

**Zelluläre Mechanismen der Habituation eines
Netzwerks aus mechanosensorischen Neuronen und
Interneuronen im Fadenwurm
*Caenorhabditis elegans***

Promotionsschrift

zur Erlangung des Dokortitels

angefertigt am

**Institut für Biochemie des Fachbereichs 14, sowie dem Buchmann
Institut für molekulare Lebenswissenschaften**

Johann Wolfgang Goethe Universität Frankfurt am Main

vorgelegt von
Cornelia Schmitt

Frankfurt, 14. Juli 2015

Vom Fachbereich 14 der

Johann Wolfgang Goethe - Universität als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. Michael Karas

Erstgutachter: Prof. Dr. Alexander Gottschalk

Zweitgutachter: Prof. Dr. Robert Ernst

Datum der Disputation:

Inhaltsverzeichnis

I.	Einleitung	1
1.	Die verschiedenen Formen des Gedächtnisses	1
1.1.	Habituation: Die einfachste Form des Gedächtnisses	3
2.	Caenorhabditis elegans (C. elegans) als Modellorganismus	6
2.1.	Nervensystem und Bewegungsablauf	7
2.2.	Habituation	16
3.	Optogenetik als Werkzeug zur Untersuchung neuronaler Netzwerke	17
3.1.	Channelrhodopsin2 (ChR2)	19
3.2.	Halorhodopsin	21
3.3.	Das 'Cre-Lox-System'	22
II.	Material und Methoden	25
1.	Material	25
1.1.	Chemikalien	25
1.2.	Puffer und Lösungen	26
1.3.	Kits	28
1.4.	Geräte	29
1.5.	Software	30
1.6.	Plasmide	31
1.7.	Oligonucleotide	32
1.8.	Enzyme	35
1.9.	Organismen	35
1.9.1.	<i>Escharichia coli</i>	35
1.9.2.	<i>Caenorhabditis elegans</i>	35
1.10.	Transgene	38
2.	Methoden	40
2.1.	Molekularbiologische Methoden	40
2.1.1.	Agarose-Gelelektrophorese	40

2.1.2.	Gelextraktion	41
2.1.3.	DNA-Aufreinigung aus wässriger Lösung mit anschließender Fällung	41
2.1.4.	DNA-Modifikation	42
2.1.5.	Transformation von <i>Escherichia coli</i>	43
2.1.6.	Herstellung kompetenter Zellen nach der Rubidium-Chlorid-Methode	43
2.1.7.	Präparation von DNA aus <i>Escharichia Coli</i>	44
2.1.8.	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	44
2.1.9.	Basenpaarspezifische ('Site-Directed')-Mutagenese	45
2.1.10.	Klonierungen	46
2.2.	Kultivierung von <i>C. elegans</i>	50
2.3.	Erzeugung transgener Tiere	51
2.4.	Integration eines extrachromosomalen Arrays	51
2.5.	Kreuzung	52
2.6.	Genotypisierung	52
2.7.	Fluoreszenzmikroskopie	53
2.8.	Optogenetische Verhaltensexperimente	53
2.8.1.	Manuelle Messung	54
2.8.2.	Messungen mit dem 'Single-Worm-Tracker' (SWT)	54
2.8.3.	Messungen mit dem 'Multi-Worm-Tracker' (MWT)	55
III.	Ergebnisse	56
1.	Zellspezifische Expression von ChR2	56
1.1.	Spezifische Expression von ChR2-HR in ASH	57
1.2.	Spezifische Expression von ChR2-HR in AVA	60
2.	Habituation des Rückzugreflexes	64
2.1.	Manuelle Experimente	64
2.2.	Aufbau und Etablierung des 'Multi-Worm-Trackers' (MWT)	68
2.3.	Computergestützte Experimente mit dem MWT	70
3.	Modulationen von AVA	73
3.1.	Eliminierung der chemischen Synapsen mittels Tetanustoxin (TeTX)	74

3.2. Unterbrechung der Gap-Junctions von AVA mittels spezifischer <i>unc-7</i> RNAi	77
3.3. Einfluss von PVC-Inhibition auf AVA	80
3.4. Einfluss von zusätzlicher AVD-Aktivierung auf AVA	87
4. Verwendung der ChR2 Variante HR/TC führt zu ähnlichen Lichtreaktionen bei verbesserter natürlicher Mechanorezeption	90
 IV. Diskussion	 94
1. Zellspezifische Expression optogenetischer Werkzeuge	94
2. Zelluläre Lokalisierung der Kurzzeithabituation des Rückzugsreflexes	98
2.1. Manuelle vs. computergestützte Messungen	98
2.2. Kurzzeithabituation in MRNs oder AVD	99
3. Modulation von AVA	103
3.1. Unterbrechung der Reizweiterleitung	103
3.2. Modulation durch andere Neurone	105
4. Verwendung der ChR2 Variante HR/TC führt zu ähnlichen Lichtreaktionen bei verbesserter natürlicher Mechanorezeption	106
5. Ausblick	109
 V. Anhang	 111
1. Etablierung des MWT	111
2. Einfluss der Habituation der MRNs auf ASH und AVA (Kreuzhabituation)	113
Literaturverzeichnis	115
Abkürzungsverzeichnis	131
Zusammenfassung	135
Danksagung	137

Teil I.

Einleitung

1. Die verschiedenen Formen des Gedächtnisses

Das Gedächtnis ist eine der grundlegendsten und geheimnisvollsten Eigenschaften des Menschseins. Es macht uns zu eigenständigen Individuen mit einer Vergangenheit und einer Zukunft und ermöglicht es, uns daran zu erinnern, wer wir sind. Wir können aus bereits gemachten Erfahrungen lernen und dieses Wissen auf ähnliche Situationen anwenden. Ohne ein funktionsfähiges Gedächtnis wäre es nicht möglich, die Menschen, denen wir im Laufe unseres Lebens begegneten, oder die Orte, die wir besuchten, wieder zu erkennen. Wir könnten nicht lernen wo Gefahr lauert und was unseren Hunger stillt. Das Gedächtnis ist weder greifbar noch sichtbar, aber unabdingbar für das Bestehen des täglichen Lebens. Schon seit vielen Generationen versuchen die Gelehrten diesem Phänomen auf die Spur zu kommen. Zu den Zeiten des Philosophen Descartes (um 1630) ging man davon aus, dass Denken und Bewusstsein von den Aktivitäten des Körpers gänzlich unabhängige Prozesse sind, die des Weiteren allein dem Menschen vorbehalten sind (Descartes (1970)). Inzwischen hat sich diese Sichtweise deutlich gewandelt. Es ist bekannt, dass Denken und Gedächtnis, Lernen und Erinnern von einem Teil unseres Körpers, dem Gehirn, gesteuert werden. Wurde früher unser Denken von der Philosophie lediglich auf theoretische Weise untersucht und hinterfragt, so ist es heute möglich Gedächtnisprozessen auch auf experimentellem Wege auf die Spur zu kommen. Hier spielt neben der Psychologie auch die Biologie eine immer größere Rolle. So kann die Funktionsweise des Gehirns zusätzlich zu verhaltenspsychologischen Experimenten auch auf der Ebene der Neurobiologie oder Biochemie erforscht werden. Das Lebenswerk Eric Kandels, welcher im Jahre 2000 für seine Erforschung von Gedächtnisprozessen an der Seeschnecke *Aplysia* auf molekularer Ebene den Nobelpreis erhielt, hat diesen neuen Forschungsansatz einer breiten Öffentlichkeit zugänglich gemacht. Das Gehirn ist nicht länger eine mysteriöse Blackbox, sondern man kann den Weg, den ein Reiz geht und der schlussendlich zu einer Reaktion führt, mitverfolgen (Kandel (2001)).

Bei Gedächtnisprozessen unterscheidet man zwischen dem impliziten und dem

expliziten Gedächtnis. Explizites Gedächtnis, auch deklaratives Gedächtnis genannt, bezeichnet all jene Erinnerungen die auf der Kenntnis von Fakten und Ereignissen beruhen, wie erlerntes Schulwissen oder die Kenntnis der eigenen Lebensgeschichte, und somit das was landläufig als Gedächtnis bezeichnet wird. Ein zweiter, wenn auch auf den ersten Blick nicht so offensichtlicher Teil des Gedächtnisses, ist das implizite bzw. nicht-deklarative Gedächtnis. Hierbei handelt es sich vor allem um motorische Erinnerungen, trainierte Reflexe und unbewusste Reaktionen auf bestimmte Umgebungsreize. Auch das Erlernen eines Musikinstruments gehört in diese Kategorie. Große Teile der impliziten Gedächtnisleistungen finden in sehr alten und konservierten Bereichen des Gehirns statt und können auch bei einfachen wirbellosen Organismen nachgewiesen werden. Dies ist ein Zeichen dafür, wie wichtig diese Formen des Gedächtnisses für die Anpassung eines Individuums an seine Umwelt sind und auch dafür, dass sie bereits sehr früh in der Evolution entstanden sind. Das explizite Gedächtnis hingegen ist beschränkt auf die neueren Bereiche des Gehirns (Abb.: 1).

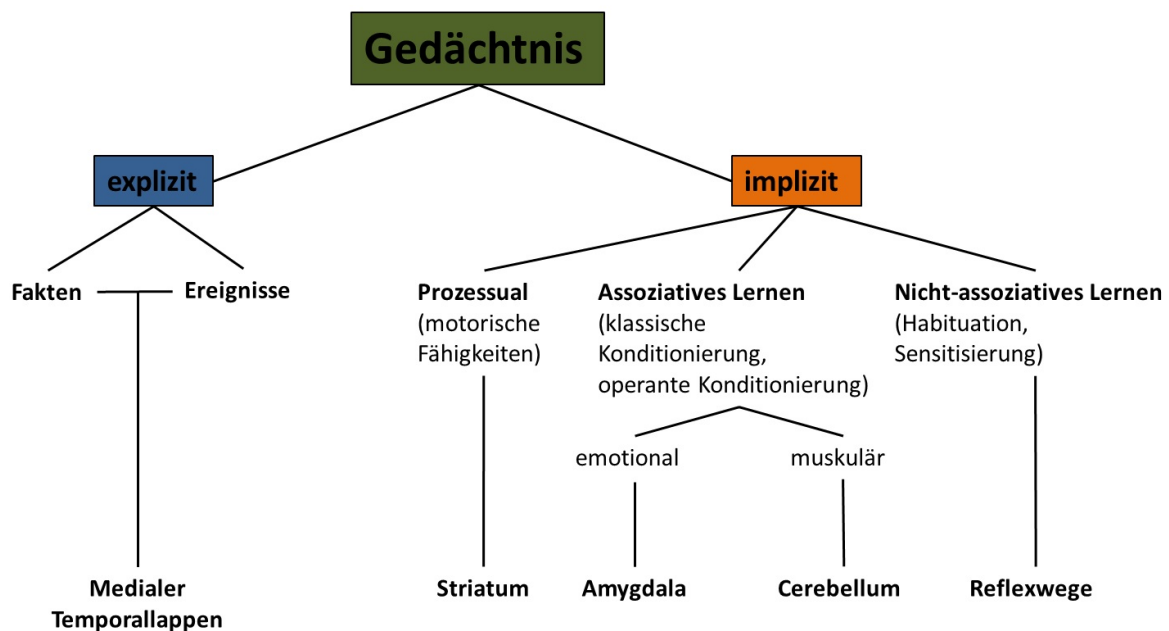


Abbildung 1: Die verschiedenen Gedächtnisformen können unterschieden werden als explizites und implizites Gedächtnis und werden in unterschiedlichen Teilen des Gehirns gebildet. Modifiziert nach Kandel u. a. (2000) Abb.62-4.

Im Rahmen der neurobiologischen Grundlagenforschung ist folglich das implizite Gedächtnis von besonderem Interesse. Implizites Gedächtnis wird langsam und auf der Basis häufiger Wiederholungen gebildet. Die einfachste Form ist das reflexbasierte Lernen. Hier kann unterschieden werden zwischen dem assoziativen und dem nicht-assoziativen Gedächtnis. Bei der Bildung eines assoziativen Gedächtnisses werden entweder 2 Reize (klassische Konditionierung) oder ein Reiz und ein spezifisches Verhaltensmuster in Relation gesetzt (operante Konditionierung). Der zeitliche Zusammenhang spielt hierbei immer eine wichtige Rolle um die beiden Gegebenheiten miteinander zu verknüpfen. Bei der klassischen Konditionierung z.B. wird ein Reiz, der üblicherweise einen Reflex auslöst (US = unconditionierter Stimulus), wie die Präsentation von Nahrung, mit einem weiteren bisher unbesetzten Reiz gepaart (CS = konditionierter Stimulus). Nach genügend vielen Wiederholungen führt die Präsentation des CS alleine zu der Reaktion die ursprünglich vom US ausgelöst wurde (Pavlov u. Georgij (1926)).

Das nicht assoziative Lernen bezeichnet eine einfachere Form des Lernens, weil hier lediglich Informationen über einen einzelnen Reiz erlernt werden. Beispiele hierfür sind Habituation und Sensitisierung. Bei der Habituation wird durch wiederholte Gabe eines Reizes die Reaktion auf diesen unterdrückt oder vermindert, während bei der Sensitisierung die Reaktion auf einen eigentlich harmlosen Reiz durch vorherige Gabe eines starken Reizes erhöht wird (Sherrington (1906); Thompson u. Spencer (1966)).

1.1. Habituation: Die einfachste Form des Gedächtnisses

Bei der Habituation handelt es sich um eine Gewöhnung bzw. erlernte Reaktionsunterdrückung. Dies bedeutet, dass eine wiederholte Präsentation des gleichen ungefährlichen Reizes in einem relativ kurzen Zeitraum zu einer verminderten bzw. völlig ausbleibenden Reaktion auf diesen Reiz führt.

Wie bei jedem Lernvorgang ist die synaptische Plastizität die Grundlage der Habituation. Das Nervensystem ist keine starre Konstruktion, deren Verknüpfungen einmal festgelegt werden, sondern es handelt sich vielmehr um ein System, das sich abhängig von äußeren Einflüssen verändern kann. Signale werden verstärkt oder abgeschwächt. Neue Synapsen können entstehen oder bereits vorhandene verschwinden. Dieser Vorgang wird als synaptische Plastizität bezeichnet. Hierbei werden Synapsen entsprechend vergangener Ereignisse modifiziert, so dass es dem

Organismus möglich ist, in Zukunft auf die gleichen Ereignisse verbessert zu reagieren (Wurtz u. a. (1967)). Im Falle einer Habituation wird die Reizempfindlichkeit der entsprechenden Synapsen herabgesetzt. Es sind verschiedene Modifikationen sowohl auf prä- als auch auf postsynaptischer Seite denkbar, wie z.B. abnehmende Erregbarkeit der sensorischen Zellen, geringere präsynaptische Ausschüttung von Neurotransmittern, Rückgang der postsynaptisch bereitgestellten Neurotransmitter-Rezeptoren oder auch Modulation durch weitere beteiligte Neuronen. Ein Vorreiter bei der Erforschung nicht-assoziativer Lernvorgänge war Eric Kandel, der die verhaltenstypischen Auswirkungen, sowie die neuronalen und molekularen Veränderungen im Zuge einer erlernten Reizunterdrückung am Beispiel der Seeschnecke *Aplysia* zeigen konnte. Gemeinsam mit seinen Mitarbeitern untersuchte er den Kiemenrückziehreflex der Seeschnecke. Bei Berührung des Atemrohrs(Siphon) zieht das Tier seine Kieme ein, um diese vor der potentiellen Gefahr zu schützen. Bei mehrfacher Wiederholung des gegebenen Reizes nimmt die Reaktion deutlich ab (Abb.: 2). Auf zellulärer Ebene konnte gezeigt werden, dass in diesem Fall bei zunehmender Gewöhnung die Freisetzung des Neurotransmitters Glutamat zurück geht (Pinsker u. a. (1970), Castellucci u. Kandel (1974); Castellucci u. a. (1978)). Wenn die Habituation in das Langzeitgedächtnis übergeht, führt es sogar zur Verringerung der vorhandenen synaptischen Endknöpfchen und damit zu einer physischen Veränderung des Nervensystems (Castellucci u. a. (1978); Armitage u. Siegelbaum (1998)).

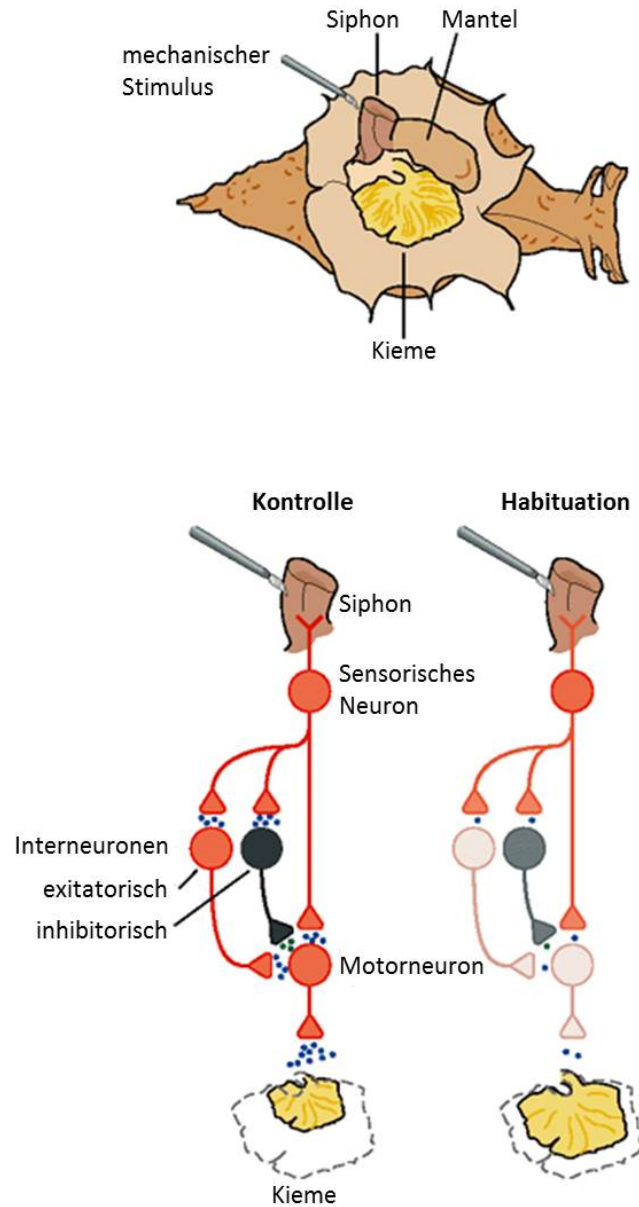


Abbildung 2: Zellulärer Mechanismus der Habituation am Beispiel des Kiemenrückziehreflexes der Seeschnecke *Aplysia*. Oben: Dorsale Ansicht von *Aplysia* mit den involvierten Organen Siphon und Kieme, zur Verdeutlichung des Experimentaufbaus. Unten: Zelluläre Veränderung während der Habituation am Beispiel eines stark vereinfachten neuronalen Netzwerkes. Übernommen von Kandel u. a. (2000) Abb.63-1.

2. *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) als Modellorganismus

Genau wie *Aplysia* kann auch der Fadenwurm *C. elegans* als einfaches Model zum Studium von Lern- und Verhaltensmechanismen verwendet werden. Hierbei handelt es sich um einen 1,2 mm großen Organismus, der besonders wegen seiner geringen Zellzahl (959) und der kurzen Generationszeit (2,5-3 Tage vom Schlüpfen bis hin zum adulten Tier) gerne als Modellorganismus verwendet wird (Abb.: 3). *C. elegans* gehört zu der Familie der Nematoden, ernährt sich von Mikroben und lebt im Bodengrund. Des Weiteren handelt es sich um einen eutelischen Organismus, das heißt jedes Individuum besitzt genau dieselbe Anzahl an Zellen, die sich auch immer auf dem selben Weg entwickeln. Üblicherweise sind die einzelnen Individuen hermaphrodit (Genotyp: XX) und in der Lage sich selbst zu befruchten. Aus einem einzelnen homozygoten Tier gehen somit immer exakte genetische Kopien hervor, was es sehr einfach macht *C. elegans* zu vermehren und mutierte Linien zu kultivieren und über einen längeren Zeitraum stabil zu halten. Zum Einführen von frischem Erbgut in eine Population und dem Aufbessern des Genpools, werden unter ungünstigen Bedingungen, z.B. großer Hitze, auch Männchen gebildet (Genotyp: XO). Diese paaren sich mit Hermaphroditen und die Befruchtung der Eier erfolgt im Anschluss mit dem fremden und nicht mit dem eigenen Sperma, dessen Entwicklung bei Fremdbefruchtung unterdrückt wird. Diese Eigenschaften machen es sehr einfach genetische Veränderungen einzuführen und auch Kreuzungen zweier Linien verschiedenen Genotyps durchzuführen und zu vermehren (Brenner (1974); Byerly u. a. (1976); Sulston u. Brenner (1974)).

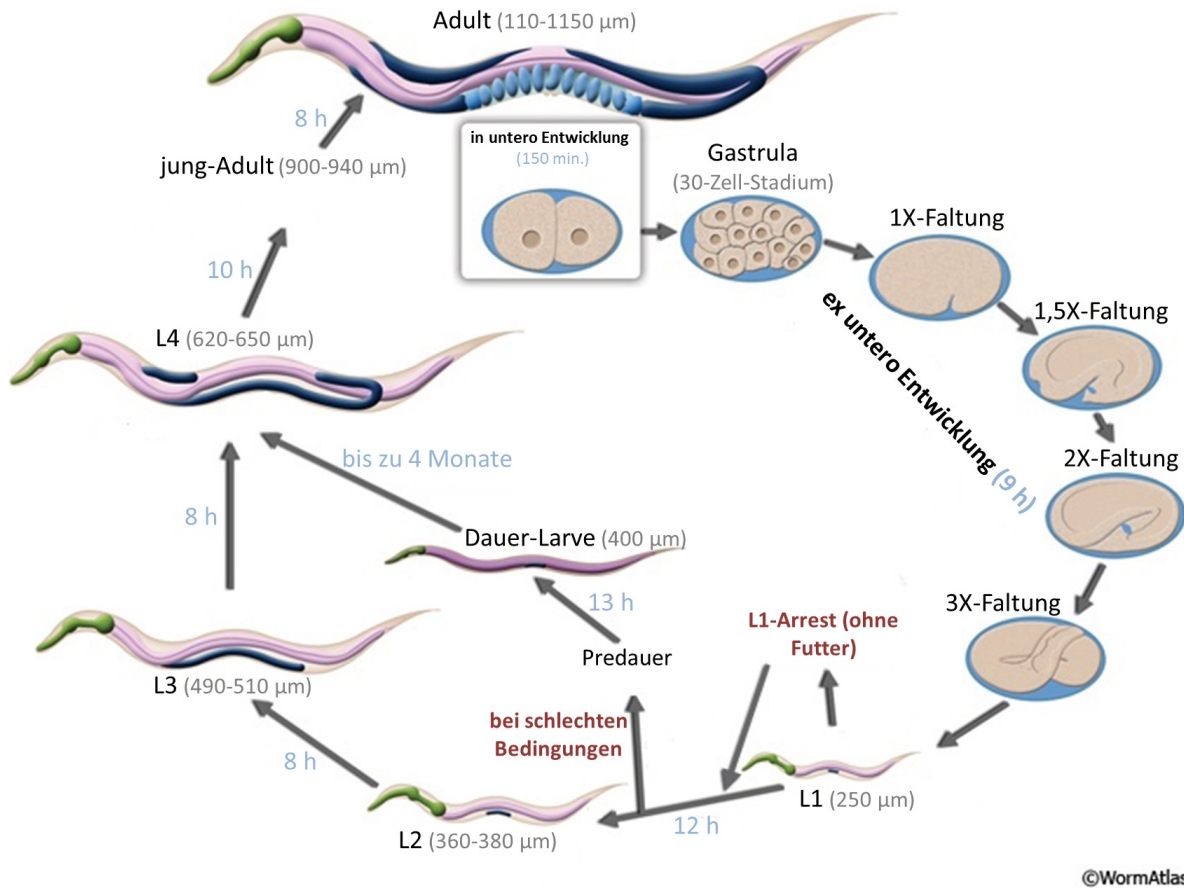


Abbildung 3: Schematische Darstellung des *C. elegans* Lebenszyklus. In blau sind die jeweiligen Zeiträume zwischen den einzelnen Entwicklungsschritten dargestellt. Übernommen von Altun u. Hall (2009).

2.1. Nervensystem und Bewegungsablauf

Das Nervensystem von *C. elegans* umfasst mit 302 Nervenzellen knapp ein Drittel der gesamten Zellen von *C. elegans*. Die Struktur inklusive der Positionen und Verbindungen aller Zellen ist bekannt. 20 Nervenzellen innervieren den Pharynx während 282 das somatische Nervensystem bilden. Diese sind hauptsächlich in Kopf (= Nervenring) und einer Art Bauchmark (= ventraler Nervenstrang) organisiert (White u. a. (1986); Ward u. a. (1975)). Die Kommunikation zwischen den Nervenzellen erfolgt über elektrische ('Gap Junctions') und chemische Synapsen, welche Neurotransmitter ausschütten. Zusätzlich zu diesen fest installierten Verbindungen geben kleine Peptide (Neuropeptide), die teilweise auch weit entfernt vom Bildungsort agieren,

die Möglichkeit der 'kabellosen' Modulation von neuronalen Prozessen (Brownlee u. Fairweather (1999); Sieburth u. a. (2007)).

Elektrische Synapsen

Im Gegensatz zu chemischen Synapsen spielen Vesikel bei elektrischen Synapsen keine Rolle, sondern sie basieren auf direkten leitenden Verbindungen zwischen den zytosolischen Kompartimenten der verbundenen Zellen. Insbesondere im Laufe der Entwicklung von *C. elegans* erfüllen direkte 'Gap-Junctions' wichtige Aufgaben (Phelan (2005)). Aber auch für den adulten Wurm sind ungefähr 560 elektrische Synapsen beschrieben (White u. a. (1986)). Da Nervenzellen und Muskeln durch eine Basalmembran voneinander getrennt sind, kommen 'Gap-Junctions' nur zwischen einzelnen Neuronen oder Muskelzellen vor. Neuromuskuläre Verbindungen hingegen sind immer chemisch.

Die strukturelle Basis der 'Gap Junctions' in Invertebraten bilden Proteine aus der Familie der Innexine (Phelan u. a. (1998); Phelan (2005)). Es konnten 25 verschiedene Innexine gefunden werden, welche vermutlich an der Bildung von 'Gap-Junctions' beteiligt sind (Altun u. a. (2009)). Mutationen der beiden Innexin-Gene *unc-7* und *unc-9* führen zu sehr ähnlichen und deutlich ausgeprägten Defekten in der Koordination von Bewegungen (Starich u. a. (1993); Barnes u. Hekimi (1997); Kawano u. a. (2011)). Es konnte gezeigt werden, dass besonders diese beiden Proteine eine wichtige Rolle bei der Funktionalität der 'Gap Junctions' des Neuromuskulären Systems spielen.

Durch die direkte Verbindung der beiden Zelllumina können Erregungszustände sehr schnell weitergegeben werden und die Verhaltensmuster laufen synchronisiert ab. Besonders zwischen homologen Zellen oder paarweisen Neuronen finden sich häufig 'Gap Junctions' genauso wie zur Bewegungskoordination zwischen Muskelzellen. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass 'Gap Junctions' in manchen Zellen zusätzlich eine Art Nebenleitung ('shunt') bilden, der diese Neuronen synchronisiert und so für eine koordinierte Vorwärtsbewegung verantwortlich ist (Kawano u. a. (2011)).

Chemische Synapsen

Zwischen den 302 Nervenzellen von *C. elegans* sind ca. 5000 chemische Synapsen

ausgebildet, sowie 2000 Verbindungen zwischen Nerven- und Muskelzellen (neuromuscular junctions (NMJ)) (White u. a. (1986)). Genau wie bei Vertebraten auch, werden hier von *C. elegans* verschiedene Neurotransmitter und Neuropeptide zur Signalweiterleitung verwendet (Brownlee u. Fairweather (1999)). Anders als bei Vertebraten oder auch bei *Aplysia* werden von *C. elegans* kaum endständige Synapsen ausgebildet. Die Synapsen bilden sich in spezialisierten Bereichen, die entlang des gesamten Axons gelegen sind (en passant). Die Nervenzellen selbst bestehen zu meist aus einem recht kleinen Zellkörper, so wie jeweils einem einzelnen Axon und Dendriten, die kaum oder auch gar nicht verzweigt sind (White u. a. (1986)). In den synaptischen Bereichen werden die Neurotransmitter in Vesikeln bereitgestellt und können bei Erregung der präsynaptischen Membran freigesetzt werden (Abb.: 4).

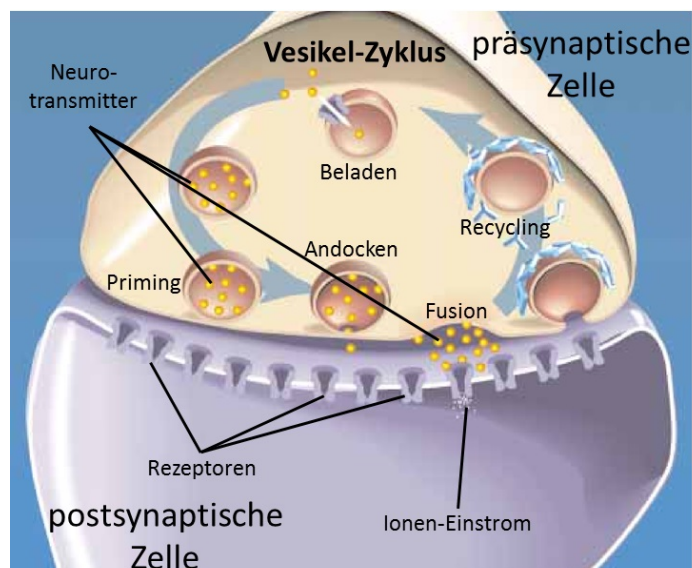


Abbildung 4: Schematische Darstellung einer chemischen Synapse. Übernommen von Harris u. a. (2001).

Dieser Vorgang wird als Exozytose bezeichnet und unterteilt sich in mehrere Phasen. Bei der ersten Phase, dem 'Docking' werden die Vesikel zur aktiven Zone der präsynaptischen Membran geleitet um dort anzudocken (Rizzoli (2004)). Hier spielen sowohl Vesikelproteine als auch Membranproteine der Zelle eine Rolle. Im Zentrum des Vorgangs steht der sogenannte SNARE-Komplex. Er setzt sich zusammen aus dem Vesikel assoziierten Protein Synaptobrevin und den beiden membranständigen Proteinen Syntaxin und SNAP25 (liegt als Dimer vor). Diese drei Proteine werden in *C. elegans* von den Genen *sub-1*, *unc-64* und *ric-4* kodiert (Soellner u. a. (1993); Nonet

u. a. (1998); Saifee u. a. (1998)). Gemeinsam bilden sie eine je viersträngige Helix zu beiden Seiten des Vesikels, die sich im Folgenden immer weiter verknäult und das Vesikel an die Zellmembran heranzieht (Abb.: 5) (Chen u. a. (2001)). Diese Phase wird 'Priming' genannt. Zusätzlich zu dem SNARE-Komplex konnte das Protein UNC-13 dabei als Schlüsselfaktor identifiziert werden (Miller (1999)). Die endgültige Fusion des Vesikels und die damit einhergehende Freisetzung des Neurotransmitters wird durch einen erhöhten Kalziumspiegel innerhalb der präsynaptischen Zelle gesteuert (Geppert u. a. (1994); Littleton u. a. (1993, 1994)). Mit Hilfe von Adhäsionsmolekülen werden anschließend an die erfolgreiche Exozytose die Membranphospholipide so wie die membranständigen Vesikelproteine zurück ins Zellinnere geführt und für neue Vesikel verwendet (=Recycling) (Huttner u. Schmidt (2000); Sweitzer u. Hinshaw (1998); Sever u. a. (2000); Greener u. a. (2001)).

Die Neurotransmitter werden in den synaptischen Spalt entlassen und diffundieren zur postsynaptischen Membran. Dort binden sie an Rezeptormoleküle, die von der postsynaptischen Zelle bereit gestellt werden. Im Zusammenhang mit neuronaler Transmission gibt es zwei wichtige Klassen an Rezeptortypen: ionotrope und metabotrope Rezeptoren. Auch *C. elegans* macht hier keine Ausnahme. Ionotrope Rezeptoren werden auch als Liganden abhängige Ionenkanäle bezeichnet. Hierbei handelt es sich um membranständige Ionenkanäle, die durch die Bindung eines Liganden (hier der Neurotransmitter) gesteuert werden. Jeder Kanal besteht aus vier oder fünf Untereinheiten, die entweder von dem selben oder unterschiedlichen Genen codiert werden. In *C. elegans* sind rund 100 verschiedene Gene für sowohl erregende als auch inhibierende, ionotrope Rezeptoren bekannt. Diese Art der Rezeptoren öffnen und schließen schnell und sind somit ideal für die Vermittlung kurzfristiger Signale (Bargmann (1998); Fleming u. a. (1997); Hart u. a. (1995); Maricq u. a. (1995); Schofield u. a. (1987)). Metabotrope Rezeptoren hingegen beeinflussen das Ionengleichgewicht in der Zelle nicht direkt, sondern setzen nach Aktivierung durch einen Liganden eine intrazelluläre Signalkaskade in Gang, die wiederum zur Weiterleitung des Signals an bestimmte Strukturen beiträgt (Second-Messenger-System). Die häufigsten metabotropen Rezeptoren sind mit G-Proteinen gekoppelt (= G-protein-coupled receptor (GPCR)). Hierbei handelt es sich um heterotrimere Proteine welche an ihrer α Untereinheit mit einem GDP verbunden sind. Durch Legendenaustausch an den Rezeptor ist der Rezeptor dazu befähigt das GDP in ein GTP umzuwandeln und somit die $G\alpha$ -Untereinheit zu aktivieren, welche ihrerseits nun Zielproteine aktivieren kann und somit das oben genannte Second-Messenger-System in Gang setzt. Ein

großer Teil der in *C. elegans* gefundenen G-Protein gekoppelten Rezeptoren ist an der chemosensorischen Wahrnehmung beteiligt (Wess (1997); Bargmann (1998); Pace u. a. (1985); Sonnhammer u. Durbin (1997); Palczewski u. a. (2000)).

Zur Untersuchung der Rolle chemischer Synapsen bei bestimmten neuronalen Verbindungen kann die Synapse mit Hilfe des Proteins Tetanustoxin (TeTx) gehemmt werden. TeTx wird von dem Bakterium *Clostridium tetani* gebildet und wirkt neurotoxisch, in dem es in der Lage ist das am SNARE-Komplex beteiligte Synaptobrevin proteolytisch zu spalten. TeTx kann auf molekularbiologischem Wege als Transgen in *C. elegans* zellspezifisch exprimiert werden. Auf diese Weise können chemische Verbindungen zwischen bestimmten Neuronen gezielt unterbrochen werden und mit Hilfe der daraus resultierenden Veränderungen in Verhalten und synaptischer Übertragung die Rolle dieser Verbindungen aufgeklärt werden (Schiavo u. a. (1992); Davis u. a. (2008)).

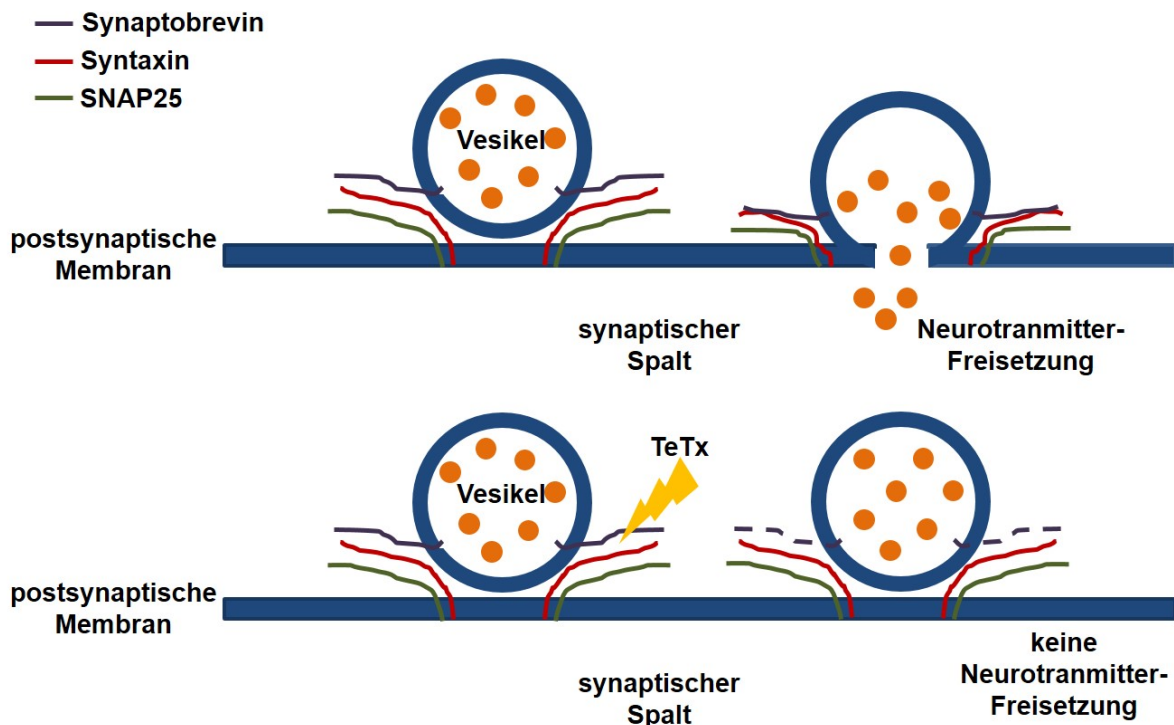


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Rolle, die der SNARE-Komplex bei der Freisetzung von Neurotransmittern einnimmt. Unten: Das von *Clostridium tetani* gebildete Nervengift Tetanustoxin (TeTx) degradiert Synaptobrevin und verhindert die Ausbildung des SNARE-Komplexes und somit auch die Freisetzung von Neurotransmittern.

Eine Sonderrolle bei chemischen Synapsen nehmen die Neuropeptide ein. Hierbei handelt es sich um kleine Peptide, die ebenfalls in Vesikeln bereitgestellt werden und bei Stimulation der Nervenzelle freigesetzt werden können. Neuropeptide können jedoch auf verschiedene Weise Wirkung zeigen. Sie dienen sowohl als primäre Transmitterstoffe, können aber auch als Hormone weit entfernt vom Freisetzungsort wirken. Die mehr als 250 in *C. elegans* gefundenen Neuropeptide sind somit in der Lage komplexe Verhaltensweisen zu steuern und bieten ein zusätzliches Werkzeug zur Neuromodulation (Li u. a. (1999); Li (2008)).

C. elegans verfügt über ein komplexes sensorisches System, mit dem es ihm möglich ist, eine Vielzahl von Umgebungsreizen wahrzunehmen (Croll (1975)). In Zusammenhang mit Habituation ist das mechanosensorische System am besten untersucht (Rankin u. a. (1990)).

Die mechanische Stimulation beinhaltet leichte und starke Berührungen am gesamten Körper, sowie Berührungen der Nasenspitze des Wurms. Auch Erschütterungen der Umgebung (unter Laborbedingungen hervorgerufen durch Antippen der Kulturschale) werden über mechanosensorische Neurone wahrgenommen. Hierbei wird zwischen drei verschiedenen Klassen unterschieden: Neuronen, deren Mechanorezeptoren in sensorischen Zilien enden, berührungssensitive Neuronen und Neuronen, die eine Dehnung der Membran detektieren und über 'Gap Junctions' weitergeben. Für die Wahrnehmung von leichten (ALML, ALMR, AVM, PLML, PLMR, PVM (Chalfie u. a. (1985))) und starken (PVD) (Way u. Chalfie (1989)) Berührungen entlang des Körpers sind berührungssensitive Neuronen verantwortlich. Im Bereich von Schwanz und Nase sind Neuronen mit sensorischen Zilien zu finden (ADE, ASH, CEP, FLP, IL1, OLQ and PDE) (White u. a. (1986); Goodman (2006)). Ein leichtes Antippen der Nase wird von IL1, FLP und OLQ Neuronen wahrgenommen (Hart u. a. (1995); Chatzigeorgiou u. Schafer (2011)), ein starkes hingegen von den ASH und FLP Neuronen (Kaplan u. Horvitz (1993); Albeg u. a. (2011); Chatzigeorgiou u. Schafer (2011)). Die CEP, ADE und PDE Neuronen nehmen die Textur des umgebenden Mediums wahr und können so beispielsweise die Information, dass ein Bereich mit Futterbakterien erreicht ist, weitergeben (Sawin u. a. (2000)). ASH nimmt eine Sonderstellung ein. Zusätzlich zu der Wahrnehmung von starken Berührungen an der Nase, ist dieses Neuronenpaar außerdem dazu in der Lage schädliche Chemikalien, sowie Veränderungen in osmotischem Wert und pH-Wert der Umgebung zu detek-

tieren (Troemel u. a. (1997); Hart u. a. (1999); Mellem u. a. (2002)). Im Rahmen dieser Arbeit liegt besonderes Augenmerk auf der Habituation leichter Berührungsreize, die über die oben angesprochenen Neuronen ALML, ALMR, AVM, PLML, PLMR und PVM vermittelt werden.

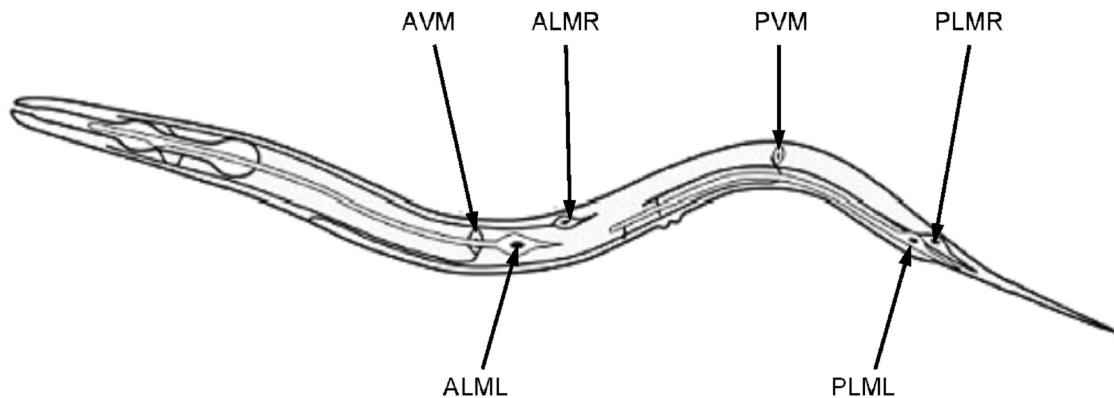


Abbildung 6: Schematische Darstellung der sechs, für die Wahrnehmung leichter Berührungen verantwortlichen, mechanosensorischen Neuronen und ihrer Lage entlang des Körpers von *C. elegans*. Übernommen von Tavernarakis u. Driscoll (2001).

Abhängig davon, wo die Berührung stattfindet, werden entweder die anterioren (ALM, AVM) oder posterioren (PLM, PVM) Neuronen gereizt. Die Reizweiterleitung erfolgt über die Interneuronen AVA, AVB, AVD, AVE und PVC an Motorneuronen, die letztendlich den Fluchreflex auslösen (Abb.: 7). Berührungen im vorderen Bereich führen zu einer Rückwärtsbewegung (vermittelt von AVA, AVD und AVE) und analog dazu führen Berührungen im hinteren Bereich des Wurmes zu einer Vorwärtsbewegung (vermittelt von AVB und PVC). Die von AVM (=Rückwärtsbewegung) vermittelten Signale übersteigen die von PVM (=Vorwärtsbewegung), welches lediglich als Verstärker dient, deutlich. Somit führt eine Erschütterung der ganzen Platte größtenteils (85%) zu einer Rückwärtsbewegung (= Rückzugsreflex) (Rankin u. a. (1990); Rankin u. Broster (1992); Broster u. Rankin (1994)). Von ALM und AVM werden die Informationen über die Interneuronen AVD und AVE an AVA weitergeleitet und im Anschluss an die entsprechenden Motorneuronen, welche die Rückwärtsbewegung einleiten. ASH hingegen vermittelt durch zusätzliche Synapsen auch Signale direkt auf AVA (White u. a. (1986)). Durch Laserablationsstudien konnte AVA als der maßgebliche Signalgeber für die Einleitung einer Rückwärtsbewegung identifiziert

werden (Piggott u. a. (2011)). Hierbei handelt es sich um ein im Kopf, als Teil des Nervenrings, lokalisiertes Zellpaar. Die Axone bilden eine Schlaufe um den Nervenring und setzen sich anschließend fort bis in den Schwanz des Tieres. Somit ist es AVA möglich Signale an motorische Neuronen entlang der gesamten Körperachse zu vermitteln. Auch AVA und PVC stehen miteinander sowohl über chemische, als auch elektrische Synapsen in Kontakt (White u. a. (1986)). Sehr wahrscheinlich ist, dass hier eine gegenseitige Inhibition erfolgt, was jedoch bisher noch nicht gesichert erforscht wurde.

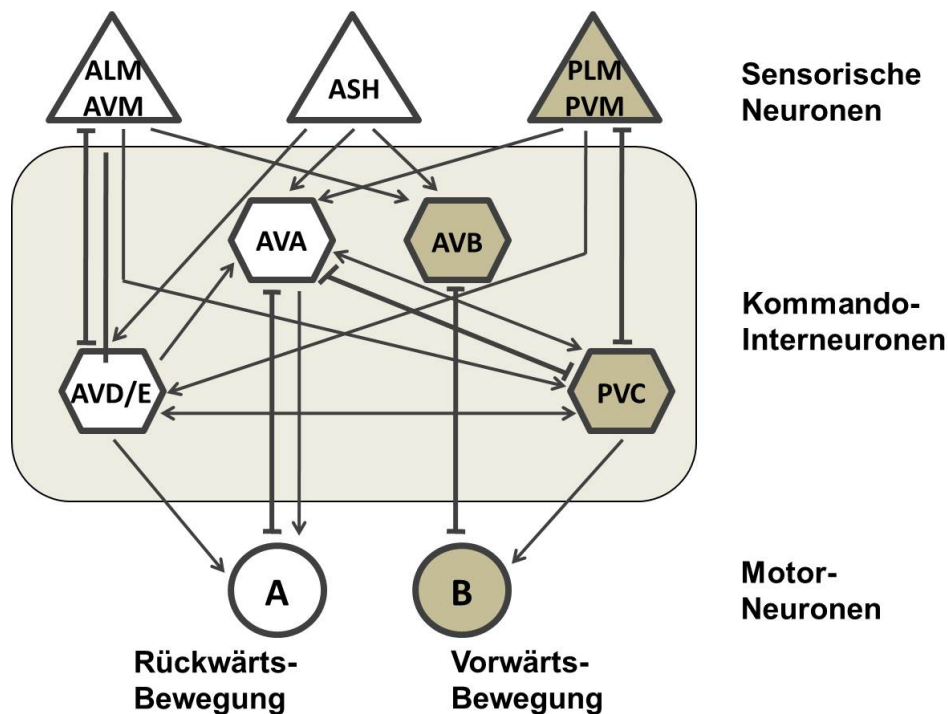


Abbildung 7: Schematische Darstellung der Zellen, welche an der Reizverarbeitung leichter Berührungen beteiligt sind. Weiß: Zellen die für eine Rückwärtsbewegung verantwortlich sind. Beige: Zellen die für eine Vorwärtsbewegung verantwortlich sind. Sensorische Zellen sind dreieckig, Interneuronen sechseckig und Motorneuronen rund dargestellt. Übernommen von Zheng u. a. (1999).

