	Synaptogyrin 1 Cellugyrin Synaptogyrin 3 Synaptogyrin 4	Chromosom 15 Chromosom 11 Chromosom 17 Chromosom 7	SNG-1	Chromosom X	Synaptogyrin	Chromosom 2R
SCAMP	SCAMP 1 SCAMP 2 SCAMP 3 SCAMP 4 SCAMP 5	Chromosom 13 Chromosom 9 Chromosom 3 Chromosom 10 Chromosom 9	SCM-1	Chromosom I	SCAMP	Chromosom X

Tabelle 2-2 Sequenzvergleich der Ähnlichkeit [%] der TVPs in *C. elegans* und *Mus musculus*.

	SPH-1	Synaptophysin	Synaptoporin	Pantophysin	Mitsugumin 29	SNG-1	Synaptogyrin 1	Synaptogyrin 2	Synaptogyrin 3	Synaptogyrin 4	
SPH-1	100	44	44	46	40	SNG-1	100	44	48	44	39
Synaptophysin		100	73	59	61	Synaptogyrin 1		100	59	65	49
Synaptoporin			100	62	63	Synaptogyrin 2			100	61	46
Pantophysin				100	55	Synaptogyrin 3				100	51
Mitsugumin 29					100	Synaptogyrin 4					100

	SCM-1	SCAMP 1	SCAMP 2	SCAMP 3	SCAMP 4	SCAMP 5
SCM-1	100	55	53	56	60	58
SCAMP 1		100	72	68	63	64
SCAMP 2			100	66	64	65
SCAMP 3				100	64	63
SCAMP 4					100	72
SCAMP 5						100

2.5 *C. elegans* als Modellorganismus

Der Konsektivzwitter *C. elegans* ist ein frei im Boden lebender ca. 1 mm großer Nematode (siehe 7.2, Abbildung 2-4), der sich von *E. coli* Bakterien ernährt. 1960 wurde *C. elegans* von Sydney Brenner als Modellorganismus zur Untersuchung der Bildung und Funktion des Nervensystems und für genetische Analysen aufgrund der einfachen Kultivierung, des kurzen Lebenszyklus (2-3 Tage bei 25 °C, Abbildung 2-5) und seiner großen Nachkommenschaft eingeführt¹³³. Neben dem Hermaphroditen mit zwei Geschlechtschromosomen (XX), treten unter normalen Zuchtbedingungen durch *non-disjunction* während der Meiose selten (1/500) auch Männchen (X0) auf. So ist *C. elegans* in der Lage, sich sowohl durch Selbst- als auch durch Heterofertilisation fortzupflanzen²⁴. Dieses diözische Befruchtungssystem ist ein großer Vorteil für genetische Untersuchungen.

Ein Großer Vorteil für die Untersuchung von neuronalen Funktionen ist, dass die meisten neuronalen

2. Einleitung

C. elegans Mutanten lebensfähig sind und diese in einfachen Verhaltenstests untersucht werden können.

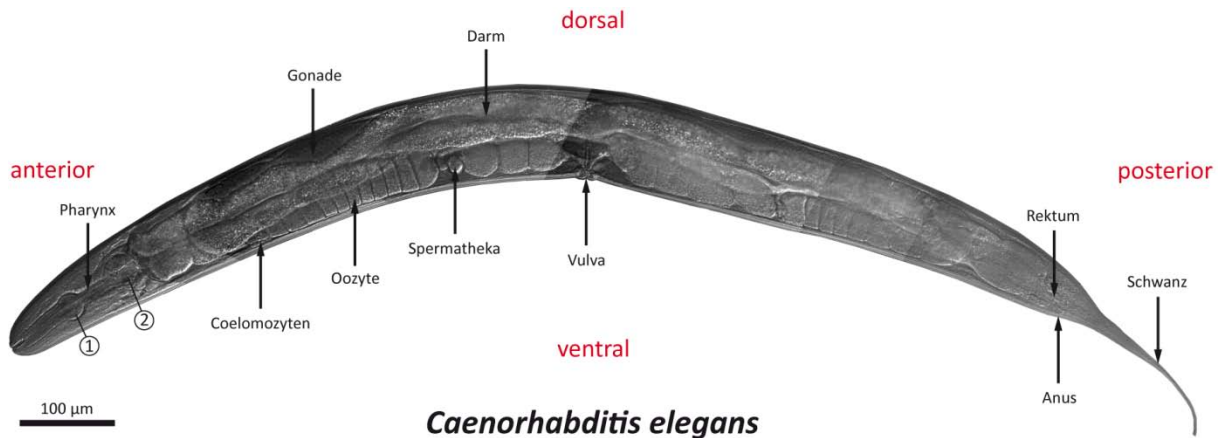


Abbildung 2-4 Konfokale Phasenbildebene des Nematoden *Caenorhabditis elegans* (Hermaphrodit).

Zu erkennen ist anterior der Pharynx mit dem vorderen ① und hinteren Bulbus ②. Die Nahrung (*E. coli* Bakterien) wird durch Pumpbewegungen des Pharynx aufgenommen und weitergeleitet. Nach Zerkleinerung im *grinder* (Struktur in ②), gelangt die zermahlene Nahrung in den Darm. Dort erfolgt die Verdauung durch Verdauungsenzyme, welche von den Darmzellen in das Lumen sezerniert werden. Die unverdaute Nahrung verlässt den Darm über das posterior gelegene Rektum und den Anus, der vor dem Beginn des Schwanzes liegt. *C. elegans* Hermaphroditen besitzen ein paariges Gonadensystem. Im distalen Gonadenarm (Ovar) befinden sich syncytiale Zellkerne (Oogonien), die von der sich asymmetrisch teilenden DTC (*distal tip cell*) entstammen. Nach Einzug der Zellmembran (Diakinese) sind die stapelförmigen Oozyten im Ovidukt zu sehen, die beim Durchqueren der Spermatheka von den dort eingelagerten amöboiden Spermien befruchtet werden. Der sich teilende Embryo im Uterus verlässt das Muttertier über die Vulva. Zwei der sechs im Coelom phagozytotisch flottierenden Coelomozyten, die den Makrophagen des angeborenen Immunsystems ähnlich sind, sind im Phasenbild zu erkennen.

2. Einleitung

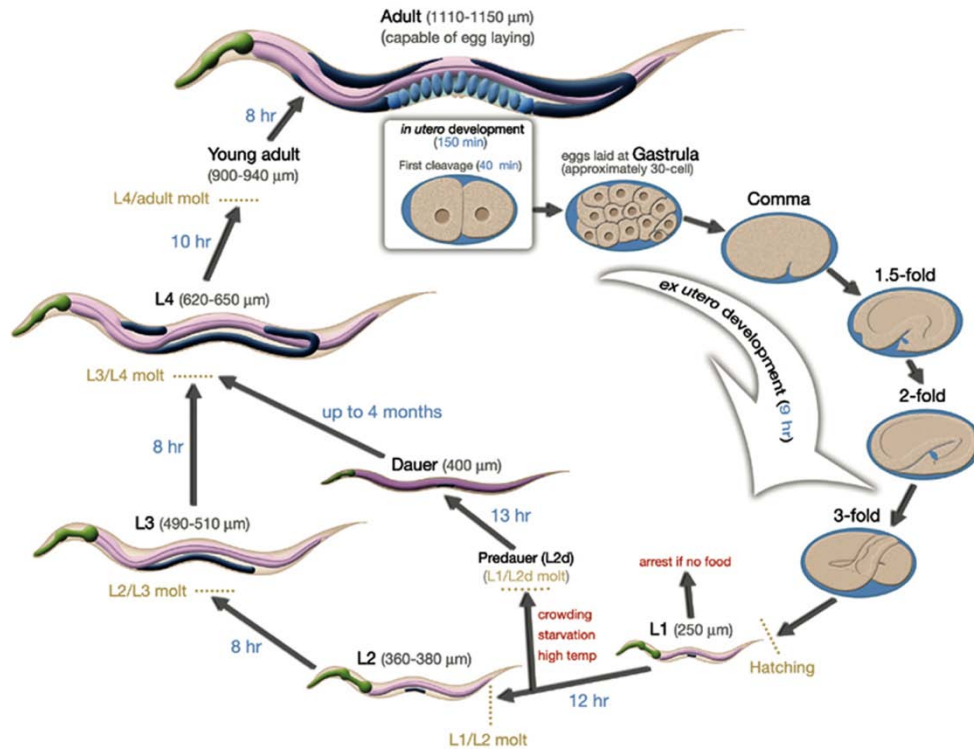


Abbildung 2-5 Lebenszyklus von *C. elegans* bei 22 °C⁶.

Die ersten 150 min der Entwicklung nach der Befruchtung der Oozyten in der Spermatheka verlaufen im adulten Hermaphroditen. Nach der Eiablage schlüpft aus dem Ei das erste Larvenstadium (Juvenilstadium L1). Die L1-Larve besteht aus genau 558 Zellen. Nach mehreren Häutungen (von L1 nach L2 nach L3 und nach L4) wird am Ende des L4 Larvenstadiums die Vulva induziert und das Tier häutet sich zum jungen adulten Hermaphrodit. Unter Extrembedingungen (z. B. Nahrungsmangel) kann sich das sog. Dauer-Larvenstadium bilden. Die Dauer-Larve, welche über mehrere Monate ohne Nahrung überleben kann, entsteht dabei durch Häutung der L1-Larve in die Prädauer-Larve.

2.5.1 Entwicklung von *C. elegans*

Durch den Eintrittsort des amöboiden Spermiums wird die posteriore Seite determiniert und somit die anteroposteriore Körperachse festgelegt. Nachdem die Zygote (P_0) sich einmal inäqual geteilt hat (kleine anteriore AB - und große posteriore P_1 -Blastomere), wird durch die nachfolgende Teilung, woraus das 4-Zellstadium resultiert, die dorsoventrale Achse definiert (Abbildung 2-6). Anschließend folgen mehrere Zellteilungen und Zellwanderungen, die zum sog. Komma-Stadium führen. In diesem Stadium findet die Neurulation statt. Hier tauchen die ersten neuronalen Vorläuferzellen auf, die das Nervensystem von *C. elegans* aufbauen.

Der gesamte Zellstammbaum von *C. elegans* ist nahezu invariant, doch spielen während der Entwicklung Zell-Zell-Interaktionen und Apoptose eine wichtige Rolle, so dass einzelne Zellschicksale später determiniert werden. Das adulte bilaterale Tier besteht aus einer konstanten Zahl von 959 somatischen Zellen, bzw. 959 Zellkernen, da einige Zellen Syncytien bilden¹⁵³.

2. Einleitung

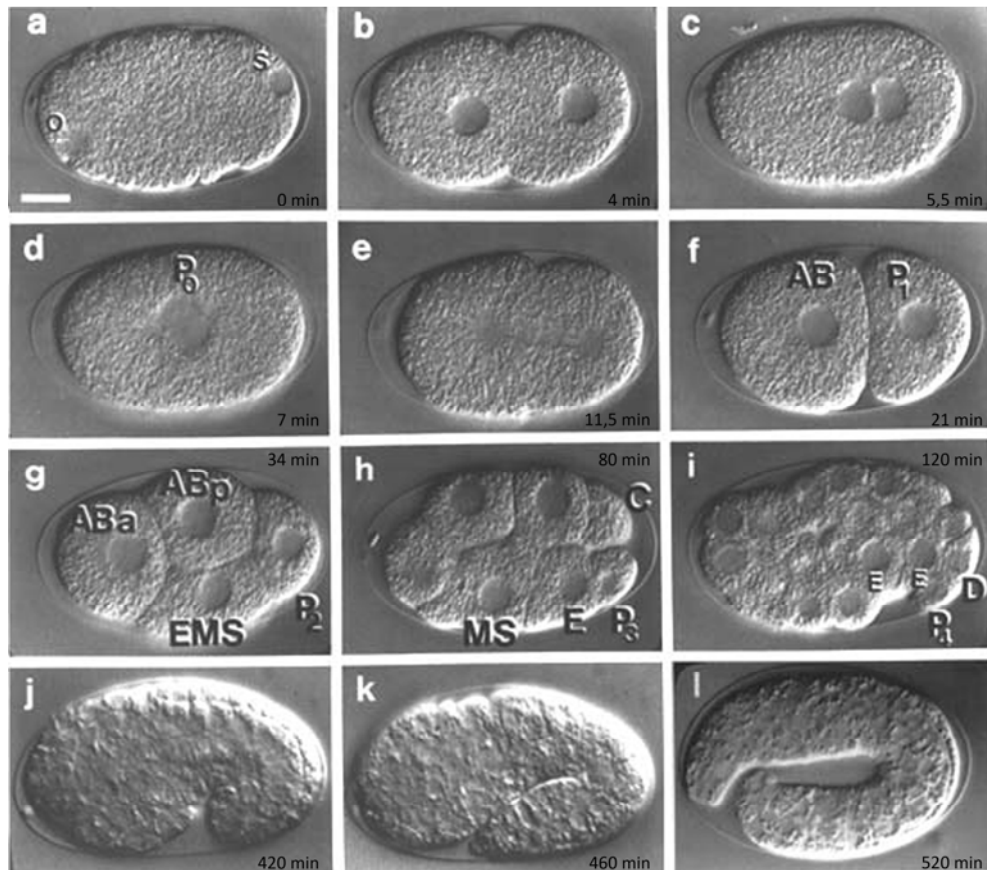


Abbildung 2-6 Embryogenese von *C. elegans* (von Einhard Schierenberg).

Die Entwicklung des befruchteten Eies bis zum Schlüpfen des Tieres dauert bei 25 °C 12 h. Dabei nimmt der Embryo nicht an Masse zu, sondern die Zellen werden durch Teilung immer kleiner. Nach der Befruchtung vollzieht der Oozytenkern die Meiose (a) und die Polkörperchen werden sichtbar. Anschließend wandern die beiden Vorkerne aufeinander zu und verschmelzen (b-d). Währenddessen kommt es zu einer Umverteilung von der sog. P-Granula (b). Die erste inäquale Teilung liefert die anteriore AB- und die posteriore P1-Blastomere (e und f). Diese beiden Zellen teilen sich wiederum. Nun ist die dorsoventrale Körperachse durch die Lage der charakteristischen EMS-Zelle, welche ventral liegt, festgelegt (g). Im 4-Zellstadium wird durch eine anschließende laterale Teilung der ABA-, ABp- und P2-Zelle, die links-rechts Symmetrie vorgegeben und in der nächsten Teilung determiniert. Nach der Gastrulation entsteht das sog. Komma-Stadium (Neurula j), welches sich durch weitere Furchungen streckt (k: 1,5-fache, l: 2,0-fache Stadium, Maßstab 10 µm).

2.5.2 Das Nervensystem von *C. elegans*

C. elegans ist ein geeignetes Modellsystem, um die molekularen Grundlagen synaptischer Funktionen zu untersuchen. Durch verhaltenstypische und pharmakologische Selektionskriterien konnten viele Schlüsselproteine, die bei der synaptischen Übertragung eine Rolle spielen, identifiziert werden. Ein weiterer Vorteil von *C. elegans* gegenüber anderen Organismen ist, dass die meisten synaptischen Mutanten überlebensfähig sind und die Mutationen an die Nachkommen weitergegeben werden. Das Nervensystem wird in das pharyngeale (PG) und das zentrale Ganglion (ZG) unterteilt. 20 Neurone regulieren die Innervation und Aktivität des Pharynx und sind über zwei Interneurone mit dem ZG verbunden. Das ZG hat somit lediglich einen modulierenden Einfluss auf die Aktivität des Pharynx. Unter Laborbedingungen sind nur 3 Neurone für das Überleben von *C. elegans* nötig (CANR/L und M4). Die CAN Neurone liegen entlang des exkretorischen Kanals und sind vermutlich an

2. Einleitung

der Osmoregulation beteiligt. M4 ist eines der pharyngealen Motoneurone, das die Isthmuspéristaltik kontrolliert ¹⁵⁰.

Insgesamt wird das Nervensystem des adulten Hermaphroditen von 302 Neuronen ¹⁷⁰ (Abbildung 2-7) und 50 gliaähnlichen Zellen gebildet ¹⁴⁰. Die Somata der Neurone sind um den circumpharyngealen Nervenring, entlang des ventralen Nervenstrangs und den Schwanzganglien zu finden. Von den Neuronen werden ca. 7.000 chemische Synapsen gebildet, von denen 2.000 an der neuromuskulären Endplatte lokalisiert sind ¹⁷⁰, die u. a. von den Motoneuronen des ventralen Nervenstranges gebildet werden. Tabelle 2-3 gibt wieder, welche Neurotransmitter in *C. elegans* in welchen Neuronen gefunden wurden. Das Verhalten und die Reaktionen von *C. elegans* auf die äußere Umwelt werden durch diese Neurone gesteuert. Dabei übernehmen verschiedene Neurone verschiedene Aufgaben (Tabelle 2-4).

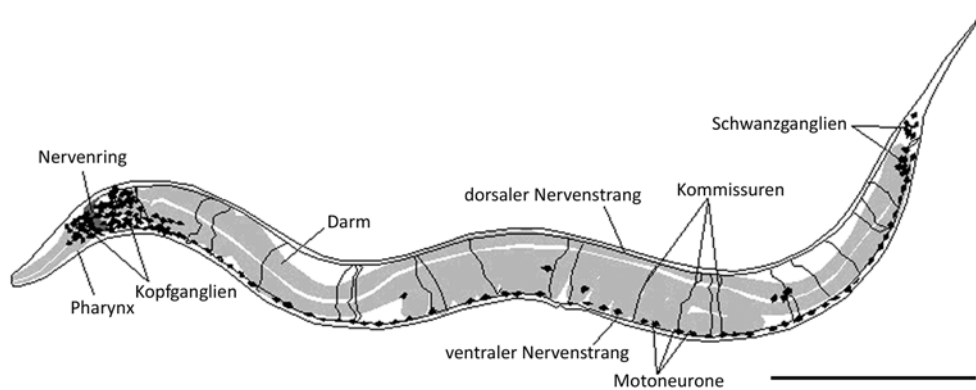


Abbildung 2-7 Position der Neurone im adulten Hermaphrodit (Herkunft unbekannt).

Ein Großteil der 302 Neurone ist um den Pharynx in den Kopfganglien lokalisiert, dort bilden deren Axone den circumpharyngealen Nervenring. Die restlichen Neurone liegen entlang des ventralen Nervenstrangs und in den Schwanzganglien. In dem Schema sind übersichtshalber nur der dorsale und ventrale Nervenstrang sowie die Kommissuren, die von den Axonen der Neurone gebildet werden, eingezeichnet. (anterior links, dorsal oben, Maßstab 200µm).

Tabelle 2-3 Zuordnung von Neuronen zu spezifischen Neurotransmittern

Neurotransmitter	Neurone
Acetylcholin	ALN, AS, CA, DA, DB, HSN, M, MC, PLN, SAA, SAB, SDQ, SIA, SIB, SMB, SMD, VA, VB, VC4, VC5 AIY, AIA
Dopamin	CEP, ADE, PDE, R5A, R7A, R9A
GABA	RME, RIS, AVL, VD, DD, DVB
Glutamat	ADA, ALM, ASH, ASK, AUA, AVJ, AIN, AVM, FLP, IL1, LUA, OLL, OLQ, PLM, PVD, PVR, M3, NSM, I5
Monoamin	ADE, PDE, CEP, NSM, HSN, VC4, VC5, ADF, RIH, AIM, RIC, CAN, alle serotonergen Neurone
Serotonin	NSM, ADF, RIH, AIM, VC1-3, VC6, HSN, CP, R1B, R3B, R9B, CA, PHB, I5

2.5.3 Fortbewegung von *C. elegans*

Durch alternierende Muskelkontraktion und -relaxation (Stimulation und kontralaterale Inhibition ¹³⁹) der dorsalen und ventralen longitudinalen Muskelstränge wird die sinusförmige Fortbewegung von *C. elegans* hervorgerufen. Dabei dient das Hydroskelett als mechanisches Widerlager. An den

2. Einleitung

exzitatorischen Synapsen der neuromuskulären Endplatte ist Acetylcholin der Neurotransmitter, welcher bei Ausschüttung eine Muskelkontraktion hervorruft. Eine Freisetzung von γ -Aminobuttersäure (GABA) hingegen bewirkt an den inhibierenden neuromuskulären Endplatten eine Muskelrelaxation⁸⁸. In *C. elegans* gibt es nur 26 GABAerge Neurone, von denen 19 D-Typ Neurone (VD und DD) für die Muskelrelaxation der Körpermuskulatur bei der Fortbewegung verantwortlich sind¹⁰⁸ (Abbildung 2-8). Die vier inhibierenden GABAergen RME Neurone sind an der Kopfbewegung beteiligt und erleichtern so die Futtersuche. Viele neuronale Mutanten, die Defekte in den GABAergen und cholinergen Neuronen aufweisen, haben ein unkoordiniertes Fortbewegungsmuster oder sind unbeweglich, zeigen somit den sog. *unc*-Phänotyp (*uncoordinated*).

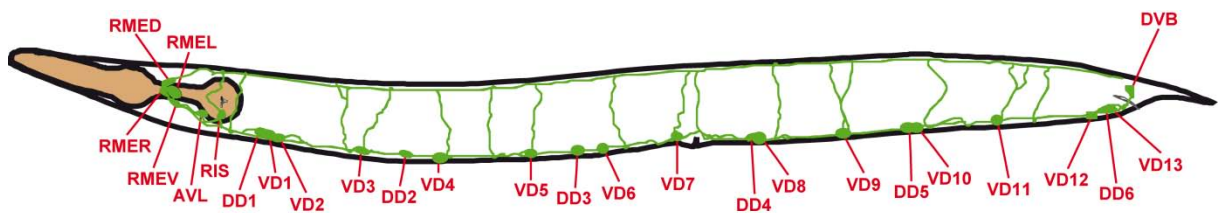


Abbildung 2-8 GABAerges Nervensystem von *C. elegans* (von Erik Jorgensen).

Schematische Darstellung des GABAergen Nervensystems und der Lage der 26 GABAergen Neurone. 19 von diesen Neuronen, die sog. D-Typ Neurone (6 DD und 13 VD Neurone) sind für die Relaxation der longitudinalen dorsoventralen Muskulatur verantwortlich. Die vier RME Neurone innervieren die Kopfmuskulatur, während die exzitatorischen GABA-Neurone AVL und DVB die Darmmuskulatur erregen. Das RIS Neuron ist ein GABAerges Interneuron.

2.5.4 Defäkation von *C. elegans*

Die Defäkation von *C. elegans* wird durch die enterischen GABAergen Neurone AVL und DVB stimuliert¹⁰⁸. Anders als die inhibierenden GABAergen Neurone wird durch die Freisetzung von GABA ein exzitatorisches postsynaptisches Signal, das auf die intestinale Muskulatur und den analen Depressormuskel wirkt, erzeugt. Dabei kommt es zu einem Na^+ -Einstrom durch den exzitatorischen GABA-Rezeptor EXP-1¹⁶. Alle 50 Sekunden durchläuft das Tier dabei ein stereotypes Muster von Muskelkontraktionen, die zur Freisetzung des intestinalen Inhaltes führen¹⁶⁰. Der finale Schritt dieses Motoprogramms ist eine Kontraktion der enterischen Muskulatur (Emc), die den Darm zusammendrückt, den Anus öffnet und den Inhalt freisetzt. Für diese Kontraktion werden die beiden oben genannten Neurone benötigt¹⁰⁸.

2.5.5 Eiablage von *C. elegans*

Auch die Eiablage wird durch Neurone gesteuert bzw. kontrolliert. Zu diesen Neuronen, die an der Eiablage beteiligt sind, gehören die 6 VC und 2 HSN Neurone (siehe Tabelle 2-4). Die HSN Neurone verwenden neben Serotonin auch Acetylcholin als Neurotransmitter^{43, 44, 72} (Tabelle 2-3). Die VC Neurone (VC1-3 und VC6) verwenden hauptsächlich auch Serotonin als Neurotransmitter. Serotonin

2. Einleitung

ist somit der Hauptneurotransmitter, der die Vulvamuskulatur innerviert¹⁴³. Das Zusammenwirken der Eiablageneurone führt zu einer Kontraktion der uterinen Muskulatur, wodurch die Eier in Richtung Vulva (ventrale Öffnung in der Hypodermis) gepresst werden. Durch Kontraktion der Vulvamuskulatur wird die Vulva geöffnet und das Ei freigesetzt¹³⁷.

2.5.6 Wahrnehmung von Umweltreizen

Um Reize der Umwelt wahrnehmen zu können, besitzt *C. elegans* 60 Neurone, die Cilien in ihren Dendritenendigungen besitzen⁷⁶. Es gibt verschiedene Rezeptoren, die in den cilientragenden Endigungen lokalisiert sind und auf unterschiedliche Formen von Reizen spezialisiert sind (Chemo-, Osmo-, Thermo- oder Mechanorezeptoren). Die Chemorezeptoren weisen dem Tier den Weg zur nächsten Futterquelle, Osmorezeptoren warnen es vor Substanzen, die das Hydroskelett destabilisieren, Thermorezeptoren geben zusätzliche Informationen über die Umgebungstemperatur und Mechanorezeptoren ermöglichen die Navigation durch den Boden. Die Chemo- und Osmorezeptoren befinden sich anterior in der „Nase“ und posterior im Schwanzende, Thermorezeptoren sind nur in der „Nase“ lokalisiert und die Mechanorezeptoren sind über den gesamten Körper verteilt. Durch die Sinnesneurone wird der Reiz aufgenommen, umgewandelt und weitergeleitet. Dadurch wird anschließend das entsprechende Verhaltensmuster ausgelöst.

Die sensorischen Neurone im Kopf nennt man Amphide und im Schwanz Phasmide. Amphide und Phasmide können mit Hilfe unterschiedlicher Farbstoffe sichtbar gemacht werden. Dabei werden die verschiedenen sensorischen Neurone des Kopfes und Schwanzes bevorzugt von unterschiedlichen Farbstoffen über die cilientragenden Enden, die Kontakt zum äußeren Medium haben, angefärbt^{125, 147} (Abbildung 2-9). Neuronale Mutanten, die einen Defekt für die Aufnahme dieser Farbstoffe haben, bezeichnet man als *dye-filling defective (dyf)*.

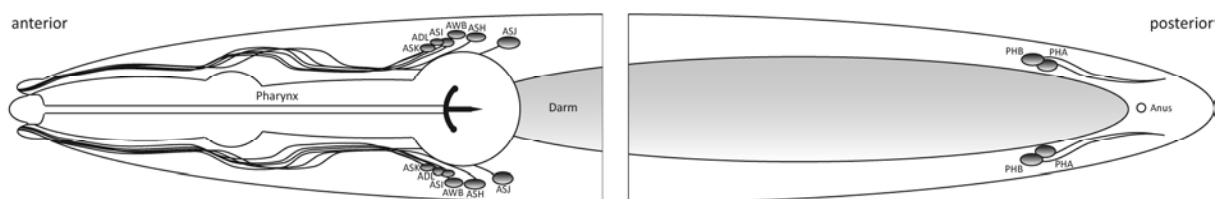


Abbildung 2-9 Schema der Amphide und Phasmide.

Schema der Lage von Amphid- (anterior) und Phasmidneuronen (posterior) in *C. elegans* nach Anfärbung der Amphide (ASK, ADL, ASI, AWB, ASH und ASJ) und Phasmide (PHA und PHB) mit dem lipophilen Farbstoff Dil⁶⁷. Ein ähnliches Färbemuster kann auch mit den Farbstoffen DiO und FITC erzielt werden⁶⁶. Der Farbstoff markiert, sowohl die Dendriten, als auch Perikaryen und Axone. Die Axone sind aufgrund der besseren Darstellung im Amphid-Schema nicht eingezeichnet worden. (Ansicht: dorsal oben, ventral unten).

2. Einleitung

Tabelle 2-4 Beispiele für Neurone und ihre charakteristischen Funktionen.

Neuron	Einige Beispiele für Funktionen
M und MC	Pharyngeale Pumpbewegung (Pharynxmuskulatur)
VD und DD	Lokomotion (Dorsale und ventrale Körpermuskulatur (Muskelrelaxation)
RME	Kopfmuskulatur (Muskelrelaxation)
VC und HSN	Eiablage (Vulvamuskelzellen)
AVL und DVB	Defäkationszyklus
ASH, FLP, OLQ, OLL, CEP, IL1	Mechanozeption (Nase)
ALM, PLM, AVM, PVM, PVD, ADE, PDE	Mechanozeption (Körperwand)
ASE	Gustatorik
AWA, AWB, AWC, ADL, ASK, ASJ, ASG, ADF, ASI	Olfaktorische Wahrnehmung
AFD	Thermische Wahrnehmung
AQR, PQR, URX	Sauerstoffwahrnehmung
PHA, PHB	Repulsive olfaktorische Wahrnehmung
AIA, AVG, AVB, AIY, AVK, AIZ, RIS	Interneurone

CP, R5A, R7A, R9A, R1B, R3B, R9B, CA, RnA, RnB, HOA, HOB, SPD, SPV, PLA, PLC, SPC: Neurone spezifisch im *C. elegans* Männchen

2.6 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war es, die Verteilung und Bedeutung der *tetraspan vesicle membrane proteins* (TVPs), die in vielen Prozessen der Vesikelbiogenese zu finden sind, im Modellorganismus *C. elegans* aufzuklären. Dabei sollte das Expressionsmuster im adulten Hermaphrodit und in frühen Entwicklungsstadien mit Hilfe von Fluoreszenzproteinen und Antikörpern untersucht werden. Des Weiteren sollten TVP-Mutanten mittels molekularbiologischer und biochemischer Methoden analysiert werden. Außerdem sollte die Rolle der TVPs in der synaptischen Übertragung an Hand von pharmakologischen und kognitiven Tests an diesen TVP-Mutanten studiert werden.

3 Material und Methoden

3.1 Materialien

Die in dieser Arbeit verwendeten Geräte, Materialien und Chemikalien wurden von folgenden Firmen bezogen (Tabelle 3-1).

Tabelle 3-1 Verwendete Materialien, Software, Chemikalien, Enzyme und Kits.

Kulturgefäße	Herkunft
24 Lochplatte	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Erlenmeyerkolben	Roth, Karlsruhe
Kulturflasche (Filter Top, 75 ml)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Kunststoffschale (L: 70 mm x B: 55 mm x H: 30 mm)	Hornbach, Mainz
Petrischalen mit Nocken (Ø 35 und 100 mm)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Petrischalen ohne Nocken (Ø 35 und 60 mm)	Nunc, Wiesbaden
quadriPerm (4 Kammern à 82 mm x 30 mm)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Röhrchen (12 ml, Zwei-Positionen-Belüftungsstopfen)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Mikroskope	
Axiophot	Zeiss, Jena
DM IRB	Leica, Wetzlar
EM Leo 906E	Zeiss, Jena
MZ16FA	Leica, Wetzlar
SMZ 1500	Nikon, Düsseldorf
TCS SP1	Leica, Wetzlar
TCS SP2	Leica, Wetzlar
TCS SP5	Leica, Wetzlar
Software	
Aida Image Analyzer v.3.28	raytest GmbH, Straubenhardt
Amira 4.0	Mercury Computer Inc., Düsseldorf
Analysis 3.2	Soft Imaging Systems, Münster
BasReader 3.14	raytest GmbH, Straubenhardt
Chromas 1.45	Technelysium, Australia
Clonemanager 7.01	Scientific & Educational Software, Cary (NC)
Igor Pro	Wavemetrics, Lake Oswego (OR)
Image Pro Plus 5.12	Media Cybernetics, Gleichen
Lasergene	DNASTAR, Madison (WI)
MEGA 3.1	The Biodesign Institute, Tempe (AZ)
Mini Analysis	Synaptosoft, Decatur (GA)
MrBayes 3.11	http://mrbayes.csit.fsu.edu/
Photoshop CS2	Adobe, München
Pulsefit	Heka, Southboro (MA)
Sigma Plot 9	Systat Software GmbH, Erkrath
TreeView	http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/index.html
Vector NTI 9	InforMax Inc., Oxford UK
Geräte und Materialien	
AGEFIX (B W Fixierer)	AGFA, PMA Bode GmbH, Berlin
Alufolie	VWR, Darmstadt
Aluminiumplatten (L: 60 mm x B: 60 mm x H: 5 mm)	Johannes Gutenberg-Universität, Mainz
Autoklav Varioklav Typ 400	H+P Labortechnik, Oberschleißheim
BAS-MS 2040 Imaging Plate	Fujifilm, Düsseldorf

3. Material und Methoden

BAS Cassette 2040	Fujifilm, Düsseldorf
Bio-Dot Microfiltration Apparatus	Bio-Rad, München
Biodyne B 0.45µ	Pall Corporation, Pensacola (FL)
Biofuge <i>fresco</i>	Heraeus, Hanau
Bio-Imaging analyzer BAS-1500	Fujifilm, Düsseldorf
Blockthermostat BT 100	Kleinfeld Labortechnik, Gehrden
Brutschrank für Bakterien	Memmert, Schwabach
Brutschrank für Zellen	Heraeus, Hanau
Calibrex 520 (10 ml)	Fisher Scientific GmbH, Schwerte
Centrikon T-1065	Kontron Instruments, Bletchley
Certomat H	B. Braun, Melsungen
Certomat IS	B. Braun, Melsungen
Cryo.s Einfrierröhrchen 2 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Deckgläser (24 mm x 32 mm)	Roth, Karlsruhe
Deckgläser (Ø 12 und 18 mm)	Langenbrinck, Teningen
Digitalkamera Hamamatsu 4742-95	Hamamatsu, Herrsching
Drigalskispatel	Roth, Karlsruhe
Duotherm	IDL, Aachen
Elektrophoresekammer	Sigma-Aldrich, München
EPC-9 Patch-Clamp Amplifier	Heka, Southboro (MA)
FemtoJet	Eppendorf, Hamburg
Flow Lamin Air TL 2448	Holten, Dreieich
Glasflaschen	Schott, Mainz
Grids (Formvar)	SCI, München
HeraeaHybrid	Heraeus, Hanau
Homogenisator (30 ml S)	B. Braun, Melsungen
Hyperfilm ECL	GE Healthcare, München
IAK Combinig Ret	Janke und Kunkel, Staufen
Image Master VDS	GE Healthcare, München
Immersionsöl	Merck, Darmstadt
Intelli Mixer RM-2L	ELMI Ltd., Riga
ITC-6 Interface	Instrutech, Port Washington (NY)
Lagerboxen B50	A. Hartenstein GmbH, Versbach
LB 1210B (Geigerzähler)	Berthold, Wildbad
LX 24 (Developer)	Kodak, PMA Bode GmbH, Berlin
Maxtor Meteor II (Framegrabber)	Leica, Wetzlar
Megafuge 1.0 R	Heraeus, Hanau
Microelectrophoresis Power Supply Consort	IMS GmbH, Magdeburg
Microflow Biological Safety Cabinet	Nunc, Wiesbaden
Mikroküvetten ½	Roth, Karlsruhe
Mikroliterspritze HAMILTON	Roth, Karlsruhe
Mikromanipulator	Eppendorf, Hamburg
Milli-Q	Millipore, Schwalbach
Mörser und Pistill	VWR, Darmstadt
Nalgene Cryo 1 °C Freezing Container	Nunc, Wiesbaden
Nanodrop ND-1000	Peqlab, Erlangen
Objektträger (76 mm x 26 mm)	Roth, Karlsruhe
Optitran BA-S83 reinforced NC	Schleicher und Schüll, Dassel
Packard 2200CA TRI-CARB	Canberra Company, Rüsselsheim
Parafilm „M“	Roth, Karlsruhe
Pasteurpipetten (2 ml)	Roth, Karlsruhe
PCR primus 96 advanced	Peqlab, Erlangen
PCR primus 96 plus	MWG Biotech, Martinsried
PCR-Reaktionsgefäße	ABgene, Hamburg
pH-Meter (pH 530)	VWR, Darmstadt

3. Material und Methoden

Plastikpipettierspitzen	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Platindraht (\varnothing 0,2 mm)	VWR, Darmstadt
Plättchenständer	CTI, Idstein
PowerPac 300	Bio-Rad, München
Proscan HSC2	Proscan GmbH, Scheuring
Protean II Mini-Gelsystem	Bio-Rad, München
Reaktiongefäße (0,5; 1,5; 2; 15 und 50 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
S48 Stimulator	Grass Telefactor, W. Warwick (RI)
Scanner Perfection 1670	Epson, Meebusch
Schlauchfolie	VWR, Darmstadt
Schüttler Heidolph Reax 2000	Labotec, Remseck
Sony XC-ST50CE	Leica, Wetzlar
Sterile Femtotips	Eppendorf, Hamburg
Stickstofftank GT40	VWR, Darmstadt
SW 27 Beckman	Beranek Laborgeräte, Weinheim
SW 40 Beckman	Beranek Laborgeräte, Weinheim
Thermometer ana-digit (-40 bis +150 °C)	Precision, Dubuque (IA)
TransferMan NK2	Eppendorf, Hamburg
Ultracut E	Leica (Reichert Jung), Wetzlar
Ultraspec 2000	GE Healthcare, München
UV-Tisch NU72	Faust, Schaffhausen
VDS Film Rolls	GE Healthcare, München
Waage 1475	Sartorius, Göttingen
Wasserbad (Bioblock Scientific)	Fisher Scientific GmbH, Schwerte
Whatman-Papier	Schleicher und Schüll, Dassel
Zählkammer (nach Neubauer)	VWR, Darmstadt
Zahnstocher	Drogerie, Mainz
Zentrifugenröhrchen (14 mm x 89 mm/25 mm x 89 mm)	Beranek Laborgeräte, Weinheim
Chemikalien	
Aceton mind. 99,5 %	Roth, Karlsruhe
Adenosin 5'-[γ - ³² P]triphosphat, Triethylammonium Salz	GE Healthcare, München
Agar-Agar (Kobe)	Roth, Karlsruhe
Aldicarb	Supelco, München
Ammoniumchlorid	Fluka, Seelze
Amoniumpersulfat	Serva, Heidelberg
Ampicillin	Roth, Karlsruhe
Bacto Agar	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Bacto Peptone	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Bio-Rad Protein Assay	Bio-Rad, München
Borsäure	Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
Calciumchlorid [CaCl ₂ · 2H ₂ O]	Roth, Karlsruhe
Chloroform	Roth, Karlsruhe
Citronensäure Monohydrat	Roth, Karlsruhe
Coomassie Brilliant Blue R-250	Roth, Karlsruhe
Diacetyl	Fluka, Seelze
DiD	Molecular Probes, Karlsruhe
Dil	Molecular Probes, Karlsruhe
Di-Kaliumhydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe
Dimethylformamid [DMF]	Sigma-Aldrich, München
DMEM (high glucose)	PAA Laboratories, Cölbe
DMSO	Roth, Karlsruhe
dNTPs	Fermentas, St. Leon-Rot
DTT	Serva, Heidelberg

3. Material und Methoden

EDTA	Roth, Karlsruhe
EGTA	Roth, Karlsruhe
Eisensulfat [Fe(II)SO ₄ · 7H ₂ O]	Roth, Karlsruhe
Ellmans Reagenz [DTNB]	Sigma-Aldrich, München
Ethylsulfonsäure [EMS]	Sigma-Aldrich, München
Epon	Serva, Heidelberg
Essigsäure 99 %	Roth, Karlsruhe
Ethanol 99 % (pa)	Roth, Karlsruhe
Ethanol 99 % (tech)	VWR, Darmstadt
Ethidiumbromid 1 %	Roth, Karlsruhe
Fetales Kälberserum [FCS]	Sigma-Aldrich, München
Fleischextrakt	Roth, Karlsruhe
Fructose D(-)	Roth, Karlsruhe
Glucose D(+)	Sigma-Aldrich, München
Glutaraldehyd 25 %	VWR, Darmstadt
Glycerin	Roth, Karlsruhe
Glycin (pa)	Roth, Karlsruhe
Halocarbon Oil 700	Sigma-Aldrich, München
Hefeextrakt	Roth, Karlsruhe
HEPES (min. 99,5 %)	Roth, Karlsruhe
Hoechst 33258	Sigma-Aldrich, München
Isoamylalkohol	Sigma-Aldrich, München
Isopropanol mind. 99,5 %	Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid	Roth, Karlsruhe
Kaliumhydrogenphosphat (pa)	Roth, Karlsruhe
Kaliumhydroxid	Roth, Karlsruhe
Kanamycin	Roth, Karlsruhe
Kupfersulfat [Cu(II)SO ₄ · 7H ₂ O]	Roth, Karlsruhe
Lachssperma DNA 10 mg/ml	Sigma-Aldrich, München
Levamisol	Sigma-Aldrich, München
Lipofectamine 2000 Reagent	Invitrogen, Karlsruhe
Lithiumchlorid	Merck, Darmstadt
Magnesiumsulfat [MgSO ₄ · 7H ₂ O]	Roth, Karlsruhe
Manganchlorid [Mn(II)Cl ₂ · 4H ₂ O]	Roth, Karlsruhe
Methanol (pa)	Roth, Karlsruhe
Milchpulver (Naturaflo)	Real, Mainz
MOPS	Biomol, Hamburg
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumazid	Sigma-Aldrich, München
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat [SDS]	Serva, Heidelberg
Natriumhypochlorit 5 %	Sigma-Aldrich, München
Natronlauge	Roth, Karlsruhe
NF-Acrylamid/Bis-Lösung 30 % (29:1)	Roth, Karlsruhe
Nonidet P-40	Fluka, Seelze
Osmiumtetroxid	VWR, Darmstadt
Pentylentetrazol [PTZ]	Sigma-Aldrich, München
Polyethylenglycol (PEG-MW 6000)	Sigma-Aldrich, München
Polyethylenglykol (6000)	Fluka, Seelze
Polyvinylalkohol 4-88	Fluka, Seelze
Ponceau S solution	Sigma-Aldrich, München
Propylenoxid	Serva, Heidelberg
Rinderserumalbumin [BSA]	Sigma-Aldrich, München
Saccharose D(+)	Roth, Karlsruhe
Salzsäure 37 %	Roth, Karlsruhe

3. Material und Methoden

Seakem® LE Agarose	Biozym, Oldendorf
Sekundenkleber (Cyanacrylat)	Aesculap Inc., Tuttlingen
SSC 20x	Sigma-Aldrich, München
Stickstoff	Linde, Wiesbaden
TEMED	Roth, Karlsruhe
Tetracyclin	Sigma-Aldrich, München
Tris Pufferan®	Roth, Karlsruhe
Trizma hydrochlorid	Sigma-Aldrich, München
Trypsin	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Trypton/Pepton aus Casein	Roth, Karlsruhe
Tween 20	Merck, Darmstadt
Uranylacetat	Serva, Heidelberg
Xylencyanol	Merck, Darmstadt
Zinksulfat [ZnSO ₄ · 7H ₂ O]	Roth, Karlsruhe
Kits	
1-Step NBT/BCIP	Pierce, Bonn
DNeasy Tissue	Qiagen, Hilden
Nucleotide Removal	Qiagen, Hilden
Omniscript	Qiagen, Hilden
Prime-It II Random Primer Labeling	Stratagene, La Jolla (CA)
Protease Inhibitor complete	Roche, Mannheim
Qiafilter Plasmid Maxi-Prep	Qiagen, Hilden
Qiaprep Spin Mini-Prep	Qiagen, Hilden
Qiaquick Gel Extraction	Qiagen, Hilden
Qiaquick PCR-Purification	Qiagen, Hilden
RNeasy	Qiagen, Hilden
SulfoLink	Pierce, Bonn
SuperSignal® West Pico Chemilumineszenz Substrat	Pierce, Bonn
Enzyme	
Alkalische Phosphatase [CIAP]	Fermentas, St. Leon-Rot
Kollagenase Typ IV	Sigma-Aldrich, München
Phusion High-Fidelity DNA Polymerase	Bio Cat, Heidelberg
Proteinase K	Sigma-Aldrich, München
RNase	Roche, Mannheim
T4 DNA Ligase	Fermentas, St. Leon-Rot
Taq-Polymerase	Eppendorf, Hamburg
Marker	
1 kb Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot
100 bp DNA Ladder	NEB, Frankfurt am Main
100 bp Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot
Massruler	Fermentas, St. Leon-Rot
peqGOLD Protein-Marker III (Prestained)	Peqlab, Erlangen

3. Material und Methoden

3.2 Puffer und Nährmedien

Puffer und Nährmedien wurden wie folgt in H₂O_{dd} angesetzt (Tabelle 3-2).

Tabelle 3-2 Verwendete Puffer und Nährmedien.

C. elegans Kultur	
NGM-Agar (N ematode G rowth M edium ²⁴)	3 g/l NaCl 16 g/l Bacto Agar 2,5 g/l Bacto Pepton
1 M KPO ₄ (pH 6,0)	0,8 M KH ₂ PO ₄ 0,2 M K ₂ HPO ₄
M9-Medium	41 mM Na ₂ HPO ₄ 25 mM KH ₂ PO ₄ 10 mM NaCl 20 mM NH ₄ Cl
PBS (Phosphate-Buffered Saline , pH 7,4)	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 10 mM Na ₂ HPO ₄ 2 mM KH ₂ PO ₄
S-Basal	100 mM NaCl 50 mM KPO ₄ (pH 6,0) 1 ml/l Cholesterin (5 mg/ml 95 % EtOH)
Trace metals	2,5 mM FeSO ₄ · 7H ₂ O 5 mM Na ₂ EDTA 1 mM MnCl ₂ · 4H ₂ O 1 mM ZnSO ₄ · 7H ₂ O 0,1 mM CuSO ₄ · 5H ₂ O
S-Basal "goodies"	10 ml/l Trace metals 10 mM Kaliumcitrat (pH 6,0) 3 mM CaCl ₂ 3 mM MgSO ₄
Bleiche	1 g NaOH 10 ml 5 % Na-Hypochlorid 40 ml H ₂ O _d
Einfriermedium für <i>C. elegans</i>	200 mM NaCl 100 mM KPO ₄ (pH 6,0) 60 % Glycerin 0,3 mM MgSO ₄
Biochemie	
Lysepuffer	10 mM HEPES (pH 7,4) 340 mM Saccharose Proteaseinhibitor Complete (1 Tablette pro 25 ml)
H-Puffer	10 mM Tris (pH 7,4) 1 mM EGTA 1 mM EDTA 2 mM DTT Proteaseinhibitor Complete (1 Tablette pro 25 ml)
5x Lämmli-Puffer	100 mM Tris-Cl (pH 6,8) 20 % Glycerin 4 % SDS 5 % DTT 0,01 % Bromphenolblau

3. Material und Methoden

5 % Sammelgel (5 ml)	830 µl 30 % Bis-Acrylamid 630 µl 1M Tris-Cl (pH 6,8) 50 µl 10 % SDS 50 µl 10 % APS 5 µl TEMED
12 % Trenngel (10 ml)	4 ml 30 % Bis-Acrylamid 2,5 ml 1,5M Tris-Cl (pH 8,8) 100 µl 10 % SDS 100 µl 10 % APS 4 µl TEMED
Elektrodenpuffer	25 mM Tris-Base (pH 8,3) 250 mM Glycin 0,1 % SDS
Coomassie-Färbelösung	0,05 % Coomassie Brilliant Blue R-250 40 % Ethanol 10 % Essigsäure
Coomassie-Entfärbelösung	40 % Ethanol 10 % Essigsäure
Transferpuffer	25 mM Tris-Base 150 mM Glycin 10 % Methanol
Dot-Blot	
TBS (Tris-Buffered Saline, pH 7,5)	20 mM Tris-HCl (pH 7,5) 500 mM NaCl
TTBS (Tween TBS)	0,05 % Tween 20 in TBS
Blocklösung	1 % BSA in TBS
Antikörper-Puffer	1 % BSA in TTBS
Molekularbiologie	
Einzeltier-Lysepuffer	50 mM KCl 10 mM Tris (pH 8,3) 2,5 mM MgCl ₂ 0,45 % Nonidet P-40 0,45 % Tween-20 60 µg/ml Proteinase K
10x Mikroinjektionspuffer	20 % Polyethylenglycol (MW: 6.000) 200 mM KPO ₄ (pH 7,5) 30 mM Kaliumcitrat (pH 7,5)
20x SSC (Sodium Chloride Sodium Citrate, pH 7,0)	3 M NaCl 0,3 M Na ₃ Citrat
Hybridisierungspuffer	1 M Na ₂ HPO ₄ (pH 7,2) 20 % SDS 0,5 M EDTA (pH 8,0)
Waschpuffer 1	2x SSC, 0,1 % SDS
Waschpuffer 2	1x SSC, 0,1 % SDS
Waschpuffer 3	0,1x SSC, 0,1 % SDS
TBE (Tris/Borat/EDTA)	50 mM Tris 5 mM Borsäure 1 mM EDTA (pH 8,0)
Bakterienkultur	
LB-Medium	10 g/l NaCl 10 g/l Trypton 5 g/l Hefeextrakt
LB-Agar	15 g/l Agar in LB-Medium

3. Material und Methoden

NB (Nutrient Buffer)	5 g/l NaCl 1,5 g/l KH ₂ PO ₄ 3,5 g/l K ₂ HPO ₄ 1 g/l Glucose 10 g/l Bacto Pepton 3 g/l Fleischextrakt
NBA (Nutrient Buffer-Agar)	15 g/l Bacto Agar
Zellkultur	
Eindeckmedium	1 g Polyvinylalkohol 4-88 2 ml Glycerin in 4 ml PBS (pH 8,0)
Trypsin-Lösung	99,7 % PBS (pH 7-7,5) 0,25 % Trypsin 0,02 % EDTA
Zellkultur-Medium	90 % DMEM 10 % FCS (bei 56 °C 30 min inaktiviert; bei -20 °C gelagert)
Einfriermedium für Zellen	60 % DMEM 20 % FCS 20 % DMSO
Elektronenmikroskopie	
Fixierlösung 1 (Elektronenmikroskopie)	10 mM HEPES 0,7 % Glutaraldehyd 0,7 % Osmiumtetroxid
Fixierlösung 2 (Elektronenmikroskopie)	10 mM HEPES 2 % Osmiumtetroxid

3.3 DNA-Oligonukleotide

Die Amplimere für die DNA-Polymerase Kettenreaktion, Klonierungen und die Southern-Blot Sonden wurden mit Hilfe des Programms Clonemanager entworfen und von der Firma MWG (7.3 web-a) bezogen (Tabelle 3-3).

Tabelle 3-3 Sequenzen der verwendeten Amplimere.

Nr.	Sequenz 5'→3'
00-13	TCC CCC CGG GCA GCG ATA TCA CTT GGA TTG G
00-15	TCC CCC CGG GCA TAA CCA TAT CCT TCC GAC T
00-17	CGG GAT CCT GGA ATC GTC CTT GAG TCG CCT G
00-18	CGG GAT CCG GGA TTA CCA TAT CCT TCC GAC T
00-20	AAC TGC AGC TCC TGT GAA AGT AGT TGT TCC C
01-04	ACG CGT CGA CAT GTC TAA TCC GTT CGC CGA CCC
01-12	CCG CTC GAG ATG GAG AAC GTG CGT GCT TAT GGT GCC
01-13	CCC AAG CTT ATA ACC ATA TCC TTC CGA CTG AGT GTA TGG G
01-14	CCG CTC GAG ATG TCA GAT AAT CCG TTC GCC GAC CC
01-15	CCC AAG CTT GAA TCG TCC TTG AGT CGC CTG ATT G
01-16	CCC AAG CTT GTT CTC TGC GTC TCT AAC ACT TCT GGC
01-17	CCC AAG CTT TCC GGG TTT TTT GCT GAT TTG CTA CC
02-01	TGA AAA TGT TCG AAA CCA CTA GAA
02-02	TTC TTC GAC AAA AAT GAA TGA AAA

3. Material und Methoden

Tabelle 3-3 Sequenzen der verwendeten Amplimere.

Nr.	Sequenz 5'→3'
02-03	AAT TGA ATG ACG AAT CAT TTC TGA
02-04	AGA GCA GTT TCA GAA TTG TGA CTT
02-05	GAG AAT TTG TTT GGA AGC GTA TTT
02-06	ATG CTG GAG ATT ACG GAG GTT A
02-07	GGT GCT CAT GAC AAG GTA TCA A
02-08	CTG AAT TAT TTG GAC AGG GGT C
02-09	TTG TCA CGG ATC TCA CTA CGA C
02-10	GTC TTC GTG ATC TGT CAT CGA G
02-11	GAC ACG ACA ATG CTG TGT CAC
02-12	TAC CCG TTC CAT CAA CAC AGT G
02-13	CCC CAA CTG TTA ATA GCG GCT A
02-14	GGT TTA ATT ACC CAA GTT TGA G
02-15	GGT TTT AAC CCA GTT ACT CAA G
03-01	TGT ATG TGA CAC AGC ATT GTC
03-02	AAA CTG CAG TCT TTC TTA TCC TTT GCA GTT ACG
03-88	AGA TCC GCT AGC CGA TAA GGA TCC GAT GGC C
03-94	ATG TCG ACC CAG CGA TAT CAC TTG GAT TG
03-97	ATA TCG ATA TGC CTT CGA TTC CTG CAC AA
04-46	AAC TGC AGA TTC AGA TTT TTT TGC AAA AGT TTC C
04-47	AAA CTG CAG TCT TTC TTA TCC TTT GCA GTT ACG
04-48	TCC CCC CGG GGT TAC TGT AGA AAC ATA GAG AAA C
04-72	AAA GCG GCC GCT TAG GCG CCG GTG GAG TGG C
04-81	TCG TTC CAT AGT CGG TTT CC
04-84	GTT ATG GAT ACG GAG GAG AC
04-86	GGG TTT GAT GGT GGT TGT TG
04-95	CCA CCA CCT GCA GGA AAC ATT TTT CCT CAA AAT AG
04-96	CCA CCA CCC GGG GCT AAA ATA AAA GAA ATA TAG AG
05-132	GGA GGA GTC GAC GTA GAT TCA ACC GAG CAT TC
05-133	GGA GGA GGA TCC GGG TCA GAG GTG TTC AGA TTC
05-254	CCT ACT TTT TCC TCC TAT TTT GTG CC
05-255	GAG GTC ATG AAA ATT GCA GC
05-262	GGC ATT TGA AAA AAT GAA AAA TGT TTG GCC C
05-263	TCG GTT TTT TTC TTC GAC
06-20	TAT TGA AAC GGA AGG ACC
06-23	TGA GTT GTT TGC AGC AG
06-102	CAT CCC GGG TAG TTT TTT AGC CAA AC
06-103	CCA CCA TGG GTT GAA AAT AAA ACT TGA AG

3. Material und Methoden

3.4 Plasmide und Cosmide

3.4.1 Plasmide

Tabelle 3-4 Plasmide.

Plasmid	Resistenz	Herkunft
pECFP-N1	Kanamycin/Neomycin	Clontech, Mountain View, (CA)
pEYFP-N1	Kanamycin/Neomycin	Clontech, Mountain View, (CA)
pRSETB(<i>mRFP</i>)	Ampicillin	Dr. Tsien ²⁹
EKL15(<i>lin-15+</i>)	Ampicillin	Dr. Jorgensen ¹⁹
pVH20.01(<i>YFP</i>)	Ampicillin	Dr. Hutter
pVH10.10(<i>CFP</i>)	Ampicillin	Dr. Hutter
STE14-CUB-RURA3-MET-313	Ampicillin	Dr. Johnsson
L4440	Ampicillin	Caenorhabditis Genetics Center (CGC)

3.4.2 Cosmide

Tabelle 3-5 Cosmide.

Cosmid	Genbank-Nr.	Herkunft
F42G8	U40417	Wellcome Trust Sanger Institute, Hinxton, Cambridge
M01D7	AF038618	Wellcome Trust Sanger Institute, Hinxton, Cambridge
T08A9	AF003739	Wellcome Trust Sanger Institute, Hinxton, Cambridge

Die Sequenzen der Cosmide wurden von der NCBI Gendatenbank (7.3 web-b) und *backbone* Sequenzen von der Sanger Datenbank bezogen (7.3 web-c, web-d).

3.5 Restriktionsendonukleasen

Tabelle 3-6 Restriktionsendonukleasen.

Enzym	Schnittsequenz	Verwendeter Puffer	Herkunft
<i>Bam</i> HI	G [↓] GATCC	BamHI (unique)	Fermentas, St. Leon-Rot
<i>Hind</i> III	A [↓] AGCTT	R (red)	Fermentas, St. Leon-Rot
<i>Nco</i> I	C [↓] CATGG	Tango (yellow)	Fermentas, St. Leon-Rot
<i>Pst</i> I	CTGCA [↓] G	O (orange)	Fermentas, St. Leon-Rot
<i>Sal</i> I	G [↓] TCGAC	O (orange)	Fermentas, St. Leon-Rot
<i>Sbf</i> I	CCTGCA [↓] GG	NEB 4	NEB, Frankfurt am Main
<i>Sma</i> I	CCC [↓] GGG	Tango (yellow)	Fermentas, St. Leon-Rot
<i>Xba</i> I	T [↓] CTAGA	Tango (yellow)	Fermentas, St. Leon-Rot
<i>Xho</i> I	C [↓] TCGAG	R (red)	Fermentas, St. Leon-Rot
<i>Xma</i> I	CCC [↓] GGG	NEB 4	NEB, Frankfurt am Main

3.6 Antikörper

Zur Herstellung von Antikörpern gegen die *C. elegans* TVPs wurden Peptide der N- und C-Termini der entsprechenden Proteine (SPH-1, SNG-1 und SCM-1) von der Firma Peptide Specialty Laboratories GmbH (Heidelberg) generiert (Tabelle 3-7) und zur Immunisierung der Tiere (Meerschweinchen und

3. Material und Methoden

Kaninchen) an das Trägerprotein Ovalbumin (OVA) gekoppelt. Vor der Immunisierung wurde den Tieren als Kontrolle Präimmunserum entnommen. Nach der ersten Immunisierung erfolgt eine schwache Immunantwort, bei der hauptsächlich IgM Antikörper von den B-Zellen produziert werden. Um IgG Antikörper zu erhalten, wurden die Tiere ein weiteres Mal mit den entsprechenden Peptiden immunisiert. Zusätzlich kommt es durch wiederholte Immunisierung zur sog. Affinitätsreifung, bei der die hypervariable Region des IgG Antikörpers weiter optimiert wird. Der Antikörpertiter wurde mittels indirektem ELISA bestimmt. Nachdem das Serum einen IgG Antikörpertiter von 1:64.000 ($OD_{450} \geq 0,6$) erreicht hatte, wurden die Tiere ausgeblutet. Von dem Blut wurde das Serum gewonnen. Die Antikörper wurden mit Hilfe des Sulfo-Link Kits affinitätsgereinigt. Dazu wurde 1 mg des jeweiligen Peptids mit Kopplungspuffer an die Säulenmatrix gekoppelt. Die Kopplungseffizienz wurde mit Hilfe des Ellmans Reagenz, welches mit freien Thiol-Gruppen unter Bildung eines gelben Farbstoffes reagiert, photometrisch bei 410 nm bestimmt. Die freien Reaktionsstellen der Säulenmatrix wurden durch Inkubation der Matrix mit 0,05 M L-Cystein · HCl bei Raumtemperatur für 45 min abgesättigt. Nach einem Waschschrift mit PBS wurde das Serum zu der Säulenmatrix gegeben und bei 4 °C über Nacht inkubiert. Nach einem Waschschrift mit PBS wurden die Antikörper, die an die Peptide gebundenen hatten, mit 10 mM Glycin (pH 2,4) von der Säule eluiert und in Reaktionsgefäßen, die 1 M Tris-Puffer (pH 9) zum Neutralisieren enthielten, aufgefangen. Zur Regeneration der Säulenmatrix wurde diese mit PBS gewaschen und mit PBS + 0,05 % Na-Azid bei 4 °C in dem mit Parafilm verschlossenen Röhrchen gelagert, so dass die Säulen für weitere Aufreinigungen zur Verfügung standen.

Tabelle 3-7 Affinitätsgereinigte Primärantikörper.

Antigenbezeichnung	Spezies		Peptidsequenz
	Meerschweinchen	Kaninchen	
SPH-1 CT	gp 32	rb 74	CKEVVPRDSSNPSDIA
SNG-1 CT	gp 33	rb 71	CAPQTMQQPPSNPYTQSEGYGY
SNG-1 NT	gp 34	rb 72	MENVRAYGAGLAGANFDKNTC
SCM-1 CT	gp 35	rb 70	CRLYRGAGFSIDKARQEF TNG
SCM-1 NT	gp 36	rb 69	RAGGSNAQPTTHQSTGSLGNKSC

3. Material und Methoden

Folgende Sekundärantikörper wurden in dieser Arbeit zur Detektion der oben genannten Primärantikörper verwendet (Tabelle 3-8).

Tabelle 3-8 Sekundärantikörper.

Antikörper gegen	Spezies	Konjugat	Herkunft
Meerschweinchen (IgG)	Ziege	Alkalische Phosphatase	Jackson/Dianova, Hamburg
Meerschweinchen (IgG)	Ziege	Cy2	Jackson/Dianova, Hamburg
Meerschweinchen (IgG)	Ziege	Cy3	Jackson/Dianova, Hamburg
Meerschweinchen (IgG)	Ziege	HRP	Jackson/Dianova, Hamburg
Kaninchen (IgG)	Ziege	Alkalische Phosphatase	Jackson/Dianova, Hamburg
Kaninchen (IgG)	Esel	Cy3	Jackson/Dianova, Hamburg
Kaninchen (IgG)	Ziege	Alexa 488	Molecular Probes, Karlsruhe
Kaninchen (IgG)	Ziege	Texas Red	Jackson/Dianova, Hamburg
Kaninchen (IgG)	Ziege	HRP	Jackson/Dianova, Hamburg

3.7 Bakterienstämme und Kultivierung

Folgende *E. coli* Bakterienstämme wurden eingesetzt und kultiviert (Tabelle 3-9).

Tabelle 3-9 Bakterienstämme.

Stamm	Spezies	Herkunft
DH5 α	<i>Escherichia coli</i>	Stratagene, La Jolla (CA)
HB101	<i>Escherichia coli</i>	DSMZ, Braunschweig
HT115(DE3)	<i>Escherichia coli</i>	Caenorhabditis Genetics Center (CGC)
XL1-Blue	<i>Escherichia coli</i>	DSMZ, Braunschweig

3.7.1 Kultivierung von XL1-Blue und DH5 α

Die Bakterienstämme XL1-Blue und DH5 α wurden in LB-Medium mit den entsprechenden Antibiotika (Ampicillin, Kanamycin oder Tetracyclin) bei 37 °C und 200 U/min über Nacht inkubiert, bis diese eine Dichte von OD₅₉₅ < 1 erreicht hatten.

3.7.2 Kultivierung von HB101

Als Nahrung für *C. elegans* wurde der Bakterienstamm HB101 verwendet. Dazu wurde mit Hilfe eines Zahnstochers eine kleine Bakterienkolonie von einer ENB-Agarplatte gepickt und in 4 ml ENB-Medium überführt. Diese Vorkultur wurde über Nacht bei 37 °C und 200 U/min inkubiert, danach in 300 ml ENB-Medium überführt und erneut über Nacht bei 37 °C und 200 U/min inkubiert. Die Bakterien wurden bei 4 °C für 1-2 Monate aufbewahrt oder in 15 % Glycerin in flüssigem Stickstoff (-196 °C) eingefroren und bei -70 °C dauerhaft gelagert.

3.7.3 Herstellung kompetenter Bakterien

Zur Klonierung der Vektoren wurden die in 3.7.1 beschriebenen Bakterienstämme verwendet. Ein Tropfen einer aufgetauten Glycerinkultur wurde auf einer LB-Agar-Platte (12,5 µg/ml Tetracyclin) ausgestrichen und bei 37 °C über Nacht inkubiert. Mit einer Einzelkolonie angeimpftes LB-Medium (10 µg/ml Tetracyclin) wurde bei 37 °C und 200 U/min über Nacht inkubiert. Mit dieser Vorkultur wurde eine Großkultur im Verhältnis 1:50 angesetzt. Diese wurde bei 37 °C und 200 U/min solange inkubiert bis die Kultur eine $OD_{595} = 0,6$ erreicht hatte. Die Bakterien wurden bei 4.000 U/min bei 4 °C pelletiert und anschließend in der Hälfte des Kulturvolumens mit 30 mM $CaCl_2$ bei 4 °C resuspendiert. Die Suspension wurde für 20 bis 30 min bei 4 °C inkubiert und anschließend pelletiert. Das Pellet wurde in 1/20 des Kulturvolumens mit 30 mM $CaCl_2$ pro 15 % Glycerin resuspendiert. Aliquots wurden in flüssigen Stickstoff eingefroren und bei -70 °C bis zur Verwendung gelagert.

3.8 *C. elegans* Stämme

Folgende *C. elegans* Stämme wurden verwendet bzw. im Verlauf dieser Arbeit generiert (siehe Tabelle 7-3).

3.9 *C. elegans* Stammhaltung

C. elegans wurde auf mit Bakterien beimpften NGM-Agar-Platten kultiviert. Zur Herstellung der Platten wurde flüssiger 55 °C warmer NGM-Agar mit 1 ml/l Cholesterin (5 mg/ml 95 % EtOH), 25 mM KPO_4 , 1 mM $MgSO_4$ und 1 mM $CaCl_2$ versehen und unter sterilen Bedingungen in Kulturschalen (Ø 35, 60 oder 100 mm) gegossen. Die Platten wurden bei Raumtemperatur für 30 bis 60 min getrocknet und bis zu 2 Wochen bei 4 °C gelagert. Die NGM-Platten wurden mit 15-20 µl Bakterienflüssigkultur (HB101) beimpft und über Nacht bei 37 °C inkubiert, so dass ein dicker Bakterienrasen entstand. Die Platten konnten so für die *C. elegans* Kultivierung verwendet werden. Die Tiere wurden täglich mit Hilfe eines *wormpicks* umgesetzt. Es handelt sich dabei um einen in einer Pasteurpipettenspitze verschmolzenen Platindraht (Ø 0,2 mm), dessen Ende mit einer Flachzange plattgedrückt wurde. 4-5 Tiere des larvalen Stadiums L4 wurden gepickt und auf eine neue bakterienbeimpfte NGM-Platte übertragen.

3.10 Cholesterinfreie NGM-Platten

Um das Verhalten von *C. elegans* unter cholesterinfreien Bedingungen zu untersuchen, wurden cholesterinfreie NGM-Platten hergestellt⁵⁷. Außerdem wurden Bakterien von einer 37 °C HB101

Übernachtkultur gewonnen, die am nächsten Tag fünfmal mit reichlich M9-Medium gewaschen wurden, um mögliche Cholesterinreste des Kulturmediums zu entfernen.

3.11 Kryokonservierung und Auftauen von *C. elegans* Stämmen

Die larvalen *C. elegans* Stadien L1 und L2 können bei -70 °C bis zu zehn Jahre und bei -196 °C für mehr als zehn Jahre gelagert werden²⁴. Dazu wurden fünf L4 Tiere auf eine NGM-Platte überführt und bei 20 °C solange inkubiert bis kein Futter auf der Platte übrig blieb und ausreichend viele Tiere der Stadien L1 und L2 vorhanden waren. Die Tiere wurden mit S-Basal von den NGM-Platten gespült, in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt, pelletiert und mit S-Basal gewaschen. Anschließend wurden die Tiere in 1 ml S-Basal und 1 ml Einfriermedium in ein Kryoröhrchen pipettiert. Die Kryoröhrchen wurden in eine Kryobox transferiert und bei -70 °C eingefroren. Durch die Kryobox wurde ein schonendes Einfrieren gewährleistet, da sich die Temperatur pro Stunde nur um 1 °C verringerte. Zur permanenten Lagerung wurden die Tiere in flüssigem Stickstoff (-196 °C) gelagert.

3.12 Generierung von *C. elegans* Männchen

Um *C. elegans* Männchen für Verpaarungen zu erhalten, wurden fünf L4 Tiere auf eine neue NGM-Platte transferiert. Die Tiere wurden 5-6 h bei 30 °C in einem Wärmeschrank inkubiert und danach bei 20 °C gelagert. Nach 4 Tagen entstanden aufgrund des Hitzeschocks junge Männchen der F1-Generation, die für Verpaarungen verwendet wurden. Vier junge Männchen wurden dabei mit einem Hermaphroditen des Stadiums L4 verpaart.

3.13 Herstellung stadiensynchroner *C. elegans* Kultur

Um *C. elegans* Kulturen zu erhalten, die sich im gleichen Entwicklungsstadium befinden, wurden adulte Tiere von einer NGM-Platte mit M9-Medium gewaschen und in ein Reaktionsgefäß überführt. Nach Pelletieren der Tiere bei 100 x g wurde der Überstand entfernt und die Tiere dreimal mit M9-Medium gewaschen. Anschließend wurde zu den pelletierten Tieren für maximal 5 min Bleiche hinzugegeben, so dass die Tiere starben und lediglich die Eier, die von einer dicken Cuticula umgeben sind, überlebten. Das Pellet wurde fünfmal mit reichlich M9-Medium gewaschen. Zum Schluss wurden die pelletierten Eier in einem geringen Volumen M9-Medium resuspendiert, auf eine frische unbeimpfte NGM-Platte gegeben und bei 20 °C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden die geschlüpften L1 Larven mit M9-Medium von der Platte gewaschen und auf frische, mit HB101 beimpfte NGM-Platten (Ø 60 mm oder 100 mm) verteilt. Nach weiteren drei Tagen bei 20 °C befanden sich junge adulte Tiere auf diesen Platten.

3.14 Herstellung stadiensynchroner *C. elegans* Flüssigkultur

Um Tiere in sehr großer Anzahl zu erhalten, wurde *C. elegans* in Flüssigkulturen herangezogen. Zunächst wurde eine 2 l über Nachtkultur der Futterbakterien HB101 bei 37 °C und 190 U/min angesetzt. Die Bakterien wurden pelletiert, dreimal mit M9-Medium gewaschen und das Pellet im 4-fachen Volumen M9-Medium resuspendiert. Dies entsprach einer Futtermenge von 50 %. Bei direkter Verwendung des Futters wurde dieses bei 4 °C gelagert. Ansonsten erfolgte die Lagerung bei -70 °C. Anschließend wurde wie in 3.13 beschrieben eine NGM-Platte (Ø 60 mm) mit adulten Tieren gebleicht, die mit M9-Medium gewaschenen *C. elegans* Eier in 50 ml S-Basal "goodies" überführt und bei 25 °C und 190 U/min über Nacht kultiviert. Am nächsten Tag wurde die Dichte (Anzahl der Tiere/ml) der geschlüpften L1 Larven bestimmt. Da *C. elegans* vom Ei bis zum Adulten 2,125 % Bakterien pro Tier benötigt, wurde für die *C. elegans* Flüssigkultur die entsprechende Futtermenge bestimmt (Formel 3-1).

Formel 3-1 Futtermengenbestimmung.

$$\text{Futtermenge}[\mu\text{l}] = \frac{\frac{\sum \text{Tiere}}{0,1\mu\text{l}} \times 10 \times (\text{Kulturvolumen}[\mu\text{l}]) \times 2,125\% [\mu\text{l}]}{50\%}}$$

Dabei wurde darauf geachtet, dass die Kulturdichte nicht größer als 10.000 Tiere/ml wurde, da sich ab einer Kulturdichte von größer 12.000 Tieren/ml Dauer-Stadien bilden.

3.15 Zellkultur

3.15.1 Zelllinien

Auf Grund ihrer flachen Form wurden humane hepatozelluläre Karzinomzellen der Linie PLC (CRL-8024) verwendet⁵.

3.15.2 Kryokonservierung und Auftauen von Zellen

Zum Einfrieren von Zellen wurden konfluent bewachsene Kulturschalen (1 x 10⁶ Zellen) verwendet, deren Kulturmedium mit einer Pasteurpipette abgesaugt und Reste von toten Zellen durch Waschen mit FCS-freien Medium entfernt wurden. Danach wurden die Zellen mit 37 °C warmen 0,5 M EDTA einmal kurz gewaschen und anschließend mit 2 ml 37 °C warmer Trypsin-Lösung von der Oberfläche der Kulturschale gelöst. Die Trypsin-Lösung wurde vorsichtig entfernt und die Zellen wurden solange unter Beobachtung bei Raumtemperatur inkubiert bis sich der Zellverband in Einzelzellen auflöste.

3. Material und Methoden

Anschließend wurden die Zellen in 5 ml Kulturmedium aufgenommen und bei 1.000 x g für 3 min pelletiert. Das Pellet wurde in 0,5 ml Kulturmedium vorsichtig resuspendiert und 0,5 ml 0 °C kaltes Einfriermedium hinzugefügt, in ein Kryoröhrchen überführt und über Nacht bei -70 °C in einer Kryobox eingefroren. Die Temperatur in der Kryobox nimmt pro Stunde um 1 °C ab und garantiert so ein schonendes Einfrieren. Am nächsten Tag wurden die Kryoröhrchen in einen Container mit flüssigem Stickstoff (-196 °C) überführt. Bei Bedarf wurden die Zellen in einem 37 °C warmen Wasserbad aufgetaut, in 5 ml 37 °C warmen Kulturmedium aufgenommen und für 3 min bei 1.000 x g pelletiert. Das Pellet wurde in 1 ml Kulturmedium resuspendiert und in eine 60 mm Kulturschale mit 4 ml Kulturmedium überführt. Die Zellen wurden durch vorsichtige Kippbewegungen gleichmäßig verteilt und in einem Inkubator (37 °C, 5 % CO₂) kultiviert.

3.15.3 Passagieren von Zellen

Zur Passage der Zellen wurde das Kulturmedium mit einer Pasteurpipette abgesaugt und die Zellen einmal mit FCS-freiem Kulturmedium gewaschen. Zur Bestimmung der Zelldichte wurden 10 µl Zellsuspension entnommen und die Zelldichte mittels Neubauer-Zählkammer bestimmt (Formel 3-2). Je nach berechneter Zelldichte wurden die Zellen (1:2 bis 1:10) mit neuem Kulturmedium verdünnt und kultiviert (37 °C, 5 % CO₂).

Formel 3-2 Bestimmung der Zellzahl mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer.

$$\text{Zellen/ml} = \left(\frac{\text{Zellzahl von vier c - Quadranten}}{4} \right) \times 10^4$$

3.15.4 Zellbewachsene Deckgläser

Um zellbewachsene Deckgläser vorzubereiten, wurden diese über Nacht in 99 %-igen Ethanol inkubiert und anschließend mit einem fusselfreien Papiertuch gereinigt. Danach wurden die Deckgläser in einem geschlossenen Glasbehälter für 2 h bei 300 °C im Trockenschrank sterilisiert und bei Raumtemperatur steril gelagert. Bei Bedarf wurden die Zellen in eine Kulturschale mit Deckgläsern ausplattiert. Durch vorsichtige Kippbewegungen wurden die Zellen gleichmäßig verteilt und im Inkubator (37 °C, 5 % CO₂) kultiviert bis sich ein gleichmäßiger Zellrasen bildete.

3.15.5 Transiente Transfektion

Zur transienten Transfektion wurde Lipofectamine 2000 verwendet. Dazu wurden konfluent bewachsene Deckgläser in Kulturschalen (Ø 35 mm) mit FCS-freiem Kulturmedium gewaschen und mit 2 ml Kulturmedium wieder aufgefüllt. Bei einer Oberfläche der Kulturschale von ca. 10 cm² wurde eine DNA-Menge von 4,0 µg eingesetzt. Die DNA wurde in 250 µl Opti-MEM (Lösung A) und 5 µl

3. Material und Methoden

Lipofectamin wurden in 245 µl Opti-MEM (Lösung B) gegeben und jeweils vorsichtig gemischt. Beide Lösungen (A und B) wurden dann bei Raumtemperatur für 5 min, anschließend zusammengegeben und bei Raumtemperatur für weitere 20 min inkubiert. Danach wurde die Lösung in kleinen Tropfen auf die Zellen gegeben und durch vorsichtige Kippbewegungen gleichmäßig verteilt. Die Zellen wurden im Inkubator (37 °C, 5 % CO₂) über Nacht kultiviert. Am nächsten Tag wurde das Medium abgesaugt und durch 2 ml frisches Kulturmedium ersetzt. Nach weiteren 48 h Kultivierung wurde ein Deckglas entnommen und die Transfektionseffizienz bestimmt. Die übrigen Zellen wurden kurz mit 37 °C temperierten PBS gewaschen und fixiert.

3.15.6 Fixierung

a) Methanol-Aceton¹⁷⁶

Dazu wurden die Deckgläser zunächst für 5 min in -20 °C kaltem Methanol und für 10 sec in Aceton (-20 °C) getaucht und danach auf einem Papiertuch bei Raumtemperatur getrocknet.

b) Paraformaldehyd

Hierfür wurden die Deckgläser 10 min in 4 °C kaltem 4 % PFA in PBS gegeben. Anschließend wurden diese dreimal 5 min mit 4 °C kaltem PBS gewaschen. Es folgte eine Behandlung mit 0,01 % Digitonin (4 °C). Nach zweimaligem Waschen für 5 min in 4 °C PBS wurden die Deckgläser in 5 % BSA bei Raumtemperatur für 10 min inkubiert. Es folgten 3 weitere Waschschrte für 5 min mit 4 °C kaltem PBS. Die Deckgläser wurden bis zur weiteren Verwendung in PBS gelagert.

3.16 Immunozytochemie

Für die Immunozytochemie wurden die auf Deckgläsern fixierten Zellen mit 100 µl PBS für 5 min gewaschen. Die Deckgläser wurden mit 50 µl der Primärantikörperlösung (Verdünnung 1:200 in PBS; gp32-gp36, rb69-rb72 und rb74) für 2 h bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS für jeweils 5 min wurden die Zellen mit Sekundärantikörperlösung (αgp-Cy2 1:100, αgp-Cy3 1:200, arb-TxR 1:50 und Alexa 488 1:400 in PBS verdünnt) für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen viermal mit 100 µl PBS für jeweils 5 min gewaschen und anschließend einmal kurz mit H₂O_{dd} gespült, um Salze zu entfernen. Die Deckgläser wurden mit einem Tropfen Evanol auf einem Objektträger eingedeckt. Bis zur mikroskopischen Analyse wurden die Präparate bei 4 °C dunkel gelagert.

3.17 *C. elegans* Mikroskopie

3.17.1 Konfokale Laserscanmikroskopie

Für die mikroskopischen Untersuchungen von *C. elegans* wurden Objektträger mit einer dünnen 2 %-igen Agaroseschicht versehen. Um die Tiere unter dem Mikroskop konfokal zu analysieren, wurden junge adulte Hermaphroditen auf dem Objektträger mit einem Tropfen 50 mM Levamisol oder mit Natriumazid (50 mM bis 1 M) paralyisiert.

3.17.2 Elektronenmikroskopie

Für die Elektronenmikroskopie wurden adulte Tiere der Stämme N2 und EG2960 von den NGM-Platten (\varnothing 100 mm) mit M9-Medium gespült, in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt und pelletiert. Die pelletierten Tiere wurden viermal mit M9-Medium und einmal mit 10 mM HEPES gewaschen. Zur Fixierung wurden die Tiere mit der Fixierlösung 1 für 1 h bei 4 °C inkubiert. Anschließend erfolgte eine weitere Fixierung mit der Fixierlösung 2 für 3 h bei 4 °C. Nach zweimaligem Waschen mit 10 mM HEPES für 15 min bei 4 °C erfolgte ein Kontrastierungsschritt mit 1 % Uranylacetat in Ethanol über Nacht bei 4 °C. Die so vorbereiteten Präparate wurden anschließend mit 10-96 % Ethanol dreimal für 30 min bei Raumtemperatur entwässert. Um die Präparate für das Einbetten vorzubereiten, wurden diese zweimal für 5 min in Propylenoxid und anschließend für jeweils 45 min in einer 1:3, 1:1 und 3:1 Mischung aus Epon:Propylenoxid inkubiert. Schließlich wurden die Tiere in einem frischen Kunstharzgemisch in kleinen Förmchen ausgerichtet. Das Kunstharz polymerisierte für drei Tage bei 60 °C und wurde anschließend getrimmt, um überschüssiges Kunstharz zu entfernen. Mit Hilfe eines Ultramikrotoms und eines Diamantmessers wurden von der Oberfläche der durch das Trimmen entstandenen Pyramide ca. 60 nm dünne Schnitte angefertigt. Diese Schnitte wurden in einen mit Wasser gefüllten Trog aufgefangen und auf Grids übertragen, die mit Formvar beschichtet waren. Die Präparate wurden im Transmissionselektronenmikroskop untersucht und dokumentiert.

3.18 Agarosegelelektrophorese von DNA

DNA-Fragmente wurde mit Hilfe der Agarosegelelektrophorese aufgetrennt. Dazu wurden Gele mit unterschiedlicher Agarosekonzentration (0,6 bis 1,2 %) ausgehend von der zu erwartenden Fragmentgröße hergestellt. Die Agarose wurde in der entsprechenden Menge (0,6 bis 1,2 g pro 100 ml) eingewogen und mit TBE-Puffer versetzt. Anschließend wurde die Mischung in einer Mikrowelle bei 360 Watt so lange erhitzt bis die Agarose gelöst war. Nachdem das Agarosegel auf 50 °C abgekühlt war, wurde dem Gel zur Visualisierung der aufzutragenden DNA-Fragmente 0,5 µg/ml Ethidiumbromid hinzugefügt und durch Schwenken im Gel verteilt. Dieses wurde dann vorsichtig in

3. Material und Methoden

einen Gelschlitten überführt, Luftblasen entfernt und für mindestens 15 min, bis das Gel fest war, bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde das Gel in die Laufkammer mit TBE-Puffer überführt, die Proben mit 6x Ladepuffer versehen und mit einem geeigneten Marker (100 bp oder 1kb Ladder) aufgetragen. Die Proben wurden je nach Größe bei 60-120 Volt aufgetrennt und danach dokumentiert.

3.19 Southern-Blot-Hybridisierung

Die Konzentration der durch PCR von den Cosmiden amplifizierten Sonden wurde mittels serieller Verdünnung bestimmt und auf eine Endkonzentration von 25 ng/ μ l mit H₂O_{dd} verdünnt. Mit Hilfe des Qiagen DNeasy Kits wurde genomische DNA aus adulten *C. elegans* Tieren präpariert. Dazu wurden die adulten Tiere von den NGM-Platten (\varnothing 100 mm) gespült und viermal mit M9-Medium gewaschen. Die Tiere wurden pelletiert und mit dem Lysepuffer des Kits, zu dem Proteinase K und RNase A hinzugefügt wurde, über Nacht bei 55 °C lysiert. Das Lysat wurde auf die im Kit enthaltene Säule gegeben, so dass die genomische DNA an die Matrix binden konnte. Nach dem Waschen erfolgte die Elution mit 50 μ l Elutionspuffer. Anschließend wurde die Konzentration und Qualität der genomischen DNA im Eluat photometrisch durch Messung der Absorption bei 260 und 280 nm bestimmt. Die DNA wurde bis zur Verwendung bei 4 °C gelagert. Zur Qualitätskontrolle wurden 5 μ l der genomischen DNA auf ein 1 %-iges Agarosegel aufgetragen und bei 90 Volt für 2 h gelelektrophoretisch aufgetrennt. Nach anschließender Dokumentation wurden 10 μ g genomische DNA mit den jeweiligen Restriktionsenzymen (100 U) über Nacht bei 37 °C verdaut. Der Verdau wurde in einem 1 %-igen Agarosegel bei 50 mA über Nacht aufgetrennt. Zur Größenbestimmung der DNA-Fragmente wurde der 1 kb Ladder Marker verwendet. Am nächsten Tag wurde das Gel bei Raumtemperatur für exakt 20 min in 0,25 M HCl inkubiert und zweimal für 20 min in 0,4 M NaOH neutralisiert. Die DNA wurde für 5 h bzw. über Nacht bei Raumtemperatur auf eine Nylonmembran geblottet¹¹³. Danach wurde die Nylonmembran zwischen Papiertüchern getrocknet. Um zu überprüfen, ob die DNA vollständig auf die Nylonmembran transferiert wurde, wurde das Gel fotografiert, danach mit einer 0,5 μ g/ml Ethidiumbromid-Lösung für 30 min bei Raumtemperatur nachgefärbt, für 1 h bei Raumtemperatur mit H₂O_{dd} entfärbt und ein weiteres Mal dokumentiert. Um die Sonden radioaktiv zu markieren, wurden 1 μ l Sonde, 22 μ l H₂O_{dd} und 10 μ l Random Primer (Random Prime-It II Kit) bei 100 °C für 5 min inkubiert. Anschließend wurden 10 μ l dATP, 2 μ l Klenow Fragment (5 U/ μ l) und 5 μ l 50 μ Ci dNTP* (γ -³²P) hinzugegeben und bei 37 °C für 30 min inkubiert. Es folgte eine Aufreinigung der Sonden nach dem Protokoll des Nucleotide Removal Kits. Die Sonden wurden mit 200 μ l Puffer AE von der Säule eluiert. Von dem Eluat wurden 2 μ l in ein 250 μ l Reaktionsgefäß gegeben, welches wiederum in ein Szintillationsgefäß überführt wurde. Mit einem

3. Material und Methoden

Szintillationszähler wurden die *counts per minute* (cpm) gemessen. Nur wenn die radioaktiv markierten Sonden 80.000 bis 100.000 x 1,2 x 10⁷ cpm hatten, wurden die Sonden für die Hybridisierung vorbereitet. Dazu wurden die Sonden mit 100 µg Lachssperma für 5 min bei 100 °C und für weitere 5 min auf Eis inkubiert. Die Sonden wurden vorsichtig zu der zuvor für 10 min bei 65 °C in Hybridisierungspuffer präinkubierten Nylonmembran gegeben und über Nacht bei 65 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Membran kurz mit Waschpuffer 1, zweimal 20 min mit Waschpuffer 2 und einmal 30 min mit Waschpuffer 3 gewaschen und in Folie eingeschweißt. Die Exposition der Membran erfolgte bei Raumtemperatur über Nacht in einer Fotokammer mit einer Phosphoimager Platte. Die Phosphoimager Platte wurde anschließend in dem Phosphoimager eingelesen und mit dem Programm Aida Image Analyzer ausgewertet. Die Bilder im TIF-Format wurden mit dem Programm Photoshop bearbeitet.

3.20 Einzeltieranalyse (Duplex PCR)

Um zu überprüfen, ob ein Tier das Wildtypallel oder das mutierte TVP-Allel trägt, wurde eine Einzeltieranalyse mit Hilfe der Duplex PCR Methode durchgeführt, bei der in einer Reaktion zwei Amplifikate, unter Verwendung von zwei *forward* (bzw. *reverse*) und einem *reverse* (bzw. *forward*) Amplimeren, erzeugt werden. Dazu wurde ein Tier in ein 250 µl Reaktionsgefäß mit 10 µl Lysepuffer überführt, für 15 min bei -70 °C, für 1 h bei 65 °C und 15 min bei 95 °C inkubiert. 1 µl des Lysats wurde zu dem entsprechenden Reaktionsansatz mit den drei Amplimeren (für *sph-1*: 02-07, 02-08, 02-11; für *sng-1*: 04-81, 04-84, 08-86 und für *scm-1*: 02-01, 02-02, 02-03) gegeben und einer PCR-Reaktion unterzogen (Tabelle 3-10, Tabelle 3-11). Dabei liegt jeweils eines der drei Amplimere im Deletionsbereich, woraus die Wildtypbande resultiert. Erst die Deletion ermöglicht eine Amplifikation durch die beiden äußeren Amplimere (siehe Abbildung 4-20). Die Produkte wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und anschließend dokumentiert.

Tabelle 3-10 Pipettierschema für den PCR-Ansatz.

PCR-Ansatz (25 µl)	
10x PCR-Puffer	2,5 µl
dNTPs (10 mM)	0,5 µl
3x Amplimere	2 µl
Taq-Polymerase	0,1 µl
DNA	2 µl
H ₂ O _{dd}	13,9 µl

3. Material und Methoden

Tabelle 3-11 Einstellungen der PCR-Maschine.

Schritte	Temperatur [°C]	Zeit [sec]	Zyklen
1. Denaturierung	94	120	1
2. Denaturierung	94	30	35
3. Annealing	55	30	
4. Elongation	72	60	
5. Chase	72	300	1

3.21 RT-PCR

3.21.1 Probenvorbereitung

Um RNA aus *C. elegans* zu präparieren, wurden Tiere einer 250 ml Flüssigkultur verwendet (siehe 3.14). Beim Erreichen einer Dichte von 10.000 adulten Tieren/ml, wurden die Tiere pelletiert und mit M9-Medium gewaschen. 2,5 ml des Pellets wurden in flüssigem Stickstoff mittels Pistill in einem Mörser zu einem feinen Pulver zermahlen und in RLT Puffer des RNeasy-Kits aufgenommen. Die weitere Verarbeitung erfolgte nach Protokoll des RNeasy-Kits für tierisches Gewebe. Die RNA wurde mit 50 µl RNase-freiem H₂O_{dd} von der Säule eluiert. Zur Konzentrationsbestimmung der RNA wurde die Extinktion bei 260 nm und 280 nm photometrisch bestimmt. Dabei entsprach eine OD₂₆₀ = 1 einer ssRNA Menge in H₂O von 40 µg/ml. Die Reinheit der RNA wurde mittels des Quotienten von OD₂₆₀/OD₂₈₀ ermittelt, welcher größer oder gleich 2,0 sein sollte.

3.21.2 RT und PCR

Die präparierte RNA wurde mit oligo(dT) Amplimeren mit Hilfe des Omniscript-Kits in cDNA umgeschrieben (Tabelle 3-12). Die Gesamt-cDNA wurde anschließend in einer PCR eingesetzt und mit den Amplimeren SL1 02-14 + 02-12 oder 02-13 und SL2 02-15 + 02-12 oder 02-13 amplifiziert (Tabelle 3-13). Das Produkt dieser Reaktion wurde gelelektrophoretisch analysiert (90 Volt, 30 min) und dokumentiert.

Tabelle 3-12 RT-Reaktionsansatz.

RT-Reaktionsansatz (20 µl)	
10x RT-Puffer	2 µl
dNTPs-Mix (5 mM)	2 µl
Oligo-dT Amplimere (10 mM)	2 µl
RNase-Inhibitor	1 µl
Omniscript-RT	1 µl
RNA	10 µl
H ₂ O _{dd}	2 µl

3. Material und Methoden

Tabelle 3-13 Einstellung der PCR-Maschine für die RT-PCR.

Schritte	Temperatur [°C]	Zeit [sec]	Zyklen
1. Denaturierung	94	120	1
2. Denaturierung	94	30	35
3. Annealing	60	30	
4. Elongation	72	60	
5. Chase	72	300	1

3.21.3 Sequenzierung

Die PCR-Produkte der RT-PCR wurden mittels des Qiaquick PCR-Purification Kits aufgereinigt und von der Firma GENterprise (Mainz) unter Verwendung des Amplimers SL1 02-14 sequenziert. Die erhaltenen Sequenzdaten wurden mit den Programmen Chromas, Clonemanager und Vector NTI ausgewertet.

3.22 Cladogramm

Um die Verwandtschaftsverhältnisse der TVPs von *Caenorhabditis elegans* (Ce) und *Mus musculus* (Mm) zu untersuchen, wurde ein Cladogramm erstellt. Zunächst wurden die Aminosäuresequenzen der TVPs der jeweiligen Spezies von der NCBI Proteindatenbank bezogen (siehe 7.3 web-b, Tabelle 7-4). Die Informationen über die Position der Transmembrandomänen wurde von der NCBI Datenbank für *M. musculus* bzw. von der Wormbase (7.3 web-e) für *C. elegans* erhalten. An Hand der Position der Transmembrandomänen wurden die Aminosäuresequenzen unter Verwendung des Programms Vector NTI angepasst (Abbildung 4-4, Tabelle 7-4). Der Vector NTI-Datensatz wurde im MSF-Format gespeichert und in das Nexus-Format (7.3 web-f) umgewandelt. Anschließend wurde der Datensatz in das Programm MrBayes 3.11 geladen und unter Verwendung der Parameter in Tabelle 3-14 mittels der Dayhoff-Matrix für Aminosäuresequenzen analysiert. Das Resultat dieser Berechnung wurde von dem Programm MrBayes in einen Datensatz im CON-Format gespeichert, der die Daten für die Erstellung des Cladogramms enthielt. Dieser Datensatz wurde mit dem Programm TreeViewX geladen und das daraus resultierende Cladogramm gespeichert.

Tabelle 3-14 Einstellung für die Cladogrammberechnung mit dem Programm MrBayes 3.11.

lset rates =	gamma
prset aamodelpr =	fixed(dayhoff)
mcmc savebrlens =	yes
ngen =	500.000
samplefreq =	10
sumt burnin =	2500
showtreeprobs =	yes

3.23 Klonierung

3.23.1 Plasmid-Konstrukte für die Mikroinjektion

Als Grundlage der Transkriptions- und Translationskonstrukte für die Mikroinjektion wurde die Vektoren pVH10.01, der für das *cyane fluorescent protein (cfp)* kodiert, und pVH20.01, der für das *yellow fluorescent protein (yfp)* kodiert, verwendet. Dieser wurde mit den entsprechenden Restriktionsendonukleasen geschnitten, um anschließend die Promoter- (Tabelle 4-2a) oder Promoter/Gen-Fragmente (Tabelle 4-2b) hinein zu ligieren.

3.23.2 Ligation

Die Fragmente wurden in die geschnittenen Vektoren, unter Verwendung von T4-DNA-Ligase und 10x Ligationspuffer, eingebracht. Zur Berechnung der einzusetzenden Fragmentmenge in einen 10 µl Ligationsansatz mit 25 ng Vektor, wurde die Formel 3-3 ¹¹³ verwendet. Die Ligation wurde entweder für 1 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 16 °C inkubiert.

Formel 3-3 Bestimmung der Fragmentmenge.

$$\text{Masse (Fragment [ng])} = \frac{125 \text{ ng} \times \text{Länge (Fragment [bp])}}{\text{Länge (Vektor [bp])}}$$

3.23.3 Transformation von Bakterien

Tiefgefrorene Bakterien (XL1-Blue und DH5α) wurden auf Eis aufgetaut und mit dem gesamten Ligationsansatz für 30 min auf Eis inkubiert. Danach erfolgte ein Hitzeschock für 40 sec bei 42 °C und eine weitere Inkubation für 10 min auf Eis. Die so behandelten Bakterien wurden in 1 ml LB-Medium aufgenommen und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Nach Pelletieren bei 3.000 rpm für 5 min wurde der Überstand verworfen und das Pellet in 50 µl LB-Medium vorsichtig resuspendiert. Die Suspension wurde auf eine bei 37 °C vorgewärmte LB-Agar-Platte mit 100 µg/ml Ampicillin oder 50 µg/ml Kanamycin mit einem Drigalskispatel ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde eine Kolonie gepickt und eine 4 ml Vorkultur angesetzt. Aus dieser wurde eine 100 ml Kultur mit entsprechendem Antibiotikum beimpft und wiederum über Nacht bei 37 °C und 200 U/min inkubiert. Mit Hilfe des Qiafilter Plasmid Mini-Prep Kits erfolgte eine Plasmidpräparation von der 4 ml Vorkultur. Um größere Mengen Plasmid-DNA zu erhalten, wurde die DNA der 100 ml Kultur mit dem Qiafilter Plasmid Maxi-Prep Kit präpariert. Die Plasmid-DNA wurde anschließend einem Kontrollverdau mit entsprechenden Restriktionsendonukleasen unterzogen. Dieser Verdau wurde gelelektrophoretisch aufgetrennt und dokumentiert. Danach wurde zur Konzentrationsbestimmung die Plasmid-DNA 1:50 und 1:100 mit H₂O_{dd} verdünnt und die Extinktion bei 260 nm und 280 nm

3. Material und Methoden

photometrisch bestimmt. Dabei entsprach eine $OD_{260} = 1$ einer dsDNA Menge in H_2O von 50 $\mu g/ml$. Die Qualität der DNA wurde aus dem Quotient OD_{260}/OD_{280} bestimmt, wobei das Verhältnis größer oder gleich 1,8 sein sollte.

3.24 RNAi

Mit Hilfe von RNAi kann durch die Präsenz spezifischer dsRNAs die Expression komplementärer Gene herunter reguliert werden. Dazu wird die cDNA des herunter zu regulierenden Gens in den Vektor L4440 kloniert, der nach Transformation in Bakterien (*E. coli* RNase III Defizient, IPTG induzierbare T7-RNA-Polymerase) und durch IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid) Induktion, die doppelsträngige RNA produziert. *C. elegans* frisst die dsRNA produzierenden Bakterien und nimmt so die RNAi auf, die sich im ganzen Organismus über die Zellgrenzen ausbreitet und auch an die F_1 -Generation weitergegeben wird. Um *C. elegans* mit RNAi produzierenden Bakterien zu kultivieren, wurde zu NGM-Agar 25 $\mu g/ml$ Carbencillin und 1 mM IPTG hinzugefügt und die Platten (\varnothing 60 mm) unter sterilen Bedingungen gegossen. Anschließend wurden 200 μl einer Bakterienkultur (kultiviert in LB-Medium mit 50 $\mu g/ml$ Ampicillin), die mit dem entsprechenden RNAi-Vektor transformiert wurde, auf diese Platten gleichmäßig verteilt und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Am nächsten Tag wurden Tiere des Stadiums L4 mit M9-Medium gewaschen, auf diese Platten transferiert und für 72 h bei 25 °C kultiviert. Die F_1 -Nachkommen wurden anschließend analysiert.

3.25 Aufreinigung von synaptischen Vesikeln

Zur Vesikelaufreinigung von *C. elegans* wurden die Tiere in einer Flüssigkultur herangezogen (siehe 3.14). Nach dreimaligem Waschen mit M9-Medium wurden die Tiere einmal mit Lysepuffer gewaschen und anschließend pelletiert. Das Pellet wurde in einem Verhältnis 1:2 (w/v) mit Lysepuffer resuspendiert und in flüssigen Stickstoff überführt. Mit einem Mörser und Pistill wurde es dann zu einem feinen Pulver zermahlen, auf Eis aufgetaut und im 4-fachen Volumen Lysepuffer resuspendiert. Anschließend wurde das Lysat dreimal mit einem Homogenisator behandelt. Das Homogenat wurde bei 1.200 x g für 10 min zentrifugiert. Der postnukleare Überstand wurde in einem weiteren Zentrifugationsschritt bei 20.000 x g für 10 min zentrifugiert. Es erfolgte ein weiterer Zentrifugationsschritt des Überstandes bei 120.000 x g für 1 h. Der daraus resultierende Überstand wurde dann vorsichtig auf eine Schicht von 0,6 M Saccharose in 10 mM Hepes gegeben und bei 250.000 x g für 2 h zentrifugiert. Das Pellet wurde anschließend in max. 500 μl PBS resuspendiert. Alle Zentrifugationsschritte erfolgten bei 4 °C. Zu den Überständen und in PBS resuspendierten

3. Material und Methoden

Pellets aller Zentrifugationsschritte wurde die entsprechenden Menge 5x Lämmli-puffer hinzugegeben und bis zur weiteren Analyse bei -20 °C aufbewahrt.

3.26 Isolierung von Synaptosomen

Um Synaptosomen aus *C. elegans* zu isolieren, wurden, wie in 3.25 beschrieben, Gesamttierlysate unter Verwendung von H-Puffer hergestellt. Das Pellet wurde mit Pistill und Mörser zu einem feinen Puder zerstoßen und mit einem Homogenisator behandelt. Das Homogenat wurde bei 1.000 x g für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde bei 10.000 x g für 30 min zentrifugiert und der daraus resultierende Überstand wurde bei 100.000 x g für 1 h zentrifugiert. Das Pellet mit den darin angereicherten Synaptosomen wurde in 500 µl H-Puffer aufgenommen. Alle Zentrifugationsschritte erfolgten bei 4 °C. Zu den Überständen und den in H-Puffer resuspendierten Pellets wurden die entsprechenden Mengen an 5x Lämmli-puffer dazugegeben und bis zur weiteren Analyse bei -20 °C aufbewahrt.

3.27 Proteinkonzentrationsbestimmung

3.27.1 Proteinfällung (Chloroform-Methanol)

Damit Salze, Lipide und Detergenzien keinen Einfluss auf die Konzentrationsbestimmung nach Bradford haben, wurden die Proteine der *C. elegans* Lysate und der Vesikelaufräumung gefällt. Dazu wurde 50 µl Probe mit 400 µl Methanol gemischt und bei 16.000 x g für 1 min zentrifugiert. Anschließend wurden 100 µl Chloroform hinzugegeben und für 1 min zentrifugiert. Nach Zugabe von 300 µl H₂O_{dd} wurde das Gemisch bei 16.000 x g für 10 min zentrifugiert, wobei die Proteine an der Phasengrenze präzipitierten. Die obere Phase wurde mit einer Glaspipette vorsichtig entfernt, 400 µl Methanol hinzu gemischt und die Proteine bei 16.000 x g für 15 min pelletiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und das feste Proteinpellet in dem Reaktionsgefäß für 1 h bei Raumtemperatur getrocknet. Als Staubschutz wurde Alufolie über das Reaktionsgefäß locker aufgelegt. Das getrocknete Pellet wurde in 50 µl H₂O_{dd} und 50 µl Ameisensäure für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend durch Schütteln gelöst.

3.27.2 Bradford

Zur Konzentrationsbestimmung von Proteinen wurde der Bradford-Test verwendet. Dazu wurde zunächst eine BSA-Verdünnungsreihe (0; 0,025; 0,125; 0,250; 0,5; 0,75 und 1 mg/ml) angefertigt. Nach Hinzufügen von 50 µl der BSA-Verdünnungsreihe zu 5 ml Bradford-Reagenz und einer Inkubation für 30 min bei Raumtemperatur im Dunkeln wurde eine Standardkurve durch

photometrische Messung der Extinktion bei 595 nm, erstellt. Dabei wurde die gemessene OD_{595} in Relation zu der BSA-Konzentration in einem Koordinatensystem aufgetragen. Von den zu messenden Proben wurde 1 μ l mit 5 ml Bradford-Reagenz gemischt und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Konzentration wurde mittels der gemessenen OD_{595} an Hand der Standardkurve ermittelt.

3.28 Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)

Die diskontinuierliche SDS-PAGE ist eine Methode zur Auftrennung von Proteingemischen nach dem Molekulargewicht. Abhängig vom Molekulargewicht wurde ein 12 %-iges Trenngel gegossen. Die in Lämmli-Puffer gelösten Proben wurden dafür 5 min bei 95 °C erhitzt und aufgetragen. Zur Bestimmung des Molekulargewichts wurde ein *prestained* Marker verwendet. Die Gele wurden solange bei 100 Volt gefahren bis die Coomassie-Lauffront das Gel vollständig passierte. Die Gele wurden entweder für einen Western-Blot verwendet oder mit Coomassie-Blue gefärbt.

3.29 Coomassie-Färbung

Coomassie-Blue bindet unspezifisch an Proteine und hat eine Nachweisgrenze von 0,1-2 μ g Protein pro Bande. Für die Färbung wurde das Gel für 30 min bei Raumtemperatur in der Coomassie-Färbelösung inkubiert. Anschließend wurde das Polyacrylamidgel kurz mit H_2O_d abgespült und bei 4 °C über Nacht auf einem Schüttler in Coomassie-Entfärbelösung inkubiert.

3.30 Immuno-Blot und Immunodetektion

3.31 Immuno-Blot

Um die mittels SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennten Proteine über Antikörper zu detektieren, wurden diese mit Hilfe der Western-Blot Methode auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Dazu wurde das Polyacrylamid-Trenngel zunächst für 1 min in Transferpuffer inkubiert. Anschließend wurden sechs Whatman-Papiere und eine Nitrozellulosemembran in der Größe des Gels zurechtgeschnitten und in Transferpuffer getränkt. Gel, Whatman-Papiere und Nitrozellulosemembran wurden wie in Abbildung 3-1 gezeigt in der Apparatur zusammengelegt. Luftblasen und überschüssiger Transferpuffer wurden durch Rollen eines Glasstabs über die einzelnen Schichten entfernt. Der Transfer erfolgte für ½-1 h bei 75 mA (Formel 3-4). Danach wurde die Nitrozellulosemembran entweder getrocknet oder direkt für die Immunodetektion verwendet.

3. Material und Methoden

Um die Transfereffizienz zu überprüfen, wurde das geblottete Polyacrylamidgel wie in 3.29 beschrieben gefärbt.

Formel 3-4 Berechnung der Stromstärke für den Immuno-Blot Transfer.

$$\text{Stromstärke [mA]} = \frac{1 \text{ mA}}{\text{Gelgröße [cm}^2\text{]}} \times 1,5$$

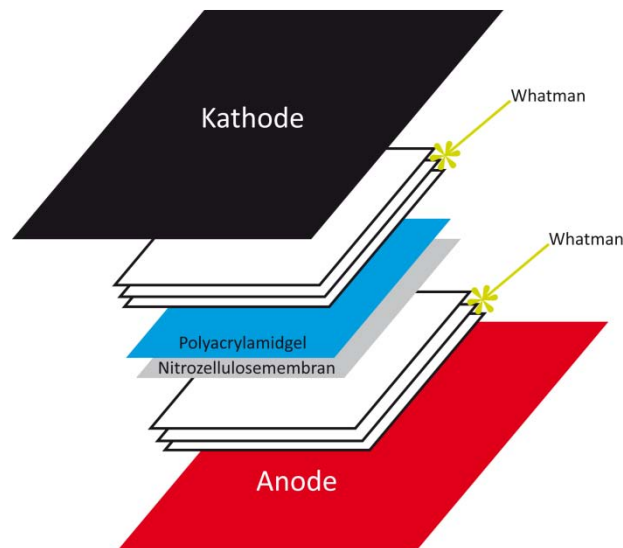


Abbildung 3-1 Aufbau des Western Blots.

3.31.1 Immunodetektion

Die mittels Immuno-Blot auf die Nitrozellulosemembran transferierten Proteine wurden zunächst mit Ponceau-S gefärbt (siehe 3.32) und an die Membran fixiert. Anschließend wurden unspezifische Proteinbindungsstellen auf der Membran durch Inkubation in einer 3 %-igen Milchpulverlösung für 1 h bei Raumtemperatur gesättigt. Zur Detektion der Proteine wurden diese mit Antikörpern markiert. Dazu wurde die Membran zunächst mit dem Primärantikörper (Tabelle 3-7, 1:100 in 3 %-iger Milchpulverlösung) über Nacht bei 4 °C auf einem Schüttler inkubiert. Überschüssiger Primärantikörper wurde durch dreimaliges Waschen für jeweils 15 min mit PBS, 0,05 % Tween 20 entfernt. Anschließend wurde die Membran mit dem an Meerrettich-Peroxidase (HRP) gekoppelten Sekundärantikörper (Tabelle 3-8, 1:10.000 in 3 %-iger Milchpulverlösung) für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dreimaligem Waschen für jeweils 15 min mit PBS, 0,05 % Tween 20 und einem kurzen Waschschriff mit H₂O_{dd} wurden die markierten Proteine mittels ECL-Reagenzien detektiert. Dabei spaltet die Peroxidase das in der ECL-Lösung vorhandene Luminol, was zu Lichtsignalen führt, die eine Schwärzung von Röntgenfilmen verursachen.

3.32 Ponceau-S Färbung

Um die Effizienz des Proteintransfers im Western-Blot zu überprüfen, wurde die Nitrozellulosemembran für 5 min bei Raumtemperatur in Ponceau-S Lösung gelegt und anschließend mit H_2O_d gewaschen bis die Banden klar zu erkennen waren.

3.33 Dot-Blot

Der Dot-Blot dient der Charakterisierung der aufgereinigten Primärantikörper (Tabelle 3-7). Hierfür wurde eine Konzentrationsreihe der an OVA gekoppelten Peptide mit PBS hergestellt (1, 10, 100 ng und 1 μ g OVA-Peptid). Die Peptide wurden auf eine Nitrozellulosemembran, die zuvor mit TBS präinkubiert wurde, in der Dot-Blot Apparatur aufgebracht. Nach einem Waschschrift mit TBS erfolgten eine Inkubation mit Blocklösung für 1 h bei Raumtemperatur und ein weiterer Waschschrift mit TTBS. Die Primärantikörper (Tabelle 3-7, 1:1.000) wurden für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Überschüssiger Antikörper wurde durch viermaliges Waschen mit TTBS entfernt. Anschließend wurde der Sekundärantikörper (1:10.000) für 1 h bei Raumtemperatur hinzugegeben. Nach dreimaligem Waschen mit TTBS wurde die Membran mit dem Detektionsmittel NBT/BCIP für 15 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Zum Abstoppen der Reaktion, wurde die Nitrozellulosemembran mit H_2O_{dd} gewaschen, anschließend getrocknet und zur Dokumentation eingescannt.

3.34 Photoaffinitätsmarkierung

Für die Photoaffinitätsmarkierung²⁷ wurde 1 mg der aufgereinigten Synaptosomen (siehe 3.26) mit 2,1 μ g [3H]6,6-Azocholestanol (100 μ Ci) versehen und in einer Quarzküvette mit einer Quecksilberdampflampe (200 W, $\lambda = 335$ nm) für 5 min bei 4 °C in einem Abstand von 15 cm bestrahlt. Durch die Bestrahlung entsteht aus dem [3H]6,6-Azocholestanol unter N_2 -Abspaltung ein reaktives Carben, das mit unterschiedlichen Aminosäureresten, Phospholipiden und Glycosphingolipiden eine kovalente Bindung eingehen kann^{159, 179}. Ungebundenes, an Phospho- und Glycosphingolipiden gebundenes [3H]6,6-Azocholestanol wurde durch Proteinfällung (siehe 3.27.1) entfernt und die Proteine in Lämmli-Puffer aufgenommen. 1 mg der behandelten Proben wurde in einem Röhrchenpolyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Das Gel wurde über Nacht bei Raumtemperatur in einer Lösung aus 30 % Methanol, 10 % Essigsäure und 60 % H_2O fixiert. Anschließend wurde das Gel aus dem Röhrchen entnommen und in 1,1 mm dicke Scheiben geschnitten. Die Menge an Radioaktivität wurde mittels Szintillationszählung pro Scheibe gemessen und mittels Standardmarkers gegen die relative Molekülmasse aufgetragen.

3.35 Verpaarungen

Für die Verpaarungen von *C. elegans* wurden 4 Männchen mit einem Hermaphroditen zusammengesetzt (siehe 3.12, siehe Tabelle 7-2). Um Mutationen im Genom von den *C. elegans* Stämmen, die bei späteren Tests einen Einfluss haben könnten, zu entfernen, wurden die Stämme zunächst viermal gegen den Wildtyp (N2) zurückgekreuzt.

3.36 Mikroinjektion

Um die in 3.23.1 beschriebenen Transkriptions- und Translationskonstrukte in *C. elegans* zu exprimieren, wurden diese mit Hilfe der Mikroinjektion in die Tiere der Linie MT1642 *lin-15(ts765)* X eingebracht. Im Tier bildeten die Konstrukte einen sog. *Array*, der an die Nachkommen der F₂-Generation weitergegeben wird. Für die Mikroinjektion wurden 100 bis 200 ng DNA (siehe Tabelle 3-15) zu 1 µl Mikroinjektions-Puffer gegeben und mit H₂O_{dd} auf 10 µl aufgefüllt. Der Ansatz für die Mikroinjektion in den Wildtypstamm (N2) enthielt kein *Rescue*-Plasmid. Die fehlende DNA wurde hier durch Hinzufügen von zusätzlichen 30 ng 1 kb Ladder Marker ersetzt.

Tabelle 3-15 DNA, die für die Mikroinjektion verwendet wurde.

DNA	100 ng	(200 ng)
Plasmidkonstrukt (Transkriptions- oder Translationskonstrukt)	10 ng	(20 ng)
<i>Rescue</i> -Plasmid (EKL15 <i>lin-15(+)</i>)	30 ng	(60 ng)
1 kb Ladder Marker	60 ng	(120 ng)

Es wurden Deckgläser mit einer dünnen 2 %-igen Agaroseschicht für mindestens 3 h bei bei 60 °C oder über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet. Auf das Deckglas wurde ein Tropfen Öl (Halocarbon 700) gegeben, in den ein Tier mit einem Glaspick überführt und vorsichtig an die getrocknete Agarose angeklebt wurde. Die Mikroinjektionslösung wurde mit Hilfe des Mikromanipulators in den distalen Arm der paarigen Gonade injiziert, bis die Gonade durch den Flüssigkeitseinstrom anzuschwellen begann. Das Tier wurde mit einem Tropfen M9-Medium in wässriges Milieu gebracht. Anschließend wurde das Tier auf eine neue NGM-Platte überführt und noch ein weiteres Mal mit einem Tropfen M9-Medium versehen. Nach Mikroinjektion wurden Tiere der F₁-Generation, die das injizierte Konstrukt exprimierten, vereinzelt. Wurde der entsprechende Marker an die Folgegeneration eines vereinzelt Tieres weitergegeben, wurde diese Linie weiterkultiviert und gesichert.

3.37 Färbung der Amphide und Phasmide

Zur Markierung der Amphide und Phasmide wurde der lipophile Farbstoff Dil, der die Zellen retrograd färbt, verwendet. Zunächst wurden die Tiere von einer Platte gespült und dreimal mit M9-Medium gewaschen. Anschließend wurden sie für 30 min bei Raumtemperatur in Dil Färbelösung [1 µl Farbstoff (12,5 mg/ml DMF) in 500 µl M9-Medium] überführt. Danach wurden die Tiere dreimal mit M9-Medium gewaschen und auf einer frischen NGM-Platte über Nacht bei 20 °C gehalten, um den vom Darm aufgenommenen Farbstoff wieder auszuscheiden.