Die Bewegung des Wurms erfolgt über dorsale und ventrale Körperwandmuskeln. Diese sind in jeweils 2 paarigen Muskelsträngen auf der dorsalen und ventralen Seite des Tieres angeordnet (Sulston u. Horvitz (1977)). Die Körperwandmuskeln werden von 8 Klassen von Motorneuronen gesteuert: AS, DA, DB, DD, VA, VB, VC, und VD. Alle Somata der Motorneurone sind entlang des ventralen Nervenstrangs angeordnet.

Die Axone der Neuronen welche dorsale Muskeln innervieren, bilden entlang der Körperseite Kommissuren zum dorsalen Nervenstrang aus (VA, VB, VC, VD). Bei den A und B-Typ Neuronen (VA, VB, DA, DB, AS) handelt es sich um cholinerge Neuronen, welche mittels des Neurotransmitters Acetylcholin die angesteuerten Muskeln aktivieren. D-Typ Motorneuronen (DD, VD) hingegen schütten den inhibitorischen Neurotransmitter Gamma-Aminobuttersäure (= GABA) aus. Die Neuronen VC4 und VC5 innervieren zusätzlich die Vulvamuskulatur und können verschiedene Transmitter bereitstellen. Erregung auf einer Seite des Wurms führt zu einer negativen Rückkopplungsschleife, die zu Muskelinhibition auf der entgegengesetzten Seite führt, um Biegung des Körpers und damit die typische sinusidale Fortbewegung möglich zu machen. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die A-Typ Motorneuronen (VA, DA) direkt mit den Interneuronen AVA, AVD und AVE verschaltet sind und eine Rückwärtsbewegung initiieren. Die B-Typ Motorneuronen (DB, VB) sind mit AVB und PVC verschaltet und sorgen für eine Vorwärtsbewegung der Tiere (White u. a. (1976, 1986)) (Abb.: 8) .

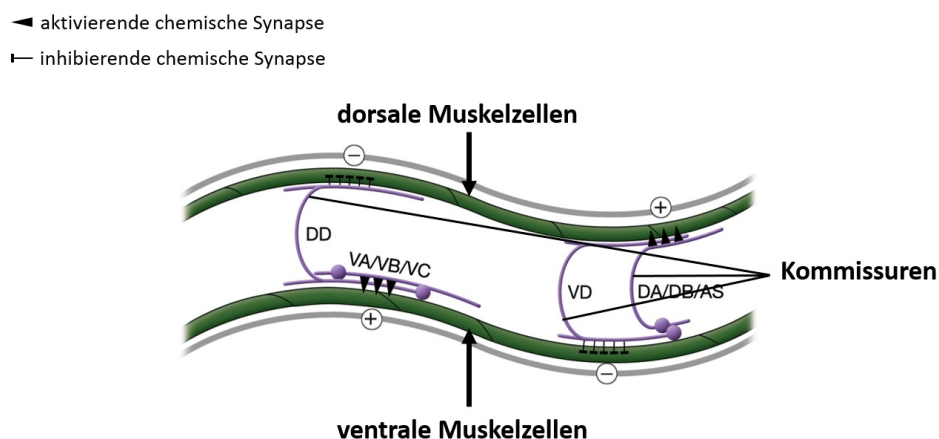


Abbildung 8: Schematische Darstellung der Funktionsweise neuromuskulärer Verbindungen bei *C. elegans*. Alle Somata der Motorneuronen (AS, DA, DB, DD, VA, VB, VC, VD) liegen auf der ventralen Seite. Zur dorsalen Seite hin werden Kommissuren ausgebildet. Wird ein Muskelsegment aktiviert, wird das gegenüberliegende gleichzeitig inaktiviert. Übernommen von Altun u. Hall (2011).

2.2. Habituation

Bei *C. elegans* wurde Habituation zum ersten mal im Zusammenhang mit einer Rückzugsreaktion im Anschluss an eine mechanische Erschütterung (Tap) der Kulturplatte beobachtet. Bei wiederholter Präsentation dieses Reizes (30-40x; alle 10 s) ging sowohl die Anzahl der reagierenden Tiere, als auch die bei einer Reaktion zurückgelegte Wegstrecke zurück. Im Anschluss an die wiederholte Erschütterung der Platte wurden die Tiere mittels Elektroschock einem stärkerem Reiz ausgesetzt und die Rückzugsreaktion konnte vollständig wieder hergestellt werden (= Dishabituation). Dies zeigt, dass es sich wirklich um eine Habituation des zuvor präsentierten schwachen Reizes handelt und nicht um eine Ermüdungserscheinung (Giles u. Rankin (2009); Rankin u. a. (1990)). Durch Versuche mit verschiedenen Abständen zwischen den einzelnen Reizen (=Inter-Stimulus-Intervalle (ISI)) konnte gezeigt werden, dass eine schnelle Folge der Stimuli auch zu einer schnellen Habituation nach nur wenigen präsentierten Reizen führt (ISI=10 s). Eine langsamere (ISI=60 s) Folge von Reizen hingegen zu einer langsameren, erst nach deutlich mehr Reizen eintretenden Habituation führt. Bei kurzen ISI's jedoch wurde eine schnelle vollständige Erholung der Rückzugsreaktion schon nach ein bis zwei Stunden beobachtet (= Kurzzeitgedächtnis). Längere ISI's führen zu einem deutlich ausgeprägterem Gedächtnis, das, je nach durchgeführtem Protokoll, bis zu 24 Stunden oder länger anhalten kann (= Langzeitgedächtnis) (Rankin u. Broster (1992); Beck u. Rankin (1995, 1997)). Habituation scheint also einer Mehrzahl von molekularen Mechanismen zu unterliegen die abhängig von den äußeren Umständen unterschiedlich schnell und stark greifen. Dies ist jedoch noch nicht zur Gänze erforscht.

Bekannt ist, auch aus Untersuchungen an anderen Organismen, dass eine strukturelle Veränderung der Zellen erst zu beobachten ist, wenn ein Langzeitgedächtnis gebildet wird (24 h und länger). Hierfür ist die Neubildung von gedächtnisspezifischen Proteinen notwendig, die erst nach einem entsprechend intensiven Lerntraining in Kraft tritt (Beck u. Rankin (1995); De Luca u. Giuditta (1997)). Für die Ausbildung eines Langzeitgedächtnisses bei *C. elegans* wird das oben beschriebene Trainingsprotokoll (30-40x; alle 10 s) 4x im Abstand von jeweils einer Stunde wiederholt. Im Anschluss an ein solches Training nimmt die Größe der synaptischen Zone zwischen mechanosensorischem Neuron und Komandointerneuron ab. Auch die Anzahl der in die post-synaptische Membran eingebauten Glutamatrezeptoren (GLR-1) verringert sich (Rose u. a. (2002)).

Bei dem, in dieser Arbeit untersuchtem Kurzzeitgedächtnis hingegen, werden keine

neuen Proteine gebildet und es hat auch keine Veränderungen in der Zusammensetzung von prä- oder postsynaptischen Membran zur Folge. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass die Ausschüttung des Neurotransmitters Glutamat während des Trainingsvorgangs verringert wird und die Empfindlichkeit der spannungsgesteuerten Kaliumkanäle (MPS-1-KHT-1-Komplex), die sowohl in der prä-, als auch der postsynaptischen Membran zu finden sind, abnimmt (Rankin (2000); Cohen (1990); Biron u. a. (2006)).

Eine Sonderstellung nimmt hier das sogenannte Mittelzeitgedächtnis ein, welches für einen Zeitraum von 12-24h anhält und im Anschluss an ein Massentraining (80x; alle 60s) gebildet wird. Für die Ausprägung eines Mittelzeitgedächtnis ist das inhibitorische Neuropeptid FLP-20 verantwortlich, aber genau wie beim Kurzzeitgedächtnis werden auch hier keine neuen Proteine gebildet und die Zellen nicht strukturell verändert (Rose u. a. (2002); Li u. a. (2013)).

3. Optogenetik als Werkzeug zur Untersuchung neuronaler Netzwerke

Wie bereits ausgeführt eignet sich *C. elegans* gut als Modellorganismus zur Untersuchung neuronaler Zusammenhänge. Hierbei bieten sich verschiedenen Ansätze an. Einer davon ist die Lokalisierung und Messung von neuronaler Aktivität während eines bestimmten Verhaltens, beispielsweise mit Hilfe von Kalziumsensoren oder von Elektrophysiologie (Kerr u. a. (2000); Richmond (2006)). Durch Aktivitätsmessungen alleine lässt sich jedoch noch kein kausaler Zusammenhang beweisen. Um zu zeigen, dass bestimmte Nervenzellen maßgeblich an der Ausprägung spezifischer Verhaltensmuster beteiligt sind, wird sehr gerne die Laserablation verwendet. Hierbei wird eine bestimmte Zelle zerstört und die resultierenden Verhaltensdefekte untersucht. Auf diese Weise konnten in der Vergangenheit zelluläre Netzwerke für verschiedenste Verhaltensweisen ermittelt werden (Wicks u. Rankin (1995)). Diese Methode ist jedoch nicht reversibel und birgt die Gefahr, dass auch Nachbarzellen in Mitleidenschaft gezogen werden könnten. Seit einigen Jahren stehen jedoch auch weniger invasive Werkzeuge zur Verfügung um den Zusammenhang zwischen Erregung oder Inhibition von bestimmten Neuronen mit dem darauf folgenden Verhalten zu untersuchen. Hierfür wurden eine Reihe von optisch aktiven Molekülen aus verschiedenen Organismen charakterisiert und ihre DNA (Desoxyribonuklein-

säure) entschlüsselt. Die funktionalen Einheiten dieser Moleküle können nun in bestimmten Zellen des Zielorganismus' exprimiert werden. Ein neues Fachgebiet wurde geboren, die Optogenetik (Boyden u. a. (2005)). Die Zahl der molekularen Werkzeuge auf die dabei zugegriffen werden kann, wächst beständig an und reicht von Ionen-Kanälen und Pumpen bis hin zu Licht gesteuerten G-Protein abhängigen Rezeptoren (sensorische Rhodopsine), oder einer Licht aktivierten Adenylatcyclase, die zur Bildung des sekundären Botenstoffes cAMP (cyclisches Adenosinmonophosphat) beiträgt (Airan u. a. (2009); Oh u. a. (2010); Herlitze u. Landmesser (2007); Schroder-Lang u. a. (2007)). Zur Untersuchung neurologischer Zusammenhänge in *C. elegans* bietet sich die Optogenetik an, da es sich hierbei um einen durchsichtigen Organismus handelt. Insbesondere die Rhodopsine Channelrhodopsin2 (ChR2) und Halorhodopsin (NpHR) eignen sich sehr gut zur Untersuchung der Rolle bestimmter Zellen innerhalb eine neuronalen Netzwerkes. Bei Rhodopsinen handelt es sich um multimer vorliegende Transmembran(TM)-Proteine. Eine Untereinheit bestehen immer aus 7 TM-Domänen, die im Falle der Typ I Rhodopsine auch die funktionale Einheit bilden. Im Gegensatz dazu erlangen Typ II Rhodopsine ihre Funktionalität erst durch das Zusammenspiel mehrere Untereinheiten im Proteinkomplex (Abb.: 9). Ebenfalls allen Rhodopsinen ist gemeinsam, dass sie einen Kofaktor, nämlich Retinal, benötigen um auf Licht reagieren zu können (Lanyi u. a. (1990); Nagel u. a. (2002, 2003); Airan u. a. (2009)) (Abb.: 10).

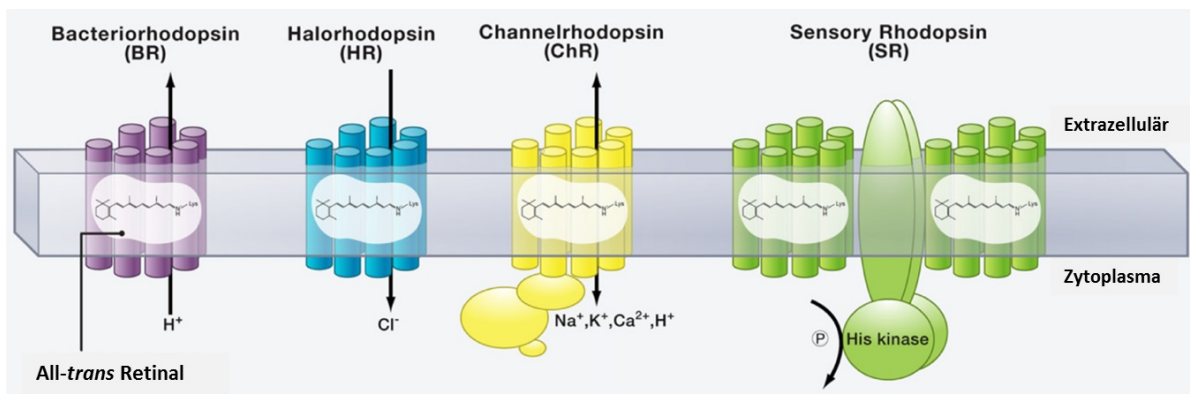


Abbildung 9: Schematische Darstellung verschiedener Rhodopsine, welche in der optogenetischen 'Tool-Box' Anwendung finden. Übernommen von Zhang u. a. (2011).

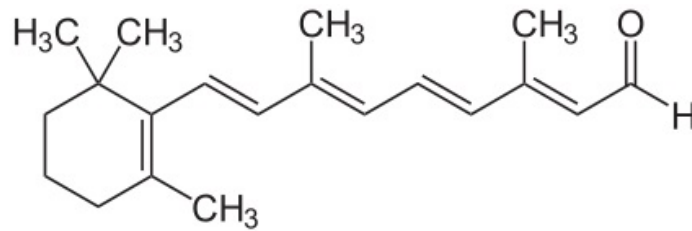


Abbildung 10: Strukturformel des optisch aktiven Enzyms Retinal in der *all-trans* Form, welches als Cofaktor für Rhodopsine dient.

3.1. Channelrhodopsin2 (ChR2)

ChR2 ist ein Kanalprotein, welches zur Familie der Rhodopsine Typ I gehört. Es stammt aus der Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* und es handelt sich dabei um einen Kationenkanal. Das über eine Schiff'sche Base kovalent gebundenen Retinal liegt im geschlossenen D470 Zustand in der oben abgebildeten *all-trans* Form vor. Bei Beleuchtung mit blauem Licht (470 nm) wird ein Photon aufgenommen und das Retinal wechselt in die *13-cis* Form. Über zwei kurzlebige Zwischenzustände wechselt ChR2 zu dem P520 Zustand und ist nun offen und Kationen können entlang des Konzentrations- und Ladungsgefälles ins Zellinnere gelangen (Abb.: 11). Es kommt zu einer Depolarisation und damit einer Erregung der Zelle. Auf diese Weise können Nervenzellen, in deren Zellmembran ChR2 durch genetische Manipulation exprimiert wird, künstlich mit der Hilfe von blauem Licht gereizt werden. Der geöffnete P520 Zustand ist nicht dauerhaft stabil (ca. 10 ms) und ChR2 kehrt wiederum über verschiedene Zwischenstufen zum D470 Dunkelzustand zurück. Mit Hilfe von grünem Licht ist es außerdem möglich den P520 Zustand direkt in D470 zu überführen (Nagel u. a. (2003, 2005); Ritter u. a. (2008); Bamann u. a. (2008)). Das gesamte wildtypische Protein ist 737 Aminosäuren (AS) lang. Da jedoch gezeigt werden konnte, dass lediglich ein N-terminaler Bereich von 315 AS, welcher die 7 TM-Domänen enthält, für die vollständige Kanalfunktion notwendig ist, wird für optogenetische Anwendungen lediglich dieser Bereich kodiert.

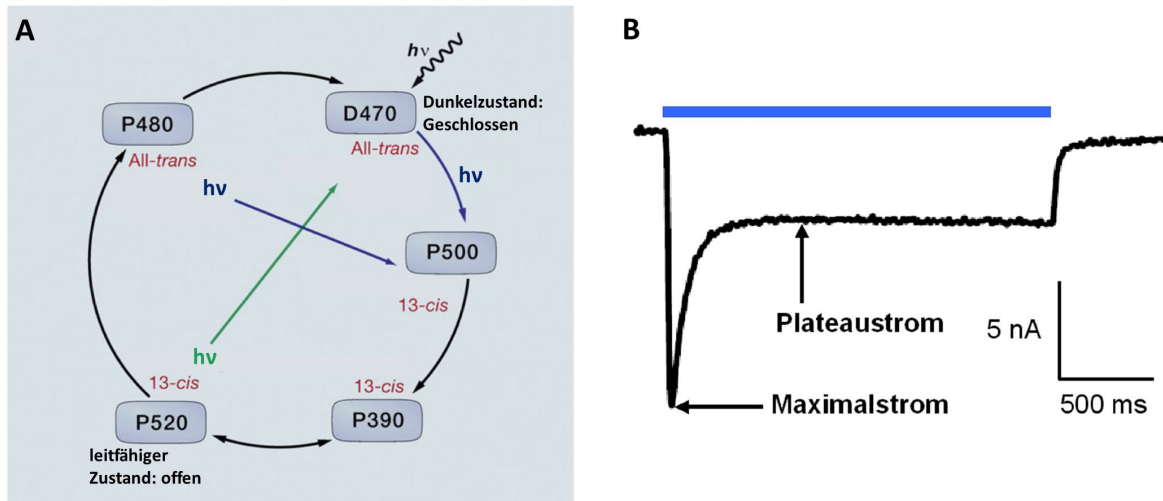


Abbildung 11: Funktionsweise von ChR2: A) Schematische Darstellung der Übergänge zwischen den verschiedenen Zuständen D470 (geschlossen) und P520 (offen). Die farbigen Pfeile zeigen an, welche Zustandsänderungen durch Beleuchtung mit Licht der entsprechenden Wellenlänge erreicht werden kann. Übernommen von Zhang u. a. (2011). B) Elektrophysiologisch messbarer Strom an der Membran einer *Xenopus laevis* Oocyte welche ChR2 exprimiert während blauer Beleuchtung (siehe blauer Balken). Übernommen von Berndt u. a. (2009).

Inzwischen existieren viele verschiedene Mutationen von ChR2 die unterschiedliche Eigenschaften besitzen, so können Öffnungsdauer oder Lichtintensität und damit einhergehend die Effizienz des Kanals verändert werden (Nagel u. a. (2005); Lin u. a. (2009); Berndt u. a. (2009)). Eine der am häufigsten verwendeten Mutationen ist H134R. Dieser AS-Austausch führt dazu, dass der Kanal länger geöffnet bleibt und ein höherer Plateaustrom erreicht wird (Lin u. a. (2009)) (Abb.: 11). Eine in dieser Arbeit ebenfalls verwendete Mutation ist H134R/T159C. Sie zeigt eine deutlich bessere Membraninsertion und damit verbunden eine höhere Expression des Kanals, selbst bei geringeren Mengen an transgener DNA (Erbguth u. a. (2012)).

Zusätzlich zur Einführung von Mutationen in ChR2, um seine Eigenschaften zu verändern, wird auch nach weiteren Kanalrhodopsinen gesucht. Beispiele hierfür sind die in jüngster Zeit entdeckten und charakterisierten Proteine Chronos (schnellere Kinetik als ChR2) und Chrimson (Aktivierungsspektrum nach Rot verschoben) (Klapoetke u. a. (2014)). Es konnten des Weiteren auch erfolgreich Schimären aus verschiedenen Kanalrhodopsinen gebildet werden, wie beispielsweise C1V1-ET/ET (Aktivierung im grünen Bereich) (Erbguth u. a. (2012)) oder C1C2, das sehr stabile

Kristalle formt und zur Strukturaufklärung von ChR verwendet wurde (Kato u. a. (2012)).

3.2. Halorhodopsin

Halorhodopsine gehören ebenfalls zu der Familie der Typ I Rhodopsine (Abb.: 9). Es handelt sich hierbei um Ionenpumpen welche sich in halophilen Archaeen finden. Sie sind zum osmotischen Ausgleich in sehr salzhaltiger Umgebung notwendig. Das hier verwendete Halorhodopsin NpHR stammt aus *Natronomonas pharaonis* und pumpt Chloridionen (Cl^-) vom Extrazellarraum in das Cytoplasma (Lanyi u. a. (1990)). Damit wird die Membran hyperpolarisiert und eine Hemmung der Zielzellen erfolgt. NpHR wird durch gelbes Licht (570 nm) angeregt und geht dann vom NpHR₅₇₅ Zustand über in den K₅₇₀ Zustand. Dieser geht über in die Zwischenstufe L₅₂₀ und unter Abgabe eines Cl^- Ions an das Zytoplasma dann zum O₆₀₀ Zustand. O₆₀₀ wiederum geht unter Aufnahme eines Cl^- zurück in den NpHR₅₇₅ Zustand (Abb.: 12).

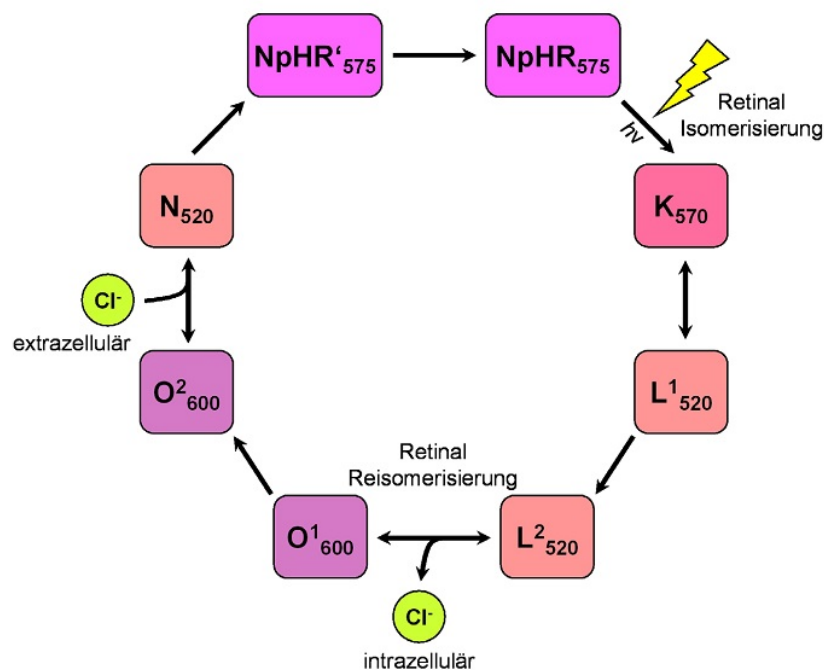


Abbildung 12: Photozyklus von Halorhodopsin aus *Natronomonas pharaonis*. Übernommen von Brauner (2009).

Alternativ zu dem oben beschriebenen Halorhodopsin können auch Protonenpumpen, welche H^+ -Ionen aus der Zelle herauspumpen zur Hyperpolarisation verwendet werden. Beispiele hierfür sind die Proteine Mac (blaues Licht) und Arch (gelbes oder grünes Licht) (Husson u. a. (2012a)). Zur Hyperpolarisation mit rotem Licht steht inzwischen die Halorhodopsinvariante JAWS zur Verfügung (Chuong u. a. (2014)).

3.3. Das 'Cre-Lox-System'

Auch wenn die Optogenetik eine Reihe wichtiger und sehr wirksamer Werkzeuge zur Untersuchung neuronaler Zusammenhänge liefert hat sie dennoch ihre Grenzen. So war es bisher nicht möglich gezielt optisch aktive Proteine in nur einen einzigen Zelltyp einzubringen, da die zur Expression verwendeten Promotoren meist in mehreren Zellen aktiv sind. Um nun jedoch ein genaues Bild der Vorgänge innerhalb neuronaler Netzwerke zu erhalten ist es notwendig wirklich gezielt einzelne Zellen untersuchen zu können. Ein Ziel dieser Arbeit war es eine Möglichkeit zu entwickeln, optogenetische Werkzeuge zellspezifisch anzuwenden. Hierfür wurde das 'Cre-Lox-System' verwendet.

Die Cre-Rekombinase (Cre)

Das Enzym Cre gehört zu den DNA-Rekombinasen und wurde aus dem Bakteriophagen P1 isoliert (Sternberg u. a. (1978)). Hierbei handelt es sich um ein 38 kDA großes Protein, welches funktional in Dimeren vorliegt. Cre ist dazu in der Lage eine bestimmte, 34 bp lange DNA-Sequenz (loxP-Sequenz) zu erkennen und dort zu binden. Eine nahe gelegene zweite Sequenz wird ebenfalls gebunden, so dass die DNA dazwischen einen 'Loop' ausbildet. Dieser wird nun bei gleich orientierten loxP-Sequenzen ausgeschnitten (Abb.: 13). Sind die beiden loxP-Sequenzen jedoch gegenläufig, wird die DNA zwischen ihnen invertiert (Sauer (1987)).

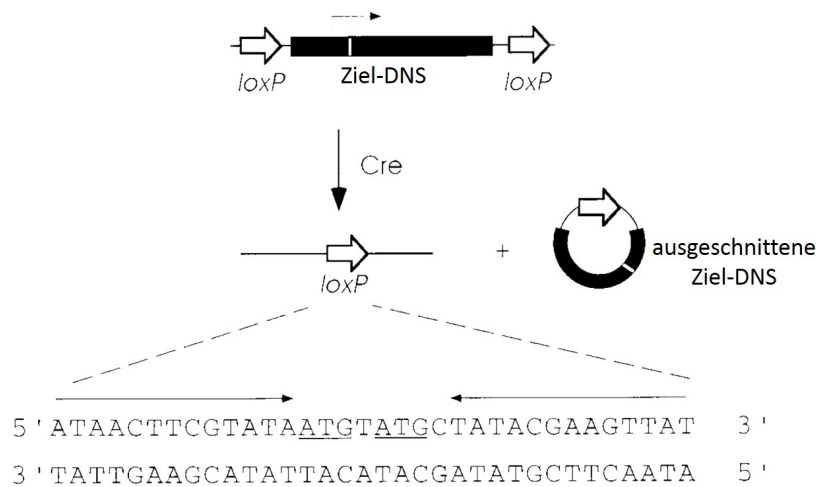


Abbildung 13: Schematische Darstellung einer DNA-Exzision mittels Cre-Rekombinase. Hierbei wird ein von zwei gleich gerichteten lox-P Sequenzen flankiertes DNA-Stück ausgeschnitten. Übernommen von Sauer (1998).

Die Cre-Rekombinase kann nutzbar gemacht werden zur Einführung gezielter genetischer Veränderungen. Insbesondere bei Mäusen gibt es inzwischen verschiedene Anwendungsgebiete: z.B. die Einführung eines Transgenes, welches die veränderten Tiere eventuell infertil macht oder bereits vor der Geschlechtsreife tötet. Hierbei wird das potentiell toxische Gen in einer inaktiven Form in das Genom der Maus gebracht und kann durch die Cre-Rekombinase aktiviert werden. Zusätzlich zu dem gewünschten Transgen wird eine STOP-Sequenz, welche von zwei gleich gerichteten lox-P-Sequenzen flankiert ist eingefügt. Diese STOP-Sequenz verhindert die Expression des Gens. So kann eine stabile transgene Linie geschaffen werden, die dann mit einer Linie gekreuzt wird, welche die Cre-Rekombinase exprimiert. Die daraus entstehenden Nachkommen sind doppelt transgen und tragen sowohl die Cre-Rekombinase als auch das Ziel-Gen. Durch die Cre-Rekombinase wird die STOP-Sequenz ausgeschnitten und das Ziel-Gen kann exprimiert werden (Abb.: 14) (Lasko u. a. (1992); Sauer (1998)). Abhängig von den verwendeten Promotoren kann auf diese Weise auch gesteuert werden, wo in der Maus das Gen exprimiert wird.

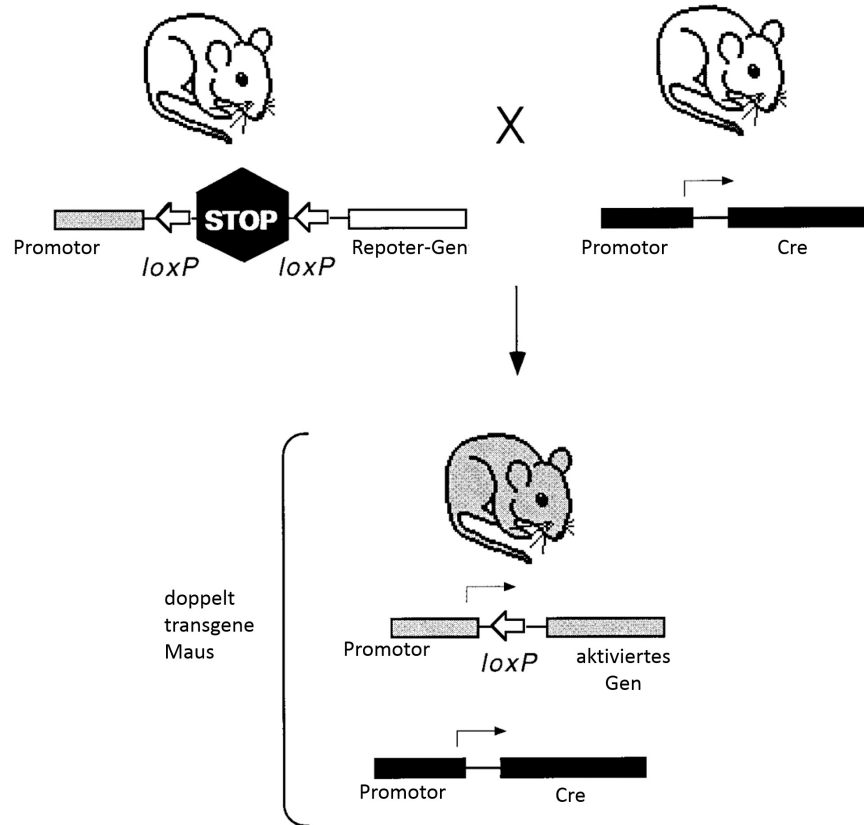


Abbildung 14: Schematische Darstellung der Einführung und anschließenden Aktivierung eines inaktiven Gens mit Hilfe der Cre-Rekombinase. Die Maus mit dem inaktiven Gen wird mit einer 'Cre-Maus' gekreuzt, was zu doppelt transgenen Nachkommen führt, bei denen das Gen aktiv ist. Übernommen von Sauer (1998).

Nach dem selben Prinzip konnte in *C. elegans* eine zellspezifische Expression des Neuropeptidrezeptors NPR-1 in RMG erreicht werden (Macosko u. a. (2009)). Analog zu der Cre-Rekombinase kann, mit einer anderen Erkennungssequenz (FRT), auch die FLP-Rekombinase verwendet werden (Davis u. a. (2008)).

Teil II.

Material und Methoden

1. Material

1.1. Chemikalien

Chemische Substanz	Hersteller
Aceton	Roth
Agar	AppliChem
Agarose	Invitrogen
<i>all-trans</i> Retinal	Sigma
Ampicillin	AppliChem
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth
desoxynucleotidtriphosphate (dNTP's)	Fermentas
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Roth
Essigsäure	Roth
Ethanol	Roth
Ethanol p.A.	Roth
Ethidiumbromid	Roth
Gene Ruler 1 kb Ladder	Fermentas
Gene Ruler 1 kb+ Ladder	Fermentas
Gene Ruler 100 bp Ladder	Fermentas
Glycerin	Roth
Hefeextrakt	Roth
Isopropanol	Roth
Kaliumacetat	Roth
Kaliumcitrat	Roth
Kaliumchlorid	Roth
di-Kaliumhydrogenphosphat	Roth
Kaliumdihydrogenphosphat	Roth
Kalziumchlorid	Roth
Magnesiumsulfat	Roth

Magnesiumchlorid	Roth
Methanol	Roth
Natriumacetat	Roth
Natriumazid	Roth
Natriumchlorid	Roth
di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Roth
Natriumhydroxid	Roth
Natriumhypochlorid 12%	Roth
Oligonukleotide	Eurofins MWG
Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (50:49:1)	Roth
Polyethylenglycol	Roth
Rubidiumchlorid	Roth
Salzsäure	AppliChem
Stickstoff	Linde
Streptomycin	AppliChem
Sucrose	Südzucker
Tris(hydroxymethyl)-aminmethan (Tris)	Roth
Triton X-100	Roth

1.2. Puffer und Lösungen

Name	Zusammensetzung
Bleichlösung	0,5 M NaOH 3,6 % Natriumhypochlorid
DNA-Ladepuffer 6x	40 % Sucrose 0,25 % Bromphenolblau 0,25% Xylencyanol FF in 6x TAE
dNTP-Mix	10 mM dATP 10 mM dCTP 10 mM dGTP

	10 mM dTTP
Injektionspuffer 10x	200 mM KPO ₄ -Puffer 30 mM Kaliumcitrat 20 % Polyethylenglycol
Klenow-Puffer	Fermetas
KPO₄-Puffer	1 M KH ₂ PO ₄ 1 M K ₂ HPO ₄ pH 6
LB-Agar	1 % Trypton/Pepton 0,5 % Hefeextrakt 1 % NaCl 1,5 % Agar autoklaviert
M9-Puffer	20 mM KH ₂ PO ₄ 40 mM Na ₂ HPO ₄ 85 mM NaCl 1 mM MgSO ₄
NGM	0,3 % NaCl 1,7 % Agar 0,25 % Trypton/Pepton 1 mM CaCl ₂ 1 mM MgSO ₄ 25 mM KPO ₄ -Puffer 0,0005 % Cholesterol (in EtOH) autoklaviert
PCR-Puffer 10x	100 mM Tris/HCl pH8,3 500 mM KCl 15 mM MgCl ₂

	0,001 % Gelantine
Phusion HF Puffer	Fermentas
SEW-LB	10 mM Tris/HCl pH 8,3 50 mM KCl 2,5 mM MgCl ₂ 0,45 % Tween-20 0,05 % Gelantine
T4 DNA Ligase-Puffer	Fermentas
TAE	40 mM Tris/Essigsäure 2 mM EDTA pH 8,5
TFBI-Puffer	30 mM C ₂ H ₃ KO ₂ 100 mM RbCl 50 mM MnCl ₂ 10 mM Ca Cl ₂ 15 % Glycerin
TFBII-Puffer	10 mM MOPS 10 mM RbCl 75 mM CaCl ₂ 15 % Glycerin

1.3. Kits

Name	Hersteller
Expand Long Template PCR-System	Roche
Gel/ PCR DNA Fragments Extraction Kit	Geneaid
GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit	Amersham Biosciences

NucleoSpin	Macherey-Nagel
Nucleobond PC 100	Macherey-Nagel
Roti-Prep Plasmid Mini	Roth

1.4. Geräte

Gerät	Name	Hersteller
Filter	Filterset CFP	Zeiss
	Filterset GFP	Zeiss
	Filterset mcherry	Zeiss
	Filter F37-594	AHF
Gellaufkammer		Roth
Heizblock	AccuBlock	Labnet
Inkubatoren	Brutschrank I	Memmert
	Schüttelinkubator Ecotron	Infors HT
Kameras	Axiocam MRm	Zeiss
	C11440	Hamamatsu
	DCC 1545M	Thorlabs
	Falcon 4M30	Dalsa
	Flash 2.8	Hamamatsu
	Powershot G9	Canon
	Powershot G10	Canon
Lampen	Halogenlampe 25 W	Osram
	Halogenlampe 100 W	Osram
	HBO 50 Quecksilberdampf-Lampe	Osram
	HBO 100 Quecksilberdampf-Lampe	Osram
Mikromanipulator	NMJ rechts	Märzhäuser
Mikropipettenpuller	Model-P97	Sutter
Mikroskope	SMZ 645	Nikon
	Axiovert 300	Zeiss
	Axiovert 35	Zeiss
	Konfokales Laser-Rastermikroskop	Zeiss
	Konfokales Laser-Rastermikroskop	Nikon

	Laser-Scanning-Spinning-Disk	
	Mikroskop	Ancor
	Leica MZ16F	Leica
	Observer Z.1	Zeiss
Nano Drop	Tray Cell	Hellma
PCR-Geräte	T1 Thermocycler	Biometra
	My Cycler	Bio Rad
pH-Meter	Cyberscan 510	EUTECH Instruments
Photometer	Jenway	Genova
Pipetten	Classic	Rainin
Shutter	Smart Shutter	Sutter
Shutterkontrollgerät	Lambda SC	Sutter
Spektrophotometer	NanoDrop ND-1000	Thermo Fisher Scientific
Zentrifugen	5810R	Eppendorf
	5415R	Eppendorf
	Heraeus Pico 17	Thermo
	Micro 200R	Hettich

1.5. Software

Name	Quelle
Choreography	Rex A. Kerr und Nicholas A. Swierczek
CloneManager	Sci-Ed Software
EndNote	Thomson Reuters
Gimp	GNU General Public License
ImageJ	open source
Inkscape	GNU General Public License
LabVIEW	National Instruments
LaTeX	Leslie Lamport
Micro-Manager	open source
MiKTeX	open source
MS Office Exel	Mikrosoft
MS Office Powerpoint	Mikrosoft

MWT1.3	Rex A. Kerr und Nicholas A. Swierczek
Origin8 Pro	OriginLab
Past3	Natural History Museum; University of Oslo
TeXnicCenter	GNU General Public License
Zotero	GNU Affero General Public License

1.6. Plasmide

PlasmidNr.	Name	Quelle
pBW31	<i>pmec-4::TeTX::mCherry</i>	Sebastian Wabnig
pCoS2	<i>pnhr-79::nCre</i>	Diese Arbeit
pCoS3	<i>psra-6::LoxP::STOP::LoxP::</i> <i>ChR2-HR::mCherry</i>	Diese Arbeit
pCoS6	<i>pglr-1::LoxP::STOP::LoxP::</i> <i>ChR2-HR::mCherry::SL2::GFP</i>	Diese Arbeit
pCoS7	<i>psra-6::LoxP::STOP::LoxP::</i> <i>ChR2-HR::mCherry::SL2::GFP</i>	Diese Arbeit
pCoS9	<i>pglr-1::TeTX::mcherry</i>	Diese Arbeit
pCoS10	<i>pflp-18::LoxP::STOP::LoxP::</i> <i>ChR2-HR::mCherry::SL2::GFP</i>	Diese Arbeit
pCoS11	<i>prig-3::nCre</i>	Diese Arbeit
pCoS13	<i>posm-10::LoxP::STOP::LoxP::</i> <i>ChR2-HR::mCherry::SL2::GFP</i>	Diese Arbeit
pCoS14	<i>pgpa-11::nCre</i>	Diese Arbeit
pCoS24	<i>pcfi-1::nCre</i>	Diese Arbeit
pCoS25	<i>paex-2::LoxP::STOP::LoxP::</i> <i>ChR2-HR::mCherry::SL2::GFP</i>	Diese Arbeit
pCoS29	<i>pmec-4::ChR2-HR/TC::mCherry</i>	Diese Arbeit
pCoS30	<i>pflp-18::LoxP::STOP::LoxP::</i> <i>TeTX::mcherry</i>	Diese Arbeit
pCoS32	<i>pflp-18::unc-7RNAiantisense</i>	Diese Arbeit
pCoS33	<i>pgpa-14::unc-7RNAisense</i>	Diese Arbeit
pCoS35	<i>paex-2 Teil1::LoxP::STOP::LoxP::</i>	

pCS40	ChR2-HR::mCherry::SL2::GFP <i>pflp-18</i> ::FRT::mCherry::FRT:: ChR2-HR::YFP	Diese Arbeit Christian Schultheis
pCS41	<i>pflp-18</i> ::FRT::mCherry::FRT:: ChR2::YFP	Christian Schultheis
pCS102	<i>prig-3</i> ::FLP	Christian Schultheis
pCS112	<i>pglr-1</i> ::NpHR::CFP	Christian Schultheis
pGJ238	<i>ppgpa-11</i> ::GFP	Gerd Jansen
pNM1736	<i>paex-2</i> ::mCherry	Michael Nonet
pNP165	<i>pglr-1</i> ::LoxP::STOP::LoxP:: ChR2-HR::mCherry	Navin Pokala
pNP259	<i>pgpa-14</i> ::nCre	Navin Pokala
pNP260	<i>pnmr-1</i> ::LoxP::STOP::LoxP:: ChR2-HR::mcherry	Navin Pokala
pSH118	pF49H12.4::TeTX::mcherry	Steven Husson
pKS52	<i>posm-10</i> ::GFP <i>lin-15+</i> <i>pelt-2</i> ::mCherry <i>pmec-4</i> ::ChR2-HR::mCherry <i>pmyo-2</i> ::CFP <i>pmyo-3</i> ::ChR2-HR/TC::mCherry <i>pmyo-3</i> ::Rcamp35 <i>psra-6</i> ::ChR2-HR::YFP pentry bicis GFP	Anne Hart Alexander Gottschalk Alexander Gottschalk Karen Erbgut Alexander Gottschalk Karen Erbgut Sebastian Wabnig und Loren L. Looger Pilali Sengupta

1.7. Oligonucleotide

Nummer	Sequenz 5'-3'
oCoS1	TGCTCCACACCTCCACAGTC
oCoS2	CCCATCTCCGAGACACTCGTAG
oCoS3	CAAGCTTGCATGCGCGGATAGACTTCCAGTTGTGAAT
oCoS4	CCATGGTACCGTCGATTTTATGCTAAAAATCGATA

	AATC
oCoS5	GCGGCCAAACATGATCTTAC
oCoS6	CATACCTTTGGGTCCTTTGG
oCoS9	CTGGTGGCTGGACCAATGT
oCoS10	TACCTACAGCGTGAGCAATTG
oCoS11	AGGTTTCCCGACTGGAAAGC
oCoS12	AGGTTCTTGCGAACCTCATC
oCoS13	CCCGTAATGCAGAAGAAGACCATGGG
oCoS14	CGACCGGCGCTCCCTAGGAATTCTTACTTG
oCoS15	CAAGTAAGAATTCCTAGGGAGCGCCGGTCCG
oCoS16	CATCCGCTTACAGACAAGCTGTGACC
oCoS18	TTAGGTACTAGTCGCTCAGTTGGAATTCTACG
oCoS20	CGGAAGAAGGTTTGGGTTTG
oCoS21	AGGTGCCTCACTGATTAAGC
oCoS22	TCGCCACCTCTGACTTGAGC
oCoS23	GCATGGACGAGCTGTACAAG
oCoS24	AAGCTTGGCCGGCCTCTGTCCATACTGCTCGAATC
oCoS25	AAGCTTGGCGCGCCGTCTAACCCTGAAATTATTAT TTTTAGTTG
oCoS26	AAGCTTGGCCGGCCTTCTCTGCCTCCCTCAACTTC
oCoS27	AAGCTTGGCGCGCCTTTCGAAAAGAAGAATGAAG TTCTTC
oCoS70	CTTCCGGCTCGTATGTTGTG
oCoS71	TGAGCTCGGTACCCTCCAAG
oCoS72	GTACTATGCACTGCGGAATC
oCoS73	GACAAGGTCACGGACACAAG
oCoS87	GGTCCTTTGGCCAATCCCGGGAATAATGTGTAATA TTAATAATATATCGGAAATTTTG
oCoS88	AGCTGGCAACGTCGTTCTAC
oCoS89	CTAGGGCTCACAGCATGTTC
oCoS91	CGGCCGCACTGACTGGGCCGGCCAAGTAGGAGGAG GGACTTAG
oCoS94	CGGCCGCACTGACTGGGCCGGCCGGAGCACAGACT TAGATTGG
oCoS95	GGTCCTTTGGCCAATCCCGGGCATTCTGAAATTTG

TTTTGTTAGAAAAAG
oCoS106 CAAGCTTGCATGCGCGGCCGCCCTGTCACATACTG
CTCG
oCoS107 ATGGTGATCGGCATGCTAGCTAGCGATAACTTCGT
ATAATGTATGC
oCoS114 TCCTGGAGCCCGTCAGTATC
oCoS115 CCCTGACCATCGGTAAATCC
oCoS116 TGTACAACCGTACCGCTAGG
oCoS117 CCGACCTATAGCTCTGACTG
oCoS118 TCCGGAACGATCCAGATACG
oCoS121 GGTCCTTTGGCCAATCCCGGGCTTCCATTCGGTCG
GCGACA
oCoS122 CGACCGAATGGAAGCCCCGGGTGTCGCCGACCGAA
TGGAAG
oCoS123 CGAGTCAGTGAGCGAGGAAG
oCoS124 ACGACTACTGGGTTTCGTTAC
oCoS129 CACGCACTGAACGGTATGTC
oCos130 CGGTCGCTACCATTACCAAC
oCoS131 AAAGGGCCCCGTACGCTATCG
oCoS132 CAGGGAGAAAGAGCATGTAG
oCoS136 CACGGGAGACGAAGAGC
oCoS137 GCCTTAGAACATTGACGC
oCoS140 AGCGGGCACTCATCTTGCTC
oCoS141 GAAGACTGTGACCGTCTTTC
oCoS143 AGACCTCTAGAGGATCCCAGGGCTATCGTCCCTTGA
CCGTGTTC
oCoS144 GGCCCGTACGGCCGAAGTACCGTACGCTAGTC
CAGATG
oCoS145 GCCTCTAGAGGATCCCCGGGACGCACGACTGATG
GATTC
oCoS146 GGCCCGTACGGCCGAAGTACCGTACCGTACCGT
CATCCC
oCoS147 GGATCTGGTGTGACTTCTTC
oCoS148 GGAGCTGCATGTGTCAGAGG
oCoS149 GAGCGTTGAGCTCGAAACTG

oSHTeTXR

GCAGGTAGTTCGGGTCGTAG

1.8. Enzyme

Enzym	Hersteller
antarktische Phosphatase	NEB
Expand-Long-Template-Polymerase	Roche
Klenow Fragment	Fermentas
Phusion DNA Polymerase	Fermentas
Polynukleotidkinase (PNK)	Fermentas
Proteinase K	Sigama
Restrictionsendonucleasen	NEB und Fermentas
Taq DNA Polymerase	Fermentas
T4 DNA Ligase	Fermentas

1.9. Organismen

1.9.1. Escharichia coli

Sowohl zum Füttern, als auch zur Durchführung der molekulargenetischen Arbeiten werden in dieser Arbeit verschiedene Stämme des sehr einfach kultivierbaren Darmbakteriums *E. coli* verwendet.