3.38 Elektrophysiologie

Für die Elektrophysiologie wurden Tiere mit Sekundenkleber immobilisiert und lateral eingeschnitten^{130, 131}, um die ventromediale Körpermuskulatur freizulegen. Nach einer Behandlung mit Typ IV Kollagenase (0,5 mg/ml) für 15 sec, wurde mittels Ganzzellkonfiguration eine Spannung von 60 mV bei 21 °C an die Muskulatur angelegt. Die Spannungsänderungen wurden durch eine angelegte Elektrode mit einem EPC-9 Verstärker, der mit einem ITC-16 Interface ausgestattet war, aufgezeichnet. Die gemessenen Antworten wurden durch eine feuernde glatte Elektrode, die entlang des ventralen Nervenstranges positioniert wurde, erzeugt. Es wurde ein quadratisch wellenförmiger depolarisierender Strom von 1 ms erzeugt, der von einer SIU5 Stimulation Isolationseinheit versehen mit einem S48 Stimulator hervorgerufen wurde. Damit es zu keiner Nekrose kam, wurden die Tiere während der gesamten Prozedur mit einer Lösung [150 mM NaCl, 5 mM KCl, 5 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 10 mM Glucose, 15 mM HEPES (pH 7,35), und Saccharose (342 mOsm)] umspült. Die Elektrode enthielt folgende Lösung: 120 mM KCl, 20 mM KOH, 4 mM MgCl₂, 5 mM N-Tris-(hydroxymethyl)-methyl-2-aminoethan-sulfonsäure, 0,25 mM CaCl₂, 4 mM NaATP, 36 mM Saccharose, 5 mM EGTA (pH 7,2), Saccharose (335mOsm). Die Daten wurden mit den Programmen Pulsefit, Mini Analysis und Igor Pro analysiert.

3.39 *C. elegans* Testverfahren zur Analyse neuronaler Mutanten

Um die Rolle der TVPs in *C. elegans* zu untersuchen, wurde das Verhalten der TVP-Mutanten mit unterschiedlichen Testverfahren analysiert. Dazu wurden synchronisierte adulte Tiere von NGM-Platten gespült und viermal mit M9-Medium gewaschen. Anschließend wurden die Tiere mit 100 x g pelletiert und in einem kleinen Volumen M9-Medium resuspendiert. So standen für die einzelnen Verhaltensversuche adulte Tiere in großer Menge zur Verfügung. Bei Einzeltieruntersuchungen, wurden adulte Tiere direkt von NGM-Platten gepickt und untersucht.

3.39.1 Berührungstest

Im Berührungstest, dem sog. *nose and tail touch*-Test, wurde die Reaktion von *C. elegans* auf Berührungsreize untersucht. Diese Reize werden durch die Mechanorezeptoren vermittelt. Dazu wurde ein Wimpernhaar mit Knetmasse in der Spitze einer Pasteurpipette befestigt. Anschließend wurden damit Einzeltiere vorsichtig am anterioren und posterioren Ende berührt und die Reaktion, die sich in einer Rückwärts- oder Vorwärtsbewegung ausdrückt, beobachtet. Mindestens 20 Tiere pro Stamm wurden auf diese Art und Weise untersucht.

3.39.2 Lokomotion

Beim Lokomotionstest wurde das sinusförmige Bewegungsverhalten von *C. elegans* untersucht. Dazu wurden zehn Einzeltiere auf eine 24 Lochplatte mit M9-Medium verteilt und die Anzahl der Wellenberge der sinusförmigen Bewegungen pro Minute gezählt.

3.39.3 Defäkationszyklus

Beim Defäkationszyklus wurden zehn Einzeltiere auf eine NGM-Platte mit Futter transferiert und die Zeit zwischen jeder Darmentleerung gemessen.

3.39.4 Pharyngeale Pumpbewegung

Zur Untersuchung des pharyngealen Pumpverhaltens wurden zehn Einzeltiere auf eine neue Platte mit Futter überführt und mit einem Stereolupenmikroskop die Anzahl der Pumpbewegungen des hinteren Bulbus innerhalb von 60 sec ausgezählt.

3.39.5 Brutgröße

Jeweils ein L4 Tier wurde am Vortag auf eine mit HB101 beimpfte NGM-Platte gesetzt. Das Muttertier wurde täglich bis zum Tod auf eine neue cholesterinhaltige oder cholesterinfreie NGM-Platte transferiert. Die Nachkommen des Muttertiers wurden nach Erreichen des Stadiums L3 und L4 gezählt.

3.39.6 Thermotaxis

Um das thermotaktische Verhalten von *C. elegans* zu untersuchen, wurde der Versuchsaufbau in Abbildung 3-2 verwendet³⁰. Dazu wurde in eine Kunststoffschale 20 ml NGM-Agar gefüllt und für 1 h bei Raumtemperatur unter sterilen Bedingungen getrocknet. Die Apparatur wurde in einem klimatisierten Raum mit einer konstanten Temperatur von 21 °C aufgebaut. Um eine bessere Wärmeleitfähigkeit an den Übergängen zu gewährleisten, wurden alle Kontaktflächen mit Glycerin

3. Material und Methoden

versehen. Um die konstante Temperatur von 25 °C an den Aluminiumplatten A und B zu erhalten, wurde ein Heizblock mit der konstanten Temperatur von 30 °C verwendet. Eine konstante Temperatur von 0 °C auf der entgegengesetzten Seite der Kunststoffschale wurde mit 90 %-igem 0 °C kalten Eisessig erreicht. Durch Anlegen der 0 °C Kulturflasche an die Kunststoffschale wurde auf der NGM-Agarfläche ein Temperaturgradient von 4 bis 20 °C erzeugt. Als Stütze für die Kulturflasche diente die Aluminiumplatte C. Die Kunststoffschalen wurden jeweils 1 h in der beschriebenen Apparatur vorinkubiert. Anschließend wurden adulte Tiere, die 1 Woche lang bei 15 bzw. 20 °C gehalten wurden, auf die „Startlinie“ der Platte ausgesetzt und für 1 h inkubiert. Die Verteilung der Tiere auf den Platten wurde mit Hilfe eines Scanners mit 1200 dpi und 16 bit Graustufen dokumentiert. Die Bilder wurden mit Photoshop bearbeitet. Dazu wurde eine neue Ebene erstellt und Punkte mit Hilfe des Buntstiftwerkzeuges an den Orten generiert, an denen sich die Tiere befanden. Zusätzlich wurde die „Startlinie“ eingezeichnet. Diese Abbildung wurde im DIN A4-Format ausgedruckt. Nach Festlegen eines Startbereiches, jeweils 5 mm links und rechts von der „Startlinie“, wurden die Punkte im Warmen, Kalten und Startbereich ausgezählt. Aus den gewonnenen Daten wurde der Thermotaxis Index [TI] errechnet (Formel 3-5³⁰).

Formel 3-5 Thermotaxis Index [TI].

$$[TI] = \frac{\sum(\text{Tiere auf kalter Seite}) - \sum(\text{Tiere auf warmer Seite})}{\sum(\text{Tiere die sich bewegt haben})}$$

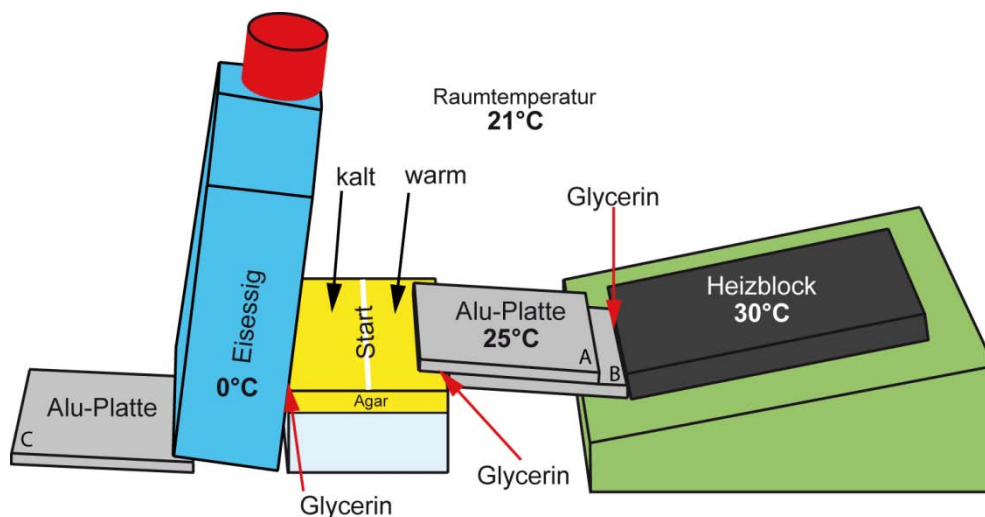


Abbildung 3-2 Versuchsaufbau Thermotaxis.

3.39.7 Chemotaxis

Das chemotaktische Verhalten von *C. elegans* wurde mit Hilfe der attraktiven chemischen Substanzen Diacetyl (1:1.000 in Ethanol) und Isoamyl (1:10 in Ethanol) untersucht^{11, 36, 112}. Unter

3. Material und Methoden

Verwendung von rechteckigen, mit 5 ml NGM-Agar befüllten Inkubationskammern wurde der in Abbildung 3-3 gezeigte Versuch durchgeführt. Dazu wurde auf ein Stück Nitrozellulose (2 x 2 mm) an den jeweiligen Enden der Kammer 1 µl 1 M Natriumazid zusammen mit 1 µl der attraktiven chemischen Substanz im „Odorantbereich“ bzw. Ethanol auf der Kontrollseite aufgebracht. Die Tiere wurden schnellstmöglich auf die Startlinie gesetzt und die Anzahl der Tiere nach einer einstündigen Inkubation im Dunkeln bei Raumtemperatur im Startbereich, „Odorantbereich“ und „Kontrollbereich“ ausgezählt. Aus den erhaltenen Werten wurde der Chemotaxis Index [CI] ermittelt (Formel 3-6³⁰).

Formel 3-6 Chemotaxis Index [CI].

$$[CI] = \frac{\sum \text{Tiere Bereich "Odorant"} - \sum \text{Tiere Bereich "Kontrolle"}}{\sum \text{Tiere gesamt}}$$

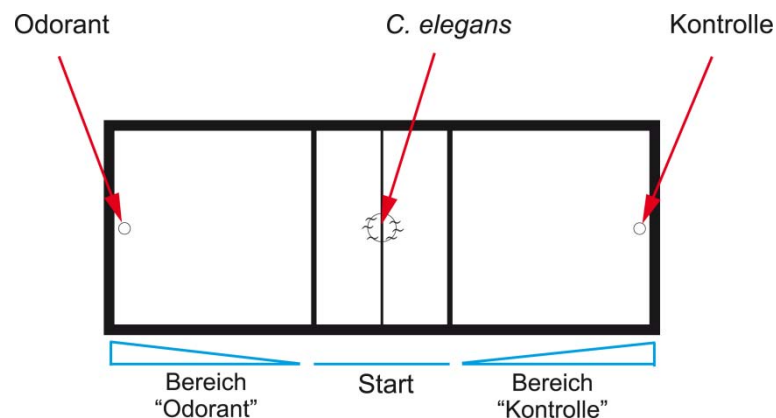


Abbildung 3-3 Versuchsaufbau Chemotaxis.

3.39.8 Adaptation

Um das Adaptationsverhalten von *C. elegans* zu untersuchen, wurden die Tiere ohne Futter auf frische NGM-Platten (Ø 100 mm) gesetzt. Die Platten wurden mit Deckeln, in deren Innenseiten Isoamyl (konz.) getränkte Agarstücke (á 0,5 cm x 1 cm) angeheftet wurden, zugedeckt¹¹², wodurch ein direkter Kontakt der Tiere mit dem Isoamyl Alkohol (konz.) verhindert wurde. Als Kontrolle dienten Platten mit unbehandelten Agarstücken. Die Platten wurden mit Parafilm verschlossen und für 1 h im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Tiere von den Platten gespült, dreimal mit M9-Medium gewaschen und einem Chemotaxis-Test (siehe 3.39.7) unterzogen. Der Chemotaxis Index wurde mit der Formel 3-6 bestimmt.

3.39.9 Osmotisches Vermeidungsverhalten

Um das osmotische Vermeidungsverhalten von *C. elegans* zu untersuchen, wurden NGM-Platten (Ø 60 mm) auf einer sterilen Werkbank 1 h lang getrocknet. Mit Hilfe eines Zwei-Positionen-Belüftungsstopfen wurde ein 4 molarer Fructose Ring auf die NGM-Platten aufgebracht (Abbildung 3-4). Die Tiere wurden in die Mitte des Ringes gesetzt. Nach einer Inkubation von 20 min, d. h. der Zeit nach der die ersten Wildtypiere den Ring überschritten, wurden die Tiere außerhalb und innerhalb des Ringes gezählt. Anschließend wurde der Prozentsatz der Tiere bestimmt, die sich außerhalb des Ringes befanden, wobei die Tiere, die sich auf dem Ring befanden, mit dazu gezählt wurden.

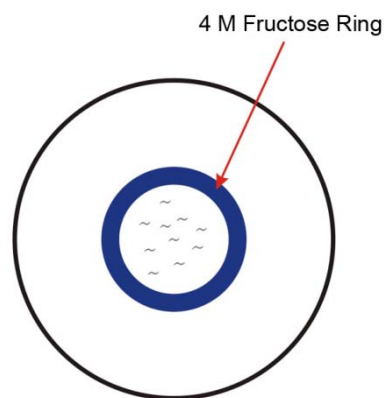


Abbildung 3-4 Versuchsaufbau „Osmotisches Vermeidungsverhalten“.

3.39.10 Radialer Aldicarb Test

Um die Aktivität der cholinergen Synapsen zu untersuchen, wurden radiale Aldicarb Tests durchgeführt. Dazu wurde auf frischen NGM-Platten (Ø 100 mm) ein dünner Bakterienrasen am Plattenrand aufgebracht und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die NGM-Platten gewogen und das Leergewicht einer Kulturschale (Ø 100 mm) von dem gewogenen Gewicht abgezogen. Zur Berechnung der gewünschten Aldicarbplattenkonzentration (0,2; 0,5 und 1 mM) wurde die Formel 3-7 verwendet.

Formel 3-7 Bestimmung der Aldicarbmenge pro Platte.

$$\text{Aldicarb [ml] pro Platte} = \frac{0,4 \text{ ml Aldicarbblösung} \times \text{Agargewicht [g]}}{10 \text{ g}}$$

Das berechnete Volumen an Aldicarbblösung (5; 12,5 und 25 mM in S-Basal) wurde gleichmäßig auf den Platten verteilt und die Platten für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Tiere wurden in die Mitte der NGM-Platten für 4 h bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Unter Verwendung einer

3. Material und Methoden

Schablone (Ringe: 1, 2 und 4 cm Radius) wurde die Anzahl der Tiere, die sich zum Futter hinbewegten, gezählt.

3.39.11 Pentylentetrazol (PTZ) Test

Um die Aktivität der GABAergen Synapsen zu untersuchen, wurde der PTZ-Test durchgeführt. Dazu wurden aus einer 20 mg/ml PTZ-Stammlösung Verdünnungen mit H₂O_{dd} (1, 4, 6, 8, 10 und 20 mg PTZ/ml) hergestellt¹⁷⁴. Zur Behandlung der NGM-Platten (Ø 35 mm) mit PTZ wurden 400 µl der jeweiligen Lösungen auf, für 2-4 h (je nach Luftfeuchtigkeit) getrocknete NGM-Platten verteilt und für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Um die Reaktion von *C. elegans* auf unterschiedliche PTZ-Konzentrationen zu untersuchen, wurden Tiere mit M9-Medium von NGM-Platten gespült und pelletiert. Die pelletierten Tiere wurden auf eine frische, mit HB101 beimpfte Platte überführt. Anschließend wurden 25 Tiere von diesen Platten auf die Platten mit unterschiedlichen PTZ-Konzentrationen gesetzt und für 30 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Im Anschluss wurden die Gesamtzahl und die Anzahl der Tiere, die ein verkrampftes Verhalten aufwiesen¹⁷⁴, bestimmt. Mit Hilfe einer installierten Kamera wurden Filme von diesen Tieren am Mikroskop angefertigt (1 Bild pro Millisekunde). Des Weiteren wurden mit Hilfe des Programmes Image Pro Plus die Höhe der Amplituden des sinusförmigen Bewegungsmusters in Längeneinheiten (LE) an Hand der Filmsequenzen bestimmt.

4 Ergebnisse

4.1 Phylogenetische Abstammung der *C. elegans* TVPs

Ziel dieses Projekteabschnittes war die Klärung der Beziehung zwischen den TVPs in *C. elegans* und der Maus.

4.1.1 Molekulare Analyse des 5'-Endes von Synaptophysin (*sph-1*)

Beim Vergleich der TVPs aus verschiedenen Spezies fiel auf, dass der N-Terminus des Nematoden-Synaptophysins eine zusätzliche, ungewöhnlich hydrophobe Sequenz besitzt⁷³. Um zu überprüfen, ob das vorhergesagte Protein tatsächlich hergestellt wird, sollte das 5'-Ende der Synaptophysin mRNA experimentell abgesichert werden. *C. elegans* mRNAs werden am 5'-Ende durch Transsplessen mit einem *leader* versehen, und zwar SL1 bei monocistronischen und SL2 bei *downstream* gelegenen polycistronischen RNAs^{21, 48, 173}. Zunächst wurde *sph-1* mRNA aus Wildtyptieren gewonnen und in cDNA umgeschrieben. Um das 5'-Ende der *sph-1* cDNA zu bestimmen, wurden daher PCR-Reaktionen mit SL1- und SL2-Amplimeren²¹ jeweils in Kombination mit zwei alternativen *downstream* gelegenen Amplimeren (02-12 und 02-13) durchgeführt. Nur *leader* SL1 lieferte ein Produkt mit den Amplimeren 02-12 und mit 02-13, d. h. das *sph-1* trotz der verhältnismäßig kurzen intergenischen Region von 433 bp als monocistronische RNA hergestellt wird (Abbildung 4-1).

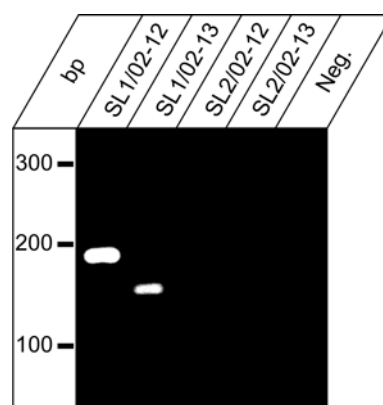


Abbildung 4-1 Bestimmung des 5'-Endes der *sph-1* cDNA.

Synaptophysin cDNA-Fragmente der 5'-Region wurden mit den *leader* Amplimeren SL1 und SL2 in Kombination mit *downstream* gelegenen Amplimeren mittels PCR untersucht. Nach einer Größenaufreinigung im Agarosegel wurden die mit Ethidiumbromid gefärbten Reaktionsprodukte für SL1 mit 02-12 (184 bp) und 02-13 (146 bp) nachgewiesen. Mit SL2 konnten keine Produkte amplifiziert werden. Somit ist *sph-1* nicht Teil eines Operons. Rechts Negativkontrolle (Neg.) und Größenmarker in Basenpaaren (bp) links.

4. Ergebnisse

Um das genaue 5'-Ende zu bestimmen, wurde das PCR-Produkt mit dem Amplimer SL1 sequenziert. Die erhaltenen Sequenzen wurden den Sequenzdaten der vorhergesagten cDNA Sequenz gegenübergestellt. Dabei zeigte sich, dass das eigentliche Startcodon (ATG) von *sph-1 downstream* von der vorhergesagten Sequenz⁷³ gelegen ist (Position 17.855 von AF038618, Abbildung 4-2 A). Somit vergrößert sich auch die intergenische Region von ehemals 433 bp auf 607 bp. Die korrigierten Sequenzdaten wurden in Abbildung 4-20 berücksichtigt. Dieser Vergleich zeigt, dass der zusätzliche hydrophobe N-Terminus in der Aminosäuresequenz fehlt (Abbildung 4-2 B). Damit ähnelt der Grundaufbau der Synaptophysine über die Speziesgrenzen hinweg (Abbildung 4-3).

A

```

sph-1 neu      (1) -----
sph-1 alt      (1) ATGGTATCTCTTGTAAATAAATAAGTTTTCTCGTTATCAAAAAGAGAACATGACACAGCAGCTCTCTTCTCTCTCTCTTTACGCACCTTTGTTTATTTT
sph-1 seq      (1) -----
                                     CGTTTAAATT

sph-1 neu      (1) -----
sph-1 alt      (106) CGATATTTTCATCAACGAAAAAATGCCTTCGATTCCTGCACAATTAATATATCTGCATTCAAATTCCCATTAGGATTTATAAGAATTATTCAAATTTGTTTTTCATA
sph-1 seq      (10) ACCCAAGTTTGAGACGAAAAAATGCCTTCGATTCCTGCACAATTAATATATCTGCATTCAAATTCCCATTAGGATTTATAAGAAT-----
                                     ATGCCTTCGATTCCTGCACAATTAATATATCTGCATTCAAATTCCCATTAGGATTTATAAGAAT

sph-1 neu      (85) ATCATTGCGATAGCCGCTATTAAACAGTTGGGGATTGGAATTGAATTACCACCTGTGTTGATGGAACGGGTAATATAACGAGAAATAGTACACAAAAAGTCTACACA
sph-1 alt      (211) ATCATTGCGATAGCCGCTATTAAACAGTTGGGGATTGGAATTGAATTACCACCTGTGTTGATGGAACGGGTAATATAACGAGAAATAGTACACAAAAAGTCTACACA
sph-1 seq      (96) -----

sph-1 neu      (190) TTTTCTCTCTCAAAAGTAAAGCTGACCCGGATGCGACAATCAAACCCGCACATCTGGTCTGGAGATGACAGTGCCAGTGGAAGTGCCGGATTCTTTTATTTTCGTT
sph-1 alt      (316) TTTTCTCTCTCAAAAGTAAAGCTGACCCGGATGCGACAATCAAACCCGCACATCTGGTCTGGAGATGACAGTGCCAGTGGAAGTGCCGGATTCTTTTATTTTCGTT
sph-1 seq      (96) -----

sph-1 neu      (295) AATGTAACCCGCCCTGATCTATGTAATTTTCATCTGCTTCGTTTATGTCATATTCTGGAATATCTATCAAACGAAAAACGAATCCCATCTAGTGTGATCTGGTGCA
sph-1 alt      (421) AATGTAACCCGCCCTGATCTATGTAATTTTCATCTGCTTCGTTTATGTCATATTCTGGAATATCTATCAAACGAAAAACGAATCCCATCTAGTGTGATCTGGTGCA
sph-1 seq      (96) -----

sph-1 neu      (400) ACTGCACTTTTATTTATCCTTTTCTTCTCTGTAGTTCGATTTGGTGGGCTGGAGCGAACACAATCGGAAATGCCACGTGACAGCAGCGATTGACTGAATTATTT
sph-1 alt      (526) ACTGCACTTTTATTTATCCTTTTCTTCTCTGTAGTTCGATTTGGTGGGCTGGAGCGAACACAATCGGAAATGCCACGTGACAGCAGCGATTGACTGAATTATTT
sph-1 seq      (96) -----

sph-1 neu      (505) GGACAGGGGTCGTGGAAAGGACAAAATGCTCAATTTTGTAGTAGAGATGTTAATAATGGAAAATGGCTATTTCCGTTGCTTGCCAATTCGGTATGTGTTCTTTGT
sph-1 alt      (631) GGACAGGGGTCGTGGAAAGGACAAAATGCTCAATTTTGTAGTAGAGATGTTAATAATGGAAAATGGCTATTTCCGTTGCTTGCCAATTCGGTATGTGTTCTTTGT
sph-1 seq      (96) -----

sph-1 neu      (610) TTCGCCTTTAACTGTTGGTTCATCTGGAAGGAAGTTGTTCCACGGGATTCATCCAATCCAAGTGATATCGCTTAA
sph-1 alt      (736) TTCGCCTTTAACTGTTGGTTCATCTGGAAGGAAGTTGTTCCACGGGATTCATCCAATCCAAGTGATATCGCTTAA
sph-1 seq      (96) -----

```

B

```

SPH-1 neu      (1) -----MPSIPAQLNISAFKPLGFIRIIQFVFIIIAIAAINSWSGLELNYHCVDGTGNIITRNSTQKVVYTF
SPH-1 alt      (1) MVSLVIKFSRYQKENMTQQALFSLLLRFTFVVIIFRYFINEKMPISIPAQLNISAFKPLGFIRIIQFVFIIIAIAAINSWSGLELNYHCVDGTGNIITRNSTQKVVYTF

SPH-1 neu      (65) SLSKVKLTGCDNQTRTFWSGDDASAGSAGFFYFVNVVTALIVYVIFCFVYVIFWNIYQTEKRIPLVDLGATALLFLLFFFCSSIIWWAGANTIGNATSDERLTELFG
SPH-1 alt      (106) SLSKVKLTGCDNQTRTFWSGDDASAGSAGFFYFVNVVTALIVYVIFCFVYVIFWNIYQTEKRIPLVDLGATALLFLLFFFCSSIIWWAGANTIGNATSDERLTELFG

SPH-1 neu      (170) QGSWKQNAQFLSRDVNNGKLAISVLANWCVLCFAFNCWFINKVVFVPRDSSNPSDIA
SPH-1 alt      (211) QGSWKQNAQFLSRDVNNGKLAISVLANWCVLCFAFNCWFINKVVFVPRDSSNPSDIA

```

Abbildung 4-2 „Alte“ und „neue“ Sequenz des *sph-1* 5'-Ende bzw. der N-terminalen Proteinsequenz (SPH-1). (A) Mit Hilfe der aus der Sequenzierung gewonnenen Daten („sph-1 seq“) wurde die Position des *sph-1* Startcodons (ATG) von der ehemaligen Position 18.031 auf die Position 17.855 in AF038618 korrigiert („sph-1 neu“). Dabei liegt das neue Startcodon im Exon-2 der alten vorhergesagten *sph-1* Sequenz („sph-1 alt“), so dass die Zahl der Exone von ehemals 5 auf 4 korrigiert wurde. Auch fällt somit eine in Exon-1_{alt} postulierte fünfte Transmembrandomäne weg. Die gelb unterlegten Buchstaben entsprechen den „sph-1 seq“ ab dem ATG in „sph-1 neu“ und „sph-1 alt“. (B) Das SPH-1 („SPH-1 neu“) wurde um die hydrophobe Aminosäuresequenz („SPH-1 alt“, rote Buchstaben) reduziert. Sequenzen, die erhalten bleiben, sind grau unterlegt.

4. Ergebnisse

SPH-1	(<i>C. elegans</i>)	(1)	-----PSIPALNLSAFKPLGFRITICQVFIIATAAINSG--LEINYSKVDGHTGITINSTQKVTFSLSKXVITCDNQT-
Synaptophysin	(<i>T. californica</i>)	(1)	-----MELVNCQIVASGSRVVKKEPLGFKLKLQWFFAIFAFATCSYSGELRFVSVECANHESDLDIRVQFEYFFRLHQVYFSPVPCRKE
Synaptophysin	(<i>D. rerio</i>)	(1)	-----MDVANQLVATGQFTLVKQPLGFKLKLQWFFAIFAFATCCGYSYGVFRMSVCEKNSDLDNIEVEFAYFFRLHQVYFDAPTCKGS
Synaptophysin	(<i>X. laevis</i>)	(1)	-----MELVNVQLVAGGQFRVTKKPLGFKLVLEMLFSSIFAFATCCGYSYGVFRMSLTLCKNKNESKPNIKYVPEYFFRLHQEYFDAPTCKG-
Synaptophysin	(<i>B. taurus</i>)	(1)	-----MDVVNQLVAGGQFRVVKKEPLGFKVQLQWFFAIFAFATCCGYSYSGELQLSVFCANKTKSDDLNIIEVEFEYFFRLHQVYFDAPTCKG-
Synaptophysin	(<i>H. sapiens</i>)	(1)	MLLLADMVVNQLVAGGQFRVVKKEPLGFKVQLQWFFAIFAFATCCGYSYSGELQLSVFCANKTESDLSIEVEFEYFFRLHQVYFDAPTCKG-
Synaptophysin	(<i>M. musculus</i>)	(1)	-----MDVVNQLVAGGQFRVVKKEPLGFKVQLQWFFAIFAFATCCGYSYSGELRLSVFCANKTESALNIEVEFEYFFRLHQVYFDAPTCKG-
Synaptophysin	(<i>R. norvegicus</i>)	(1)	-----MDVVNQLVAGGQFRVVKKEPLGFKVQLQWFFAIFAFATCCGYSYSGELRLSVFCANKTESALNIEVEFEYFFRLHQVYFDAPTCKG-
SPH-1	(<i>C. elegans</i>)	(79)	---SIFWSGDSSSGSAGFYFVNVTAIVYFICFVYLFVWNIYQTEKIFPLVDLGATAIFLLEFCSSIWMAAGANTGNATSDERT
Synaptophysin	(<i>T. californica</i>)	(85)	RLEONFLTGDYSS--AEFFVTVAVFAELYAGALITVYFLPNKYENNRGPLYDLVATAVFFLNLVSSSAWAQGLSDVKMATDAEYLI
Synaptophysin	(<i>D. rerio</i>)	(85)	EEELFLVGDNSS--AEFFVTVAVFAELYAGALITVYFLPNKYENNRGPLYDLVATAVFFLNLVSSSAWAQGLSDVKMATDAEYLI
Synaptophysin	(<i>X. laevis</i>)	(84)	TRKFLVGDYSS--AEFFVTVAVFAELYAGALITVYFLPNKYENNRGPLYDLVATAVFFLNLVSSSAWAQGLSDVKMATDAEYLI
Synaptophysin	(<i>B. taurus</i>)	(84)	PKKFLVGNYS--AEFFVTVAVFAELYAGALITVYFLPNKYENNRGPLYDLVATAVFFLNLVSSSAWAQGLSDVKMATDAEYLI
Synaptophysin	(<i>H. sapiens</i>)	(90)	CTTKFLVGDYSS--AEFFVTVAVFAELYAGALITVYFLPNKYENNRGPLYDLVATAVFFLNLVSSSAWAQGLSDVKMATDAEYLI
Synaptophysin	(<i>M. musculus</i>)	(85)	CTTKFLVGDYSS--AEFFVTVAVFAELYAGALITVYFLPNKYENNRGPLYDLVATAVFFLNLVSSSAWAQGLSDVKMATDAEYLI
Synaptophysin	(<i>R. norvegicus</i>)	(85)	CTTKFLVGDYSS--AEFFVTVAVFAELYAGALITVYFLPNKYENNRGPLYDLVATAVFFLNLVSSSAWAQGLSDVKMATDAEYLI
SPH-1	(<i>C. elegans</i>)	(166)	ELFGQGSVK--CNAQFLSRDVENKLAISVLAIVYVLCFAFNCWFYKKEVPRDSNPDID-----
Synaptophysin	(<i>T. californica</i>)	(173)	D-LTRACETK--ENTCKELRDFVMSGLNLSVVFGLNLVLWGNLWVFKETGWRPFAPGGLPPEEKPPEDS---REVYGGQPOENTYH
Synaptophysin	(<i>D. rerio</i>)	(173)	K-LTPACERT--ENRCKELRDFVMSGLNLSVVFGLNLVLWGNLWVFKETGWRPFAPGGLPPEEKPPEDS---REVYGGQPOENTYH
Synaptophysin	(<i>X. laevis</i>)	(172)	ETQPECKREYMTCSRLRDFVMSGLNLSVVFGLNLVLWGNLWVFKETGWRPFAPGGLPPEEKPPEDS---REVYGGQPOENTYH
Synaptophysin	(<i>B. taurus</i>)	(172)	K-GMHVCHOP--GNTCKELRDFVMSGLNLSVVFGLNLVLWGNLWVFKETGWRPFAPGGLPPEEKPPEDS---REVYGGQPOENTYH
Synaptophysin	(<i>H. sapiens</i>)	(178)	K-EMPVCRQI--GNTCKELRDFVMSGLNLSVVFGLNLVLWGNLWVFKETGWRPFAPGGLPPEEKPPEDS---REVYGGQPOENTYH
Synaptophysin	(<i>M. musculus</i>)	(173)	K-EMPVCRQI--GNTCKELRDFVMSGLNLSVVFGLNLVLWGNLWVFKETGWRPFAPGGLPPEEKPPEDS---REVYGGQPOENTYH
Synaptophysin	(<i>R. norvegicus</i>)	(173)	K-EMPVCRQI--GNTCKELRDFVMSGLNLSVVFGLNLVLWGNLWVFKETGWRPFAPGGLPPEEKPPEDS---REVYGGQPOENTYH
SPH-1	(<i>C. elegans</i>)	(228)	-----
Synaptophysin	(<i>T. californica</i>)	(256)	QEAERYELEGYQPNYQOYEP-----PQGGDYQPOGGYS-QVPTSFNQM
Synaptophysin	(<i>D. rerio</i>)	(255)	QDQYASGGYQPDYQCG-----YEGGQY--QGYG-QGPTSFNQM
Synaptophysin	(<i>X. laevis</i>)	(255)	QDQSYGQGGYQPDY-----YGGQDY--QGYG-QGPTSFNQM
Synaptophysin	(<i>B. taurus</i>)	(258)	QDQSYGQGGYQPDYQPASGGGGYGPQGDY--QGYG-QGPTSFNQM
Synaptophysin	(<i>H. sapiens</i>)	(264)	QDQSYGQGGYQPDYQPASGGGGYGPQGDY--QGYG-QGPTSFNQM
Synaptophysin	(<i>M. musculus</i>)	(259)	QDQSYGQGGYQPDYQPASGGGGYGPQGDY--QGYG-QGPTSFNQM
Synaptophysin	(<i>R. norvegicus</i>)	(259)	QDQSYGQGGYQPDYQPASGGGGYGPQGDY--QGYG-QGPTSFNQM

Abbildung 4-3 Sequenzvergleich des SPH-1 aus *C. elegans* mit Synaptophysinen verschiedener Vertebraten.

Aminosäuresequenzvergleich von Synaptophysin verschiedener Arten unterschiedlicher Tierklassen: Mammalia [*Bos taurus*, *Homo sapiens*, *Mus musculus* und *Rattus norvegicus*], Amphibia [*Xenopus laevis*], Osteichthyes [*Danio rerio*] und Chondrichthyes [*Torpedo californica*] mit der neu bestimmten Aminosäuresequenz des *C. elegans* Synaptophysins (SPH-1, rot; Proteindatenbanknummern siehe Tabelle 7-5). Identische Aminosäuren (As) sind gelb, gleiche Blöcke grün, konservierte As hellblau, As mit geringer Ähnlichkeit lila und As ohne Ähnlichkeit sind nicht unterlegte Buchstaben (verwendete Matrix = Dayhoff).

4.1.2 Erstellung eines Cladogramms der TVPs von *C. elegans* und *Mus musculus*

Um die Verwandtschaft der TVPs zwischen *C. elegans* (Ce) und der Maus (*Mus musculus*, Mm) zu untersuchen, sollte ein Cladogramm erstellt werden. Zum „Wurzeln“ wurden nicht verwandte Proteine aus *C. elegans* mit vier Transmembrandomänen verwendet [Connexinortholog Innexin (INX-1) und Tetraspanin 1 (TSP-1)]. Die Sequenzen wurden an Hand der konservierten Transmembrandomänen angepasst (Tabelle 7-4 und Abbildung 4-4). Anschließend wurde ein phylogenetischer Baum mit Hilfe des Programms MrBayes berechnet (Abbildung 4-5). Aus dieser Berechnung resultiert ein Monophylum für die Gruppe der SCAMPs, wobei das SCM-1 aus *C. elegans* näher mit der Ur-SCAMP-Variante verwandt ist, als die Maus-SCAMPs. Das Phylum der Physine und Gyryne ist aus einem gemeinsamen Vorläufer hervorgegangen. SPH-1 hat dabei mehr Gemeinsamkeiten mit dem Vorläufer als die Physine der Maus und die Gyryne beider Arten. Bei den Physinen Pantophysin und Mitsugumin 29 der Maus sind die Verwandtschaftsverhältnisse noch widersprüchlich, was sich in dem *bootstrap*-Wert < 0,9 widerspiegelt. Aus den Physinen sind die Gyryne hervorgegangen, wobei SNG-1 näher zu der ursprünglichen Gyrynvariante steht als die Gyryne der Maus, die eine Weiterentwicklung des Ur-Gyryns darstellen.

4. Ergebnisse

Abbildung 4-4 Vergleich von TVPs aus *C. elegans* (Ce) und *M. musculus* (Mm).

Vergleich der TVP-Aminosäuresequenzen von *C. elegans* (Ce; SPH-1, SNG-1 und SCM-1) mit den TVPs aus *Mus musculus* (Mm; Synaptophysin, Synaptoporin, Pantophysin, Mitsugumin29, Synaptogyrin 1-4 und SCAMP 1-5). Als Wurzel wurden nichtverwandte Proteine mit 4 Transmembrandomänen aus *C. elegans* [Innexin (INX-1) und Tetraspanin 1 (TSP-1)] verwendet. Die Aminosäuresequenz der Transmembrandomänen ist in roten Buchstaben dargestellt.

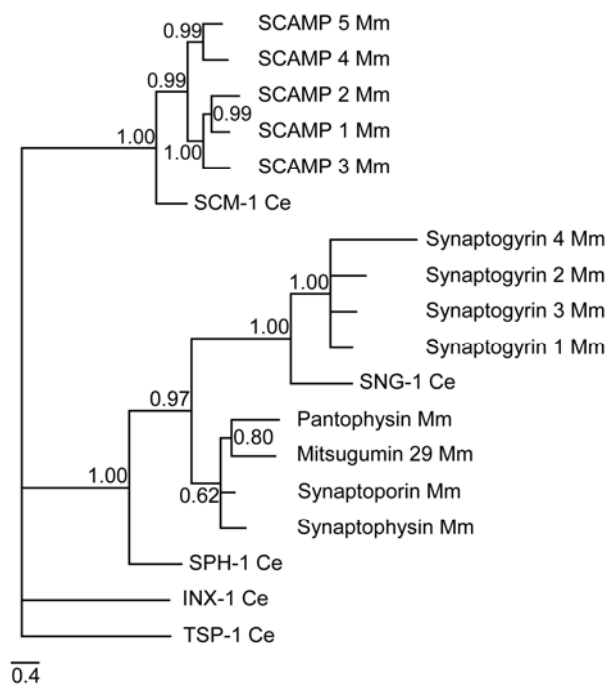


Abbildung 4-5 Cladogramm der *C. elegans* (Ce) und *M. musculus* (Mm) TVPs.

Phylogenetische Verwandtschaft der TVPs aus *C. elegans* (Ce) und *Mus musculus* (Mm). Die TVPs der SCAMP-Familie bilden ein Monophylum. Die Physin- und Gyrin-Familie bilden ein zweites gemeinsames Phylum. Die *C. elegans* TVPs (SPH-1, SNG-1 und SCM-1) sind mit den ursprünglichen Varianten näher verwandt, als die jeweiligen Varianten aus *M. musculus*. Die Gyrin-Familie geht aus einem Physinvorläufer hervor. Die Verwandtschaftsverhältnisse innerhalb der Physine aus *M. musculus* sind unklar, da hier *bootstrap*-Faktoren von < 0,9 vorliegen. Der Maßstab gibt die Anzahl der Austausche pro Aminosäurestelle wieder.

4.2 Aufreinigung und Charakterisierung von Antikörpern gegen *C. elegans* TVPs

4.2.1 Aufreinigung und Titerbestimmung im Dot-Blot

Um die Expression der TVPs in *C. elegans* zu untersuchen, wurden zunächst Antikörper gegen N- und C-terminale Peptidsequenzen generiert (siehe Tabelle 3-7) und die Rohseren affinitätsgereinigt. Anschließend wurde die Reaktivität dieser Antikörper in einem Dot-Blot überprüft (Abbildung 4-6). Dabei zeigte sich, dass die Antikörper die an Ovalbumin gekoppelten Peptide schon bei einer Menge von ca. 10-100 ng und einer Antikörperverdünnung von 1:1.000 detektieren (Abbildung 4-6).

4. Ergebnisse

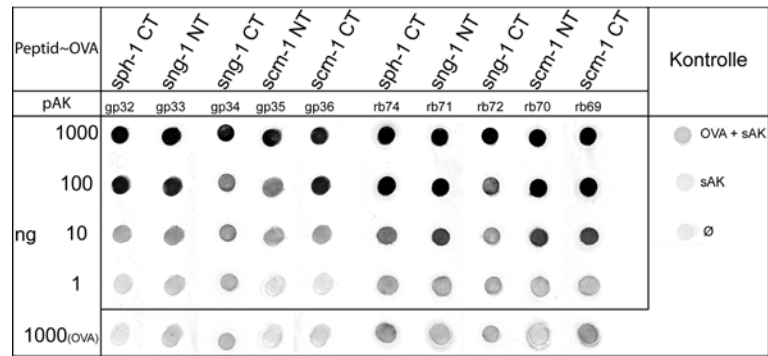


Abbildung 4-6 Dot-Blot der verschiedenen Antikörper gegen die *C. elegans* TVPs.

Der Dot-Blot zeigt, dass die aufgereinigten Antikörper (pAK; Verdünnung 1:1.000) aus dem Meerschweinchen (gp32-gp36) und Kaninchen (rb69-rb72 und rb74) die an Ovalbumin (OVA) gekoppelten Peptide (Peptid~OVA; 1-1.000 ng) ab einer Menge von ≥ 10 ng detektieren. Als Kontrolle wurde 1 μ g OVA aufgetragen. Außerdem wurde die Membran zur Kontrolle ohne Antikörper (\emptyset), mit Sekundärantikörper (sAK) und mit OVA (1 μ g) + sAK inkubiert.

4.2.2 Verteilung der *C. elegans* TVPs in humanen Zellen

Um die Funktionalität der Antikörper *in situ* zu testen, wurden humane Epithelzellen (PLC) mit Plasmidkonstrukten transient transfiziert, die für *C. elegans* TVPs kodieren (Tabelle 4-1). Darüber hinaus sollte in diesen Experimenten die subzelluläre Verteilung der TVPs analysiert werden.

Tabelle 4-1 Plasmid-Konstrukte für die transiente Transfektion*.

- *sph-1::ecfp*

Durch Amplifikation der *sph-1* cDNA mit den Amplimeren 03-97 und 03-94 wurde ein 688 bp *Clal/Sall*-Fragment gewonnen. Dieses Fragment wurde in den Vektor STE14-CUB-RURA3-MET-313 kloniert. Anschließend wurde die *sph-1* cDNA mit *EcoRI* und *Sall* aus diesem Vektor geschnitten und in den pECFP-N1 Vektor ligiert.

- *sng-1::evfp*

Die cDNA von *sng-1* wurde mit den Amplimeren 01-12 und 01-13 amplifiziert. Das so entstandene 1.826 bp große *HindIII/XhoI*-Fragment wurde anschließend in den pEYFP-N1 Vektor überführt.

- *scm-1::cfp*

Die *scm-1* cDNA wurde mit den Amplimeren 01-14 und 01-15 amplifiziert und das resultierende 1.015 bp große *XhoI/HindIII*-Fragment in den Vektor pECFP-N1 ligiert.

- *scm-1::rfp*

Um die *scm-1* cDNA mit *mrfp*-cDNA zu fusionieren, wurde die *mrfp*-cDNA von dem Vektor pRSETB(*mrfp*) mit den Amplimeren 03-88 und 04-72 amplifiziert. Das 677 bp große *BamHI/NotI*-Fragment wurde anschließend verwendet, um die *yfp*-codierende cDNA Sequenz des Vektors pEYFP-N1 zu ersetzen. Hierfür wurde zunächst ein 719 bp großes *BamHI/NotI*-Fragment, welches die *yfp*-cDNA enthielt, aus dem Vektor pEYFP-N1 entfernt. Danach wurde die *scm-1*-cDNA aus dem Vektor *scm-1::cfp* mit *XhoI* und *BamHI* entnommen und in den neuen *mRFP*-Vektor eingefügt, so dass der Vektor *scm-1::rfp* entstand.

(*siehe Vektorkarten Abbildung 7-1 A)

4.2.3 Detektion der ektopisch exprimierten *C. elegans* TVPs mit den Antikörpern

Um zu testen, ob mit den generierten Antikörpern die *C. elegans* TVP-Epitope *in vitro* nachgewiesen werden können, wurden die Fluoreszenzkonstrukte (Tabelle 4-1) in PLC-Zellen transient transfiziert und mit den Antikörpern inkubiert. Anschließend wurden die Zellen fluoreszenzmikroskopisch untersucht (Abbildung 4-7, Abbildung 4-8).

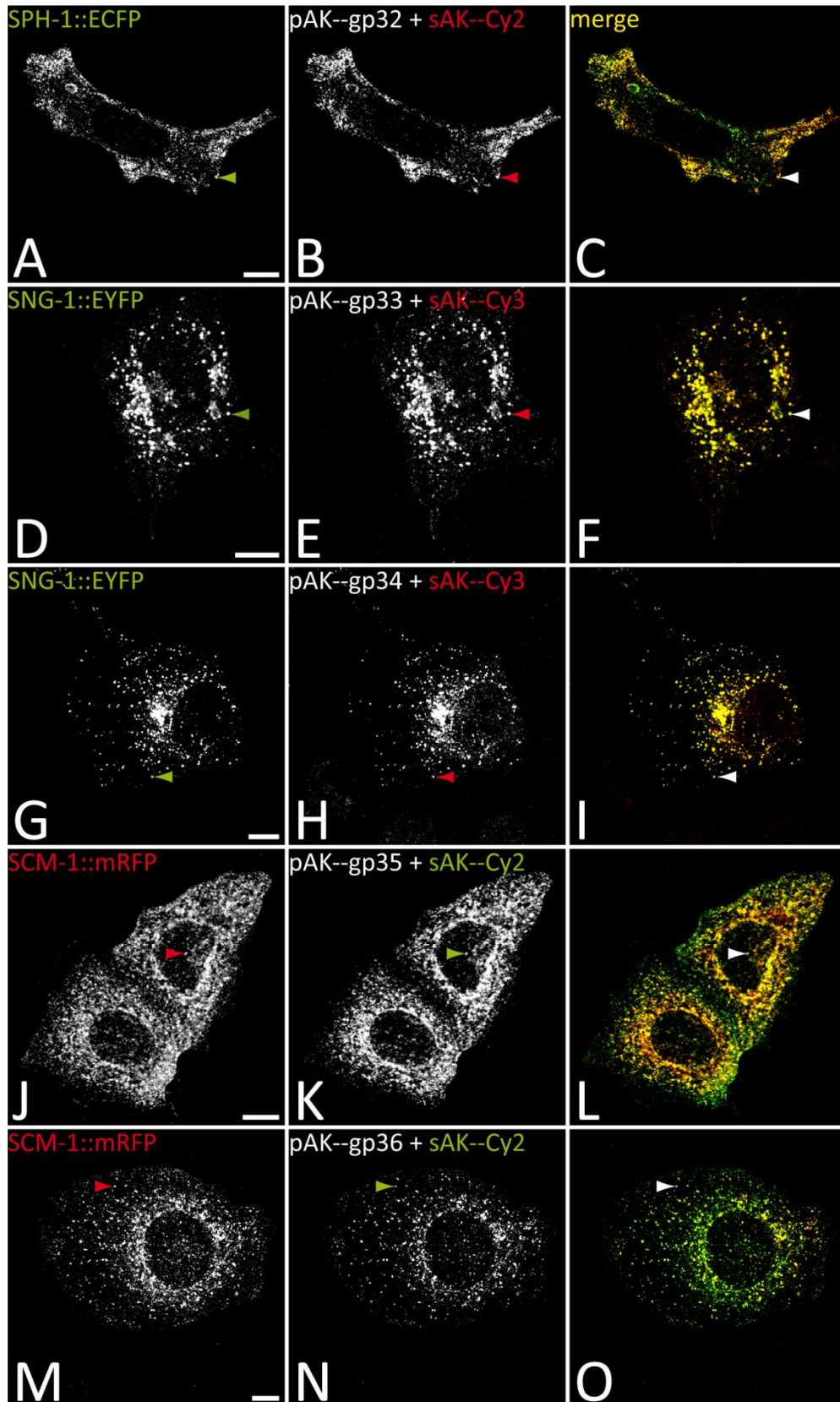
Die Antikörper aus dem Meerschweinchen detektieren die rekombinaten *C. elegans* TVP-Fluoreszenzkonstrukte in den transfizierten PLC-Zellen (Abbildung 4-7). Dabei kolokalisieren die TVPs mit den Antikörpern. Die Quantität der Kolokalisierung wurde mit Hilfe der Pearson Korrelation bestimmt, wobei ein Korrelationskoeffizient von $r = 1$ einer Kolokalisierung von 100 % entspricht. Der Korrelationskoeffizient ist dabei für den Antikörper gerichtet gegen SPH-1-CT (gp32) $r = 0,82$ (Abbildung 4-7 C), gegen SNG-1-CT (gp33) $r = 0,79$ (Abbildung 4-7 F), gegen SNG-1-NT (gp34) $r = 0,85$ (Abbildung 4-7 I), gegen SCM-1-CT (gp35) $r = 0,86$ (Abbildung 4-7 L) und gegen SCM-1-NT (gp36) $r = 0,75$ (Abbildung 4-7 O). Mit den Kaninchenantikörpern rb69-rb71 konnten die TVP-Fluoreszenzkonstrukte ebenfalls detektiert werden (Abbildung 4-8). Mittels Pearson Korrelation wurde auch hier der Grad der Kolokalisierung ermittelt. Die Korrelation beträgt für den Antikörper gegen SNG-1-CT (rb71) $r = 0,75$ (Abbildung 4-8 C), gegen SCM-1-CT (rb70) $r = 0,78$ (Abbildung 4-8 L) und gegen SCM-1-NT (rb69) $r = 0,79$ (Abbildung 4-8 I). Der Antikörper gegen SPH-1-CT (rb74) detektiert hingegen Keratin (Daten nicht gezeigt) und gegen SNG-1-NT (rb72) markiert neben vesikulären Kompartimenten zusätzlich ebenfalls Keratin (Abbildung 4-8 D-F). Im Fall von rb74 könnte die Reaktion mit Keratin 8 oder 18 auf Ähnlichkeiten des verwendeten Peptid epitops beruhen, wie ein Sequenzvergleich der C-terminalen SPH-1 Peptidsequenz zeigt (Abbildung 4-10 A). Ebenso zeigt ein ähnlicher Vergleich der N-terminalen SNG-1 Peptidsequenz mit Keratin 8 und 18, ebenso eine Sequenzähnlichkeit (Abbildung 4-10 B), was die Kreuzreaktion des affinitätsgereinigten Antikörpers rb72 erklären könnte.

Um zu zeigen, dass die Primärantikörper aus Meerschweinchen und Kaninchen für die Detektion der Epitope verantwortlich sind und nicht die Sekundärantikörper, wurden die PLC Zellen zur Kontrolle nur mit den verwendeten Sekundärantikörpern inkubiert (Abbildung 4-9, Details siehe Bildlegende).

Abbildung 4-7 Detektion der *C. elegans* TVPs in transfizierten PLC-Zellen mit den gp-Antikörpern.

PLC-Zellen wurden mit *C. elegans* TVP-Fluoreszenzkonstrukten transient transfiziert, anschließend mit Methanol-Aceton fixiert und mit dem jeweiligen Antikörper inkubiert. SPH-1 gekoppelt an ECFP (A) wurde mit dem Antikörper gp32 (C-Terminus, B) detektiert. Der Korrelationskoeffizient der Kolokalisierung beträgt $r = 0,82$ für ECFP mit Cy2 (C merge). SNG-1 gekoppelt an EYFP (D, G) wurde mit den Antikörper gp33 (C-Terminus, E) und gp34 (N-Terminus, H) detektiert. Daraus ergibt sich für die Kolokalisierung von EYFP mit Cy3 ein Korrelationskoeffizient von $r = 0,79$ (F) und $r = 0,85$ (I). SCM-1 gekoppelt an mRFP (J, M) wurde mit den Antikörpern gp35 (C-Terminus, K) und gp36 (N-Terminus, N) detektiert. Die Kolokalisierung mit Cy2 hat dabei einen Korrelationskoeffizienten von $r = 0,86$ (L) und $r = 0,75$ (O). Es wurde jeweils eine konfokale Schnittebene verwendet (Maßstab 10 μm).

4. Ergebnisse



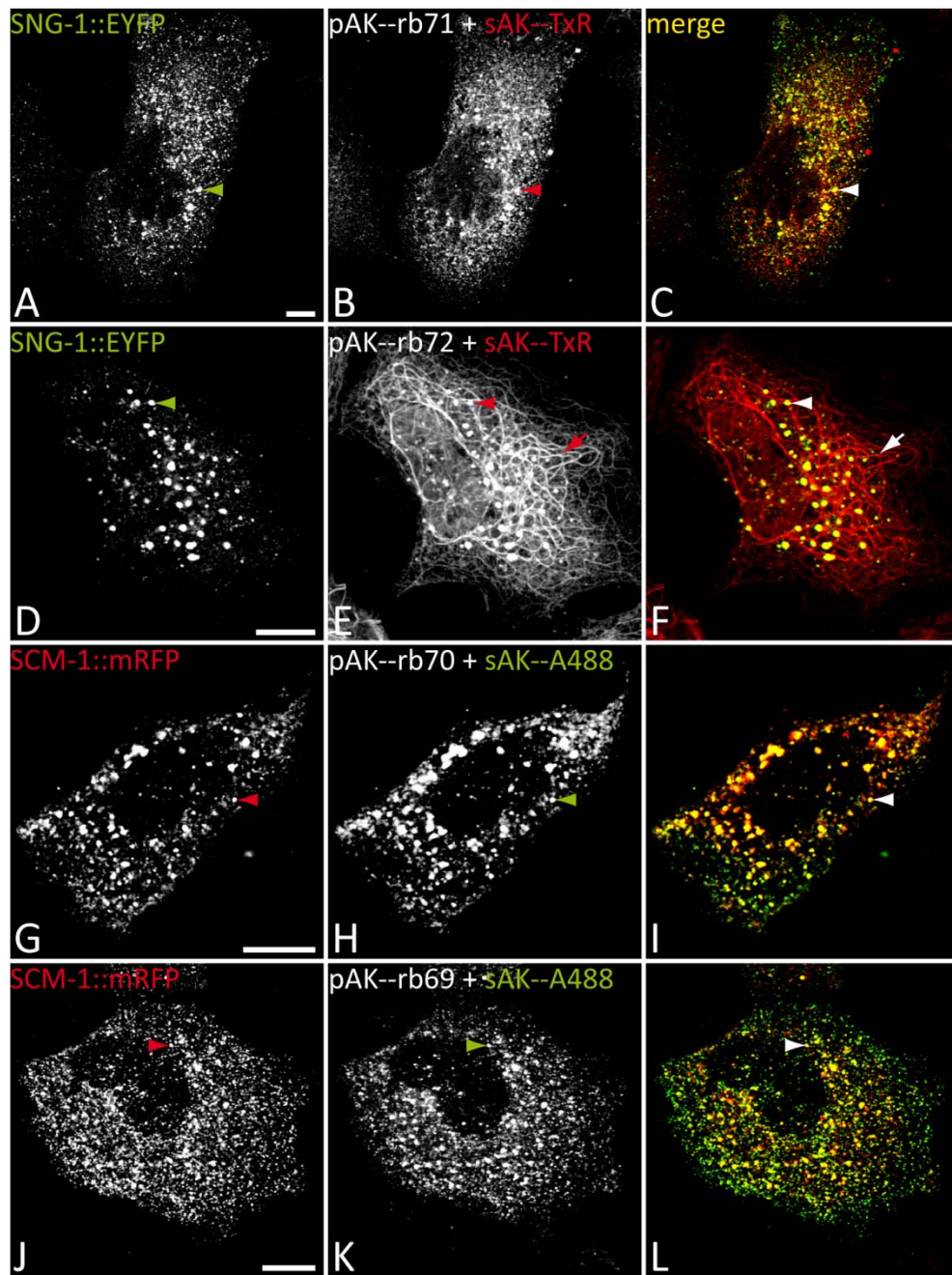
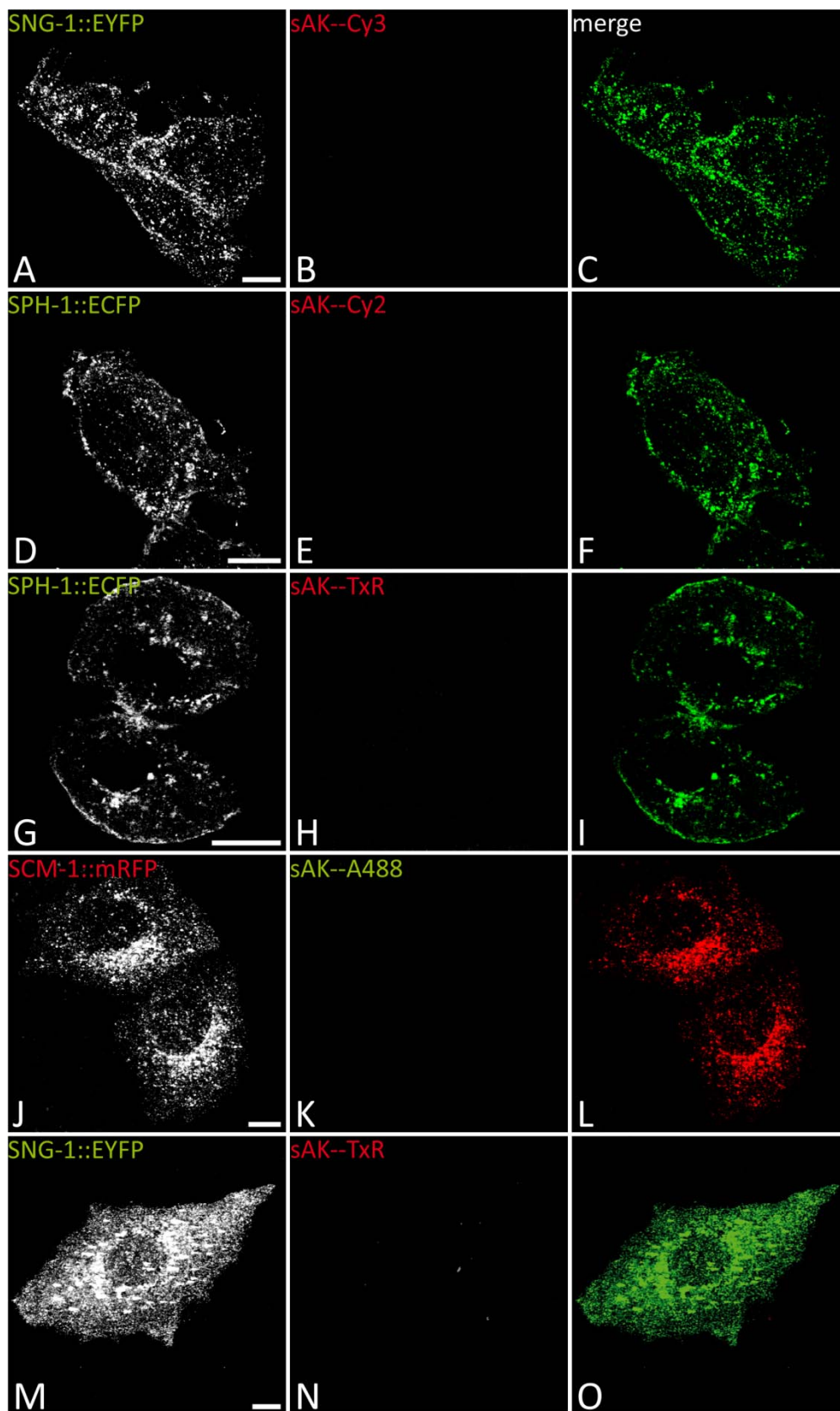


Abbildung 4-8 Detektion der *C. elegans* TVPs in transfizierten PLC-Zellen mit den rb-Antikörpern.

Detektion von *C. elegans* TVPs transient transfizierter PLC-Zellen mit den Kaninchen-Antikörpern (rb). Fixierung mit Paraformaldehyd (A-D) und mit Methanol-Aceton (G-L). SNG-1 gekoppelt an EYFP (A, D) wurde mit den Antikörpern rb71 (C-Terminus, B) und rb72 (N-Terminus, E) detektiert. Die Kolokalisierung von EYFP mit TxR hat dabei einen Korrelationskoeffizienten von $r = 0,75$ (C merge). Der Korrelationskoeffizient für den Antikörper rb72 (EYFP mit TxR) wurde nicht bestimmt, da hier der Antikörper auch Keratin detektiert (Pfeile E, F). SCM-1 gekoppelt an mRFP (G, J) konnte mit den Antikörpern rb70 (C-Terminus, H) und rb69 (N-Terminus, K) detektiert werden. Für die Kolokalisierung von mRFP mit A488 ergibt sich ein Korrelationskoeffizient von $r = 0,79$ (I) und $r = 0,78$ (L). Es wurde jeweils eine konfokale Schnittebene verwendet (Maßstab 10 μm).



4. Ergebnisse

Abbildung 4-9 Negativkontrolle der Antikörperdetektion der *C. elegans* TVPs in transfizierten PLC-Zellen.

Negativkontrollen der Fluoreszenzkonstrukte mit Sekundärantikörpern (sAK) und deren Überlagerung (in Farbe). Methanol-Aceton (A-L) und Paraformaldehyd-(M-O) fixierte PLC-Zellen. SNG-1::YFP (A) mit sAK--Cy3 (B, C merge). SPH-1::CFP (D, G) mit sAK--Cy2 (E) und sAK--Txr (H) und deren Überlagerung (F, I). SCM-1::RFP (J) mit sAK--A488 (K) und die Überlagerung (L). (M) PLC-Zelle, die SNG-1::EYFP exprimiert wurde mit Paraformaldehyd fixiert und mit dem sAK--Txr inkubiert (N). Die Überlagerung ist in O zu sehen. Es wurde jeweils eine konfokale Schnittebene verwendet (Maßstab 10 µm).

A

Keratin 18 (Hs)	(1)	MS-FTTRSTSTNYRSLGVCQPSYGFREVSSAIVYAGAGGSGSRISVSRSSFRGGGSGGLTGIAGGLAGGGIQ-----EKETIQ
Keratin 8 (Hs)	(1)	MSIRVTQKSYKVSTSGPPEFSRSYTGCGSRISSSFSRVGSG-----NFRGGGGCYGASMGGTAVTVNQSLLSPLVLEVDPNIAQAVRTKEKEQIK
SPH-1 Peptid-CT	(1)	-----
Keratin 18 (Hs)	(86)	SLNDLASYLDVRSLETENRLEKIREHLEKGPQVRDWSHFKIEDLRACFANTVNAKAVLQIDNARLAAQDFRVKYETELAMRQSENIHGLKVID
Keratin 8 (Hs)	(97)	LLNDFASFLDKVRFLEQQNMLEKWSLLQOQKTARSNMMDNDESYNNLRQLETLGOIKLKEAEKGMQGLVDFNKYEDELNKRTEENEFVLKQDID
SPH-1 Peptid-CT	(1)	-----
Keratin 18 (Hs)	(191)	TNTITKOLETEEALKKEELFMKKNHEEVVGLQQAQIASGTTIEMDAPNSODAKIMADIRAQYDELARKNREELKYSQIQIEESTVVTQSAEVAEAT
Keratin 8 (Hs)	(202)	EAYNNKVELESREELTTEINFRLQLEEEIHELQSQISDTSVLSMDNSRLDSDSIILAEVIAQYEDIANSRABASMSQIKYEELQSLAGKHGDLRRTKTE
SPH-1 Peptid-CT	(1)	-----
Keratin 18 (Hs)	(296)	LEIRRTQSLEIQLDSMNLASLENIRVEARYALQEQNLILHLEFLAQTALGQRCAQVEALNKKLAEIATYRLLLEDGED-----
Keratin 8 (Hs)	(307)	LEENRNRLQAELGKQASLEAALAAQRGETAKKDKANKISELEALQRAQCMARQLREYQELNNVKALAEIATYRLLLEDGEDSRLESGMQNMSI
SPH-1 Peptid-CT	(1)	-----
Keratin 18 (Hs)	(388)	-----NLGDLDSNSMQLQKTRRIVDGVVSETNDKVLRH-----
Keratin 8 (Hs)	(412)	HTKTTSGYAGGLSSAYGGLTSPGLSLSLGSFGSGAGSSFSRITSSRAVVVKIETRDGKLVSESDVLPK
SPH-1 Peptid-CT	(1)	-----CKEVVFRDSSNPSII-----

B

Keratin 18 (Hs)	(1)	MS-FTTRSTSTNYRSLGVCQPSYGFREVSSAIVYAGAGGSGSRISVSRSSFRGGGSGGLTGIAGGLAGGGIQ-----EKETIQ
Keratin 8 (Hs)	(1)	MSIRVTQKSYKVSTSGPPEFSRSYTGCGSRISSSFSRVGSG-----NFRGGGGCYGASMGGTAVTVNQSLLSPLVLEVDPNIAQAVRTKEKEQIK
SNG-1 Peptid-NT	(1)	-----
Keratin 18 (Hs)	(86)	SLNDLASYLDVRSLETENRLEKIREHLEKGPQVRDWSHFKIEDLRACFANTVNAKAVLQIDNARLAAQDFRVKYETELAMRQSENIHGLKVID
Keratin 8 (Hs)	(97)	LLNDFASFLDKVRFLEQQNMLEKWSLLQOQKTARSNMMDNDESYNNLRQLETLGOIKLKEAEKGMQGLVDFNKYEDELNKRTEENEFVLKQDID
SNG-1 Peptid-NT	(1)	-----
Keratin 18 (Hs)	(191)	TNTITKOLETEEALKKEELFMKKNHEEVVGLQQAQIASGTTIEMDAPNSODAKIMADIRAQYDELARKNREELKYSQIQIEESTVVTQSAEVAEAT
Keratin 8 (Hs)	(202)	EAYNNKVELESREELTTEINFRLQLEEEIHELQSQISDTSVLSMDNSRLDSDSIILAEVIAQYEDIANSRABASMSQIKYEELQSLAGKHGDLRRTKTE
SNG-1 Peptid-NT	(1)	-----MIVRYAGAGLAGANFNNTC-----
Keratin 18 (Hs)	(296)	LEIRRTQSLEIQLDSMNLASLENIRVEARYALQEQNLILHLEFLAQTALGQRCAQVEALNKKLAEIATYRLLLEDGED-----
Keratin 8 (Hs)	(307)	LEENRNRLQAELGKQASLEAALAAQRGETAKKDKANKISELEALQRAQCMARQLREYQELNNVKALAEIATYRLLLEDGEDSRLESGMQNMSI
SNG-1 Peptid-NT	(22)	-----
Keratin 18 (Hs)	(390)	-----NLGDLDSNSMQLQKTRRIV-----DGKVVSEINDTKVLRH
Keratin 8 (Hs)	(412)	HTKTTSGYAGGLSSAYGGLTSPGLSLSLGSFGSGAGSSFSRITSSRAVVVKIETRDGKLVSESDVLPK
SNG-1 Peptid-NT	(22)	-----

Abbildung 4-10 Sequenzvergleich der Peptidsequenzen von SPH-1-CT und SNG-1-NT mit Keratin 8 und 18.

Vergleich der Aminosäuresequenz des humanen (Hs) Keratin 8 und 18 (Datenbanknummer: NP_002264 und NP_954657) mit der C-terminalen Peptidsequenz von SPH-1 (A) und mit der N-terminalen Peptidsequenz des SNG-1 (B), die für die Generierung der Antikörper verwendet wurde. Identische Aminosäuren (As) sind gelb, gleiche Blöcke grün, konservative As hellblau, As von geringer Ähnlichkeit lila und As ohne Ähnlichkeiten nicht unterlegt (verwendete Matrix = blosum62mt2).

4.2.4 Nachweis der TVPs mit den Antikörpern in *C. elegans*

Um zu prüfen, ob die Antikörper auch in tierischem Gewebe ihr Epitop detektieren, wurden Gesamttierlysate und Vesikelpräparationen von *C. elegans* angefertigt und nach Auftrennung in einer SDS-PAGE einem Immuno-Blot unterzogen. Dabei konnte eine 33 kDa große Bande mit den Antikörpern aus dem Meerschweinchen (gp33, gp34, gp35, gp36) im Wildtyp detektiert werden, die jedoch auch in den Mutanten (EG2960 siehe unten) nachweisbar war (Daten nicht gezeigt). Die Antikörper aus dem Kaninchen lieferten im Immuno-Blot keine reproduzierbaren spezifischen Reaktionen.

4.3 Subzelluläres Verteilungsmuster in PLC-Zellen

Die fluoreszenzmikroskopischen Muster der Proteine und Antikörper wiesen konstant eine vesikuläre Verteilung auf, wie sie typisch für Transportvesikel sind und für Physine beschrieben wurden⁷³. Um herauszufinden, ob die *C. elegans* TVPs in den gleichen Kompartimenten lokalisieren, wurden Mehrfachtransfektanden hergestellt (Abbildung 4-11). Um den Grad der Kolokalisierung zu quantifizieren, wurde der Pearson Korrelationskoeffizient von SNG-1::YFP zu SCM-1::RFP (Abbildung 4-11 A+B: $r = 0,65$), SCM-1::RFP zu SPH-1::CFP (Abbildung 4-11 B+C: $r = 0,62$) und SPH-1::CFP zu SNG-1::YFP (Abbildung 4-11 C+A: $r = 0,67$) bestimmt, dabei entspricht ein Korrelationskoeffizient von $r = 1$ einer Kolokalisierung von 100 %. Konfokale Aufnahmen der dreifach transfizierten PLC-Zellen bestätigen die Kolokalisierung in einer Schnittebene (Abbildung 4-11 Ausschnitte).

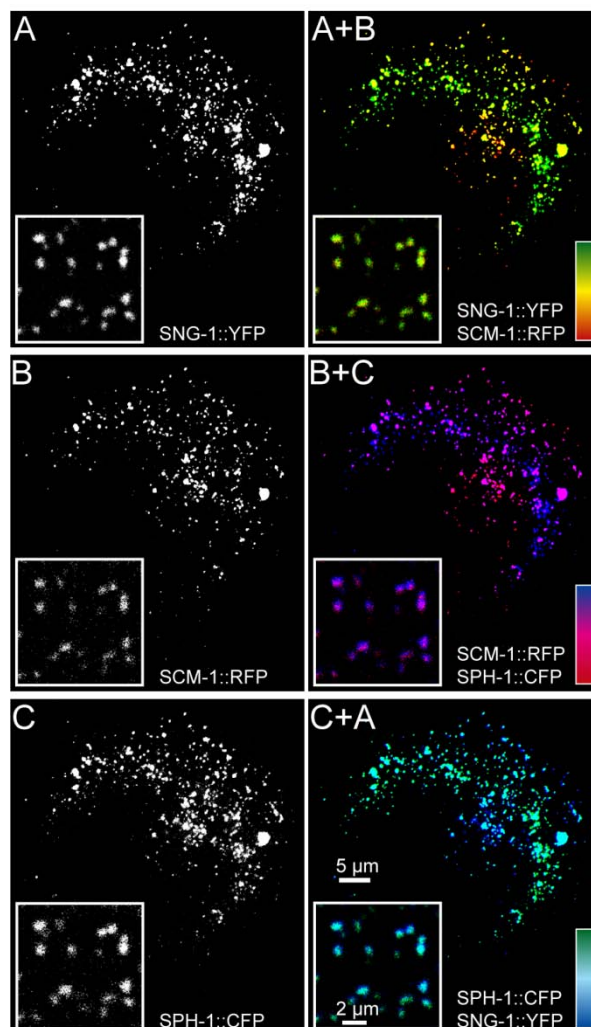


Abbildung 4-11 Ektopische Expression von *C. elegans* TVP-Fluoreszenzkonstrukten in PLC-Zellen.

Methanol-Aceton fixierte PLC-Zelle, die mit den Fluoreszenzkonstrukten SNG-1::YFP (A), SCM-1::RFP (B) und SPH-1::CFP (C) dreifach transient transfiziert wurde. Jeweils zwei Kombinationen einer fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung der Kolokalisierung sind dargestellt (A+B, B+C und C+A). Dabei ergibt sich eine Kolokalisierung nach Pearson für A+B von $r = 0,65$, für B+C von $r = 0,62$ und für C+A von $r = 0,67$. Ausschnitte zeigen eine Ebene einer konfokalen Kolokalisierung einer dreifach transient transfizierten PLC-Zelle. Farbbalken geben den Grad der Kolokalisierung wieder.

4.4 Verteilung der TVPs in *C. elegans*

Um die Verteilung der TVPs in *C. elegans* zu untersuchen, wurden Plasmidkonstrukte für fluoreszierende Transkriptions- und Translationschimären (Tabelle 4-2 und Abbildung 7-1) hergestellt und mikroinjiziert. Die Nachkommen der mikroinjizierten Tiere exprimierten die Konstrukte, wobei die Transkriptionschimären ein geringfügig abweichendes Verteilungsmuster im Vergleich zu den Translationschimären zeigten (siehe auch Tabelle 4-3).

Tabelle 4-2 Transkriptions- und Translationskonstrukte für die Mikroinjektion*.

a) Transkriptionskonstrukte**

- *Psph-1::yfp*_(kurz)

Für das Transkriptionskonstrukt wurde ein 433 bp großes *PstI/XmaI*-Fragment des *sph-1* Promoters mit Hilfe der Amplimere 04-46 und 04-48 von Cosmid F42G8 amplifiziert.

- *Psph-1::yfp*_(lang)

Für das Transkriptionskonstrukt wurde ein 3.672 bp großes *PstI/XmaI*-Fragment des *sph-1* Promoters mit Hilfe der Amplimere 04-47 und 04-48 von Cosmid F42G8 amplifiziert.

- *Psng-1::yfp*

Für das Transkriptionskonstrukt wurde ein 3.791 bp großes *SbfI/XmaI*-Fragment des *sng-1* Promoters mit den Amplimeren 04-95 und 04-96 von Cosmid T08A9 amplifiziert.

- *Psng-1::cfp*[†]

Für das Transkriptionskonstrukt wurde ein 3.585 bp großes *BamHI/SalI*-Fragment des *sng-1* Promoters mit den Amplimeren 05-132 und 05-133 von Cosmid T08A9 amplifiziert.

- *Pscm-1::yfp*

Für das Transkriptionskonstrukt wurde ein 1.573 bp großes *HindIII*-Fragment des *scm-1* Promoters mit den Amplimeren 01-16 und 01-17 von Cosmid M01D7 amplifiziert.

b) Translationskonstrukte**

- *sph-1::yfp*

Für das Konstrukt *sph-1::yfp* wurde ein 1.791 bp *PstI/XmaI*-Fragment mit den Amplimeren 00-20 und 00-13 und ein 4.185 bp *PstI/SalI* -Fragment mit den Amplimeren 03-01 und 03-02 von Cosmid F42G8 amplifiziert. Zunächst wurde das 1.791 bp *PstI/XmaI*-Fragment in den Vektor ligiert und anschließend das 4.185 *PstI/SalI*-Fragment hineinkloniert.

- *sng-1::yfp*

Für den Vektor *sng-1::yfp* wurde ein 6.544 bp *BamHI/XmaI*-Fragment mit den Amplimeren 00-18 und 00-15 von Cosmid T08A9 amplifiziert.

- *scm-1::yfp*

Mit den Amplimeren 01-04 und 00-17 wurde ein 1.010 bp *scm-1* cDNA *BamHI/SalI*-Fragment von der Gesamt-cDNA amplifiziert. Außerdem wurde ein 1.569 bp *HindIII*-Fragment des *scm-1* Promoters mit den Amplimeren 01-16 und 01-17 von Cosmid M01D7 amplifiziert.

(*Fragmente wurden mit den entsprechenden Restriktionsendonukleasen in den Vektor pVH20.01(YFP) überführt.)

([†]Fragment wurde mit den entsprechenden Restriktionsendonukleasen in den Vektor pVH10.10(CFP) ligiert.)

(**siehe Vektorkarten Abbildung 7-1 B, C)

4.4.1 Verteilungsmuster im adulten *C. elegans* Stadium

Um zu untersuchen, in welchen Zellen und subzellulären Strukturen die *C. elegans* TVPs exprimiert werden, wurden die in Tabelle 4-2 genannten Konstrukte in die Tiere mikroinjiziert und transgene

4. Ergebnisse

Stämme generiert (Tabelle 7-3). Anschließend wurden die Nachkommen fluoreszenzmikroskopisch analysiert. Die Transkriptions- und Translationschimären konnten in unterschiedlichen zellulären und subzellulären Strukturen nachgewiesen werden (Tabelle 4-3).

a) Synaptophysin (*Psph-1_{kurz}::YFP*, *Psph-1_{lang}::YFP* und *SPH-1::YFP*)

Um zu untersuchen, wo in *C. elegans* Synaptophysin exprimiert wird, wurde das kurze Transkriptionskonstrukt (*Psph-1_{kurz}::yfp*) in Tiere mikroinjiziert und fluoreszenzmikroskopisch untersucht (Abbildung 4-12). In diesen Tieren (BJ36) ist es in der Pharynxmuskulatur, in der intestinalen Übergangsröhre (Film 01) und den rektalen Drüsenzellen lokalisiert. Da die Verteilung von dem Muster der Translationschimäre abweicht (Abbildung 4-13 B-D), wurde auch das lange Transkriptionskonstrukt (*Psph-1_{lang}::yfp*) mikroinjiziert (Abbildung 4-13 A). Der Promoter des Konstrukts *Psph-1_{lang}::YFP* ist in den pharyngealen Epithelzellen, in der Pharynxmuskulatur, in der intestinalen Übergangsröhre, in den rektalen Drüsenzellen und im analen Sphinkter (Abbildung 4-13 A, A') sowie in pharyngealen Neuronen aktiv (Film 02).

Die Translationschimäre *SPH-1::YFP* zeigt im Pharynx ein punktiertes Muster (Abbildung 4-13 B, C). Es wird u. a. in pharyngealen Epithelzellen und Neuronen, in der intestinalen Übergangsröhre, im Darm, in der exkretorischen Kanal- und Gangzelle, in den Coelomozyten (sehr schwach), in den rektalen Drüsenzellen, im analen Sphinkter und in den rektalen Epithelzellen synthetisiert (Abbildung 4-13 B, C, D, Details siehe Bildlegende). In den Darmzellen ist eine starke apikale Konzentration von *SPH-1::YFP* zu erkennen. Durch Kolo-kalisierung von *SPH-1::YFP* mit der Translationschimäre *IFB-2::CFP*, einem Intermediärfilament des *terminal webs*⁹⁰, wurde die apikale Lokalisierung weiter bestätigt (Abbildung 4-13 E anterior, F + F' median, G posterior, siehe Film 03 und Film 04). Eine höhere Auflösung zeigt, dass *SPH-1::YFP* apikal des *terminal webs* gelegen ist (Abbildung 4-13 F').

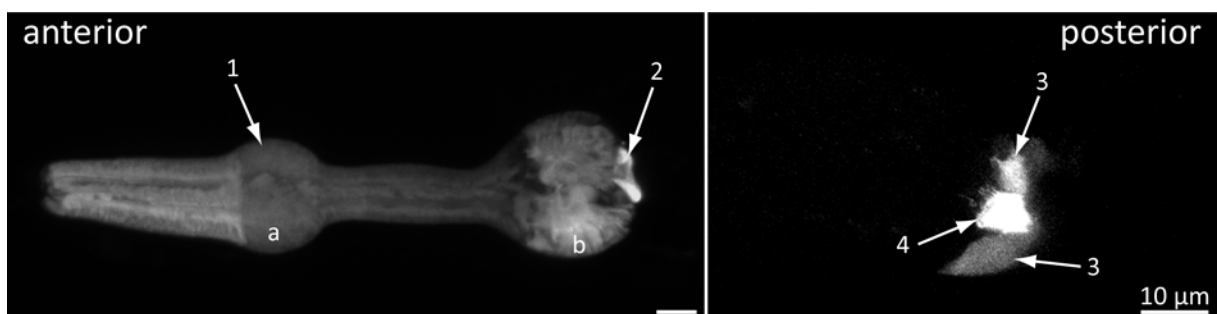
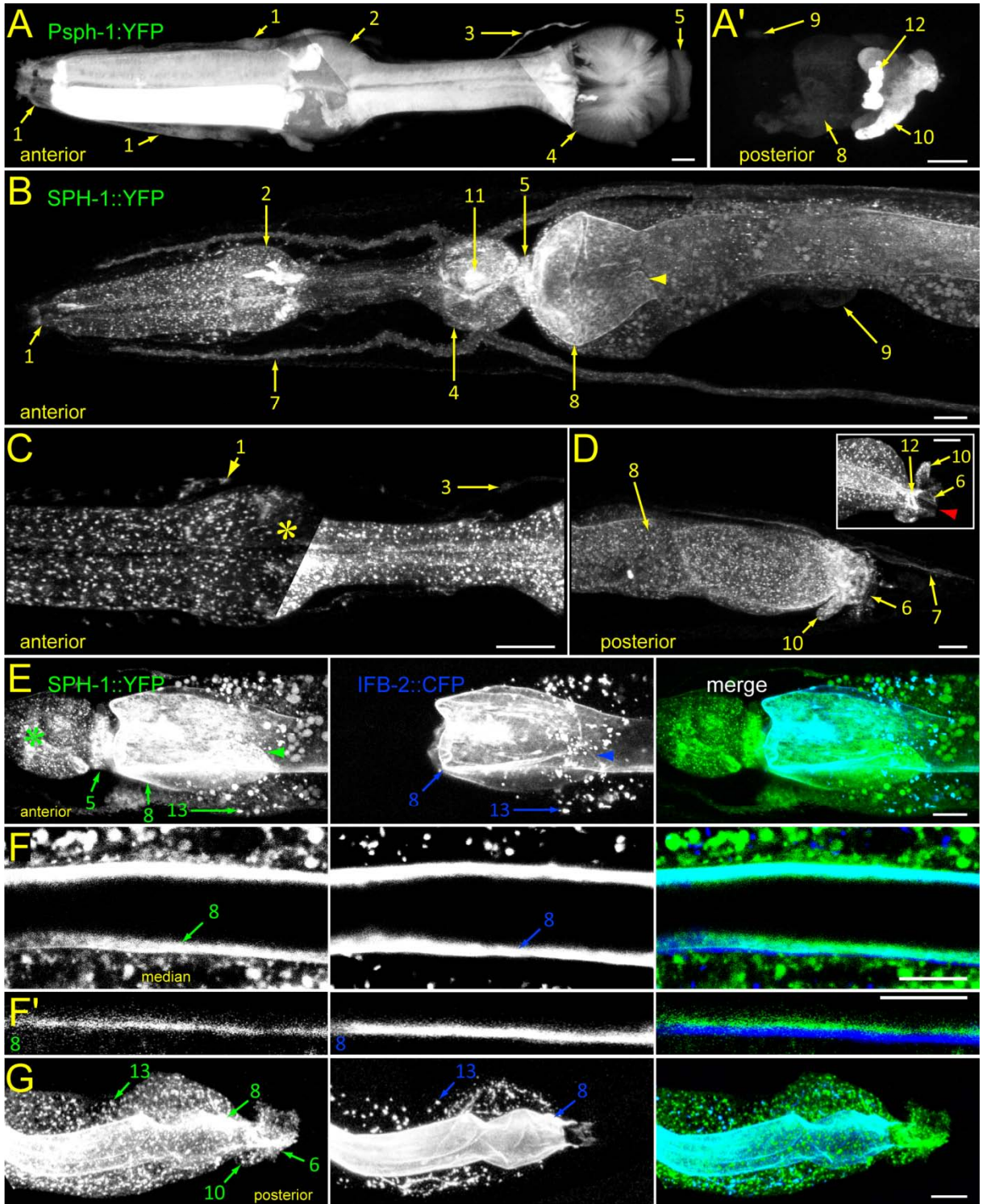


Abbildung 4-12 Expressionsmuster des kurzen *sph-1* Transkriptionskonstruktes.

Das kurze Transkriptionskonstrukt wird in der pharyngealen Muskulatur (1, a: anteriorer und b: posteriorer Bulbus) und in der intestinalen Übergangsröhre (2) exprimiert (Film 01). Posterior ist es in den rektalen Drüsenzellen (3) und in der rektalen Übergangsröhre (4) lokalisiert.

4. Ergebnisse



4. Ergebnisse

Abbildung 4-13 Verteilungsmuster der *sph-1* Transkriptions- und Translationschimären in *C. elegans*.

Die Transkriptionschimäre P $sph-1::YFP$ ist im Pharynx (anteriorer Bulbus 2, posteriorer Bulbus 4), in der intestinalen Übergangsröhre (5), im analen Sphinkter (12) und in den rektalen Drüsenzellen (10) zu finden. Außerdem ist es in epithelialen Zellen (1) und in pharyngealen Neuronen lokalisiert (Fortsatz 3). Dagegen zeigt die Translationschimäre SPH-1:: YFP eine punktierte Verteilung im Pharynx (2 anteriorer Bulbus, 4 posteriorer Bulbus, C), eine gleichförmige punktierte Expression auf der Oberfläche der gesamten exkretorischen Kanal- (7) und Gangzelle (11), eine apikale Expression in den Darmzellen (8), eine Expression im analen Sphinkter (12), in den rektalen Drüsenzellen (10), in Pharynxepithelzellen (1), in rektalen Epithelzellen (6; roter Pfeil zeigt auf Rektum) und in einem Fortsatz eines Neurons (3). Dass es sich bei der starken SPH-1:: YFP Expression zum Darmlumen hin um die apikale Seite der Darmzellen handelt, zeigt die Kolo-kalisierung mit dem Intermediärfilament IFB-2:: CFP (E-G), einer Komponente des apikal gelegenen *terminal webs*. Dabei kolo-kalisieren auch IFB-2:: CFP Granula mit dem SPH-1:: YFP im Zytoplasma der Darmzellen anterior (13) und posterior (13). F' zeigt, dass SPH-1:: YFP apikal von IFB-2:: CFP liegt, während die lateralen Zellgrenzen frei von SPH-1:: YFP (grüner und gelber Pfeil) sind. Dort ist nur IFB-2:: CFP vorhanden (blauer Pfeil; gelber Stern = anteriorer Bulbus; grüner Stern = posteriorer Bulbus; A, A', D, F, F' und G: dorsal oben; B und E: Aufsicht = dorsal nach ventral; Maßstab: 10 μm , in F' 5 μm).

b) Synaptogyrin (P $sng-1::YFP$ und SNG-1:: YFP/CFP)

Die Synaptogyrin Transkriptions- und Translationschimären werden ausschließlich im Nervensystem synthetisiert (Abbildung 4-14 A, B, Abbildung 4-15 A). Dies konnte durch vorherige Untersuchungen mit Transkriptions- (P $sng-1::YFP$ ^{1, 136}) und Translationskonstrukten (SNG-1:: YFP ¹¹⁸) bestätigt werden. Um zu prüfen, ob Synaptogyrin in Amphid- und Phasmidneuronen exprimiert wird, wurden die Tiere mit dem lipophilen Farbstoff Dil behandelt, welcher sich in diesen Neuronen anreichert (Abbildung 4-14). Weder die Transkriptions- noch die Translationschimäre kolo-kalisiert mit den markierten Amphiden (Abbildung 4-14 A''a, B''a) und Phasmiden (Abbildung 4-14 A''p, B''p).

Die vier CEPsh-Zellen (sog. *sheath glia*), welche bipolare Arme besitzen und sowohl sensorische Neurone als auch blattartig den Nervenring umgeben^{140, 170} sind positiv für die P $sng-1::YFP$ (Abbildung 4-14 Aa CEPshD/V).

4. Ergebnisse

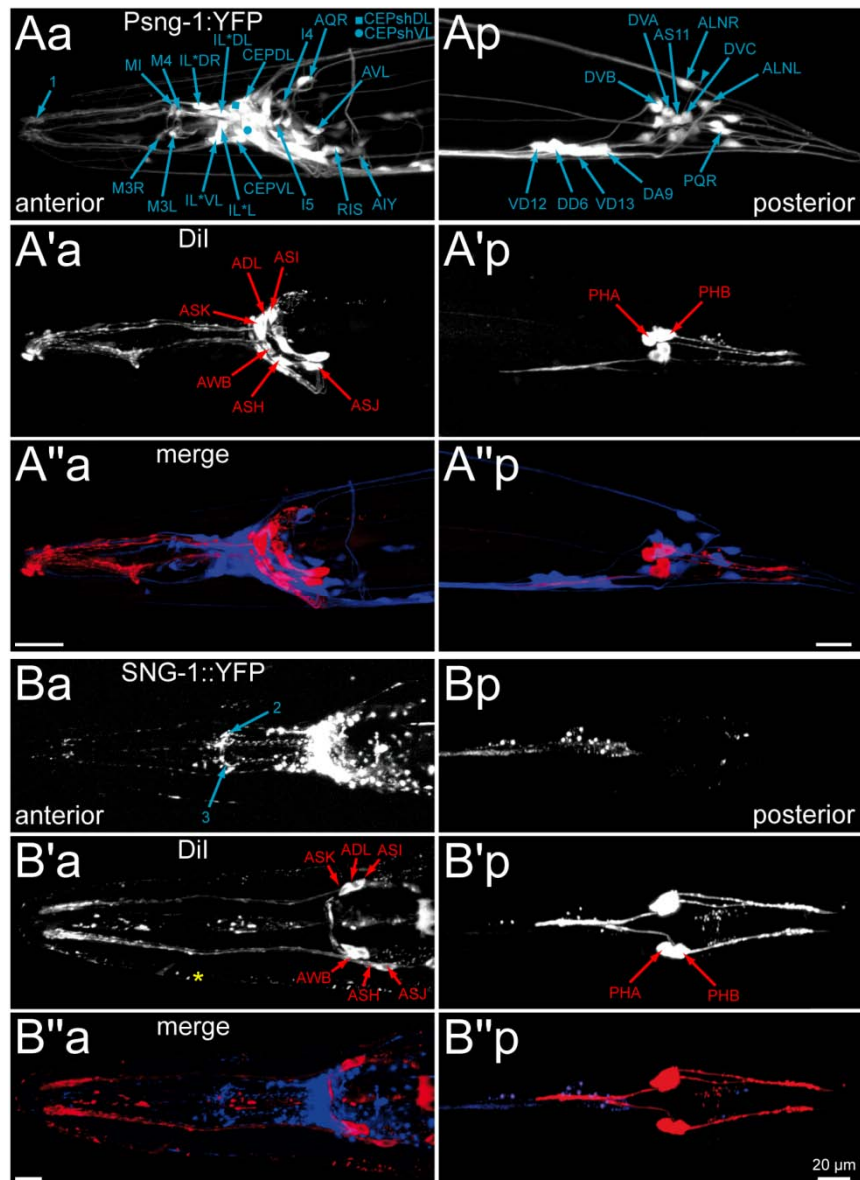


Abbildung 4-14 Synaptogyrin kolokalisiert nicht mit Dil in Amphiden und Phasmiden.

Die Transkriptionschimäre *Psng-1:YFP* (A) und die Translationschimäre *SNG-1::YFP* (B) werden fast ausschließlich im Nervensystem exprimiert. In Aa (Film 05, Film 07) und Ap (Film 06, Film 08) sind Neurone und deren Fortsätze markiert, während *SNG-1::YFP* ein punktiertes Muster aufweist (Ba, Bp). Dabei ist die Expression u. a. im circumpharyngealen Nervenring (Aa, Ba) und dort befindlichen Neuronen (Aa) zu finden. Lediglich einige dieser Neurone konnten an Hand der Lage bestimmt werden. Um welche IL Neurone es sich anterior handelt konnte nicht ermittelt werden, aus diesem Grund wurden diese im Namen mit einem Stern versehen. Auch posterior sind nicht alle Neurone für *Psng-1:YFP* positiv (Ap). Einige Neurone, die *Psng-1:YFP* exprimieren sind in A durch Pfeile markiert (Pfeilkopf markiert DA9 Axon). In Ba sind die Fortsätze der Neurone MI, M4 und M3R/L (Ba 2,3) zu erkennen. Neben den CEP-Neuronen (Aa) sind auch die gliaähnlichen Zellen CEPshD/V (Aa, 1) für *Psng-1:YFP* positiv (Maßstab 10 µm).

Um herauszufinden, ob Synaptogyrin in allen GABAergen Neuronen zu finden ist, wurden Männchen (BJ31), die *Psng-1:cfp* tragen, mit Hermaphroditen (EG1285¹³⁹), die das Promoterkonstrukt *Punc-47:GFP* exprimieren, verpaart. Die anschließende fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der Nachkommen zeigt eine Lokalisierung von *SNG-1::YFP* in allen GABAergen Neuronen (Abbildung 4-15).

4. Ergebnisse

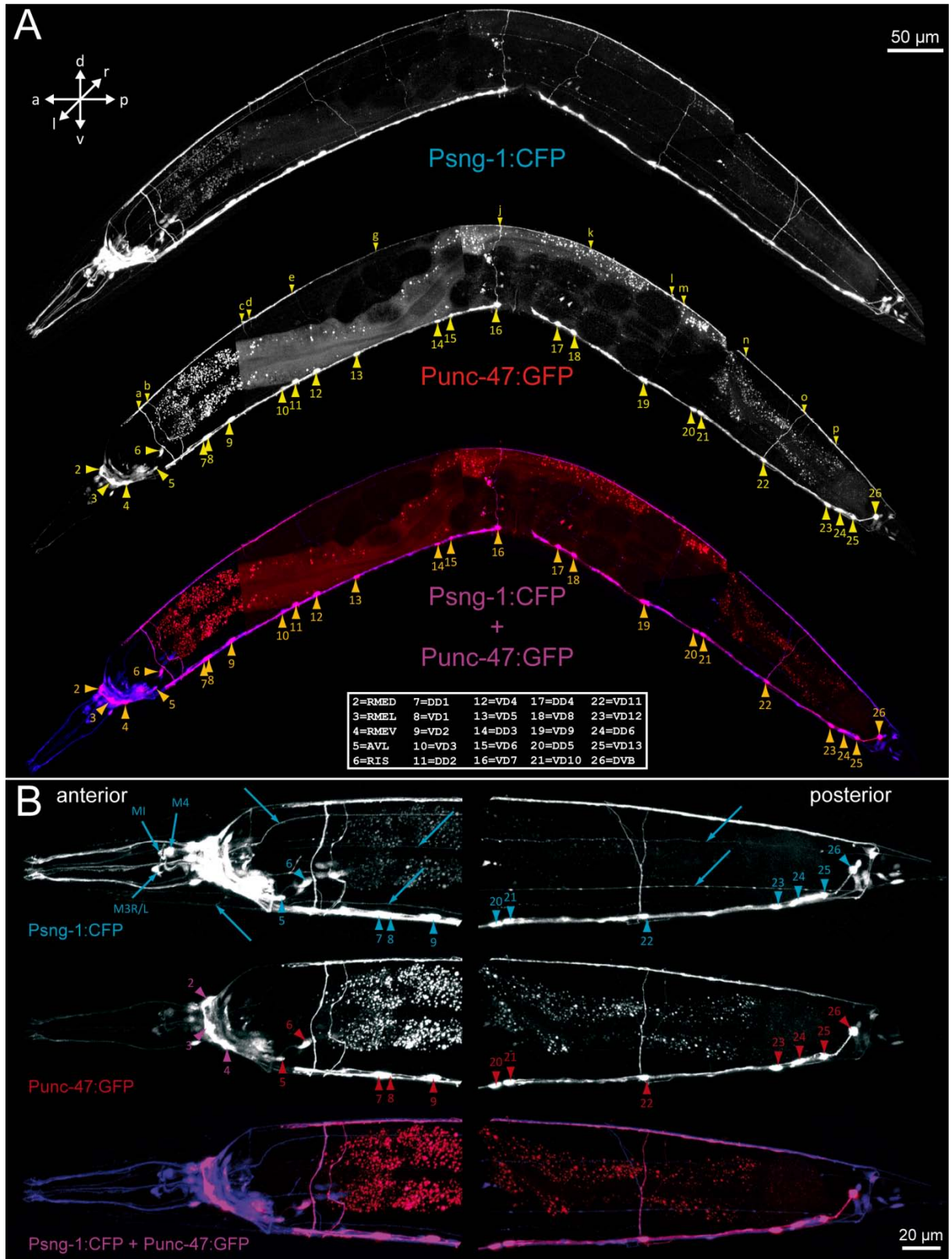


Abbildung 4-15 Synaptogyrinexpression im gesamten GABAergen Nervensystem.

Psng-1:CFP wird im gesamten GABAergen Nervensystem, in dem auch der vesikuläre GABA-Transporter UNC-47 vorhanden ist, exprimiert. Dadurch kommt es zu einer Kolokalisierung (lila, orange Pfeilköpfe) aller GABAergen Neurone (A Punc-47:GFP, rot, gelbe Pfeilköpfe) mit den GABAergen Neuronen, die Synaptogyrin enthalten (A Psng-1:CFP, blau, gelbe Pfeilköpfe). Nicht GABAerge Neurone wie MI, M4 und M3R/L sowie laterale Prozesse sind mit Pfeilen markiert (B). Aufgrund der fluoreszenzmikroskopischen Einstellungen und der Lage des Tieres konnten drei Kommissuren und das GABAerge Neuron RMER nicht detektiert werden (siehe Film 09, Film 10).

c) SCAMP (Pscm-1:YFP und SCM-1::YFP)

Um die Expression von SCAMP in *C. elegans* zu untersuchen, wurde zunächst die Transkriptionschimäre Pscm-1:YFP im adulten Tier analysiert (Abbildung 4-16 A). Pscm-1:YFP konnte in anterioren (7, 21, 22, 25, 26) und posterioren Neuronen (12-18), in gliaähnlichen Zellen (3, 23), im ventralen Nervenstrang (20), in den Vulvaepithelzellen (19), in der longitudinalen Muskulatur (9), in den Coelomozyten (10), im Darm (6, 11), im posterioren Bulbus des Pharynx (5) und der Spermatheka (8) detektiert werden. Um zu untersuchen, ob die Expression in der Spermatheka von den darin befindlichen Spermien stammt, wurde das larvale Stadium L4 untersucht (Abbildung 4-16 B). Dort konnte eine sehr schwache Expression in der Spermatheka detektiert werden (8), was darauf hinweist, dass die Expression von Pscm-1:YFP (8) von den Spermathekazellen stammt und nicht von den Spermien, da die Spermien im L4-Stadium schon vorhanden sind bzw. sich noch entwickeln⁶. Um zu analysieren, ob Pscm-1:YFP auch in Amphid- und Phasmidneuronen exprimiert wird, wurden diese mit dem Farbstoff Dil markiert. Zwei Amphide (AWBL/R) kolokalisieren mit Dil, die Pscm-1:YFP exprimieren (Abbildung 4-16 C anterior). Während in sieben weiteren Amphidneuronen, die nicht von dem Farbstoff angefärbt wurden (eines auf der rechten und 6 auf der linken Seite), Pscm-1:YFP exprimiert wird. In den Phasmiden (PHA und PHB) kommt es hingegen zu keiner Kolokalisierung mit dem Farbstoff (Abbildung 4-16 D posterior).

4. Ergebnisse

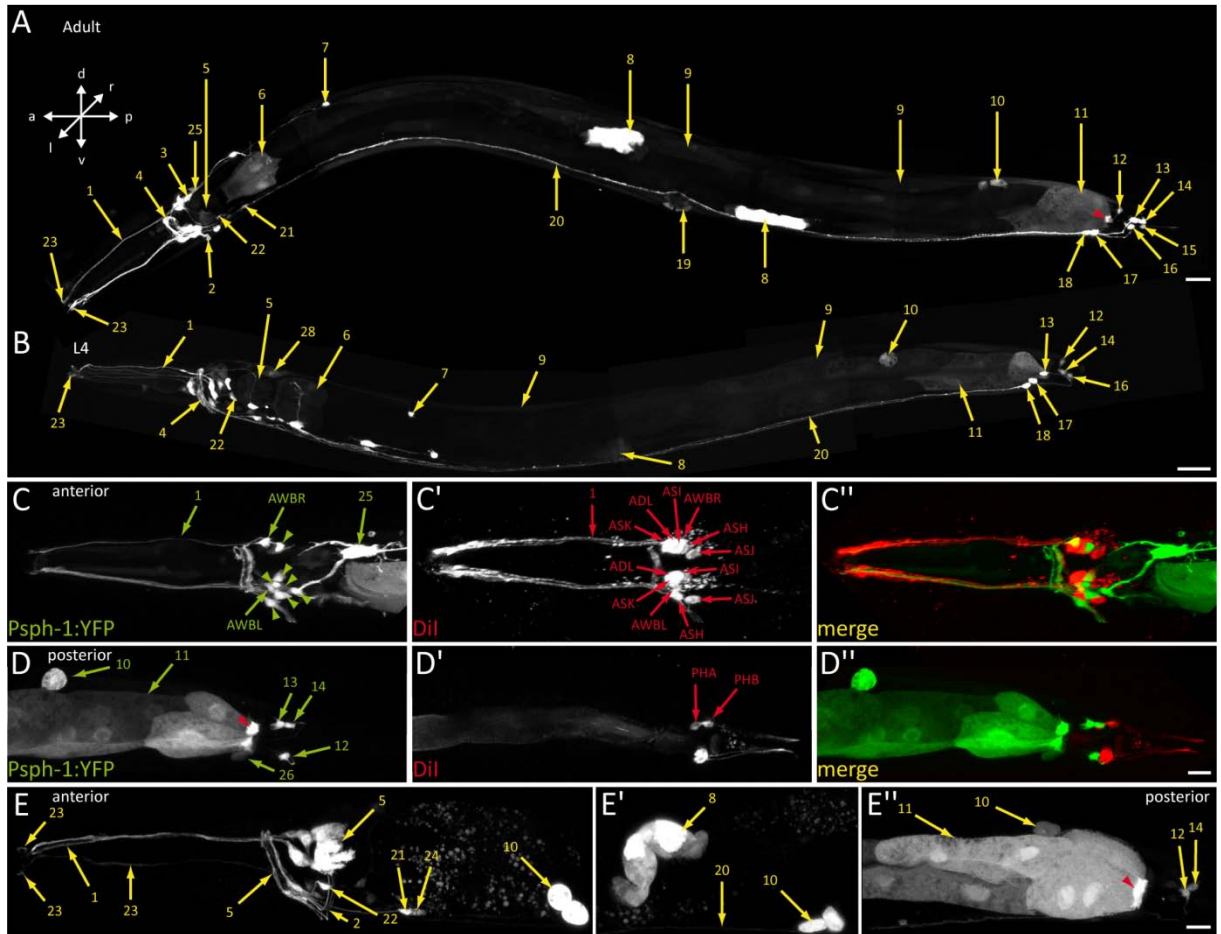
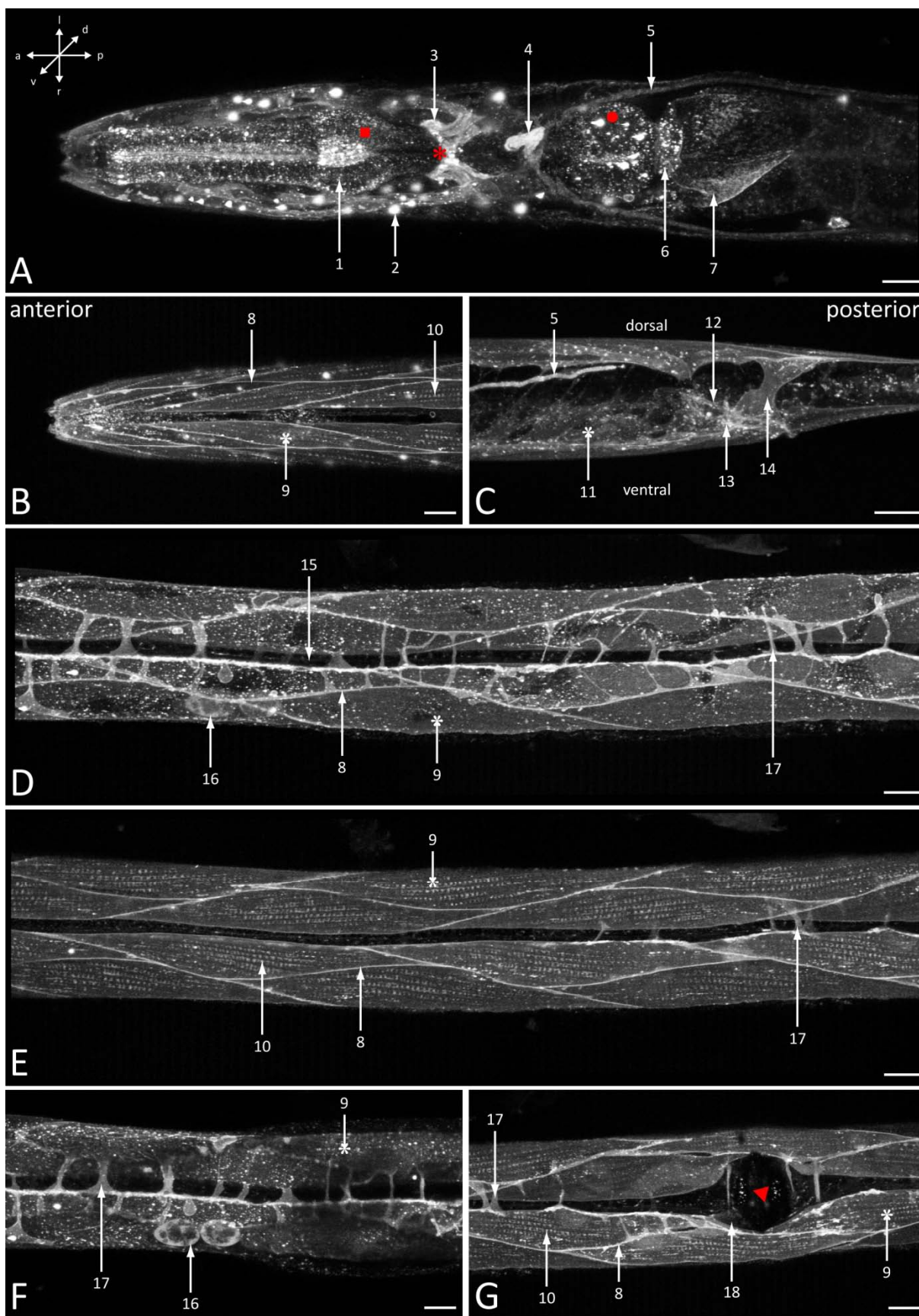


Abbildung 4-16 Verteilung von Pscm-1:YFP in unterschiedlichen Zellen.

Pscm-1:YFP ist in *C. elegans* sowohl neuronal (anterior und posterior) als auch nicht neuronal lokalisiert. Pscm-1:YFP ist im Nervenring (4), im ventralen Nervenstrang (20), in Neuronen (u. a. SDQR 7, DVB 12, DVA 13, DVC 14, PQR 15, LUA 16, VD13 17, DD6 18, DD1 21, AVL 22 und VD1 24), in gliaähnlichen Zellen (AMsh 3, AMshL/R 23), im posterioren Bulbus des Pharynx (5), in Coelomozyten (10), im Darm (6 u. a. int1DR/L+VR/L, 11 u. a. int9R/L), in den rektalen Drüsenzellen (26), in Muskelzellen (9), in den Vulvaepithelzellen (19), in der Spermatheka (8), in einer mesodermalen Zelle (25), in Amphidneuronen (C'' AWBR/L, Pfeile = unbekannte Amphide – 6 auf der linken und 1 auf der rechten Seite, Film 11), deren Fortsätzen (1) und deren Kommissuren (2) zu finden. Außerdem ist es im linken AIAL Neuron und dessen Fortsatz zu finden (nicht eingezeichnet, siehe Film 11). Dagegen ist es nicht in den Phasmiden lokalisiert (PHA, PHB posterior; D', D''); Maßstab A, B: 20 µm und C-E: 10 µm; C: Aufsicht von dorsal nach ventral, D-E: dorsal oben).

Um zu analysieren, ob SCM-1::YFP eine ähnliche Verteilung wie Pscm-1:YFP in *C. elegans* aufweist, wurden die mit SCM-1::YFP mikroinjizierten Tiere fluoreszenzmikroskopisch untersucht (Abbildung 4-17). SCM-1::YFP ist u. a. in der gesamten analogen gestreiften Muskulatur (2, 9), in den Muskelarmen (3, 17), in der analogen glatten Muskulatur (intestinale Muskulatur 11, analer Sphinkter 13, analer Depressor 14), im Pharynx (1), in der intestinalen Übergangsröhre (6), im gesamten Darm (7), in der exkretorischen Kanal- (5) und Gangzelle (4) und in den Coelomozyten (16) lokalisiert. Sehr schwach ist SCM-1::YFP im ventralen Nervenstrang (15) und in der Vulvamuskulatur (18) exprimiert. Im Darm ist SCM-1::YFP ebenso wie SPH-1::YFP auf der apikalen Seite lokalisiert (7, Abbildung 4-17 Details siehe Bildlegende).

4. Ergebnisse



4. Ergebnisse

Abbildung 4-17 Subzelluläres Verteilungsmuster der SCM-1::YFP Expression in *C. elegans*.

SCM-1::YFP ist in *C. elegans* in der gesamten analogen gestreiften Muskulatur (longitudinalen anterioren Kopfmuskulatur 9, longitudinalen Körpermuskulatur 9, im Bereich der *dense bodies* 10, Sarkolemma 8, Muskellarmen 3, 17) und glatten Muskulatur (posterior: intestinalen Muskulatur 11, analer Sphinkter 13, analer Depressor 14), im Pharynx (1), in der intestinalen Übergangsröhre (6), im Rektum (12), im Vulvaepithel (18), in der exkretorischen Kanal- (5) und Gangzelle (4), im ventralen Nervenstrang (15) und in Coelomozyten (16) zu finden (Stern = Nervenring, Quadrat = vorderer Bulbus, Kreis = hinterer Bulbus und Dreieck = Vulva, Maßstab 10 µm).

4.4.2 Verteilung der TVPs in verschiedenen embryonalen Entwicklungsstadien von *C. elegans*

Um zu prüfen, ob die Transkriptions- und Translationschimären auch in frühen embryonalen Entwicklungsstadien von *C. elegans* zu finden sind, wurden die embryonalen Stadien Gastrula, Komma (Neurula) und 1,5- bis 3,0-fach mikroskopisch untersucht (Abbildung 4-18, Abbildung 4-19).

a) Verteilung der Transkriptionschimären

Psph-1:YFP (Psph-1_{lang}:YFP) wird ab dem Gastrula-Stadium in den sich entwickelnden pharyngealen Muskelzellen exprimiert (Abbildung 4-18). Vom Komma-Stadium an ist eine posteriore Expression in der Nähe des Rektums zu finden. Im 1,5- und 2,0-fach Stadium ist die intestinale Übergangsröhre und im 2,0-fach ebenso die anterioren Epithelzellen positiv für Psph-1:YFP. Im 3,0-fach Stadium ist es in den longitudinalen Körperwandmuskelzellen einer Seite vorhanden.

Dagegen weist Psng-1:YFP offensichtlich eine rein neuronale Synthese auf (Abbildung 4-18). Das erste Signal ist im Komma-Stadium posterior in vier Zellen zu finden. Während im 1,5-fach Stadium eine anteriore Markierung von Zellen hinzukommt, wandern die vier posterioren Zellen paarweise auseinander. Im Stadium 2,0-fach verschwindet die posteriore Fluoreszenz und anterior sind um den späteren pharyngealen Nervenring mehr Zellen positiv für Psng-1:YFP. Auch sind erste Fortsätze zu erkennen. Im Stadium 3,0-fach sind Nervenzellen, Kommissuren, der ventrale und dorsale Nervenstrang positiv für die Transkriptionschimäre.

Pscm-1:YFP weist neben einer neuronalen eine starke Expression in Zellen auf, aus denen die späteren Darmzellen hervorgehen (Abbildung 4-18). Im Gastrula-Stadium sind zunächst Darmvorläuferzellen positiv. Im Komma taucht eine Zelle auf, aus der ein Neuron mit einem Ausläufer nach anterior hervorgeht. Weitere nicht eindeutig identifizierbare anteriore Zellen sind im Komma- und 1,5-fach Stadium positiv, deren Fluoreszenz aber im 2,0-fach-Stadium wieder verschwindet. Im 2,0-fach Stadium zeigen die beiden Coelomozytenvorläufer eine starke Pscm-1:YFP Expression. Im 3,0-fach Stadium sind neben Neuronen der ventrale und dorsale Nervenstrang und auch die longitudinalen Körperwandmuskelzellen positiv.