Stamm	Quelle
DH5 α	Alexander Gottschalk
OP50	Alexander Gottschalk
Stellar Competent Cells	Clonetech

1.9.2. Caenorhabditis elegans

Ein großer Teil der in dieser Arbeit verwendeten *C. elegans* Stämme wurde in dem Labor von Alexander Gottschalk hergestellt oder sogar speziell für die Arbeit angefer-

tigt. Einige stammen auch aus der Stamm-Sammlung des 'Caenorhabditis Genetic Center' (CGC) oder von verschiedenen Kooperationspartnern.

Stammnr.:	Genotyp	Transgen	Quelle
AQ2235	<i>lite-1(ce314)</i>	<i>ljIs114</i>	William Shafer
AQ2313	<i>N2</i>	<i>ljIs123</i>	William Schafer
AQ2334	<i>lite-1(ce314)</i>	<i>ljIs123</i>	William Schafer
CB139	<i>unc-7(e139)</i>		CGC
CB101	<i>unc-9(e101)</i>		CGC
CS5	<i>unc-7(e5)x</i>		CGC
ZX108	<i>lin-15(n765ts)</i>		Alexander Gottschalk
ZX399	<i>lite-1(c313)</i>		Alexander Gottschalk
ZX406	<i>N2</i>		Alexander Gottschalk
ZX509	<i>lin-15(n765ts); lite-1(ce314)</i>		Martin Brauner
ZX831	<i>lin-15(n765ts); lite-1(ce314)</i>	<i>zxEx700</i>	Diese Arbeit
ZX906	<i>lin-15(n765ts); lite-1(ce314)</i>	<i>zxIs18</i>	Diese Arbeit
ZX920	<i>lin-15(n765ts); lite-1(ce314)</i>	<i>zxEx702</i>	Diese Arbeit
ZX1019	<i>lin-15; lite-1(ce314)</i>	<i>zxEx703</i>	Diese Arbeit
ZX1020	<i>lin-15(n765ts); lite-1(ce314)</i>	<i>zxEx704</i>	Diese Arbeit
ZX1021	<i>lin-15(n765ts); lite-1(ce314)</i>	<i>zxEx705</i>	Diese Arbeit
ZX1023	<i>lin-15(n765ts); lite-1(ce314)</i>	<i>zxIs30</i>	Diese Arbeit
ZX1082	<i>lin-15(n765ts); lite-1(ce314)</i>	<i>zxIs25</i>	Diese Arbeit
ZX1083	<i>lin-15(n765ts); lite-1(ce314);</i>		

	<i>unc-7(e5)</i>	<i>zxIs30</i>	Diese Arbeit
ZX1084	<i>lin-15(n765ts);</i>		
	<i>lite-1(ce314)</i>	<i>zxEx707</i>	Diese Arbeit
ZX1085	<i>lin-15(n765ts);</i>		
	<i>lite-1(ce314)</i>	<i>zxEx711</i>	Diese Arbeit
ZX1379	<i>lin-15(n765ts);</i>		
	<i>lite-1(ce314)</i>	<i>zxEx715</i>	Diese Arbeit
ZX1380	<i>lin-15(n765ts);</i>		
	<i>lite-1(ce314)</i>	<i>zxEx717</i>	Diese Arbeit
ZX1394	<i>N2</i>	<i>zxEx718</i>	Diese Arbeit
ZX1395	<i>N2</i>	<i>zxEx719</i>	Diese Arbeit
ZX1425	<i>lin-15(n765ts);</i>	<i>zxIs30;</i>	
	<i>lite-1(ce314)</i>	<i>zxIs52</i>	Diese Arbeit
ZX1426	<i>lite-1(ce314)</i>	<i>ljIs114;</i>	
		<i>zxIs52</i>	Diese Arbeit
ZX1427	<i>unc7(e5)</i>	<i>zxIs52</i>	Diese Arbeit
ZX1428	<i>unc7(e5)</i>	<i>zxIs30;</i>	
		<i>zxIs52</i>	Diese Arbeit
ZX1431	<i>unc-7(e5)</i>	<i>zxIs30</i>	Diese Arbeit
ZX1432	<i>lin-15(n765ts)</i>	<i>zxIs30;</i>	
	<i>lite-1(ce314)</i>	<i>zxEx721</i>	Diese Arbeit
ZX1433	<i>lite-1(ce314)</i>	<i>zxEx722</i>	Diese Arbeit
ZX1434	<i>lite-1(ce314)</i>	<i>ljIs123;</i>	
		<i>zxIs52</i>	Diese Arbeit
ZX1637	<i>lite-1(ce314)</i>	<i>zxIs30</i>	Diese Arbeit
ZX1638	<i>lin15(n765ts);</i>		
	<i>lite-1(ce314)</i>	<i>zxEx723</i>	Diese Arbeit
ZX1639	<i>lin15(n765ts);</i>		
	<i>lite-1(ce314)</i>	<i>zxEx724</i>	Diese Arbeit
ZX1640	<i>lite-1(ce314)</i>	<i>zxEx725</i>	Diese Arbeit
ZX1641	<i>lite-1(ce314)</i>	<i>zxEx726</i>	Diese Arbeit
ZX1642	<i>lite-1(ce314)</i>	<i>zxEx727</i>	Diese Arbeit
ZX1643	<i>lite-1(ce314)</i>	<i>zxEx728</i>	Diese Arbeit
ZX1644	<i>lite-1(ce314)</i>	<i>zxIs30;</i>	
		<i>zxEx728</i>	Diese Arbeit

ZX1645	<i>lite-1</i> (ce314)	<i>zxIs30</i> ; <i>zxEx729 A</i>	Diese Arbeit
ZX1646	<i>lite-1</i> (ce314)	<i>zxIs30</i> ; <i>zxEx729 B</i>	Diese Arbeit
ZX1647	<i>lite-1</i> (ce314)	<i>zxIs30</i> ; <i>zxEx730</i>	Diese Arbeit
ZX1648	<i>lite-1</i> (ce314)	<i>zxEx731</i>	Diese Arbeit
ZX1649	<i>lite-1</i> (ce314)	<i>zxIs30</i> ; <i>zxEx731</i>	Diese Arbeit
ZX1650	<i>lite-1</i> (ce314)	<i>zxIs30</i> ; <i>zxEx732</i>	Diese Arbeit

1.10. Transgene

Integriert:

Nummer	Transgen
<i>ljIs114</i>	[<i>pgpa-13</i> ::FLPase; <i>psra-6</i> ::FTF::ChR2-HR::YFP]
<i>ljIs123</i>	[<i>pmec-4</i> ::ChR2-HR codon optimised; <i>punc-122</i> ::rfp]
<i>zxIs18</i>	[<i>pglr-1</i> ::LoxP::STOP::LoxP::ChR2-HR::mCherry (80 ng/ μ l); <i>pgpa-14</i> ::nCre (80 ng/ μ l); <i>lin-15+</i> (80 ng/ μ l)]
<i>zxIs30</i>	[<i>pflp-18</i> ::LoxP::STOP::LoxP::ChR2-HR::mCherry::SL2::GFP (80 ng/ μ l); <i>pgpa-14</i> ::nCre (80 ng/ μ l); <i>lin15+</i> (80 ng/ μ l)]
<i>zxIs52</i>	[<i>pmyo-3</i> ::Rcamp35 (80 ng/ μ l)]
<i>zxIs66</i>	[<i>pglr-1</i> ::TeTX::YFP (5 ng/ μ l); <i>pmyo-2</i> ::CFP (1,5 ng/ μ l)]

Extrachromosomale DNA:

Nummer	Transgen
<i>zxEx700</i>	[<i>psra-6</i> ::ChR2-HR::YFP (80 ng/ μ l);

	<i>lin-15+</i> (80 ng/μl)]
zxEx702	[<i>pglr-1::LoxP::STOP::LoxP::ChR2-HR::mCherry</i> (80 ng/μl); <i>pgpa-14::nCre</i> (80 ng/μl); <i>lin-15+</i> (80 ng/μl)]
zxEx703	[<i>pglr-1::LoxP::STOP::LoxP::ChR2-HR::mCherry::SL2::GFP</i> (80 ng/μl); <i>pgpa-14::nCre</i> (80 ng/μl); <i>lin15+</i> (80 ng/μl)]
zxEx704	[<i>pflp-18::LoxP::STOP::LoxP::ChR2-HR::mCherry::SL2::GFP</i> (80 ng/μl); <i>pgpa-14::nCre</i> (80 ng/μl); <i>lin15+</i> (80 ng/μl)]
zxEx705	[<i>posm-10::LoxP::STOP::LoxP::ChR2-HR::mCherry::SL2::GFP</i> (80 ng/μl); <i>pgpa-11::nCre</i> (80 ng/μl); <i>lin-15+</i> (80 ng/μl)]
zxEx707	[<i>pflp-18::LoxP::STOP::LoxP::ChR2-HR::mCherry::SL2::GFP</i> (80 ng/μl); <i>prig-3::nCre</i> (80 ng/μl); <i>lin-15+</i> (80 ng/μl)]
zxEx711	[<i>posm-10::LoxP::STOP::LoxP::ChR2-HR::mcherry::SL2::GFP</i> (80 ng/μl); <i>pnhr-79::nCre</i> (150 ng/μl); <i>lin-15+</i> (80 ng/μl)]
zxEx715	[<i>psra-6::LoxP::STOP::LoxP::ChR2-HR::mCherry::bicisGFP</i> (150ng/μl); <i>pnhr-79::nCre</i> (150ng/μl); <i>lin-15+</i> (80 ng/μl)]
zxEx717	[<i>pflp-18::FRT::STOP::FRT::ChR2-HR::YFP</i> (80 ng/μl); <i>prig-3::FLP</i> (80 ng/μl)]
zxEx718	[<i>pglr-1::LoxP::STOP::LoxP::STOP::ChR2-HR::mcherry</i> (80 ng/μl); <i>pdes-2::nCre</i> (20 ng/μl)]
zxEx719	[<i>pnmr-1::LoxP::STOP::LoxP::STOP::ChR2-HR::mcherry</i> (80 ng/μl); <i>pdes-2::nCre</i> (20 ng/μl)]
zxEx721	[<i>pglr-1::TeTX::YFP</i> (5 ng/μl); <i>pmyo-2::CFP</i> (1,5 ng/μl)]
zxEx722	[<i>pmec-4::TeTX::YFP</i> (5 ng/μl); <i>pmyo-2::CFP</i> (1,5 ng/μl)]
zxEx723	[<i>pmec-4::ChR2-HR/TC::mCherry</i> (20 ng/μl); <i>lin-15+</i> (80 ng/μl)]
zxEx724	[<i>pmec-4::ChR2-HR/TC::mCherry</i> (50 ng/μl);

	<i>lin-15+</i> (80 ng/ μ l)]
zxEx725	[<i>pglr-1::Chr2-HR::YFP</i> (80 ng/ μ l); <i>pelt-2::mCherry</i> (10 ng/ μ l)]
zxEx726	[<i>paex-2::LoxP::STOP::LoxP::NpHR::CFP</i> (20 ng/ μ l); <i>pcf1-1::nCre</i> (1 ng/ μ l); <i>pelt-2::mCherry</i> (10 ng/ μ l)]
zxEx727	[<i>paex-2::LoxP::STOP::LoxP::NpHR::CFP</i> (20 ng/ μ l); <i>pcf1-1::nCre</i> (20 ng/ μ l); <i>pelt2::mCherry</i> (10 ng/ μ l)]
zxEx728	[<i>paex-2::LoxP::STOP::LoxP::Chr2-HR::mcherry::SL2::GFP</i> (80 ng/ μ l); <i>pcf1-1::nCre</i> (20 ng/ μ l); <i>pelt2::mCherry</i> (10 ng/ μ l)]
zxEX729	[<i>pflp-18::unc-7RNAiantisense</i> (100 ng/ μ l); <i>pgpa-14::unc-7RNAisense</i> (100 ng/ μ l); <i>pmyo-2::CFP</i> (1,5 ng/ μ l)]
zxEx730	[<i>pflp-18::unc-7RNAiantisense</i> (100 ng/ μ l); <i>pmyo-2::CFP</i> (1,5 ng/ μ l)]
zxEx731	[<i>pflp-18::LoxP::STOP::LoxP::TeTX::mCherry</i> (10 ng/ μ l); <i>pmyo-2::CFP</i> (1,5 ng/ μ l)]
zxEx732	[<i>pglr-1::NpHR::CFP</i> (80 ng/ μ l); <i>pmyo-2::CFP</i> (1,5 ng/ μ l)]

2. Methoden

2.1. Molekularbiologische Methoden

2.1.1. Agarose-Gelelektrophorese

Um DNA-Fragmente ihrer Größe nach aufzutrennen wurde die Agarose-Gelelektrophorese verwendet. Hierbei wird die fragmentierte DNA in die Taschen eines Agarosegels (1-2% Agarose in TAE-Puffer) gefüllt und durch das Anlegen eines elektrischen Feldes aufgetrennt (140 V für 60-90 min.). Die DNA-Moleküle wandern innerhalb des Gels zu der Kathode. Dabei können sich kleinere Fragmente schneller bewegen als große und es entsteht ein charakteristisches Bandenmuster. Um die Größe der einzelnen Fragmente bestimmen zu können wird zusätzlich ein industriell gefe-

tigter Größenstandart auf das Gel aufgetragen. Hier wurden je nach Größe der zu trennenden DNA Fragmente die '1kb+ Dna-ladder', '1kb Dna-ladder' oder '100bp Dna-ladder' der Firma Fermentas verwendet.

Im Anschluss daran wurde das Gel in einem Ethidiumbromid-Bad (40 μ l Ethidiumbromid auf 500 ml Wasser) gefärbt. Ethidiumbromid interkaliert mit der DNA und kann mittels UV-Licht sichtbar gemacht werden. Das Auftrennen von DNA-Fragmenten wurde hier entweder zu Identifikation eines bestimmten Plasmides, anhand seines Verdauungsmuster, oder zum Erhalten eines spezifischen DNA-Fragmentes, welches zur Herstellung eines neuen Plasmides benötigt wurde (siehe auch: Klonierung).

2.1.2. Gelextraktion

Um ein spezifisches DNA-Fragment zu erhalten wurde die DNA im Anschluss an einen Restriktionsverdau über ein Gel aufgetrennt und die benötigte Bande aus dem Gel ausgeschnitten. Das Gel wurde aufgeschmolzen und die DNA mit Hilfe des 'Gel/PCR DNA Fragments Extraction' Kits von Geneaid nach der Vorschrift des Herstellers aufgereinigt.

2.1.3. DNA-Aufreinigung aus wässriger Lösung mit anschließender Fällung

Um DNA in wässriger Lösung aufzureinigen und Proteine zu entfernen, z.B. im Anschluss an eine PCR oder einen Restriktionsverdau, wurden hier zwei unterschiedliche Methoden verwendet. Die Aufreinigung erfolgte entweder analog der Aufreinigung aus einem Gel mit dem Kit von Quiagen nach den Angaben des Herstellers oder mit Hilfe von Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (PCA).

PCA-Aufreinigung:

Hierbei wurde die DNA-Lösung auf mit 2-fach destilliertem Wasser 200 μ l aufgefüllt und anschließend 100 μ l PCA dazu gegeben. Das Gemisch wurde für eine Minute kräftig durchmischt (Vortex) und im Anschluss für 5 min. bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert (Tischzentrifuge für Eppendorfgefäße). Hierbei trennten sich eine wässrige und eine organische Phase voneinander und die organische Phase setzte sich nach unten ab. Die DNA befand sich in der wässrigen Phase und wurde so von Proteinen befreit. Im Anschluss an die Aufreinigung war bei der PCA-Methode eine Fällung der DNA notwendig, um Pufferreste zu entfernen und die DNA zu konzentrieren.

Ethanol-Fällung:

Hierzu wurden zu 100 μl gelöster DNA (z.B. Überstand nach PCA-Aufreinigung) 1 μl 3 M Natriumacetat und 250 μl reine Ethanol zugegeben. Die Fällung erfolgte 10 min. bei -80°C . Im Anschluss wurde die gefällte DNA herunter zentrifugiert (10 min bei 13.000 rpm; 4°C), gewaschen (70% Ethanol, erneute Zentrifugation: 10 min bei 13.000 rpm; 4°C) und bei 40°C im offenen Gefäß getrocknet.

2.1.4. DNA-Modifikation

Um ein neues Plasmid mit den gewünschten Eigenschaften herzustellen, zu klonieren, mussten verschiedene Modifikationen an der DNA vorhandener Plasmide durchgeführt werden. Bei einer klassischen Klonierung wird meist ein kleineres DNA-Stück, welches ein benötigtes Gen oder einen benötigten Promotor oder beides enthält (=Insert), in ein größeres (=Vektor) eingefügt. Der Vektor enthält alle weiteren notwendigen Komponenten um das Plasmid in E. Coli Bakterien vervielfältigen zu können und das gewünschte Gen im Zielorganismus zu exprimieren.

Restriktionsverdau:

Die DNA konnte mit Hilfe sogenannter Restriktionsendonukleasen in verschiedene Fragmente zerlegt werden. Bei Restriktionsendonukleasen handelt es sich um Enzyme, die an eine spezifische DNA-Sequenz binden und dort nach einem, ebenfalls spezifischen, Muster schneiden. Durch die Auswahl der Enzyme kann sowohl die Größe der Fragmente als auch der Ort des Schnittes festgelegt werden. In dieser Arbeit wurden Restriktionsendonukleasen der Firmen New England Biolabs (NEB) und Fermentas verwendet. Die Restriktionsverdau wurden nach den entsprechenden Angaben der Hersteller durchgeführt. Die eingesetzte DNA-Menge betrug für einen präparativen Verdau 20-40 μg DNA und bei einem analytischen Verdau ca. 1-5 μg DNA.

Phosphatase Behandlung:

Um zu verhindern das zwei Vektoren miteinander legieren, kann im Zuge einer Klonierung eine Behandlung des geschnittenen Vektors mit antarktischer Phosphatase durchgeführt werden. Die antarktische Phosphatase katalysiert den Abbau von 5' Phosphat-Resten, die für die Ligation notwendig sind, so dass die Vektormoleküle nur mehr mit den Insertmolekülen reagieren können, bei denen diese Reste noch vorhanden sind. Die Behandlung mit antarktischer Phosphatase wurde gemäß den Angaben des Herstellers (NEB) durchgeführt.

Auffüllung mit 'Klenow':

Wenn bei einer Klonierung die Enden von Vektor und Insert nicht zusammen passen können 5' Enden Hilfe des Enzyms Klenow und unter Zugabe von Desoxinukleotidtriphosphaten (dNTP's) aufgefüllt werden. Auch hier wurde die Behandlung mit 'Klenow' nach Angaben des Herstellers (Fermentas) durchgeführt.

Ligation:

Bei der Ligation wurden nun die beiden geschnittenen und modifizierten Komponenten zu einem Plasmid zusammengefügt. Hierbei kam das Enzym T4 Ligase zum Einsatz und die Ligation erfolgte nach den Angaben des Herstellers (NEB) bei 15°C über Nacht.

2.1.5. Transformation von *Escherichia coli*

Zur Vervielfältigung von Plasmid-DNA wurde diese in *Escherichia coli* transferiert. Hierbei wurden im Anschluss an die Ligation 10 μl des Ligationsansatzes auf 100 μl kompetente Zellen (DH5 α) gegeben. Es folgte zuerst eine Inkubation auf Eis für 30 min, anschließend ein Hitzeschock bei 42°C für 45 sec und eine 5 minütige Abkühlphase. Darauf hin wurden 500 μl LB-Medium zugegeben und die Bakterien wurden für 60 min. bei 37°C im Schüttelinkubator inkubiert. Anschließend können die Zellen entweder direkt in eine Flüssigkultur überführt werden (LB-Medium) oder werden auf LB-Agarplatten ausplattiert und in beiden Fällen über Nacht bei 37°C inkubiert. Diese Methode kann auch eingesetzt werden um bereits vorhandene DNA zu vervielfältigen. Hierbei wurden üblicherweise 1-2 μg Plasmid-DNA zu 100 μl gegeben.

2.1.6. Herstellung kompetenter Zellen nach der Rubidium-Chlorid-Methode

Damit die DNA bei einer Transformation die Zellwand der verwendeten Bakterien durchqueren kann, muss diese zuvor perforiert werden. Die Zellen sind dann kompetent. Zur Perforation der Zellwand gibt es verschiedene Möglichkeiten, sowohl chemische als auch mechanische. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Herstellung der kompetenten Zellen mittels Rubidium-Chlorid, einer chemischen Methode, durchgeführt. Die DH5 α wurden, in 200 ml Medium, aus einer Vorkultur für einige Stunden bei 37°C gezogen und die Ernte erfolgte nach Erreichen einer optischen Dichte bei 600 nm (OD₆₀₀) von 0,4 und einer Stunde Inkubation auf Eis. Im Anschluss an die Zellernte wurden 70 ml TFBI Puffer zugegeben und für 1h auf Eis inkubiert. Es erfolgte eine Umpufferung zu TFBII (12 ml) und die Zellen konnten aliquotiert werden (zu je 100 μl). Es ist von höchster Wichtigkeit, dass alle Arbeitsschritte bei

höchstens 4°C durchgeführt werden.

2.1.7. Präparation von DNA aus Escherichia Coli

Die Isolierung der Plasmid-DNA erfolgte je nach gewünschter DNA Menge und Größe der Bakterienkultur entweder mit dem Kit 'Roti-Prep Plasmid Mini', für kleine Volumina, oder dem Kit 'Nucleobond PC100', für größere Volumina. In beiden Fällen handelte es sich um eine enzymatische Lyse zum Aufschluss der Bakterienzellen. Die Plasmid-DNA wurde zur Aufreinigung an eine Silicagel Matrix gebunden. Die genaue Durchführung der DNA-Präparation erfolgte nach Angabe der Hersteller.

2.1.8. Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Mit einer PCR können spezifische (bekannte) DNA-Sequenzen selektiv vervielfältigt werden: Voraussetzung hierfür ist, dass zumindest zwei, die gewünschte Sequenz flankierende Sequenzen bekannt sind, damit Oligonukleotide (mind. 20bp) dieser beiden Sequenzen hergestellt werden können. Dabei ist darauf zu achten, dass eines dieser Oligonukleotide, der Vorwärtsprimer, am Anfang der zu vervielfältigenden Sequenz, der Sequenz von 3' nach 5' entspricht, während das zweite Oligonukleotid, der Rückwärtsprimer, am Ende der Sequenz, von 5' nach 3' läuft und somit zu der gesuchten Sequenz komplementär ist.

Eine PCR besteht üblicherweise aus drei Schritten die mehrfach wiederholt werden (20-45X).

1. Denaturierung: Hier wird die doppelsträngige DNA bei großer Hitze (95°C+) in ihre beiden Einzelstränge aufgespalten.

2. Die Bindung der Primer: Bei diesem Schritt wird die Probe wieder abgekühlt bis eine Temperatur erreicht ist, bei der die kurzen Primer an die entsprechenden Sequenzen der Matrizen-DNA binden können. Diese Temperatur ist abhängig von Länge und Zusammensetzung der beiden verwendeten Primer.

3. Verlängerung: Nun wird die Temperatur auf 72°C erhöht (kann bei Verwendung verschiedener Polymerasen variieren) und über einen bestimmten Zeitraum gehalten, der abhängig ist von der Länge der gewünschten DNA-Sequenz. Die, der Reaktion zugesetzte, DNA-Polymerase kann nun an den Enden der beiden gebundenen Primer ansetzen und mittels dNTP's diese verlängern, bis die Reaktion durch erneutes Erhitzen auf 95°C abgebrochen wird.

Durch die Wiederholung dieser Schritte kann das DNA-Stück, welches zwischen den

beiden Primern liegt, spezifisch vervielfältigt werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden je nach Fragestellung drei verschiedene Polymerasen (Taq, Phusion und 'Expand-Long-Tamplate-Polymerase') verwendet und die genaue Zusammensetzung der einzelnen Reaktionen, so wie Zeitprotokolle, nach Angaben der Hersteller eingehalten.

Nested-PCR:

Zur Vervielfältigung einer spezifischen DNA-Sequenz anhand einer hochkomplexen DNA-Matrix, wie z.B. genomischer DNA, wird oftmals eine spezielle Art der PCR verwendet, die sogenannte Nested-PCR. Hier wird nicht ein, sondern zwei Primerpaare benötigt. Das erste Primerpaar setzt ungefähr 500-1000bp vor bzw. nach der gewünschten Sequenz an und wird für eine PCR eingesetzt (erste Runde). Das hierbei gewonnene DNA-Gemisch sollte bereits eine sehr große Menge der gewünschten Sequenz enthalten und wird nun als Matrix für eine zweite PCR (zweite Runde) verwendet, welche mit den Primern, die die gewünschte Sequenz tatsächlich flankieren stattfindet. Somit wird die Komplexität der Matrix zur zweiten Runde hin gesenkt und die Wahrscheinlichkeit erhöht, dass das zweite Primerpaar auch die richtigen Bindungspartner finden kann. Um eine Nested-PCR noch effektiver zu gestalten kann für die erste Runde eine Polymerase eingesetzt werden, die speziell für komplexe DNA-Matrizen entwickelt wurde. In dieser Arbeit handelte es sich dabei um die 'Expand-Long-Template'-Polymerase von Roche.

2.1.9. Basenpaarspezifische ('Site-Directed')-Mutagenese

Bei 'Site-Directed' Mutagenese handelt es sich um die spezifische und gerichtete Mutation eines einzelnen, oder von ein paar wenigen Basenpaaren innerhalb einer DNA-Sequenz. Hierfür wird eine PCR in drei Runden, mit insgesamt vier verschiedenen Primern durchgeführt. Es wird ein äußeres Primerpaar (1 und 2) designt, welches die zu mutierende Sequenz und zwei flankierende Schnittstellen umschließt und außerdem je ein Vorwärts- und ein Rückwärts-Primer (3 und 4) von mindestens 25bp Länge. In dessen Mitte befindet sich die mutierte Sequenz. Nun werden insgesamt drei PCR Ansätze gefahren. Die ersten beiden können mit demselben Temperatur- und Zeit-Protokoll stattfinden. Für den ersten Ansatz werden die Primer 1 und 4, für den zweiten 2 und 3 verwendet. Die Ursprungs-DNA dient als Matrize. Für die dritte Runde wird die DNA der beiden vorherigen Ansätze als Matrize eingesetzt und die Primer 1 und 2 verwendet. So kann ein DNA-Fragment hergestellt werden

mit der gewünschten Mutation. Mit Hilfe der, das mutierte Stück flankierenden, Schnittstellen kann im Anschluss eine Klonierung durchgeführt werden, bei der das Ursprungsplasmid als Vektor und das mutierte Fragment als Insert dienen.

2.1.10. Klonierungen

pCoS2: *pnhr-79::nCre*

Zur Erzeugung des Plasmids pCoS2 wurde pNP259 als Vektor verwendet und mit SphI und XmaI geschnitten. Der *nhr-79* Promoter, welcher das Insert darstellte, wurde mittels Nested PCR aus genomischer DNA gewonnen. Verwendet wurden hierfür die beiden Primerpaare oCoS1/oCoS2 (1. Runde) und oCoS3/oCoS4 (2. Runde). Das Insert wurde mit Hilfe des Kits 'In-Fusion HD EcoDry' von Clontech in den Vektor eingefügt. Hierbei wurde nach den Angaben des Herstellers verfahren.

pCoS3: *psra-6::LoxP::STOP::LoxP::ChR2-HR::mCherry*

Zur Erzeugung des Plasmides pCoS3 wurde pNP165 als Vektor verwendet und mit FseI und AscI geschnitten. Das Insert war der *sra-6* Promotor welcher mittels PCR aus dem Plasmid '*psra-6::ChR2-HR::YFP*' amplifiziert wurde. Das verwendete Primerpaar war oCoS5/oCoS6. Auch das Insert wurde im Anschluss an die PCR mit FseI und AscI geschnitten und die beiden Teilstücke wurden zu einem neuen Plasmid ligiert.

pCoS4: *pglr-1::LoxP::STOP::LoxP::ChR2-HR::mCherry* mit zusätzlicher AvrII Schnittstelle

Um die für das bicistronisch exprimierte Protein GFP verantwortliche Sequenz SL2::GFP in das Plasmid pNP165 einzufügen, wurde als erstes eine zusätzliche Schnittstelle für das Enzym AvrII an die Stelle 10827 in das Plasmid eingeführt. Dazu wurde eine 'Site-Directed'-Mutagenese durchgeführt. Für die hierfür notwendige 3-fache PCR wurden folgende Primerpaare verwendet: oCoS13/oCoS14, oCoS15/oCoS16 und oCoS13/oCoS16. Für die Klonierung wurden die Enzyme SgrAI und SpeI verwendet.

pCoS5: *psra-6::LoxP::STOP::LoxP::ChR2-HR::mCherry* mit zusätzlicher AvrII Schnittstelle

Analog zu pCoS 4 wurde, um die für das bicistronisch exprimierte Protein GFP verantwortliche Sequenz SL2::GFP in das Plasmid pNP165 einzufügen, als erstes eine

zusätzliche Schnittstelle für das Enzym AvrII an die Stelle 9507 in das Plasmid eingeführt. Dazu wurde eine 'Site-Directed'-Mutagenese durchgeführt. Für die hierfür notwendige 3-fache PCR wurden folgende Primerpaare verwendet: oCoS13/oCoS14, oCoS15/oCos16 und oCoS13/oCoS16. Für die Klonierung wurden die Enzyme SgrAI und SpeI verwendet.

pCoS6: *pglr-1::LoxP::STOP::LoxP::ChR2-HR::mCherry::SL2::GFP*

Das als Vector eingesetzte Plasmid pCoS4 wurde an der neu eingefügten Schnittstelle AvrII geschnitten. Das Insert SL2::GFP wurde mittels PCR aus dem Plasmid pEntry(polycis)GFP amplifiziert (Primerpaar: oCoS17/18). Das Insert wurde mit SpeI geschnitten und beide Stücke wurden mittels Ligation aneinander gefügt. In diesem Fall ist eine gerichtete Klonierung nicht möglich, da das Schneiden des Vektors mit nur einem Enzym ein Einfügen des Inserts in beiden möglichen Orientierungen begünstigt. Es musste also im Anschluss an die Transformation nach E. Coli-Kolonien selektiert werden, die das Plasmid mit dem korrekt orientierten Insert enthielten.

pCoS7: *psra-6::LoxP::STOP::LoxP::ChR2-HR::mCherry::SL2::GFP*

Das als Vector eingesetzte Plasmid pCoS5 wurde an der neu eingefügten Schnittstelle AvrII geschnitten. Das Insert SL2::GFP wurde mittels PCR aus dem Plasmid pEntry(polycis)GFP amplifiziert (Primerpaar: oCoS17/18). Das Insert wurde mit SpeI geschnitten und beide Stücke wurden mittels Ligation aneinander gefügt. In diesem Fall ist eine gerichtete Klonierung nicht möglich, da das Schneiden des Vektors mit nur einem Enzym ein Einfügen des Inserts in beiden möglichen Orientierungen begünstigt. Es musste also im Anschluss an die Transformation nach E. Coli-Kolonien selektiert werden, die das Plasmid mit dem korrekt orientierten Insert enthielten.

pCoS9: *pglr-1::TeTX::mcherry*

Das als Vektor dienende Plasmid pSH118 wurde mit den Enzymen NotI und XmaI geschnitten, um die pF49H12.4-Sequenz zu entfernen. Als Insert diente der *glr-1* Promotor, der ebenfalls mit NotI und XmaI aus dem Plasmid pNP165 geschnitten werden konnte. Die beiden Teilstücke wurden zu einem neuen Plasmid ligiert.

pCoS10: *pflp-18::LoxP::STOP::LoxP::ChR2-HR::mCherry::SL2::GFP*

Um den *glr-1* Promoter gegen den *flp-18* Promotor auszutauschen, wurde das Vektorplasmid pCoS6 SphI und BamHI geschnitten. Der als Insert dienende flp-18

Promotor wurde mittels PCR aus dem Plasmid pCS40 amplifiziert (Primerpaar: oCoS24/oCoS25). Auch das Insert wurde im Anschluss an die PCR mit SphI und BamHI geschnitten und die beiden Teilstücke wurden zu einem neuen Plasmid ligiert.

pCoS11: *prig-3::nCre*

Um den *gpa-14* Promotor gegen den *rig-3* Promotor zu tauschen, wurde das Vektorplasmid pNP259 mit SphI und XmaI geschnitten. Der als Insert dienende *rig-3* Promotor wurde mittels PCR aus dem Plasmid pCS41 amplifiziert (Primerpaar: oCoS26/oCoS27). Auch das Insert wurde im Anschluss an die PCR mit SphI und XmaI geschnitten und die beiden Teilstücke wurden zu einem neuen Plasmid ligiert.

pCoS13: *posm-10::LoxP::STOP::LoxP::ChR2-HR::mCherry::SL2::GFP*

Um den *glr-1* Promotor gegen den *osm-10* Promotor zu tauschen, wurde Vektorplasmid pCoS6 mit SphI und BamHI geschnitten. Der als Insert dienende *osm-10* Promotor wurde mittels PCR aus dem Plasmid pKS52 amplifiziert (Primerpaar: oCoS/oCoS). Auch das Insert wurde im Anschluss an die PCR mit SphI und BamHI geschnitten und die beiden Teilstücke wurden zu einem neuen Plasmid ligiert.

pCoS14: *pgpa-11::nCre*

Das als Vektor dienende Plasmid pNP259 wurde mit den Enzymen PstI und XmaI geschnitten, um den *gpa-14* Promotor zu entfernen. Als Insert diente der *gpa-11* Promotor, der ebenfalls mit PstI und XmaI aus dem Plasmid pGJ238 geschnitten werden konnte. Die beiden Teilstücke wurden zu einem neuen Plasmid ligiert.

pCoS24: *pcfi-1::nCre*

Um den *glr-1* Promoter gegen den *cfi-1* Promoter auszutauschen, wurde das Vektorplasmid pNP259 mit FseI und XmaI geschnitten. Der als Insert dienende *cfi-1* Promotor wurde mittels Nested-PCR aus genomischer DNA amplifiziert (Primerpaare: oCoS88/oCoS89 und oCoS91/oCoS87). Das Produkt der 2. PCR-Runde wurde ebenfalls mit FseI und XmaI geschnitten und die beiden Teilstücke wurden anschließend zu einem neuen Plasmid ligiert.

pCoS25: *paex-2::LoxP::STOP::LoxP::ChR2-HR::mCherry::SL2::GFP*

Hier sollte der *flp-18* Promoter in Plasmid pCoS10 (Vektor) gegen den *aex-2* Promotor

ausgetauscht werden. Da es sich bei dem *aex-2* Promotor um ein sehr großes Insert handelt (10026bp!) musste die Klonierung in zwei Teilschritten durchgeführt werden. Für den ersten Teilschritt wurde das Vektor-Plasmid pCoS10 mit FseI und XmaI geschnitten. Die, hier als Insert dienende, erste Hälfte des *aex-2* Promotors wurde mittels PCR aus dem Plasmid pNM1736 amplifiziert (Primerpaar: oCoS94/oCoS121). Das Insert wurde mit Hilfe des Kits 'In-Fusion HD EcoDry' von Clontech in den Vektor eingefügt. Hierbei wurde nach den Angaben des Herstellers verfahren (Zwischenplasmid: pCoS35). Für den zweiten Teilschritt wurde das Zwischenplasmid pCoS35, das nun als Vektor diente mit XmaI geschnitten. Die, als Insert dienende, 2. Hälfte des *aex-2* Promotors wurde mittels PCR ebenfalls aus dem Plasmid pNM1736 amplifiziert (Primerpaar: oCoS122/oCoS95). Das Insert wurde mit Hilfe des Kits 'In-Fusion HD EcoDry' von Clontech in den Vektor eingefügt. Hierbei wurde nach den Angaben des Herstellers verfahren.

pCoS29: *pmec-4::Chr2-HR/TC::mCherry*

Um die einfach mutierte Chr2H134R Variante gegen die zweifachmutierte Chr2H134R T159C auszutauschen wurde das Vektorplasmid *pmec-4::Chr2::mCherry* mit BamHI und EcoRI geschnitten. Das als Insert dienende Fusionsprotein Chr2H134RT159C wurde ebenfalls mit BamHI und EcoRI geschnitten und die beiden Teilstücke wurden anschließend zu einem neuen Plasmid ligiert.

pCoS30: *pflp-18::LoxP::STOP::LoxP::TeTX::mcherry*

Um das Plasmid pCoS30 zu erhalten wurde das Vektorplasmid pSH118 mit NheI und NotI geschnitten. Als Insert diente hier die komplette *pflp-18::LoxP::STOP::LoxP* DNA-Sequenz, welche mittels PCR aus pCoS10 amplifiziert wurde (Primerpaar: oCoS106/oCoS107). Das Insert wurde mit Hilfe des Kits 'In-Fusion HD EcoDry' von Clontech in den Vektor eingefügt. Hierbei wurde nach den Angaben des Herstellers verfahren.

pCoS32: *pflp-18::unc-7RNAiantisense*

Hier wurde die gesamte *LoxP::STOP::LoxP::Chr2mCherry::SL2::GFP* Kasette gegen die für *unc-7* 'RNAi antisense' kodierende Sequenz ausgetauscht. Das Vektorplasmid pCoS10 wurde mit SpeI und XmaI geschnitten. Die als Insert dienende Sequenz für *unc-7* 'RNAi antisense' wurde mittels PCR aus dem Plasmid pCS189 amplifiziert (Primerpaar: oCoS143/oCoS144). Das Insert wurde mit Hilfe des Kits 'In-Fusion HD

EcoDry' von Clontech in den Vektor eingefügt. Hierbei wurde nach den Angaben des Herstellers verfahren.

pCoS33: pgpa-14::unc-7RNAisense

Hier wurde nCre gegen die für *unc-7* 'RNAi sense' kodierende Sequenz ausgetauscht. Das Vektorplasmid pNP259 wurde mit SpeI und XmaI geschnitten. Die als Insert dienende Sequenz für *unc-7* 'RNAi sense' wurde mittels PCR aus dem Plasmid pCS186 amplifiziert (Primerpaar: oCoS145/oCOS146). Das Insert wurde mit Hilfe des Kits 'In-Fusion HD EcoDry' von Clontech in den Vektor eingefügt. Hierbei wurde nach den Angaben des Herstellers verfahren.

2.2. Kultivierung von *C. elegans*

Caenorhabditis elegans war der in dieser Arbeit verwendete Modellorganismus. *C. elegans* wurde auf NGM-Agar Platten kultiviert, welche 24 bis 72 Stunden zuvor mit 500 μ l OP50 Bakteriensuspension beimpft wurden (Referenz/Wormbook). Um zu verhindern, dass ein Stamm verhungert, wurden regelmäßig drei Tiere von einer vollen Platte auf eine frische, mit OP50 beimpfte, NGM-Agar Platte überführt. Zur Aufbewahrung wurden alle Stämme bei 15°C kultiviert, da sich das Wachstum bei dieser Temperatur deutlich verlangsamt und somit eine Überführung auf frische Platten seltener notwendig als bei auf Raumtemperatur (RT) kultivierten Tieren. Auf Raumtemperatur wurden immer nur diejenigen Stämme gehalten, die zur Zeit oft benötigt wurden, oder wenn die aktuelle Behandlung es notwendig machte. Tiere, die für Verhaltensexperimente eingesetzt werden sollten, wurden zuvor mindestens eine gesamte Generation auf 20°C gehalten. Bei dieser Temperatur wachsen die Tiere sehr gut und befinden sich in einem optimalen Gesundheitszustand. Die Tiere wurden immer in geschlossenen, luftdurchlässigen Boxen im Dunkeln aufbewahrt und jede Platte einzeln mit Parafilm umschlossen um Kontaminationen nach Möglichkeit zu vermeiden.

Dekontamination:

Wenn eine Platte mit fremden Bakterien oder Pilzen befallen war, mussten die sich darauf befindenden Würmer dekontaminiert werden. Hierfür wurden 10 μ l Bleich-Lösung auf einer frischen, beimpften Platte platziert, möglichst an einer Stelle ohne Bakterienrasen. In diesen Tropfen wurden nun 10 bis 20 adulte Tiere, welche viele

sichtbare Eier trugen, von der kontaminierten Platte überführt. Die adulten Tiere, so wie die unerwünschten Kontaminationen, sterben in der Bleich-Lösung ab und lösen sich auf. Die Eier sind jedoch durch ihre Außenhülle geschützt, so dass sich im Anschluss daraus neue, unkontaminierte Tiere entwickeln können. Da nicht eindeutig geklärt ist welchen Einfluss diese Behandlung auf den Organismus der daraus entstehenden Würmer hat, wurde für einen Verhaltensversuch frühestens die nachfolgende Generation verwendet.

2.3. Erzeugung transgener Tiere

Zur Erzeugung transgener Tiere wurde die DNA des gewünschten Konstruktes in die distalen Gonaden der Würmer injiziert Mello u. a. (1991), wo sich ein extrachromosomales Array bildete, welches bei der Bildung neuer Eier in diese aufgenommen wurde. Zur Bildung eines stabilen extrachromosomalen Arrays ist mindestens eine DNA-Konzentration von 100 ng/ μ l notwendig. Sollte diese alleine mit den gewünschten Konstrukten nicht erreicht werden, wurde zusätzliche DNA in Form 'leerer' Plasmide oder 'DNA-Ladder' verwendet um die Mindestmenge zu erreichen. Da nur ein Bruchteil der neu gebildeten Eier ein extrachromosomales Array umschließt, war die Injektion von 15 bis 50 Tieren sowie ein umfangreiches Screening notwendig. Um das Screening zu erleichtern wurde in den meisten Fällen zusätzlich zu dem gewünschten Transgen ein sogenannter Co-Injektionsmarker injiziert. Solch ein Marker beinhaltet die codierende Sequenz für ein gut sichtbares Merkmal, wie eine Mutation (z.B. *rol-6*; *lin-15*) oder ein Fluoreszenzprotein, welches in einem großen Gewebe exprimiert wird (z.B. *pelt-2::mCherry*; *pmyo-2::CFP*). Extrachromosomale Arrays werden nicht an alle Nachkommen weitergeben, so dass auch bei der Kultivierung späterer Generationen immer ein Screening notwendig ist. Zusätzlich kann eine Mosaikbildung auftreten.

2.4. Integration eines extrachromosomalen Arrays

Auch wenn eine transgene Linie erzeugt werden konnte, werden Extrachromosomale Arrays nicht stabil weitergegeben, was je nach Versuchsaufbau hinderlich sein kann. Des weiteren kommt es vor, dass die Tiere aufgrund der oben beschriebenen Mosaikbildung nicht konsistent reagieren. Deshalb wurde das extrachromosomale Array bei wichtigen Linien in die chromosomale DNA integriert. Hierfür wurde die mutagene Chemikalie Trioxsalen, sowie UV-Licht verwendet, um Doppelstrang-Brüche in

die chromosomale DNA einzuführen (Ezcurra u. a. (2011)). Bei der anschließenden Reparatur der DNA durch das Organismus eigene Reparatursystem besteht eine geringe Chance, dass die extrachromosomale DNA mit eingebaut wird. Da durch die stark DNA-schädigende Behandlung oft jedoch auch unerwünschte Mutationen zurück bleiben ist es notwendig eine neu integrierte Linie mit mehrfach gesunden Tieren (Wildtyp oder benötigter genetischer Hintergrund) zurück zu kreuzen, bevor Verhaltensexperimente durchgeführt werden.

2.5. Kreuzung

Um transgene Mutanten, Doppelmutante oder doppelt transgene Linien herzustellen wurden die Tiere gekreuzt. Die hierfür benötigten Männchen können entweder durch einen Hitzeschock (= Inkubation bei 30°C für 6-7 h) oder durch Kreuzung mit bereits vorhandenen Männchen erzeugt werden. Im zweiten Fall ist zu beachten, dass bei einer Kreuzung mit Wildtypmännchen heterozygote Tiere entstehen.

2.6. Genotypisierung

Im Anschluss an eine Kreuzung war es notwendig sicher zu stellen, dass die erzeugten Tiere auch alle gewünschten Merkmale aufzeigen. Bei Transgenen mit Co-Injektionsmarker ist dies relativ einfach unter einem Binokular zu erkennen, es gibt jedoch viele Mutationen, die keinen leicht erkennbaren Phänotypen aufweisen. In diesem Fall ist es notwendig den Genotyp mittels molekularer Methoden zu ermitteln. Hierfür wurden die Tiere in 2,5 μ l SEW-LB-Puffer mit Proteinkinase K (0,2 μ g/ μ l) zuerst für 10 min auf -80°C, anschließend 60 min auf 60°C und 15 min auf 95°C inkubiert. Im Anschluss an diese Behandlung wurde, mit der so erhaltenen genomischen DNA als Matrize, eine PCR gefahren. Die hierbei verwendeten Primer umschließen das mutierte Gen, welches im Idealfall eine Deletion oder eine zusätzliche Enzymschnittstelle enthält, die die Mutation eindeutig vom Wildtyp unterscheidet. Getestet wurden je Kreuzung 10 bis 20 F2 Tiere. Hierfür wurden die F2 Tiere in entsprechender Anzahl vereinzelt und dann ca. 30 Tiere der nachkommenden F3 Generation gemeinsam in einem Probengefäß, wie oben beschrieben, behandelt. Als negativ-Kontrolle diente in jedem Fall der Wildtyp. Da es sich hierbei um eine PCR mit einer komplexen Matrize handelt, kann es im Falle mancher Gene ratsam sein eine Nested PCR durchzuführen. Wenn die Unterscheidung über eine zusätzliche oder fehlende Schnittstelle möglich ist, war im Anschluss an die PCR ein Restriktionsverdau mit

dem entsprechenden Enzym notwendig. Im Verlauf dieser Arbeit wurden folgende Genotypisierungen durchgeführt:

Gen	Primer-Paar	Folgebehandlung
<i>lin-15</i> (ce314) (Nested)	oCoS140/oCoS141 oCoS136/oCoS137	Acii Verdau
<i>unc-7</i> (e5)	oCoS72/oCoS73	

2.7. Fluoreszenzmikroskopie

Die Fluoreszenzmikroskopie wurde im Rahmen dieser Arbeit verwendet, um die exprimierten Fusionsproteine (ChR2::mCherry, ChR2::YFP, NpHR::CFP, TeTX::mCherry) zu lokalisieren und um die teilweise angestrebte zellspezifische Expression zu verifizieren. Zur Präparation wurden die Tiere auf einem 2 %igem Agarose-Gel immobilisiert. Hierfür wurden 150 μ l in M9-Puffer aufgekochte Agarose auf einen Objektträger gegeben und mit Hilfe eines weiteren Objektträgers in Form gebracht und abgekühlt. Die zu beobachtenden Tiere wurden zur vollständigen Immobilisation nun in 10 μ l M9 + Natriumazid [50mM] auf das Gel aufgebracht und mit einem Deckgläschen versehen. Die Tiere sterben in dem Natriumazid binnen 30 Minuten ab, sodass die Beobachtung in diesem Zeitfenster durchgeführt werden muss. Zur Fluoreszenzmikroskopie kamen folgende Mikroskope zum Einsatz: 'Axiovert 300' (Zeiss), 'Observer Z.1' (Zeiss), Konfokales Laser-Rastermikroskop mit 'Observer'-Stativ (Zeiss), Konfokales Laser-Rastermikroskop (Nikon). Die Bearbeitung erfolgte mit den Programmen 'Fiji', 'ImageJ' und 'Micromanager'.

2.8. Optogenetische Verhaltensexperimente

Soweit nicht anders beschrieben, wurden für die Verhaltensexperimente Tiere verwendet, die über mindestens eine Generation im Dunkeln bei 20°C kultiviert wurden. Die verwendete Retinalkonzentration in der OP50 Lösung betrug 100 μ M. Um immer möglichst gleich alte Tiere zu erhalten, wurden am Vortag des Experimentes Larven im L4 Stadium selektiert und nach 12-16h verwendet. Für die Messungen

wurde jeweils ein einzelnes Tier auf eine NGM-Kulturschale gebracht, gemessen und anschließend entsorgt.

2.8.1. Manuelle Messung

Um sich einen ersten Überblick über die Reaktionen und das Habitationsverhalten der einzelnen Stämme zu verschaffen, wurde in dieser Arbeit ein manueller Test am Mikroskop durchgeführt. Hierbei wurde ein Auflicht-Fluoreszenzmikroskop verwendet, welches mit einem GFP Filter bestückt ist, um blaues Licht (470 nm) präsentieren zu können. Mit Hilfe eines zwischengeschalteten, Computer gesteuerten 'Shutters' konnte eine definierte Beleuchtungszeit mit ebenfalls festgelegten ISI's erreicht werden. Ein einzelner Wurm wurde auf einer unbeimpften 5 cm NGM-Kulturschale positioniert und nach einer Ruhephase (zum Stressabbau) von 2 bis 3 Minuten unter das Mikroskop gelegt und beleuchtet. Die Reaktion auf das blaue Licht (Rückwärtsbewegung oder keine Rückwärtsbewegung) wurde von Hand von dem Experimentator protokolliert.

Für Reaktionstests wurden 5 Lichtpulse ($0,8 \text{ mW/mm}^2$) mit einem ISI von 10 s gegeben. Angegeben wird der Prozentsatz aller reagierenden Tiere mit anschließender Berechnung der mittleren Reaktion der 5 Lichtpulse. Die statistische Analyse erfolgt über einen T-Test mit Bonferoni-Anpassung (Anova).

Bei den Habitationsanalysen werden ebenfalls Lichtpulse von 1 s gegeben ($0,8 \text{ mW/mm}^2$, ISI=10 s). Die Anzahl der präsentierten Stimuli variiert je nach Experiment zwischen 20 und 60 Pulsen. Hier wird der Prozentsatz der reagierenden, gemessenen Tiere einer Linie pro individuellem Lichtpuls angegeben. So lässt sich eine Habituation deutlich feststellen. Die statistische Analyse erfolgte mittels Chi^2 -Test.

2.8.2. Messungen mit dem 'Single-Worm-Tracker' (SWT)

Der SWT ist ein computergestütztes System zum Aufnehmen, Verfolgen und Beleuchten von *C. elegans*. Hierbei werden Positionsdaten gesammelt aus denen Parameter wie Geschwindigkeit, Bewegungsrichtung und Biegungswinkel errechnet werden können (Stirman u. a. (2011)). Das auf dem Programm 'Lab-View' basierte Computerprogramm ist gekoppelt mit der Kamera und dem motorisierten Objektisch eines Mikroskops (Vergrößerung: 4X), was Verfolgung und Messung der Bewegung ermöglicht. Des Weiteren steuert das Programm einen modifizierten Beamer, welcher eine verschiedenfarbige und segmentierte Beleuchtung mit hoher Intensität möglich

macht. Es wurde jeweils ein einzelnes Tier auf einer mit einer, dünnen gleichmäßigen OP50-Schicht beimpften, 5 cm NGM-Kulturschale verwendet.

Die Beleuchtungsparameter der einzelnen Experimente sind im Ergebnisteil beschrieben.

2.8.3. Messungen mit dem 'Multi-Worm-Tracker' (MWT)

Der MWT gibt die Möglichkeit bis zu 60 Tiere gleichzeitig mit verschiedenen Reizen, wie Licht oder Vibration, zu stimulieren und ihre Positionsdaten zu messen (Swierczek u. a. (2011)). Genau wie beim SWT auch, können hier Geschwindigkeit, Bewegungsrichtung und Biegungswinkel berechnet werden. Es ist jedoch keine segmentierte Beleuchtung möglich, sondern der gegebene Reiz betrifft immer die gesamte Kulturschale. Da hier eine große Anzahl von Tieren für eine Messung benötigt wird, wurden diese nicht wie in den Experimenten mit einzelnen Tieren Stück für Stück gepickt sondern direkt auf einer Kulturschale hinsichtlich ihres Alters synchronisiert. Hierfür wurden 5 bis 10 Tiere einer Linie (Abhängig von der Anzahl der gelegten Eier) für 4 h auf eine mit Bakterien und Retinal beimpfte Kulturschale transferiert und anschließend wieder entfernt. Die Eier wurden für vier Tage bei 20°C kultiviert und die daraus entstehenden jungen adulten Würmer direkt auf der Kulturschale gemessen.

Die verschiedenen verwendeten Parameter sind bei den einzelnen Experimenten im Ergebnisteil beschrieben.

Teil III.

Ergebnisse

1. Zellspezifische Expression von ChR2

Zur Untersuchung des Rückzugreflexes und der darin involvierten Neurone war es zuerst notwendig das optogenetische Werkzeug ChR2 in spezifischen Zellen, die in dieses Netzwerk involviert sind, zu exprimieren. Dies erfolgte im Rahmen dieser Arbeit mit Hilfe des Cre-lox-Systems (I.3.3), welches es ermöglicht zur ChR2-Expression eine Kombination aus zwei verschiedenen Promotoren zu verwenden, die nach Möglichkeit nur in der gewünschten Zelle gleichzeitig aktiv sind. Zusätzlich zu dem mit ChR2 fusionierten mCherry wurde ein bicistronisch exprimiertes und somit in der Zelle löslich vorliegendes GFP als Marker verwendet, da lösliche Proteine stärker exprimiert werden als diejenigen, welche an die Membran gebunden vorliegen. Dies macht das System empfindlicher und die angesteuerten Zellen sind besser zu erkennen, was es sehr erleichtert die Linien zu charakterisieren. Zwei Neuronen, die für die Untersuchung des Rückzugsreflexes relevant sind und in denen ChR2 spezifisch exprimiert werden sollte, waren das multisensorische Neuronenpaar ASH, sowie das Interneuronenpaar AVA.

Außerdem stand eine Linie zur Verfügung, welche die ChR2 Variante ChR2-HR unter dem *mec-4* Promotor exprimiert. Der Promoter ist aktiv in denjenigen Mechanorezeptorneuronen (MRNs), die für die Reaktion auf leichte, ungefährliche Berührungen verantwortlich sind (Stamm Nr.: AQ2334). Da diese Linie sehr zuverlässig reagierte und unter entsprechenden Bedingungen eine deutliche Habituation zeigte wurde sie in den folgenden Experimenten als Positivkontrolle verwendet, sofern nichts anderes angegeben ist. Alle lichtabhängigen Verhaltensexperimente dieser Arbeit wurden mit lichtunempfindlichen Tieren (*lite-1(-)* Hintergrund) durchgeführt. Das Gen *lite-1* ist verantwortlich für negative Phototaxis von *C. elegans* gegenüber UV und blauem Licht. In den folgenden Experimenten dienten *lite-1(-)* Tiere ohne ChR2 als Negativkontrolle, sofern nicht anders angegeben.

1.1. Spezifische Expression von Chr2-HR in ASH

Zur zellspezifischen Expression von Chr2-HR in ASH wurden zwei verschiedene Kombinationen von Promotorpaaren getestet (Abb.: 15). Insgesamt wurden hierbei die Promotoren dreier Gene verwendet. Der *osm-10* Promotor führt zu einer Expression in den Zellen ASH, ASI, PHA und PHB (Hart u. a. (1999)). Bei OSM-10 handelt es sich um ein Protein, welches über einen bisher noch nicht aufgeklärten Mechanismus, dafür verantwortlich ist osmotische Veränderungen wahrzunehmen und eine Vermeidung von Bereichen hoher Osmolarität und hoher Chininkonzentration hervorruft (Hart u. a. (1999); Faber u. a. (1999); Esposito u. a. (2007)). NHR-79 ist ein nuklearer Hormonrezeptor welcher vermutlich in den Metabolismus involviert ist. Exprimiert wird dieses Protein in den Zellen ADL und ASH (Miyabayashi u. a. (1999)). Als drittes wurde der *gpa-11* Promotor verwendet. Die Expression ist ebenfalls in den Zellen ADL und ASH zu finden und bei GPA-11 handelt es sich um ein Mitglied der G-Protein- α -Untereinheiten-Familie (Jansen u. a. (1999)).

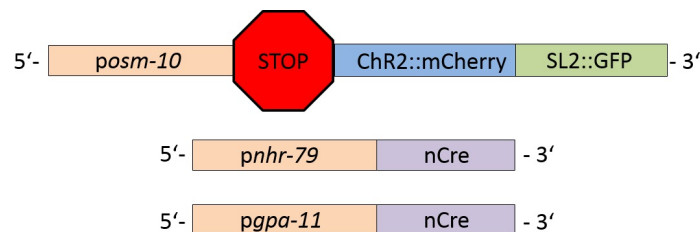


Abbildung 15: Schematische Darstellung der zur ASH spezifischen Chr2-HR Expression getesteten genetischen Konstrukte.

In Abbildung 16 A) und B) ist das Fluoreszenz-Muster der, mit diesen beiden Promotorkombinationen erstellten, Linien zu sehen. Leider konnte in keinem der beiden Fälle eine zellspezifische Expression erreicht werden. Marina Ezcurra, Mitarbeiterin in der Arbeitsgruppe von William Schafer (Cambridge, England) veröffentlichte im Jahr 2011 eine Arbeit in der ein, dort mittels FLP-Rekombinase hergestellter, Stamm mit einer echten ASH spezifischen Expression verwendet wurde. Dieser Stamm wurde uns freundlicherweise von William Schafer überlassen und im Rahmen dieser Arbeit anhand des Fluoreszenz-Musters charakterisiert (Abb.: 16 C)). Alle drei Linien wurden außerdem hinsichtlich ihrer Reaktion auf blaues Licht untersucht. Sowohl Linie A (34,7 %) als auch Linie C (95,7 %) sind statistisch signifikant unterschiedlich von der negativ Kontrolle (8,6 %). Die Linie C von Ezcurra zeigt mit Abstand die

stärkste Reaktion auf blaues Licht und ist nicht signifikant unterschiedlich zu der Reaktion der Positivkontrolle, welche ChR2 in den MRNs exprimiert (90 %). Hier wurden die Promotoren *sra-6* und *gpa-13* verwendet. Der *sra-6* Promotor führt zu einer Expression in den Zellen ASI, ASH, SPDm/SPVm und PVQ. Bei SRA-6 handelt es sich um einen chemosensorischen Rezeptor (Troemel u. a. (1997)). Das Gen *gpa-13* kodiert für einen Teil der α -Untereinheit eines G-Proteins und wird in den Zellen ADE, ASH, AWC, PHA, und PHB exprimiert (Jansen u. a. (1999)).

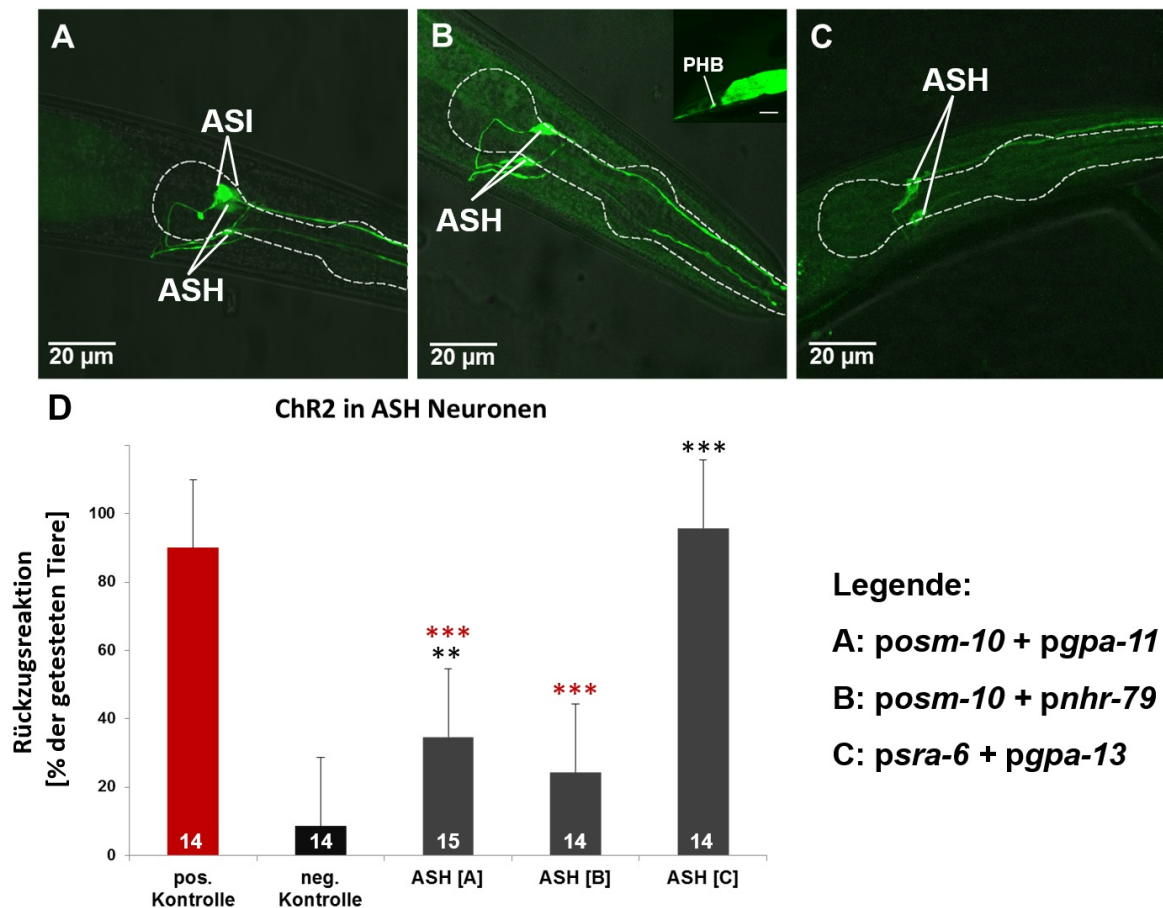


Abbildung 16: Verschiedene getestete Promotor-Kombinationen zur zellspezifischen Expression von ChR2-HR in ASH. Verwendet wurde das genetische Konstrukt: -ChR2-HRmCherry::SL2::GFP. Gezeigt ist hier der GFP Kanal. Die Umrisszeichnung des Pharynx dient der Orientierung. A-C) Konfokalmikroskopische Fluoreszenzaufnahmen von Linien mit verschiedenen Promotorkombinationen (60X). A) *posm-10/pgpa-11* (Stamm Nr.: ZX1021; B) *posm-10/pnhr-79* (Stamm Nr.: ZX1085); C) *psra-6/pgpa-13* (Stamm Nr.: AQ2235).

D) Prozentsatz der Tiere, welche auf Beleuchtung mit blauem Licht (470nm, 1 Sek., 0,8mw/mm²) mittels einer Rückzugsbewegung reagieren. Getestet wurden die Linien A-C, sowie eine Linie welche ChR2 in den MRNs exprimiert (AQ2334) (pos. Kontrolle) und der Wildtyp (ZX399) (neg. Kontrolle). Alle getesteten Linien tragen den *lite-1*-Hintergrund. Statistik: ANOVA mit Tukey-Test. Verwendetes Programm: Past3

1.2. Spezifische Expression von Chr2-HR in AVA

Zur zellspezifischen Expression von Chr2-HR in AVA wurden im Rahmen dieser Arbeit insgesamt drei Promotorpaare getestet und vier verschiedene Promotoren verwendet (Abb.: 17). Das Gen *glr-1* kodiert für einen Glutamat-Rezeptor und wird mittels seines Promotors in den Zellen AIB, AVA, AVB, AVD, AVE, AVG, AVJ, DVC, PVC, PVQ, RIG, RIM, RMD, SMD, PVQ und URY exprimiert (Brockie u. a. (2001)). Bei FLP-18 handelt es sich hingegen um ein Neuropeptid, welches in den Zellen AVA, AIY und RIG exprimiert wird (Rogers u. a. (2003)). Analog zu den oben beschriebenen Proteinen GPA-11 und GPA-13 handelt es sich auch bei GPA-14 um ein Mitglied der G-Protein- α -Untereinheiten-Familie. Exprimiert wird GPA-14 in den Neuronen ASI, ASJ, ASH, ASK, ADE, PHA, PHB, ALA, AVA, CAN, DVA, PVQ, RIA sowie den Vulva-Muskel-Zellen (Jansen u. a. (1999)). Der letzte verwendete Promotor gehört zu dem Gen *rig-3*, welches für ein Protein kodiert, das zu der Immunoglobulin-Superfamilie der Zell-Adhäsions-Moleküle (IgCAMs) gehört und gewebespezifisch in den Neuronen AVA, I1, I4, M4, NSM sowie den amphidalen Glia-Zellen exprimiert wird.

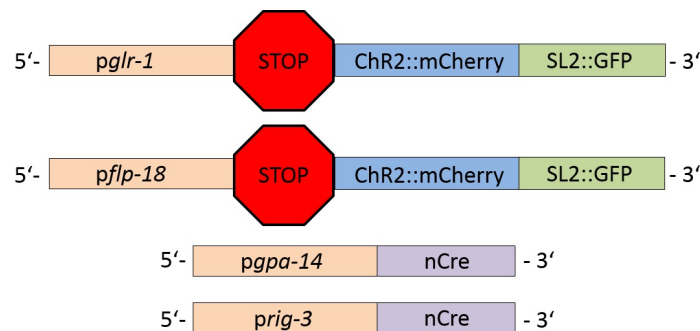


Abbildung 17: Schematische Darstellung der zur AVA spezifischen Chr2-HR Expression getesteten genetischen Konstrukte.

Mit den Kombinationen *pglr-1/pgpa-14* und *pflp-18/prig-3* konnte keine AVA spezifische Expression erreicht werden (Abb.: 18 A und B). Wie jedoch in Abb.: 18 C) gezeigt war die Kombination *pflp-18/pgpa-14* erfolgreich. Analog zu der Charakterisierung der ASH spezifischen Chr2-HR Linien wurde die Reaktion getestet (II.2.8.1). Die Linien A (53,3 %) und C (71,4 %) sind signifikant unterschiedlich zu der Negativkontrolle. Die deutlichste Reaktion zeigt Linie C mit einem Expressionsmuster, welches dem gewünschten am nächsten kommt. Die Reaktion der Linie C ist außerdem nicht signifikant unterschiedlich zu der Reaktion der Positivkontrolle (90 %).

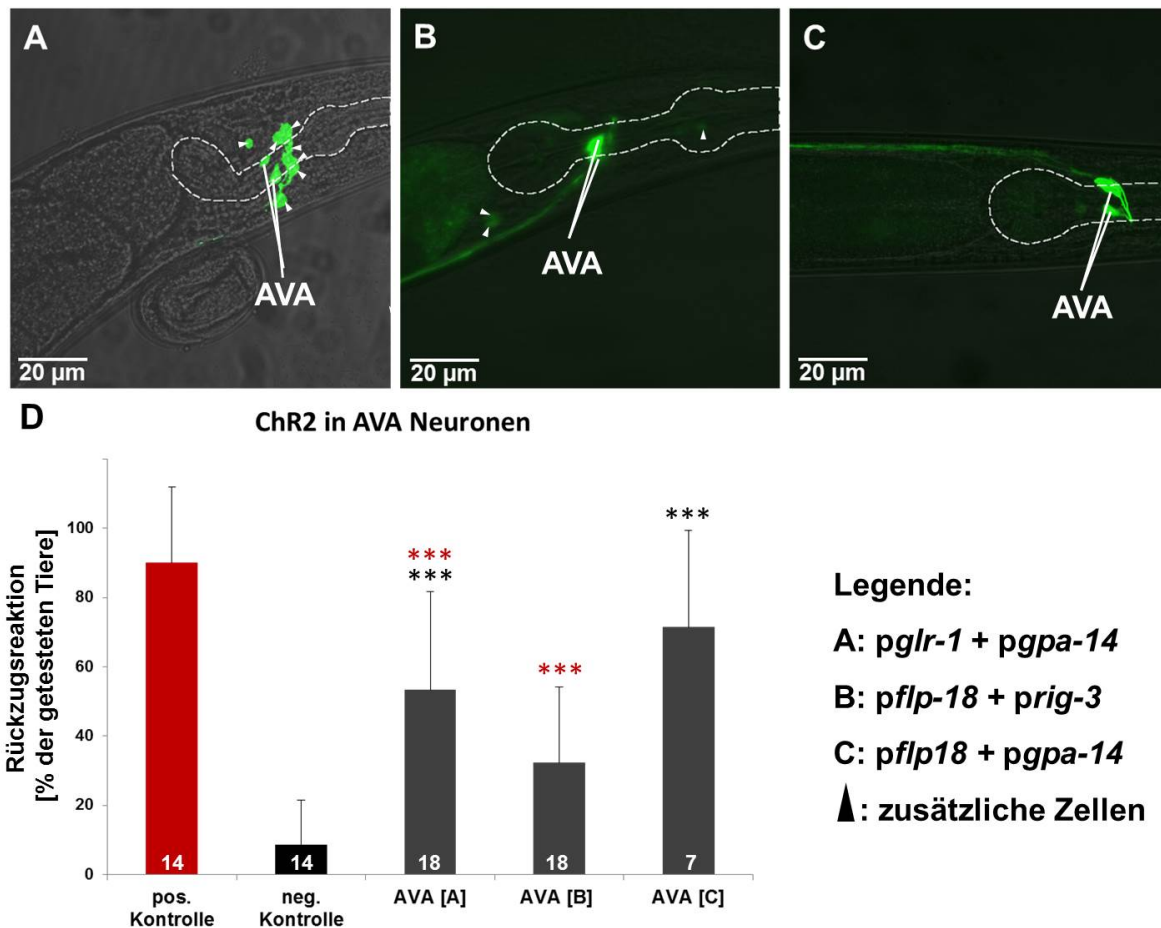


Abbildung 18: Verschiedene getestete Promotor-Kombinationen zur zellspezifischen Expression von ChR2-HR in AVA. Verwendet wurde das genetische Konstrukt: -ChR2-HRmCherry::SL2::GFP. Gezeigt ist hier der GFP Kanal. Die Umrisszeichnung des Pharynx dient der Orientierung. A-C) Konfokalmikroskopische Fluoreszenzaufnahmen von Linien mit verschiedenen Promotorkombinationen (60X). A) *p_{glr-1}/p_{gpa-14}* (ZX1019); B) *p_{flp-18}/p_{rig-3}* (ZX1084); C) *p_{flp-18}/p_{gpa-14}* (ZX1020). D) Prozentsatz der Tiere welche auf Beleuchtung mit blauem Licht (470 nm, 1 s, 0,8 mw/mm²) mittels einer Rückzugsbewegung reagieren. Getestet wurden die Linien A-C, sowie eine Linie welche ChR2 in den MRNs exprimiert (AQ2334) (pos. Kontrolle) und der Wildtyp (ZX399) (neg. Kontrolle). Alle getesteten Linien tragen den *lite-1*-Hintergrund. Statistik: ANOVA mit Tukey-Test; Verwendetes Programm: Past3

Um für zukünftige Experimente ein möglichst stabiles Verhaltensmuster der Tiere zu erhalten, wurde das hier auf einem extrachromosomalen Array vorliegende Transgen in das Genom integriert. Im Anschluss an die Integration wurde auch diese

Linie, analog zu den beschriebenen transgenen Linien, charakterisiert (Abb.: 19). Hierfür wurden konfokale Fluoreszenzaufnahmen eines vollständigen Tieres, sowie Kopf-Aufnahmen mehrerer Tiere gemacht. Für die Verhaltensanalyse wurde ein Reaktionstest durchgeführt. Mit 72,5 % der Tiere reagiert die integrierte Linie sogar noch etwas besser als die nicht integrierte Linie C (Abb.: 18). Leider entwickelte sich nach der Integration eine zusätzliche Expression in dem Zellpaar RIG (Abb.: 19 A + B) (White u. a. (1986)). Bei RIG handelt es sich um ein Interneuronenpaar, welches im retrovesikulären Ganglion lokalisiert ist und ebenfalls einen Einfluss auf die Rückwärtsbewegung ausübt (Chao u. a. (2005)). Doch ist die GFP-Expression in RIG geringer als in AVA und eine mCherry-Expression nicht zu sehen (Abb.: 19 B). So besteht die Möglichkeit, dass das Expressionsniveau von ChR2-HR in RIG so gering ist, dass es keinen Einfluss auf die Rückwärtsbewegung nimmt und diese Linie für weitere Experimente verwendet werden kann.

Um dies mit Sicherheit sagen zu können, wurde ein weiterer Reaktionstest durchgeführt. Hierbei wurde das, in Kooperation mit Jeff Stirman entwickelte, 'Single Worm Tracking' System verwendet (II.2.8.2). Dieses System folgt dem einzelnen Wurm mittels eines automatisierten Objektisches über den gesamten Messzeitraum hinweg und zeichnet ein Video auf. Des Weiteren bietet es durch einen verbundenen Beamer die Möglichkeit das verfolgte Tier spezifisch in bis zu 10 Segmenten zu beleuchten. Lichtintensität und Farbe (je nach verwendetem Filter) kann ebenfalls für jedes Segment gesondert eingestellt werden. In diesem Fall wurden 3 verschiedene Beleuchtungsprotokolle verwendet. Zum einen wurde das gesamte Tier mit blauem Licht (470 nm, 1,8 mW/mm²) beleuchtet und außerdem spezifisch jeweils diejenige Region die AVA (ganz vorne) bzw. RIG (zwischen Kopf und Wurmmitte gelegen) beinhaltet. Hierbei konnte gezeigt werden, dass bei Beleuchtung der vorderen Region (AVA), sowie des ganzen Tieres eine Reaktion hervorgerufen werden konnte, bei alleiniger Beleuchtung von RIG jedoch nicht (Abb.: 20).

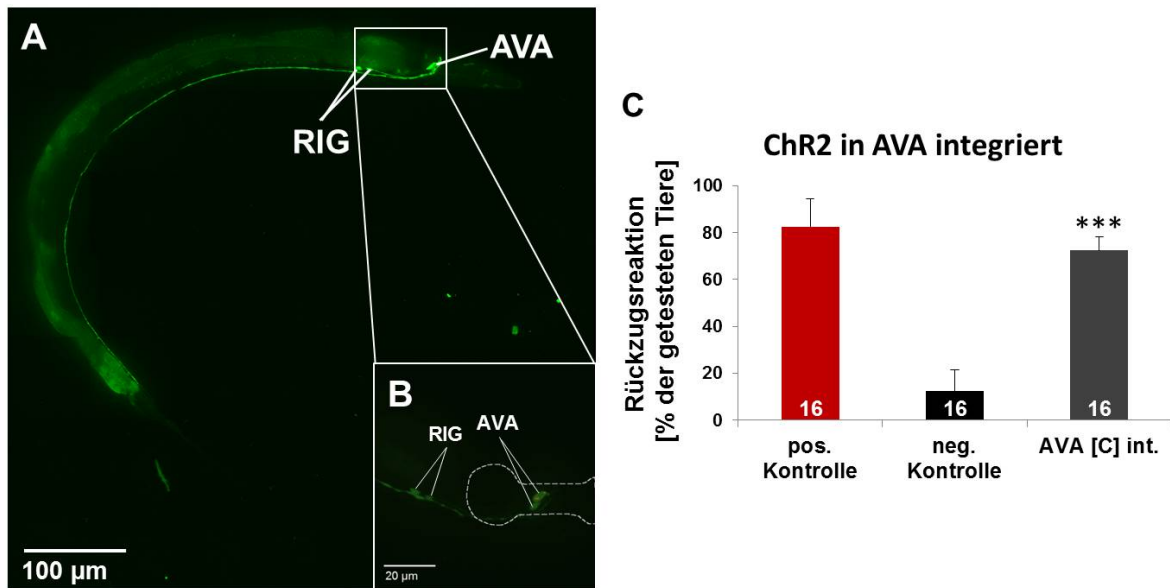


Abbildung 19: Charakterisierung des ChR2-HR::mCherry::SL2::GFP (Promotorpaar: *pflp-18/pgpa-14*) Stammes nach erfolgreicher Integration (ZX1023). A) Fluoreszenz-Muster im gesamten Wurm, hierbei handelt es sich um z-Projektionen von 8x8 konfokalmikroskopischen Stapeln (Vergrößerung: 60X), die anschließend zu einer Montage zusammengefügt wurden. B) Überlagerung des roten (ChR2-HR::mCherry) und grünen (SL2::GFP) Kanals eines Wurmes des Stammes zx1023. C) Prozentsatz der Tiere welche auf Beleuchtung mit blauem Licht (470 nm, 1 s., 0,8 mw/mm²) mittels einer Rückzugsbewegung reagieren. Getestet wurde die integrierte Linie, sowie eine Linie welche ChR2 in den MRNs exprimiert (AQ2334) (pos. Kontrolle) und der Wildtyp (ZX399) (neg. Kontrolle). Alle getesteten Linien tragen den *lite-1*-Hintergrund. Statistik: ANOVA mit Bonferoni-Anpassung; Verwendetes Programm: Origin

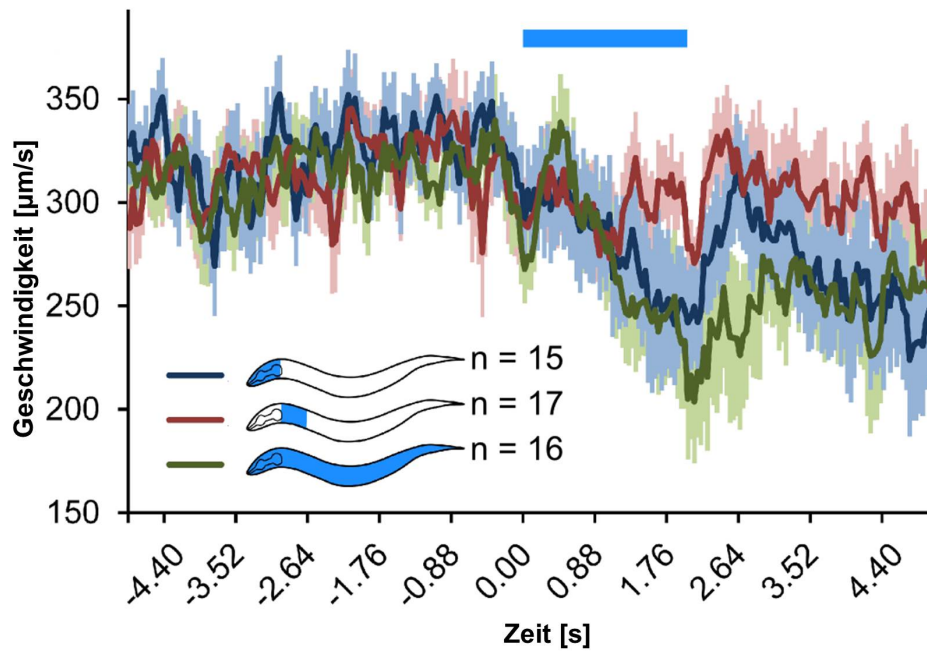


Abbildung 20: Segmentierte Beleuchtung der integrierten Linie (ZX1023) mit Hilfe des 'Single-Worm-Trackers' (470 nm, 2 s., 1,8 mW/mm²). Beleuchtet wurde der ganze Wurm, sowie die beiden Segmente, welche AVA bzw. RIG enthalten.

2. Habituation des Rückzugreflexes

2.1. Manuelle Experimente

Eine der wichtigsten Fragen, die im Rahmen dieser Arbeit beantwortet werden soll ist, auf welcher Ebene der Reizweiterleitung eine Habituation entsteht. Wie bereits in der Einleitung ausgeführt ist, tritt bei leichten, für den Organismus nicht schädlichen Reizen, nach häufiger Wiederholung ein Gewöhnungseffekt ein. Das Tier reagiert nicht mehr, bzw. reagiert schwächer auf diesen Reiz. Anfang der 90er Jahre konnte Catharine Rankin zeigen, dass eben eine solche Gewöhnung, auch Habituation genannt, bei *C. elegans* für den sogenannten 'Tap' eintritt (Rankin u. a. (1990)). Hierbei spielen insbesondere die mechanosensorischen Neurone ALML/R, AVM, PLML/R und PVM, sowie das, für den Rückzugreflex hauptsächlich verantwortliche, Interneuronenpaar AVAL/R eine Rolle (Chalfie u. a. (1985); Piggott u. a. (2011); Zheng u. a. (1999)).

Zum Testen der sensorischen Ebene der Reizverarbeitung wurden die Linien *pmec-4::ChR2-HR* (AQ2334) *psra6::ChR2-HR* (ZX831) verwendet (Abb.: 21). Der *mec-4* Promotor führt zu einer Expression in den oben beschriebenen Mechanorezeptor-neuronen (Lai u. a. (1996)). Diese zeigen nach den Experimenten von Rankin et al. eine deutliche Habituation auf wiederholte Stimulation (Rankin u. a. (1990)). Auch optogenetisch konnte dies im Vorfeld in Experimenten von Martin Brauner gezeigt werden (Nagel u. a. (2005)). Der *sra-6* Promotor hingegen führt unter anderem zu einer Expression in dem sensorischen Neuronenpaar ASHL/R (Troemel u. a. (1997)), welches insbesondere auf aversive chemische Reize und Änderungen des osmotischen Wertes reagiert (I.2.1). Hier wird keine Habituation erwartet, da ASHL/R potentiell schädliche Reize wahrnimmt, und daher ein Gewöhnungseffekt biologisch nicht sinnvoll wäre. Wie erwartet konnte auch in diesem ersten Test eine Habituation für die mechanosensorischen Neuronen gezeigt werden. Die maximale Reaktion dieser Linie während des ersten gegebenen Stimulus lag bei 94,4 %. Auch für die *psra-6::ChR2-HR* Linie war jedoch eine Habituation zu verzeichnen, obwohl diese für die ASH-Neuronen nicht zu erwarten war. Keine Habituation ist zu sehen für die integrierte Linie ZX906 (AVA[A]), welche ChR2-HR in AVA, sowie einigen weiteren Neuronen exprimiert (siehe Abb.: 18 Linie AVA[A]). Die höchste Reaktion der Linie AVA[A] liegt bei 66,7 %. Die Tiere der Negativkontrolle (Wildtyp)(ZX399) reagieren höchstens zu 20 %. Dabei handelt es sich um spontane Rückwärtsbewegungen, die nicht durch äußere Reize induziert wurden (Chiba u. Rankin (1990)). Gezeigt ist das Experiment sowohl mit, als auch ohne Retinal (Abb.: 21 B)). Hier war deutlich zu sehen, dass ohne die Zugabe von Retinal keine Reaktion der Tiere auf blaues Licht zu verzeichnen war.

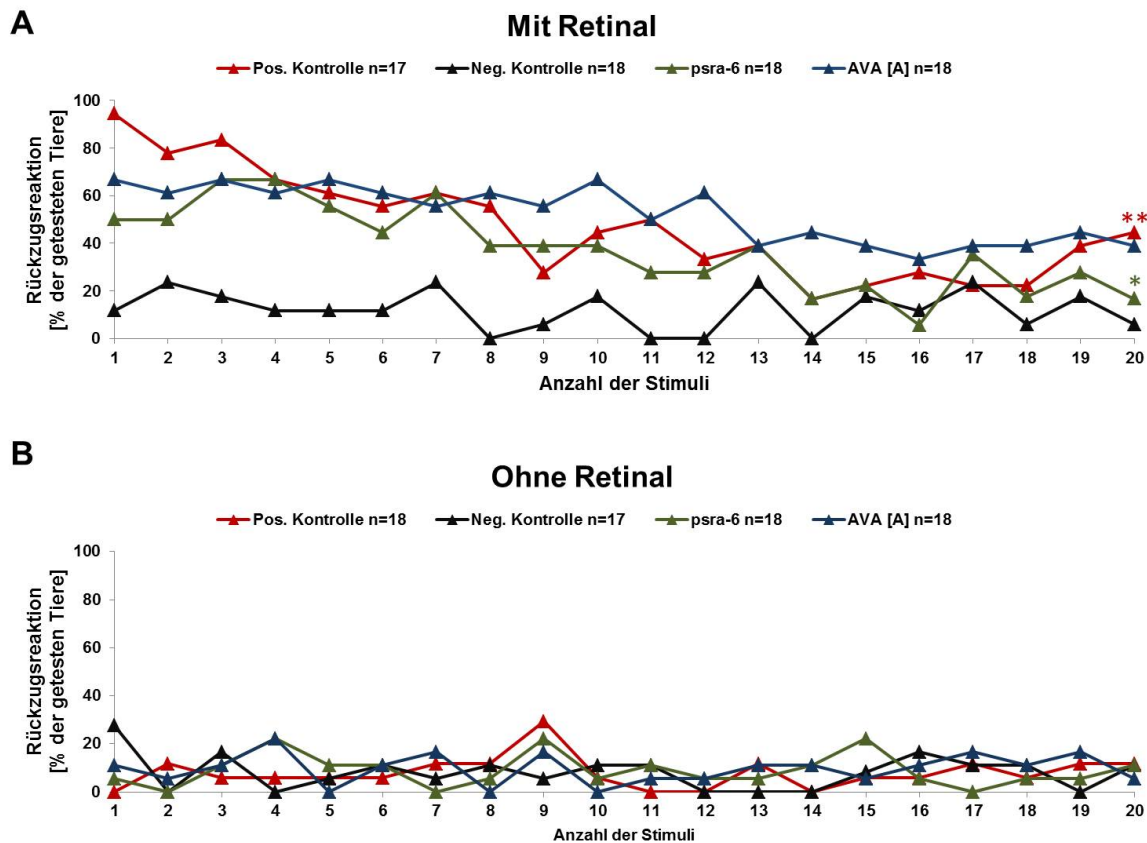


Abbildung 21: 1. Habituationsexperiment mit den Linien AVA[A] integriert (Chr2-HR in AVA und 8-10 zusätzlichen Zellen) (ZX906) und *psra-6::Chr2*-HR (ZX831), sowie einer Linie welche Chr2 in den MRNs exprimiert (AQ2334) (pos. Kontrolle) und dem Wildtyp (ZX399) (neg. Kontrolle). Alle getesteten Linien tragen den *lite-1*-Hintergrund. Durchgeführt wurde das Experiment am Mikroskop und die Reaktion 'per Hand' protokolliert. Gezeigt ist jeweils der Prozentsatz der Tiere welche auf Beleuchtung mit blauem Licht mit Rückzug reagieren. Parameter: 470 nm, 1 s, 0,8 mW/mm²; ISI=10 s; 20 Wiederholungen. Statistik: Chi²-Test; Verwendetes Programm: Excel. (*) zeigt den Unterschied zwischen dem ersten und dem letzten Stimulus. A) Experiment mit Zugabe von Retinal in das Futter, B) Experiment ohne Zugabe von Retinal.

Nachdem es gelungen war echte zellspezifische Expressionen von Chr2-HR in den Zellpaaren AVAL/R und ASHL/R zu erreichen, wurden die oben gezeigten Experimente mit den beiden zellspezifisch exprimierenden Linien AVA[C] integriert (ZX1023) und ASH[C] (AQ2235) wiederholt. Als Kontrollen wurden auch hier die Linien *pmec-*

4::ChR2-HR (AQ2334) und *lite-1* (ZX399) verwendet. Anders als *psra-6*::ChR2-HR zeigt die Linie ASH[C] keine Habituation, die höchste Reaktion liegt bei 83,3 %. Die Reaktion der integrierten Linie AVA[C] liegt in den Höchstwerten um 66 % und es konnte für ChR2-HR in den Mechanorezeptorneuronen eine Habituation gezeigt werden. Außerdem ist es sehr auffällig, dass die Werte stark schwanken zwischen den einzelnen Stimuli, was mit dem relativ geringen Stichprobenumfang von 12 Tieren zu begründen ist (siehe Abb.: 22).

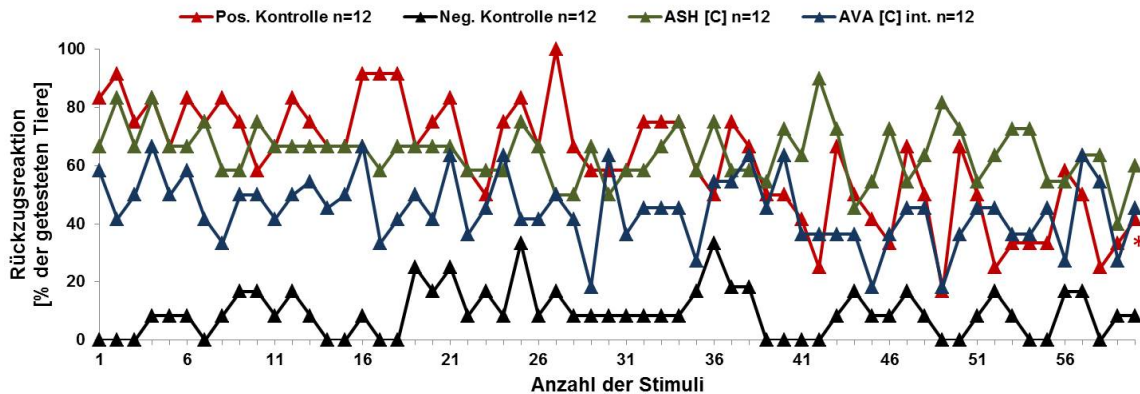


Abbildung 22: 2. Habituationsexperiment mit den Linien AVA[C] integriert (ZX1023) und ASH[C] (AQ2235), sowie einer Linie welche ChR2 in den MRNs exprimiert (AQ2334) (pos. Kontrolle) und dem Wildtyp (ZX399) (neg. Kontrolle). Durchgeführt wurde das Experiment am Mikroskop und die Reaktion manuell protokolliert. Gezeigt ist jeweils der Prozentsatz der Tiere welche auf Beleuchtung mit blauem Licht mit Rückzug reagieren. Parameter: 470 nm, 1 s, 0,8 mW/mm²; ISI=10 s; 60 Wiederholungen. Statistik: Chi²-Test; Verwendetes Programm: Excel. (*) zeigt den Unterschied zwischen dem ersten und dem letzten Stimulus.

Bei der hier gewählten Messmethode mit einzelnen Tieren, die über das komplette Experiment hinweg beobachtet wurden um ihre Reaktion zu protokollieren, ist die Messung eines hohen Stichprobenumfangs sehr zeitaufwändig. Außerdem ist die manuelle Protokollierung fehleranfällig, da der Experimentator insbesondere in Grenzfällen subjektiv entscheidet und zu dem gewünschten Ergebnis tendiert. Hierfür wurde ein Computer gestütztes Tracking-System entwickelt (Swierczek u. a. (2011)), welches im Rahmen dieser Arbeit auch vor Ort etabliert werden konnte.

2.2. Aufbau und Etablierung des 'Multi-Worm-Trackers' (MWT)

Wie oben beschrieben, war es sinnvoll ein Computer gestütztes Messverfahren zur Durchführung der Verhaltensexperimente zu verwenden, um Objektivität während der Messung zu gewährleisten und um mehrere Tiere zur gleichen Zeit messen zu können. Nach dem Vorbild des in den Laboren von Rex Kerr und Cathrin Rankin entwickelten 'Multi-Worm-Trackers' (Swierczek u. a. (2011)) habe ich ein solches Messsystem aufgebaut.

Die Hardware des Systems beinhaltet zusätzlich zu einem leistungsstarken, mit einer Kamera-Link-Karte ausgestatteten PC eine 4 Megapixel Hochgeschwindigkeitskamera mit Stativ, einen Objektisch und Vorrichtungen zur Präsentation der verschiedenen Reize Tap und Licht (Abb.: 23 A). Das von der Kamera übertragene Bild wird mittels des auf 'Lab-View' basierenden Programms 'MWT' (Screenshot Abb.: 24) direkt in Standortdaten der einzelnen Objekte umgerechnet, welche anschließend gespeichert werden. Dieses Verfahren ermöglicht eine deutlich schnellere Speicherung als wenn das Gesamtbildmaterial aufgenommen werden würde, benötigt jedoch einen sehr leistungsstarken Rechner mit einem großen Arbeitsspeicher (min. 8 Gigabyte). 'MWT' gibt die aufgenommenen Daten in einer '.blob' Datei aus, welche jedem einzelnen erkannten Objekt zu jedem Zeitpunkt während des Trackingvorgangs diese Daten zuordnet. Gemessen werden können bis zu 80 Objekte gleichzeitig. Eine größere Anzahl an Tieren (120) kann von der Software ebenfalls noch erfasst werden, jedoch sind die Kollisionen der Würmer untereinander dann so häufig, dass es zu erheblichen Datenverlust kommt. Zwei sehr nahe beieinander liegende Würmer können nicht mehr als einzelne Objekte erkannt werden. Zur Analyse der vom MWT gesammelten Daten und zur übersichtlichen Ausgabe wurde von Kerr und Rankin noch ein weiteres, auf Java basierendes, Programm entwickelt (Choreography), welches die Möglichkeit bietet, sich bestimmte Parameter und Durchschnittswerte für alle Objekte auf einer Platte übersichtlich anzeigen zu lassen. Mittels verschiedener 'Plugins' kann dieses Programm erweitert und auf die jeweils vorhandenen Bedürfnisse zugeschnitten werden.

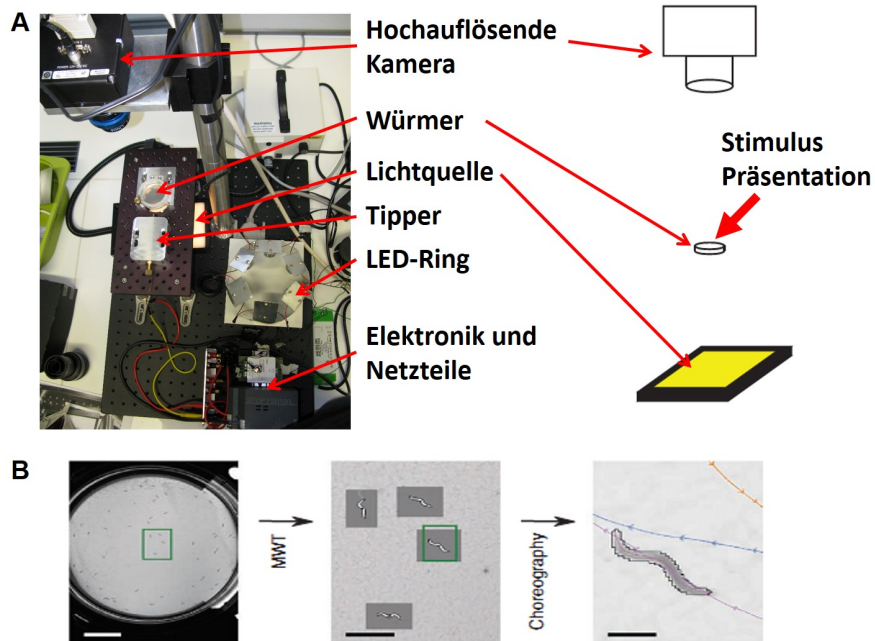


Abbildung 23: Aufbau und Funktionsweise des MWT: A) Hardware-Komponenten für Stimulus-Präsentation und 'Tracking' (Foto und Schema). B) Schematische Darstellung des Zusammenhangs der einzelnen Schritte zur Datengenerierung und -verarbeitung: Kamera - Trackingprogramm 'MWT' - Analyseprogramm 'Choreography'. Modifiziert nach Swierczek u. a. (2011).