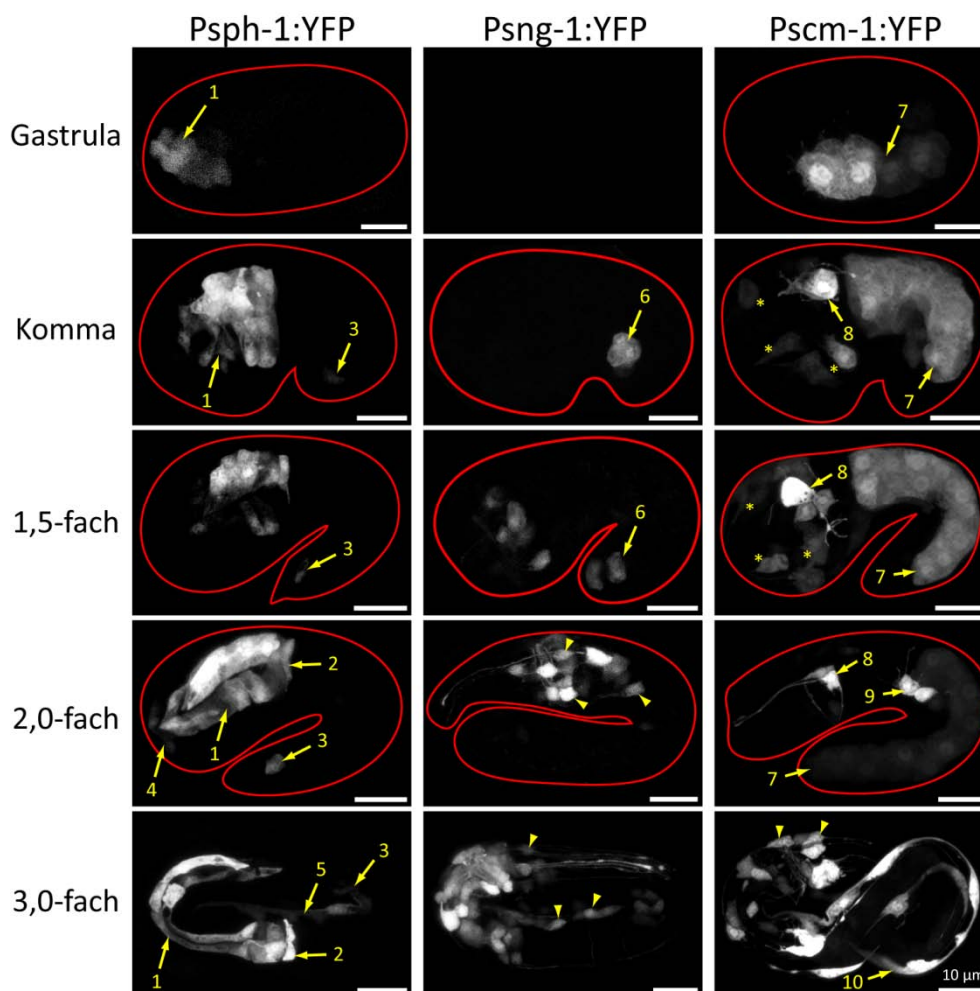


Abbildung 4-18 Verteilungsmuster der TVP-Transkriptionschimären in verschiedenen Entwicklungsstadien.

Expressionsmuster der Transkriptionschimären Psph-1:YFP, Psng-1:YFP und Pscm-1:YFP in verschiedenen embryonalen Stadien (Gastrula-, Komma-, 1,5-; 2,0- und 3,0-fach Stadium). Psph-1:YFP wird durchgehend von der Gastrula- bis zum 3,0-fach Stadium in der sich entwickelnden Pharynxmuskulatur (1) und vom Komma-Stadium an posterior in der Nähe des Rektums (3) synthetisiert. In späteren Stadien (2,0- und 3,0-fach) ist es auch in der intestinalen Übergangsröhre (2) lokalisiert. Im 2,0-fach Stadium sind die anterioren Epithelzellen (4) positiv. Außerdem wird es im 3,0-fach Stadium in der ventralen Muskulatur (5) produziert. Psng-1:YFP Expression ist mit der neuronalen Entwicklung assoziiert. Die ersten Signale sind im Komma-Stadium posterior in vier Zellen (6) vorhanden, die auch im 1,5-fach Stadium zu finden sind (6). Im 1,5-fach Stadium sind anterior Zellen für Psng-1:YFP positiv, aus denen Nervenzellen hervorgehen. Im 2,0- und 3,0-fach Stadium sind die Nervenzellen (gelbe Pfeilköpfe) gut zu erkennen. Pscm-1:YFP wird in den zukünftigen Darmzellen (7) über die Zeit abnehmend exprimiert. Früh (ab dem Komma Stadium) ist es in Neuronen exprimiert, aus denen die Amphidneurone (8) hervorgehen. Im Komma- und 1,5-fach Stadium sind transient anteriore Zellen positiv für Pscm-1:YFP (gelbe Sterne). Das 2,0-fach Stadium weist auch eine starke Fluoreszenz für die beiden Vorläuferzellen der Coelomozyten auf (9). Im 3,0-fach Stadium sind neben neuronalen und intestinalen Zellen auch die longitudinalen Muskelzellen für Pscm-1:YFP stark positiv (10). Rote Linien markieren die Embryogrenzen, die aus dem dazugehörigen Phasenbild entnommen wurden (nicht gezeigt). Anterior links und dorsal oben.

b) Verteilung der Translationschimären

Die Translationschimären zeigen ein punktiertes Verteilungsmuster, was auf vesikuläre Strukturen hinweist (Abbildung 4-19). Sph-1::YFP wird vom Gastrula-Stadium an im zukünftigen Pharynx und Darm exprimiert. Dabei kommt es im 2,0-fach Stadium zu einer apikal polarisierten Expression

4. Ergebnisse

sowohl im Pharynx als auch im Darm.

SNG-1::YFP weist eine rein neuronale Verteilung auf (3,0-fach). Dabei wird es transient posterior im Komma-Stadium exprimiert. Im 1,5-fach Stadium ist es anterior in Neuronen lokalisiert.

SCM-1::YFP ist von der Gastrula an in nahezu allen Zellen lokalisiert. Dabei ist vom Komma-Stadium an eine polarisierte Expression im Pharynx vorhanden. Im 3,0-fach Stadium kommt eine apikal polarisierte Expression zum Darmlumen hin. Interessanterweise weisen sowohl SPH-1::YFP als auch SCM-1::YFP eine Expression im Pharynx und im Darm auf.

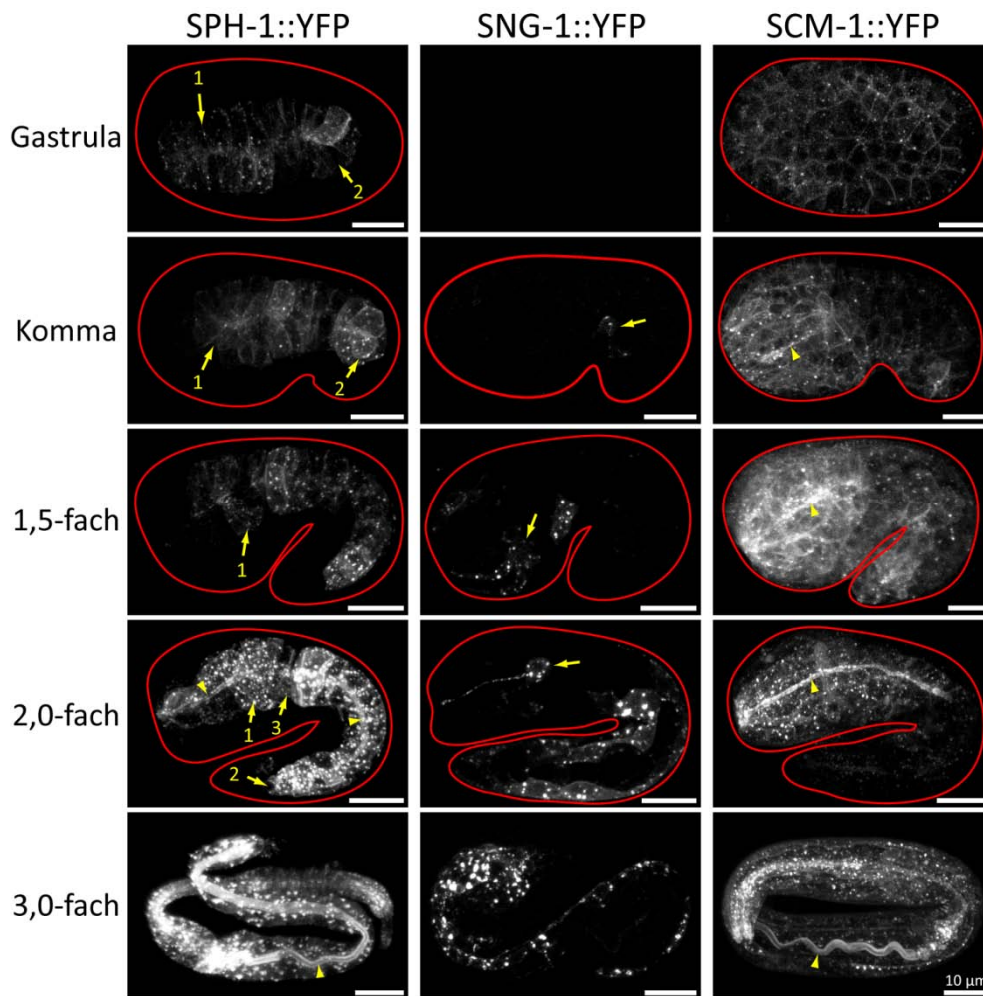


Abbildung 4-19 Verteilungsmuster der TVP-Translationschimären in verschiedenen Entwicklungsstadien.

Die Translationschimären SPH-1::YFP und SCM-1::YFP werden überwiegend im zukünftigen Pharynx und im Darm exprimiert, während SNG-1::YFP eine neuronale Verteilung aufweist. SPH-1::YFP ist dabei vom Gastrula Stadium an in einem punktierten vesikulären Muster im Pharynx (1) und Darm (2) zu finden. Ab dem 2,0-fach Stadium zeigt SPH-1::YFP eine polarisierte apikal Lokalisation (gelbe Pfeilköpfe) im Pharynx (1), intestinalen Übergangsröhre (3) und Darm (2). SNG-1::YFP wird zunächst transient posterior im Komma-Stadium (gelber Pfeil), dann ab dem 1,5-fach Stadium anterior in Neuronen (gelber Pfeil) exprimiert. Im 3,0-fach Stadium ist die neuronale Verteilung gut zu erkennen. SCM-1::YFP wird von dem Gastrula-Stadium aufwärts in allen Zellen exprimiert. Ab dem 1,5-fach Stadium ist eine apikale Polarisierung (gelbe Pfeilköpfe) im Pharynx zu erkennen, die sich im 2,0-fach bis 3,0-fach Stadium weiter im Darm ausdehnt.

4. Ergebnisse

4.5 Expression der *C. elegans* TVPs in unterschiedlichen Geweben

Die *C. elegans* TVPs werden in unterschiedlichen und nahezu allen Geweben exprimiert. Tabelle 4-3 gibt einen Überblick über die Expressionsverteilung der drei TVPs SPH-1, SNG-1 und SCM-1. Dabei ist das Verteilungsmuster überlappend und in einigen Zellen kommen zum Teil zwei TVPs gleichzeitig vor. Beispiele dafür sind die Coelomozyten, in denen SCM-1 und SPH-1, und die GABAergen Neurone AVL, DD1, VD1, DD6, VD13 und DVB, in denen neben SCM-1 auch SNG-1 vorkommt.

Tabelle 4-3 Verteilung der Transkriptions- und Translationschimären in *C. elegans*.

Struktur	Synaptophysin		Synaptogyrin	SCAMP
	Psph-1 _{kurz} :YFP	Psph-1 _{lang} :YFP	Psng-1:YFP/CFP	Pscm-1:YFP
pharyngeale Epithelzellen	-	+++	-	-
Pharynx	+++ ¹	+++	-	++ bis +++ ¹
intestinale Übergangsröhre	+++ ¹	+++	-	-
Darm	-	++	-	++
rektale Übergangsröhre	+++	+++	-	-
intestinale Muskulatur	-	-	-	-
analer Sphinkter	-	+++	-	-
rektale Drüsenzellen	+++	+++	-	-
rektale Epithelzellen	-	-	-	-
analer Depressor	-	-	-	-
Rektum	-	-	-	-
exkretorische Zellen	-	-	-	-
Spermatheka	-	-	-	+++ ¹
Muskulatur	-	+*	-	+
Coelomozyten	-	+	-	+++ ¹
Nervensystem	-	++	+++ ^{1, 136}	+++ ¹
gliaähnliche Zellen	-	-	+++	++
Struktur	Synaptophysin SPH-1::YFP		Synaptogyrin SNG-1::YFP	SCAMP SCM-1::YFP
pharyngeale Epithelzellen	+++		-	-
Pharynx	+++		-	+++
intestinale Übergangsröhre	+++		-	+++
Darm	+++		-	+++
rektale Übergangsröhre	-		-	-
intestinale Muskulatur	-		-	+++
analer Sphinkter	++		-	+++
rektale Drüsenzellen	++		-	-
rektale Epithelzellen	++		-	-
analer Depressor	-		-	+++
Rektum	-		-	+++
exkretorische Zellen	++		-	+++
Spermatheka	-		-	-
Muskulatur	-		-	+++
Coelomozyten	+		-	+++
Nervensystem	+		+++ ^{118, 182}	+
gliaähnliche Zellen	-		**	-

+++ starke Expression, ++ normale Expression, + schwache Expression, - Keine Expression.

* Im 3,0-fach Stadium.

** Aufgrund des Fluoreszenzmusters ist eine Zellbestimmung nicht möglich.

4.6 Die *C. elegans* TVP-Mutanten

4.6.1 Isolierung der TVP-Mutanten

Um die Funktion der TVPs Synaptophysin (*sph-1*), Synaptogyrin (*sng-1*) und SCAMP (*scm-1*) in *C. elegans* zu analysieren, wurden TVP-Mutanten verwendet, die entweder vom CGC bezogen wurden bzw. aus vorangegangenen Projekten zur Verfügung standen.

Aus Vorarbeiten von Prof. Dr. Rudolf Leube sind für *sph-1* zwei mutierte Allele isoliert worden, *ox277* und *ox278*. Das Allel *ox277* hat eine 347 bp Deletion (Position 16.805-17.151 auf AF038618), welche einen Großteil des dritten Exons (E3) betrifft und das für zwei der vier Transmembrandomänen codiert. Außerdem fehlt ein kleiner Teil des zweiten Introns. Bei dem zweiten *sph-1* Allel *ox278* fehlen aufgrund einer 539 bp Deletion (Position 16538-17122 auf AF038618) E3 und E4, welche u. a. für drei der vier Transmembrandomänen codieren. Außerdem fehlt die gesamte dritte und ein kleiner Teil der vierten nichtcodierenden Region (Abbildung 4-20 Gen: *sph-1*, Protein: SPH-1).

Für *sng-1* wurde das mutierte Allel *ok234* (bezogen vom CGC) identifiziert, mit einer 1.702 bp großen Deletion (Position 15.736-17.437 auf U40417). Dadurch fehlen die codierenden Regionen E1-E5, die Introns 1-4 und ein Grossteil der fünften nichtcodierenden Region. Das sechste Exon (E6) bleibt erhalten (Abbildung 4-20 Gen: *sng-1*, Protein: SNG-1).

Für *scm-1* wurde das mutierte Allel *hd30* von Prof. Dr. Harald Hutter isoliert und zur Verfügung gestellt. Dieses Allel beinhaltet eine 1.729 bp Deletion (Position 28.591-30.679 auf AF003739), die Teile von Intron 3, 4 und die gesamte dritte codierende Region (E3) umfasst. Das dritte Exon beinhaltet drei der vier Transmembrandomänen (Abbildung 4-20 *scm-1*, SCM-1).

Die Stämme der Deletionsdatenbank wurden 4- bis 10-mal mit dem Wildtyp (N2 und BJ20, Tabelle 7-2, Tabelle 7-3) zurückgekreuzt, so dass weitere Mutationen im Genom ausgeschlossen werden konnten. Die daraus resultierenden Stämme sind für *ox277* EG2961, für *ox278* EG2948 und BJ16, für *hd30* EG2947 und BJ15, für *ok234* VH619 und BJ14. In den weiteren Untersuchungen wurde für *sph-1* das Allel *ox278* verwendet. Durch Verpaarung der TVP-Einzelmutanten wurden Zweifach- (EG2956 und BJ18 [*sph-1(ox278); sng-1(ok234)*], EG2957 und BJ30 [*sph-1(ox278); scm-1(hd30)*] und EG2952 und BJ19 [*sng-1(ok234); scm-1(hd30)*]) und Dreifachmutanten (EG2959, EG2960 und BJ21 [*sph-1(ox278); sng-1(ok234); scm-1(hd30)*]) generiert (Tabelle 7-2, Tabelle 7-3).

4. Ergebnisse

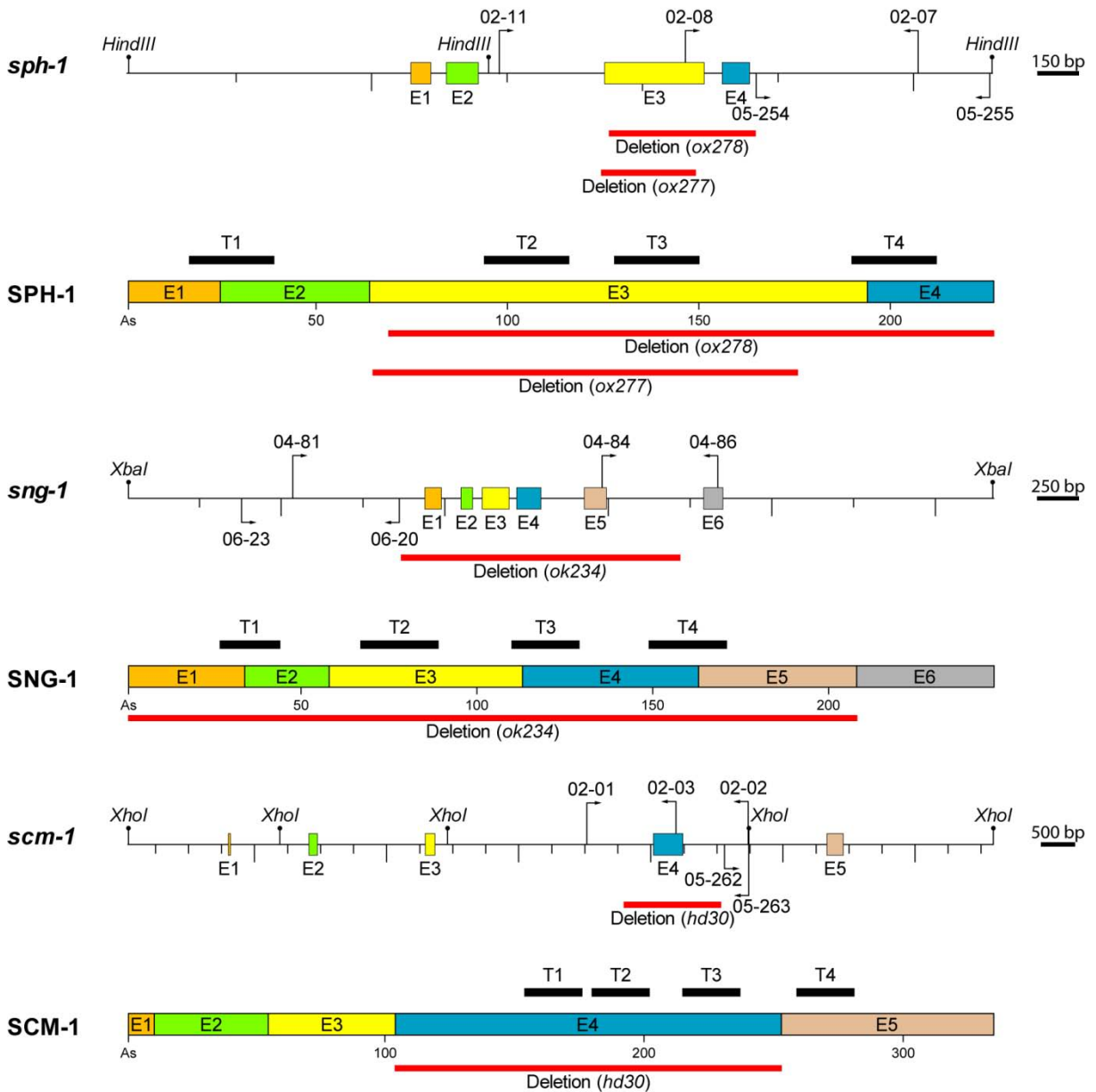


Abbildung 4-20 Schematische Gen- und Proteinstruktur der *C. elegans* TVPs.

Gen- (*sph-1*, *sng-1* und *scm-1*) und Proteinstruktur (SPH-1, SNG-1 und SCM-1) der TVPs in *C. elegans* (Gen- und Proteindatenbanknummern 4.6.1 und Tabelle 7-4). Die korrigierten Sequenzdaten für Synaptophysin (*sph-1* und SPH-1) sind miteinbezogen (Abbildung 4-2). Exone (E) sind in unterschiedlichen Farben dargestellt. Die Positionen der Amplimere für die PCR-Analyse (02-07, 02-08, 02-11 und 04-81, 04-84, 04-86 und 02-01, 02-02, 02-03) und Southern-Blot Sonden (05-254, 05-255 und 06-20, 06-23 und 05-262, 05-263) sowie die Schnittstellen der verwendeten Restriktionsenzyme (*HindIII*, *XbaI* und *XhoI*) für den Southern-Blot sind eingetragen. Die Deletionen der jeweiligen Allele sind durch rote Balken gekennzeichnet. So sind Allele für das Gen *sph-1* *ox277* und *ox278*, für *sng-1* *ok234* und für *scm-1* *hd30*. In der Proteinsequenz (As) wurde ebenso der jeweilige Bereich mit einem roten Balken markiert, der in dem mutierten Allel der Deletion entspricht. Die schwarzen Balken markieren die Positionen der Transmembrandomänen (T1-T4).

4.6.2 Charakterisierung der TVP-Mutanten durch PCR-Analyse

Um die TVP-Mutanten von Wildtyp- bzw. heterozygoten Tieren zu unterscheiden, wurde der Genotyp der Tiere mittels Duplex-PCR untersucht, wobei die Oligomere so gewählt wurden, dass eines der Amplimere im Bereich der Deletion des jeweiligen Allels lag.

4. Ergebnisse

Durch Verwendung der drei Oligomere 02-07, 02-08 und 02-11, wurde ein 860 bp großer Abschnitt des Wildtypallels *sph-1* und ein 1.011 bp großer Abschnitt des Allels *sph-1(ox278)* amplifiziert (Abbildung 4-21 *sph-1*). Unter Verwendung der Oligomere 04-81, 04-84 und 04-86 wurde ein 684 bp großer Bereich des *sng-1* Wildtypallels und ein 880 bp großer Bereich des *sng-1(ok234)* Allels amplifiziert (Abbildung 4-21 *sng-1*). Mittels der Oligomere 02-01, 02-02 und 02-03 wurde für das *scm-1* Wildtypallel ein 614 bp Produkt, für *scm-1(hd30)* Allel ein 709 bp Produkt generiert (Abbildung 4-21 *scm-1*).

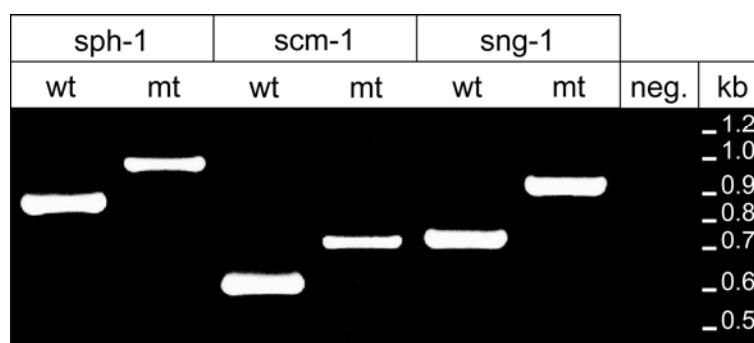


Abbildung 4-21 Duplex-PCR zum Nachweis der TVP Mutanten.

Durch Duplex-PCR wurden die TVP-Allele des Wildtyps (BJ20) und der Dreifachmutante (BJ21) amplifiziert. Die auf einem Agarosegel nach Größe aufgetrennten und mit Ethidiumbromid gefärbten Produkte wurden dokumentiert. Dabei wurde jeweils eine Bande für die Wildtypallele (wt) *sph-1* bei 860 bp, *sng-1* bei 684 bp und *scm-1* bei 614 bp und für die Allele der Dreifachmutante (mt) *ox278* eine 1.011 bp, *ok234* eine 880 bp und *hd30* eine 709 bp Bande an Hand des verwendeten Größenmarkers (kb) detektiert.

4.6.3 Charakterisierung der TVP-Mutanten mit Hilfe der Southern-Blot Methode

Um die TVP-Gene des Wildtyps (BJ20) und der TVP-Dreifachmutante (BJ21) umfassend zu charakterisieren und Duplikationen im Genom auszuschließen, wurden Southern-Blot-Hybridisierungsexperimente durchgeführt. Zunächst wurden Amplimere in Bereichen vor der Deletion der mutierten Allele der *C. elegans* TVPs mit dem Programm Clonemanager ausgewählt. Mit diesen Amplimeren wurden die Sonden an den entsprechenden Cosmiden (Tabelle 3-5) durch PCR generiert. Für *sph-1* wurde mit den Amplimeren 05-254 und 05-255 eine 862 bp Sonde vom Cosmid F42G8, für *sng-1* mit den Amplimeren 06-20 und 06-23 eine 1.015 bp Sonde vom Cosmid T08A9 und für *scm-1* mit den Amplimeren 05-262 und 05-263 eine 366 bp Sonde vom Cosmid M01D7 generiert. Anschließend wurde die genomische DNA vom Wildtyp und der TVP-Dreifachmutante mit den Restriktionsenzymen *HindIII* für die *sph-1* Sonde, *XbaI* für die *sng-1* Sonde und *XhoI* für die *scm-1* Sonde behandelt, gelelektrophoretisch getrennt und auf eine Membran transferiert, die mit den entsprechenden radioaktiv markierten Sonden inkubiert wurde. Die hybridisierende Radioaktivität wurde mit einer Phosphoimagerplatte dokumentiert.

Dabei wurde eine Wildtypbande (wt) für *sph-1* von 1.857 bp, für *sng-1* von 5.283 bp und für *scm-1* von 4.561 bp und für die Allele der TVP-Dreifachmutante (mt) eine Bande von 875 bp für *ox278*, von

4. Ergebnisse

3.582 bp für *ok234* und für *hd30* in einer Größe von 2.832 bp nachgewiesen (Abbildung 4-22). Durch die Deletion in *ox278* entsteht eine zusätzliche *HindIII* Restriktionsschnittstelle.

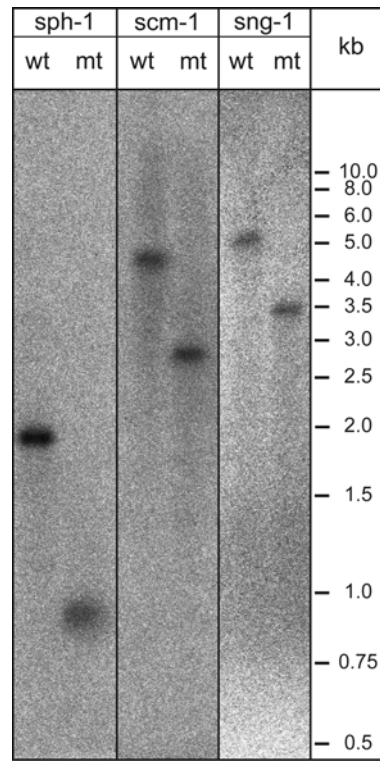


Abbildung 4-22 Southern-Blot Analyse der *C. elegans* TVPs¹.

Southern-Blot Analyse zur Charakterisierung der TVP Loci des Wildtyps (wt) und der TVP-Dreifachmutante (mt). Die genomische DNA wurde mit *HindIII* für den Synaptophysin (*sph-1*), mit *XbaI* für den Synaptogyrin (*sng-1*) und mit *XhoI* für den SCAMP (*scm-1*) Locus geschnitten und geblottet. Mit Hilfe der entsprechenden radioaktiv markierten Sonden wurden für *sph-1* eine 1.857 bp, für *ox278* eine 875 bp, für *sng-1* eine 5.283 bp, für *ok234* eine 3.582 bp, für *scm-1* eine 4.561 bp und für *hd30* eine 2.832 bp Bande detektiert. Durch die Deletion in *ox278* ist eine zusätzliche *HindIII* Restriktionsschnittstelle entstanden. Die verwendeten Markergrößen sind rechts in Kilobasen (kb) eingezeichnet.

4.7 Verhaltensstudien an der TVP-Dreifachmutante

Um die Rolle der TVPs in *C. elegans* zu studieren, wurde zunächst das Verhalten der TVP-Dreifachmutante untersucht.

4.7.1 Lokomotion

Um zu untersuchen, ob die TVP-Dreifachmutanten (EG2959, EG2960) einen motorischen Defekt aufweisen, wurde die sinusförmige Bewegung beobachtet und mit der des Wildtyps verglichen. Dabei konnte kein signifikanter Unterschied im Bewegungsverhalten (Wellenberge pro Minute) der Dreifachmutante im Vergleich mit dem Wildtyp festgestellt werden (Abbildung 4-23).

Da die Interaktion von Synaptophysin mit Cholesterin wichtig für die Vesikelbiogenese ist¹⁵⁹, wurde das Bewegungsmuster auch unter cholesterinfreien Bedingungen untersucht (Abbildung 4-23). Auch

hier konnte kein Unterschied festgestellt werden.

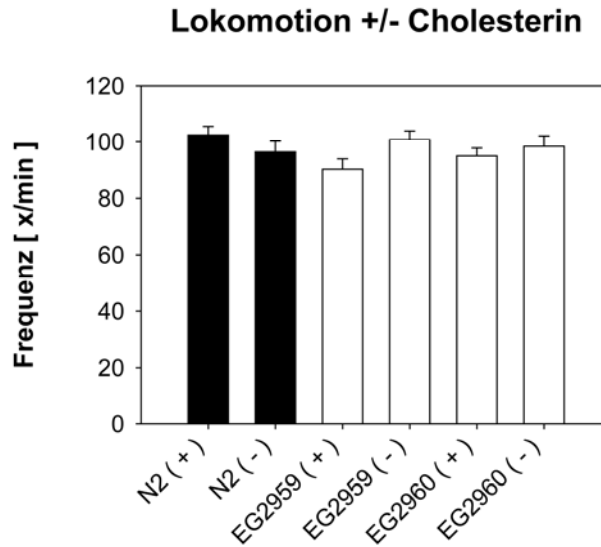


Abbildung 4-23 Lokomotion der TVP-Dreifachmutante und des Wildtyps unter cholesterinhaltigen (+) und cholesterinfreien (-) Bedingungen.

Sowohl unter normalen als auch unter cholesterinfreien Bedingungen konnte kein Unterschied der TVP-Dreifachmutanten (EG2959, EG2960) im Vergleich mit dem Wildtyp (N2) im Bewegungsmuster festgestellt werden ($n = n_t = 10$).

4.7.2 Mechanozeption

Um zu analysieren, ob die TVP-Dreifachmutante äußere mechanische Reize wahrnehmen kann, wurde der Berührungstest durchgeführt. Dabei erfolgt die Reizwahrnehmung über die Mechanorezeptoren in den modifizierten Neuronfortsätzen, die die Reizinformation an andere Neurone weiterleiten, die wiederum die entsprechende Reaktion auslösen. In allen Fällen reagierten die TVP-Dreifachmutanten (EG2959, EG2960, BJ21) gleich wie der Wildtyp (N2, BJ20) mit einer Rückwärts- bzw. Vorwärtsbewegung bei einer Berührung anterior bzw. posterior.

4.7.3 Pharyngeale Pumpbewegung

Durch pharyngeale Pumpbewegungen gelangen Bakterien, ausgelöst durch eine Kontraktion der Muskulatur des Corpus und des posterioren Bulbus, in den Pharynx. Durch die peristaltische Bewegung des Isthmus wird diese schließlich an den posterioren Bulbus weitergeleitet und dort mit Hilfe des *grinder* zermahlen. Dabei wird die Nahrung an die intestinale Übergangsröhre weitergegeben⁷⁰. Die Muskelkontraktionen des Pharynx entstehen durch Aktionspotentiale innerhalb der Muskelzellen, die über *gap junctions* synchronisiert werden^{8, 148, 149}. Lediglich die Geschwindigkeit der Kontraktionen wird durch Motoneurone moduliert, u. a. durch das cholinerge Motoneuron (MC).

Um mögliche Unterschiede in den rhythmischen Pharynxmuskulaturkontraktionen zu detektieren,

4. Ergebnisse

wurden die Pumpbewegungen im Wildtyp (N2; BJ20: $152,8 \pm 3,5$) und in den TVP-Dreifachmutanten (EG2959, EG2960; BJ21: $156 \pm 2,5$ / $P = 0,456$) pro Minute bestimmt (Abbildung 4-24). Auch hier konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

4.7.4 Defäkationszyklus

Unter Normalbedingungen verläuft die Defäkation bei *C. elegans* rhythmisch alle 45 ± 3 sec^{70, 101}. Zunächst erfolgt eine Kontraktion der posterioren Muskulatur (pBoc), danach eine Kontraktion der anterioren Muskulatur (aBoc). Durch anschließende Kontraktion der zwei intestinalen Muskeln, des analen Sphinkter- und des analen Depressormuskels wird die verdaute Nahrung freigesetzt (Emc). Die Kontraktion der Darmmuskulatur wird durch exzitatorische GABAerge Motoneurone (AVL, DVB) kontrolliert.

Um die neuronale Innervation der Darmmuskulatur in der TVP-Dreifachmutante (EG2959) zu untersuchen, wurden die Zeiten zwischen jeder posterioren Kontraktion sowohl von der Dreifachmutante als auch vom Wildtyp (N2) gemessen. Der Vergleich der ermittelten Daten zeigt, dass hier kein signifikanter Unterschied vorliegt ($P = 0,134$, Abbildung 4-24).

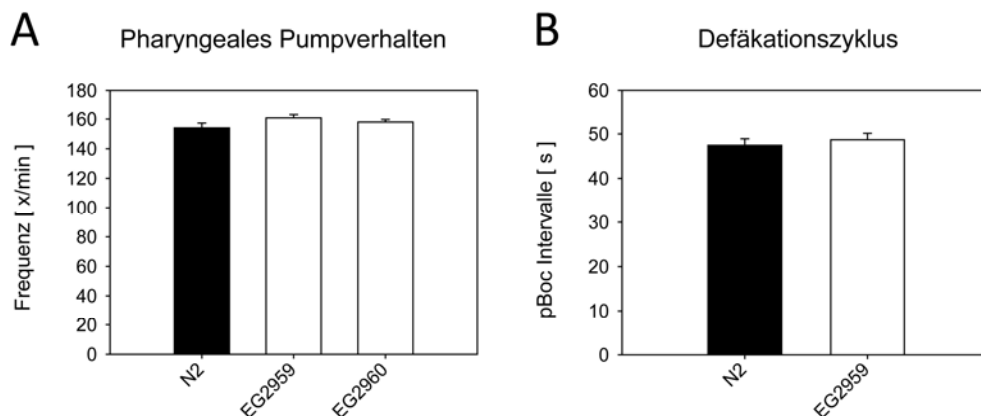


Abbildung 4-24 Pharyngeales Pumpverhalten und Defäkation der TVP-Dreifachmutante und des Wildtyps.

Die TVP-Dreifachmutante (EG2959, EG2960) weist sowohl einen normalen rhythmischen Verlauf der pharyngealen Pumpbewegung ($P_{EG2959} = 0,141$, $P_{EG2960} = 0,286$) als auch der Defäkation (EG2959, $P = 0,134$) im Vergleich zum Wildtyp (N2) auf (A, B: $n = n_t = 10$).

4.7.5 Chemotaxis

Mit Hilfe von Sinneszellen kann *C. elegans* die chemische Zusammensetzung der Umgebung wahrnehmen. Dabei reagiert *C. elegans* u. a. auf Stoffwechselprodukte von Bakterien. Diese chemischen Substanzen finden ihren passenden Rezeptor in den Sinneszellen. Dabei unterscheidet *C. elegans* zwischen attraktiven und repulsiven Substanzen. Attraktiv wirken u. a. die chemischen Stoffe Diacetyl (1:1.000) und Isoamyl (1:10).

Um das chemotaktische Verhalten der TVP-Dreifachmutante auf diese attraktiven Substanzen in

4. Ergebnisse

entsprechenden Verdünnungen zu untersuchen, wurden die Tiere einem Chemotaxis-Test unterzogen. Dabei zeigte sich, dass sowohl der Wildtyp (BJ20) als auch die TVP-Dreifachmutante (BJ21) auf die attraktiven Substanzen gleichartig reagieren. Dies spiegelt sich in einem positiven Chemotaxis Index wieder (Abbildung 4-25 A, B-). Lediglich die Kontrollmutante (MT4589), die nicht in der Lage ist auf die beiden Substanzen zu reagieren, weist einen Chemotaxis Index $< 0,1$ auf (Abbildung 4-25 A).

4.7.6 Adaptationsverhalten

Die Fähigkeit zum adaptiven Verhalten auf chemische Substanzen ist wichtig für *C. elegans*, um auf chemische Geruchsveränderungen reagieren zu können. Im Adaptationstest mit Isoamyl zeigte sich, dass sowohl der Wildtyp (BJ20) als auch die TVP-Dreifachmutante (BJ21) nach einer einstündigen Vorinkubation mit konzentriertem Isoamyl nicht mehr auf die attraktive Isoamylverdünnung mit einem positiven Chemotaxisverhalten reagieren (siehe 4.7.5, Abbildung 4-25 B+).

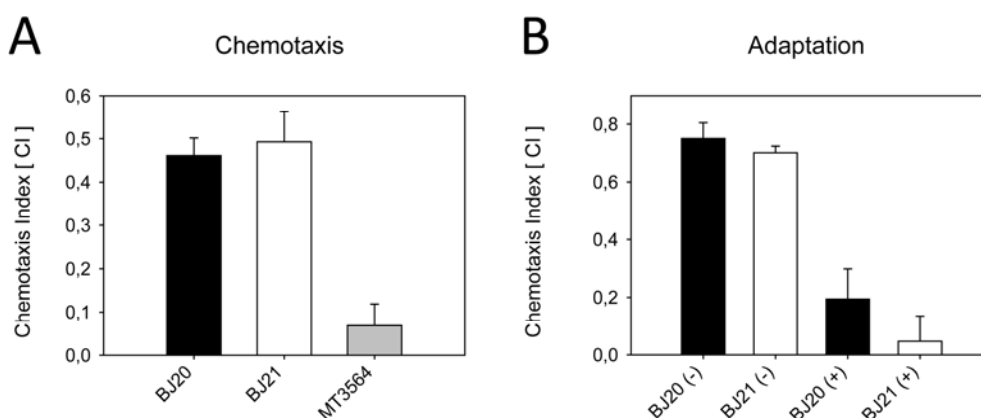


Abbildung 4-25 Untersuchung des Chemotaxis- und Adaptationsverhaltens.

Die TVP-Dreifachmutante (BJ21: CI $> 0,5$; $n_t = 414$) und der Wildtyp (BJ20: CI $> 0,5$; $n_t = 885$) zeigen ein normales chemotaktisches Verhalten gegenüber den attraktiven chemischen Substanzen Diacetyl (1:1.000, A, $P = 0,524$) und Isoamyl (1:10, B-, BJ20: CI $> 0,7$; $n_t = 869$, BJ21: CI $> 0,7$; $n_t = 1173$, $P = 0,813$). Die Mutante (MT3564) hingegen ist nicht in der Lage Diacetyl wahrzunehmen, was sich in einem niedrigen Chemotaxis Index widerspiegelt (A, $n_t = 759$, CI $< 0,1$, $P = 0,002$). Sowohl Wildtyp (B+, BJ20: CI $< 0,2$; $n_t = 721$) als auch Dreifachmutante (B+, BJ21: CI $< 0,2$; $n_t = 813$, $P = 0,225$) haben ein normales Adaptationsverhalten nach einstündiger Vorinkubation mit konzentriertem Isoamyl-Alkohol, welches sich in einem niedrigen Chemotaxis Index widerspiegelt (Isoamyl-Alkohol 1:10, B+, A, B: $n = 8$).

4.7.7 Lernverhalten von *C. elegans*

Lernen ist eine komplexe Form kognitiver Prozesse. *C. elegans* kann sich an die Temperatur „erinnern“, bei der die größte Futtermenge vorlag. Um zu testen, ob die TVP-Dreifachmutante (BJ21) in der Lage ist sich zu „erinnern“, wurden Dreifachmutante, Wildtyp (BJ20) und eine Mutante (MT6308) sowohl bei 15 °C als auch bei 20 °C mit ausreichend Futter aufgezogen. Anschließend wurde ein Thermotaxis-Test durchgeführt.

4. Ergebnisse

Sowohl Wildtyp als auch TVP-Dreifachmutante sind in der Lage, sich an die Temperatur zu „erinnern“, bei der sie kultiviert wurden. Durch das Wanderungsverhalten in Richtung dieser Temperatur weisen beide somit einen Thermotaxis Index größer 0,5 auf (Abbildung 4-26). Die Thermotaxismutante (MT6308) ist nicht in der Lage sich an die Aufzuchttemperatur zu „erinnern“ und bewegt sich in alle Richtungen. Dieses atypische Verhalten spiegelt sich in einem Thermotaxis Index $< 0,1$ wieder (Abbildung 4-26).

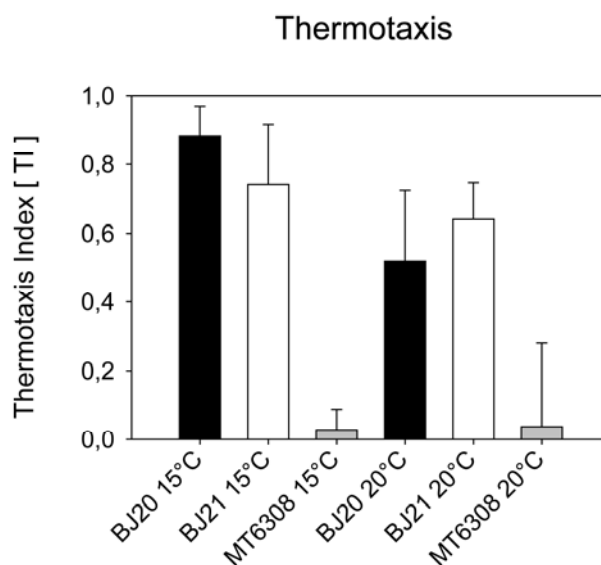


Abbildung 4-26 Thermotaxis Verhalten der TVP-Dreifachmutante bei verschiedenen Temperaturen.

Die TVP-Dreifachmutante (BJJ21) zeigt keinen signifikanten Unterschied im thermotaktischen Verhalten sowohl bei einer Temperatur von 15 °C (TI $> 0,7$; $n_t = 527$, $P = 0,675$) als auch von 20 °C (TI $> 0,6$; $n_t = 647$, $P = 0,718$) im Vergleich zum Wildtyp (BJJ20: 15 °C, TI $> 0,7$; $n_t = 811$ / 20 °C, TI $> 0,4$; $n_t = 723$) auf. Die Thermotaxismutante (MT6308: 15 °C, TI $< 0,1$; $n_t = 848$, $P = 0,004$ / 20 °C, TI $< 0,1$; $n_t = 734$, $P < 0,001$) kann sich nicht an die Temperatur „erinnern“ ($n = 3$).

4.7.8 Osmotisches Vermeidungsverhalten

C. elegans vermeidet Substanzen höherer Osmolarität, die das Hydroskelett destabilisieren. Um solche Substanzen wahrzunehmen besitzt *C. elegans* Neurone mit Osmorezeptoren.

Um das Verhalten der Dreifachmutante (BJJ21) in Gegenwart von hochmolarer Fructose-Lösung (4 M) zu untersuchen, wurde der Test auf osmotisches Vermeidungsverhalten durchgeführt. Als Kontrolle wurde eine Mutante (CX10) verwendet, die diese hochmolaren Substanzen nicht wahrnehmen kann (Abbildung 4-27). Die TVP-Dreifachmutante zeigt keinen signifikanten Unterschied im Vergleich zum Wildtyp (BJJ20) im Verhalten gegenüber 4 M Fructose (Abbildung 4-27).

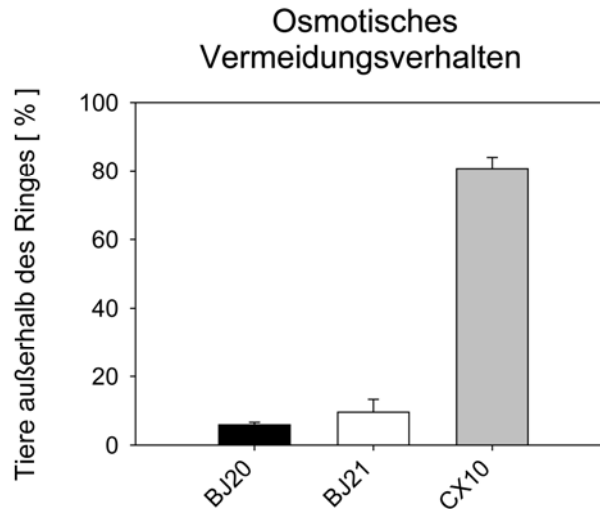


Abbildung 4-27 Normales osmotisches Vermeidungsverhalten der TVP-Dreifachmutante.

Die TVP-Dreifachmutante (BJJ21: $n_t = 908$, $P = 0,597$) und der Wildtyp (BJJ20: $n_t = 1328$) zeigen ein normales osmotisches Vermeidungsverhalten. Die Mutante (CX10: $n_t = 995$, $P = 0,001$) hingegen zeigt ein signifikant anomales Verhalten (BJJ20: $n = 11$; BJJ21/CX10: $n = 10$).

4.8 Entwicklung

Um zu untersuchen, ob die TVP-Dreifachmutante (EG2959, EG2960, BJJ21) sich normal entwickelt, wurde die Brutgröße mit denen von Wildtyptieren (N2, BJJ20) verglichen. Auch hier wurde die Rolle von Cholesterin analysiert¹⁵⁹. Es wurde kein Unterschied zwischen Wildtyp und TVP-Dreifachmutante sowohl in der Gesamtzahl der Nachkommen (Abbildung 4-28 A) als auch in der Dynamik der Eiablage (Abbildung 4-28 B) festgestellt. Selbst unter cholesterinfreien Bedingungen zeigten sich keine Unterschiede zwischen Wildtyp und TVP-Dreifachmutante (Abbildung 4-28 A, Abbildung 4-28 C). Unter cholesterinfreien Bedingungen traten sowohl beim Wildtyp als auch bei der TVP-Dreifachmutante die typischen Merkmale, wie das Fehlen von Dauerstadien und Auftreten von Häutungsdefekten auf^{56, 94}.

Die Eiablage erfolgt durch Kontraktion von 8 Vulvamuskelnzellen, die durch die Neurone HSN und VC innerviert werden. Auch hier zeigt die Anzahl der Nachkommen und die Eiablagedynamik, dass kein Unterschied der TVP-Dreifachmutanten im Vergleich zum Wildtyp vorliegt (Abbildung 4-28).

4. Ergebnisse

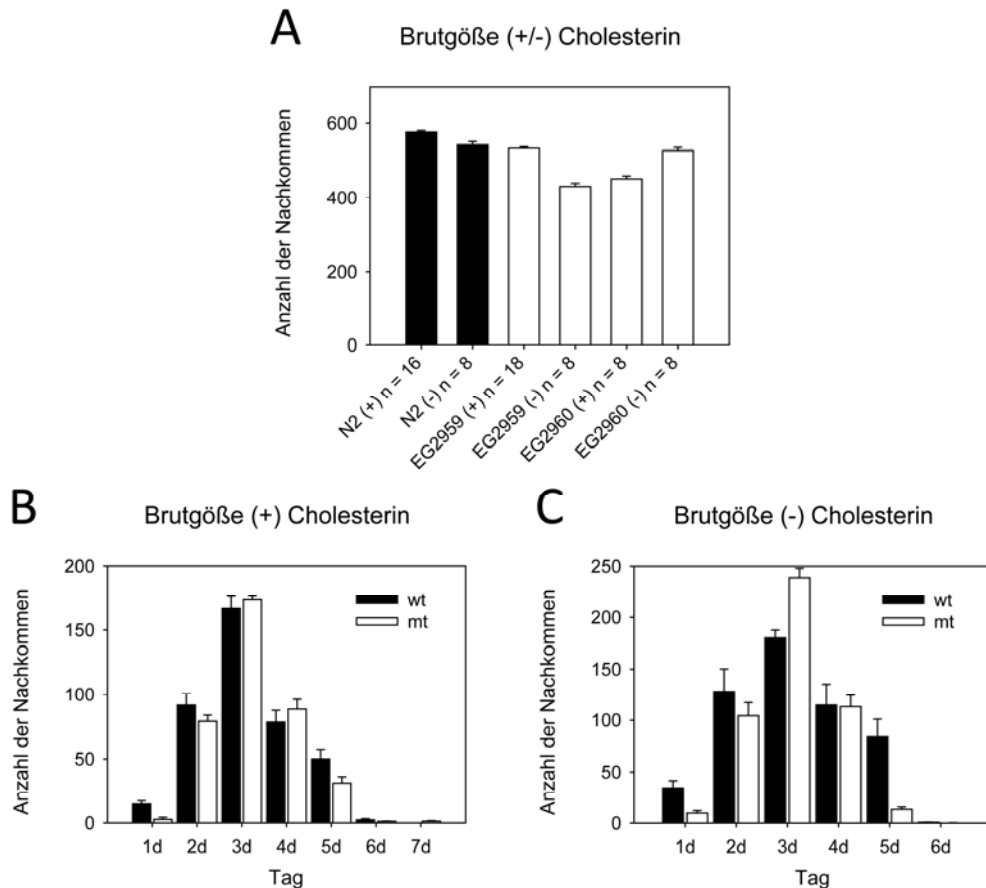


Abbildung 4-28 Die TVP-Dreifachmutante hat eine normale Entwicklung und Eiablagedynamik.

Anzahl der Nachkommen und Eiablagedynamik der TVP-Dreifachmutante (mt, EG2959, EG2960) weisen auf eine normale Entwicklung und Innervation der Eiablageneurone und -muskulatur im Vergleich mit Wildtyptieren (wt, N2) hin ($n = n_t$).

4.9 Die Rolle von Cholesterin

Da die vorhergehenden Ergebnisse zeigten, dass selbst unter cholesterinfreien Bedingungen die TVP-Dreifachmutante keine Defizite aufwies, sollte durch Photoaffinitätsmarkierung von Synaptosomen geklärt werden, ob die TVP-Dreifachmutante ein verändertes Muster der Cholesterininteraktion auf synaptischen Vesikeln zeigt. Dazu wurde in Zusammenarbeit mit Junior-Prof. Dr. Katja Burger photoaktivierbares Azocholestanol an die Gesamtproteine der Vesikel von Wildtyp und TVP-Dreifachmutante gekoppelt. Zunächst zeigten sich Unterschiede in der Markierung bei den Molekulargrößen 37,5; 21,3 und 18,7 kDa in der Dreifachmutante (EG2960) im Vergleich mit dem Wildtyp (N2, Abbildung 4-29 A). Doch konnte dieser Unterschied in einem zweiten Experiment nicht bestätigt werden (Abbildung 4-29 B).

4. Ergebnisse

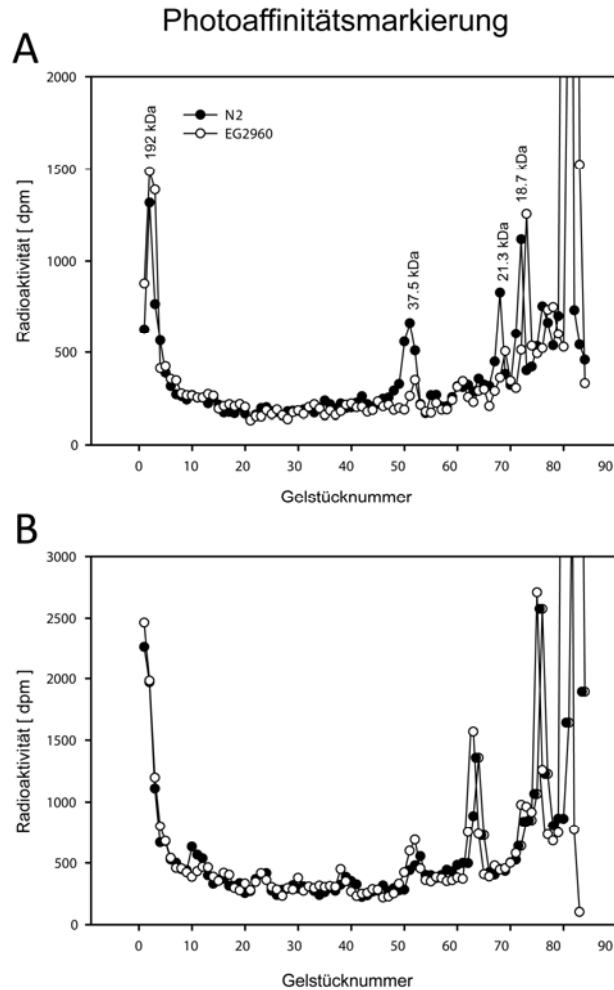


Abbildung 4-29 Photoaffinitätsmarkierung von Synaptosomen der TVP-Dreifachmutante und des Wildtyps. Gesamtprotein von Synaptosomen der TVP-Dreifachmutante (EG2960) und des Wildtyps (N2) ist in der Lage mit Cholesterin zu interagieren. Unterschiede bei 37,5, 21,3 und 18,7 kDa (A) konnten in einem zweiten Experiment (B) nicht bestätigt werden (n = 2).

4.10 Nervensystem

4.10.1 Neuronale Entwicklung

Um Unterschiede in der Entwicklung des Nervensystems der TVP-Dreifachmutante festzustellen, wurden die sensorischen Neurone (Amphide und Phasmide), deren Anzahl und Lage bekannt ist, sowohl von TVP-Dreifachmutante als auch vom Wildtyp mit dem lipophilen Farbstoff Dil retrograd markiert⁶⁶. Es wurden keine Unterschiede in der Zahl, in der Position und im Muster der Fortsätze der markierten Amphide und Phasmide zwischen Wildtyp und TVP-Dreifachmutante gefunden (Abbildung 4-30 A, B).

4. Ergebnisse

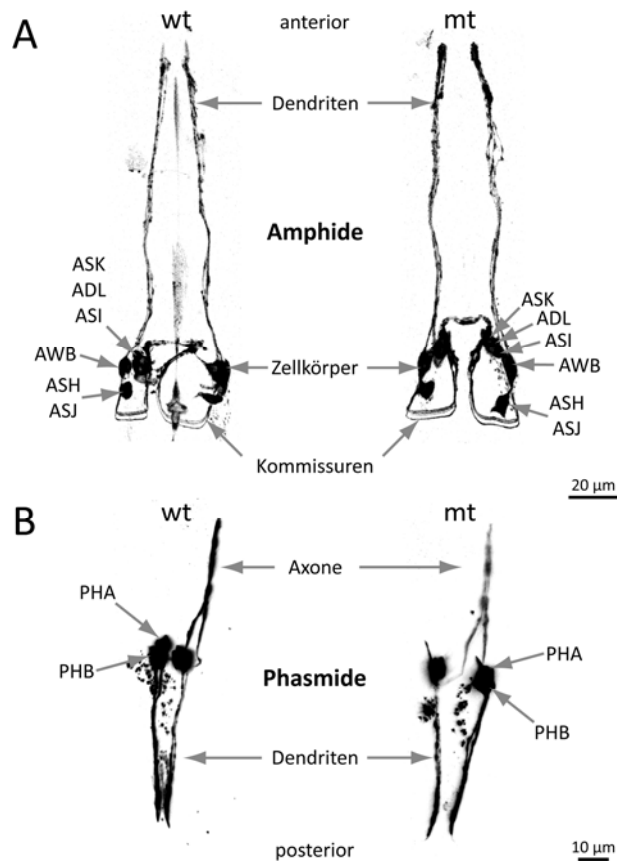


Abbildung 4-30 Mit Dil markierte Amphide und Phasmide des Wildtyps und der TVP-Dreifachmutante.

Anterior sind die Amphidneurone (ASK, ADL, ASI, AWB, ASH und ASJ), deren Fortsätze (A), posterior die Phasmidneurone (PHA und PHB) und deren Fortsätze (B) sowohl im Wildtyp (wt: N2, BJ20, Film 12, Film 13) als auch in der TVP-Dreifachmutante (mt: EG2960, BJ21, Film 14, Film 15) zu finden.

Um zu untersuchen, ob die TVP-Dreifachmutante Defekte in axonalen Verknüpfungen aufweist, wurde das GABAerge Nervensystem mit den gut erkennbaren 26 Neuronen und ihren deutlichen Kommissuren gewählt. Dazu wurde die TVP-Dreifachmutante (EG2960) mit Männchen der Transkriptionschimäre *Punc-47:gfp* (EG1285, Abbildung 4-31 wt¹⁰⁸) verpaart. Der daraus resultierende Stamm (BJ1, Abbildung 4-31 mt) wurde anschließend fluoreszenzmikroskopisch analysiert. Dabei wurden keine Unterschiede sowohl in Anzahl und Position der GABAergen Neurone als auch der Kommissuren im Vergleich zum Wildtyp (wt) gefunden (Abbildung 4-31). In beiden Fällen (wt, mt) wurde ein weiteres, bisher unbekanntes GABAerges Neuron detektiert (Abbildung 4-31 Stern).