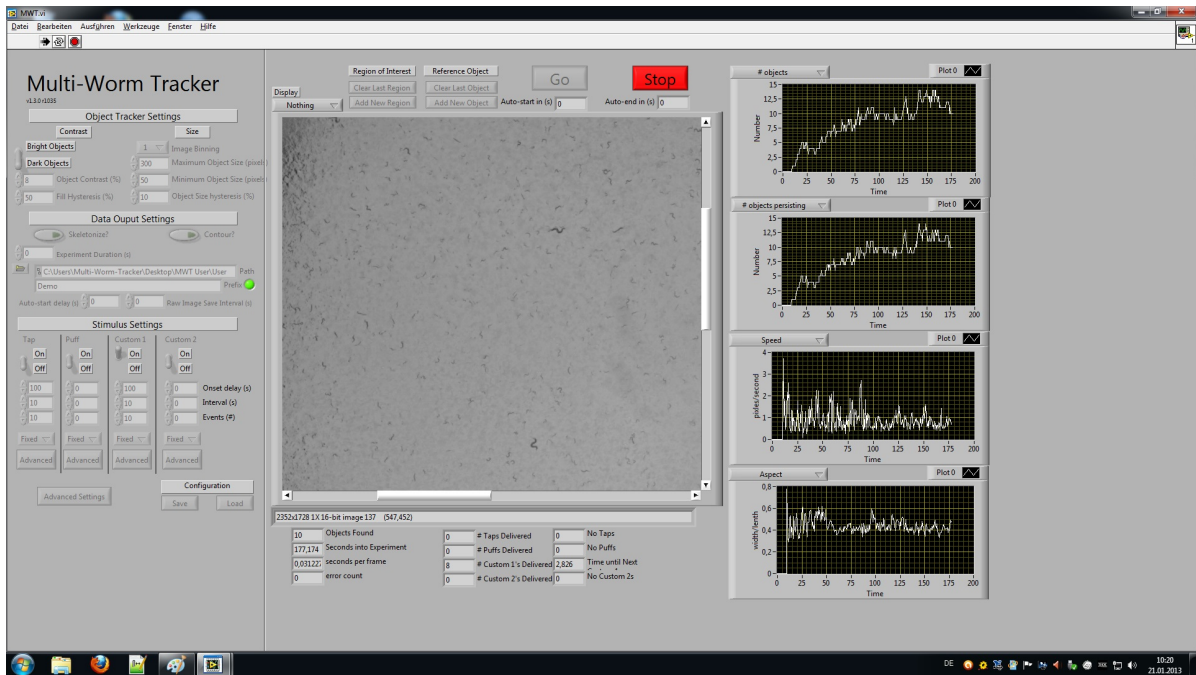


Abbildung 24: Screenshot des Lab-View basierten Programms MWT während des Trackingvorgangs. Links: Variable Einstellungen zur Objekterkennung und Stimulus-Präsentation; Mitte: Blickfeld der Kamera und Informationen zu Anzahl der erkannten Objekte, 'Framerate', Zeit und Stimulus-Präsentation; rechts: Trackingdaten graphisch aufbereitet.

Nach dem Aufbau des Systems und erfolgreicher Installation der zugehörigen Softwarepakete wurden mehrere Experimente zum Finden möglichst optimaler Bedingungen zur Gabe des Lichtreizes durchgeführt (Anhang).

2.3. Computergestützte Experimente mit dem MWT

Wiederholungen des oben gezeigten manuellen Habituationsexperiments mit zellspezifisch exprimiertem Chr2-HR sind in den Abbildungen 25 A) und 26 A) zu sehen. Hierbei wurde der Test zwei mal mit jeweils unterschiedlichen Beleuchtungsbedingungen (Dauer und Intensität des präsentierten Lichtpulses variieren) durchgeführt. In beiden Fällen ist die Habituation der Positivkontrolle (Chr2-HR in den MRNs) sehr deutlich zu beobachten. Mit dem Stichprobenumfang ist die Anzahl der gemessenen Kultur-Platten angegeben. Auf jeder Platte befinden sich zwischen 20 und 50, vom System gleichzeitig messbare Tiere.

Bei einer Lichtintensität von $0,02 \text{ mW/mm}^2$ sind die Höchstwerte für die Linien

AVA[C] integriert und ASH[C] jedoch mit 49 % bzw. 61 % reagierenden Tieren niedriger als in den manuell am Mikroskop durchgeführten Versuchen (siehe Abb.: 25). Bei $0,6 \text{ mW/mm}^2$ für 700 ms, ist sowohl eine deutlich signifikante Habituation der Kontrolllinie (von 68,5 % - 37,5 % reagierender Tiere) vorhanden als auch eine gute Anfangsreaktion der Linie AVA[C] int. von 52,2 % der Tiere (Abb.: 26). Die höchsten Reaktionen liegen für ASH[C] bei 71 % und bei AVA[C] bei 59 % der Würmer. Wie in den Abbildungen 25B) und 26 gezeigt, ist es mittels MWT ebenfalls möglich die während der Rückzugsreaktion jeweils zurück gelegte Distanz zu messen und anzugeben. Ein deutlicher Rückgang der Distanz, in Abhängigkeit von der Anzahl der bereits präsentierten Stimuli, ist nur für die jeweilige Positivkontrolle zu verzeichnen. Diese Experimente konnten zeigen, dass wie erwartet bei Reizung der Mechanorezeptorneuronen eine Habituation eintritt, jedoch nicht bei Reizung des nozizeptiven chemosensorischen Neuronenpaares ASH oder des Interneuronenpaares AVA.

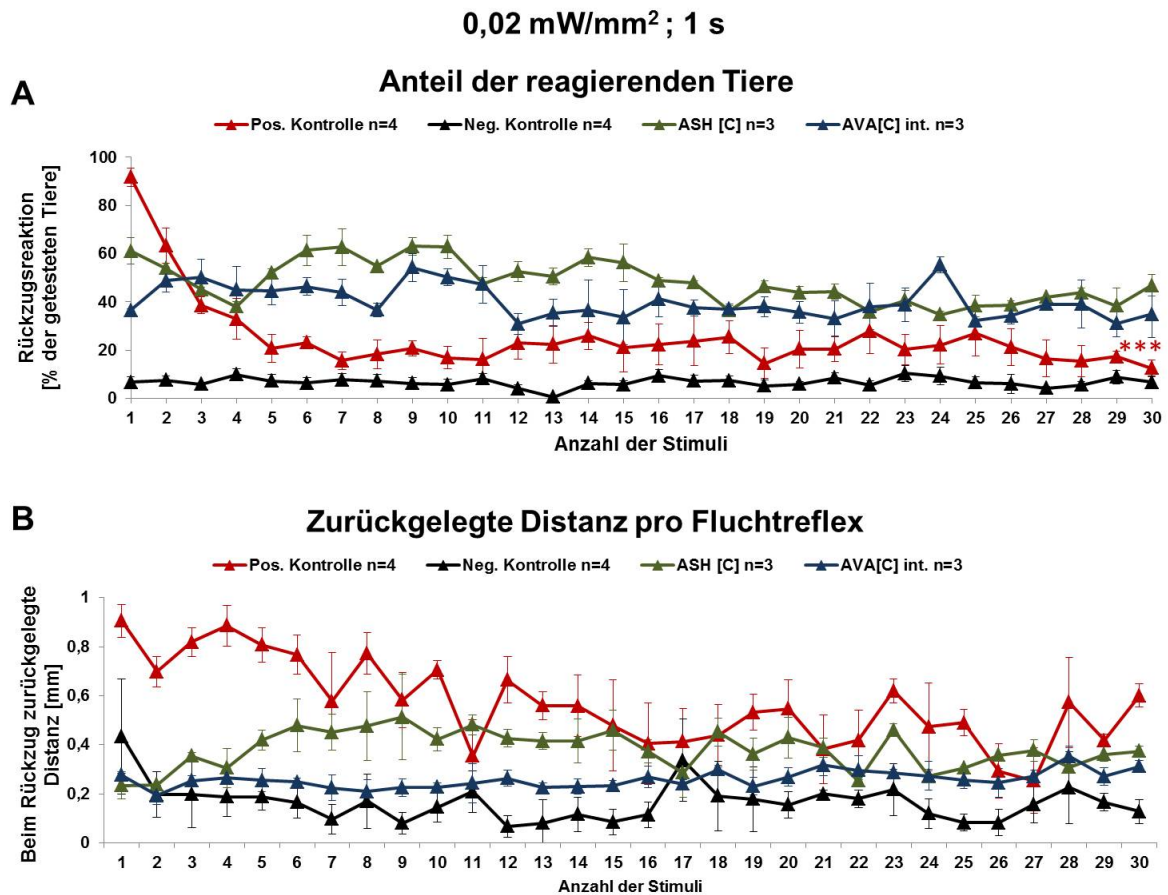


Abbildung 25: MWT-Habituationsexperiment 1. Verwendete Linien waren AVA[C] integriert (ZX1023) und ASH[C] (AQ2235), sowie eine Linie welche Chr2 in den MRNs exprimiert (AQ2334) (pos. Kontrolle) und der Wildtyp (ZX399) (neg. Kontrolle). Alle getesteten Linien tragen den *lite-1*-Hintergrund. Durchgeführt wurden die Experimente am MWT und die Reaktion wurde von dem eigens dafür entwickelten Computerprogramm 'MWT' gemessen und mit dem Programm 'Choreography' analysiert. Parameter: 470 nm, 1 s, 0,02 mW/mm²; ISI=10 s; 30 Wiederholungen. Statistik: ANOVA mit anschließendem Tukey Test; Verwendetes Programm: PAST3. (*) zeigt den Unterschied zwischen dem ersten und dem letzten Stimulus.

0,6 mW/mm²; 700 ms

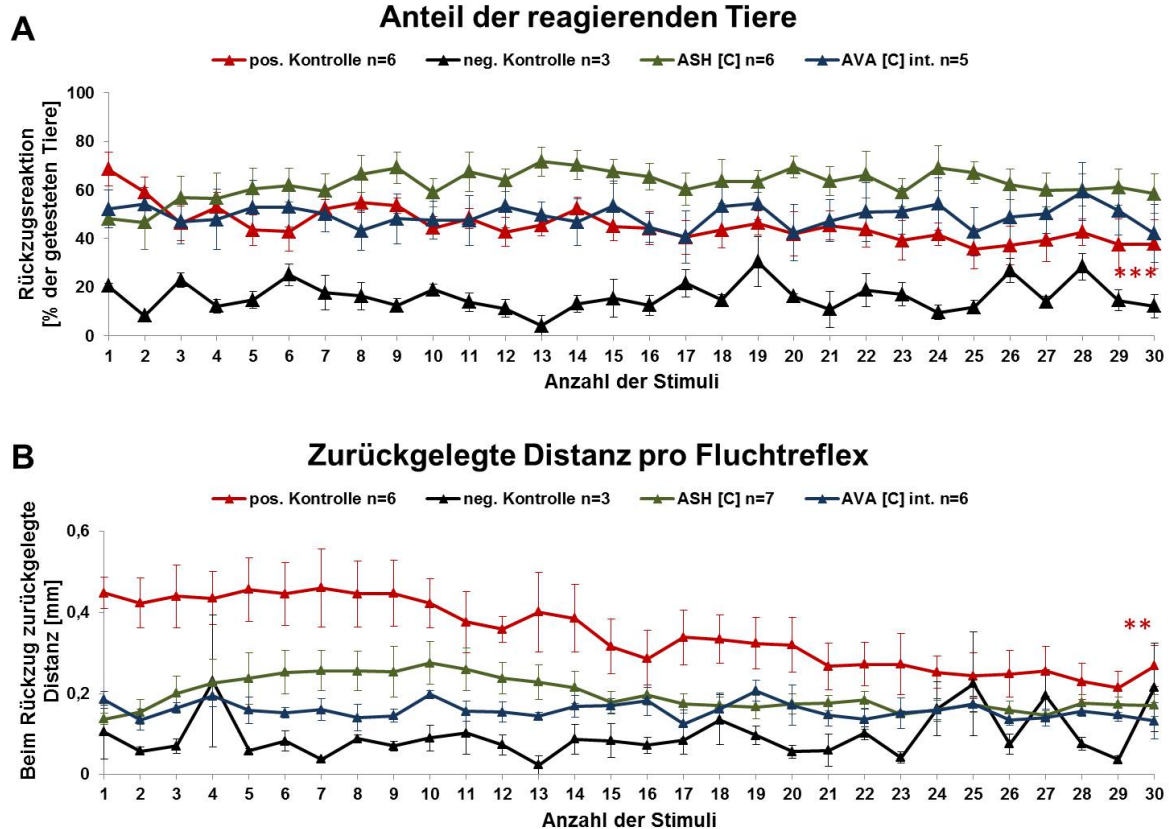


Abbildung 26: MWT-Habituationsexperiment 2. Verwendete Linien waren AVA[C] integriert (ZX1023) und ASH[C] (AQ2235), sowie eine Linie welche Chr2 in den MRNs exprimiert (AQ2334) (pos. Kontrolle) und der Wildtyp (ZX399) (neg. Kontrolle). Alle getesteten Linien tragen den *lite-1*-Hintergrund. Durchgeführt wurden die Experimente am MWT und die Reaktion wurde von dem eigens dafür entwickelten Computerprogramm 'MWT' gemessen und mit dem Programm 'Choreography' analysiert. Parameter: 470 nm, 700 ms, 0,6 mW/mm²; ISI=10 s; 30 Wiederholungen. Statistik: ANOVA mit anschließendem Tukey Test; Verwendetes Programm: PAST3. (*) zeigt den Unterschied zwischen dem ersten und dem letzten Stimulus.

3. Modulationen von AVA

Zusätzlich zu der Frage, an welcher Stelle im Netzwerk am wahrscheinlichsten eine Habituation des Reizes stattfindet, ist es von Interesse, wie die Reizweiterleitung

von AVA zu den nachfolgenden Neuronen vonstatten geht. Wie in der Einleitung beschrieben, gehen von AVA sowohl chemische Synapsen, als auch elektrische Zell-Zell-Verbindungen aus. Durch jeweilige Unterbrechung dieser Verbindungen wurde im Folgenden getestet, welche eine Rolle spielen und ob potentielle Modulationen von AVA durch andere Interneuronen vorliegen.

3.1. Eliminierung der chemischen Synapsen mittels Tetanustoxin (TeTX)

Bei Tetanus-Toxin handelt es sich um ein, als Synapsengift wirkendes Protein, welches mit Synaptobrevin hydrolytisch spaltet und somit ein Verschmelzen der synaptischen Vesikel mit der präsynaptischen Membran verhindert (Schiavo u. a. (1992)). Eine spezifische Expression von Tetanustoxin in den beiden AVA Neuronen führt zu einer Unterbrechung der chemischen Synapsen zwischen AVA und nachgeschalteten Zellen, wie den Motorneuronen und dem Interneuronenpaar PVC (Abb.: 27). Die hierfür benötigten genetischen Konstrukte sind in Abbildung 28 schematisch dargestellt.

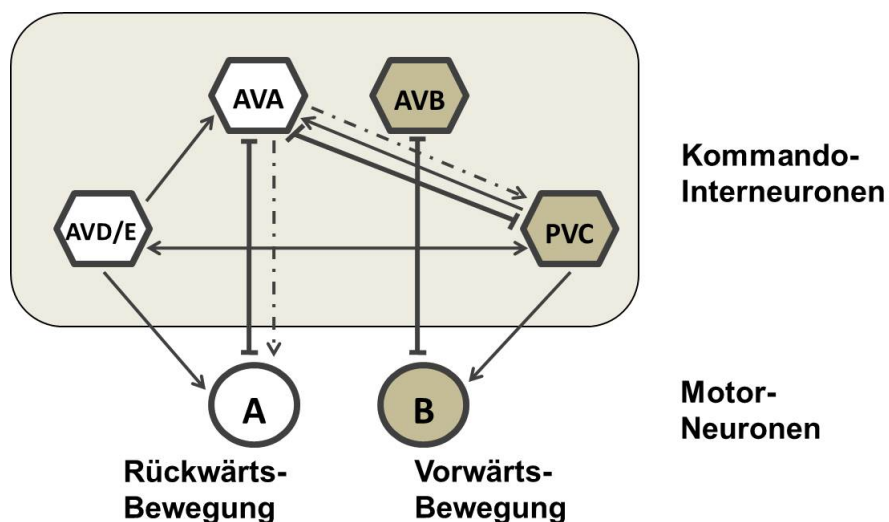


Abbildung 27: Schematische Darstellung der in den Rückzugreflex involvierten Zellen. Die, durch die spezifische Expression von Tetanustoxin in AVA, beeinträchtigten neuronalen Verbindungen sind gestrichelt dargestellt.

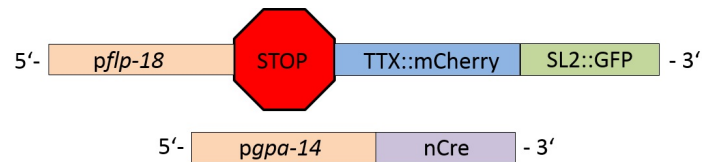


Abbildung 28: Schematische Darstellung der zur AVA spezifischen TeTX Expression hergestellten genetischen Konstrukte.

Abbildung 29 zeigt die Reaktion einer Linie, welche sowohl Chr2 als auch das im obigen beschriebene TeTX in den AVA Neuronen exprimiert (zx1649). Die Reizweiterleitung von AVA an die nachgeschalteten Zellen kann somit nur über elektrische Verbindungen ('Gap Junctions') erfolgen. 55 % der Tiere dieser Linie reagieren mit einem Rückzugsreflex auf blaues Licht. In der Reaktion lässt sich hier kein signifikanter Unterschied zu der Kontrolllinie feststellen (48 % reagierende Tiere), die nur Chr2HR in AVA exprimiert und deren chemische Synapsen somit völlig intakt sind. Zusätzlich wurde eine Linie getestet, welche TeTX unter dem *glr-1* Promotor und somit in allen am Bewegungsapparat beteiligten Interneuronen exprimiert. Hier führte die Beleuchtung mit blauem Licht zu einer Reaktion von 44 % der Tiere und es konnte weder zu den Reaktionen der Kontrolle, als auch der AVA_TeTX-Linie ein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Ebenfalls keine signifikanten Unterschiede konnten für die, während der Rückzugsreaktion zurückgelegte, Distanz gefunden werden.

TeTX- Test

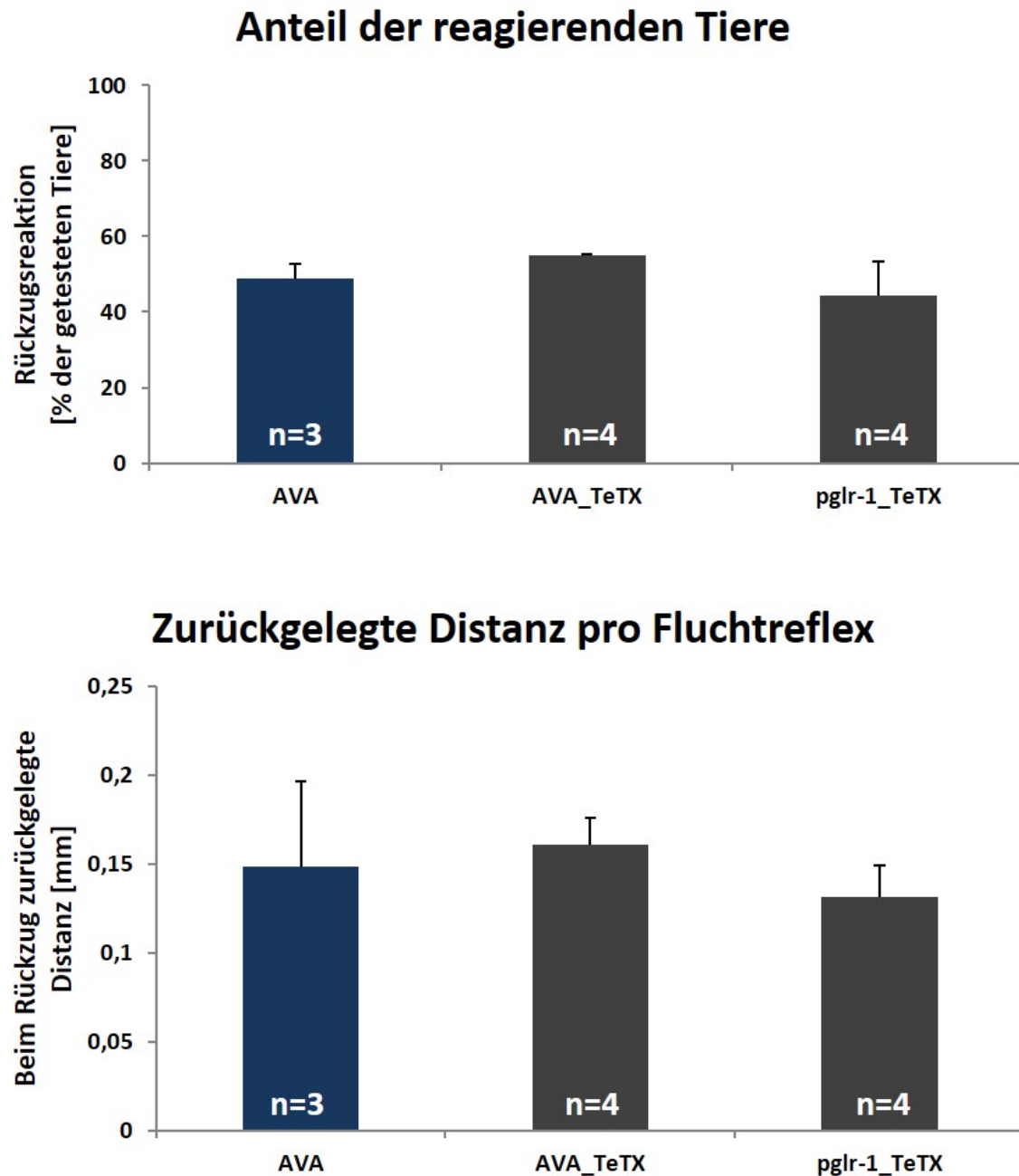


Abbildung 29: Einfluss chemischer Synapsen auf die via AVA vermittelte Rückwärtsbewegung: Getestete Linien: AVA[C] int. (zx1023) und AVA[C] int. mit zusätzlicher spezifischer Expression von TeTX in AVA (zx1649), sowie eine Kontrolllinie mit TeTX Expression unter dem *glr-1* Promoter und somit in den gesamten Interneuronen (zx1637). Verwendet wurde der MWT. Parameter: 470 nm, 700 ms, 0,6 mw/mm². Statistik: ANOVA mit Tukey-Test; Verwendetes Programm: Past3.

3.2. Unterbrechung der Gap-Junctions von AVA mittels spezifischer *unc-7* RNAi

Zusätzlich zu den chemischen Synapsen soll auch die Rolle der elektrischen Verbindungen untersucht werden (Abb.: 30, gestrichelte Linien).

Wichtige Proteine zur Ausbildung von elektrisch leitfähigen Zell-Zell-Verbindungen, so genannten 'Gap-Junctions', des neuromuskulären Systems sind die beiden Inexine UNC-7 und UNC-9. Um gezielt die 'Gap-Junctions' zu, mit AVA verbundenen, Zellen zu unterbrechen, wurde hier die RNAi Methode gewählt. Das macht es möglich, entsprechend der verwendeten Promotoren, einen gewebe-, zelltyp- oder sogar einzelzellspezifischen 'Knock-Down' eines bestimmten Gens zu erreichen (Esposito u. a. (2007)). Es werden zwei Konstrukte benötigt, von denen eines für eine, dem auszuschaltenden Gen identische, RNAi-Sequenz kodiert ('sense') und das andere für den komplementären Strang ('antisense'). Auch hier wurde wieder das AVA spezifische Promotorpaar *pflp-18/pgpa-14* verwendet (Abb.: 31). Jeweils ein Promotor wurde gekoppelt mit einem der beiden benötigten RNAi Konstrukten zum Ausschalten des *unc-7* Genes.

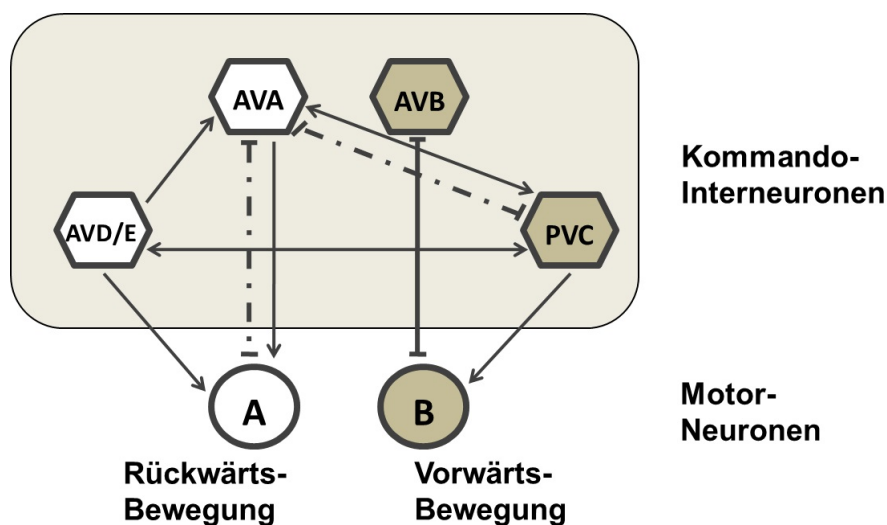


Abbildung 30: Schematische Darstellung der in den Rückzugreflex involvierten Zellen. Die, durch die spezifische Expression von *unc-7* RNAi in AVA, beeinträchtigten neuronalen Verbindungen sind gestrichelt dargestellt.

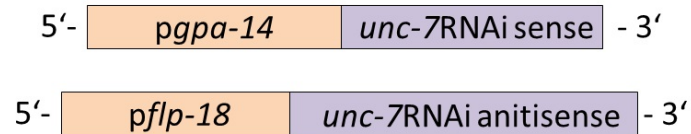


Abbildung 31: Schematische Darstellung der zum AVA spezifischen 'Knock-Down' des *unc-7* Genes verwendeten RNAi Konstrukte.

Abbildung 32 zeigt die Reaktion von zwei getesteten Linien: mit AVA spezifisch unterbrochenen 'Gap-Junctions' und Chr2 in AVA auf blaues Licht (zx1645 und zx1646). Zur Kontrolle dienten die Linie AVA[C] integriert (zx1023), sowie eine Linie, die zusätzlich nur das *unc-7* RNAi 'antisense' Konstrukt enthält (zx1647), um zu zeigen, dass dieses alleine keinen 'Knock-Down' herbeiführt, sondern nur eine gleichzeitige Expression beider RNAi-Segmente das gewünschte Ergebnis erreicht. So kann auch hier genau wie bei der Verwendung des Cre-Lox-Systems ein zellspezifischer Effekt erreicht werden. Zwischen der Linie AVA[C] integriert (49 % reagierende Tiere) und der Linie mit dem zusätzlichen Antisense-Konstrukt (52 % reagierende Tiere) ist kein signifikanter Unterschied auszumachen. Die beiden Linien mit dem AVA spezifischen *unc-7* 'Knock-Down' hingegen reagieren deutlich mit 82 % und 81 % der Tiere signifikant stärker als die Kontrolllinie AVA[C] integriert. Es konnten zwischen den getesteten Linien jedoch keine signifikanten Unterschiede für die, während der Rückzugsreaktion, zurückgelegte Distanz gefunden werden.

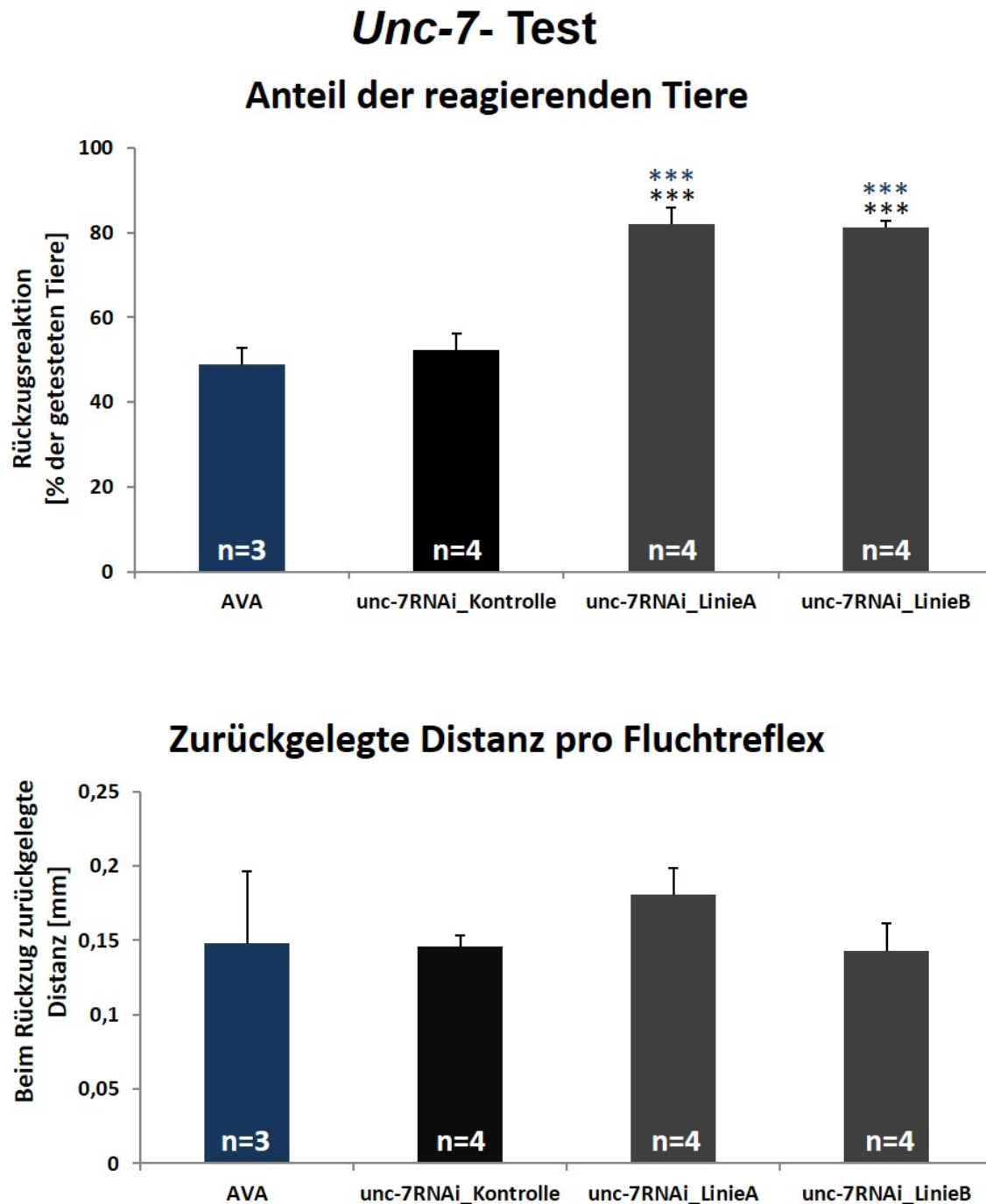


Abbildung 32: Einfluss von 'Gap-Junctions' auf die via AVA vermittelte Rückwärtsbewegung: Getestete Linien: AVA[C] int. (zx1023) und AVA[C] int. mit zusätzlicher AVA spezifischer RNAi [A] (zx1645) und [B] (zx1646), sowie einer Kontrolllinie, die zusätzlich zu Chr2 in AVA lediglich das RNAi antisense Konstrukt exprimiert (zx1647). Verwendet wurde der MWT. Parameter: 470 nm, 700 ms, 0,6 mw/mm². Statistik: ANOVA mit Tukey-Test; Verwendetes Programm: Past3.

3.3. Einfluss von PVC-Inhibition auf AVA

Die mit dem Multi-Worm-Tracker durchgeführten Habituations-Experimente zeigen zusätzlich zu den bereits oben besprochenen Ergebnissen, dass die Reaktion der AVA-Linie auf den ersten Stimulus deutlich geringer ausfällt als weitere Reaktionen (Abb.: 33). Hier findet mit dem ersten Lichtimpuls eine Sensitisierung der AVA Neurone für die nachfolgenden Reize statt. Diese kann beispielsweise durch die Inhibierung von zu AVA antagonistisch wirkenden Neuronen geschehen. Die Experimente mit gestörten chemischen bzw. elektrischen neuronalen Verbindungen weisen darauf hin, dass das posterior liegende Interneuronenpaar bei der Modulation von AVA eine wichtige Rolle inne hat und somit ein Kandidat für die Sensitisierung von AVA ist.

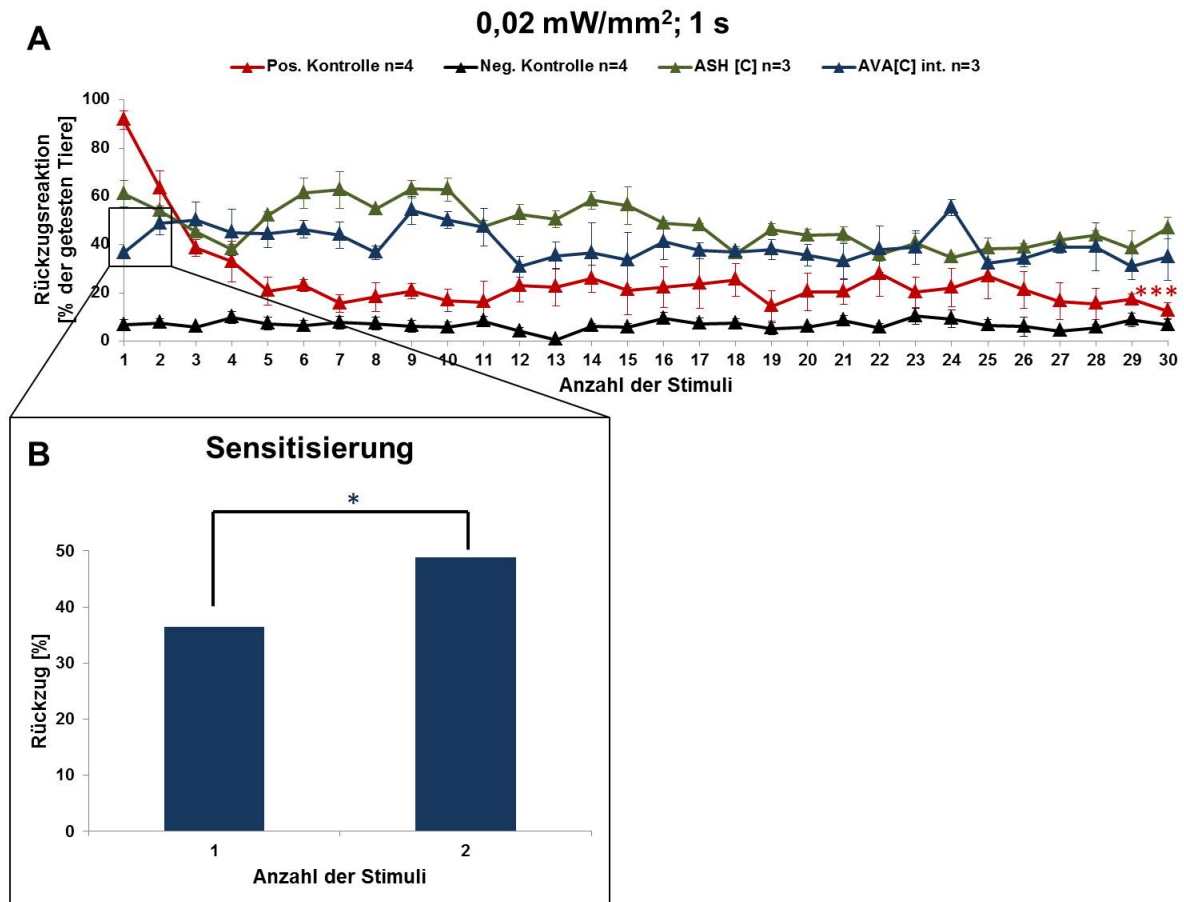


Abbildung 33: Sensitierungsreaktion der Linie AVA[C] integriert bei wiederholten Reizen. Verwendete Linien waren AVA[C] integriert (zx1023) und ASH[C] (zx1080), sowie *pmeC-4::ChR2HR* (zx835) (pos.) und *lite-1* (zx399) (neg.) als Kontrollen. Parameter: 470 nm, 1 s, 0,02 mW/mm²; ISI=10 s; 30 Wiederholungen. Statistik: Chi²-Test (Vergleich zwischen dem ersten und dem zweiten Stimulus).

Wenn die AVA-Antagonisten PVCL/R durch wiederholte Reizung von AVA über 'Gap-Junctions' zwischen den beiden Neuronenpaaren inhibiert werden, könnte dies die nachfolgende Sensitisierung der AVA-Neuronen bedingen. Durch künstliche Inhibition der PVC Neuronen mit der durch gelbes Licht gesteuerten Ionenpumpe NpHR, wurde diese These im Folgenden getestet. Da es uns nicht möglich war eine PVC spezifische Proteinexpression zu erreichen (Schmitt u. a. (2012)), wurde hier der *glr-1* Promotor verwendet in Kombination mit segmentierter Beleuchtung spezifisch im Schwanz, wo PVC zu finden ist (Abb.: 34).

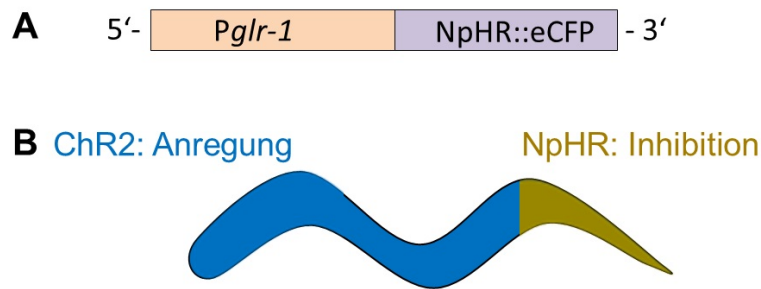


Abbildung 34: A) Genetisches Konstrukt zur Expression von NpHR in den Interneuronen. B) Beleuchtungsschema der nachfolgenden Experimente.

Die Linie AVA[C] int. (AVA) (zx1023), sowie eine weitere Linie, welche zusätzlich NpHR unter dem *glr-1* Promotor exprimiert (AVA_PVC) (zx1648), wurden in drei verschiedenen Versuchsreihen nach obigem Schema einmal nur mit blauem Licht, einmal nur mit gelbem Licht und einmal mit beiden Wellenlängen gleichzeitig beleuchtet (Abb.: 36). Des Weiteren wurden, als Positivkontrolle, Tiere der Linie *pmec-4::ChR2* (zx835) mit blauem Licht beleuchtet (Abb.: 35). Hier ist als Reaktion auf die Präsentation des blauen Lichtes eine maximale Veränderung der mittleren Geschwindigkeit von 0,2 mm/s auf -0,6 mm/s ($\Delta = 0,8$ mm/s) zu sehen und somit eine deutliche Rückzugsreaktion. Dahingegen ändert sich die mittlere Geschwindigkeit der Linien AVA und AVA_PVC während der Beleuchtung mit blauem Licht maximal nur um $\Delta = 0,2$ mm/s (Abb.: 36A). Dieselbe maximale Änderung ist auch für die Beleuchtung mit blauem und gelbem Licht gleichzeitig zu verzeichnen (Abb.: 36C). Während der Beleuchtung mit gelbem Licht ändert sich die mittlere Geschwindigkeit von AVA und AVA_PVC nicht (Abb.: 36B).

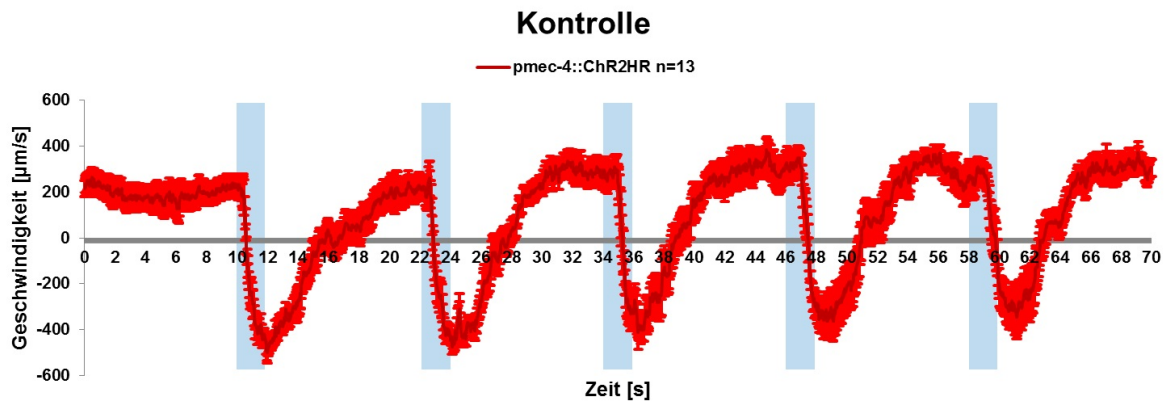


Abbildung 35: Geschwindigkeitsänderung während wiederholter Beleuchtung der Positivkontrolle $p_{mec-4}::ChR2$. Parameter: 470 nm, 2 s, 0,8 mw/mm^2 ; ISI=10 s; 5 Wiederholungen.

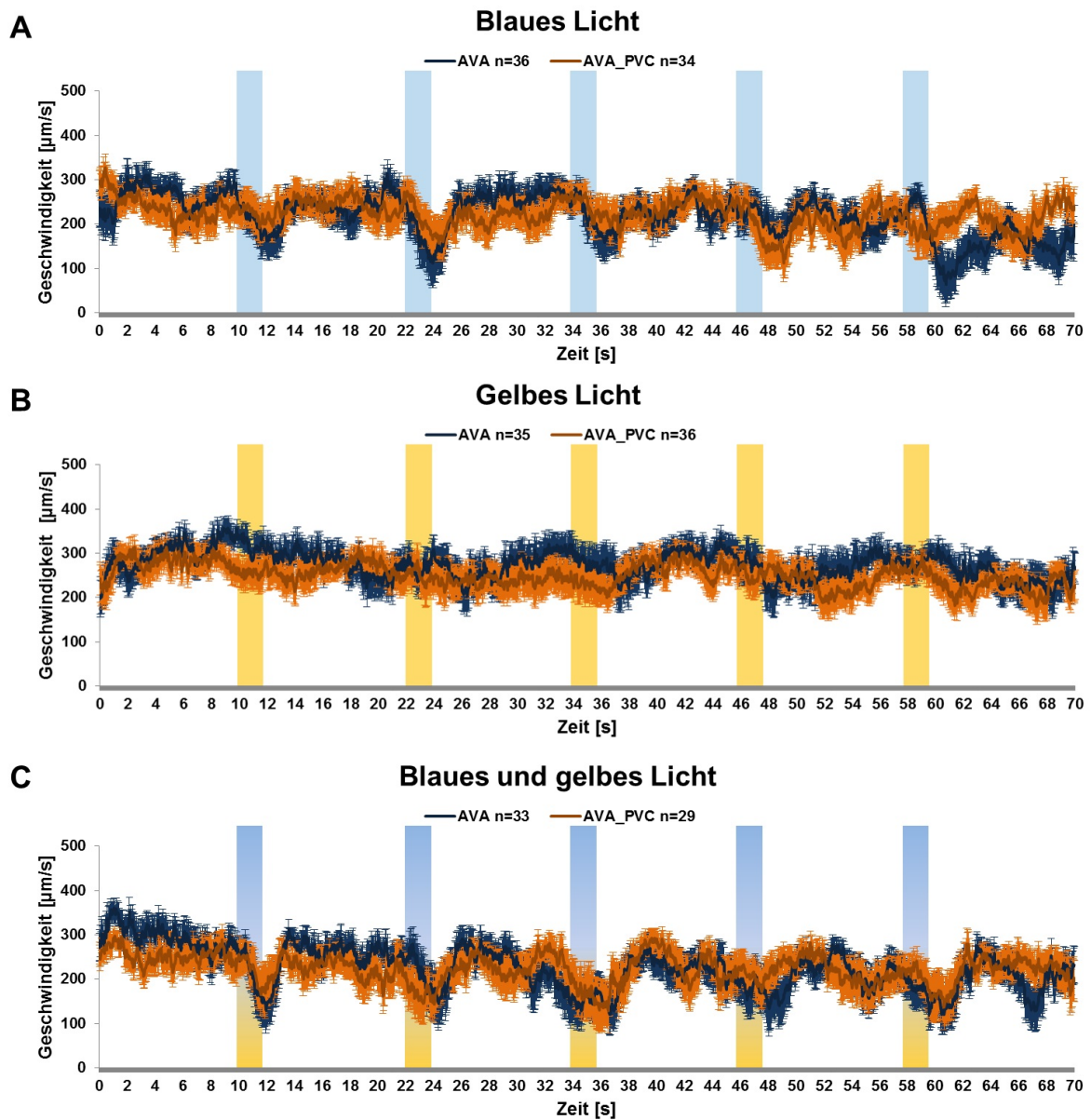


Abbildung 36: Geschwindigkeitsänderung während wiederholter Beleuchtung. Getestete Linien sind AVA[C] int. (AVA) (zx1023) und AVA[C] int. + *pglr-1::NpHR* (zx1648) (AVA_PVC). Parameter: 470 nm, 2 s, 1,7 mw/mm² (blaues Licht); 560 nm, 2 s, 2,4 mw/mm² (gelbes Licht) ISI=10 s; 5 Wiederholungen.