4. Ergebnisse

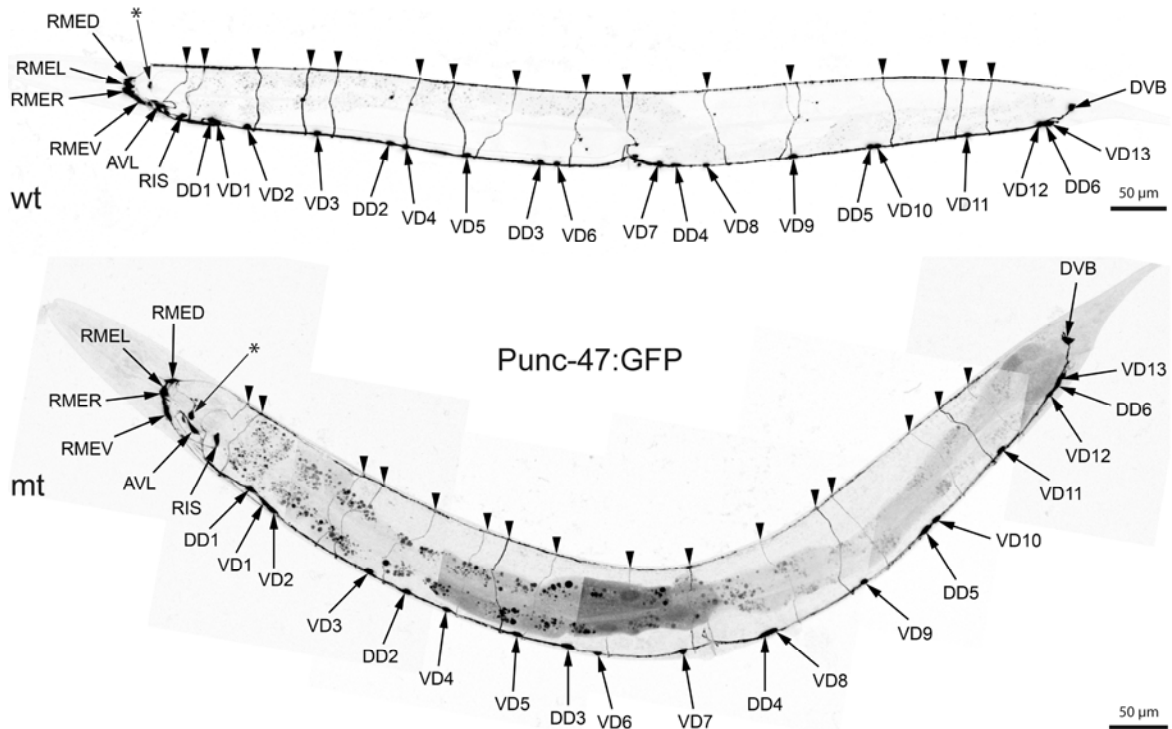


Abbildung 4-31 GABAerges Nervensystem von *C. elegans* markiert durch Punc-47:GFP.

Expression von Punc-47:GFP im GABAergen Nervensystem der TVP-Dreifachmutante (BJ1 mt) und des Wildtyps (EG1285 wt) zeigen keinen Unterschied in Lage, Position und Anzahl der GABAergen Neurone und ihrer Kommissuren. Ein weiteres, bisher unbekanntes GABAerges Neuron wurde detektiert (Stern).

4.10.2 Verteilung von Synaptobrevin in der *C. elegans* TVP-Dreifachmutante

Um die Verteilung der Synaptobrevinanhäufungen in synaptischen Terminalen¹¹⁸ in der TVP-Dreifachmutante (BJ21) zu untersuchen, wurde diese und der Wildtyp (BJ20) mit dem *Psnb-1::gfp* exprimierenden Stamm NM440 verpaart. Anschließend wurde in den daraus resultierenden Stämme BJ22 (Wildtyp, wt) und BJ28 (TVP-Dreifachmutante, mt) die Verteilung der Synaptobrevincluster fluoreszenzmikroskopisch charakterisiert (Abbildung 4-32 A). Sowohl im Wildtyp als auch in der TVP-Dreifachmutante wurde ein punktiertes Muster der Synaptobrevinanhäufungen gefunden. Dabei konnten in der TVP-Dreifachmutante $35,5 \pm 3,4$ und im Wildtyp $34,7 \pm 2,2$ Cluster pro 100 µm detektiert werden.

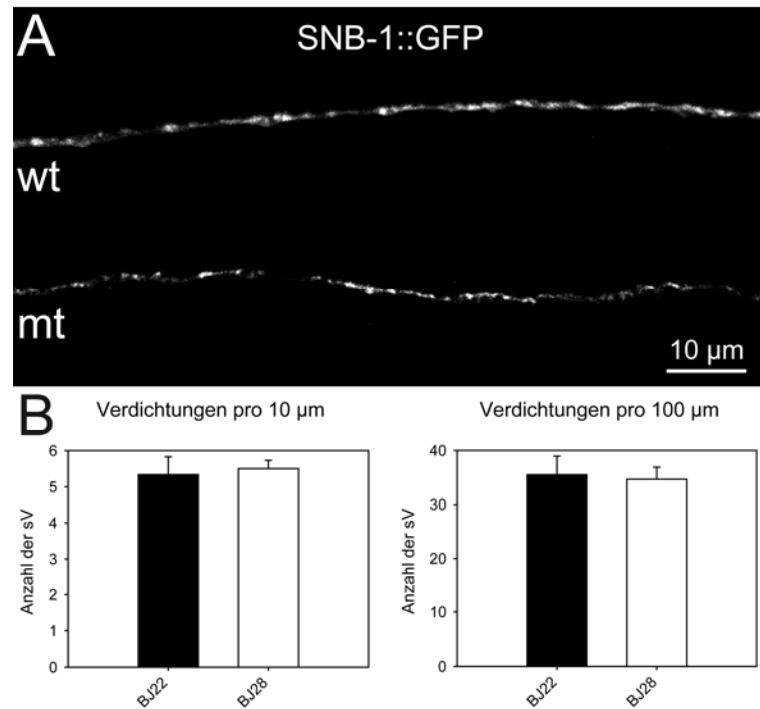


Abbildung 4-32 Verteilung von Synaptobrevinanhäufungen in Synapsen des Wildtyps und der TVP-Dreifachmutante.

Die Verteilung der synaptischen Verdichtungen von Synaptobrevin ist in der TVP-Dreifachmutante (BJJ28 A mt) und im Wildtyp (BJJ22 A wt) gleich. Auch konnte kein signifikanter Unterschied in der Anzahl der synaptischen Cluster pro 10 ($P = 0,679$) und 100 μm ($P = 0,978$) detektiert werden (BJJ22: $n = n_t = 6$; BJJ28: $n = n_t = 13$).

4.10.3 Ultrastruktur von Synapsen der TVP-Dreifachmutante

Um die Ultrastruktur der Synapse darzustellen und mögliche Endozytosedefekte zu detektieren, wurden die Synapsen der TVP-Dreifachmutante (EG2960) und des Wildtyps (N2) elektronenmikroskopisch in Zusammenarbeit mit Dr. Gabriele Spatkowski analysiert. Dabei zeigte sich, dass die Vesikel der TVP-Dreifachmutante in Clustern an den präsynaptischen Spezialisierungen zu finden sind, wie dies im Wildtyp der Fall ist. Außerdem sind in diesen Synapsen Clathrin-umhüllte und endozytierende Vesikel vorhanden (Abbildung 4-33).

4. Ergebnisse

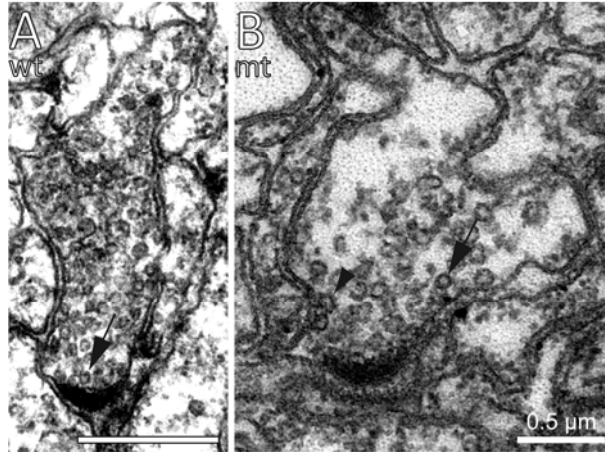


Abbildung 4-33 EM-Aufnahme einer cholinergen Synapse des Wildtyps und der TVP-Dreifachmutante.

Die cholinergen Synapsen der TVP-Dreifachmutante (EG2960, B) haben normale synaptische Verdichtungen, zeigen Clathrin-ummantelte Vesikel (B Pfeil) und endozytotische Strukturen (B Pfeilkopf). In (A) ist eine Wildtypsynapse zu sehen (A Pfeil markiert Clathrin-umhülltes Vesikel).

Die TVP-Dreifachmutante ($1,93 \pm 0,35 \%$, 21 Terminalen) hat eine signifikant erhöhte Anzahl Clathrin-ummantelter Vesikel im Vergleich zum Wildtyp ($0,74 \pm 0,15 \%$, 16 Terminalen, $P = 0,006$), was auf eine Veränderung im Endozytoseprozess hinweisen könnte.

Des Weiteren wurde der mittlere Vesikeldurchmesser bestimmt, da Synaptophysin möglicherweise eine Rolle bei der Krümmung von Membranen spielen könnte¹⁵⁹. Hier war kein signifikanter Unterschied zwischen der TVP-Dreifachmutante ($26,66 \pm 0,19$ nm) und dem Wildtyp ($27,82 \pm 0,2$ nm) vorhanden. Auch konnte in der Verteilung der unterschiedlichen Vesikeldurchmesser innerhalb der Synapse kein Unterschied detektiert werden (Abbildung 4-34 B). Außerdem wurde die Vesikelverteilung an der präsynaptischen Spezialisierung in Zusammenarbeit mit Dr. Robby Weimer bestimmt. Dazu wurden die Vesikel in Kategorien eingeteilt. Solche, die an der Membran zu finden waren (berührend), solche, die sich in einem 30 nm Abstand befanden (nah) und solche die weit entfernt waren (entfernt, Abbildung 4-34 A).

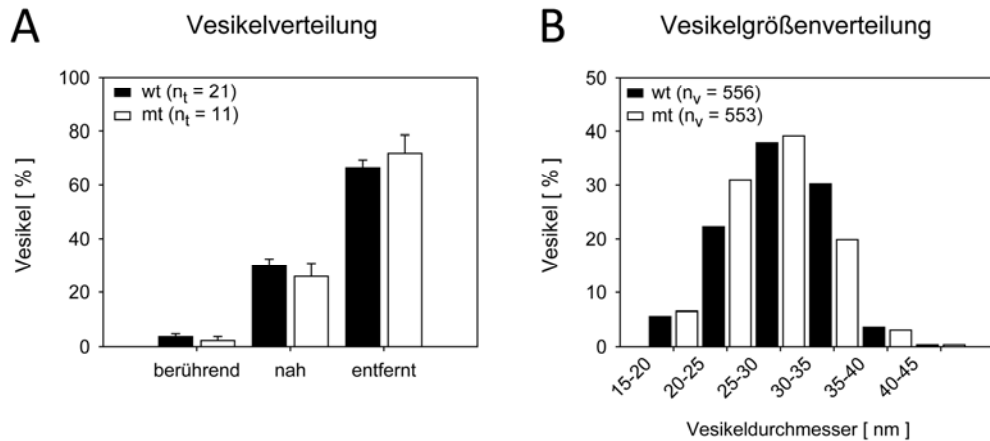


Abbildung 4-34 Keine Unterschiede in der Vesikelverteilung und -durchmesser.

Keine Unterschiede wurden in der Verteilung und Anzahl der Vesikel in direktem Kontakt mit der Plasmamembran (berührend), in der Nähe (nah) und weiter entfernt (entfernt) bei der TVP-Dreifachmutante (EG2960, A) gefunden werden. Auch die Verteilung der unterschiedlichen Vesikeldurchmesser (B) zeigt keine Veränderung in der Dreifachmutante im Vergleich zum Wildtyp (N2, A: n = n_t, B: n = 1).

Um zu überprüfen, ob ein Unterschied in der Anzahl der synaptischen Dichten der neuromuskulären Endplatten (NMJ, *neuronal muscular junction*) vorhanden ist, wurden die synaptischen Dichten von zehn NMJ der TVP-Dreifachmutante (152 ± 8 Vesikel/ μm^2) und des Wildtyps (163 ± 13 Vesikel/ μm^2) ermittelt ($P = 0,463$).

GABAerge Synapsen von *C. elegans* enthalten ca. 10-mal mehr Vesikel als cholinerge Synapsen. Aus diesem Grund wurde die Gesamtzahl der Vesikel in einer einzelnen GABAergen Synapse bestimmt. Dabei enthält die Dreifachmutante (EG2960, 1518 Vesikel) etwas mehr Vesikel als der Wildtyp (N2, 1247 Vesikel). Da es sich um eine Einzelbestimmung handelt, ist dieses Ergebnis statistisch nicht verwertbar.

4.10.4 Aldicarb Resistenz

Da eine erhöhte Zahl an Clathrin-umhüllten Vesikeln detektiert wurde, wurde das Verhalten der TVP-Dreifachmutante (EG2959) im sog. Aldicarb-Test untersucht. Aldicarb ist ein Inhibitor der Acetylcholinesterase und verursacht eine Dauererregung der Postsynapse, wodurch es zu einer Hyperkontraktion der Muskulatur kommt. Mutanten, die eine verringerte Ausschüttung von Neurotransmitter haben, zeigen eine Resistenz und ein normales Fortbewegungsmuster in Gegenwart von Aldicarb. Um die TVP-Dreifachmutante auf anormale Freisetzung von Neurotransmitter hin zu untersuchen, wurden Dreifachmutante und Wildtyp (N2) im Aldicarb-Test bei verschiedenen Temperaturen analysiert. Sowohl die TVP-Dreifachmutante als auch der Wildtyp haben keine Unterschiede im Verhalten gegenüber Aldicarb, auch nicht bei unterschiedlichen Temperaturen (15, 20 und 25 °C, Abbildung 4-35).

4. Ergebnisse

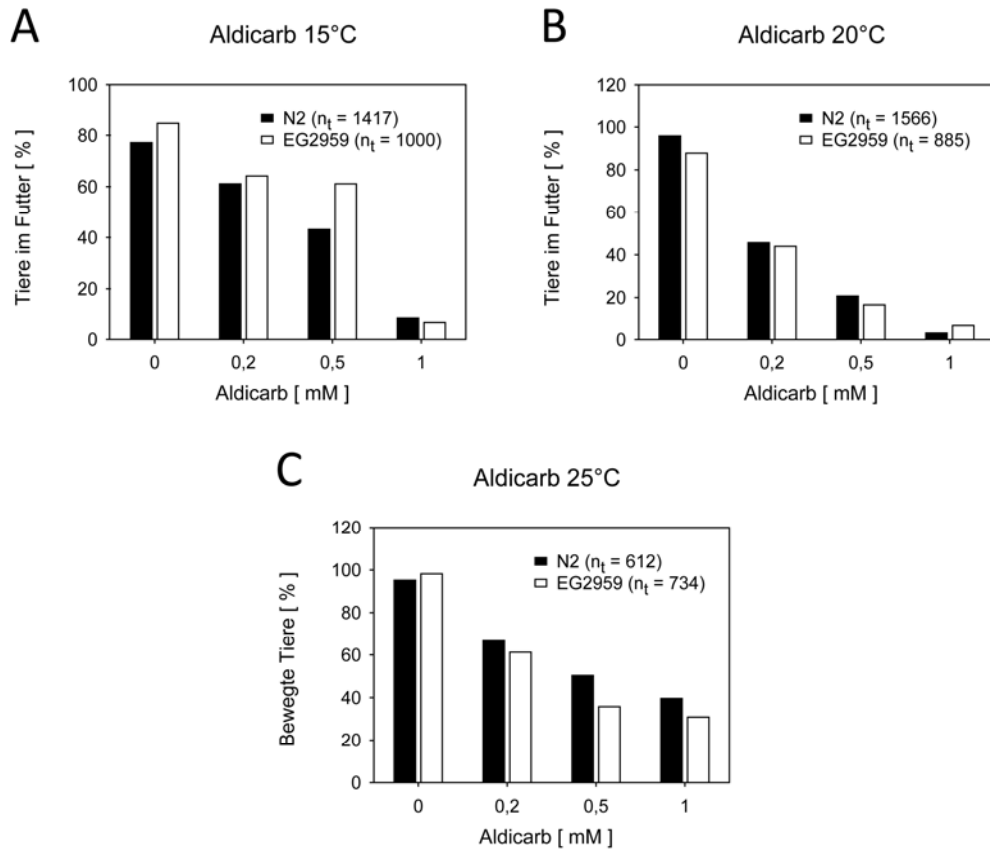


Abbildung 4-35 Normale Aldicarb-Reaktion der TVP-Dreifachmutante (EG2959).

Die TVP-Dreifachmutante (EG2959) zeigt wie der Wildtyp (N2) eine normale Empfindlichkeit in Gegenwart des Acetylcholinesteraseinhibitors Aldicarb bei unterschiedlichen Temperaturen (15 °C, 20 °C, 25 °C, n = 1).

4.10.5 Elektrophysiologie

Durch die unterschiedlichen Verhaltenstests wurden keine signifikanten Veränderungen bei der TVP-Dreifachmutante ermittelt. Des Weiteren zeigte die TVP-Dreifachmutante im Aldicarbtest ein normales Verhalten. Um zu klären, ob die TVP-Dreifachmutante feine, mit den Tests nicht zu detektierende Auffälligkeiten in den synaptischen Antworten hat, wurde das cholinerge Nervensystem elektrophysiologisch von Mark Palfreyman aus dem Labor von Prof. Dr. Erik Jorgensen der Universität von Utah untersucht. Es konnten keine signifikanten Unterschiede in den evozierten Antworten (Abbildung 4-36 A, B), in den spontanen Fusionen (Abbildung 4-36 C, E) und in den Amplituden der endogenen Fusionen (Abbildung 4-36 D) detektiert werden.

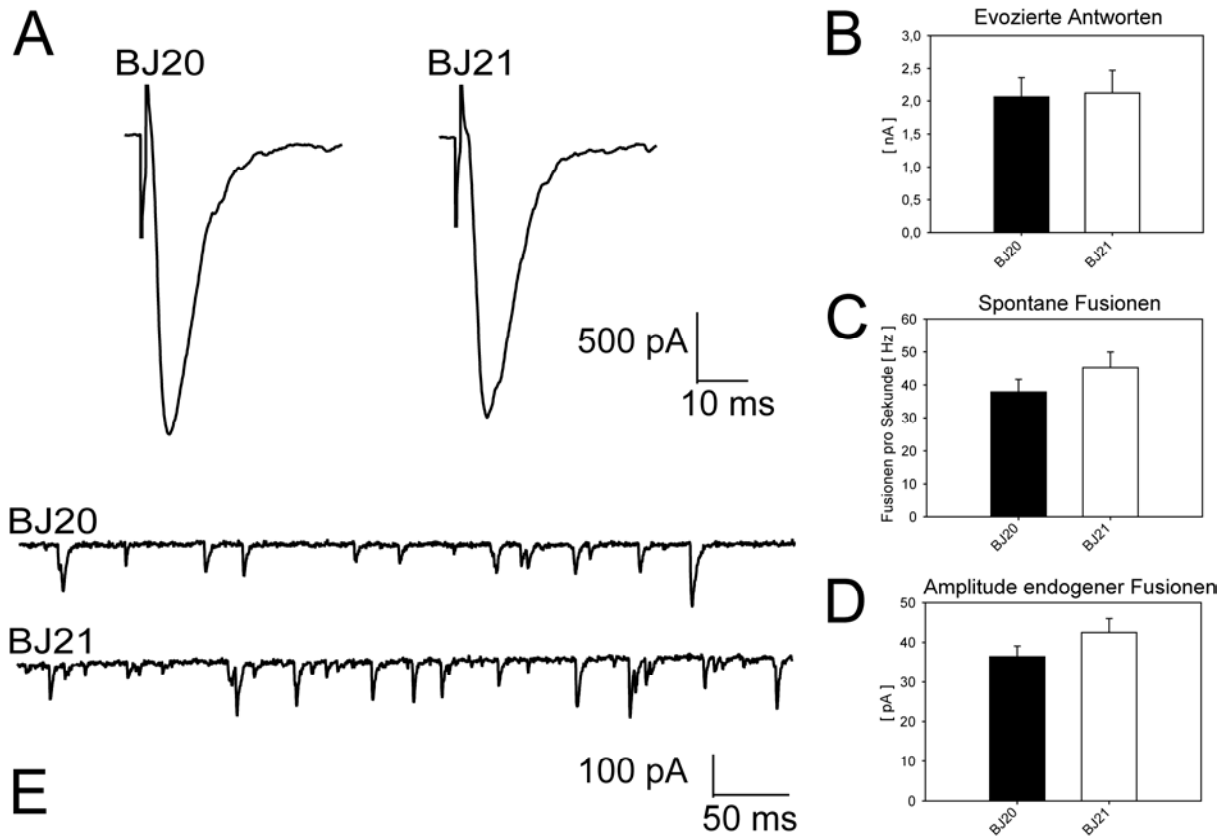


Abbildung 4-36 Normale Elektrophysiologie der cholinergen Synapsen.

Die TVP-Dreifachmutante (BJ21) weist keinen signifikanten Unterschied im Verlauf (A) und der Höhe der evozierten Antworten (B, $P = 0,324$) auf. Außerdem wurden weder in den spontanen Fusionen (C, E; $P = 0,321$) noch in der Amplitude der endogenen Fusionen (D, E; $P = 0,287$) signifikante Veränderungen im Vergleich zum Wildtyp (BJ20) gemessen ($n = n_t = 3$).

4.11 PTZ-Sensitivität

4.11.1 PTZ-Sensitivität der TVP-Dreifachmutante und TVP-Einzelmutanten

Da elektronenmikroskopisch eine GABAerge Synapse eine erhöhte Anzahl synaptischer Vesikel enthielt, sollte untersucht werden, ob Veränderungen an GABAergen Synapsen vorhanden sind. Dazu wurde zunächst die TVP-Dreifachmutante im PTZ-Sensitivitätstest genauer analysiert. Pentylentetrazol (PTZ) kompetitiert mit GABA um die Bindungsstelle am GABA-Rezeptor (UNC-49B/C). Ist nicht genügend GABA im synaptischen Spalt vorhanden, so blockiert PTZ die Relaxation der postsynaptischen Muskulatur und die Tiere zeigen ein verkrampftes Verhalten. Dabei wurde festgestellt, dass die TVP-Dreifachmutante (BJ21, $P = 0,004$: Abbildung 4-37 A, C) gegenüber niedrigen PTZ-Konzentrationen eine höhere Empfindlichkeit zeigt als der Wildtyp (BJ20: Abbildung 4-37 A, C), der sich normal sinusförmig fortbewegt. Anders als die Kontrollmutante (NM467, $P < 0,001$: Abbildung 4-37 A, C), die einen PTZ-Phänotyp hat¹⁷⁴ und 80 % der Tiere ab einer PTZ-Konzentration von 4 mg/ml verkrampft sind, reagiert die TVP-Dreifachmutante auf Berührungs- und Erschütterungsreize mit normalen sinusförmigen Fluchtbewegungen. Dabei ist die Amplitude der

4. Ergebnisse

Sinuskurve kleiner als beim Wildtyp (Daten nicht gezeigt). Um zu ermitteln, welches der drei TVP-Allele für den PTZ-Phänotyp verantwortlich ist, wurden die TVP-Einzelmutanten untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass die TVP-Einzelmutanten unterschiedlich stark auf die verschiedenen PTZ-Konzentrationen reagieren (BJ14: Abbildung 4-37 B, C; BJ15 und BJ16: Abbildung 4-37 B). Während die *sph-1* Mutante *ox278* den schwächsten Phänotyp bei den unterschiedlichen PTZ-Konzentrationen zeigt (BJ16, $P = 0,005$: PTZ 8 mg/ml < 40 % der Tiere verkrampft), sind ca. 60 % der Tiere bei 8 mg/ml der *scm-1* Mutante *hd30* (BJ15, $P = 0,011$) verkrampft. Die *sng-1* Mutante *ok234* zeigt in Gegenwart der unterschiedlichen PTZ-Konzentrationen die stärkste Ausprägung, hier sind > 60 % der Tiere schon ab einer PTZ-Konzentration von 4 mg/ml verkrampft (BJ14, $P < 0,001$: Abbildung 4-37 B). Der PTZ-Phänotyp ist nicht additiv, da die TVP-Dreifachmutante im Vergleich zur *sng-1(ok234)* Mutante einen milderen Phänotyp besitzt und erst 60 % der Tiere bei einer PTZ-Konzentration von 8 mg/ml verkrampft sind (Abbildung 4-37 A, B). Auch hier reagieren die TVP-Einzelmutanten auf Erschütterungs- und Berührungsreize mit einer sinusförmigen Fortbewegung und mit signifikant verringerter Amplitude (BJ20: $26,15 \text{ LE} \pm 0,91$ und BJ14: $19,91 \text{ LE} \pm 0,67$; $P < 0,001$).

4. Ergebnisse

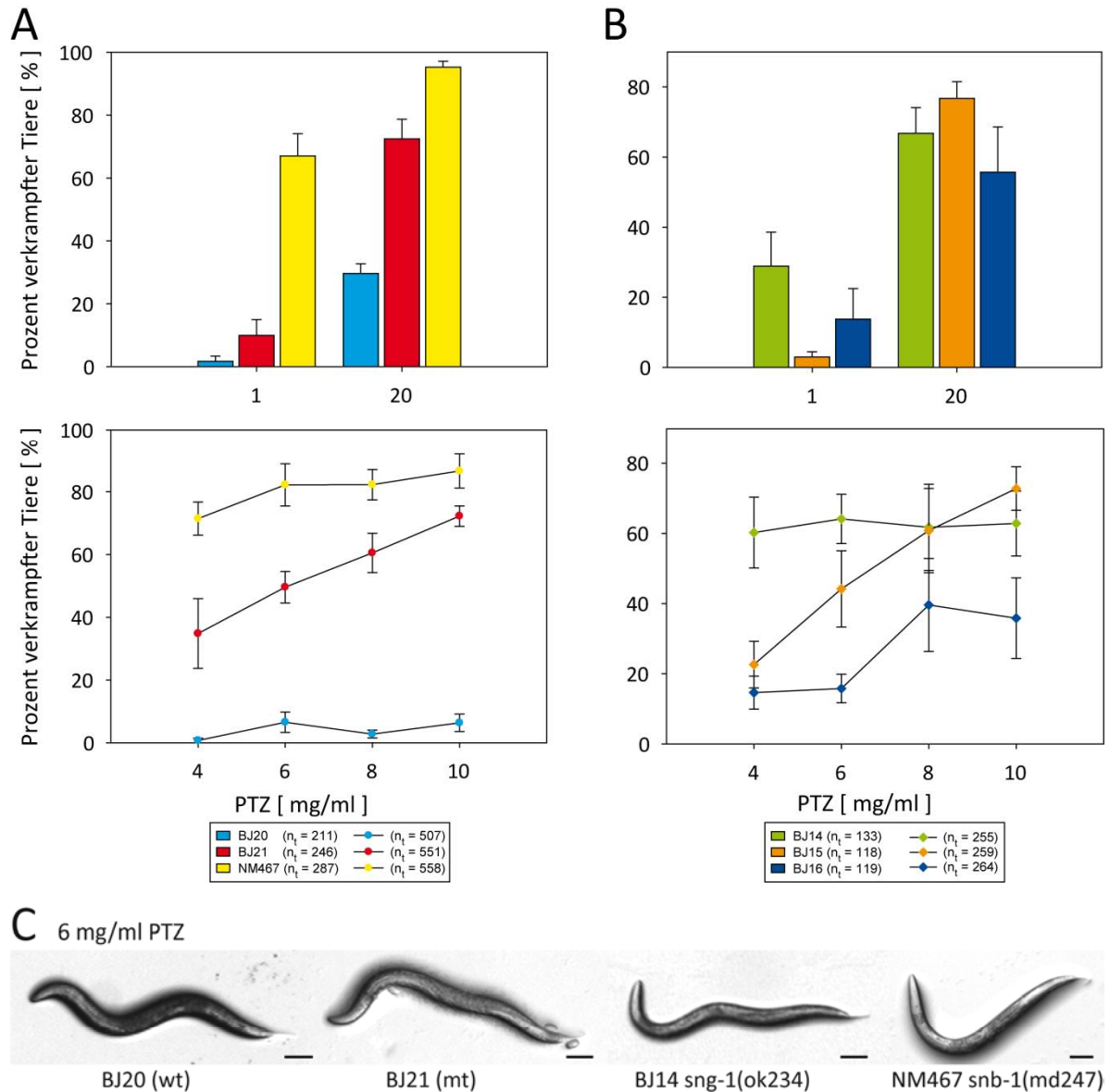


Abbildung 4-37 PTZ-Sensitivität der TVP-Dreifach- und TVP-Einzelmutanten.

Die TVP-Dreifachmutante (BJ21: $P = 0,004$, Film 16) reagiert schon bei niedrigen PTZ-Konzentrationen (A) mit einem verkrampften (C) Verhalten, während 20 % der Wildtypiere (BJ20, Film 17) erst bei einer Konzentration von 20 mg/ml Spasmen zeigen (A, C). Dabei handelt es sich nicht um einen additiven Phänotyp der mutierten TVPs, da die Synaptogyrin-Einzelmutante einen sehr starken PTZ-Phänotyp zeigt (BJ14: $P < 0,001$, Film 19, B, C). Als Kontrolle wurde die Synaptobrevin-Mutante (NM467, Film 18, A, C) verwendet, die schon bei niedrigen PTZ-Konzentrationen verkrampft (A: $n = 6$, B: $n = 3$; Maßstab = 100 μm).

4.11.2 Induktion der PTZ-Sensitivität durch *sng-1* RNAi

Da die Synaptogyrin-Mutante den stärksten Phänotyp im PTZ-Sensitivitätstest zeigte und Synaptogyrin ausschließlich neuronal exprimiert wird (4.4.1 II. Synaptogyrin), wurde diese näher betrachtet.

Um zu zeigen, dass dieser Phänotyp durch *sng-1(ok234)* hervorgerufen wird, wurde die TVP-Einzelmutante (BJ14) mit der RNAi-hypersensitiven Mutante (GR1373) verpaart, woraus der Stamm BJ67 resultierte. Anschließend wurde GR1373 mit *sng-1* RNAi behandelt (GR1373+) und zusammen

4. Ergebnisse

mit BJ67 und GR1373 in einem PTZ-Test untersucht. Dabei zeigte sich, dass BJ67 > 80 % der Tiere verkrampft sind und somit den stärksten Phänotyp besitzt (Abbildung 4-38). Dieser Phänotyp kann durch Herunterregulierung von *sng-1* durch *sng-1*-RNAi in GR1373 (Abbildung 4-38, GR1373+) induziert werden, so dass > 40 % der Tiere einen verkrampften Phänotyp zeigen (Abbildung 4-38). Bei dem unbehandelten Kontrollstamm GR1373 zeigen erst ab einer PTZ-Konzentration von 10 mg/ml < 40 % der Tiere Spasmen (Abbildung 4-38).

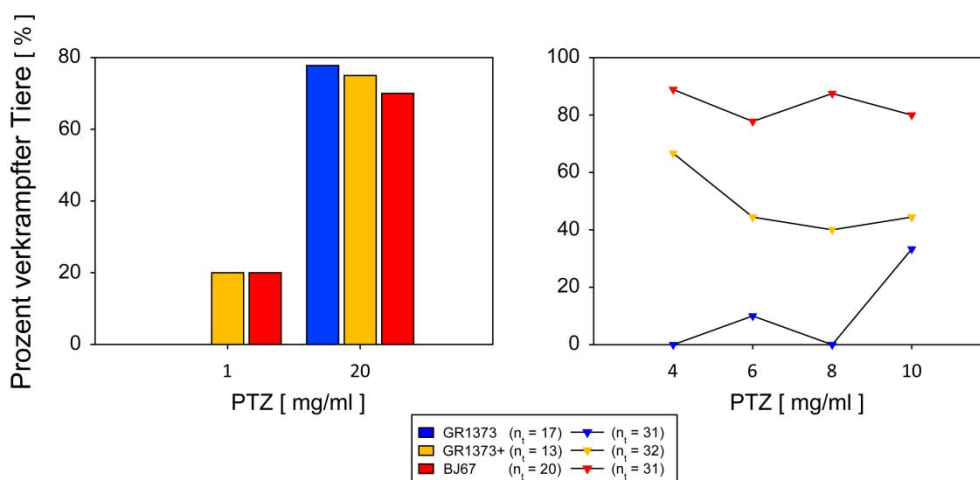


Abbildung 4-38 PTZ-Test nach *sng-1* RNAi.

Der RNAi-sensitive Stamm GR1373 reagiert nach Behandlung mit *sng-1* RNAi (GR1373+) mit einem verstärkten Krampfverhalten. Als Kontrolle wurde die *sng-1(ok234)*-Mutante (BJ67) verwendet, die ein starkes Krampfverhalten unter PTZ-Bedingungen zeigt. Der Wildtyp (GR1373) beginnt erst ab einer Konzentration von 10 mg/ml PTZ deutlich vermehrt zu krampfen (n = 1).

4.11.3 „Rettung“ des PTZ-Phänotyps durch Mikroinjektion von *Psng-1:sng-1*

Um zu verifizieren, dass dieser Phänotyp durch die Deletion im *sng-1(ok234)* hervorgerufen wird, wurde in Zusammenarbeit mit Lin Bai das Konstrukt *Psng-1:sng-1* (Tabelle 4-4, siehe Abbildung 7-1) in die Synaptogyrin-Mutante (BJ14) mikroinjiziert. Als Koinjektionsmarker wurde das Transkriptionskonstrukt *Pifb-2:yfp* verwendet. Der daraus resultierende Stamm BJ103 wurde anschließend in einem PTZ-Sensitivitätstest untersucht (Abbildung 4-39). Dieser Test zeigte, dass die Chimäre *Psng-1:sng-1* in der Lage ist, den verkrampften Phänotyp, hervorgerufen von *sng-1(ok234)*, zu „retten“ (BJ103). Außerdem wurden die „geretteten“ Tiere auf *Pifb-2:YFP* Fluoreszenz und mit Hilfe der Duplex-PCR-Methode auf das vorhandene Wildtypallel hin überprüft (Abbildung 4-40).

Tabelle 4-4 Translationskonstrukt für die „Rettung“ des PTZ-Phänotyps.

• *Psng-1:sng-1*

Für das Konstrukt *Psng-1:sng-1* wurde ein 759 bp *XmaI/NotI*-Fragment mit den Amplimeren 06-102 und 06-103 am Cosmid T08A9 amplifiziert. Anschließend wurde das 759 bp *XmaI/NotI*-Fragment in den mit *XmaI/NotI* geschnittenen Vektor *sng-1::yfp* ligiert, so dass der Leseraster der *yfp* cDNA verschoben wurde. Dadurch wird gewährleistet, dass *sng-1* ohne Kopplung an YFP produziert wird.

4. Ergebnisse

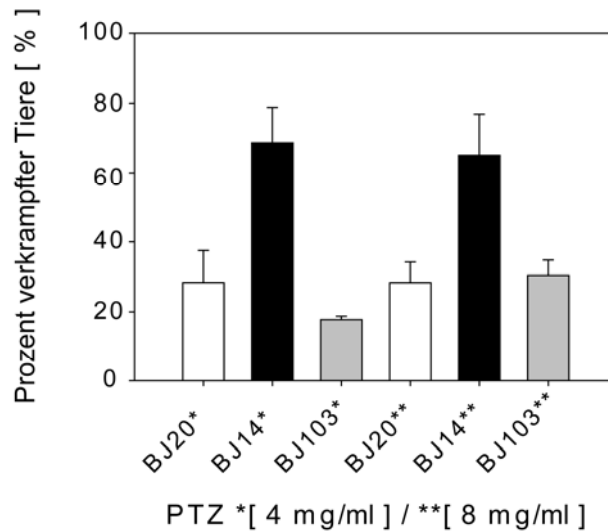


Abbildung 4-39 „Rettung“ des PTZ-Phänotyps durch Mikroinjektion von *Psng-1:sng-1*.

Durch Mikroinjektion von *Psng-1:sng-1* in die TVP-Einzelmutante *sng-1(ok234)* (BJ103, $P = 0,651$; $n_t = 142$) kann der PTZ-Phänotyp der Synaptogyrin-Mutante (BJ14 *sng-1(ok234)*, $P = 0,002$; $n_t = 130$) im Vergleich zum Wildtyp (BJ20: $n_t = 141$) „gerettet“ werden, so dass der Unterschied zwischen BJ14 und BJ103 signifikant ist ($P = 0,002$; $n = 3$).

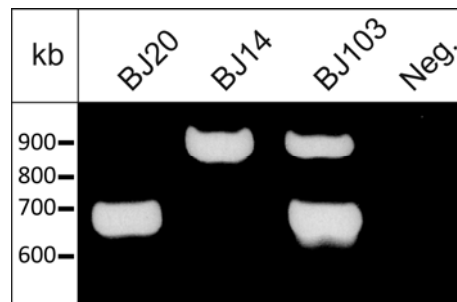


Abbildung 4-40 Überprüfung des mikroinjizierten Stammes BJ103 mit Hilfe der Duplex-PCR-Methode.

Neben der Fluoreszenzkontrolle wurde der Stamm BJ103 mit Hilfe der Duplex-PCR-Methode unter Verwendung der Synaptogyrin spezifischen Amplimere untersucht, ob dieser den mikroinjizierten Vektor *Psng-1:sng-1* trägt. Zu sehen sind die 684 bp große Wildtyp- (BJ20, *sng-1*) und die 880 bp große Mutantenbande (BJ14, *ok234*). Im Stamm BJ103 konnte sowohl die Mutante- (880 bp) als auch die Wildtypbande (684 bp) nachgewiesen werden.

5 Diskussion

Tetraspan vesicle membrane proteins (TVPs) sind innerhalb der Säugetiere auf Vesikeln in allen Schritten des Vesikelzyklus zu finden. Doch ist die Funktion der TVPs während der Exo-, Endozytose und Vesikelbiogenese bis heute ungeklärt. Unterschiedliche Untersuchungen gaben Hinweise und führten zu verschiedenen Vorstellungen über die Rolle der TVPs. Diese Hypothesen sind im Folgenden aufgelistet:

a) Beteiligung an der Exozytose

- TVPs sind an der Regulation der Exozytose beteiligt, da die Neurotransmitterfreisetzung durch Zugabe von spezifischen Antikörpern oder *antisense* RNA inhibiert bzw. bei Überexpression verstärkt wird^{3, 109, 152}.
- TVPs sind an der kalziumvermittelten Exozytose beteiligt, da die zytoplasmatischen Enden Kalziumionen binden¹²⁹. Jedoch konnte diese Hypothese in späteren Studien nicht bestätigt werden²⁶.
- TVPs regulieren die SNARE-Komplexbildung, da sie mit der v-SNARE-Komponente Synaptobrevin Heterooligomere bilden¹⁵. TVPs könnten demnach die Verfügbarkeit von Synaptobrevin erhöhen⁴⁵ oder vermindern^{28, 45}.
- TVPs bilden ähnlich den Connexinen einen spannungsgesteuerten Kanal, der spezifisch für Kaliumionen ist^{59, 162}.
- TVPs könnten Teil der Fusionspore sein, durch die der Neurotransmitter freigesetzt wird^{82, 87, 124}.

b) Beteiligung an der Endozytose

- TVPs sind am Vorgang der Endozytose beteiligt, da sie mit Cholesterin interagieren und so die Vesikelbildung induzieren¹⁵⁹.
- TVPs sind Regulatoren der Endozytose, da sie mit der GTPase Dynamin interagieren^{40, 41}.
- TVPs vermitteln die Rekrutierung von Clathrin über Interaktion mit Adaptorproteinen (AP1)⁷¹.
- TVPs könnten an der schnellen Synaptobrevin-abhängigen und Clathrin-unabhängigen Endozytose beteiligt sein, da sowohl in Synaptophysin 1- als auch Synaptobrevin 2-knockout Mäusen eine erhöhte Anzahl Clathrin-umhüllter Vesikel gefunden wurde^{40, 42, 146}.

c) Beteiligung an der Biogenese

- TVPs sind für die korrekte Sortierung von Synaptobrevin am TGN und für dessen *targeting* zur präsynaptischen Seite verantwortlich^{28, 123}.
- TVPs sind an der Vesikelbiogenese beteiligt, da sie cholesterinhaltige homo- bzw. heteromere Mikrodomänen mit spezieller Lipidzusammensetzung bilden könnten^{53, 54, 64}.

d) Beteiligung an der Vesikelstruktur

- TVPs sind für die Formung von Mikrovesikeln (SLMVs) wichtig, da sie überwiegend auf solchen zu finden sind⁹⁹.
- TVPs segregieren in nichtneuroendokrinen Zellen in spezielle vesikuläre Strukturen^{97, 98}.
- TVPs sind Strukturproteine, die für die Krümmung von Membranen prinzipiell verantwortlich sind bzw. diese stabilisieren¹⁵⁹.
- TVPs binden Cholesterin, welches für die Vesikelbiogenese und die Formung der Vesikelkrümmung benötigt wird^{65, 159}.
- TVPs halten als cholesterinbindendes Protein die Membranstabilität aufrecht¹⁵⁹.

Untersuchungen an Synaptophysin 1- bzw. Synaptogyrin 1-*knockout* Mäusen ließen jedoch keine offensichtlichen Defizite erkennen^{47, 80, 109}. Grund dafür könnte die Redundanz anderer TVPs sein¹⁶⁵, wobei jedoch keine deutlichen Unterschiede in der Genexpression in Synaptophysin 1-*knockout*

Mäusen nachgewiesen werden konnten⁹.

Hinweise für die Bedeutung der TVPs während der embryonalen Entwicklung geben Pantophysin-*knockout* Mäuse (Eshkind und Leube unveröffentlicht). Eine Beteiligung an der Formgebung der Muskeltriade legen Mitsugumin 29-*knockout* Mäuse nahe¹²¹.

Ziel dieser Arbeit war es, die Funktion der TVPs in einem weniger komplexen System zu untersuchen. Um dies zu erreichen, wurde der Modellorganismus *C. elegans* gewählt. Im *C. elegans* Genom sind drei TVP-Orthologe bekannt. Dabei kann jeweils eins der *C. elegans* Säugetier-TVP-Varianten zu einer der drei TVP-Familien (Physin-, Gyrin- und SCAMP-Familie) zugeordnet werden^{1,73}.

5.1 Die TVPs in *C. elegans* sind mit denen der Maus verwandt

Es konnte experimentell gezeigt werden, dass die vorhergesagte SPH-1 Sequenz mit dem ungewöhnlich langen und hydrophoben N-Terminus⁷³ nicht mit der tatsächlichen Sequenz übereinstimmt. Ein erneuter Sequenzvergleich der korrigierten SPH-1-Sequenz mit den Synaptophysin-Varianten anderer Tierarten zeigte, dass die überarbeitete SPH-1-Sequenz den Sequenzen der anderen Synaptophysine nun deutlich mehr ähnelt. Aufgrund der Ähnlichkeit aller TVPs aus *C. elegans* mit denen der Säugetiere kann vermutet werden, dass diese auch gleiche Funktionen haben könnten. Diese Tatsache macht den Modellorganismus *C. elegans* zu einem hervorragenden Untersuchungsobjekt, um die Rolle der TVPs zu analysieren.

Das Cladogramm zeigt weiterhin, dass die *C. elegans* TVPs näher mit einer TVP-Urvariante verwandt sind, als die TVPs aus der Maus. Durch die Cladogrammanalyse werden zwei große Phyla postuliert: das SCAMP-Phylum und das Physin-Gyrin-Phylum. Diese Unterteilung in verschiedene Phyla könnte auch auf einen funktionellen Unterschied dieser TVPs hinweisen.

Durch die Sequenzgegenüberstellung konnte außerdem gezeigt werden, dass die Transmembrandomänen stark konservierte Breiche darstellen und ein wesentliches Strukturmerkmal sind⁷³. Vermutlich handelt es sich um wichtige Interaktionsdomänen. So sind sie bei Synaptophysin an der Wechselwirkung mit Synaptobrevin beteiligt¹⁸⁰, oder bei der SCAMP-Complexin Assoziation von Bedeutung (*Shestopal und Castle, ASCB 2006*).

5.2 Ektopisch in PLC-Zellen synthetisierte *C. elegans* TVPs sind vesikulär verteilt

Alle TVPs sind auf vesikulären Zellorganellen zu finden⁷³. Durch transiente Transfektion der *C. elegans* TVPs in humane Leberkarzinomzellen (PLC-Zellen) konnte gezeigt werden, dass die *C. elegans* TVPs wie ihre Säugetierorthologe in die gleichen subzellulären und vesikulären Strukturen sortiert werden⁷³. Dabei sind die *C. elegans* TVPs auch untereinander redundant, da alle drei TVPs in den

gleichen vesikulären Kompartimenten kolokalisieren. Diese Kolokalisierung konnte schon für SCAMP mit Pantophysin und SCM-1 mit SNG-1 in transfizierten PLC-Zellen gezeigt werden⁷³. Eine solche Redundanz der TVPs wird auch in der Synaptophysin 1-*knockout* Maus vermutet, da hier keine neuronalen Defizite gefunden wurden^{47, 109}. Lediglich in den Terminalen der Photorezeptorzellen konnten leichte Veränderungen nachgewiesen werden, da dort die sonst in vielen Neuronen enthaltenen TVPs Synaptoporin und Synaptogyrin 1 fehlen¹⁴⁶.

Das vesikuläre Verteilungsmuster konnte auch mit Hilfe der spezifischen *C. elegans* TVP-Antikörper in transient transfizierten PLC-Zellen bestätigt werden. Somit ist ein vesikuläres Verteilungsmuster der *C. elegans* TVPs auch im Wurm zu erwarten.

5.3 Die *C. elegans* TVPs werden in unterschiedlichen Geweben exprimiert

Da mit den Antikörpern keine eindeutigen Ergebnisse erzielt wurden, wurden die Verteilungsinformationen der *C. elegans* TVPs durch Mikroinjektion von Transkriptions- und Translationkonstrukten untersucht.

Während Synaptogyrin (SNG-1) fast ausschließlich neuronal zu finden ist, weisen die anderen TVPs Synaptophysin (SPH-1) und SCAMP (SCM-1) ein sehr unterschiedliches Verteilungsmuster auf, welches in einigen Geweben überlappt. In Säugetieren werden die verschiedenen TVP-Varianten in sehr unterschiedlichen Zellen bzw. Geweben synthetisiert, wobei Synaptophysin 1, Synaptoporin, SCAMP 5, Synaptogyrin 1 und 3 fast ausschließlich eine neuronale Verteilung zeigen^{18,73}.

5.3.1 Verteilungsmuster von Synaptophysin (SPH-1) in *C. elegans*

SPH-1 ist hauptsächlich auf vesikulären Strukturen in Geweben lokalisiert, die sekretorisch sehr aktiv sind. U. a. ist es in den Darmzellen, die die Nahrung verdauen, auf der gesamten Oberfläche der exkretorischen Kanal- und Gangzelle, die für die Osmoregulation wichtig sind, und in den rektalen Drüsenzellen, die Verdauungsenzyme in den Darm absondern⁶, lokalisiert. Sehr schwach ist SPH-1 in den Coelomozyten, makrophagenähnlichen phagozytierenden Zellen, nachweisbar.

In den Darmzellen ist SPH-1 in einem fein punktierten Muster auf der apikalen Seite oberhalb des *terminal webs* vorhanden. Dort befinden sich die Mikrovilli der Darmoberfläche. Neben dieser apikalen Lokalisierung ist SPH-1::YFP auch auf vesikulären Strukturen in den anterioren und posterioren Darmzellen unterhalb des *terminal webs* zu finden. Hier kolokalisiert SPH-1 ebenfalls mit der IFB-2 Komponente des *terminal webs*. Im mittleren Darmbereich fehlt eine solche vesikuläre Kolokalisierung in den Darmzellen. Welche Bedeutung diese Kolokalisierung hat ist unbekannt und ob auch die anderen fünf Intermediärfilamente, die im Darm exprimiert werden (*Hüsken et al., 2007* unveröffentlicht), mit diesen Vesikeln assoziiert sind, wurde nicht untersucht. In Säugetieren konnte,

im Gegensatz zu *C. elegans*, kein Synaptophysin in intestinalen Geweben nachgewiesen werden. Hier ist Pantophysin der Physin-Vertreter, der hauptsächlich im Darmgewebe vorliegt^{73, 175}.

Im Gegensatz zur SPH-1-Translationschimäre ist die SPH-1-Transkriptionschimäre in den pharyngealen Muskel- und rektalen Drüsenzellen sowie in neuronalen Zellen im Pharynx nachweisbar. Um welche Neurone es sich dabei handelt, konnte aufgrund der starken pharyngealen Expression nicht bestimmt werden. Die Marginalzellen, die zwischen der Pharynxmuskulatur liegen, sind frei von SPH-1, welches besonders gut in den Animationen (Film 01, Film 02) zu erkennen ist. Ebenso fehlt die intestinale Expression bei den Transkriptionschimären komplett.

5.3.2 Verteilungsmuster von Synaptogyrin (SNG-1) in *C. elegans*

Synaptogyrin ist in *C. elegans* fast ausschließlich im Nervensystem lokalisiert. Diese neuronale Verteilung konnte auch schon in anderen Arbeiten gezeigt werden, die von einer exklusiven panneuronalen Verteilung ausgeht^{1, 118, 136, 182}. Hier konnte jedoch gezeigt werden, dass SNG-1 nicht in allen Neuronen vorhanden ist. So kommt SNG-1 z. B. nicht in anterioren Amphid- (ASI, ADL, ASK, AWB, ASH, ASJ) und posterioren Phasmidneuronen (PHA, PHB) und im Neuron SQLR vor, welches auf der rechten, anterior der Vulva gelegenen Körperhälfte positioniert ist. Dass Synaptogyrin nicht im gesamten Nervensystem exprimiert wird, konnte auch in der Maus gezeigt werden. So fehlt es z. B. in den Terminalen der Photorezeptoren¹⁴⁶.

Neben der neuronalen Verteilung ist Synaptogyrin aber auch in vier nichtneuronalen, gliaähnlichen Zellen (CEPsh) nachweisbar. Die CEPsh-Zellen gehören zu den 24 sog. *sheath* Gliazellen, die die Dendriten sensorischer Neurone umhüllen¹⁴⁰. Dabei umhüllen sie mit ihren bipolaren Fortsätzen die Dendriten und den Nervenring und ähneln anatomisch den Astrozyten der Säugetiere¹⁴⁰. Die restlichen 26 der 50 Gliazellen in *C. elegans* gehören zu der sog. *socket glia*¹⁴⁰. Dass TVPs in Gliazellen vorkommen, konnte auch in den Astrozyten der Ratte immunohistologisch nachgewiesen werden, in denen neben SCAMP 1, Synaptophysin 1 in geringen Mengen exprimiert wird¹⁷². Interessant ist, dass auch Cellugyrin (Synaptogyrin 2) angeblich in Gliazellen zu finden ist⁷⁹, doch konnte dies bisher noch nicht gezeigt werden.

5.3.3 Verteilungsmuster von SCAMP (SCM-1) in *C. elegans*

Das Verteilungsmuster der SCM-1-Translationschimäre zeigt, dass SCM-1 in mehreren Zellarten stark produziert wird. Neben dem Darm, Pharynx und den Coelomozyten ist es u. a. in der analogen quergestreiften und glatten Muskulatur vertreten. In der Muskulatur ist SCM-1 sowohl auf der Plasmamembran als auch im Bereich der *dense bodies* zu finden. Bei den *dense bodies* handelt es sich um eine Struktur, die den T-Tubuli und der Z-Scheibe entspricht⁶ (siehe Abbildung 5-1). An diesen *dense bodies* ist das Ryanodinrezeptorortholog UNC-68 (ein Kalziumkanal) auf dem

5. Diskussion

sarkoplasmatischen Retikulum (SR) lokalisiert ¹⁰⁴. Dieser Ryanodinrezeptor (RyR) ist in den Säugetieren für die kalziumvermittelte Muskelkontraktion verantwortlich ². In *C. elegans* wird diese Funktion hauptsächlich von dem spannungsgesteuerten Ca²⁺-Kanal EGL-19 (das Ortholog des Dihydropyridinrezeptors in *C. elegans*), der sich auf der Plasmamembran befindet, übernommen ^{89, 96, 104}.

Interessanterweise ist das TVP Mitsugumin 29 in der Maus sowohl in der T-Tubulus-Membran, in der sich der Dihydropyridinrezeptor (DHPR) befindet, als auch auf dem sarkoplasmatischen Retikulum, wo der Ryanodinrezeptor (RyR) gelegen ist, lokalisiert ¹⁶⁸. Da SCM-1 auch in der Plasmamembran und auf den Muskelarmen zu finden ist (Film 20), könnte SCM-1 in *C. elegans* eine analoge Funktion wie Mitsugumin 29 in der Säugetiertriade ¹⁵⁷ übernehmen.

Bei den Muskelarmen handelt es sich um Fortsätze, die *en passant* Kontakt mit den Axonen der Motoneurone aufnehmen und die neuromuskuläre Endplatte bilden ¹⁷⁰. Diese Lokalisierung von SCM-1 könnte einen weiteren Hinweis darauf geben, dass SCM-1 eine Funktion bei der kalziumvermittelten Muskelantwort haben könnte. Dieses konnte für Mitsugumin 29 in Zellen gezeigt werden. Dort wird durch den Ryanodinrezeptor in Gegenwart von Mitsugumin 29 Ca²⁺ freigesetzt, welches in diesen Zellen die Apoptose induziert ¹²⁰.

SCAMP ist ebenso auf der gesamten Oberfläche der analogen glatten Muskulatur zu finden, wo es eine ähnliche Funktion wie in der analogen quergestreiften Muskulatur übernehmen könnte. Die einzige Muskulatur, in der kein SCM-1 nachgewiesen werden konnte, ist die Vulvamuskulatur, wobei das Vulvaepithel positiv für SCM-1 ist.

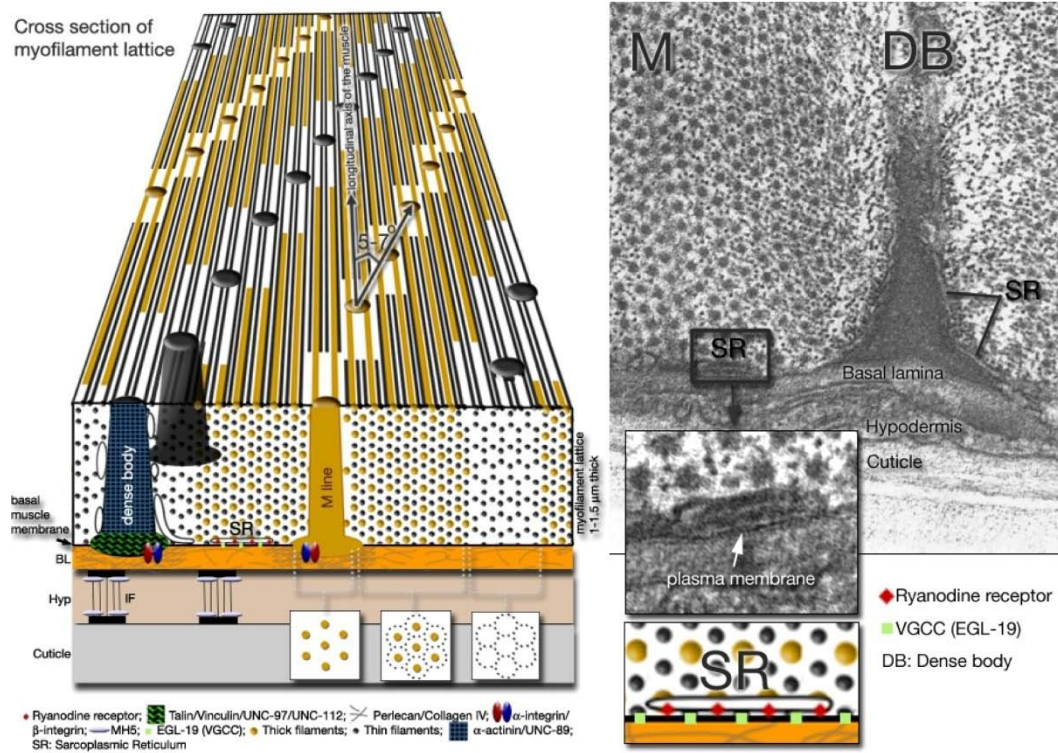


Abbildung 5-1 Ultrastruktur der *dense bodies* in der *C. elegans* Muskulatur⁶.