Um die Unterschiede der Linien während der einzelnen Stimuli besser darstellen zu können wurden die oben beschriebenen Experimente zusätzlich zur Geschwindigkeit auch nach Reaktion in Prozent der reagierenden Tiere ausgewertet (Abb.:

37). Gezeigt sind die beiden Linien AVA und AVA_PVC sowohl mit als auch ohne Retinal kultiviert (Negativkontrollen). Bei der Beleuchtung mit blauem Licht ist eine signifikant höhere Reaktion für die Linie AVA im Vergleich zur Kontrolle ohne Retinal bei den Stimuli 1, 2 und 5 zu verzeichnen. Die Linie AVA_PVC zeigt lediglich beim 5. Stimulus einen signifikanten Unterschied zur entsprechenden Kontrolle ohne Retinal. Zwischen den beiden Linien AVA und AVA_PVC die beide im Schnitt 40 % reagierende Tiere auf blaues Licht zeigen, ist für keinen der fünf aufeinander folgenden Stimuli ein signifikanter Unterschied in der Reaktion zu verzeichnen. Auch zwischen den einzelnen Stimuli besteht kein Unterschied. Die zuvor in MWT-Experimenten gezeigte Sensibilisierung kann hier nicht bestätigt werden. Eine Beleuchtung mit blauem und gelbem Licht zur gleichen Zeit führt zu dem selben Ergebnis. Die Reaktionen der Tiere nur auf gelbes Licht sind nicht signifikant unterschiedlich zu den jeweiligen Kontrollen ohne Retinal.

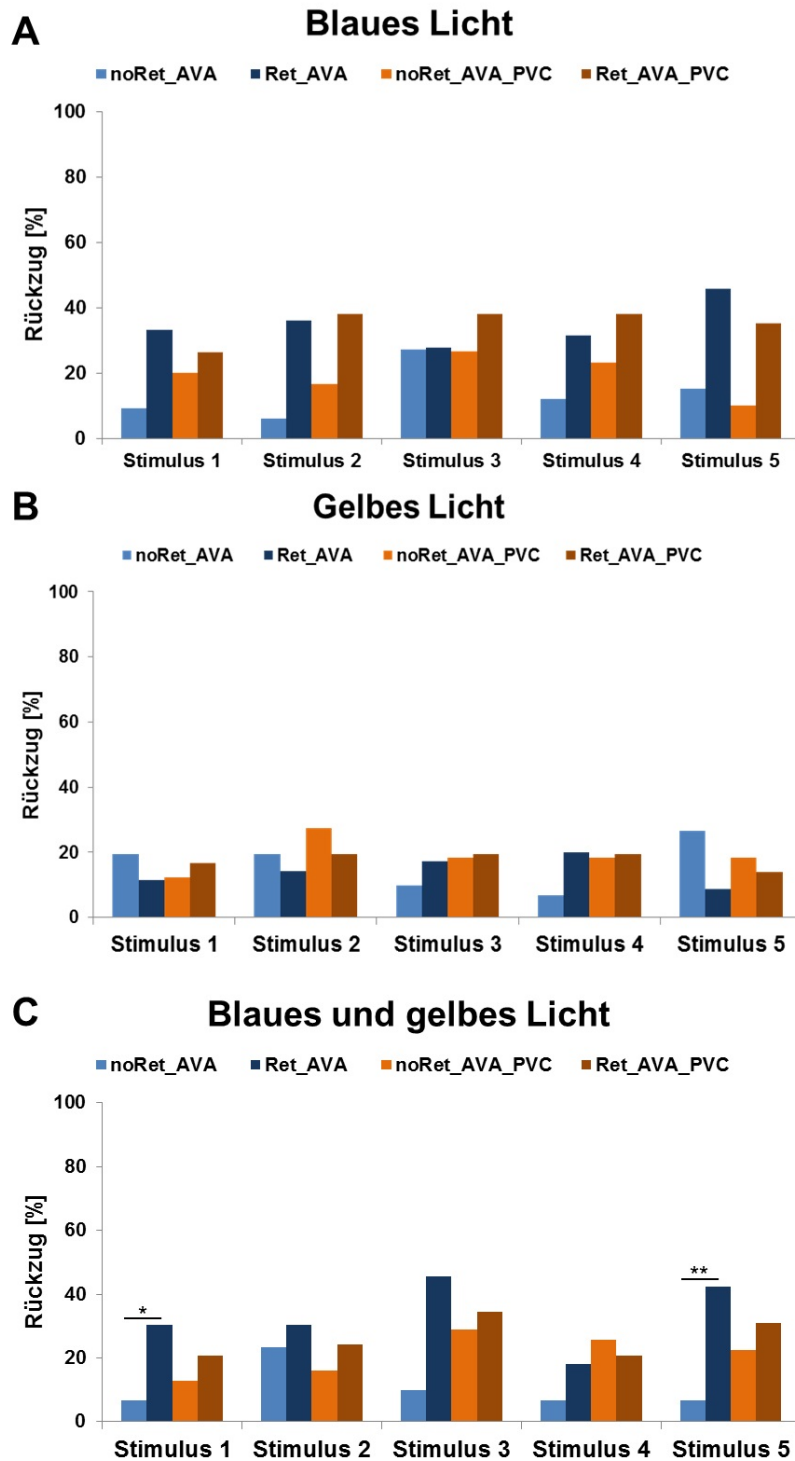


Abbildung 37: Anzahl der auf wiederholte Beleuchtung reagierenden Tiere [%]. Getestete Linien sind AVA[C] int (AVA) und AVA[C] int. + *pglr-1::NpHR* (AVA_PVC), sowohl mit als auch ohne Retinal kultiviert. Parameter: 470 nm, 2 s, 1,7 mw/mm² (blaues Licht); 560 nm, 2 s, 2,4 mw/mm² (gelbes Licht) ISI=10 s; 5 Wiederholungen. Statistik: Chi²-Test.

3.4. Einfluss von zusätzlicher AVD-Aktivierung auf AVA

Da die Reizweiterleitung von den mechanosensorischen Neuronen ALM und AVM via des Interneuronenpaares AVD zu AVA erfolgt (Referenz: Abbildung aus der Einleitung) ist auch AVD ein guter Kandidat zur Modulation von AVA. Zur näheren Untersuchung der Rolle von AVD wurden auch hier wieder Konstrukte zur zellspezifischen Expression von Chr2-HR entwickelt (Abb.: 38).

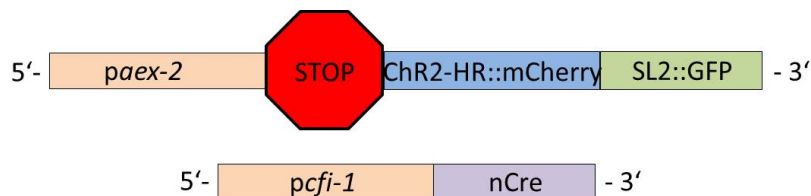


Abbildung 38: Genetische Konstrukte zur zellspezifischen Expression von Chr2-HR in AVD.

Hier wurde das Promotorpaar *paex-2/pcf1-1* verwendet. Analog zu der zellspezifischen Expression von Chr2-HR in AVA wurde auch hier ein Chr2::mcherry Fusionsprotein, sowie ein zusätzlich bicistronisch exprimiertes lösliches GFP verwendet, um die Expression sichtbar zu machen und die Lokalisation bestimmen zu können (Abb.: 39). Bei *aex-2* handelt es sich um ein Gen für einen G-Protein gekoppelten Rezeptor. Expression findet in den Interneuronen des Nervenrings statt (Mahoney u. a. (2008)). CFI-1 ist ein DNA-Bindeprotein, welches in drei Neuronen des ventralen Nervenstrangs, sowie AVD, IL2, LUA, PVC, URA und Muskelzellen exprimiert wird (Shaham u. Bargmann (2002)). Anders als erhofft, ist das bicistronisch exprimierte GFP in einem Großteil der Zellen des Nervenrings zu sehen und das Expressionsmuster entspricht in etwas dem von *paex-2* (Mahoney u. a. (2008)). Doch die Chr2::mCherry-Expression fällt deutlich geringer aus und ist lediglich in den Neuronen AVD (Kopf) und PVC (Schwanz) zu sehen. Somit konnte mit dem beschriebenen Promotorpaar keine zellspezifische Expression von Chr2-HR erreicht werden. Da jedoch Chr2::mCherry in nachweisbarer Menge im Kopf lediglich in AVD zu finden ist, konnten Experimente mit sequenzieller Beleuchtung durchgeführt werden (Abb.: 40).

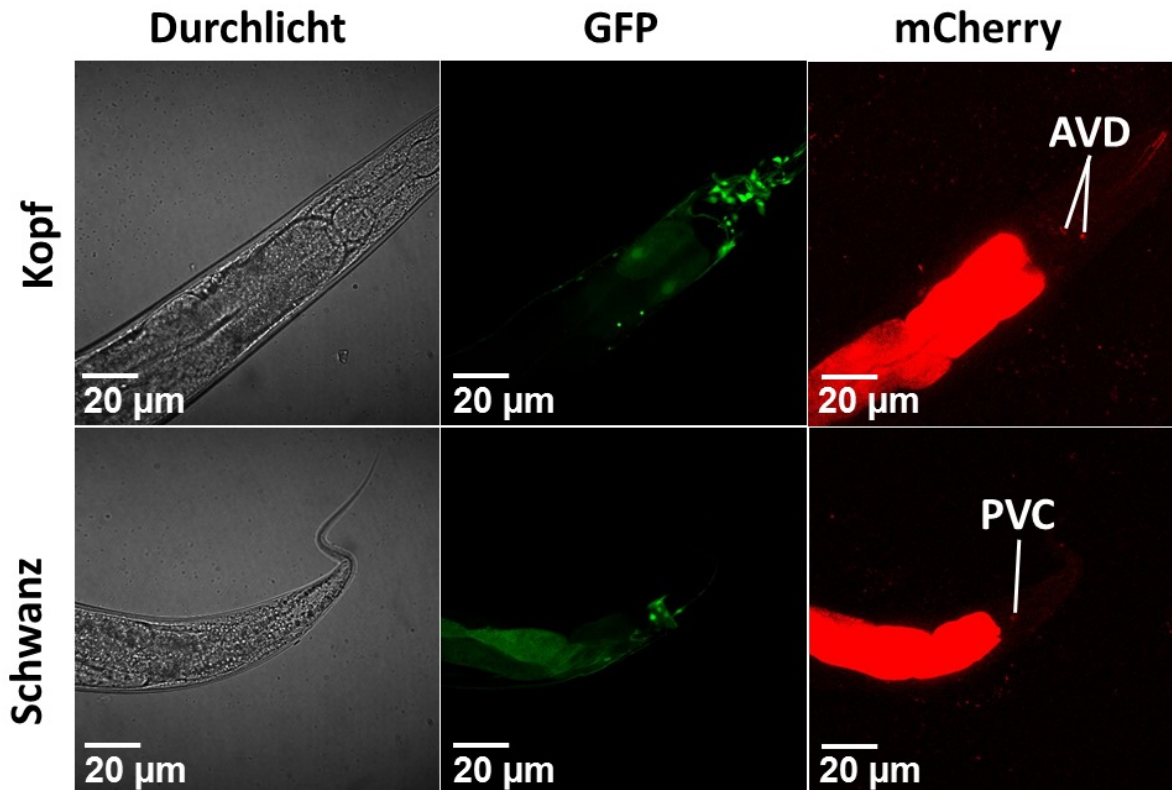


Abbildung 39: Konfokalmikroskopische Aufnahme der zur zellspezifischen Expression von Chr2-HR hergestellten Linie zx1643. Gezeigt sind drei Kanäle: Durchlicht sowie GFP und mCherry Fluoreszenz.

Gezeigt ist hier die Reaktion der Linien AVA[C] int. (zx1023), AVD (zx1643) und AVA[C] int. + AVD (zx1644) (AVA_AV D), sowie *lite-1* (zx399) (Negativkontrolle) auf Beleuchtung der vorderen Hälfte mit blauem Licht (Abb.: 40 oben). Tendenziell reagiert die Linie AVA_AV D, mit Werten zwischen 37 % und 57 % reagierenden Tieren, am stärksten auf das blaue Licht. Für AVA ist eine Tendenz zur Sensibilisierung zu sehen zwischen dem 2. und 3. Lichtpuls, hier steigt die Reaktion der Tiere von 12 % auf 50 % an. Jedoch konnte weder zwischen den einzelnen Linien, noch zwischen den verschiedenen Lichtpulsen ein statistisch signifikanter Unterschied gezeigt werden.

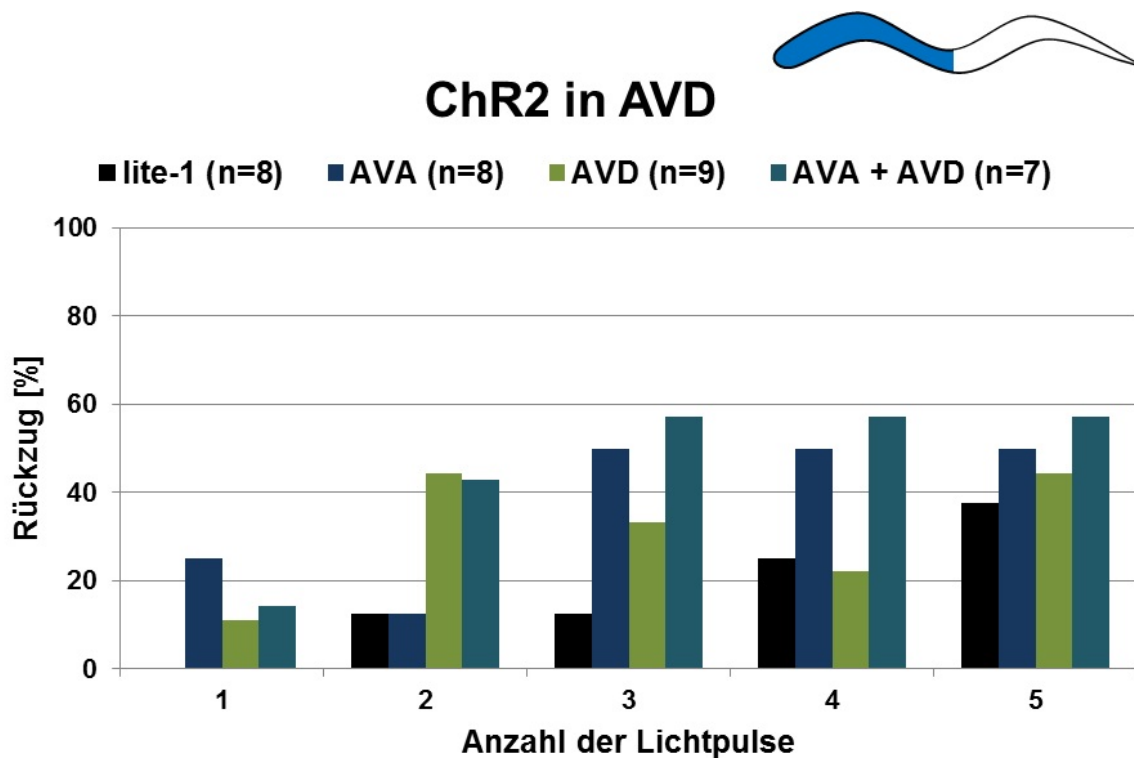


Abbildung 40: Anzahl der auf wiederholte Beleuchtung reagierenden Tiere [%]. Getestete Linien sind AVA[C] int. (zx1023), AVD (zx1643) und AVA[C] int. + AVD (zx1644), sowie *lite-1* (zx399) als Negativkontrolle. Parameter: 470 nm, 2 s, 1,7 mw/mm²; ISI=10 s; 5 Wiederholungen. Statistik: Chi²-Test.

Ebenfalls interessant wäre in diesem Zusammenhang die Reaktion der Tiere auf eine Stimulation von AVA während gleichzeitiger Inhibition von AVD mittels NpHR. Es wurden mehrere Linien mit entsprechenden Transgenen (Abb.: 41) kreiert, es konnte jedoch im Rahmen dieser Arbeit keine nachweisbare NpHR::CFP Expression in AVD erreicht werden.

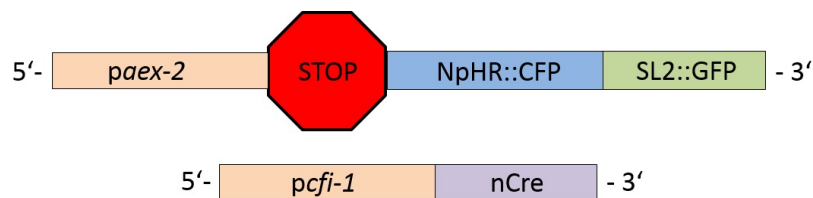


Abbildung 41: Genetische Konstrukte zur zellspezifischen Expression von NpHR in AVD.

4. Verwendung der Chr2 Variante HR/TC führt zu ähnlichen Lichtreaktionen bei verbesserter natürlicher Mechanorezeption

Wie in Abbildung 42 zu sehen ist, reagiert die Linie *p_{mec-4}::Chr2-HR* (Chr2 in den MRNs) sehr gut auf blaues Licht, jedoch kaum mehr auf den natürlichen Stimulus, was daran liegen könnte, dass Transkriptionsfaktoren, welche von der Zelle zur Herstellung des Chr2-HR verwendet werden, nicht zeitgleich zur Verfügung stehen um auch den Mechanorezeptor Mec-4 in ausreichender Menge bilden zu können (persönliche Konversation mit Cathrin Rankin und Evan Adriel).

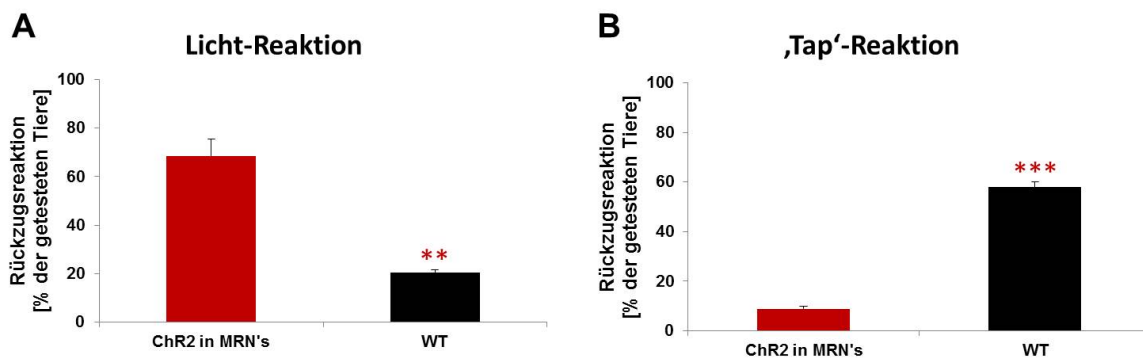


Abbildung 42: Vergleich der Reaktionen der Linien mit Chr2-HR Expression in den MRNs (AQ2334), ASH[C] (AQ2235) und AVA[C] (integriert) (ZX1023) auf Licht (A) und Tap (= durch kräftiges Antippen der Platte ausgelöste Vibration) (B). Statistik: ANOVA mit anschließendem Tukey Test; Verwendetes Programm: PAST3.

Um nach Möglichkeit eine Linie zu erhalten, die sowohl sehr gut auf den Lichtreiz des Chr2, als auch auf die natürliche Stimulation der Mechanorezeptoren reagiert, wurde ein neues Plasmid kloniert, welches zu einer Expression der doppelt mutierten Channelrhodopsin2-Variante H134R T159C (im Folgenden Chr2-HR/TC genannt) führt. Chr2-HR/TC wird effizienter exprimiert und in die Membran eingebaut, als die einfach mutierte Variante Chr2-HR (Erbguth u. a. (2012)). Dies sollte es ermöglichen, bei geringerer Menge an eingebrachter DNA und somit weniger Sequestrierung der Transkriptionsfaktoren, dennoch eine gute Photostimulation der Tiere zu erreichen (Abb.: 43).

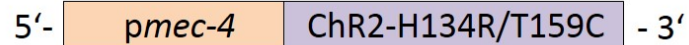


Abbildung 43: Schematische Darstellung des zur Expression von ChR2HRTC in den mechanosensorischen Neuronen klonierten genetischen Konstruktes.

Das genetische Konstrukt wurde in verschiedenen Konzentrationen injiziert, um eine Konzentration zu finden, bei der bereits eine gute Lichtreaktion, jedoch auch immer noch eine gute mechanosensorische Reaktion zu finden ist. Bei dem Vergleich dieser Linien ist wieder deutlich zu sehen, dass die Linie *pmec-4::ChR2-HR* (80 ngDNA/ μ l) (ChR2 in den MNR's) nicht dazu in der Lage ist auf den natürlichen Stimulus zu reagieren (Abb.: 44). Die ChR2-HR/TC Linien hingegen reagieren alle signifikant stärker auf den natürlichen Reiz. Die stärkste Reaktion sowohl auf Licht, als auch auf Tap wurde von der mit 20 ngDNA/ μ l injizierten Linie *pmec-4::ChR2-HR/TC_20ngA* (zx1638) erreicht.

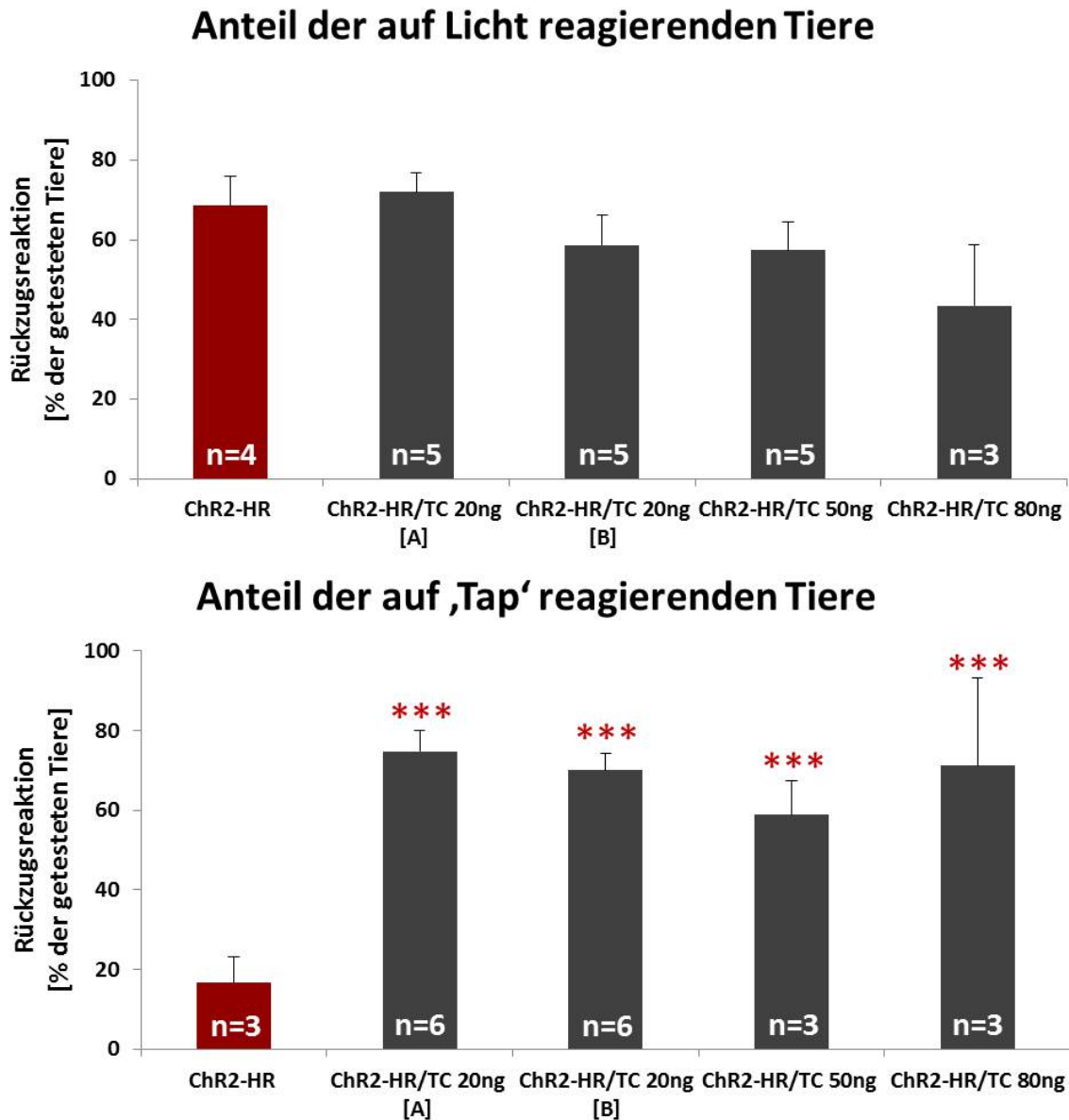


Abbildung 44: Reaktion der Linien mit verschiedenen Injektionskonzentrationen von *pmec-4::Chr2-HR/TC* auf blaues Licht (A) und Tap (B). Als Kontrolle wurde die Linie *pmec-4::Chr2-HR* (AQ2334) verwendet. Parameter: 470 nm, 1 s, 0,6 mw/mm². Experiment wurde im Rahmen eines Arbeitskreis-Praktikums von Stefanie Fischer durchgeführt. Statistik: ANOVA mit Tukey-Test; Verwendetes Programm: Past3

Diese Linie wurde im Anschluss auch auf eine Habituation des Fluchtreflexes getestet (Abb.: 45). Während der ersten 5 Stimuli ist ein signifikanter Rückgang der mit einem Fluchtreflex reagierenden Tiere zu beobachten (von 70 % bis zu 23 %).

Jedoch steigt die Anzahl der reagierenden Tiere im Verlaufe des Experiments wieder bis zum Ausgangsniveau an, welches ab dem 17. Stimulus erneut erreicht wird. Im Gegensatz dazu zeigt die parallel getestete Positivkontrolle (Chr2-HR in MRNs) einen langsameren, aber kontinuierlichen Rückgang der Reaktion. Somit zeigt die neu entwickelte Linie zwar eine gute Reaktion sowohl auf Licht, als auch auf den natürlichen Stimulus, ist jedoch für die Untersuchung der Habituation nicht als Positivkontrolle geeignet.

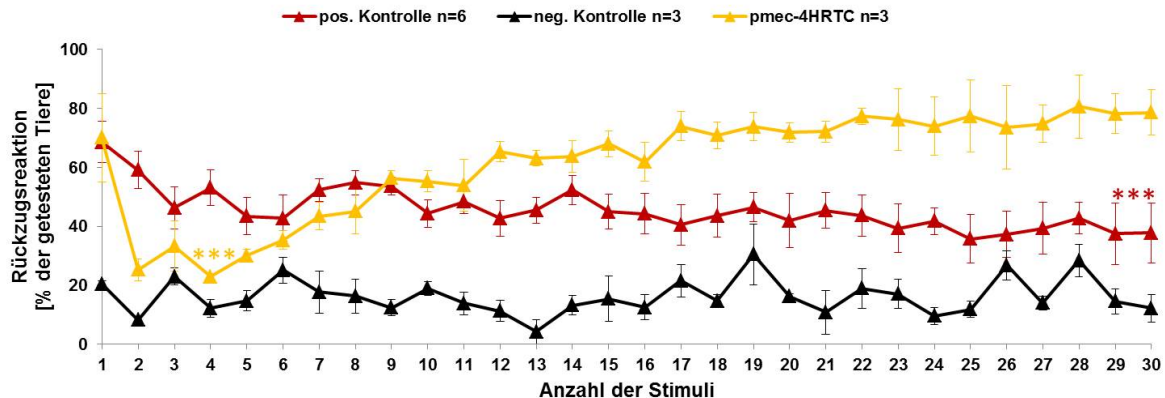


Abbildung 45: Test auf Habituation der Linie mit Chr2-HR/TC in den MNR's. Verwendete Linien waren Chr2-HR/TC in den MNRs (ZX1638) sowie eine Linie welche Chr2-HR in den MRNs exprimiert (AQ2334) (pos. Kontrolle) und der Wildtyp (ZX399) (neg. Kontrolle). Alle getesteten Linien tragen den *lite-1*-Hintergrund. Durchgeführt wurden die Experimente am MWT und die Reaktion wurde von dem eigens dafür entwickelten Computerprogramm 'MWT' gemessen und mit dem Programm 'Choreography' analysiert. Parameter: 470 nm, 700 ms, 0,6 mW/mm²; ISI=10 s; 30 Wiederholungen. Statistik: ANOVA mit anschließendem Tukey Test; Verwendetes Programm: PAST3. (*) Zeigt den Unterschied zwischen dem ersten und dem jeweils markierten Stimulus.

Teil IV. Diskussion

1. Zellspezifische Expression optogenetischer Werkzeuge

Wie beschrieben eignet sich die Optogenetik sehr gut als Hilfsmittel zur Untersuchung neuronaler Zusammenhänge bei *C. elegans*. Hierfür müssen die entsprechenden optisch aktivierbaren Proteine (hier ChR2-HR und NpHR) spezifisch in den zu untersuchenden Neuronen exprimiert werden. Die meisten Gen-Promotoren, welche man für eine zielgerichtete künstliche Expression verwenden kann, sind nicht in einzelnen Neuronen sondern meist in Gruppen von Zellen aktiv. So musste ein Weg gefunden werden die angesteuerten Zellen weiter einzugrenzen. Durch Expressionstudien kann gezeigt werden welche Zellen von einem bestimmten Promoter angesteuert werden. So konnten oftmals Kombinationen aus zwei Promotoren gefunden werden die gemeinsam nur in jeweils einer Zelle aktiv sind (Abb.: 46).

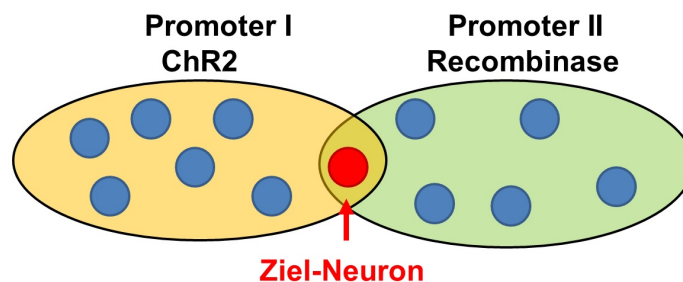


Abbildung 46: Die Verwendung zweier verschiedener Promotoren, die lediglich in einer Zelle gleichzeitig aktiv sind kann zu einer zellspezifischen Expression führen (Schmitt u. a. (2012)).

Um auch tatsächlich eine Expression nur dort zu erreichen, wo beide Promotoren gleichzeitig aktiv sind wurden zwei verschiedene Konzepte entwickelt. Das Erste beruht auf der Verwendung einer sequenzspezifischen DNA-Rekombinase (zb. Cre-Rekombinase, FLP-Rekombinase). Bei DNA-Rekombinasen handelt es sich um Enzyme die dazu in der Lage sind die DNA zu schneiden und neu zu kombinieren. Ein von zwei bestimmten Erkennungssequenzen flankiertes DNA-Segment wird von der Rekombinase, je nach Orientierung der Erkennungssequenzen, entweder voll-

ständig ausgeschnitten, oder entgegengesetzt wieder eingebaut (Hoess u. a. (1984)). Um hier zu dem gewünschten Ergebnis einer zellspezifischen Expression der optogenetischen Werkzeuge ChR2-HR oder NpHR zu gelangen werden 2 genetische Konstrukte benötigt.

Das Erste beinhaltet einen der beiden Promotoren (Promotor I), eine von den Erkennungssequenzen flankierte Stop-Sequenz, die die Expression unterbindet und die Gene der zu exprimierenden Proteine. Meist handelt es sich dabei um das entsprechende optogenetische Werkzeug, welches mit einem fluoreszierenden Protein fusioniert ist um die Expression sichtbar zu machen. In dieser Arbeit wurde im Falle der Expression von ChR2-HR zusätzlich zu dem fusionierten mCherry Protein noch ein weiteres Fluoreszenzprotein (GFP) verwendet. GFP wird bicistronisch und damit löslich exprimiert um seine Leuchtkraft zu steigern und damit die Sensitivität des Systems zu erhöhen (Evans u. Blumenthal (2000)).

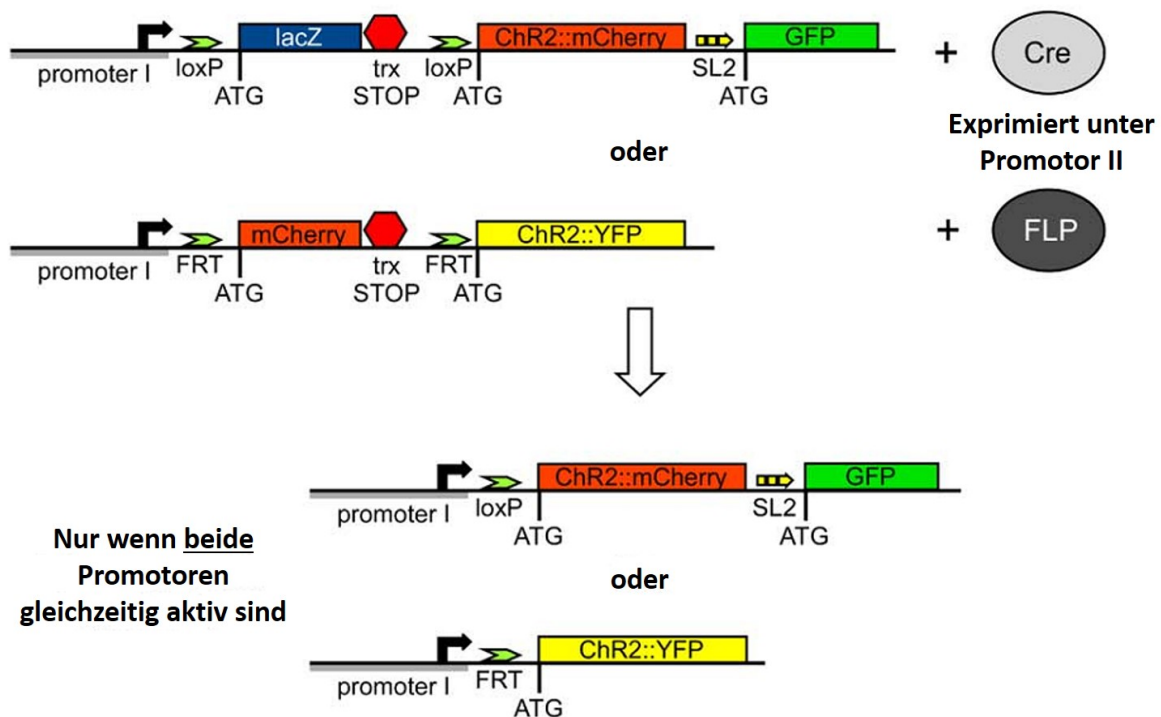


Abbildung 47: Schematische Darstellung der Funktion der beiden Rekombinasen Cre und FLP im Zusammenhang mit der zellspezifischen Proteinexpression unter Zuhilfenahme zweier Promotoren. Übernommen von Alexander Gottschalk (Schmitt u. a. (2012)).

Zur zellspezifischen Expression wurde im Rahmen dieser Arbeit die Cre-Rekombinase verwendet und sowohl für das Zellpaar ASH, als auch für das Zellpaar AVA verschiedene Promotorkombinationen getestet. Eine erfolgreiche zellspezifische Expression von Chr2-HR (sowie von TeTX und der *unc-7RNAi*) in AVA konnte mit dem Promotorpaar *pflp-18* und *pgpa-14* erreicht werden. Die in dieser Arbeit mit dem Cre-Lox-System getesteten Promotorkombinationen für ASH führten jedoch nicht zu einer zellspezifischen Expression. 2011 wurde jedoch von Marina Ezcurra eine *C. elegans* Linie publiziert welche mit Hilfe der FLP-Rekombinase hergestellt wurde und eine zellspezifische Expression von Chr2-HR in ASH aufweist (Promotoren: *psra-6* und *pgpa-13*). Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Linie mit Hilfe konfokalmikroskopischer Fluoreszenzaufnahmen charakterisiert und auf den Rückzugsreflex hin getestet. Aufgrund der hier dargestellten Ergebnisse kann gesagt werden, dass sowohl unter Verwendung der Cre-Rekombinase, als auch der FLP-Rekombinase eine zellspezifische Expression von Proteinen erreicht werden kann. Jedoch führt nicht jede Promotorkombination zu dem gewünschten Ergebnis. Hier liegt die Schwierigkeit des Systems. Die einzelnen getesteten Promotoren wurden anhand vergangener Expressionsstudien ausgewählt und es wurde in der Literatur gezielt nach eben solchen Kombinationen gesucht, die nur in einer einzelnen Zelle zu überlappen scheinen. Expressionsstudien beruhen auf verschiedenen Techniken. So kann das Expressionsmuster eines bestimmten Gens mit Hilfe von Antikörpern untersucht werden oder in dem die DNA-Sequenz des Promotor mit einem Fluoreszenzprotein gekoppelt wird, was zu einer löslichen Expression des Fluoreszenzproteins führt (Jansen u. a. (1999); Troemel u. a. (1997); Schwarz u. a. (2009)). Es gibt auch Studien wo das Fluoreszenzprotein fusioniert mit einem anderen Protein vorliegt, welches sowohl arteigen, als auch artfremd sein kann. Hier besteht die Schwierigkeit, dass eine Detektion der Fluoreszenz im Falle von membranständigen Proteinen deutlich schwieriger ist. Löslich vorliegende Fusionsproteine hingegen haben aufgrund der höheren Expression im Vergleich zu integralen Membranproteinen eine höhere Leuchtkraft und zeigen somit auch diejenigen Zellen auf, die ein verhältnismäßig geringes Expressionsniveau aufweisen (Ogawa u. a. (1995); Pines (1995); Gerdes u. Kaether (1996)). Es ist außerdem oftmals der Fall, dass in Expressionsstudien nur einzelne Ausschnitte des Wurms gezeigt werden oder die Aufnahmen sich auf eine Ebene beschränken. Auch so können Zellen übersehen werden. Ebenfalls denkbar ist, dass sich das Expressionsmuster abhängig von der spezifischen Länge der verwendeten Promotorsequenz und der Natur des eventuell fusionierten Proteins ändert. Auch Anzahl, Position und Aufbau der Introns

des ursprünglichen Proteins dessen Promotor verwendet wird können eine Rolle für die korrekte Expression spielen. Diese fehlen jedoch in den optogenetischen Werkzeugen, was zu einer Abweichung von dem erwarteten Expressionsmuster führen kann (Schmitt u. a. (2012)). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass es sehr schwer ist das genaue Expressionsmuster eines optogenetischen Werkzeugs vorherzusagen und noch nicht alle Steuerungsmechanismen einer korrekten Expression bekannt sind. Sinnvoll wäre es mögliche Promotorkombinationen im Vorfeld zu testen, z.B. mit Hilfe des Proteinsplitverfahrens, bei dem ein Fluoreszenzprotein in 2 Teile zerlegt wird und gesondert unter je einem Promotor exprimiert. Fluoreszenz ist dann nur in den Zellen zu beobachten, in denen die Promotoren überlappen (Zhang u. a. (2004)). Jedoch ist man auch dann nicht abgesichert dagegen, dass die unter dem jeweiligen Promotor exprimierten optischen Werkzeuge oder anderen Zielproteine Einfluss nehmen auf das Expressionsmuster (Schmitt u. a. (2012)). Es ist folglich mühsam und aufwändig die für den jeweiligen Fall richtige Kombination zu finden. Dies wird zusätzlich dadurch erschwert, dass die Konzentration der vorliegenden Rekombinase und weitere DNA-Manipulationen (z.B. Integration der extrachromosomalen DNA) das Expressionsmuster ebenfalls verändern können. Im Fall der Linie AVA[C], bei welcher im Anschluss an die Charakterisierung das vorliegende Transgen in die chromosomale DNA integriert wurde, fand ich im Anschluss an die Integration eine Fluoreszenz des bicistronisch exprimierten GFPs in einem zusätzlichen Zellpaar (RIG). Die Fluoreszenz des fusionierten Chr2-HR_mcherry in RIG ist jedoch nur sehr schwach. Des Weiteren konnte mittels lokal begrenzter Beleuchtung gezeigt werden, dass Bestrahlung von RIG durch blaues Licht nicht zu merklichen Verhaltensreaktionen führt. Die nach der Integration beobachtete zusätzliche Chr2-HR Expression ist also vernachlässigbar und die Linie konnte als Modell für eine AVA spezifische Chr2-HR Expression verwendet werden. Die Arbeit von Christian Schultheis mit dem FLP-Rekombinase-System lassen annehmen (Schmitt u. a. (2012)), dass es für eine erfolgreiche zellspezifische Expression auch wichtig ist, welcher Promotor für die Expression des optogenetischen Werkzeuges bzw. der Rekombinase verwendet wird. Es scheint sinnvoll den stärker exprimierenden Promotor mit dem Zielprotein und den schwächeren mit der Rekombinase zu verbinden. Von der enzymatisch wirksamen Rekombinase werden deutlich geringere Mengen benötigt, da ein einzelnes Molekül dazu in der Lage ist eine große Anzahl an DNA-Molekülen zu rekombinieren (Schmitt u. a. (2012)). Wenn jedoch für einzelne Zielzellen spezifische Promotorkombinationen gefunden werden konnten erweist sich die Verwendung von Rekombinasen zur

zellspezifischen Expression von optogenetischen Tools als sehr wirkungsvoll.

2. Zelluläre Lokalisierung der Kurzzeithabituation des Rückzugsreflexes

Diese Arbeit ging unter anderem der Frage nach, welche Neurone an der Speicherung der mechanosensorischen Kurzzeithabituation beteiligt sind. Hierfür wurde ChR2-HR in verschiedene Nervenzellen eingebracht, die Teil des neuronalen Netzwerkes sind, das für eine Fluchtreaktion verantwortlich ist. Die MRNs, sowie ASH (sensorischer Nozizeptor) und AVA (Interneuron) wurden auf Kurzzeithabituation getestet. Hierbei kamen sowohl manuelle, von mir protokollierte, als auch computergestützte Messungen zum Einsatz.

2.1. Manuelle vs. computergestützte Messungen

Um schnell und unkompliziert mit den zur Verfügung stehenden Mitteln erste Tests der verschiedenen transgenen Linien durchzuführen wurde eine manuelle Messmethode verwendet. Hierbei lässt sich jedoch immer nur ein Tier auf einmal beobachten und die Protokollierung obliegt den Entscheidungen des Experimentators. Um möglichst objektive Daten zu erhalten und eine hohe Zahl von Tieren in angemessener Zeit messen zu können bieten sich hingegen computergestützte Verfahren an. In den letzten 10 Jahren wurden verschiedene 'Wurm-Trackingsysteme' entwickelt die den unterschiedlichsten Ansprüchen gerecht werden (Husson u. a. (2012b)). Zur Messung der Reaktion auf leichte Berührungen bzw. Erschütterungen eignet sich der von Nicolas Swierczek entwickelte MWT, der es ermöglicht verschiedene Stimuli zu applizieren (Swierczek u. a. (2011)). Ein Nachbau dieses Systems wurde im Rahmen dieser Arbeit in unserem Labor etabliert. Es bietet die Möglichkeit bis zu 80 Würmer sowohl mit Tap, als auch mit blauem Licht (460 nm) zu stimulieren und simultan die Positionsdaten dieser Tiere zu messen und aufzuzeichnen. Damit wurde die Möglichkeit geschaffen innerhalb kurzer Zeit viele objektive Daten zu erhalten, aus denen sowohl der Prozentsatz der auf den jeweiligen Stimulus reagierenden Würmer, als auch die zurückgelegte Distanz während der Reaktion abgeleitet werden konnte. Diese Messungen sind um einiges genauer, als die zuvor durchgeführten manuellen Experimente. Nachteil bei dieser Methode ist es jedoch, dass einzelne Tiere nur sehr schwer über den gesamten Zeitraum des Experimentes (hier 5 min)

verfolgt werden können. Der 'Tracker' verliert diese sobald ein weiteres Tier berührt oder der Rand der Kulturschale erreicht wird. Somit ist es mit diesem System nur möglich zum Zeitpunkt des jeweiligen Stimulus anzugeben, wie die aktuell gemessene Wurmpopulation reagiert. Einzelne sich über das Experiment hinweg atypisch verhaltende Tiere beispielsweise können hier nicht erkannt und eliminiert werden. Die Möglichkeit in kurzer Zeit einen großen Stichprobenumfang zu messen gleicht diesen Nachteil jedoch aus. Das System hat sich hier als sehr zweckmäßig erwiesen, insbesondere, da es möglich ist beide Stimuli innerhalb des selben Experimentes zu präsentieren. Eine Weiterentwicklung des MWT wurde von Takuma Sugi beschrieben. Hier können aktuell bis zu 9 Kulturschalen zur gleichen Zeit stimuliert und mit 4 an das System angeschlossenen Kameras entsprechend 4 Populationen live gemessen werden. Außerdem verfügt dieses System über die Möglichkeit transgene Tiere die einen fluoreszierenden Koinjektionsmarker tragen von nicht transgenen Tieren auf der selben Platte zu unterscheiden (Sugi u. a. (2014)). Das System von Sugi et al. präsentiert bisher nur einen Stimulus (Tap) und die zur Selektion transgener Tiere notwendige dauerhafte Beleuchtung der Platten macht es zusätzlich schwierig optogenetische Werkzeuge einzusetzen. Da Fluoreszenzproteine während längerer Beleuchtung ausbleichen wird es auch bei zunehmender Dauer des Experiments deutlich schwieriger die transgenen Tiere vom Wildtyp zu unterscheiden. Zwar ist es ein Vorteil auch nicht integrierte Linien ohne vorherige aufwendige Selektion stimulieren und messen zu können, jedoch weisen Tiere mit extrachromosomalem Transgen, im Gegensatz zu einem in das Genom integriertem Transgen, oftmals Mosaizismen oder unterschiedliche Expressionsniveaus auf. Somit ist der hier verwendete MWT das zur Zeit für diese Art der Anwendung am sinnvollsten nutzbare System.