Dense bodies (DB) sind die Anlagerungspunkte der Myofibrillen und im Aufbau den fokalen Kontakten der Wirbeltiere analog⁷⁵. Sie enthalten Integrin (α -Integrin = PAT-2 / β -Integrin = PAT-3) und verankern die dünnen Filamente (Aktin) mit der extrazellulären Matrix³⁹, so dass eine der Z-Scheibe ähnliche Struktur entsteht. Die *dense bodies* enthalten ebenso andere orthologe Komponenten der fokalen Kontakte: das aktinbindende DEB-1 (Vinculin), ATN-1 (α -Actinin), ein Talin-Ortholog, UNC-97 (PINCH), UNC-112 (Mig-2), PAT-4 (ILK) und PAT-6 (Actopaxin)³⁹. In der Nähe dieser *dense bodies* unterhalb der Plasmamembran liegen die Vesikel des sarkoplasmatischen Retikulums (SR), auf denen UNC-68 (RyR) lokalisiert ist⁶. Hingegen ist EGL-19 (DHPR, VGCC) auf der gesamten Plasmamembran der Muskelzelle (M) verteilt⁶.

Die SCM-1-Transkriptionschimäre zeigt u. a. ein asymmetrisches Expressionsmuster in den Amphidneuronen. Solches wurde für unterschiedliche Gene in den Amphidneuronen AWC und ASE wie z. B. den sieben Transmembranrezeptor (*str-2*) und die putativen Rezeptorguanylylcyclase Gene (*gcy*) in *C. elegans* beschrieben^{126, 163}, woraus auch eine funktionelle Asymmetrie resultieren kann³². Bemerkenswert ist, dass *Sun et al., 2005* durch quantitative Transkriptionsanalyse eine solche links/rechts-Asymmetrie auch im menschlichen Gehirn nachweisen konnten¹⁵⁴. Somit ist die asymmetrische Genaktivität ein Phänomen, welches keine Besonderheit des Nematoden Phylums darstellt. SCM-1 könnte somit eine Funktion in diesen sensorischen Neuronen ausüben, die für die asymmetrische Verteilung von bestimmten Molekülen, die z. B. an der Reizwahrnehmung bzw. der synaptischen Übertragung beteiligt sind. Hier gilt es, auch mit anderen Farbstoffen zu ermitteln um welche weiteren drei Amphidneurone es sich handelt, da von Dil nur sechs der insgesamt 12 Amphidneurone markiert werden⁶.

Neben SNG-1 ist auch SCM-1 in gliaähnlichen Zellen (AMsh) zu finden, die ebenfalls zur sog. sheath Glia zählen. Während SNG-1 nicht in Gliazellen anderer Spezies nachgewiesen werden konnte, ist

SCAMP u. a. in Astrozyten zu finden¹⁷². Bei den AMsh-Zellen handelt es sich um gliaähnliche Zellen, in die z. B. die dendritische Endigung des AWC Amphidneurons eingebettet ist¹⁴⁰.

5.3.4 Die *C. elegans* TVPs zeigen eine vesikuläre Verteilung

Das punktierte Verteilungsmuster der Translationschimären weist auf eine vesikuläre Verteilung der TVPs in *C. elegans* hin, wie dies bereits in PLC-Zellen gezeigt werden konnte und postuliert wurde⁷³. Das Expressionsmuster der SNG-1::YFP Chimäre deutet auf eine Verteilung an den synaptischen Endigungen hin, wo es möglicherweise auf allen synaptischen Vesikeln lokalisiert ist^{73, 118}.

5.3.5 Es gibt Unterschiede in der Verteilung der Transkriptions- und Translationschimären

Beim Vergleich von Transkriptions- und Translationschimären zeigten sich deutliche Unterschiede zwischen den beiden Konstrukttypen. Während bei den Transkriptionschimären transiente, teils schwache oder starke Expressionsmuster zu sehen waren, konnten bei den Translationschimären kontinuierlich stabile Muster nachgewiesen werden. Ein Grund für die unterschiedlichen Verteilungsmuster könnte in der Stabilität des Fluoreszenzproteins liegen, welches als Reporter eine kürzere Halbwertszeit haben könnte, während es am Translationsprodukt gekoppelt eine längere Halbwertszeit aufweisen würde. Rückschließend würde dies bedeuten, dass die *C. elegans* TVPs eine lange Halbwertszeit hätten.

Der Vergleich der verschiedenen *C. elegans* Chimären zeigt, dass das Expressionsmuster für die SNG-1 Transkriptions- und Translationschimäre konstant fast ausschließlich neuronal und es in keinen anderen Zellen außer den gliaähnlichen Zellen (CEPsh) zu finden ist. Hingegen ist das Muster der beiden SPH-1 Chimärtypen abweichend. Im Gegensatz zur Translationschimäre ist die Transkriptionschimäre nicht im Darm, in den exkretorischen Zellen und den Coelomozyten zu finden. Auch die Verwendung einer längeren Promotersequenz, die zusätzlich das benachbarte intergenische Gen beinhaltet, führt zu gleichen Ergebnissen. Bemerkenswert ist, dass durch die Wahl des längeren Promoters auch Neurone im Pharynx beobachtet werden können.

Die wohl unterschiedlichste Verteilung konnte für SCM-1 beim Vergleich der beiden Chimären gefunden werden. Während die Translationschimäre fast kein neuronales Expressionsmuster zeigt, sind einige Neurone für die SCM-1 Promoteraktivität der Transkriptionschimäre positiv. Auch ist eine Expression in den Spermathekezellen zu finden, gleichzeitig ist eine sehr schwache Fluoreszenz in den Muskelzellen vorhanden, während es in der Translationschimäre in der gesamten Entwicklung in der Muskulatur zu beobachten ist.

5.4 Die TVPs werden früh in der Entwicklung von *C. elegans* exprimiert

5.4.1 Expression von Synaptophysin (SPH-1) in verschiedenen Entwicklungsstadien

Die SPH-1 Translationschimäre wird ab dem Gastrula-Stadium in der Plasmamembran der zukünftigen Pharynx- und Darmzellen exprimiert. Während der weiteren Entwicklung kommt es zu einer apikalen Lokalisierung im Pharynx und Darm. Ein ähnliches Verteilungsmuster ist auch im adulten Tier zu finden, wie bereits in 5.3.1 beschrieben. Ob diese apikale Lokalisierung in cholesterinhaltigen Mikrodomänen erfolgt, ist unbekannt.

Das punktierte Muster in den Entwicklungsstadien weist auch hier auf eine vesikuläre Lokalisierung hin. Die Expression von SPH-1 während der Gastrulation könnte ein Hinweis sein, dass SPH-1 ähnlich dem Pantophysin während der Entwicklung eine wichtige Rolle spielt, jedoch konnte diese Hypothese nicht bestätigt werden ¹. Die Transkriptionschimäre wird ähnlich wie die Translationschimäre im Pharynx synthetisiert, jedoch fehlt die Expression im Darm in der gesamten Entwicklung bis einschließlich dem adulten Tier. Hingegen ist eine transiente Expression in den ventralen longitudinalen Körperwandmuskeln zu beobachten. Bei beiden Chimären ist recht früh auch posterior im Bereich der rektalen Drüsenzellen bzw. analen Sphinkter Fluoreszenz nachweisbar. Aufgrund des unterschiedlichen Verteilungsmusters der beiden Chimären könnte vermutet werden, dass hier regulatorische Elemente im *sph-1* enthalten sind, die z. B. die Expression im intestinalen Gewebe steuern. Da die beiden Chimären den gleichen Promoter verwenden, könnten diese Regulatoren im Gen selbst liegen.

5.4.2 Expression von Synaptogyrin (SNG-1) in verschiedenen Entwicklungsstadien

Synaptogyrin wird mit Beginn der Neurulation im Komma-Stadium von *C. elegans* exprimiert. Hier könnte die frühe Expression darauf hinweisen, dass SNG-1 während der neuronalen Entwicklung bzw. Spezifizierung eine wichtige Rolle spielt. Im Vergleich zu den anderen TVP-Chimären haben die SNG-1 Chimären das kontinuierlichste Verteilungsmuster, da sie während der gesamten Entwicklung in Neuronen zu finden sind. Dies lässt die Vermutung zu, dass SNG-1 in diesen Neuronen eine entscheidende Aufgabe übernimmt. Dass TVPs während der Entwicklung von Bedeutung sind, konnte bisher nur für die Physin-Varianten Pantophysin (Eshkind und Leube unveröffentlicht) und Mitsugumin 29 ^{121, 157} gezeigt werden.

5.4.3 Expression von SCAMP (SCM-1) in verschiedenen Entwicklungsstadien

SCM-1 zeigt eine kontinuierliche anteriore asymmetrische Verteilung in den Amphidneuronen einer Seite. Hier könnte SCM-1 während der Entwicklung an der bilateralen Musterbildung beteiligt sein, wie dieses für unterschiedliche Gene beschrieben wurde (siehe 5.3.3), so dass in *C. elegans* ein

unterschiedliches Expressionsmuster in der linken und rechten Körperhälfte vorhanden ist. Somit könnte SCM-1 eine wichtige Rolle beim Aufbau dieser Asymmetrie spielen.

5.5 Es gibt Gewebe in *C. elegans*, in denen keine TVPs exprimiert werden

Neben den unterschiedlichen Expressionsmustern der TVPs gibt es auch Gewebe, in denen keine Expression der TVPs gefunden wurde (siehe ebenso Tabelle 4-3). Zu diesen Geweben zählen u. a. die Hypodermis, die sog. *seam* Zellen, bestimmte Neurone (z. B. die uterinen und Phasmideneurone), Gonadenepithel und DTC (*distal tip cell*). Solche distinkten Verteilungsmuster wurden auch für die TVPs der Säugetiere beschrieben⁷³. Hier sind z. B. Synaptophysin 1 und Synaptogyrin 1 ausschließlich im Gehirn vorhanden, während Mitsugumin 29 ausschließlich in der Muskulatur zu finden ist⁷³. Die unterschiedlich verteilte Expression könnte zum Einen an der Wahl der Konstrukte liegen, wie dies für unterschiedliche SNG-1 Transkriptionschimären gezeigt wurde¹³⁶, oder zum Anderen daran, dass diese Gewebe generell keine TVPs exprimieren. Andererseits sind sehr schwache Expressionen nicht auszuschließen, wie dieses z. B. für die Expression von SPH-1 in den Coelomozyten beobachtet wurde. Ebenso sollte dieses Verteilungsmuster durch immunohistologische Untersuchungen verifiziert werden, wobei zunächst die widersprüchlichen Immuno-Blot Ergebnisse geklärt werden müssten.

Ein Nachteil ist, dass es fast unmöglich ist, außer dem Darm andere Gewebe aus *C. elegans* zu isolieren. Hier könnte die Methode der Einzelzell-RT-PCR helfen, wobei das komplette Zytoplasma einer Einzelzelle (z.B. der großen Muskel- oder Darmzellen) entnommen und analysiert werden kann, wie dies bereits bei der *patch-clamp* Methode an Neuronen durchgeführt wurde³⁴.

Da die *C. elegans* TVPs ein vielfältiges Verteilungsmuster zeigten, könnten die TVPs eine wichtige Rolle bzw. Aufgabe in diesen Geweben erfüllen, weshalb im weiteren Verlauf der Arbeit die TVP-Mutanten näher untersucht wurden.

5.6 Die Entwicklung der TVP-Mutanten ist auch in Abwesenheit von Cholesterin normal

Synaptophysin interagiert mit Cholesterin. Diese Interaktion spielt eine wichtige Rolle bei der Vesikelbiogenese¹⁵⁹. *C. elegans* benötigt sehr wenig Cholesterin. Dieses kann das Tier nicht *de novo* synthetisieren. Cholesterin übernimmt jedoch keine Hauptfunktion bei der Strukturbildung von Membranen in *C. elegans*⁹⁴. Dennoch zeigen Tiere, die unter cholesterinfreien Bedingungen kultiviert werden, schwere Entwicklungsdefekte⁹⁴. Cholesterin und dessen Derivate spielen hierbei wahrscheinlich eine Hauptrolle bei Signalprozessen (z. B. Signalwege, die an der Bildung des Dauer-Stadiums beteiligt sind) und agieren hier vermutlich als Hormone^{46, 94}.

Interessanterweise ist der Hauptanteil an Cholesterin in *C. elegans* auf der apikalen Darmzellseite, in den exkretorischen Drüsenzellen, im Pharynx, in den sensorischen Amphiden und im Nervenring (neben den Spermien und Oozyten) zu finden⁹⁴, in denen auch die TVPs exprimiert werden (siehe 5.3). Da Cholesterin in Mikrodomänen (*rafts*) assoziiert ist, könnte hier ein möglicher Hinweis dafür liegen, dass z. B. SPH-1 in solchen Mikrodomänen an die apikale Seite der Darmzelle sortiert wird. Doch steht dies im Widerspruch mit der Hypothese, dass Cholesterin in *C. elegans* nicht an der Bildung von Mikrodomänen beteiligt ist⁹⁴.

Unter cholesterinfreien Bedingungen zeigt die TVP-Dreifachmutante ein normales Fortbewegungsmuster, auch konnten keine Entwicklungsunterschiede zwischen cholesterinfreien und cholesterinhaltigen Bedingungen festgestellt werden, welches sich in Größe und Dynamik der Nachkommenzahl widerspiegelt. Selbst Photoaffinitätsmarkierungen synaptischer Vesikel mit einem Cholesterinanalogue zeigten keine Unterschiede in der Bindung von Cholesterin, was daraufhin deutet, dass hier Cholesterin möglicherweise keine wichtige Rolle spielt. Dies steht im Widerspruch zur Beobachtung, dass synaptische Vesikelmembranen der Maus stärker mit Cholesterin angereichert sind, als die Plasmamembran, und dass es durch Verminderung des Cholesteringehaltes in der Membran zu einer Reduzierung des Synaptophysin/Synaptobrevin-Komplexes kommt¹¹¹. Dennoch könnten TVPs an der Bildung von den cholesterinhaltigen Mikrodomänen¹⁴⁴ beteiligt oder in diesen enthalten sein, da einige der *C. elegans* TVPs in den Geweben zu finden sind, in denen der Hauptanteil an Cholesterin vorliegt.

5.7 Die Struktur der synaptischen Vesikel in den TVP-Mutanten ist normal

Analysen der synaptischen Ultrastuktur der TVP-Dreifachmutante mit Hilfe der Elektronenmikroskopie zeigten, dass die TVPs nicht wichtig für die Strukturgebung der Vesikel sind¹, was aufgrund der TVP-Domänenstruktur in früheren Studien vermutet wurde^{65, 159}. Es wurden keine Unterschiede in der Vesikelgröße der TVP-Dreifachmutante gefunden, obwohl postuliert wurde, dass Synaptophysin an der Formgebung von stark gekrümmten Membranen beteiligt sein könnte¹⁵⁹. Die Beteiligung von Proteinen mit vier Transmembrandomänen an der Aufrechterhaltung von stark gekrümmten Membranregionen konnte bisher nur für Peripherin, ein dem Synaptophysin strukturell ähnliches Protein, welches in den Photorezeptoren vorkommt, gezeigt werden^{7, 37}.

Da in den Vesikelgrößen keine Unterschiede gefunden wurden, kann gefolgert werden, dass hier weder Synaptophysin noch die Interaktion von Synaptophysin mit Cholesterin eine wichtige Funktion erfüllen. Eher scheint hier die Lipidzusammensetzung eine wesentliche Rolle bei der Krümmung der Vesikelmembran zu spielen¹¹⁰.

5.8 In der TVP-Dreifachmutante sind die Vesikel in cholinergen Synapsen normal verteilt

Für die Photorezeptoren der Synaptophysin1-*knockout* Maus wurde bereits ein signifikanter Unterschied in der Anzahl der synaptischen Vesikel im Vergleich zu Wildtypmäusen beschrieben¹⁴⁶. Doch bei der Analyse cholinergischer Synapsen in *C. elegans* konnte kein signifikanter Unterschied in der Anzahl und in der Verteilung der synaptischen Vesikel nachgewiesen werden¹. Des Weiteren konnten keine Veränderungen im Axolemma beobachtet werden, die auf strukturelle Defekte hinweisen könnten.

Interessanterweise wurde in einer einzigen GABAergen Synapse ein Unterschied in der Anzahl der Vesikel festgestellt. Jedoch muss dieser Wert statistisch verifiziert und abgesichert werden.

5.9 Hinweise auf eine mögliche Funktion der TVPs in einem alternativen Endozytoseweg

Obwohl keine Unterschiede in der Vesikelanzahl cholinergischer Synapsen der TVP-Dreifachmutante nachgewiesen wurden, weisen diese eine signifikant erhöhte Anzahl Clathrin-ummantelter Vesikel auf. Solch eine Erhöhung Clathrin-ummantelter Vesikel wurde schon für die Synaptophysin 1-*knockout* Maus¹⁴⁶ und in Experimenten an Tintenfischaxonen⁴⁰ beobachtet. Dies unterstützt die Hypothese, dass TVPs an einem Clathrin-unabhängigen Endozytoseweg beteiligt sein könnten⁴⁰⁻⁴². In wie weit an diesem Weg Synaptobrevin beteiligt ist, ist unbekannt, jedoch ist in der Synaptobrevin 2-*knockout* Maus der schnelle und Clathrin-unabhängige Endozytoseweg gestört⁴². Somit scheint zumindest Synaptobrevin an diesem alternativen Weg beteiligt zu sein. Ob hierbei eine Interaktion der beiden Moleküle (Synaptophysin und Synaptobrevin) wichtig ist, muss noch geklärt werden.

5.10 Keine Veränderungen in der neuronalen Entwicklung der TVP-Dreifachmutante

Viele Gene sind an der neuronalen Differenzierung und axonalen Wegfindung von Neuronen beteiligt. Dazu gehören u. a. Transkriptionsfaktoren wie UNC-30, welcher das Schicksal GABAerger Neurone definiert^{84, 107}. Aber auch über die Beteiligung von Neurotransmittern (z. B. GABA) an der neuronalen Entwicklung wurde spekuliert¹⁷. Doch konnte in Untersuchungen an UNC-25 (Glutamatdecarboxylase, GAD) Mutanten gezeigt werden, dass GABA bei der neuronalen Gestaltung keine Rolle spielt⁸⁵. Auch in dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass TVPs keinen Einfluss auf die neuronale Differenzierung und axonale Wegfindung haben. Sowohl die Amphide der TVP-Dreifachmutante als auch das GABAerge Nervensystem sind normal entwickelt.

Dieses steht im Widerspruch dazu, dass die TVPs schon relativ früh in der Entwicklung exprimiert werden. Vor allem die neuronale Expression von SNG-1 und die links/rechts Asymmetrie der SCM-1 Expression lassen eine Funktion während der Entwicklung vermuten.

5.11 Die TVP-Mutanten zeigen eine normale Synaptobrevinverteilung an den Synapsen

Ultrastrukturell konnte gezeigt werden, dass die TVP-Dreifachmutanten normale Synapsen ausbilden. Des Weiteren konnten keine Unterschiede in der Verteilung von Synaptobrevin, dem Interaktionspartner der Synaptophysine¹⁵, an den synaptischen Verdichtungen in der *C. elegans* TVP-Dreifachmutante beobachtet werden. Im Gegensatz dazu steht die Beobachtung, dass Synaptophysin an der Sortierung von Synaptobrevin beteiligt sein soll^{28, 123} und in Synaptophysin 1-*knockout* Mäusen eine leichte Verringerung der Verteilung von Synaptobrevin in Synapsen nachgewiesen werden konnte¹⁰⁹. Jedoch wurden keine Expressionsunterschiede in diesen Mäusen gefunden⁹. In *C. elegans* wird hauptsächlich SNG-1 im Nervensystem exprimiert, was vermuten lässt, dass SNG-1 und nicht SPH-1 der Hauptinteraktionspartner von SNB-1 im Nervensystem sein könnte, welches experimentell noch zu untersuchen ist.

5.12 Unter normalen Bedingungen zeigen TVP-Mutanten keinen neuronalen Phänotyp

Unter normalen Bedingungen konnten in den Tieren der TVP-Dreifachmutante keine signifikanten neuronalen Defizite beobachtet werden. Die TVP-Mutanten bewegen sich normal in einem sinusförmigen Muster, reagieren normal auf chemische und mechanische Reize, haben ein normales pharyngeales Pumpverhalten und einen normalen Defäkationszyklus. Die TVP-Dreifachmutanten haben ein normales chemotaktisches und adaptives Verhalten gegenüber attraktiven Odorantien, sie zeigen auch ein normales Vermeidungsverhalten in Gegenwart von 4 M Fructose.

Da SCM-1 als einziges TVP in den Amphidneuronen detektiert wurde und dazu eine laterale Asymmetrie aufweist, stellt sich die Frage, ob nicht durch andere attraktive oder repulsive Geruchstoffe, die durch unterschiedliche Rezeptoren wahrgenommen werden, Defizite aufgedeckt werden könnten. In Arbeiten, in denen die asymmetrische Expressionsverteilung untersucht wurde, konnte beobachtet werden, dass Mutanten, in denen die asymmetrische Expression fehlt, gegenüber unterschiedlichen Odorantien normale bzw. anormale Reaktionen zeigen^{32, 169}.

Gegenüber Aldicarb (einem Acetylcholinesteraseinhibitor) zeigt die TVP-Dreifachmutante bei unterschiedlichen Konzentrationen und Temperaturen eine normale Reaktion. Auch im kognitiven Thermotaxistest konnten keine Unterschiede im Vergleich zum Wildtyp festgestellt werden, obwohl in Synaptophysin 1/Synaptogyrin 1-*knockout* Mäusen Unterschiede in der synaptischen Plastizität (LTPs und STPs) gefunden wurden⁸⁰.

5.13 Die cholinergen Motoneurone der TVP-Mutanten zeigen elektrophysiologisch normale Antworten

Die Verhaltenstests haben bereits gezeigt, dass TVPs unter normalen Bedingungen für neuronale Funktionen nicht notwendig sind. Um zu untersuchen, ob feine, nicht mit den Tests nachweisbare Defizite in den TVP-Dreifachmutanten zu finden sind, wurden die Antworten im cholinergen Nervensystem untersucht. Doch konnten auch elektrophysiologisch keine Unterschiede zwischen TVP-Dreifachmutante und Wildtyp in den Antworten der cholinergen Synapsen gefunden werden. Das steht im Widerspruch zu den Ergebnissen der Synaptophysin 1/Synaptogyrin 1-*knockout* Mäuse, in denen eine veränderte synaptische Plastizität beobachtet wurde⁸⁰.

5.14 TVP-Mutanten zeigen eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber PTZ

Durch den GABA-Antagonist PTZ (Pentylentetrazol) können in *C. elegans* ab einer Konzentration von ≥ 20 mg/ml epilepsieähnliche Verkrampfungen hervorgerufen werden¹⁷⁴. Dieses Verkrampfen wird durch Inhibition des GABA-Rezeptors und somit des postsynaptischen Signals hervorgerufen. Dadurch kann es zu keiner Relaxation der cholinergen Kontraktion kommen und das Tier zeigt ein verkrampftes Verhalten.

Bereits in Gegenwart von niedrigen Konzentrationen des GABA-Rezeptorinhibitors PTZ (≥ 4 mg/ml) weist die TVP-Dreifachmutante ein verstärktes Krampfverhalten auf. Dieser Phänotyp konnte bereits in Untersuchungen mit der SNB-1 Mutante in *C. elegans* beobachtet werden¹⁷⁴. Dabei blockiert PTZ den GABA-Rezeptor in einer konzentrationsabhängigen kompetitiven Weise und verhindert somit die Übertragung des inhibierenden relaxierenden Signals auf die Muskelzelle. Da TVPs bei der Exozytose eine wichtige Funktion übernehmen könnten^{109, 152} und gezeigt wurde, dass Synaptophysin 1/Synaptogyrin 1-*knockout* Mäuse Defizite in der synaptischen Plastizität aufweisen⁸⁰, könnten TVPs bei der schnellen Übertragung von synaptischen Antworten eine entscheidende Rolle spielen. Es wurde bereits postuliert, dass TVPs an einer Form der Exozytose, die als *kiss and run* und/oder *kiss and stay* bezeichnet werden, beteiligt sein könnten¹⁶⁵. Hier könnten kurze und schnelle Neurotransmitterausschüttungen zu einer Erhöhung der GABA-Konzentration im synaptischen Spalt führen, da Vesikel an Ort und Stelle rezirkuliert werden können und einer wiederholten Antwort wieder zur Verfügung stehen. Wichtig hierfür ist auch die schnelle Wiederbefüllung des Vesikels mit dem Neurotransmitter GABA. An dieser Wiederbefüllung könnten TVPs indirekt beteiligt sein, da Synaptophysin 1 im Komplex mit Synaptobrevin mit der V-ATPase assoziiert ist^{55, 161}.

Auch könnten die TVPs an der Endozytose beteiligt sein, da Synaptophysin 1 mit Adaptorproteinen (AP1) interagiert⁷¹ und Adaptorprotein-*knockout* (AP3 μ 3B) Mäuse epileptische Verkrampfungen und Defizite in der synaptischen Übertragung zeigen¹¹⁶. Hier sind die Adaptorproteine an der Sortierung

5. Diskussion

des VGAT (*vesicular GABA transporter*) beteiligt¹¹⁶.

Der verstärkte Krampfphänotyp ist auch in den *C. elegans* TVP-Einzelmutanten zu beobachten, wobei die SNG-1 Mutante die stärkste Ausprägung zeigt. Während SNG-1 im gesamten GABAergen Nervensystem vorhanden ist, konnte SCM-1 nur in wenigen und SPH-1 in keinen GABAergen Neuronen nachgewiesen werden. Es stellt sich daher die Frage, ob hier das Expressionsmuster, welches für die Transkriptionschimären nachgewiesen werden konnte, auch der tatsächlichen Expression entspricht. Der PTZ-Phänotyp ist zwar schwächer in der SPH-1-Mutante ausgeprägt, aber dennoch deutlich vorhanden. Dies könnte natürlich auch dafür sprechen, dass hier SPH-1 ähnlich wie in den Coelomozyten nur in geringen Mengen exprimiert wird.

Des Weiteren zeigen die Phänotypen der TVP-Einzelmutanten, dass dieser PTZ-Phänotyp für alle drei TVPs dominant ist, wohingegen je nach Mutante unterschiedliche Ausprägungen vorhanden sind. Jedoch ist der Phänotyp der TVP-Dreifachmutante kein additiver Effekt aus den Phänotypen der TVP-Einzelmutanten. Interessanterweise reagieren die TVP-Mutanten bei Berührung oder Erschütterung zunächst mit einer normalen Fluchtbewegung, wobei die Amplitude der sinusförmigen Bewegung konzentrationsabhängig kleiner ausfällt als im Vergleich zum Wildtyp. Anschließend verkrampfen die TVP-Mutanten wieder. Hingegen reagiert die SNB-1 Mutante bei Berührung mit Spasmen. Der Phänotyp der SNB-1 Mutante wird durch die verminderte Exozytose, was zu einer verminderten Konzentration von Neurotransmittern im synaptischen Spalt führt, hervorgerufen¹⁷⁴. Demnach müsste auf Grund der Fluchtbewegung die Neurotransmitterfreisetzung bei den TVP-Mutanten an der GABAergen Synapse intakt sein. Dies sollte jedoch durch elektrophysiologische Messungen untermauert werden.

Da für die SPH-1 und SCM-1 Einzelmutanten auf transkriptioneller Ebene noch Produkte nachgewiesen werden konnten (Bai und Leube unveröffentlicht) und aufgrund der widersprüchlichen Ergebnisse in der Immuno-Blot-Analyse nicht ausgeschlossen werden kann, dass diese Transkripte translatiert werden, wurde für die weiteren Untersuchungen die SNG-1 Mutante verwendet. Dadurch konnte auch ausgeschlossen werden, dass durch etwaige Translationsprodukte der anderen mutierten TVPs eine Stressantwort (*unfolded protein response*^{135, 181}) in den Zellen und somit ein Phänotyp hervorgerufen wird.

Ein weiterer Grund für die Wahl der SNG-1 Mutante ist, dass SNG-1 fast ausschließlich im Nervensystem von *C. elegans* exprimiert wird und auch im gesamten GABAergen Nervensystem vorhanden ist. Dieses konnte auch auf transkriptioneller Ebene in *microarray* Analysen von GABAergen Neuronen in *C. elegans* bestätigt werden³⁵.

Dass dieser Phänotyp durch die Deletion im SNG-1 Gen hervorgerufen wird, konnte durch RNAi vermittelte Inaktivierung der SNG-1 Expression gezeigt werden. Dabei ist jedoch zu beachten, dass das Medium, welches zur Kultivierung von den RNAi Bakterien verwendet wurde, Carbencillin

enthält, welches ein β -Lactam Antibiotikum und somit ein sog. *open-channel blocker* des GABA-Rezeptors ist¹⁰. Doch durch Mikroinjektion des Vektors *Psng-1:sng-1* in die SNG-1-Mutanten konnte der PTZ-Phänotyp gerettet werden, was bestätigt, dass dieses Krampfverhalten durch die Deletion und nicht durch eine andere Hintergrundmutation hervorgerufen wird.

Inwieweit ein alternativer Endozytoseweg für diesen Phänotyp verantwortlich sein könnte, muss noch untersucht werden, obwohl durch die verminderte Anzahl von Vesikeln in einer GABAergen Synapse und signifikant erhöhte Anzahl Clathrin-umhüllter Vesikel Hinweise gegeben werden.

Ob hier die Interaktion von SNG-1 mit SNB-1 eine entscheidende Bedeutung hat bleibt fraglich, da bereits die SNB-1 Mutante einen PTZ-Phänotyp aufweist¹⁷⁴. Zumindest in der Ratte konnte bereits gezeigt werden, dass es im Epilepsiemodell, welches eine gesteigerte Freisetzung von Neurotransmitter induziert, zu einer gesteigerten Anreicherung des Synaptophysin/Synaptobrevin-Komplexes kommt⁶⁹.

Möglicherweise sind die TVPs hierbei an der Bereitstellung von SNB-1 für den Vorgang der schnellen Endozytose beteiligt, da Synaptobrevin für den Clathrin-unabhängigen schnellen Endozytoseweg notwendig ist, durch den synaptische Vesikel schnell wieder zur Verfügung gestellt werden können⁴².

5.15 Schlussfolgerung

Es konnte gezeigt werden, dass TVPs in unterschiedlichen Geweben und in nahezu allen Entwicklungsstadien von *C. elegans* exprimiert werden. Dabei weist SNG-1 eine fast ausschließlich neuronale Verteilung auf, während SPH-1 und SCM-1 in verschiedenen Geweben vorkommen. Inwieweit sie dabei analoge Funktionen zur Maus übernehmen, muss noch untersucht werden. Zumindest ist klar, dass die *C. elegans* TVPs redundant sind und ähnlich wie die Säugetieranalogen in vesikulären Zellkompartimenten vorkommen. Interessanterweise gibt es auch TVP-freie Gewebe, jedoch muss dies noch experimentell verifiziert werden.

Isolierte *C. elegans* TVP-Mutanten zeigten keine Veränderungen in der Form und Struktur von Vesikelmembranen, was zu der Schlussfolgerung führte, dass die TVPs in *C. elegans* nicht an der Membrankrümmung beteiligt sind. Hier übernehmen wahrscheinlich unterschiedliche Lipidzusammensetzungen die alleinige Funktion, da auch hier Cholesterin in *C. elegans* keine bedeutende Rolle im Zusammenhang mit den TVPs spielt.

In unterschiedlichen Verhaltensanalysen zeigten die TVP-Mutanten unter normalen Kulturbedingungen normale Reaktionen und ihre cholinergen synaptischen Antworten wiesen im Vergleich zu Wildtyptieren keine Unterschiede auf. Erst unter Stressbedingungen, ausgelöst durch den GABA-Rezeptorinhibitor PTZ, wurden schwerwiegende Veränderungen in der synaptischen Übertragung an der Muskulatur beobachtet. Dabei zeigte die SNG-1 Mutante die stärkste

5. Diskussion

Ausprägung. Welche Funktionsstörungen zu solch einem dramatischen Phänotyp führen, kann nur spekuliert werden. Hier müssen erst weitere Untersuchungen durchgeführt werden, um herauszufinden, welcher Schritt der synaptischen Übertragung (Exozytose, Endozytose) in den TVP-Mutanten gestört ist. Außerdem gilt es zu klären, ob hierbei bereits bekannte Interaktionspartner eine wesentliche Rolle spielen bzw. neue Interaktionspartner entdeckt werden können

6 Referenzen

1. Abraham, C. *et al.* Synaptic tetraspan vesicle membrane proteins are conserved but not needed for synaptogenesis and neuronal function in *Caenorhabditis elegans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **103**, 8227-8232 (2006).
2. Ahern, C.A., Bhattacharya, D., Mortenson, L., & Coronado, R. A component of excitation-contraction coupling triggered in the absence of the T671-L690 and L720-Q765 regions of the II-III loop of the dihydropyridine receptor $\alpha(1s)$ pore subunit. *Biophys. J.* **81**, 3294-3307 (2001).
3. Alder, J., Kanki, H., Valtorta, F., Greengard, P., & Poo, M.M. Overexpression of synaptophysin enhances neurotransmitter secretion at *Xenopus* neuromuscular synapses. *J. Neurosci.* **15**, 511-519 (1995).
4. Alder, J., Lu, B., Valtorta, F., Greengard, P., & Poo, M.M. Calcium-dependent transmitter secretion reconstituted in *Xenopus* oocytes: requirement for synaptophysin. *Science* **257**, 657-661 (1992).
5. Alexander, J.J., Bey, E.M., Geddes, E.W., & Lecatsas, G. Establishment of a continuously growing cell line from primary carcinoma of the liver. *S. Afr. Med. J.* **50**, 2124-2128 (1976).
6. Altun, Z.F. & Hall, D.H. *Handbook of C. elegans Anatomy. In WormAtlas*. 2005).
7. Arikawa, K., Molday, L.L., Molday, R.S., & Williams, D.S. Localization of peripherin/rds in the disk membranes of cone and rod photoreceptors: relationship to disk membrane morphogenesis and retinal degeneration. *J. Cell Biol.* **116**, 659-667 (1992).
8. Avery, L. & Horvitz, H.R. Pharyngeal pumping continues after laser killing of the pharyngeal nervous system of *C. elegans*. *Neuron* **3**, 473-485 (1989).
9. Bai, L., Spiwoks-Becker, I., & Leube, R.E. Transcriptome comparison of murine wild-type and synaptophysin-deficient retina reveals complete identity. *Brain Res.* **1081**, 53-58 (2006).
10. Bamber, B.A., Twyman, R.E., & Jorgensen, E.M. Pharmacological characterization of the homomeric and heteromeric UNC-49 GABA receptors in *C. elegans*. *Br. J. Pharmacol.* **138**, 883-893 (2003).
11. Bargmann, C.I., Hartwig, E., & Horvitz, H.R. Odorant-selective genes and neurons mediate olfaction in *C. elegans*. *Cell* **74**, 515-527 (1993).
12. Bargou, R.C. & Leube, R.E. The synaptophysin-encoding gene in rat and man is specifically transcribed in neuroendocrine cells. *Gene* **99**, 197-204 (1991).
13. Barnekow, A., Jahn, R., & Scharl, M. Synaptophysin: a substrate for the protein tyrosine kinase pp60c-src in intact synaptic vesicles. *Oncogene* **5**, 1019-1024 (1990).
14. Baumert, M. *et al.* P29: a novel tyrosine-phosphorylated membrane protein present in small clear vesicles of neurons and endocrine cells. *J. Cell Biol.* **110**, 1285-1294 (1990).
15. Becher, A. *et al.* The synaptophysin-synaptobrevin complex: a hallmark of synaptic vesicle maturation. *J. Neurosci.* **19**, 1922-1931 (1999).
16. Beg, A.A. & Jorgensen, E.M. EXP-1 is an excitatory GABA-gated cation channel. *Nat. Neurosci.* **6**, 1145-1152 (2003).
17. Belhage, B., Hansen, G.H., Elster, L., & Schousboe, A. Effects of gamma-aminobutyric acid (GABA) on synaptogenesis and synaptic function. *Perspect. Dev. Neurobiol.* **5**, 235-246 (1998).

6. Referenzen

18. Belizaire, R. *et al.* Characterization of synaptogyrin 3 as a new synaptic vesicle protein. *J. Comp Neurol.* **470**, 266-281 (2004).
19. Bessereau, J.L. *et al.* Mobilization of a Drosophila transposon in the Caenorhabditis elegans germ line. *Nature* **413**, 70-74 (2001).
20. Bloom, O. *et al.* Colocalization of synapsin and actin during synaptic vesicle recycling. *J. Cell Biol.* **161**, 737-747 (2003).
21. Blumenthal, T. Trans-splicing and polycistronic transcription in Caenorhabditis elegans. *Trends Genet.* **11**, 132-136 (1995).
22. Bonanomi, D., Benfenati, F., & Valtorta, F. Protein sorting in the synaptic vesicle life cycle. *Prog. Neurobiol.* **80**, 177-217 (2006).
23. Brand, S.H., Laurie, S.M., Mixon, M.B., & Castle, J.D. Secretory carrier membrane proteins 31-35 define a common protein composition among secretory carrier membranes. *J. Biol. Chem.* **266**, 18949-18957 (1991).
24. Brenner, S. The genetics of Caenorhabditis elegans. *Genetics* **77**, 71-94 (1974).
25. Brooks, C.C. *et al.* Pantophysin is a phosphoprotein component of adipocyte transport vesicles and associates with GLUT4-containing vesicles. *J. Biol. Chem.* **275**, 2029-2036 (2000).
26. Brose, N., Petrenko, A.G., Sudhof, T.C., & Jahn, R. Synaptotagmin: a calcium sensor on the synaptic vesicle surface. *Science* **256**, 1021-1025 (1992).
27. Burger, K. Cholesterin und Progesteron - Modulatoren G-Protein-gekoppelter Signaltransduktionswege. 2000.
Ref Type: Thesis/Dissertation
28. Calakos, N. & Scheller, R.H. Vesicle-associated membrane protein and synaptophysin are associated on the synaptic vesicle. *J. Biol. Chem.* **269**, 24534-24537 (1994).
29. Campbell, R.E. *et al.* A monomeric red fluorescent protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **99**, 7877-7882 (2002).
30. Cassata, G., Kuhn, F., Witmer, A., Kirchhofer, R., & Burglin, T.R. A steep thermal gradient thermotaxis assay for the nematode Caenorhabditis elegans. *Genesis* **27**, 141-144 (2000).
31. Castle, A. & Castle, D. Ubiquitously expressed secretory carrier membrane proteins (SCAMPs) 1-4 mark different pathways and exhibit limited constitutive trafficking to and from the cell surface. *J. Cell Sci.* **118**, 3769-3780 (2005).
32. Chang, S., Johnston, R.J., Jr., Frokjaer-Jensen, C., Lockery, S., & Hobert, O. MicroRNAs act sequentially and asymmetrically to control chemosensory laterality in the nematode. *Nature* **430**, 785-789 (2004).
33. Cheng, M.C. & Chen, C.H. Identification of rare mutations of synaptogyrin 1 gene in patients with schizophrenia. *J. Psychiatr. Res.* (2006).
34. Chiang, L.W. Detection of gene expression in single neurons by patch-clamp and single-cell reverse transcriptase polymerase chain reaction. *J. Chromatogr. A* **806**, 209-218 (1998).
35. Cinar, H., Keles, S., & Jin, Y. Expression profiling of GABAergic motor neurons in Caenorhabditis elegans. *Curr. Biol.* **15**, 340-346 (2005).

6. Referenzen

36. Colbert,H.A. & Bargmann,C.I. Odorant-specific adaptation pathways generate olfactory plasticity in *C. elegans*. *Neuron* **14**, 803-812 (1995).
37. Connell,G.J. & Molday,R.S. Molecular cloning, primary structure, and orientation of the vertebrate photoreceptor cell protein peripherin in the rod outer segment disk membrane. *Biochemistry* **29**, 4691-4698 (1990).
38. Cornille,F., Deloye,F., Fournie-Zaluski,M.C., Roques,B.P., & Poulain,B. Inhibition of neurotransmitter release by synthetic proline-rich peptides shows that the N-terminal domain of vesicle-associated membrane protein/synaptobrevin is critical for neuro-exocytosis. *J. Biol. Chem.* **270**, 16826-16832 (1995).
39. Cox,E.A. & Hardin,J. Sticky worms: adhesion complexes in *C. elegans*. *J. Cell Sci.* **117**, 1885-1897 (2004).
40. Daly,C., Sugimori,M., Moreira,J.E., Ziff,E.B., & Llinas,R. Synaptophysin regulates clathrin-independent endocytosis of synaptic vesicles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **97**, 6120-6125 (2000).
41. Daly,C. & Ziff,E.B. Ca²⁺-dependent formation of a dynamin-synaptophysin complex: potential role in synaptic vesicle endocytosis. *J. Biol. Chem.* **277**, 9010-9015 (2002).
42. Deak,F., Schoch,S., Liu,X., Sudhof,T.C., & Kavalali,E.T. Synaptobrevin is essential for fast synaptic-vesicle endocytosis. *Nat. Cell Biol.* **6**, 1102-1108 (2004).
43. Desai,C., Garriga,G., McIntire,S.L., & Horvitz,H.R. A genetic pathway for the development of the *Caenorhabditis elegans* HSN motor neurons. *Nature* **336**, 638-646 (1988).
44. Duerr,J.S., Gaskin,J., & Rand,J.B. Identified neurons in *C. elegans* coexpress vesicular transporters for acetylcholine and monoamines. *Am. J. Physiol Cell Physiol* **280**, C1616-C1622 (2001).
45. Edelman,L., Hanson,P.I., Chapman,E.R., & Jahn,R. Synaptobrevin binding to synaptophysin: a potential mechanism for controlling the exocytotic fusion machine. *EMBO J.* **14**, 224-231 (1995).
46. Entchev,E.V. & Kurzchalia,T.V. Requirement of sterols in the life cycle of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Semin. Cell Dev. Biol.* **16**, 175-182 (2005).
47. Eshkind,L.G. & Leube,R.E. Mice lacking synaptophysin reproduce and form typical synaptic vesicles. *Cell Tissue Res.* **282**, 423-433 (1995).
48. Evans,D. *et al.* Operons and SL2 trans-splicing exist in nematodes outside the genus *Caenorhabditis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **94**, 9751-9756 (1997).
49. Evans,G.J. & Cousin,M.A. Tyrosine phosphorylation of synaptophysin in synaptic vesicle recycling. *Biochem. Soc. Trans.* **33**, 1350-1353 (2005).
50. Fernandez-Chacon,R., Achiriloaie,M., Janz,R., Albanesi,J.P., & Sudhof,T.C. SCAMP1 function in endocytosis. *J. Biol. Chem.* **275**, 12752-12756 (2000).
51. Fesce,R., Grohovaz,F., Valtorta,F., & Meldolesi,J. Neurotransmitter release: fusion or 'kiss-and-run'? *Trends Cell Biol.* **4**, 1-4 (1994).
52. Fykse,E.M. *et al.* Relative properties and localizations of synaptic vesicle protein isoforms: the case of the synaptophysins. *J. Neurosci.* **13**, 4997-5007 (1993).
53. Galli,T. & Haucke,V. Cycling of synaptic vesicles: how far? How fast! *Sci. STKE.* **2001**, RE1 (2001).

6. Referenzen

54. Galli,T. & Haucke,V. Cycling of synaptic vesicles: how far? How fast! *Sci. STKE*. **2004**, re19 (2004).
55. Galli,T., McPherson,P.S., & De,C.P. The V0 sector of the V-ATPase, synaptobrevin, and synaptophysin are associated on synaptic vesicles in a Triton X-100-resistant, freeze-thawing sensitive, complex. *J. Biol. Chem.* **271**, 2193-2198 (1996).
56. Gerisch,B. & Antebi,A. Hormonal signals produced by DAF-9/cytochrome P450 regulate *C. elegans* dauer diapause in response to environmental cues. *Development* **131**, 1765-1776 (2004).
57. Gerisch,B., Weitzel,C., Kober-Eisermann,C., Rottiers,V., & Antebi,A. A hormonal signaling pathway influencing *C. elegans* metabolism, reproductive development, and life span. *Dev. Cell* **1**, 841-851 (2001).
58. Gerst,J.E. SNARE regulators: matchmakers and matchbreakers. *Biochim. Biophys. Acta* **1641**, 99-110 (2003).
59. Gincel,D. & Shoshan-Barmatz,V. The synaptic vesicle protein synaptophysin: purification and characterization of its channel activity. *Biophys. J.* **83**, 3223-3229 (2002).
60. Gracheva,E.O. *et al.* Tomosyn inhibits synaptic vesicle priming in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS. Biol.* **4**, e261 (2006).
61. Greengard,P., Valtorta,F., Czernik,A.J., & Benfenati,F. Synaptic vesicle phosphoproteins and regulation of synaptic function. *Science* **259**, 780-785 (1993).
62. Haass,N.K., Kartenbeck,M.A., & Leube,R.E. Pantophysin is a ubiquitously expressed synaptophysin homologue and defines constitutive transport vesicles. *J. Cell Biol.* **134**, 731-746 (1996).
63. Haass,N.K., Kartenbeck,M.A., & Leube,R.E. Pantophysin is a ubiquitously expressed synaptophysin homologue and defines constitutive transport vesicles. *J. Cell Biol.* **134**, 731-746 (1996).
64. Hannah,M.J., Schmidt,A.A., & Huttner,W.B. Synaptic vesicle biogenesis. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **15**, 733-798 (1999).
65. Hannah,M.J., Weiss,U., & Huttner,W.B. Differential extraction of proteins from paraformaldehyde-fixed cells: lessons from synaptophysin and other membrane proteins. *Methods* **16**, 170-181 (1998).
66. Hedgecock,E.M., Culotti,J.G., Thomson,J.N., & Perkins,L.A. Axonal guidance mutants of *Caenorhabditis elegans* identified by filling sensory neurons with fluorescein dyes. *Dev. Biol.* **111**, 158-170 (1985).
67. Herman,R.K. Analysis of genetic mosaics of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* **108**, 165-180 (1984).
68. Heuser,J.E. & Reese,T.S. Evidence for recycling of synaptic vesicle membrane during transmitter release at the frog neuromuscular junction. *J. Cell Biol.* **57**, 315-344 (1973).
69. Hinz,B. *et al.* Activity-dependent changes of the presynaptic synaptophysin-synaptobrevin complex in adult rat brain. *Eur. J. Cell Biol.* **80**, 615-619 (2001).
70. Hope,I.A. *C. elegans; A Practical Approach* (1999).
71. Horikawa,H.P., Kneussel,M., El,F.O., & Betz,H. Interaction of synaptophysin with the AP-1 adaptor protein gamma-adaptin. *Mol. Cell Neurosci.* **21**, 454-462 (2002).

6. Referenzen

72. Horvitz,H.R., Chalfie,M., Trent,C., Sulston,J.E., & Evans,P.D. Serotonin and octopamine in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Science* **216**, 1012-1014 (1982).
73. Hubner,K., Windoffer,R., Hutter,H., & Leube,R.E. Tetraspan vesicle membrane proteins: synthesis, subcellular localization, and functional properties. *Int. Rev. Cytol.* **214**, 103-159 (2002).
74. Huttner,W.B. & Schmidt,A. Lipids, lipid modification and lipid-protein interaction in membrane budding and fission--insights from the roles of endophilin A1 and synaptophysin in synaptic vesicle endocytosis. *Curr. Opin. Neurobiol.* **10**, 543-551 (2000).
75. Hynes,R.O. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* **69**, 11-25 (1992).
76. Inglis,P.N., Ou,G., Leroux,M.R., & Scholey,J.M. The sensory cilia of *Caenorhabditis elegans*. ed. The *C.elegans* Research Community. WormBook . WormBook. 27-11-2006.
Ref Type: Generic
77. Jahn,R. & Scheller,R.H. SNAREs--engines for membrane fusion. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **7**, 631-643 (2006).
78. Jahn,R., Schiebler,W., Ouimet,C., & Greengard,P. A 38,000-dalton membrane protein (p38) present in synaptic vesicles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **82**, 4137-4141 (1985).
79. Janz,R. & Sudhof,T.C. Cellugyrin, a novel ubiquitous form of synaptogyrin that is phosphorylated by pp60c-src. *J. Biol. Chem.* **273**, 2851-2857 (1998).
80. Janz,R. *et al.* Essential roles in synaptic plasticity for synaptogyrin I and synaptophysin I. *Neuron* **24**, 687-700 (1999).
81. Jena,B.P., Webster,P., Geibel,J.P., Van den Pol,A.N., & Sritharan,K.C. Localization of SH-PTP1 to synaptic vesicles: a possible role in neurotransmission. *Cell Biol. Int.* **21**, 469-476 (1997).
82. Jessell,T.M. & Kandel,E.R. Synaptic transmission: a bidirectional and self-modifiable form of cell-cell communication. *Cell* **72 Suppl**, 1-30 (1993).
83. Jiang,G. *et al.* A Na⁺/Cl⁻ -coupled GABA transporter, GAT-1, from *Caenorhabditis elegans*: structural and functional features, specific expression in GABA-ergic neurons, and involvement in muscle function. *J. Biol. Chem.* **280**, 2065-2077 (2005).
84. Jin,Y., Hoskins,R., & Horvitz,H.R. Control of type-D GABAergic neuron differentiation by *C. elegans* UNC-30 homeodomain protein. *Nature* **372**, 780-783 (1994).
85. Jin,Y., Jorgensen,E., Hartwig,E., & Horvitz,H.R. The *Caenorhabditis elegans* gene *unc-25* encodes glutamic acid decarboxylase and is required for synaptic transmission but not synaptic development. *J. Neurosci.* **19**, 539-548 (1999).
86. Johnston,P.A., Jahn,R., & Sudhof,T.C. Transmembrane topography and evolutionary conservation of synaptophysin. *J. Biol. Chem.* **264**, 1268-1273 (1989).
87. Johnston,P.A. & Sudhof,T.C. The multisubunit structure of synaptophysin. Relationship between disulfide bonding and homo-oligomerization. *J. Biol. Chem.* **265**, 8869-8873 (1990).
88. Jorgensen,E.M. GABA. ed. The *C.elegans* Research Community. WormBook . WormBook. 31-8-2005.
Ref Type: Generic

6. Referenzen

89. Jospin, M., Jacquemond, V., Mariol, M.C., Segalat, L., & Allard, B. The L-type voltage-dependent Ca²⁺ channel EGL-19 controls body wall muscle function in *Caenorhabditis elegans*. *J. Cell Biol.* **159**, 337-348 (2002).
90. Karabinos, A., Schunemann, J., & Weber, K. Most genes encoding cytoplasmic intermediate filament (IF) proteins of the nematode *Caenorhabditis elegans* are required in late embryogenesis. *Eur. J. Cell Biol.* **83**, 457-468 (2004).
91. Kedra, D. *et al.* Characterization of the human synaptogyrin gene family. *Hum. Genet.* **103**, 131-141 (1998).
92. Khvotchev, M.V. & Sudhof, T.C. Stimulus-dependent dynamic homo- and heteromultimerization of synaptobrevin/VAMP and synaptophysin. *Biochemistry* **43**, 15037-15043 (2004).
93. Knaus, P., Marqueze-Pouey, B., Scherer, H., & Betz, H. Synaptoporin, a novel putative channel protein of synaptic vesicles. *Neuron* **5**, 453-462 (1990).
94. Kurzchalia, T.V. & Ward, S. Why do worms need cholesterol? *Nat. Cell Biol.* **5**, 684-688 (2003).
95. Laird, D.W. Life cycle of connexins in health and disease. *Biochem. J.* **394**, 527-543 (2006).
96. Lee, R.Y., Lobel, L., Hengartner, M., Horvitz, H.R., & Avery, L. Mutations in the alpha1 subunit of an L-type voltage-activated Ca²⁺ channel cause myotonia in *Caenorhabditis elegans*. *EMBO J.* **16**, 6066-6076 (1997).
97. Leimer, U., Franke, W.W., & Leube, R.E. Synthesis of the mammalian synaptic vesicle protein synaptophysin in insect cells: a model for vesicle biogenesis. *Exp. Cell Res.* **224**, 88-95 (1996).
98. Leube, R.E. *et al.* Sorting of synaptophysin into special vesicles in nonneuroendocrine epithelial cells. *J. Cell Biol.* **127**, 1589-1601 (1994).
99. Leube, R.E., Wiedenmann, B., & Franke, W.W. Topogenesis and sorting of synaptophysin: synthesis of a synaptic vesicle protein from a gene transfected into nonneuroendocrine cells. *Cell* **59**, 433-446 (1989).
100. Li, L. *et al.* Phosphatidylinositol phosphates as co-activators of Ca²⁺ binding to C2 domains of synaptotagmin 1. *J. Biol. Chem.* **281**, 15845-15852 (2006).
101. Liu, D.W. & Thomas, J.H. Regulation of a periodic motor program in *C. elegans*. *J. Neurosci.* **14**, 1953-1962 (1994).
102. Liu, L., Guo, Z., Tieu, Q., Castle, A., & Castle, D. Role of secretory carrier membrane protein SCAMP2 in granule exocytosis. *Mol. Biol. Cell* **13**, 4266-4278 (2002).
103. Marks, B. *et al.* GTPase activity of dynamin and resulting conformation change are essential for endocytosis. *Nature* **410**, 231-235 (2001).
104. Maryon, E.B., Saari, B., & Anderson, P. Muscle-specific functions of ryanodine receptor channels in *Caenorhabditis elegans*. *J. Cell Sci.* **111** (Pt 19), 2885-2895 (1998).
105. Matthews, G. Cycling the synapse: scenic versus direct routes for vesicles. *Neuron* **44**, 223-226 (2004).
106. Maycox, P.R., Link, E., Reetz, A., Morris, S.A., & Jahn, R. Clathrin-coated vesicles in nervous tissue are involved primarily in synaptic vesicle recycling. *J. Cell Biol.* **118**, 1379-1388 (1992).

6. Referenzen

107. McIntire,S.L., Jorgensen,E., & Horvitz,H.R. Genes required for GABA function in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **364**, 334-337 (1993).
108. McIntire,S.L., Jorgensen,E., Kaplan,J., & Horvitz,H.R. The GABAergic nervous system of *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **364**, 337-341 (1993).
109. McMahon,H.T. *et al.* Synaptophysin, a major synaptic vesicle protein, is not essential for neurotransmitter release. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **93**, 4760-4764 (1996).
110. McMahon,H.T. & Gallop,J.L. Membrane curvature and mechanisms of dynamic cell membrane remodelling. *Nature* **438**, 590-596 (2005).
111. Mitter,D. *et al.* The synaptophysin/synaptobrevin interaction critically depends on the cholesterol content. *J. Neurochem.* **84**, 35-42 (2003).
112. Miyahara,K., Suzuki,N., Ishihara,T., Tsuchiya,E., & Katsura,I. TBX2/TBX3 transcriptional factor homologue controls olfactory adaptation in *Caenorhabditis elegans*. *J. Neurobiol.* **58**, 392-402 (2004).
113. Mühlhardt,C. *Molekularbiologie/Genomics*2003).
114. Mullany,P.M. & Lynch,M.A. Evidence for a role for synaptophysin in expression of long-term potentiation in rat dentate gyrus. *Neuroreport* **9**, 2489-2494 (1998).
115. Mullen,G.P. *et al.* The *Caenorhabditis elegans* snf-11 gene encodes a sodium-dependent GABA transporter required for clearance of synaptic GABA. *Mol. Biol. Cell* **17**, 3021-3030 (2006).
116. Nakatsu,F. *et al.* Defective function of GABA-containing synaptic vesicles in mice lacking the AP-3B clathrin adaptor. *J. Cell Biol.* **167**, 293-302 (2004).
117. Navone,F. *et al.* Protein p38: an integral membrane protein specific for small vesicles of neurons and neuroendocrine cells. *J. Cell Biol.* **103**, 2511-2527 (1986).
118. Nonet,M.L. Visualization of synaptic specializations in live *C. elegans* with synaptic vesicle protein-GFP fusions. *J. Neurosci. Methods* **89**, 33-40 (1999).
119. Ozcelik,T. *et al.* Synaptophysin: structure of the human gene and assignment to the X chromosome in man and mouse. *Am. J. Hum. Genet.* **47**, 551-561 (1990).
120. Pan,Z. *et al.* Co-expression of MG29 and ryanodine receptor leads to apoptotic cell death: effect mediated by intracellular Ca²⁺ release. *J. Biol. Chem.* **279**, 19387-19390 (2004).
121. Pan,Z. *et al.* Dysfunction of store-operated calcium channel in muscle cells lacking mg29. *Nat. Cell Biol.* **4**, 379-383 (2002).
122. Pang,D.T., Wang,J.K., Valtorta,F., Benfenati,F., & Greengard,P. Protein tyrosine phosphorylation in synaptic vesicles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **85**, 762-766 (1988).
123. Pennuto,M., Bonanomi,D., Benfenati,F., & Valtorta,F. Synaptophysin I controls the targeting of VAMP2/synaptobrevin II to synaptic vesicles. *Mol. Biol. Cell* **14**, 4909-4919 (2003).
124. Pennuto,M., Dunlap,D., Contestabile,A., Benfenati,F., & Valtorta,F. Fluorescence resonance energy transfer detection of synaptophysin I and vesicle-associated membrane protein 2 interactions during exocytosis from single live synapses. *Mol. Biol. Cell* **13**, 2706-2717 (2002).
125. Perkins,L.A., Hedgecock,E.M., Thomson,J.N., & Culotti,J.G. Mutant sensory cilia in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Dev. Biol.* **117**, 456-487 (1986).

6. Referenzen

126. Pierce-Shimomura, J.T., Faumont, S., Gaston, M.R., Pearson, B.J., & Lockery, S.R. The homeobox gene *lim-6* is required for distinct chemosensory representations in *C. elegans*. *Nature* **410**, 694-698 (2001).
127. Prekeris, R. & Terrian, D.M. Brain myosin V is a synaptic vesicle-associated motor protein: evidence for a Ca²⁺-dependent interaction with the synaptobrevin-synaptophysin complex. *J. Cell Biol.* **137**, 1589-1601 (1997).
128. Regnier-Vigouroux, A., Tooze, S.A., & Huttner, W.B. Newly synthesized synaptophysin is transported to synaptic-like microvesicles via constitutive secretory vesicles and the plasma membrane. *EMBO J.* **10**, 3589-3601 (1991).
129. Rehm, H., Wiedenmann, B., & Betz, H. Molecular characterization of synaptophysin, a major calcium-binding protein of the synaptic vesicle membrane. *EMBO J.* **5**, 535-541 (1986).
130. Richmond, J.E., Davis, W.S., & Jorgensen, E.M. UNC-13 is required for synaptic vesicle fusion in *C. elegans*. *Nat. Neurosci.* **2**, 959-964 (1999).
131. Richmond, J.E. & Jorgensen, E.M. One GABA and two acetylcholine receptors function at the *C. elegans* neuromuscular junction. *Nat. Neurosci.* **2**, 791-797 (1999).
132. Richmond, J. Synaptic function. ed. The *C. elegans* Research Community. WormBook . WormBook. 30-12-2005.
Ref Type: Generic
133. Riddle, D.L., Blumenthal, T., & Meyer, B.J. *C. elegans II* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, U.S., 1998).
134. Rubenstein, J.L., Greengard, P., & Czernik, A.J. Calcium-dependent serine phosphorylation of synaptophysin. *Synapse* **13**, 161-172 (1993).
135. Rutkowski, D.T. & Kaufman, R.J. A trip to the ER: coping with stress. *Trends Cell Biol.* **14**, 20-28 (2004).
136. Ruvinsky, I., Ohler, U., Burge, C.B., & Ruvkun, G. Detection of broadly expressed neuronal genes in *C. elegans*. *Dev. Biol.* **302**, 617-626 (2007).
137. Schafer, W.R. Egg-laying. ed. The *C. elegans* Research Community. WormBook . WormBook. 14-12-2005.
Ref Type: Generic
138. Schiavo, G. *et al.* Tetanus and botulinum-B neurotoxins block neurotransmitter release by proteolytic cleavage of synaptobrevin. *Nature* **359**, 832-835 (1992).
139. Schuske, K., Beg, A.A., & Jorgensen, E.M. The GABA nervous system in *C. elegans*. *Trends Neurosci.* **27**, 407-414 (2004).
140. Shaham, S. Glia-neuron interactions in the nervous system of *Caenorhabditis elegans*. *Curr. Opin. Neurobiol.* **16**, 522-528 (2006).
141. Shibaguchi, H. *et al.* Role of synaptophysin in exocytotic release of dopamine from *Xenopus* oocytes injected with rat brain mRNA. *Cell Mol. Neurobiol.* **20**, 401-408 (2000).
142. Shimuta, M. *et al.* Structure and expression of mitsugumin29 gene. *FEBS Lett.* **431**, 263-267 (1998).
143. Shyn, S.I., Kerr, R., & Schafer, W.R. Serotonin and Go modulate functional states of neurons and muscles controlling *C. elegans* egg-laying behavior. *Curr. Biol.* **13**, 1910-1915 (2003).

6. Referenzen

144. Simons,K. & Toomre,D. Lipid rafts and signal transduction. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **1**, 31-39 (2000).
145. Singleton,D.R., Wu,T.T., & Castle,J.D. Three mammalian SCAMPs (secretory carrier membrane proteins) are highly related products of distinct genes having similar subcellular distributions. *J. Cell Sci.* **110 (Pt 17)**, 2099-2107 (1997).
146. Spiwoкс-Becker,I. *et al.* Synaptic vesicle alterations in rod photoreceptors of synaptophysin-deficient mice. *Neuroscience* **107**, 127-142 (2001).
147. Starich,T.A. *et al.* Mutations affecting the chemosensory neurons of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* **139**, 171-188 (1995).
148. Starich,T.A., Lee,R.Y., Panzarella,C., Avery,L., & Shaw,J.E. eat-5 and unc-7 represent a multigene family in *Caenorhabditis elegans* involved in cell-cell coupling. *J. Cell Biol.* **134**, 537-548 (1996).
149. Starich,T.A., Miller,A., Nguyen,R.L., Hall,D.H., & Shaw,J.E. The *Caenorhabditis elegans* innexin INX-3 is localized to gap junctions and is essential for embryonic development. *Dev. Biol.* **256**, 403-417 (2003).
150. Strange,K. *C. Elegans: Methods and Applications*(Humana Press Inc.,U.S.,2006).
151. Sudhof,T.C. The synaptic vesicle cycle. *Annu. Rev. Neurosci.* **27**, 509-547 (2004).
152. Sugita,S., Janz,R., & Sudhof,T.C. Synaptogyrins regulate Ca²⁺-dependent exocytosis in PC12 cells. *J. Biol. Chem.* **274**, 18893-18901 (1999).
153. Sulston,J.E. & Horvitz,H.R. Post-embryonic cell lineages of the nematode, *Caenorhabditis elegans*. *Dev. Biol.* **56**, 110-156 (1977).
154. Sun,T. *et al.* Early asymmetry of gene transcription in embryonic human left and right cerebral cortex. *Science* **308**, 1794-1798 (2005).
155. Szpirer,C. *et al.* Gene-based anchoring of the rat genetic linkage and cytogenetic maps: new regional localizations, orientation of the linkage groups, and insights into mammalian chromosome evolution. *Mamm. Genome* **9**, 721-734 (1998).
156. Takamori,S. *et al.* Molecular anatomy of a trafficking organelle. *Cell* **127**, 831-846 (2006).
157. Takeshima,H. *et al.* Mitsugumin29, a novel synaptophysin family member from the triad junction in skeletal muscle. *Biochem. J.* **331 (Pt 1)**, 317-322 (1998).
158. Tang,J. *et al.* A complexin/synaptotagmin 1 switch controls fast synaptic vesicle exocytosis. *Cell* **126**, 1175-1187 (2006).
159. Thiele,C., Hannah,M.J., Fahrenholz,F., & Huttner,W.B. Cholesterol binds to synaptophysin and is required for biogenesis of synaptic vesicles. *Nat. Cell Biol.* **2**, 42-49 (2000).
160. Thomas,J.H. Genetic analysis of defecation in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* **124**, 855-872 (1990).
161. Thomas,L. & Betz,H. Synaptophysin binds to physophilin, a putative synaptic plasma membrane protein. *J. Cell Biol.* **111**, 2041-2052 (1990).
162. Thomas,L. *et al.* Identification of synaptophysin as a hexameric channel protein of the synaptic vesicle membrane. *Science* **242**, 1050-1053 (1988).

6. Referenzen

163. Troemel,E.R., Sagasti,A., & Bargmann,C.I. Lateral signaling mediated by axon contact and calcium entry regulates asymmetric odorant receptor expression in *C. elegans*. *Cell* **99**, 387-398 (1999).
164. Valtorta,F. *et al.* Neurotransmitter release and synaptic vesicle recycling. *Neuroscience* **35**, 477-489 (1990).
165. Valtorta,F., Pennuto,M., Bonanomi,D., & Benfenati,F. Synaptophysin: leading actor or walk-on role in synaptic vesicle exocytosis? *Bioessays* **26**, 445-453 (2004).
166. Verma,R. *et al.* A nonsense mutation in the synaptogyrin 1 gene in a family with schizophrenia. *Biol. Psychiatry* **55**, 196-199 (2004).
167. Washbourne,P., Schiavo,G., & Montecucco,C. Vesicle-associated membrane protein-2 (synaptobrevin-2) forms a complex with synaptophysin. *Biochem. J.* **305 (Pt 3)**, 721-724 (1995).
168. Weisleder,N. *et al.* Muscle aging is associated with compromised Ca²⁺ spark signaling and segregated intracellular Ca²⁺ release. *J. Cell Biol.* **174**, 639-645 (2006).
169. Wes,P.D. & Bargmann,C.I. *C. elegans* odour discrimination requires asymmetric diversity in olfactory neurons. *Nature* **410**, 698-701 (2001).
170. White,J.G., Southgate,E., Thomson,J.N., & Brenner,S. The structure of the nervous system of the nematode *C. elegans*. *Philos. Trans. R. Soc. Lond B Biol. Sci.* **314**, 1-340 (1986).
171. Wiedenmann,B. & Franke,W.W. Identification and localization of synaptophysin, an integral membrane glycoprotein of Mr 38,000 characteristic of presynaptic vesicles. *Cell* **41**, 1017-1028 (1985).
172. Wilhelm,A. *et al.* Localization of SNARE proteins and secretory organelle proteins in astrocytes in vitro and in situ. *Neurosci. Res.* **48**, 249-257 (2004).
173. Williams,C., Xu,L., & Blumenthal,T. SL1 trans splicing and 3'-end formation in a novel class of *Caenorhabditis elegans* operon. *Mol. Cell Biol.* **19**, 376-383 (1999).
174. Williams,S.N., Locke,C.J., Braden,A.L., Caldwell,K.A., & Caldwell,G.A. Epileptic-like convulsions associated with LIS-1 in the cytoskeletal control of neurotransmitter signaling in *Caenorhabditis elegans*. *Hum. Mol. Genet.* **13**, 2043-2059 (2004).
175. Windoffer,R. *et al.* Tissue expression of the vesicle protein pantophysin. *Cell Tissue Res.* **296**, 499-510 (1999).
176. Windoffer,R. & Leube,R.E. Imaging of keratin dynamics during the cell cycle and in response to phosphatase inhibition. *Methods Cell Biol.* **78**, 321-352 (2004).
177. Wu,T.T. & Castle,J.D. Evidence for colocalization and interaction between 37 and 39 kDa isoforms of secretory carrier membrane proteins (SCAMPs). *J. Cell Sci.* **110 (Pt 13)**, 1533-1541 (1997).
178. Wu,T.T. & Castle,J.D. Tyrosine phosphorylation of selected secretory carrier membrane proteins, SCAMP1 and SCAMP3, and association with the EGF receptor. *Mol. Biol. Cell* **9**, 1661-1674 (1998).
179. Yeagle PL. Cholesterol and the cell membrane. *Biochim Biophys Acta.* **822**, 267-287 (1985).
180. Yelamanchili,S.V. *et al.* The C-terminal transmembrane region of synaptobrevin binds synaptophysin from adult synaptic vesicles. *Eur. J. Cell Biol.* **84**, 467-475 (2005).

6. Referenzen

181. Zhang, K. & Kaufman, R.J. Signaling the unfolded protein response from the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* **279**, 25935-25938 (2004).
182. Zhao, H. & Nonet, M.L. A conserved mechanism of synaptogyrin localization. *Mol. Biol. Cell* **12**, 2275-2289 (2001).
183. Zhao, W., Cavallaro, S., Gusev, P., & Alkon, D.L. Nonreceptor tyrosine protein kinase pp60c-src in spatial learning: synapse-specific changes in its gene expression, tyrosine phosphorylation, and protein-protein interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **97**, 8098-8103 (2000).

7 Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

λ	Lambda (Wellenlänge)
\varnothing	Durchmesser
$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius
%	Prozent
μCi	M ikrocurie
μg	M ikrogramm
μl	M ikroliter
A	
aBoc	a nterior b ody contraction
Ach	A cetyl ch olin
AP	A dapt o protein
As	A minosäure
ATN-1	A ctin i n-1
ATP	A denos i ntr i phosphat
B	
BCIP	5- B rom-4-chlor-3-indoly l hydrogen ph osphat-p-toluidin
bp	b ase p air
BSA	b ovine s erum a lbumine (Rinderserumalbumin)
bzw.	b eziehungsweise
C	
Ca^{2+}	C alcium (Kalzium; 2-wertiges Kation)
cdk5	c yclin- d e p endent k inase 5
cDNA	c omplementary d esoxyribonucleic acid
Ce	<i>Caenorhabditis elegans</i>
CFP	c yane f luorescent p rotein
CHC-1	clathrin h eavy c hain-1 (<i>C. elegans</i>)
CKII	casein k inase I I
Cl^{-}	C hlorid (1-wertiges Anion)
CLIC-1	clathrin l ight c hain-1 (<i>C. elegans</i>)
CIAP	c alf i ntestine a kaline p hosphatase
cm	Zentimeter
cpm	c ounts p er m inute
C-Terminus	(COOH)- C arboxy t erminus
D	
DAPI	D iamidin p henylindol
DEB-1	d ense b ody- 1
DHPR	D ihydropyridin r ezeptor
DiD	1,1'- d ioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate
Dil	1,1'- d ioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate
DMEM	d ulbecco`s m odified e agle m edium
DMF	D imethylformamid
DNA	d esoxyricbonucleoteic acid
dNTP	D esoxyribonukletid t ri p hosphat
DTC	d istal t ip c ell
DTNB	D ithio i s n itro b enzo e säure
DTT	D ithio t hreitol
DYN-1	D ynam i n-1 (<i>C. elegans</i>)
E	
E	E xon
EH-Domäne	E ps-15 h omology (Domäne beteiligt an der Regulation von Endozytose und Vesikeltransport)
EHS-1	E ps-15 h omologous s equence-1
ECFP	e nhan c ed c yane f luorescent p rotein
EDTA	E thylendiamintetraessigsäure (- a cid)
EGL-19	e gg-laying defective- 19
EGTA	E thylenglykol-bis-(2-aminoethylethyl)- t etraessigsäure (- a cid)

7. Anhang

ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
Emc	enteric (Expulsion) muscle contraction
ER	endoplasmatisches Retikulum
Ex	extrachromosomal
EXP-1	expulsion defective-1
EYFP	enhanced yellow fluorescent protein
F	
FCS	fetale calf serum (fötales Kälberserum)
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
G	
g	Gramm
g	Erdbeschleunigung $g = 9,81 \text{ N}$
GABA	Gamma (γ)-Aminobuttersäure (-acid)
GAD	glutamic acid decarboxylase
GCY	Guanylcyclase
GDP	Guanosindiphosphat
GFP	green fluorescent protein
gp	guinea-pig (Meerschweinchen)
GST	Glutathion S-Transferase
GTP	Guanosintriphosphat
H	
h	hour (Stunde)
^3H	Tritium
H_2O	Wasser
H_2O_d	Wasser (Umkehrosmose)
H_2O_{dd}	Wasser (MilliQ)
HCl	Salzsäure (Hydrochlorid)
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure
HRP	horse reddich peroxidase (Meerrettichperoxidase)
Hs	Homo sapiens
Hsc70	heat shock protein 70
Hz	Hertz
I	
IgG	Immunglobulin G
ILK	integrin-linked kinase
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
Is	inseriert
K	
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
L	
l	Liter
LB	lennox (Luria) broth
LE	Längeneinheiten
LTP	long-term potentiation
M	
M	Molar
Mig-2	mitogen inducible gene-2
min	minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
Mm	Mus musculus
mRFP	monovalent red fluorescent protein
mRNA	messenger RNA
ms	Millisekunde
mV	Millivolt
MW	molecular weight
N	
n	Anzahl der Experiment (dieser Wert wurde für die statistischen Berechnungen verwendet)
N_2	Stickstoff
Na^+	Natrium (1-wertiges Kation)
NB	nutrient buffer
NBA	nutrient buffer agar

7. Anhang

NBT	N itroblautetrazolium
NCA-1/-2	novel channel type/putative Nematode calcium channel-1/-2 (VGCC)
ng	N anogramm
NGM	n ematode g rowth m edium
NPF Motiv	Asparagin (N)-Prolin (P)-Phenylalanin (F) Motiv
Nr.	N ummer
NSF	N -ethylmaleimide-sensitive-factor
n_t	Anzahl der untersuchten Tiere aller Experimente
n_v	Anzahl der gezählten Vesikel
N-Terminus	(NH ₂)-Aminoterminus

O

OD	o ptische D ichte
Osm	O smolar
OVA	O valbumin

P

PAGE	P olyacrylamidgelelektrophorese
pAK	p rimär A ntikörper
PAT-2/-3/-4/-6	p aralysed a rrest at t wo-fold- 2/-3/-4/-5
pBoc	p osterior b ody c ontraction
PBS	p hosphate- b uffered s aline
PCR	p olymerase c hain r eaction
PFA	P araformaldehyd
PG	p haryngeales G anglion
pH	p otentia H ydrogenii
PIP ₂	P hosphatidylinositol (4, 5)- b isphosphat
PIP ₃	P hosphatidylinositol (3, 4, 5)- t risphosphat
PKC	P roteinkinase C
PLC	p rimary l iver c ancer
PTZ	P entylentetrazol

Q

Q-SNARE	Q = Aminosäure Glutamin, SNARE
---------	---------------------------------------

R

RAB-3	ras -like GTP b inding p rotein- 3
rb	r abbit (Kaninchen)
R-SNARE	R = Aminosäure Arginin, SNARE
RFP	r ed f luorescent p rotein
RIC-1	resistance to inhibitors of cholinesterase- 1 (SNAP-25)
Rim	r ab3-interacting m olecule
RNA	r ibonucleoteic a cid
RT	R eversetranskriptase
RyR	R yanodinrezeptor

S

sAK	sekundär A ntikörper
SCM-1	SCAMP-1 (<i>C. elegans</i>)
SCAMP	secretory carrier-associated m embrane p rotein
SDS	sodium d odecylsulfate
sec	s econds (Sekunden)
SLMV	synaptic-like m icrovesicle
SNAP	soluble N SF attachment p rotein
SNAP-25	synaptosomal-associated p rotein of 25 kDa
SNARE	soluble N SF attachment p rotein r eceptor
SNB-1	S ynaptobrevin- 1 (<i>C. elegans</i>)
SNF-3/-11	sodium neurotransmitter symporter family- 3/-11 (<i>C. elegans</i>)
SNG-1	S ynaptogyrin- 1 (<i>C. elegans</i>)
SNN-1	S ynapsin- 1 (<i>C. elegans</i>)
SNT-1	S ynaptotagmin- 1 (<i>C. elegans</i>)
sog.	s ogenannt
SR	sarkoplasmatisches R etikulum
SSC	sodium sodium c hloride
SPH-1	S ynaptophysin- 1 (<i>C. elegans</i>)
STP	short-term p otentiation
STR-2	seven transmembrane r eceptor- 2
SV40	S imian v irus 40

7. Anhang

T

Taq	T hermophilus a quaticus
TBE	T ris/ B orat/ E DTA
TBS	t ris- b uffered s aline
TEMED	N,N,N',N' - T etramethylethylendiamin
TGN	t rans- g olgi n etwork
Tm	T ransmembrandomäne
TOM-1	T omosyn-1 (<i>C. elegans</i>)
Tris	T ris(hydroxymethyl)-aminomethan
t-SNARE	t arget-SNARE
TTBS	T wen t ris- b uffered s aline
TVP	t etraspan v esicle m embrane p rotein

U

U	u nit
U	U mdrehungen
u. a.	u nter a nderem
unc	u ncoordinated
UNC-2	calcium channel
UNC-10	Rim (Protein mit: Zinkfinger-, Q/N-reicher-, PDZ- und C2-Domäne)
UNC-11	clathrin-adaptor protein AP180
UNC-13	Munc13
UNC-18	Munc18
UNC-25	Glutamate decarboxylase (GAD)
UNC-26	Synaptojanin 1
UNC-30	Pitx-Familie orthologer Homeodomäntranskriptionsfaktor
UNC-46	vesicular GABA transporter
UNC-47	vesicular GABA transporter
UNC-49	GABA-Rezeptor (Untereinheiten: A, B und C)
UNC-57	Endophilin A
UNC-64	Syntaxin 1 (<i>C. elegans</i>)
UNC-68	ryanodine receptor ortholog
UNC-97	PINCH
UNC-112	Mig-2
UV	U ltraviolett

V

VGAT	v esicular G ABA t ransporter
VGCC	v oltage-gated C a ²⁺ channel
VAMP	v esicle-associated m embrane p rotein
v-SNARE	v esicle-SNARE

W

W	W att
w/v	w eight p er v olume (Gewicht pro Volumen)

Y

YFP	y ellow f luorescent p rotein
γ- ³² P	Adenosin 5'-[γ- ³² P]triphosphat, Triethylammonium Salz

Z

z. B.	z um B eispiel
ZG	z entrales G anglion

7.2 Taxonomie von *Caenorhabditis elegans*

Stamm	Nemathelminthes
Unterstamm	Nematoda
Klasse	Secernentea
Ordnung	Rhabditida
Familie	Rhabditidae
Art	<i>Caenorhabditis elegans</i>

7.3 Webseiten

Tabelle 7-1 Verwendete Webseiten

web-a	www.mwg-biotech.com
web-b	www.ncbi.nlm.nih.gov
web-c	http://www.sanger.ac.uk/Projects/C_elegans/DOCS/vectors.shtml
web-d	ftp://ftp.sanger.ac.uk/pub/vector_sequences/
web-e	http://www.wormbase.org/
web-f	http://bioweb.pasteur.fr/cgi-bin/readseq2/readseq.cgi

7.4 *C. elegans* Stämme

Tabelle 7-2 Durch Verpaarung generierte Stämme.

Stamm			rückgekreuzt mit N2
♀	♂	♀	♂
RB503	N2	VH619	4-mal
EG2947	N2	EG2947	4-mal
EG2948	N2	EG2948	4-mal
EG2947	VH619	EG2952	—
EG2948	VH619	EG2956	—
EG2948	EG2947	EG2957	—
EG2948	EG2952	EG2959/EG2960	—
EG2960	N2	BJ21/BJ20	12-mal
EG1285	VH619	EG3008	4-mal
EG2960	EG3008	BJ1	4-mal
EG1285	BJ31	BJ60	—
EG3008	BJ31	BJ62	—
EG2976	BJ52	BJ64	—
NM440	BJ21	BJ22/BJ24	3-mal
BJ24	BJ21	BJ26	3-mal
BJ26	BJ21	BJ28	3-mal

7. Anhang

Tabelle 7-3 C. elegans Stämme.

Stamm	Genotyp
BJ1	<i>scm-1(hd30) I; sph-1(ox278) IV; sng-1(ok234) X; oxls12 [lin-15(+), Punc47::GFP] X, lin-15(n765ts) X</i>
BJ20	<i>Wildtyp</i>
BJ21	<i>scm-1(hd30) I; sph-1(ox278) IV; sng-1(ok234) X</i>
BJ22	<i>jsls1 [rol-6(su1006); snb-1::gfp]</i>
BJ23	<i>kcEx2 [Psng-1:yfp]</i>
BJ24	<i>ok234 X; jsls1 [rol-6(su1006); snb-1::gfp]</i>
BJ26	<i>scm-1(hd30) I; sng-1(ok234) X; jsls1 [rol-6(su1006); snb-1::gfp]</i>
BJ28	<i>scm-1(hd30) I; sph-1(ox278) IV; sng-1(ok234) X; jsls1 [rol-6(su1006); snb-1::gfp]</i>
BJ31	<i>kcEx3 [Psng-1:cfp]</i>
BJ35	<i>lin-15(n765ts) X; kcEx1 [lin-15(+); Psph-1:yfp]</i>
BJ36	<i>lin-15(n765ts) X; kcEx11 [lin-15(+); Psph-1:yfp]</i>
BJ52	<i>kcls6 [ifb-2::cfp]</i>
BJ60	<i>oxls12 [lin-15(+), Punc-47:gfp] X, lin-15(n765ts) X; kcEx3 [Psng-1:cfp]</i>
BJ62	<i>sng-1(ok234), oxls12 [lin-15(+), Punc-47:gfp] X, lin-15(n765ts) X; kcEx3 [Psng-1:cfp]</i>
BJ64	<i>lin-15(n765ts) X; oxEx466 [lin-15(+), sph-1::yfp]; kcls6 [ifb-2::cfp]</i>
BJ65	<i>lin-15(n765ts) X; oxEx466 [lin-15(+), sph-1::yfp]; kcls6 [ifb-2::cfp]</i>
BJ67	<i>sng-1 (ok234)X; eri-1 (mg366)IV</i>
BJ103	<i>sng-1 (ok234)X; kcEx12 [Psng-1:sng-1]; kcEx5 [Pifb-2:yfp]</i>
BJ106	<i>kcEx7 [Psph-1:YFP]</i>
BJ114	<i>kcEx9 [Pscm-1:yfp]</i>
CX10	<i>osm-9(ky10)</i>
EG1285	<i>oxls12 [lin-15(+), Punc-47:gfp] X, lin-15(n765ts) X</i>
EG2948	<i>sph-1(ox278) IV</i>
EG2952	<i>sng-1(ok234) X; scm-1(hd30) I</i>
EG2956	<i>sng-1(ok234) X; sph-1(ox278) IV</i>
EG2957	<i>scm-1(hd30) I; sph-1(ox278) IV</i>
EG2959	<i>scm-1(hd30) I; sph-1(ox278) IV; sng-1(ok234) X</i>
EG2960	<i>scm-1(hd30) I; sph-1(ox278) IV; sng-1(ok234) X</i>
EG2975	<i>lin-15(n765ts) X; oxEx466 [lin-15(+), sph-1::yfp]</i>
EG2976	<i>lin-15(n765ts) X; oxEx466 [lin-15(+), sph-1::yfp]</i>
EG2977	<i>lin-15(n765ts) X; oxEx466 [lin-15(+), sph-1::yfp]</i>
EG2978	<i>lin-15(n765ts) X; oxEx468 [lin-15(+), Pscm-1:yfp]</i>
EG2979	<i>lin-15(n765ts) X; oxEx468 [lin-15(+), Pscm-1:yfp]</i>
GR1373	<i>eri-1(mg366)IV</i>
MT1642	<i>lin-15(n765ts) X</i>
MT3564	<i>osm-7(n1515) III</i>
MT6308	<i>eat-4(ky5) III</i>
N2	<i>Wildtyp (S. Brenner)</i>
NM440	<i>unc-104(e1265) II; jsls1 [rol-6(su1006); snb-1::gfp]</i>
NM467	<i>snb-1(md247) V</i>
RB503	<i>sng-1(ok234) X</i>
VH178	<i>hdEx22 [rol-6(su1006), sng-1::yfp]</i>
VH179	<i>hdEx23 [rol-6(su1006), sng-1::yfp]</i>
VH180	<i>hdEx24 [rol-6(su1006), sng-1::yfp]</i>
VH322	<i>pha-1(e2123ts); hdEx130 [pha-1(+), scm-1::yfp]</i>
VH369	<i>pha-1(e2123ts); hdEx153 [pha-1(+), scm-1::yfp]</i>
VH370	<i>pha-1(e2123ts); hdEx154 [pha-1(+), scm-1::yfp]</i>
VH371	<i>pha-1(e2123ts); hdEx155 [pha-1(+), scm-1::yfp]</i>
VH619	<i>sng-1(ok234) X</i>

Stämme mit der Stammbezeichnung BJ stammen aus dem Leube Labor, mit der Stammbezeichnung EG aus dem Jorgensen Labor und mit der Stammbezeichnung VH aus dem Hutter Labor. Alle anderen Stämme wurden über das Caenorhabditis Genetics Center (CGC) bezogen.

7.5 Datenbanknummern

Tabelle 7-4 Datenbanknummern der Sequenzen für die As und Tm zur Berechnung des Cladogramms.

Spezies	Protein	As	Tm
<i>C. elegans</i>	SPH-1	AAB92070*	CE17070**
	SNG-1	AAA81418*	CE21167**
	SCM-1	NP_490911*	CE25946**
	INX-1	NP_741826*	CE31880**
	TSP-1	AAA27923*	CE00044**
<i>M. musculus</i>	Synaptophysin	Q62277*	
	Synaptoporin (Synaptophysin 2)	Q8BGN8*	
	Pantophysin	O09117*	
	Mitsugumin 29	O89104*	
	Synaptogyrin 1	O55100*	
	Synaptogyrin 2 (Cellugyrin)	O55101*	
	Synaptogyrin 3	O43761*	Q8R191*
	Synaptogyrin 4	Q9Z1L2*	
	SCAMP 1	Q8K021*	
	SCAMP 2	Q9ERN0*	
	SCAMP 3	NP_036016*	O35609*
	SCAMP 4	AAH18215*	Q9JKV5*
	SCAMP 5	Q9JKD3*	

(*NCBI, ** Wormbase)

Tabelle 7-5 Proteindatenbanknummern von Synaptophysin verschiedener Spezies

Klasse	Spezies	Datenbanknummer
Mammalia	<i>Bos taurus</i>	A32208
	<i>Homo sapiens</i>	NP_003170
	<i>Mus musculus</i>	NP_033331
	<i>Rattus norvegicus</i>	NP_036796
Amphibia	<i>Xaenopus laevis</i>	AAB88136
Osteichthyes	<i>Danio rerio</i>	AA79174
Chondrichthyes	<i>Torpedo californica</i>	A60548
Nematoda	<i>Caenorhabditis elegans</i>	AAB92070

7.6 Vektorkarten

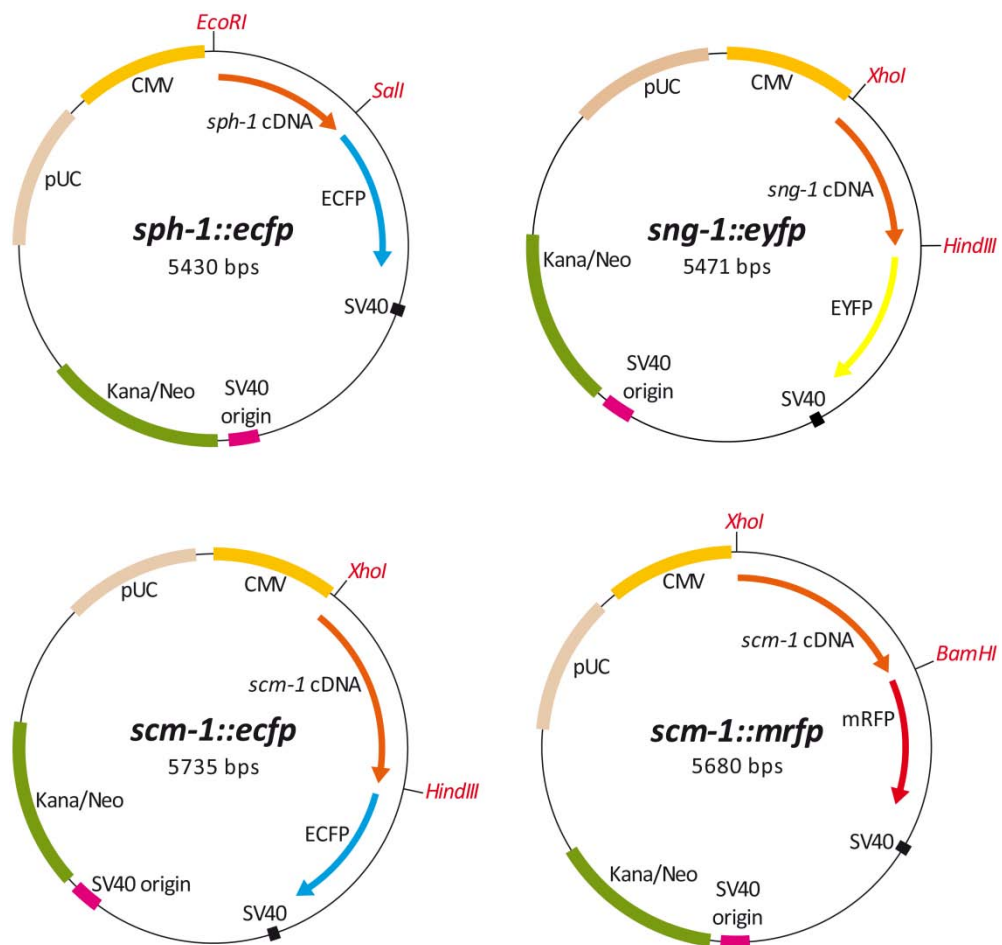


Abbildung 7-1 Vektorkarten der Expressionskonstrukte für die transiente Transfektion von PLC-Zellen.

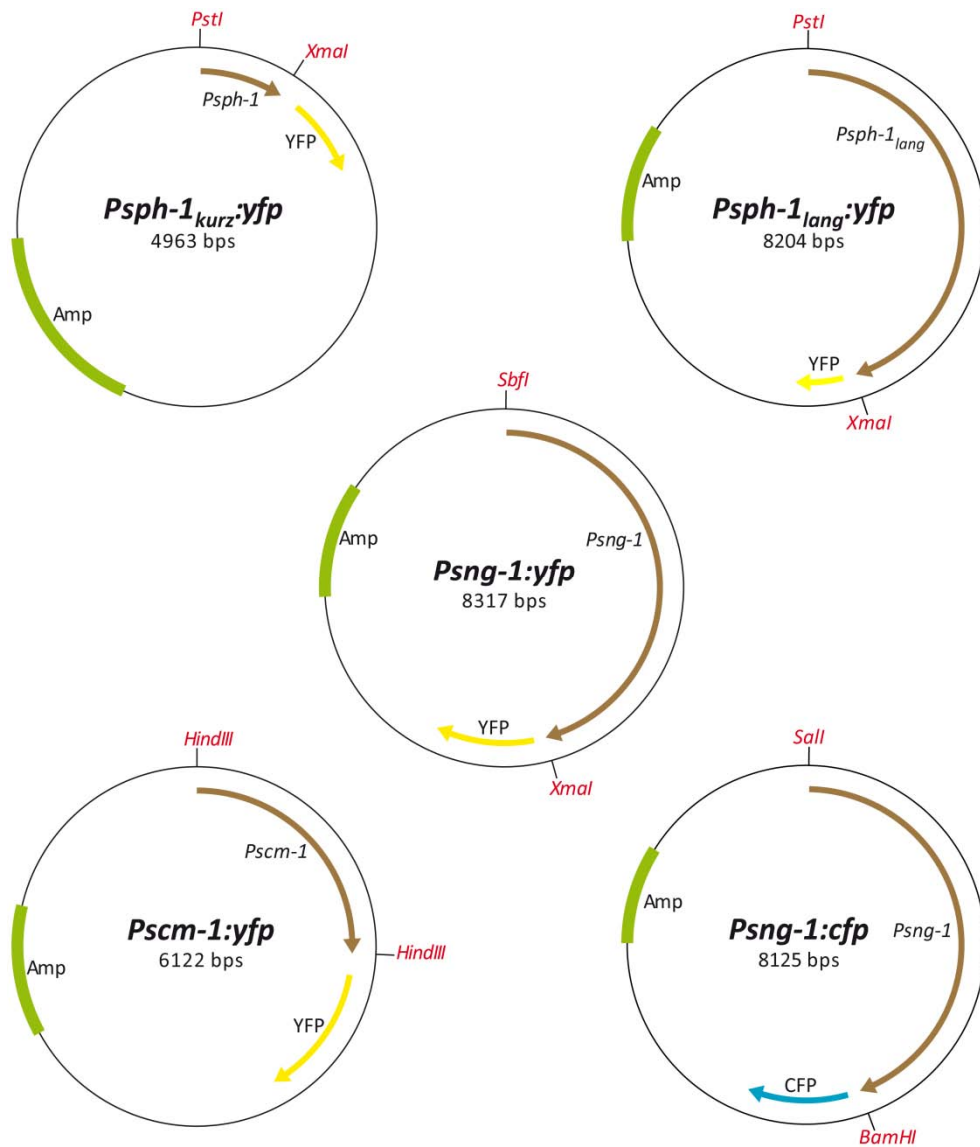


Abbildung 7-2 Vektorkarten der mikroinjizierten Transkriptionskonstrukte.

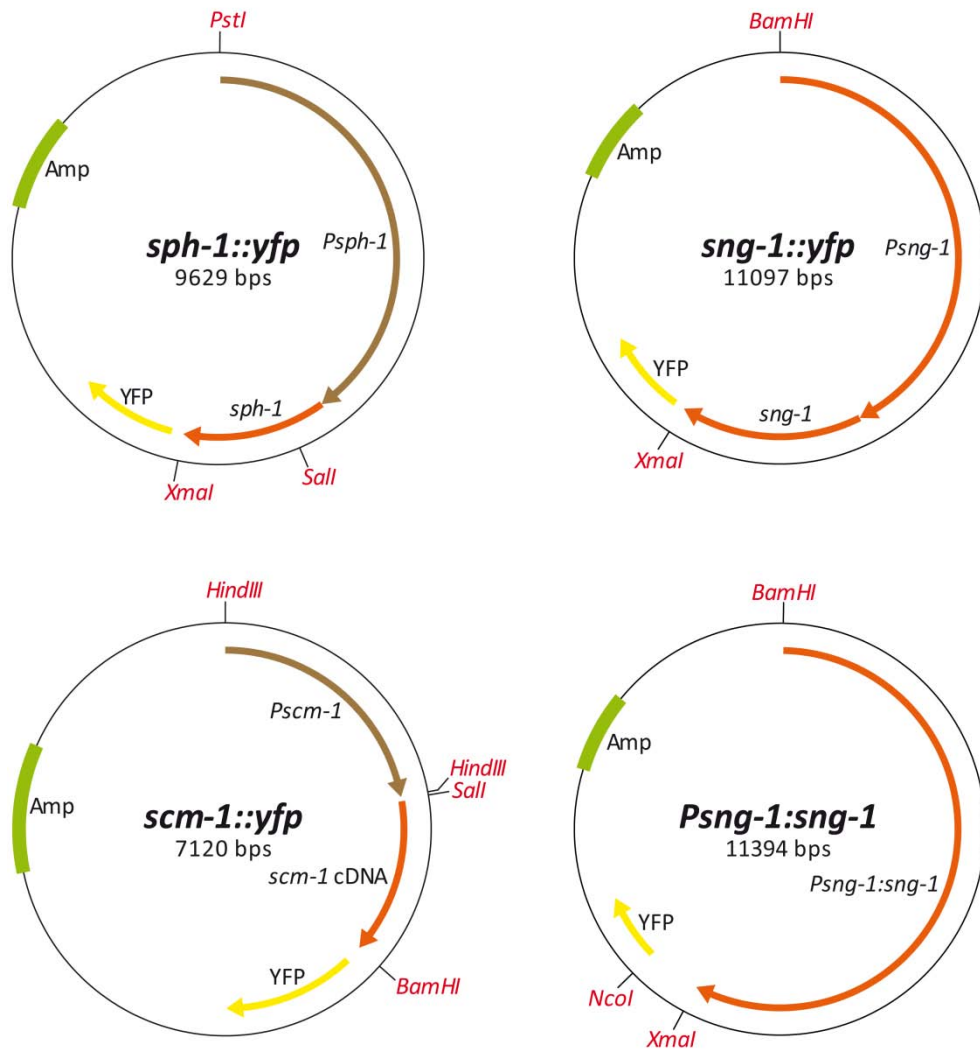


Abbildung 7-3 Vektorkarten der mikroinjizierten Translationskonstrukte.

7.7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2-1 Hypothetische Fusionsarten und recycling synaptischer Vesikel ¹⁰⁵ .	3
Abbildung 2-2 Hypothetisches Model der SNARE-vermittelten Vesikelfusion ¹⁵⁸ .	5
Abbildung 2-3 Komponenten eines GABAergen Neurons in <i>C. elegans</i> .	6
Abbildung 2-4 Konfokale Phasenbildebene des Nematoden <i>Caenorhabditis elegans</i> (Hermaphrodit).	13
Abbildung 2-5 Lebenszyklus von <i>C. elegans</i> bei 22 °C ⁶ .	14
Abbildung 2-6 Embryogenese von <i>C. elegans</i> (von Einhard Schierenberg).	15
Abbildung 2-7 Position der Neurone im adulten Hermaphrodit (Herkunft unbekannt).	16
Abbildung 2-8 GABAerges Nervensystem von <i>C. elegans</i> (von Erik Jorgensen).	17
Abbildung 2-9 Schema der Amphide und Phasmide.	18
Abbildung 3-1 Aufbau des Western Blots.	46
Abbildung 3-2 Versuchsaufbau Thermotaxis.	51
Abbildung 3-3 Versuchsaufbau Chemotaxis.	52
Abbildung 3-4 Versuchsaufbau „Osmotisches Vermeidungsverhalten“.	53
Abbildung 4-1 Bestimmung des 5'-Endes der <i>sph-1</i> cDNA.	55
Abbildung 4-2 „Alte“ und „neue“ Sequenz des <i>sph-1</i> 5'-Ende bzw. der N-terminalen Proteinsequenz (SPH-1).	56
Abbildung 4-3 Sequenzvergleich des SPH-1 aus <i>C. elegans</i> mit Synaptophysinen verschiedener Vertebraten.	57
Abbildung 4-4 Vergleich von TVPs aus <i>C. elegans</i> (Ce) und <i>M. musculus</i> (Mm).	59
Abbildung 4-5 Cladogramm der <i>C. elegans</i> (Ce) und <i>M. musculus</i> (Mm) TVPs.	59
Abbildung 4-6 Dot-Blot der verschiedenen Antikörper gegen die <i>C. elegans</i> TVPs.	60
Abbildung 4-7 Detektion der <i>C. elegans</i> TVPs in transfizierten PLC-Zellen mit den gp-Antikörpern.	61
Abbildung 4-8 Detektion der <i>C. elegans</i> TVPs in transfizierten PLC-Zellen mit den rb-Antikörpern.	63
Abbildung 4-9 Negativkontrolle der Antikörperdetektion der <i>C. elegans</i> TVPs in transfizierten PLC-Zellen.	65
Abbildung 4-10 Sequenzvergleich der Peptidsequenzen von SPH-1-CT und SNG-1-NT mit Keratin 8 und 18.	65
Abbildung 4-11 Ektopische Expression von <i>C. elegans</i> TVP-Fluoreszenzkonstrukten in PLC-Zellen.	66
Abbildung 4-12 Expressionsmuster des kurzen <i>sph-1</i> Transkriptionskonstruktes.	68
Abbildung 4-13 Verteilungsmuster der <i>sph-1</i> Transkriptions- und Translationschimären in <i>C. elegans</i> .	70
Abbildung 4-14 Synaptogyrin kolokalisiert nicht mit Dil in Amphiden und Phasmiden.	71
Abbildung 4-15 Synaptogyrinexpression im gesamten GABAergen Nervensystem.	72
Abbildung 4-16 Verteilung von Pscm-1:YFP in unterschiedlichen Zellen.	74
Abbildung 4-17 Subzelluläres Verteilungsmuster der SCM-1::YFP Expression in <i>C. elegans</i> .	76
Abbildung 4-18 Verteilungsmuster der TVP-Transkriptionschimären in verschiedenen Entwicklungsstadien.	77
Abbildung 4-19 Verteilungsmuster der TVP-Translationschimären in verschiedenen Entwicklungsstadien.	78
Abbildung 4-20 Schematische Gen- und Proteinstruktur der <i>C. elegans</i> TVPs.	81
Abbildung 4-21 Duplex-PCR zum Nachweis der TVP Mutanten.	82
Abbildung 4-22 Southern-Blot Analyse der <i>C. elegans</i> TVPs ¹ .	83
Abbildung 4-23 Lokomotion der TVP-Dreifachmutante und des Wildtyps unter cholesterinhaltigen (+) und cholesterinfreien (-) Bedingungen.	84
Abbildung 4-24 Pharyngeales Pumpverhalten und Defäkation der TVP-Dreifachmutante und des Wildtyps.	85
Abbildung 4-25 Untersuchung des Chemotaxis- und Adaptationsverhaltens.	86
Abbildung 4-26 Thermotaxis Verhalten der TVP-Dreifachmutante bei verschiedenen Temperaturen.	87
Abbildung 4-27 Normales osmotisches Vermeidungsverhalten der TVP-Dreifachmutante.	88
Abbildung 4-28 Die TVP-Dreifachmutante hat eine normale Entwicklung und Eiablagedynamik.	89
Abbildung 4-29 Photoaffinitätsmarkierung von Synaptosomen der TVP-Dreifachmutante und des Wildtyps.	90
Abbildung 4-30 Mit Dil markierte Amphide und Phasmide des Wildtyps und der TVP-Dreifachmutante.	91
Abbildung 4-31 GABAerges Nervensystem von <i>C. elegans</i> markiert durch Punc-47:GFP.	92
Abbildung 4-32 Verteilung von Synaptobrevinanhäufungen in Synapsen des Wildtyps und der TVP-Dreifachmutante.	93
Abbildung 4-33 EM-Aufnahme einer cholinergen Synapse des Wildtyps und der TVP-Dreifachmutante.	94

7. Anhang

Abbildung 4-34 Keine Unterschiede in der Vesikelverteilung und -durchmesser.	95
Abbildung 4-35 Normale Aldicarb-Reaktion der TVP-Dreifachmutante (EG2959).	96
Abbildung 4-36 Normale Elektrophysiologie der cholinergen Synapsen.	97
Abbildung 4-37 PTZ-Sensitivität der TVP-Dreifach- und TVP-Einzelmutanten.	99
Abbildung 4-38 PTZ-Test nach <i>sng-1</i> RNAi.	100
Abbildung 4-39 „Rettung“ des PTZ-Phänotyps durch Mikroinjektion von <i>Psng-1:sng-1</i> .	101
Abbildung 4-40 Überprüfung des mikroinjizierten Stammes BJ103 mit Hilfe der Duplex-PCR-Methode.	101
Abbildung 5-1 Ultrastruktur der dense bodies in der <i>C. elegans</i> Muskulatur ⁶ .	107
Abbildung 7-1 Vektorkarten der Expressionskonstrukte für die transiente Transfektion von PLC-Zellen.	136
Abbildung 7-2 Vektorkarten der mikroinjizierten Transkriptionskonstrukte.	137
Abbildung 7-3 Vektorkarten der mikroinjizierten Translationskonstrukte.	138

7.8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 2-1 Mitglieder der TVPs in <i>Mus musculus</i> , <i>Caenorhabditis elegans</i> und <i>Drosophila melanogaster</i> .	12
Tabelle 2-2 Sequenzvergleich der Ähnlichkeit [%] der TVPs in <i>C. elegans</i> und <i>Mus musculus</i> .	12
Tabelle 2-3 Zuordnung von Neuronen zu spezifischen Neurotransmittern	16
Tabelle 2-4 Beispiele für Neurone und ihre charakteristischen Funktionen.	19
Tabelle 3-1 Verwendete Materialien, Software, Chemikalien, Enzyme und Kits.	20
Tabelle 3-2 Verwendete Puffer und Nährmedien.	25
Tabelle 3-3 Sequenzen der verwendeten Amplimere.	27
Tabelle 3-4 Plasmide.	29
Tabelle 3-5 Cosmide.	29
Tabelle 3-6 Restriktionsendonukleasen.	29
Tabelle 3-7 Affinitätsgereinigte Primärantikörper.	30
Tabelle 3-8 Sekundärantikörper.	31
Tabelle 3-9 Bakterienstämme.	31
Tabelle 3-10 Pipettierschema für den PCR-Ansatz.	39
Tabelle 3-11 Einstellungen der PCR-Maschine.	40
Tabelle 3-12 RT-Reaktionsansatz.	40
Tabelle 3-13 Einstellung der PCR-Maschine für die RT-PCR.	41
Tabelle 3-14 Einstellung für die Cladogrammberechnung mit dem Programm MrBayes 3.11.	41
Tabelle 3-15 DNA, die für die Mikroinjektion verwendet wurde.	48
Tabelle 4-1 Plasmid-Konstrukte für die transiente Transfektion*.	60
Tabelle 4-2 Transkriptions- und Translationskonstrukte für die Mikroinjektion*.	67
Tabelle 4-3 Verteilung der Transkriptions- und Translationschimären in <i>C. elegans</i> .	79
Tabelle 4-4 Translationskonstrukt für die „Rettung“ des PTZ-Phänotyps.	100
Tabelle 7-1 Verwendete Webseiten	133
Tabelle 7-2 Durch Verpaarung generierte Stämme.	133
Tabelle 7-3 <i>C. elegans</i> Stämme.	134
Tabelle 7-4 Datenbanknummern der Sequenzen für die <i>As</i> und <i>Tm</i> zur Berechnung des Cladogramms.	135
Tabelle 7-5 Proteindatenbanknummern von Synaptophysin verschiedener Spezies	135

7.9 Formelverzeichnis

Formel 3-1 Futtermengenbestimmung.	34
Formel 3-2 Bestimmung der Zellzahl mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer.	35
Formel 3-3 Bestimmung der Fragmentmenge.	42

7. Anhang

Formel 3-4 Berechnung der Stromstärke für den Immuno-Blot Transfer.	46
Formel 3-5 Theromotaxis Index [TI].	51
Formel 3-6 Chemotaxis Index [CI].	52
Formel 3-7 Bestimmung der Aldicarbmenge pro Platte.	53

7.10 CD-Verzeichnis

Doktorarbeit: Abraham 2007 (Word- und PDF-Dokument)

Filme: 01bis20

Referenzen: PDF-Dateien und „Reference Manager“ Datenbank

Clonemanager 7.1: Dateien (Vektor- und Primersequenzen)

Software: Biosoftware (Freeware, die in dieser Arbeit verwendet wurden)

7.11 Filmunterschriften

- Film 01** 3D-Animation des Verteilungsmusters von PspH-1_{kurz}:YFP anterior im Pharynx und intestinalen Übergangsröhre.
- Film 02** Animation einzelner konfokaler Schnittebenen der Transkriptionschimäre PspH-1_{lang}:YFP durch den Pharynx.
- Film 03** 3D-Animation der apikalen Kolokalisierung des *terminal webs* (IFB-2::CFP) mit der SPH-1::YFP Expression und der vesikulären Strukturen anterior.
- Film 04** 3D-Animation der apikalen Kolokalisierung des *terminal webs* (IFB-2::CFP) mit der SPH-1::YFP Expression und der vesikulären Strukturen posterior.
- Film 05** 3D-Animation von Psng-1:YFP und Dil zeigt keine Kolokalisierung der Amphidneurone anterior.
- Film 06** 3D-Animation von Psng-1:YFP und Dil zeigt keine Kolokalisierung der Phasmidneurone posterior.
- Film 07** 3D-Animation von SNG-1::YFP und Dil zeigt keine Kolokalisierung der Amphidneurone anterior.
- Film 08** 3D-Animation von SNG-1::YFP und Dil zeigt keine Kolokalisierung der Phasmidneurone posterior.
- Film 09** Kolokalisierung des GABAergen Nervensystem mit der Expression von Psng-1:CFP in einer 3D-Animation anterior.
- Film 10** Kolokalisierung des GABAergen Nervensystem mit der Expression von Psng-1:CFP in einer 3D-Animation posterior.
- Film 11** Die 3D-Animation zeigt die Kolokalisierung der Pscm-1:YFP Expression mit der Dil Markierung der Amphidneurone anterior.
- Film 12** 3D-Animation Dil markierter Amphidneurone des Wildtyps (N2, BJ20).
- Film 13** 3D-Animation Dil markierter Phasmidneurone des Wildtyps (N2, BJ20).
- Film 14** 3D-Animation Dil markierter Amphidneurone der TVP-Dreifachmutante (EG2960, BJ21) zeigen keinen Unterschied in Anzahl und Position der Zellkörper.
- Film 15** 3D-Animation Dil markierter Phasmidneurone der TVP-Dreifachmutante (EG2960, BJ21) zeigen keinen Unterschied in Anzahl und Position der Zellkörper.
- Film 16** Krampfverhalten der TVP-Dreifachmutante (BJ21 *sph-1(ox278)*, *sng-1(ok234)*, *scm-1(hd30)*) in Gegenwart von 6 mg/ml PTZ.
- Film 17** Normales Verhalten des Wildtyps (BJ20) in Gegenwart von 6 mg/ml PTZ.
- Film 18** Krampfverhalten der Synaptobrevinmutante (NM467 *snb-1(md247)*) in Gegenwart von 6 mg/ml PTZ.
- Film 19** Krampfverhalten der Synaptogyrinmutante (BJ14 *sng-1(ok234)*) in Gegenwart von 6 mg/ml PTZ.
- Film 20** Expression von SCM-1::YFP auf einem sich bewegenden Muskelarm, der versucht mit einem Axon eine Neuromuskuläre Endplatte zu generieren (larvales Stadium L3).

Lebenslauf

Präsentationen

- 03/2003 **26th ANNUAL MEETING OF THE GERMAN SOCIETY FOR CELL BIOLOGY, Bonn**
Tetraspan vesicle membrane proteins in *Caenorhabditis elegans*
Leube, R.E., Abraham, C., Hübner, K., Wilhelm, U., Windoffer, R., Jorgensen, E. and Hutter, H.
- 28.11.2003 **3rd ANNUAL MEETING OF THE INTERDISCIPLINARY SCIENCE NETWORK 'MOLECULAR AND CELLULAR NEUROBIOLOGY', Mainz**
Tetraspan vesicle membrane proteins in *C. elegans*
C. Abraham, R. Windoffer, E. Jorgensen, H. Hutter and R.E. Leube
- 04/2004 **99. Versammlung der Anatomischen Gesellschaft, Vienna**
Funktionsanalysen von synaptischen Vesikelproteinen in *Caenorhabditis elegans*
Leube, R.E., Abraham, C., Hutter, H. and Jorgensen, E.
- 16.02.2005 **-6th Meeting of the German Neuroscience Society**
-30th Neurobiology Conference -SATELLITE SYMPOSIUM V, Göttingen
"Joint Symposium of the DFG Neuroscience Graduate Schools"
Synaptic vesicle proteins with four transmembrane domains are not essential for neuronal functions in *C. elegans*
C. Abraham, E. Jorgensen, H. Hutter and R.E. Leube
- 22.09.-
24.09.2005 **7th Young Scientists Meeting German Society for Cell Biology, Jena**
Tetraspan vesicle membrane proteins in *Caenorhabditis elegans*
C. Abraham, H. Hutter, E. Jorgensen and R.E. Leube
- 18.11.2005 **5th ANNUAL MEETING OF THE INTERDISCIPLINARY SCIENCE NETWORK 'MOLECULAR AND CELLULAR NEUROBIOLOGY', Mainz**
Tetraspan vesicle membrane proteins in *Caenorhabditis elegans*
C. Abraham, H. Hutter, E. Jorgensen and R.E. Leube
- 28.04.-
29.04.2006 **European Worm Meeting 2006, Crete**
Evolutionary Conservation of Synaptic Tetraspan Vesicle Membrane Proteins but Lack of Defects in Mutant *C. elegans* Strains
C. Abraham, L. Bai, H. Hutter M.T. Palfreyman, G. Spatkowski, R.M. Weimer R. Windoffer, E.M. Jorgensen, R.E. Leube
- 09.07.-
12.07.2006 **West Coast Worm Meeting: Neuronal Development, Synaptic Function & Behavior *C. elegans* Topic Meeting #2, University of Wisconsin at Madison**
Synaptic tetraspan vesicle membrane proteins are conserved but not needed for synaptogenesis and neuronal function in *C. elegans*
C. Abraham, H. Hutter, M. Palfreyman, G. Spatkowski, R. Weimer, R. Windoffer, E. Jorgensen, R.E. Leube
- 08.12.2006 **6th ANNUAL MEETING OF THE INTERDISCIPLINARY SCIENCE NETWORK 'MOLECULAR AND CELLULAR NEUROBIOLOGY', Mainz**
The Importance of Tetraspan Vesicle Membrane Proteins for GABAergic Neurotransmission in *Caenorhabditis elegans*
C. Abraham, L. Bai and R.E. Leube
- 09.12.-
13.12.2006 **ASCB 46th Annual Meeting, San Diego**
The Importance of Tetraspan Vesicle Membrane Proteins for GABAergic Neurotransmission in *Caenorhabditis elegans*
C. Abraham, L. Bai and R.E. Leube
- 14.03.-
17.03.2007 **Annual Meeting 2007 of the German Society for Cell Biology, Frankfurt**
Neuronal expression and function of the synaptic vesicle protein synaptogyrin in *Caenorhabditis elegans*
C. Abraham, L. Bai and R.E. Leube
-