2.2. Kurzzeithabituation in MRNs oder AVD

Während der beschriebenen Experimente wurden die Linien *p_{mec-4}::ChR2-HR* (ChR2-HR in den MRNs), *AVA[A]* (ChR2-HR in AVA und 8 weiteren Interneuronen), *AVA[C]* (funktionelles ChR2-HR nur in AVA), *psra-6::ChR2-HR* (ChR2-HR in ASH und weiteren sensorischen Neuronen) und *ASH[C]* (ChR2-HR nur in ASH) getestet. Es konnte eine Habituation für *p_{mec-4}::ChR2-HR* gezeigt werden, die mit der von Rankin beschriebenen Habituation des natürlichen Stimulus (Tap) übereinstimmt (Rankin u. Broster (1992)). Die Linie eignet sich somit zu Abbildung der natürlichen Gegeben-

heiten und als Positivkontrolle für Habituation. Ebenfalls konnte Habituation gezeigt werden für die Linie *psra-6* und eine Tendenz zur Habituation konnte ausgemacht werden bei der Linie *AVA[A]*. Anders als *psra-6::Chr2-HR* zeigt *ASH[C]* keine Habituation. Bei *ASH* handelt es sich um ein sensorisches Neuron, welches zusätzlich zur Wahrnehmung von starken Berührungsreizen auch die Anwesenheit schädlicher Chemikalien, sowie einen hohen osmotischen Druck detektiert (Kaplan u. Horvitz (1993)). Eine Habituation tritt gewöhnlich für harmlose Reize auf. Es ist also zu erwarten dass bei Reizung mechanosensorischer Zellen zur Detektion leichter Berührung, wie den MRNs, eine Habituation erfolgt, jedoch nicht bei der Reizung von Zellen, die für die Detektion potentiell tödlicher Gefahren verantwortlich sind. Eine Habituation solcher Zellen hätte sehr schädliche Folgen für den Organismus. Interessant ist jedoch, dass der Wurmstamm *psra-6::Chr2-HR* dazu in der Lage ist zu habituierten obwohl hier *ASH* gereizt wird. Der *sra-6* Promotor ist jedoch nicht nur in *ASH* aktiv, sondern auch in den Neuronen *ASI* und *PVQ*. Bei *ASI* handelt es sich um ein chemosensorisches Neuronenpaar, welches auf verschiedenen Interneuronen, aber auch auf *ASH* projiziert und damit Teil des neuronalen Netzwerks für den Rückzugsreflex ist (White u. a. (1986)). Eine Reizung der *ASH* Neuronen alleine führt nicht zu einer Habituation des Rückzugsreflexes. Das hier beobachtete Verhalten ist also vermutlich durch die zusätzliche Reizung eines weiteren chemosensorischen Neurons bedingt. Jedoch wird im *psra-6::Chr2-HR* Stamm auch das Interneuronenpaar *PVQ* gereizt. *PVQ* projiziert seine Informationen auf *AVB* und ist somit Teil des für eine vorwärts gerichtete Fluchtbewegung verantwortlichen Netzwerkes (Abb.: 48). Die Interneuronen welche eine Vorwärtsbewegung vermitteln stehen in Konkurrenz zu *AVA*, *AVD* und *AVE*, die für eine Rückwärtsbewegung verantwortlich sind. Somit könnten Interaktionen dieser beiden Netzwerke stromabwärts von *ASH* die Habituation der Linie *psra-6::Chr2-HR* erklären. Die Linie *AVA[A]* exprimiert *Chr2-HR* zusätzlich zu *AVA* noch in vermutlich 8 weiteren Neuronen, deren Zellkörper im Nervenring lokalisiert sind. In Frage kommen hierfür *AIB*, *AVB*, *AVD*, *AVE*, *AVJ*, *RIM*, *RMD* und *SMD*, da diese Neuronen im Nervenring liegen und der zur *Chr2-HR* Expression verwendete *glr-1* Promotor dort aktiv ist. *AVD* und *AVE* sind Teil des rückwärts gerichteten Fluchtreflex, *AVB* gehört zum vorwärts gerichteten Fluchtreflex. Die beobachtete Tendenz zur Habituation in der Linie *AVA[A]* könnte auf Ebene der vorgeschalteten Interneuronen *AVD* und *AVE* stattfinden oder auch durch eine Wechselwirkung mit *AVB* (Chalfie u. a. (1985); Zheng u. a. (1999)).

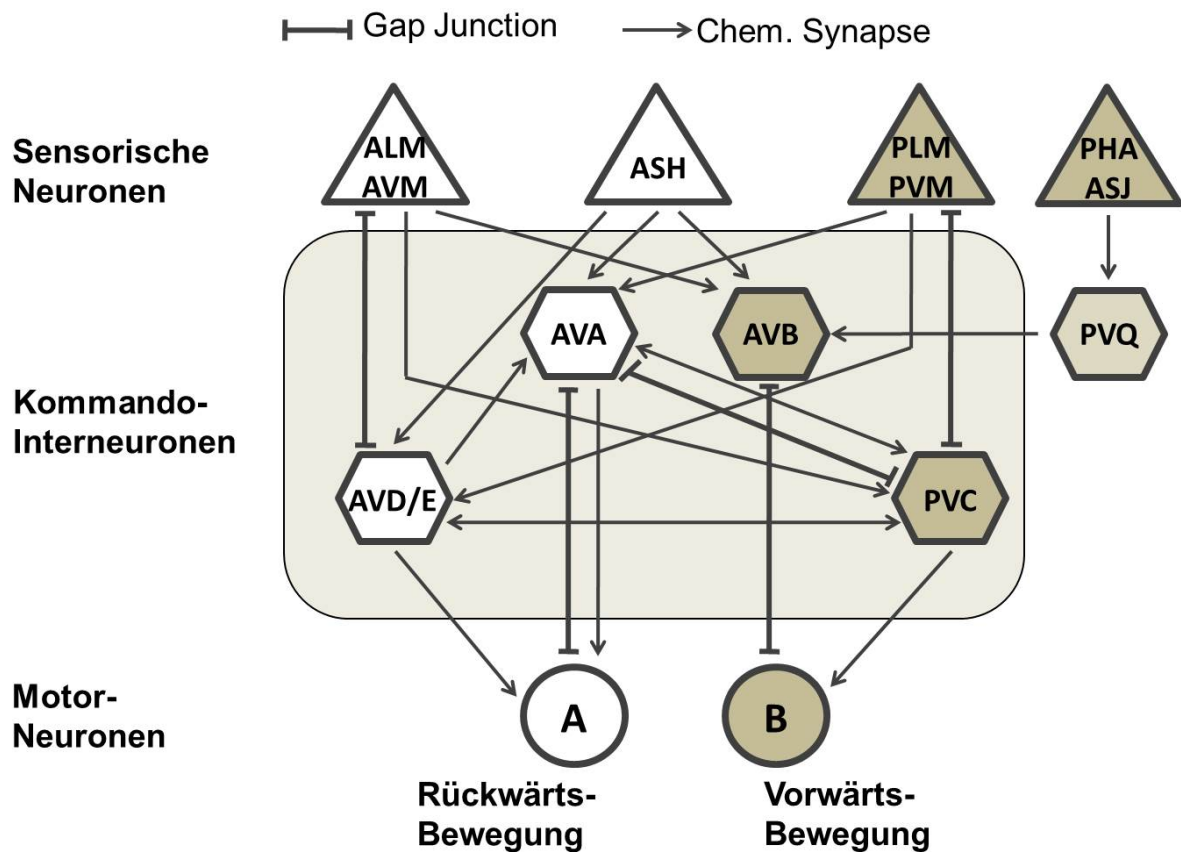


Abbildung 48: Schematische Darstellung der Zellen welche an der Reizverarbeitung leichter Berührungen beteiligt sind. Weiß: Zellen die für eine Rückwärtsbewegung verantwortlich sind. Beige: Zellen die für eine Vorwärtsbewegung verantwortlich sind. Sensorische Zellen sind dreieckig, Interneurone sechseckig und Motorneuronen rund dargestellt. Ergänzt durch PVQ. Übernommen von Zheng u. a. (1999).

Die Linie AVA[C] zeigt keine Kurzzeithabituation. Dies weist darauf hin, dass die zu einer Habituation führenden molekularen Veränderungen in den Nervenzellen oberhalb von AVA stattfinden. Im Fall von leichten Berührungen sind das die MRNs und AVD. In genetischen Studien konnte nachgewiesen werden, dass die, unter anderem, in den MRNs exprimierten Proteine EAT-4 und MPS-1 eine Rolle spielen im Zusammenhang mit der Kurzzeithabituation. Bei EAT-4 handelt es sich um einen vesikulären Glutamattransporter, welcher für das Beladen der präsynaptischen Vesikel mit dem Neurotransmitter Glutamat zuständig ist (Lee u. a. (1999)). Eine

'losts-of-function'-Mutation dieses Transporters führt zu einer deutlich schnelleren Habituation, was darauf hinweist, dass eine Modulation der präsynaptisch bereit gestellten Glutamatmenge durchaus ein die Habituation bestimmender Mechanismus sein kann (Rankin (2000)). Bei MPS-1 handelt es sich um eine Untereinheit eines Kaliumkanals. Gemeinsam mit KHT-1 wird es in den MRNs ALM und PLM exprimiert. Der Fluchtreflex als Antwort auf leichte Berührungen ist in MPS-1 'losts-of-function' Mutationen gestört. Dieser Effekt kann gerettet werden mit einer MRN spezifischen MPS-1 Expression. Interessant ist, dass die MRN spezifische Expression von MPS-1 ohne intakte Kinasedomäne zwar wieder zu einer Fluchtreaktion führt, aber die Habituation diese Reizes deutlich verlangsamt wird (Cai u. a. (2009)). Zusätzlich zu einer veränderten Glutamatausschüttung spielt also auch die durch wiederholte Reizung ausgelöste Phosphorylierung der in den MRNs exprimierten Kaliumkanäle eine Rolle. Dies legt nahe, dass durch Reizung der Mechanorezeptoren die Kaliumkanäle aktiviert werden, jedoch im Laufe der Gewöhnung an den Reiz durch Phosphorylierung wieder inaktiviert. All dies deutet in Einklang mit den in dieser Arbeit erhaltenen Resultaten darauf hin, dass der Mechanismus für eine Kurzzeithabituation in den MRNs zu finden ist. Erste Experimente zu einer Kreuzhabituation zwischen MRNs und AVA zeigten jedoch dass im Anschluss an eine Habituation des natürlichen mechanischen Stimulus auch die Anzahl der auf Reizung von AVA reagierenden Tiere zurück geht (siehe Anhang Abb.: 52). Obwohl die Ergebnisse hier nicht statistisch signifikant sind kann dies darauf hindeuten, dass auch in AVA eine Gedächtnisspeicherung statt findet. Ebenfalls gibt es Hinweise darauf, dass molekulare Veränderungen, die zu einem Langzeitgedächtnis führen (Habituation ist noch nach 24h nachweisbar) zusätzlich zu den MRNs auch in AVA stattfinden. Timbers und Rankin untersuchten die Rolle des von cAMP aktivierten Transkriptionsfaktor bindenden Proteins CRH-1 (in Säugern CREB-1) im Zusammenhang mit Langzeithabituation (Timbers u. Rankin (2011)). In Säugern wird CREB-1 von dem sekundären Botenstoff cAMP aktiviert um seinerseits Transkriptionsfaktoren zu aktivieren die zu einer Neubildung von für ein Langzeitgedächtnis notwendigen Proteinen führen (Kaang u. a. (1993); Yin u. a. (1994)). Zellspezifisches Ausschalten von CRH-1 in den Zellen AVD und AVA führte zu einer Störung des Langzeitgedächtnisses. Intakt blieb das Gedächtnis jedoch wenn CRH-1 in nur einer der beiden Zellen ausgeschaltet war. AVD und AVA scheinen zur Bildung des Langzeitgedächtnisses eine redundante Rolle einzunehmen (Sugi u. a. (2014)). In diesem Zusammenhang ist es sehr interessant zukünftig auch Experimente zur Langzeithabituation mit der hier getesteten Linie

AVA[C] durchzuführen, um zu überprüfen, ob sich die Rolle, die molekulare Vorgänge in AVA bei der Ausbildung eines Langzeitgedächtnisses spielt, ebenfalls im Verhalten abbilden lässt. Eine denkbare Versuchsanordnung wäre es durch wiederholte Gabe des natürlichen Stimulus eine Langzeithabituation des Rückzugsreflexes zu erreichen und im Anschluss die Reaktion der Tiere auf alleinige Reizung von AVA zu testen. Der Mechanismus der zu einer CRH-1 Phosphorylierung führt ist bisher noch ungeklärt. Denkbar ist jedoch, dass durch das wiederholte Training (Langzeittraining umfasst 4 Trainingseinheit mit jeweils 30 Stimuli) eine Schwelle überschritten wird, die dann die cAMP Ausschüttung bedingt. Wenn AVA eine Rolle zur Speicherung des Langzeitgedächtnisses führt müssen umgekehrt bei der Reizung von Neuronen, die schädliche Reize detektieren und ebenfalls einen Rückzugsreflex initiieren (zB. ASH) Mechanismen in Gang gesetzt werden die diesen Prozess unterbinden. Die in dieser Arbeit gezeigte Möglichkeit der zellspezifischen Expression optogenetischer Werkzeuge birgt das Potential solche, mittels genetischer Studien ermittelte Erkenntnisse auch auf der Verhaltensebene abzubilden.

3. Modulation von AVA

3.1. Unterbrechung der Reizweiterleitung

Innerhalb des Netzwerkes für den Fluchtreflex ist AVA sowohl über chemische Synapsen, als auch über 'Gap-Junctions' mit den exzitatorischen Motorneuronen der DA/VA-Klasse verbunden (Chalfie u. a. (1985)). Des Weiteren besteht eine synaptische Verbindung zwischen AVA und AVD (beidseitig), sowie Synapsen (beidseitig) und 'Gap-Junctions' zwischen AVA und PVC (Abb.: 48). In dieser Arbeit habe ich sowohl die chemischen, als auch elektrischen Verbindungen die AVA nachgeschaltet sind, unterbrochen. Hier konnte gezeigt werden, dass eine Unterbrechung der AVA nachgeschalteten 'Gap-Junctions' via *unc-7* RNAi spezifisch in AVA zu signifikant mehr reagierenden Tieren auf AVA Stimulation als beim Wildtyp (Linie AVA[C]) führt. Die zurückgelegte Distanz wird jedoch davon nicht beeinflusst. Auch die Vorwärtsbewegung erscheint normal. Bei einer Unterbrechung der chemischen Synapsen hingegen konnten keine signifikanten Unterschiede zum Wildtyp gefunden werden.

'Gap-Junctions' zwischen den Prämotorinterneuronen (AVA, AVB, AVD, AVE und PVC) werden heteromer von den Innexinen UNC-7 und UNC-9 gebildet (Starich u. a.

(2009)). 'Loss-of-function' Mutationen eines dieser beiden Proteine führen zu einem unkoordiniertem Phänotyp ('Kinker'), der nicht dazu in der Lage sich über längere Strecken hinweg in der *C. elegans* typischen Wellenform vorwärts zu bewegen. Die Rückwärtsbewegung hingegen ist kaum eingeschränkt. Somit bewegen sich diese Tiere deutlich mehr rückwärts als vorwärts (Brenner (1974); Kawano u. a. (2011)). Die Störung der 'Gap-Junctions' zwischen Prämotor- und Motorneuronen ist dafür verantwortlich. Insbesondere die Verbindung zwischen AVA und den A-Klasse Motorneuronen konnte als wichtig für eine koordinierte Vorwärtsbewegung identifiziert werden (Kawano u. a. (2011)). Da jedoch eine spezifische Unterbrechung der AVA-A-Verbindung keine Einschränkung der Vorwärtsbewegung zur Folge hat sind auf jeden Fall noch andere Verbindungen für eine koordinierte Vorwärtsbewegung wichtig. Vermutlich kommt vor allem die AVE-A-Verbindung, welche in unserem Versuch ja nicht unterbrochen ist, als Kandidat in Frage. Kalzium-'Imaging'-Experimente haben gezeigt, dass AVA und AVE bei der Bewegung simultan aktiv (rückwärts) oder inaktiv (vorwärts) sind. Bei Störung der elektrischen Verbindung zwischen AVA und den Klasse-A Motorneuronen kommt es jedoch zu einer Hyperaktivierung der chemischen Synapsen zwischen diesen beiden Zelltypen (Kawano u. a. (2011)). Dies erklärt die hier gefundene stärkere Reaktion der Tiere auf Stimulation von AVA. *Unc-7* RNAi in AVA bedingt jedoch auch eine Unterbrechung der 'Gap-Junctions' zwischen AVA und PVC (Chalfie u. a. (1985); Zheng u. a. (1999)). Es ist anzunehmen, dass sich diese beiden Neuronen im Wildtyp gegenseitig inhibieren können, damit es entweder zu einer Vorwärts- oder Rückwärtsbewegung kommt. Also wäre es auch denkbar, dass zusätzlich zu der oben beschriebenen Hyperaktivität die fehlende Rückkopplung von PVC die stärkere Reaktion bedingt.

Keine zum Wildtyp unterschiedliche Reaktion wurde bei der Unterbrechung der AVA nachgeschalteten chemischen Synapsen gefunden. Auch hier könnte die Verbindung von AVE zu den Klasse-A Motorneuronen für die weiterhin intakte Reaktion eine Rolle spielen. Dies führt zu der Annahme das AVA und AVE redundant sind. Jedoch konnte in Laser-Ablation-Experimenten gezeigt werden, dass die Zerstörung von AVA Rückwärtsbewegungen gänzlich verhindert nicht, aber die von AVE (Chalfie u. a. (1985); Piggott u. a. (2011)), was dagegen spricht dass AVE AVA vollständig ersetzen kann. Diese Ergebnisse beziehen sich aber lediglich auf spontane Rückwärtsbewegung und nicht auf von außen induziertes Fluchtverhalten. Das deutet darauf hin, dass das Zusammenspiel der Zellen in beiden Fällen unterschiedlich ist und AVE im

Fälle induzierter Rückwärtsbewegung eine größere Rolle zukommt als bei spontaner. Außerdem sind in dem hier vorliegenden Versuch nur die chemischen Synapsen von der Störung betroffen. Die 'Gap-Junctions' sind damit intakt. Zusätzlich dazu, dass die elektrische Verbindung, wie oben beschrieben, eine Hyperaktivierung der Klasse-A Motorneuronen durch chemische Synapsen verhindert, kann sie auch für deren Aktivierung verantwortlich sein.

3.2. Modulation durch andere Neurone

AVA spielt eine große Rolle als Hauptsignalgeber für die Initiation einer Rückwärtsbewegung und ist eingebettet in ein Netzwerk aus einer Vielzahl von Zellen (Zheng u. a. (1999); Piggott u. a. (2011)). Bei einer Stimulation der MRNs erfolgt die Reizweiterleitung beispielsweise nicht sofort zu den AVA Neuronen. Die Verbindung verläuft von ALM und AVM über AVD zu AVA (Zheng u. a. (1999)). Falls also eine Verhaltensmodulation oberhalb von AVA stattfindet ist auch AVD ein guter Kandidat dafür. Es konnte keine zellspezifische Expression von ChR2-HR in AVD erreicht werden. Deswegen wurden die Experimente zur Bestimmung der Rolle mit einem Trackingsystem durchgeführt das sequenzielle Beleuchtung erlaubt (Stirman u. a. (2011)). Leider konnten hier keine signifikanten Unterschiede zu den gemessenen Kontrollen erreicht werden.

Die Reaktion der Linie AVA[C] (ChR2-HR spezifisch in AVA) auf blaues Licht wurde mit dem MWT bei zwei verschiedenen Lichtintensitäten gemessen. Die Messung mit einer Blaulichtintensität von $0,02 \text{ mW/mm}^2$ zeigt eine deutliche Sensitisierung zwischen dem ersten und dem zweiten Stimulus (Abb.: 33). Um zu zeigen ob die Verbindung zwischen AVA und PVC Einfluss auf die Stärke der Reaktion auf die Stimulation von AVA hat wurde PVC mit Hilfe von NpHR inhibiert. Auch hier konnte bei einem Großteil der Experimente kein statistisch signifikanter Unterschied zur mitgeführten Negativkontrolle (die Linien ohne Retinal) gezeigt werden.

Da in beiden Fällen (AVD Stimulation und PVC Inhibition) keine spezifische Expression der verwendeten optogenetischen Werkzeuge stattfand wurden die Lichtreaktionen der Tiere mit dem SWT, der segmentierte Beleuchtung ermöglicht, gemessen. Die parallel zum Test des Systems gemessene Linie mit ChR2-HR in den MRNs zeigt eine sehr gute Reaktion; die Linien AVA[C] jedoch nicht. Da AVA[C] am MWT jedoch

deutlich auf blaues Licht reagierte scheint es hier ein Problem mit dem verwendeten System zu geben. Die Intensität liegt hier mit $1,7 \text{ mmW/mm}^2$ zwar höher als die am MWT Verwendeten (höchstens $0,6 \text{ mmW/mm}^2$), aber es scheint einen großen Unterschied zu machen, ob nur ein kleiner Teil des Wurms beleuchtet wird oder das ganze Tier bzw. die gesamte Platte. Eine Streuung des Lichtes durch das Nährmedium (NGM) könnte eine Verstärkung der Beleuchtung verursachen, was dazu führt das die tatsächliche Lichtausbeute im Falles des MWT deutlich höher ist als beim SWT. Es war im Rahmen dieses Projektes leider nicht mehr möglich Tiere mit zellspezifischer Expression von ChR2-HR in AVD bzw. NpHR in PVC herzustellen um eine Messung mit dem MWT möglich zu machen.

4. Verwendung der ChR2 Variante HR/TC führt zu ähnlichen Lichtreaktionen bei verbesserter natürlicher Mechanorezeption

Experimente mit Hilfe des MWT konnten zeigen, dass die hier als Positivkontrolle verwendete Linie AQ2334 (ChR2 in den Mechanorezeptorneuronen (MRNs)) nicht dazu in der Lage ist auf den natürlichen Stimulus in Form von Erschütterungen der Kulturschale (Tap) zu reagieren (Abb.: 42). Die Linie enthält das transgene DNA-Konstrukt *p_{mec-4}::ChR2-HR*. ChR2-HR wird also unter dem Promotor, welcher spezifisch ist für das Gen des Proteins MEC-4 exprimiert. Bei MEC-4 handelt es sich um eine Untereinheit, die zusammen mit MEC-10 dazu in der Lage ist den für die MRNs charakteristischen Mechanorezeptor zu bilden. Dieser Rezeptor ist dazu in der Lage leichte mechanosensorische Stimuli (z.B. Erschütterungen oder Berührungen) wahrzunehmen und den Reiz an die Nervenzelle weiterzuleiten, so dass es zu einer Depolarisation kommt und die Information an die Folgezellen des Netzwerkes übermittelt werden kann die schlussendlich den Fluchtreflex einleiten (Huang u. Chalfie (1994); Driscoll u. Chalfie (1991); Goodman u. a. (2002)). Im Fall der hier hergestellten transgenen Linie tritt der für die transgene DNA verwendete *mec-4* Promotor in Konkurrenz zu dem bereits vorhandenen Promotor, welcher für die rechtzeitige und ausreichende Expression der MEC-4 Mechanorezeptoruntereinheit verantwortlich ist. Die zur Genexpression notwendigen Transkriptionsfaktoren werden in benötigter Menge von der Zelle bereit gestellt (Kornberg (1996)). Wenn jedoch ein Promotor im Zellkern häufiger als natürlicherweise üblich vorliegt, könnten möglicherweise nicht mehr genügend Transkriptionsfaktoren vorhanden sein um alle Promotoren

zu bedienen. Da die transgenen DNA-Segmente zur optimalen Expression des gewünschten Zielproteins (hier Chr2-HR) in Tandems mit vielen Kopien vorliegen ist es gut denkbar, dass ein Großteil der vorhandenen Transkriptionsfaktoren an das Transgen gebunden wird und das eigentliche Gen, also MEC-4, nur in unzureichender Menge, oder auch gar nicht, exprimiert wird. Um eine Linie zu erhalten welche sowohl in der Lage ist 'normal' auf den natürlichen Reiz zu reagieren, als auch Chr2 in ausreichender Menge in den MRNs zu exprimieren muss dieses Problem umgangen werden. Zwei Strategien sind hierfür denkbar. Zum Einen die Verwendung eines anderen Promotors, welcher das selbe Expressionsmuster (MRNs) zeigt, jedoch für die Expression eines Gens verantwortlich ist, welches keine solch zentrale Rolle bei der Wahrnehmung des natürlichen Stimulus spielt bzw. nicht so empfindlich auf einen Mangel an Transkriptionsfaktoren reagiert. Zum Anderen kann man eine Chr2 Variante welche bereits bei einer deutlich geringeren Menge an exprimiertem Protein eine gute Reaktion der Zielneuronen auf Lichtstimulation hervorruft verwenden.

In dieser Arbeit wurde eine weitere Chr2 Variante getestet. Dabei handelt es sich um die Doppelmutante Chr2-HR/TC. Hierfür wurde in das bereits vorhandene Chr2-HR die zusätzliche Mutation T159C eingeführt. Das Threonin T159 befindet sich in der Retinalbindestelle und wurde hier durch ein Cystein ersetzt (Abb.: 49). Dies erhöht den Kationeneinstrom signifikant im Vergleich zu Wildtyp und auch zu der Chr2-HR Einzelmutante. Des weiteren konnte in Fluoreszenzstudien gezeigt werden dass die Expressionsrate sich bei gleicher Konzentration an injizierter DNA erhöht (Berndt u. a. (2011); Erbguth u. a. (2012)). Aufgrund dieser Eigenschaften konnte erwartet werden dass die Variante Chr2-HR/TC bei geringerer Konzentration an transgener DNA zu ähnlichen Reaktionen auf blaues Licht führt wie das bisher verwendete Chr2-HR. Es konnte gezeigt werden, dass bereits eine Konzentration von $20 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ Plasmid-DNA ausreichte damit genauso viele Tiere auf blaues Licht reagieren, wie bei $80 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ Chr2-HR Plasmid-DNA. Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass bei dieser Konzentration ($20 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) signifikant mehr Tiere auf den Tap reagieren, als bei Chr2-HR. Die Anzahl der auf blaues Licht reagierenden Tiere nimmt jedoch mit zunehmender Konzentration von Chr2-HR/TC ab, wohingegen die Reaktion auf den Tap-Stimulus gleich bleibt. Auf eine bisher noch nicht geklärte Weise scheint eine zu große Menge der Chr2HR/TC Variante dessen Effektivität zu mindern.

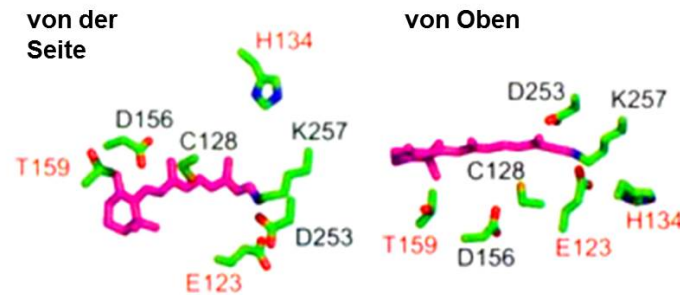


Abbildung 49: Schematische Darstellung der Aminosäuren, welche in der Retinalbindestelle von ChR2 eine Rolle spielen (Berndt u. a. (2011))

Da ChR2-HR/TC für zukünftige Experimente vielversprechend erschien wurde es ebenfalls im Rahmen eines Habituationsexperiments (1 s blaues Licht; ISI=10; 30 Wiederholungen) getestet. Auf den ersten Stimulus reagierten mehr Tiere als bei der mitgeführten ChR2-HR Kontrollgruppe. Es konnte bereits nach 5 Stimuli eine vollständige Habituation gezeigt werden und es reagierten lediglich noch genau so viele Tiere auf blaues Licht, wie in der getesteten Negativkontrolle ohne ChR2. Jedoch ist im Anschluss an diese vollständige Habituation erneut ein Anstieg der reagierenden Tiere zu verzeichnen. Nach 15 Stimuli entspricht der Prozentsatz der reagierenden Tiere wieder dem beim ersten Stimulus. Im Anschluss an eine schnelle Habituation tritt also eine Dishabituation ein. Wie oben beschrieben zeigt die ChR2-Doppelmutante HR/TC einen erhöhten Ioneneinstrom im Vergleich zu der Einzelmutante HR. Diese Erhöhung ist auf eine deutlich längere Öffnungszeit des Kanals nach der initialen Beleuchtung zurückzuführen (Berndt u. a. (2011)). Dadurch kann möglicherweise eine leicht erhöhte Leitfähigkeit Ca^{2+} -Ionen zustande kommen. Es strömt mehr Ca^{2+} ein und kann innerhalb der Zelle als 'Second Messenger' wirken und die MRNs erneut aktivieren, z. B. dadurch dass die Kaliumkanäle wieder dephosphoryliert werden. Auch eine, durch den großen Kationeneinstrom bedingte, Depolarisation über das für die MRNs gewöhnliche Maß hinaus (Berndt u. a. (2011)) kann zu zusätzlichen Veränderungen in der Zelle führen die letztendlich eine Habituation verhindern oder rückgängig machen. Diese Theorie würde ebenfalls darauf hindeuten dass die Habituation direkt an den MRNs gesteuert wird.

5. Ausblick

Die im Rahmen dieser Arbeit etablierte spezifische Expression optogenetischer Werkzeuge in einzelnen Neuronen legt den Grundstein dafür dass es einmal möglich sein wird jede beliebige Nervenzelle von *C. elegans* gezielt zu aktivieren, zu inhibieren oder anderweitig zu manipulieren. Auch erlaubt die zellspezifische Expression die Herstellung von Stämmen welche eine Kombination verschiedener optogenetischer Werkzeuge wie ChR2, NpHR, C1V1, Mac, Arch etc. exprimieren. Auf diese Weise kann das genau Zusammenspiel einzelner Nervenzellen erforscht werden. Dies ist ein wichtiger Schritt hin zur vollständigen funktionalen Aufklärung des *C. elegans* Nervensystems. Diese Informationen würden einen wichtigen Anhaltspunkt liefern für die Untersuchung der neuronalen Vorgänge höherer Organismen. Außerdem macht eine zellspezifische Expression der optogenetischen Werkzeuge die zielgerichtete Verwendung von Hochdurchsatzmethoden, bei denen viele Würmer zur gleichen Zeit beleuchtet und gemessen werden möglich. So können Experimente deutlich schneller und effizienter gestaltet werden als bei gezielter Laserbeleuchtung einzelner Zellen, die immer nur bei einem Tier zur gleichen Zeit gelingt.

Die hier gezeigten Ergebnisse deuten daraufhin, dass vor allem die MRNs beteiligt sind an der Speicherung einer Habituation. Jedoch gibt es verschiedene Hinweise darauf, dass in den AVA-Interneuronen ebenfalls Mechanismen zur Gedächtnisbildung aktiviert werden. Erste Voruntersuchungen zeigten eine Kreuzhabituation zwischen den MRNs und AVA. Diese Messungen müssen jedoch mit einem größeren Stichprobenumfang, sowie geeigneten Kontrollen wiederholt werden um das Ergebnis zu bestätigen. Es konnte bereits gezeigt werden, dass AVA auf molekularer Ebene an der Speicherung einer Langzeithabituation beteiligt ist. So wäre es sehr interessant dies auch auf Ebene des Verhaltens zu untersuchen. Hierzu kann die Linie AVA[C] einem Protokoll zur Langzeithabituation unterzogen werden. Auch interessant wären Kreuzhabituationsexperimente in diesem Zusammenhang. Dabei wird zuerst eine Langzeithabituation der MRNs erreicht (Tap) und im Anschluss die Reaktion auf Aktivierung der AVA-Neuronen getestet. Wenn ChR's mit verschiedenen Anregungsspektren verwendet werden ist auch eine Langzeithabituation der MRNs Licht möglich.

Um die Funktionsweise von AVA genauer zu charakterisieren wurden die AVA nachgeschalteten Synaptischen Verbindungen unterbrochen. Die nach Unterbrechung der 'Gap Junctions' gezeigte stärkere Reaktion der Tiere auf Aktivierung von AVA weist

vermutlich auf eine Modulation von AVA durch PVC hin. Um dies zu testen wurde in dieser Arbeit NpHR in PVC exprimiert, es war jedoch leider keine zellspezifische Expression möglich. Mit dem deswegen verwendeten SWT war es nicht möglich eine signifikante Reaktion nach AVA Aktivierung mit blauem Licht zu erreichen. Somit konnte die Rolle, die PVC bei der Modulation von AVA hier nicht vollständig untersucht werden. Die Suche nach einem Promotorpaar für PVC spezifische Expression optogenetischer Werkzeuge ist eine Aufgabe die noch aussteht. Wenn in einer Linie sowohl AVA als auch PVC spezifisch manipuliert werden können sollte es gelingen das Zusammenspiel dieser beiden Neuronen zu charakterisieren. Das Neuronenpaar AVD ist könnte ebenfalls ein wichtiger Modulator für AVA. Auch hier ist im Rahmen dieser Arbeit keine zellspezifische Expression gelungen. Es wurde jedoch der Grundstein gelegt für die komplette funktionale Aufklärung eines neuronalen Netzwerkes. Sollte dies zukünftig gelingen können aus dem Zusammenspiel dieser Zellen Informationen für andere Netzwerke und auch höhere Organismen abgeleitet werden.

Um einen Wurmstamm zu erhalten der dazu in der Lage ist auf den natürlichen Stimulus und den Lichtpuls gleichermaßen zu reagieren wurde eine Linie, welche ChR2HR/TC unter dem *mec-4*-Promotor exprimiert, erzeugt. Anders als erwartet zeigt diese Linie jedoch keine anhaltende Habituation. Eventuell ist dieser Effekt auf erhöhten Ca^{2+} -Einstrom zurückzuführen. Um diese Theorie zu testen könnte man die stark Ca^{2+} durchlässige ChR2-Mutante CatCH(L132C) (Kleinlogel u. a. (2011)) verwenden und überprüfen ob der selbe Effekt eintritt wie bei ChR2HR/TC beobachtet.

Teil V.

Anhang

1. Etablierung des MWT

Die Abbildung 50 zeigt verschiedene Lichtintensitäten, sowie verschiedene Beleuchtungszeiten für die Kontrolllinie *p_{mec-4}::ChR2HR* (zx835). Wie deutlich zu sehen ist, nimmt die Signifikanz der Habituationsreaktion mit abnehmender Lichtintensität zu, ab einem Wert von 0,02 mW/mm² ist jedoch keine Anfangsreaktion mehr zu verzeichnen. Die Beleuchtungsdauer betrug hier in allen Fällen 1 s. Aufgrund des geringen Stichprobenumfangs konnte hier kein ANOVA durchgeführt werden. Zur Feststellung einer Habituation wurde die Reaktion auf den ersten und letzten Stimulus mittels Chi²-Test verglichen. In dem zweiten Test wurde eine konstante Lichtintensität von 0,6 mW/mm² präsentiert, jedoch die Dauer des Stimulus zwischen 100 ms und 1000 ms variiert. Habituation konnte in allen 4 getesteten Fällen erreicht werden, am deutlichsten war sie jedoch für 200 und 500 ms Reizdauer. Auch hier gilt wieder: Je geringer der Reiz desto besser die Habituation, bei zu geringem Reiz erfolgt jedoch keine nennenswerte Anfangsreaktion mehr.

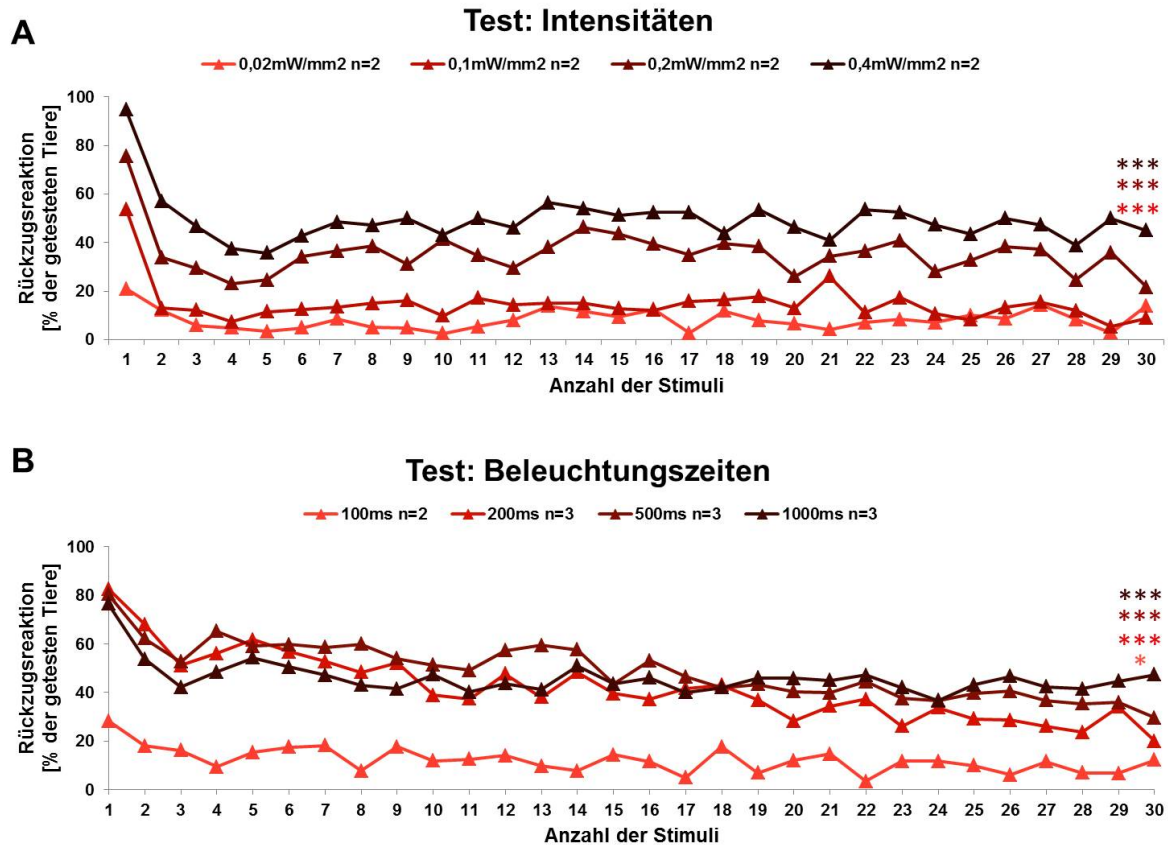


Abbildung 50: Test mit unterschiedlichen Lichtintensitäten und verschiedener Beleuchtungsdauer um gute Bedingungen für nachfolgende Experimente zu finden. Getestete Linie: *p_{mec-4}::ChR2HR* (zx835). A) Test Lichtintensität (über einen Dimmer reguliert); 470 nm; Beleuchtungsdauer: 1 s; 30 Wiederholungen. B) Test Beleuchtungsdauer: 470 nm; Lichtintensität 0,6 mW/mm²; 30 Wiederholungen.

Da jedoch der verwendete Dimmer zusätzlich zur Regulation der Lichtintensität auch eine Verzögerung des Beleuchtungsreizes hervorruft wurden auch Experimente mit LED's von geringerer Lichtintensität ohne Dimmer durchgeführt. Es ist bereits aus früheren Publikationen bekannt, dass der ISI einen deutlichen Einfluss, sowohl auf die Geschwindigkeit der Habituation, als auch auf die Bildung einer über mehrere Tage andauernden Verhaltensänderung (Langzeitgedächtnis) nimmt Rankin u. Broster (1992). Hier wurden ISI von 5 s, 10 s und 20 s getestet (Abb.: 51). In allen 3 Fällen liegt die Anfangsreaktion zwischen 85 % und 95 % und es ist eine deutliche Habituation in Abhängigkeit von der Anzahl der gegebenen Stimuli zu erkennen. Diese erfolgt jedoch für die Intervalle 5 s und 10 s deutlich schneller. Ein Rückgang der

Anzahl der reagierenden Tiere auf 20 % (entsprechend den Negativkontrollen) wird hier bereits nach 5 Stimuli erreicht und im Fall eines Intervalls von 20 s erst nach 20 Stimuli. Da im Rahmen dieser Arbeit keine Experimente gemacht wurden, die das Langzeitgedächtnis betrafen, wofür längere ISI von Vorteil sind, wurden die nachfolgenden Experimente mit einem ISI von 10 s durchgeführt, welches auch in der Literatur am gebräuchlichsten ist.

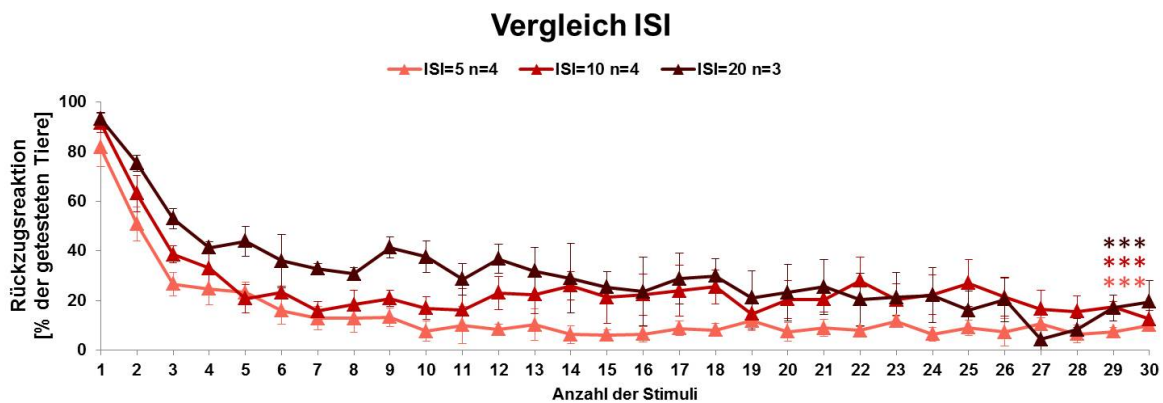


Abbildung 51: Vergleich verschiedener Inter-Stimulus-Intervalle am MWT in Vancouver. Verwendet wurde eine Linie welche Chr2 in den MRNs exprimiert (AQ2334). Parameter: 470 nm, 1 s, 0,02 mw/mm² (ohne Dimmer); ISI=variabel; 30 Wiederholungen. Statistik: ANOVA mit anschließendem Tukey Test; Verwendetes Programm: PAST. (*) Zeigt den Unterschied zwischen dem ersten und dem letzten Stimulus.

2. Einfluss der Habituation der MRNs auf ASH und AVA (Kreuzhabituation)

In vorläufigen Experimenten wurde der Einfluss, welcher die Habituation des natürlichen Stimulus (Tap) auf die Neuronen ASH und AVA hat untersucht. Hierbei wurde zuerst ein Lichtpuls gegeben, anschließend die Kulturschale mit den Würmern 30X angetippt (Tap) (ISI = 5 sec) und mit einem erneuten Lichtpuls getestet ob sich die Reaktion darauf verändert hat (Abb.: 52). Leider konnte mit dem verwendeten Versuchsaufbau keine vollständige Habituation (15-20 % reagierende Tiere) durch Tap erreicht werden. Dennoch reagierten die getesteten Tiere der Linie ASH[C] bei Präsentation des 30. Tap signifikant weniger, als bei Gabe des Ersten. Die Reizung

von ASH durch blaues Licht zeigte vor (61 % reagierende Tiere) und nach (51 % reagierende Tiere) der Habituation des Tap keinen deutlichen Unterschied. Im Falle von AVA ist die Differenz zwischen den vor (36 %) und nach (7 %) Habituation auf blaues Licht reagierenden Tieren deutlich höher. Dieses Ergebnis deutet darauf hin dass die Information über die Gewöhnung an den mechanischen Stimulus nicht nur in den MRNs, sondern evtl. auch in AVA gespeichert wird, also eine Kreuzhabituation zwischen MRNs und AVA stattfindet.

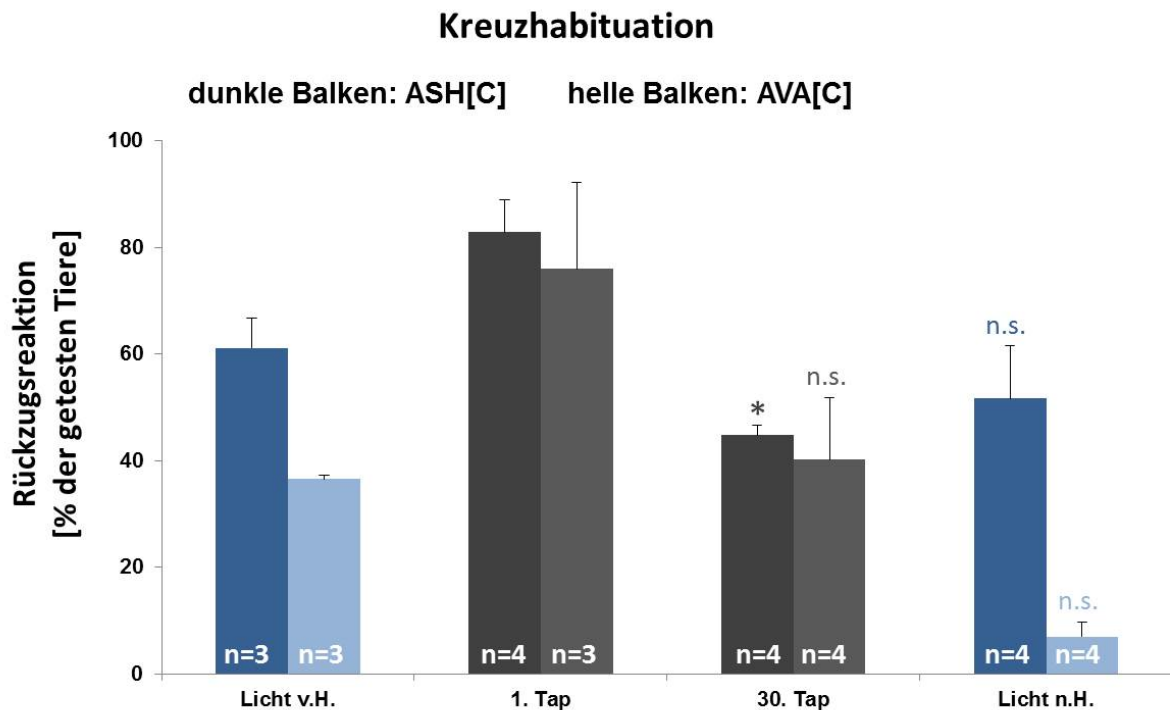


Abbildung 52: Test auf Kreuzhabituation in den Neuronen ASH und AVA im Anschluss an die Habituation der MRNs durch den natürlichen Stimulus. Verwendet wurden die Linien welche ASH[C] (AQ2235) und AVA[C] (ZX1023). Parameter: Blaues Licht: 470 nm, 1 s, 0,02 mw/mm² (ohne Dimmer); Tap: ISI=5, 30 Wiederholungen. Statistik: ANOVA mit anschließendem Tukey Test; Verwendetes Programm: PAST. (* / n.s.) Zeigt den statistischen Unterschied zwischen dem ersten und dem letzten Tap-Stimulus bzw. den Unterschied zwischen der Reaktion auf blaues Licht vor und nach der Habituation des Tap-Stimulus.

Literatur

- [Airan u. a. 2009] AIRAN, R. D. ; THOMPSON, K. R. ; FENNO, L. E. ; BERNSTEIN, H. ; DEISSEROTH, K.: Temporally precise in vivo control of intracellular signalling. In: *Nature* 458 (2009), Nr. 7241, S. 1025–29
- [Albeg u. a. 2011] ALBEG, A. ; SMITH, C. J. ; CHATZIGEORGIU, M. ; FEITELSON, D. G. ; HALL, D. H. ; SCHAFER, W. R. ; MILLER, D. M. ; TREININ, M.: C. elegans multidendritic sensory neurons: Morphology and function. In: *Molecular and Cellular Neuroscience* 46 (2011), Januar, Nr. 1, S. 308–317
- [Altun u. a. 2009] ALTUN, Z. F. ; CHEN, B. ; WANG, Z.-W. ; HALL, D. H.: High resolution map of *Caenorhabditis elegans* gap junction proteins. In: *Developmental Dynamics* 238 (2009), August, Nr. 8, S. 1936–1950
- [Altun u. Hall 2009] ALTUN, Z.F. ; HALL, D.H.: Introduction. In: *WormAtlas* (2009)
- [Altun u. Hall 2011] ALTUN, Z.F. ; HALL, D.H.: Nervous system, general description. In: *WormAtlas* (2011)
- [Armitage u. Siegelbaum 1998] ARMITAGE, B. A. ; SIEGELBAUM, S. A.: Presynaptic induction and expression of homosynaptic depression at Aplysia sensorimotor neuron synapses. In: *J Neurosci* 18 (1998), Nr. 21, S. 8770–9
- [Bamann u. a. 2008] BAMANN, C. ; KIRSCH, T. ; NAGEL, G. ; BAMBERG, E.: Spectral characteristics of the photocycle of channelrhodopsin-2 and its implication for channel function. In: *Journal of molecular biology* 375 (2008), Nr. 3, S. 686–94
- [Bargmann 1998] BARGMANN, C. I.: Neurobiology of the *Caenorhabditis elegans* genome. In: *Science* 282 (1998), Nr. 5396, S. 2028–33
- [Barnes u. Hekimi 1997] BARNES, T. M. ; HEKIMI, S.: The *Caenorhabditis elegans* avermectin resistance and anesthetic response gene *unc-9* encodes a member of a protein family implicated in electrical coupling of excitable cells. In: *J Neurochem* 69 (1997), Nr. 6, S. 2251–60
- [Beck u. Rankin 1995] BECK, C. D. ; RANKIN, C. H.: Heat shock disrupts long-term memory consolidation in *Caenorhabditis elegans*. In: *Learn Mem* 2 (1995), Nr. 3-4, S. 161–77

- [Beck u. Rankin 1997] BECK, C. D. ; RANKIN, C. H.: Long-term habituation is produced by distributed training at long ISIs and not by massed training at short ISIs in *Caenorhabditis elegans*. In: *Animal Learning and Behavior* 25 (1997), S. 446–57
- [Berndt u. a. 2011] BERNDT, A. ; SCHOENENBERGER, P. ; MATTIS, J. ; TYE, K. M. ; DEISSEROTH, K. ; HEGEMANN, P. ; OERTNER, T. G.: High-efficiency channelrhodopsins for fast neuronal stimulation at low light levels. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108 (2011), Mai, Nr. 18, S. 7595–7600
- [Berndt u. a. 2009] BERNDT, A. ; YIZHAR, O. ; GUNAYDIN, L. A. ; HEGEMANN, P. ; DEISSEROTH, K.: Bi-stable neural state switches. In: *Nat Neurosci* 12 (2009), Nr. 2, S. 229–34
- [Biron u. a. 2006] BIRON, D. ; SHIBUYA, M. ; GABEL, C. ; WASSERMAN, S. M. ; CLARK, D. A. ; BROWN, A. ; SENGUPTA, P. ; SAMUEL, A. D. T.: A diacylglycerol kinase modulates long-term thermotactic behavioral plasticity in *C. elegans*. In: *Nature Neuroscience* 9 (2006), Dezember, Nr. 12, S. 1499–1505
- [Boyden u. a. 2005] BOYDEN, E. S. ; ZHANG, F. ; BAMBERG, E. ; NAGEL, G. ; DEISSEROTH, K.: Millisecond-timescale, genetically targeted optical control of neural activity. In: *Nat Neurosci* 8 (2005), Nr. 9, S. 1263–8
- [Brauner 2009] BRAUNER, M.: Entwicklung optogenetischer Methoden zur Erforschung des Nervensystems des Nematoden *Caenorhabditis elegans*. In: *Dissertation Johann-Wolfgang-Goethe Universität* (2009), Nr. Fachbereich 14
- [Brenner 1974] BRENNER, S.: The genetics of *Caenorhabditis elegans*. In: *Genetics* 77 (1974), Nr. 1, S. 71–94
- [Brockie u. a. 2001] BROCKIE, P. J. ; MADSEN, D. M. ; ZHENG, Y. ; MELLEM, J. ; MARICQ, A. V.: Differential expression of glutamate receptor subunits in the nervous system of *Caenorhabditis elegans* and their regulation by the homeodomain protein UNC-42. In: *J Neurosci* 21 (2001), Nr. 5, S. 1510–22
- [Broster u. Rankin 1994] BROSTER, B. S. ; RANKIN, C. H.: Effects of changing inter-stimulus interval during habituation in *Caenorhabditis elegans*. In: *Behavioral neuroscience* 108 (1994), Nr. 6, S. 1019–29

- [Brownlee u. Fairweather 1999] BROWNLEE, D. J. ; FAIRWEATHER, I.: Exploring the neurotransmitter labyrinth in nematodes. In: *Trends Neurosci* 22 (1999), Nr. 1, S. 16–24
- [Byerly u. a. 1976] BYERLY, L. ; CASSADA, R. C. ; RUSSELL, R. L.: The life cycle of the nematode *Caenorhabditis elegans*. I. Wild-type growth and reproduction. In: *Dev Biol* 51 (1976), Nr. 1, S. 23–33
- [Cai u. a. 2009] CAI, Shi-Qing ; WANG, Yi ; PARK, Ki H. ; TONG, Xin ; PAN, Zui ; SESTI, Federico: Auto-phosphorylation of a voltage-gated K⁺ channel controls non-associative learning. In: *The EMBO journal* 28 (2009), Juni, Nr. 11, S. 1601–1611
- [Castellucci u. a. 1978] CASTELLUCCI, V. F. ; CAREW, T. J. ; KANDEL, E. R.: Cellular analysis of long-term habituation of the gill-withdrawal reflex of *Aplysia californica*. In: *Science* 202 (1978), Nr. 4374, S. 1306–8
- [Castellucci u. Kandel 1974] CASTELLUCCI, V. F. ; KANDEL, E. R.: A quantal analysis of the synaptic depression underlying habituation of the gill-withdrawal reflex in *Aplysia*. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 71 (1974), Nr. 12, S. 5004–8
- [Chalfie u. a. 1985] CHALFIE, M. ; SULSTON, J. E. ; WHITE, J. G. ; SOUTHGATE, E. ; THOMSON, J. N. ; BRENNER, S.: The neural circuit for touch sensitivity in *Caenorhabditis elegans*. In: *J Neurosci* 5 (1985), Nr. 4, S. 956–64
- [Chao u. a. 2005] CHAO, M. Y. ; LARKINS-FORD, J. ; TUCEY, T. M. ; HART, A. C.: lin-12 Notch functions in the adult nervous system of *C. elegans*. In: *BMC Neurosci* 6 (2005), S. 45
- [Chatzigeorgiou u. Schafer 2011] CHATZIGEORGIOU, M. ; SCHAFFER, W. R.: Lateral Facilitation between Primary Mechanosensory Neurons Controls Nose Touch Perception in *C. elegans*. In: *Neuron* 70 (2011), April, Nr. 2, S. 299–309
- [Chen u. a. 2001] CHEN, Y. A. ; SCALES, S. J. ; SCHELLER, R. H.: Sequential SNARE Assembly Underlies Priming and Triggering of Exocytosis. In: *Neuron* 30 (2001), April, Nr. 1, S. 161–170
- [Chiba u. Rankin 1990] CHIBA, C. M. ; RANKIN, C. H.: A developmental analysis of spontaneous and reflexive reversals in the nematode *Caenorhabditis elegans*. In: *J Neurobiol* 21 (1990), Nr. 4, S. 543–54

- [Chuong u. a. 2014] CHUONG, A. S. ; MIRI, M. L. ; BUSSKAMP, V. ; MATTHEWS, G. A. C. ; ACKER, L. C. ; SORENSEN, A. T. ; YOUNG, A. ; KLAPOETKE, N. C. ; HENNINGER, M. A. ; KODANDARAMAIAH, S. B. ; OGAWA, M. ; RAMANLAL, S. B. ; BANDLER, R. C. ; ALLEN, B. D. ; FOREST, C. R. ; CHOW, B. Y. ; HAN, X. ; LIN, Y. ; TYE, K. M. ; ROSKA, B. ; CARDIN, J. A. ; BOYDEN, E. S.: Noninvasive optical inhibition with a red-shifted microbial rhodopsin. In: *Nature Neuroscience* 17 (2014), Juli, Nr. 8, S. 1123–1129
- [Cohen 1990] COHEN, P.: The structure and regulation of protein phosphatases. In: *Advances in Second Messenger and Phosphoprotein Research* 24 (1990), S. 230–235
- [Croll 1975] CROLL, N. A.: Behavioural analysis of nematode movement. In: *Adv Parasitol* 13 (1975), S. 71–122
- [Davis u. a. 2008] DAVIS, M. W. ; MORTON, J. J. ; CARROLL, D. ; JORGENSEN, E. M.: Gene activation using FLP recombinase in *C. elegans*. In: *PLoS genetics* 4 (2008), Nr. 3, S. e1000028
- [De Luca u. Giuditta 1997] DE LUCA, A. ; GIUDITTA, A.: Role of a transcription factor (CREB) in memory processes. In: *Rivista Di Biologia* 90 (1997), Nr. 3, S. 371–384
- [Descartes 1970] DESCARTES, R.: *the P philosophical works of Descartes, uebersetzt von Elizzabeth S. Haldane und G. R. T. Ross*. Cambridge University Press, 1970
- [Driscoll u. Chalfie 1991] DRISCOLL, M. ; CHALFIE, M.: The *mec-4* gene is a member of a family of *Caenorhabditis elegans* genes that can mutate to induce neuronal degeneration. In: *Nature* 349 (1991), Februar, Nr. 6310, S. 588–593
- [Erbguth u. a. 2012] ERBGUTH, K. ; PRIGGE, M. ; SCHNEIDER, F. ; HEGEMANN, P. ; GOTTSCHALK, A.: Bimodal activation of different neuron classes with the spectrally red-shifted channelrhodopsin chimera C1V1 in *Caenorhabditis elegans*. In: *PloS One* 7 (2012), Nr. 10, S. e46827
- [Esposito u. a. 2007] ESPOSITO, G. ; DI SCHIAVI, E. ; BERGAMASCO, C. ; BAZZICALUPO, P.: Efficient and cell specific knock-down of gene function in targeted *C. elegans* neurons. In: *Gene* 395 (2007), Nr. 1-2, S. 170–6
- [Evans u. Blumenthal 2000] EVANS, D. ; BLUMENTHAL, T.: trans splicing of polycistronic *Caenorhabditis elegans* pre-mRNAs: analysis of the SL2 RNA. In: *Mol Cell Biol* 20 (2000), Nr. 18, S. 6659–67

- [Ezcurra u. a. 2011] EZCURRA, M. ; TANIZAWA, Y. ; SWOBODA, P. ; SCHAFER, W. R.: Food sensitizes *C. elegans* avoidance behaviours through acute dopamine signalling. In: *The EMBO journal* 30 (2011), Nr. 6, S. 1110–22
- [Faber u. a. 1999] FABER, P. W. ; ALTER, J. R. ; MACDONALD, M. E. ; HART, A. C.: Polyglutamine-mediated dysfunction and apoptotic death of a *Caenorhabditis elegans* sensory neuron. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 96 (1999), Nr. 1, S. 179–84
- [Fleming u. a. 1997] FLEMING, J. T. ; SQUIRE, M. D. ; BARNES, T. M. ; TORNOE, C. ; MATSUDA, K. ; AHNN, J. ; FIRE, A. ; SULSTON, J. E. ; BARNARD, E. A. ; SATTELLE, D. B. ; LEWIS, J. A.: *Caenorhabditis elegans* levamisole resistance genes *lev-1*, *unc-29*, and *unc-38* encode functional nicotinic acetylcholine receptor subunits. In: *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 17 (1997), August, Nr. 15, S. 5843–5857
- [Geppert u. a. 1994] GEPPERT, M. ; GODA, Y. ; HAMMER, R. E. ; LI, C. ; ROSAHL, T. W. ; STEVENS, C. F. ; SÄ¼DHOFF, T. C.: Synaptotagmin I: A major Ca²⁺ sensor for transmitter release at a central synapse. In: *Cell* 79 (1994), November, Nr. 4, S. 717–727
- [Gerdes u. Kaether 1996] GERDES, H. H. ; KAETHER, C.: Green fluorescent protein: applications in cell biology. In: *FEBS Lett* 389 (1996), Nr. 1, S. 44–7
- [Giles u. Rankin 2009] GILES, A. C. ; RANKIN, C. H.: Behavioral and genetic characterization of habituation using *Caenorhabditis elegans*. In: *Neurobiology of learning and memory* 92 (2009), Nr. 2, S. 139–46
- [Goodman 2006] GOODMAN, M. B.: Mechanosensation. In: *WormBook* (2006)
- [Goodman u. a. 2002] GOODMAN, Miriam B. ; ERNSTROM, Glen G. ; CHELUR, Dattananda S. ; O'HAGAN, Robert ; YAO, C. A. ; CHALFIE, Martin: MEC-2 regulates *C. elegans* DEG/ENaC channels needed for mechanosensation. In: *Nature* 415 (2002), Februar, Nr. 6875, S. 1039–1042
- [Greener u. a. 2001] GREENER, T. ; GRANT, B. ; ZHANG, Y. ; WU, X. ; GREENE, L. E. ; HIRSH, D. ; EISENBERG, E.: *Caenorhabditis elegans* auxilin: a J-domain protein essential for clathrin-mediated endocytosis in vivo. In: *Nature Cell Biology* 3 (2001), Februar, Nr. 2, S. 215–219

- [Harris u. a. 2001] HARRIS, T. W. ; SCHUSKE, K. ; JORGENSEN, E. M.: Studies of synaptic vesicle endocytosis in the nematode *C. elegans*. In: *Traffic* 2 (2001), Nr. 9, S. 597–605
- [Hart u. a. 1999] HART, A. C. ; KASS, J. ; SHAPIRO, J. E. ; KAPLAN, J. M.: Distinct signaling pathways mediate touch and osmosensory responses in a polymodal sensory neuron. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 19 (1999), Nr. 6, S. 1952–8
- [Hart u. a. 1995] HART, A. C. ; SIMS, S. ; KAPLAN, J. M.: Synaptic code for sensory modalities revealed by *C. elegans* GLR-1 glutamate receptor. In: *Nature* 378 (1995), November, Nr. 6552, S. 82–85
- [Herlitze u. Landmesser 2007] HERLITZE, S. ; LANDMESSER, L. T.: New optical tools for controlling neuronal activity. In: *Current Opinion in Neurobiology* 17 (2007), Februar, Nr. 1, S. 87–94
- [Hoess u. a. 1984] HOESS, R. ; ABREMSKI, K. ; STERNBERG, N.: The nature of the interaction of the P1 recombinase Cre with the recombining site loxP. In: *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* 49 (1984), S. 761–68
- [Huang u. Chalfie 1994] HUANG, M. ; CHALFIE, M.: Gene interactions affecting mechanosensory transduction in *Caenorhabditis elegans*. In: *Nature* 367 (1994), Nr. 6462, S. 467–70
- [Husson u. a. 2012a] HUSSON, S. J. ; LIEWALD, J. F. ; SCHULTHEIS, C. ; STIRMAN, J. N. ; LU, H. ; GOTTSCHALK, A.: Microbial light-activatable proton pumps as neuronal inhibitors to functionally dissect neuronal networks in *C. elegans*. In: *PLoS One* 7 (2012), Nr. 7, S. e40937
- [Husson u. a. 2012b] HUSSON, Steven J. ; COSTA, Wagner S. ; SCHMITT, Cornelia ; GOTTSCHALK, Alexander: Keeping track of worm trackers. In: *WormBook: The Online Review of C. Elegans Biology* (2012), S. 1–17
- [Huttner u. Schmidt 2000] 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. In: *Current Opinion in Neurobiology* 10 (2000), Oktober, Nr. 5, S. 543–551

- [Jansen u. a. 1999] JANSEN, G. ; THIJSSSEN, K. L. ; WERNER, P. ; HORST, M. van d. ; HAZENDONK, E. ; PLASTERK, R. H.: The complete family of genes encoding G proteins of *Caenorhabditis elegans*. In: *Nature genetics* 21 (1999), Nr. 4, S. 414–9
- [Kaang u. a. 1993] KAANG, B. K. ; KANDEL, E. R. ; GRANT, S. G.: Activation of cAMP-responsive genes by stimuli that produce long-term facilitation in *Aplysia* sensory neurons. In: *Neuron* 10 (1993), März, Nr. 3, S. 427–435
- [Kandel 2001] KANDEL, E. R.: The molecular biology of memory storage: A dialogue between genes and synapses. In: *Science* 294 (2001), Nr. 5544, S. 1030–1038
- [Kandel u. a. 2000] KANDEL, E. R. ; SCHWARTZ, J.H. ; JESSELL, T. M.: *Principles of Neural Science*. McGraw-Hill Companies, 2000
- [Kaplan u. Horvitz 1993] KAPLAN, J. M. ; HORVITZ, H. R.: A dual mechanosensory and chemosensory neuron in *Caenorhabditis elegans*. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90 (1993), Nr. 6, S. 2227–31
- [Kato u. a. 2012] KATO, H. E. ; ZHANG, F. ; YIZHAR, O. ; RAMAKRISHNAN, C. ; NISHIZAWA, T. ; HIRATA, K. ; ITO, J. ; AITA, Y. ; TSUKAZAKI, T. ; HAYASHI, S. ; HEGEMANN, P. ; MATURANA, A. D. ; ISHITANI, R. ; DEISSEROTH, K. ; NUREKI, O.: Crystal structure of the channelrhodopsin light-gated cation channel. In: *Nature* 482 (2012), Januar, Nr. 7385, S. 369–374
- [Kawano u. a. 2011] KAWANO, T. ; PO, M. D. ; GAO, S. ; LEUNG, G. ; RYU, W. S. ; ZHEN, M.: An imbalancing act: gap junctions reduce the backward motor circuit activity to bias *C. elegans* for forward locomotion. In: *Neuron* 72 (2011), Nr. 4, S. 572–86
- [Kerr u. a. 2000] KERR, R. ; LEV-RAM, V. ; BAIRD, G. ; VINCENT, P. ; TSIEN, R. Y. ; SCHAFER, W. R.: Optical imaging of calcium transients in neurons and pharyngeal muscle of *C. elegans*. In: *Neuron* 26 (2000), Nr. 3, S. 583–94
- [Klapoetke u. a. 2014] KLAPOETKE, N. C. ; MURATA, Y. ; KIM, S. S. ; PULVER, S. R. ; BIRDSEY-BENSON, A. ; CHO, Y. K. ; MORIMOTO, T. K. ; CHUONG, A. S. ; CARPENTER, E.J. ; TIAN, Z. ; WANG, J. ; XIE, Y. ; YAN, Z. ; ZHANG, Y. ; CHOW, B. Y. ; SUREK, B. ; MELKONIAN, M. ; JAYARAMAN, V. ; CONSTANTINE-PATON, M. ; WONG, G.K. ; BOYDEN, E.S.: Independent optical excitation of distinct neural populations. In: *Nature Methods* 11 (2014), Februar, Nr. 3, S. 338–346

- [Kleinlogel u. a. 2011] KLEINLOGEL, S. ; FELDBAUER, K. ; DEMPSKI, R. E. ; FOTIS, H. ; WOOD, P. G. ; BAMANN, C. ; BAMBERG, E.: Ultra light-sensitive and fast neuronal activation with the (Ca²⁺)-permeable channelrhodopsin CatCh. In: *Nat Neuroscience* 14 (2011), Nr. 4, S. 513–8
- [Kornberg 1996] KORNBERG, R: RNA polymerase II transcription control. In: *Trends in Biochemical Sciences* 21 (1996), September, Nr. 9, S. 325–326
- [Lai u. a. 1996] LAI, C. C. ; HONG, K. ; KINNELL, M. ; CHALFIE, M. ; DRISCOLL, M.: Sequence and transmembrane topology of MEC-4, an ion channel subunit required for mechanotransduction in *Caenorhabditis elegans*. In: *The Journal of cell biology* 133 (1996), Nr. 5, S. 1071–81
- [Lanyi u. a. 1990] LANYI, J. K. ; DUSCHL, A. ; HATFIELD, G. W. ; MAY, K. ; OESTERHELT, D.: The primary structure of a halorhodopsin from *Natronobacterium pharaonis*. Structural, functional and evolutionary implications for bacterial rhodopsins and halorhodopsins. In: *J Biol Chem* 265 (1990), Nr. 3, S. 1253–60
- [Lasko u. a. 1992] LASKO, M. ; SAUER, B. ; MOSINGER, Jr. B. ; LEE, E.J. ; MANNING, R.W. ; YU, S.-H. ; MULDER, K.L. ; WESTPHAL, H.: Targeted oncogene activation by site-specific recombination in transgenic mice. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89 (1992), Juli, Nr. 14, S. 6232–6236
- [Lee u. a. 1999] LEE, R. Y. ; SAWIN, E. R. ; CHALFIE, M. ; HORVITZ, H. R. ; AVERY, L.: EAT-4, a homolog of a mammalian sodium-dependent inorganic phosphate cotransporter, is necessary for glutamatergic neurotransmission in *Caenorhabditis elegans*. In: *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 19 (1999), Januar, Nr. 1, S. 159–167
- [Li 2008] LI, C.: Neuropeptides. In: *WormBook* (2008), September, S. 1–36
- [Li u. a. 1999] LI, C. ; NELSON, L. S. ; KIM, K. ; NATHOO, A. ; HART, A. C.: Neuropeptide gene families in the nematode *Caenorhabditis elegans*. In: *Annals of the New York Academy of Sciences* 897 (1999), S. 239–252
- [Li u. a. 2013] LI, C. ; TIMBERS, T. A. ; ROSE, J. K. ; BOZORGMEHR, T. ; MCEWAN, A. ; RANKIN, C. H.: The FMRFamide-related neuropeptide FLP-20 is required in the mechanosensory neurons during memory for massed training in *C. elegans*. In: *Learning & Memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)* 20 (2013), Nr. 2, S. 103–108

- [Lin u. a. 2009] LIN, J. Y. ; LIN, M. Z. ; STEINBACH, P. ; TSIEN, R. Y.: Characterization of engineered channelrhodopsin variants with improved properties and kinetics. In: *Biophys J* 96 (2009), Nr. 5, S. 1803–14
- [Littleton u. a. 1994] LITTLETON, J. T. ; STERN, M. ; PERIN, M. ; BELLEN, H. J.: Calcium dependence of neurotransmitter release and rate of spontaneous vesicle fusions are altered in *Drosophila* synaptotagmin mutants. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91 (1994), November, Nr. 23, S. 10888–10892
- [Littleton u. a. 1993] LITTLETON, J. T. ; STERN, M. ; SCHULZE, K. ; PERIN, M. ; BELLEN, H. J.: Mutational analysis of *Drosophila* synaptotagmin demonstrates its essential role in Ca²⁺-activated neurotransmitter release. In: *Cell* 74 (1993), September, Nr. 6, S. 1125–1134
- [Macosko u. a. 2009] MACOSKO, E. Z. ; POKALA, N. ; FEINBERG, E. H. ; CHALASANI, S. H. ; BUTCHER, R. A. ; CLARDY, J. ; BARGMANN, C. I.: A hub-and-spoke circuit drives pheromone attraction and social behaviour in *C. elegans*. In: *Nature* 458 (2009), Nr. 7242, S. 1171–5
- [Mahoney u. a. 2008] MAHONEY, T. R. ; LUO, S. ; ROUND, E. K. ; BRAUNER, M. ; GOTTSCHALK, A. ; THOMAS, J. H. ; NONET, M. L.: Intestinal signaling to GABAergic neurons regulates a rhythmic behavior in *Caenorhabditis elegans*. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 105 (2008), Nr. 42, S. 16350–5
- [Maricq u. a. 1995] MARICQ, A. V. ; PECKOL, E. ; DRISCOLL, M. ; BARGMANN, C. I.: Mechanosensory signalling in *C. elegans* mediated by the GLR-1 glutamate receptor. In: *Nature* 378 (1995), Nr. 6552, S. 78–81
- [Mellem u. a. 2002] MELLEM, J. E. ; BROCKIE, P. J. ; ZHENG, Y. ; MADSEN, D. M. ; MARICQ, A. V.: Decoding of polymodal sensory stimuli by postsynaptic glutamate receptors in *C. elegans*. In: *Neuron* 36 (2002), Dezember, Nr. 5, S. 933–944
- [Mello u. a. 1991] MELLO, C. C. ; KRAMER, J. M. ; STINCHCOMB, D. ; AMBROS, V.: Efficient gene transfer in *C. elegans*: extrachromosomal maintenance and integration of transforming sequences. In: *EMBO J* 10 (1991), Nr. 12, S. 3959–70
- [Miller 1999] MILLER, K.: G α and Diacylglycerol kinase negatively regulate the G α pathway in *C. elegans*. In: *Neuron* 24 (1999), Oktober, Nr. 2, S. 323–333

- [Miyabayashi u. a. 1999] MIYABAYASHI, T. ; PALFREYMAN, M. T. ; SLUDER, A. E. ; SLACK, F. ; SENGUPTA, P.: Expression and function of members of a divergent nuclear receptor family in *Caenorhabditis elegans*. In: *Developmental biology* 215 (1999), Nr. 2, S. 314–31
- [Nagel u. a. 2005] NAGEL, G. ; BRAUNER, M. ; LIEWALD, J. F. ; ADEISHVILI, N. ; BAMBERG, E. ; GOTTSCHALK, A.: Light activation of channelrhodopsin-2 in excitable cells of *Caenorhabditis elegans* triggers rapid behavioral responses. In: *Current biology : CB* 15 (2005), Nr. 24, S. 2279–84
- [Nagel u. a. 2002] NAGEL, G. ; OLLIG, D. ; FUHRMANN, M. ; KATERIYA, S. ; MUSTI, A. M. ; BAMBERG, E. ; HEGEMANN, P.: Channelrhodopsin-1: a light-gated proton channel in green algae. In: *Science* 296 (2002), Nr. 5577, S. 2395–8
- [Nagel u. a. 2003] NAGEL, G. ; SZELLAS, T. ; HUHN, W. ; KATERIYA, S. ; ADEISHVILI, N. ; BERTHOLD, P. ; OLLIG, D. ; HEGEMANN, P. ; BAMBERG, E.: Channelrhodopsin-2, a directly light-gated cation-selective membrane channel. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 (2003), Nr. 24, S. 13940–5
- [Nonet u. a. 1998] NONET, M. L. ; SAIFEE, O. ; ZHAO, H. ; RAND, J. B. ; WEI, L.: Synaptic transmission deficits in *Caenorhabditis elegans* synaptobrevin mutants. In: *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 18 (1998), Januar, Nr. 1, S. 70–80
- [Ogawa u. a. 1995] OGAWA, H. ; INOUE, S. ; TSUJI, F. I. ; YASUDA, K. ; UMESONO, K.: Localization, trafficking, and temperature-dependence of the *Aequorea* green fluorescent protein in cultured vertebrate cells. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 92 (1995), Nr. 25, S. 11899–903
- [Oh u. a. 2010] OH, E. ; MAEJIMA, T. ; LIU, C. ; DENERIS, E. ; HERLITZE, S.: Substitution of 5-HT_{1A} receptor signaling by a light-activated G protein-coupled receptor. In: *J Biol Chem* 285 (2010), Nr. 40, S. 30825–36
- [Pace u. a. 1985] PACE, U. ; HANSKI, E. ; SALOMON, Y. ; LANCET, D.: Odorant-sensitive adenylate cyclase may mediate olfactory reception. In: *Nature* 316 (1985), Juli, Nr. 6025, S. 255–258

- [Palczewski u. a. 2000] PALCZEWSKI, K. ; KUMASAKA, T. ; HORI, T. ; BEHNKE, C. A. ; MOTOSHIMA, H. ; FOX, B. A. ; LE TRONG, I. ; TELLER, D. C. ; OKADA, T. ; STENKAMP, R. E. ; YAMAMOTO, M. ; MIYANO, M.: Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor. In: *Science (New York, N.Y.)* 289 (2000), August, Nr. 5480, S. 739–745
- [Pavlov u. Georgij 1926] PAVLOV, I. P. ; GEORGIJ, F. V.: *Die hoechste Nerventaetigkeit (das Verhalten) von Tieren : Eine zwanzigjaehr. Pruefung d. objektiven Forschung ; Bedingte Reflexe.* J. Bergmann, Muenchen, 1926
- [Phelan 2005] PHELAN, P.: Innexins: members of an evolutionarily conserved family of gap-junction proteins. In: *Biochim Biophys Acta* 1711 (2005), Nr. 2, S. 225–45
- [Phelan u. a. 1998] PHELAN, P. ; BACON, J. P. ; DAVIES, J. A. ; STEBBINGS, L. A. ; TODMAN, M. G. ; AVERY, L. ; BAINES, R. A. ; BARNES, T. M. ; FORD, C. ; HEKIMI, S. ; LEE, R. ; SHAW, J. E. ; STARICH, T. A. ; CURTIN, K. D. ; SUN, Y. A. ; WYMAN, R. J.: Innexins: a family of invertebrate gap-junction proteins. In: *Trends Genet* 14 (1998), Nr. 9, S. 348–9
- [Piggott u. a. 2011] PIGGOTT, P. J. ; LIU, J. ; FENG, Z. ; WESCOTT, S. A. ; XU, X.Z S.: The Neural Circuits and Synaptic Mechanisms Underlying Motor Initiation in *C.Â elegans*. In: *Cell* 147 (2011), Nr. 4, S. 922–33
- [Pines 1995] PINES, J.: GFP in mammalian cells. In: *Trends Genet* 11 (1995), Nr. 8, S. 326–7
- [Pinsker u. a. 1970] PINSKER, H. ; KUPFERMANN, I. ; CASTELLUCCI, V. ; KANDEL, E.: Habituation and dishabituation of the gill-withdrawal reflex in *Aplysia*. In: *Science* 167 (1970), Nr. 3926, S. 1740–2
- [Rankin 2000] RANKIN, C. H.: Context conditioning in habituation in the nematode *Caenorhabditis elegans*. In: *Behavioral neuroscience* 114 (2000), Nr. 3, S. 496–505
- [Rankin u. a. 1990] RANKIN, C. H. ; BECK, C. D. ; CHIBA, C. M.: *Caenorhabditis elegans*: a new model system for the study of learning and memory. In: *Behavioural brain research* 37 (1990), Nr. 1, S. 89–92
- [Rankin u. Broster 1992] RANKIN, C. H. ; BROSTER, B. S.: Factors affecting habituation and recovery from habituation in the nematode *Caenorhabditis elegans*. In: *Behavioral neuroscience* 106 (1992), Nr. 2, S. 239–49

- [Richmond 2006] RICHMOND, J. E.: Electrophysiological recordings from the neuromuscular junction of *C. elegans*. In: *WormBook* (2006), S. 1–8
- [Ritter u. a. 2008] RITTER, E. ; STEHFEST, K. ; BERNDT, A. ; HEGEMANN, P. ; BARTL, F. J.: Monitoring light-induced structural changes of Channelrhodopsin-2 by UV-visible and Fourier transform infrared spectroscopy. In: *J Biol Chem* 283 (2008), Nr. 50, S. 35033–41
- [Rizzoli 2004] RIZZOLI, S. O.: The structural organization of the readily releasable pool of synaptic vesicles. In: *Science* 303 (2004), März, Nr. 5666, S. 2037–2039
- [Rogers u. a. 2003] ROGERS, C. ; REALE, V. ; KIM, K. ; CHATWIN, H. ; LI, C. ; EVANS, P. ; DEBONO, M.: Inhibition of *Caenorhabditis elegans* social feeding by FMRamide-related peptide activation of NPR-1. In: *Nature neuroscience* 6 (2003), Nr. 11, S. 1178–85
- [Rose u. a. 2002] ROSE, J. K. ; KAUN, K. R. ; RANKIN, C. H.: A new group-training procedure for habituation demonstrates that presynaptic glutamate release contributes to long-term memory in *Caenorhabditis elegans*. In: *Learning & Memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)* 9 (2002), Juni, S. 130–137
- [Saifee u. a. 1998] SAIFEE, O. ; WEI, L. ; NONET, M. L.: The *Caenorhabditis elegans* unc-64 locus encodes a syntaxin that interacts genetically with synaptobrevin. In: *Molecular Biology of the Cell* 9 (1998), Juni, Nr. 6, S. 1235–1252
- [Sauer 1987] SAUER, B.: Functional expression of the cre-lox site-specific recombination system in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. In: *Mol Cell Biol* 7 (1987), Nr. 6, S. 2087–96
- [Sauer 1998] SAUER, B.: Inducible gene targeting in mice using the Cre-lox system. In: *Methods (San Diego, Calif)* 14 (1998), Nr. 4, S. 381–92
- [Sawin u. a. 2000] SAWIN, E. R. ; RANGANATHAN, R. ; HORVITZ, H. R.: *C. elegans* locomotory rate is modulated by the environment through a dopaminergic pathway and by experience through a serotonergic pathway. In: *Neuron* 26 (2000), Juni, Nr. 3, S. 619–631
- [Schiavo u. a. 1992] SCHIAVO, G. ; BENFENATI, F. ; POULAIN, B. ; ROSSETTO, O. ; LAURETO, P. Polverino d. ; DASGUPTA, B. R. ; MONTECUCCO, C.: Tetanus and botulinum-B

- neurotoxins block neurotransmitter release by proteolytic cleavage of synaptobrevin. In: *Nature* 359 (1992), Nr. 6398, S. 832–5
- [Schmitt u. a. 2012] SCHMITT, C. ; SCHULTHEIS, C. ; HUSSON, S. J. ; LIEWALD, J. F. ; GOTTSCHALK, A.: Specific expression of channelrhodopsin-2 in single neurons of *Caenorhabditis elegans*. In: *PLoS One* 7 (2012), Nr. 8, S. e43164
- [Schofield u. a. 1987] SCHOFIELD, P. R. ; DARLISON, M. G. ; FUJITA, N. ; BURT, D. R. ; STEPHENSON, F. A. ; RODRIGUEZ, H. ; RHEE, L. M. ; RAMACHANDRAN, J. ; REALE, V. ; GLENCORSE, T. A.: Sequence and functional expression of the GABA A receptor shows a ligand-gated receptor super-family. In: *Nature* 328 (1987), Juli, Nr. 6127, S. 221–227
- [Schroder-Lang u. a. 2007] SCHRODER-LANG, S. ; SCHWARZEL, M. ; SEIFERT, R. ; STRUNKER, T. ; KATERIYA, S. ; LOOSER, J. ; WATANABE, M. ; KAUPP, U. B. ; HEGEMANN, P. ; NAGEL, G.: Fast manipulation of cellular cAMP level by light in vivo. In: *Nat Methods* 4 (2007), Nr. 1, S. 39–42
- [Schwarz u. a. 2009] SCHWARZ, V. ; PAN, J. ; VOLTMER-IRSCH, S. ; HUTTER, H.: Ig-CAMs redundantly control axon navigation in *Caenorhabditis elegans*. In: *Neural Development* 4 (2009), Nr. 1, S. 13
- [Sever u. a. 2000] SEVER, S. ; DAMKE, H. ; SCHMID, S. L.: Dynamin:Gtp controls the formation of constricted coated pits, the rate limiting step in Clathrin-mediated endocytosis. In: *The Journal of Cell Biology* 150 (2000), September, Nr. 5, S. 1137–1148
- [Shaham u. Bargmann 2002] SHAHAM, S. ; BARGMANN, C. I.: Control of neuronal subtype identity by the *C. elegans* ARID protein CFI-1. In: *Genes Dev* 16 (2002), Nr. 8, S. 972–83
- [Sherrington 1906] SHERRINGTON, C. S.: *The Integrative Action of the Nervous System*. Yale Univ. Press., 1906
- [Sieburth u. a. 2007] SIEBURTH, D. ; MADISON, J. M. ; KAPLAN, J. M.: PKC-1 regulates secretion of neuropeptides. In: *Nature Neuroscience* 10 (2007), Januar, Nr. 1, S. 49–57
- [Soellner u. a. 1993] SOELLNER, T. ; BENNETT, M. K. ; WHITEHEART, S. W. ; SCHELLER, R. H. ; ROTHMAN, J. E.: A protein assembly-disassembly pathway in vitro that may

- correspond to sequential steps of synaptic vesicle docking, activation, and fusion. In: *Cell* 75 (1993), November, Nr. 3, S. 409–418
- [Sonnhammer u. Durbin 1997] SONNHAMMER, E. L. ; DURBIN, R.: Analysis of protein domain families in *Caenorhabditis elegans*. In: *Genomics* 46 (1997), Dezember, Nr. 2, S. 200–216
- [Starich u. a. 1993] STARICH, T. A. ; HERMAN, R. K. ; SHAW, J. E.: Molecular and genetic analysis of *unc-7*, a *Caenorhabditis elegans* gene required for coordinated locomotion. In: *Genetics* 133 (1993), Nr. 3, S. 527–41
- [Starich u. a. 2009] STARICH, T. A. ; XU, J. ; SKERRETT, I. M. ; NICHOLSON, B. J. ; SHAW, J. E.: Interactions between innexins UNC-7 and UNC-9 mediate electrical synapse specificity in the *Caenorhabditis elegans* locomotory nervous system. In: *Neural Dev* 4 (2009), S. 16
- [Sternberg u. a. 1978] STERNBERG, N. ; AUSTIN, S. ; HAMILTON, D. ; YARMOLINSKY, M.: Analysis of bacteriophage P1 immunity by using lambda-P1 recombinants constructed in vitro. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 75 (1978), November, Nr. 11, S. 5594–5598
- [Stirman u. a. 2011] STIRMAN, J. N. ; CRANE, M. M. ; HUSSON, S. J. ; WABNIG, S. ; SCHULTHEIS, C. ; GOTTSCHALK, A. ; LU, H.: Real-time multimodal optical control of neurons and muscles in freely behaving *Caenorhabditis elegans*. In: *Nature Methods* 8 (2011), Nr. 2, S. 153–8
- [Sugi u. a. 2014] SUGI, Takuma ; OHTANI, Yasuko ; KUMIYA, Yuta ; IGARASHI, Ryuji ; SHIRAKAWA, Masahiro: High-throughput optical quantification of mechanosensory habituation reveals neurons encoding memory in *Caenorhabditis elegans*. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111 (2014), Dezember, Nr. 48, S. 17236–17241
- [Sulston u. Brenner 1974] SULSTON, J. E. ; BRENNER, S.: The DNA of *Caenorhabditis elegans*. In: *Genetics* 77 (1974), Nr. 1, S. 95–104
- [Sulston u. Horvitz 1977] SULSTON, J. E. ; HORVITZ, H. R.: Post-embryonic cell lineages of the nematode, *Caenorhabditis elegans*. In: *Dev Biol* 56 (1977), Nr. 1, S. 110–56

- [Sweitzer u. Hinshaw 1998] SWEITZER, S. M. ; HINSHAW, J. E.: Dynamin undergoes a GTP-dependent conformational change causing vesiculation. In: *Cell* 93 (1998), Juni, Nr. 6, S. 1021–1029
- [Swierczek u. a. 2011] SWIERCZEK, N. A. ; GILES, A. C. ; RANKIN, C. H. ; KERR, R. A.: High-throughput behavioral analysis in *C. elegans*. In: *Nat Methods* 8 (2011), Nr. 7, S. 592–8
- [Tavernarakis u. Driscoll 2001] TAVERNARAKIS, N. ; DRISCOLL, M.: Mechanotransduction in *Caenorhabditis elegans*: the role of DEG/ENaC ion channels. In: *Cell Biochem Biophys* 35 (2001), Nr. 1, S. 1–18
- [Thompson u. Spencer 1966] THOMPSON, R. F. ; SPENCER, W. A.: Habituation: a model phenomenon for the study of neuronal substrates of behavior. In: *Psychol Rev* 73 (1966), Nr. 1, S. 16–43
- [Timbers u. Rankin 2011] TIMBERS, Tiffany A. ; RANKIN, Catharine H.: Tap withdrawal circuit interneurons require CREB for long-term habituation in *Caenorhabditis elegans*. In: *Behavioral Neuroscience* 125 (2011), August, Nr. 4, S. 560–566
- [Troemel u. a. 1997] TROEMEL, E. R. ; KIMMEL, B. E. ; BARGMANN, C. I.: Reprogramming chemotaxis responses: sensory neurons define olfactory preferences in *C. elegans*. In: *Cell* 91 (1997), Nr. 2, S. 161–9
- [Ward u. a. 1975] WARD, S. ; THOMSON, N. ; WHITE, J. G. ; BRENNER, S.: Electron microscopical reconstruction of the anterior sensory anatomy of the nematode *Caenorhabditis elegans*. In: *J Comp Neurol* 160 (1975), Nr. 3, S. 313–37
- [Way u. Chalfie 1989] WAY, J. C. ; CHALFIE, M.: The *mec-3* gene of *Caenorhabditis elegans* requires its own product for maintained expression and is expressed in three neuronal cell types. In: *Genes & Development* 3 (1989), Dezember, Nr. 12A, S. 1823–1833
- [Wess 1997] WESS, J.: G-protein-coupled receptors: molecular mechanisms involved in receptor activation and selectivity of G-protein recognition. In: *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 11 (1997), April, Nr. 5, S. 346–354

- [White u. a. 1976] WHITE, J. G. ; SOUTHGATE, E. ; THOMSON, J. N. ; BRENNER, S.: The structure of the ventral nerve cord of *Caenorhabditis elegans*. In: *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 275 (1976), Nr. 938, S. 327–48
- [White u. a. 1986] WHITE, J. G. ; SOUTHGATE, E. ; THOMSON, J. N. ; BRENNER, S.: The structure of the nervous system of the nematode *caenorhabditis elegans*. In: *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 314 (1986), Nr. 1165, S. 1–340
- [Wicks u. Rankin 1995] WICKS, S. R. ; RANKIN, C. H.: Integration of mechanosensory stimuli in *Caenorhabditis elegans*. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 15 (1995), Nr. 3 Pt 2, S. 2434–44
- [Wurtz u. a. 1967] WURTZ, R. H. ; CASTELLUCCI, V. F. ; NUSRALA, J. M.: Synaptic plasticity: the effect of the action potential in the postsynaptic neuron. In: *Exp Neurol* 18 (1967), Nr. 3, S. 350–68
- [Yin u. a. 1994] YIN, J. C. ; WALLACH, J. S. ; DEL VECCHIO, M. ; WILDER, E. L. ; ZHOU, H. ; QUINN, W. G. ; TULLY, T.: Induction of a dominant negative CREB transgene specifically blocks long-term memory in *Drosophila*. In: *Cell* 79 (1994), Oktober, Nr. 1, S. 49–58
- [Zhang u. a. 2011] ZHANG, F. ; VIEROCK, J. ; YIZHAR, O. ; FENNO, L. E. ; TSUNODA, S. ; KIANIANMOMENI, A. ; PRIGGE, M. ; BERNDT, A. ; CUSHMAN, J. ; POLLE, J. ; MAGNUSON, J. ; HEGEMANN, P. ; DEISSEROTH, K.: The microbial opsin family of optogenetic tools. In: *Cell* 147 (2011), Nr. 7, S. 1446–57
- [Zhang u. a. 2004] ZHANG, S. ; MA, C. ; CHALFIE, M.: Combinatorial marking of cells and organelles with reconstituted fluorescent proteins. In: *Cell* 119 (2004), Nr. 1, S. 137–44
- [Zheng u. a. 1999] ZHENG, Y. ; BROCKIE, P. J. ; MELLEM, J. E. ; MADSEN, D. M. ; MARICQ, A. V.: Neuronal control of locomotion in *C. elegans* is modified by a dominant mutation in the GLR-1 ionotropic glutamate receptor. In: *Neuron* 24 (1999), Nr. 2, S. 347–61

Abkürzungsverzeichnis

Arch	Archaerhodopsin3 aus <i>Halorubrum sodomense</i>
AS	Aminosäure
ATR	<i>all-trans</i> Retinal
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
C1C2	Chimäres Molekül aus ChR1 und ChR2
C1V1	chimäres Molekül aus ChR1 und VChR1
C ₂ H ₃ KO ₂	Kaliumacetat
Ca ²⁺	Calciumion
CaCl ₂	Kalziumchlorid
cAMP	zyklisches Adenosintriphosphat
CatCh	Channelrhodopsinvariante mit erhöhter Kalziumleitfähigkeit
CFP	cyanfarben fluoreszierendes Protein
CGC	<i>C. elegans</i> genomic center
ChR	Channelrhodopsin
ChR1	Channelrhodopsin 1
ChR2	Channelrhodopsin 2
Cre	Cre-Rekombinase
CREB-1	cyclic AMP-response element binding protein 1
CRH-1	CREB Homolog
CS	konditionierter Stimulus
DA	Dalton
dATP	Desoxyriboadenosintriphosphat
dCTP	Desoxyribocytosintriphosphat
dGTP	Desoxyriboguanintriphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP's	Desoxyribonucleotidtriphosphat
dTTP	Desoxyribothymintriphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escharichia coli</i>
EAT-4	Name eines vesikulären Glutamat Transporters

EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EtOH	Ethanol
F1	Filialgeneration 1
F2	Filialgeneration 2
F3	Filialgeneration 3
g	Maß für die Erdanziehung
GFP	grün fluoreszierendes Protein
h	Stunden
H134R	Aminosäureaustausch von L-Histidin zu L-Arginin an Position 134
HCl	Salzsäure
HR	H134R
int.	integriert
ISI	Interstimulus Intervall
Kb	Kilobasenpaare
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
KHT-1	Untereinheit eines in den MRN's expremierten Kaliumkanals
KPO ₄	Kaliumphosphat
L132C	Aminosäureaustausch von L-Leucin zu L-Cystein an Position 132
m	Meter
m	milli
M	molar bzw. Molarität
Mac	Protonenpumpe aus <i>Leptosphaeria maculans</i>
mCherry	rot fluoreszierendes Protein
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
min	Minuten
MOPS	3-N-Morpholinopropansulfonsäure
MPS-1	Untereinheit eines in den MRN's expremierten Kaliumkanals
MRN	Mechanorezeptorneuron

MRNs	Mechanorezeptorneuronen
MWT	Multi Worm Tracker
n	nano
n.H.	nach Habituation
n.s.	nicht signifikant
N2	Wildtyp <i>C. elegans</i>
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NEB	New England Biolabs
NGM	Nematode Growth Media
NpHR	Halorhodopsin aus <i>Natronomonas pharaonis</i>
oCoS	Ordnungsnummer für Oligonukleotide
OD	optische Dichte
p	pico
pAG/pCoS/usw.	Ordnungsnummer für Plasmide
PC	Personal Computer
PCA	Phenol-Chlorophorm-Isoamyl-Alkohol
PCR	Polymerasekettenreaktion
RbCl	Rubidiumchlorid
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
sec	Sekunden
SEWLB	Puffer zur Lyse von einzelnen Würmern
SWT	Single Worm Tracker
T159C	Aminosäureaustausch von L-Threonin zu L-Cystein an Position 159
TAE	Tris-Acetat-EDTA
Tap	Stimulation durch antippen der Kulturschale
TC	T159C
TM	transmembran
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
u	units

unc	uncoordinated
US	unkonditionierter Stimulus
usw.	und so weiter
UV	ultraviolett
v.H.	vor Habituation
VChR1	Channelrhodopsin aus <i>Volvox</i>
zxEx	Ordnungsnummer für extrachromosomale Transgene
zxIs	Ordnungsnummer für integrierte Transgene
μ	mikro

Zusammenfassung

Habituation ist eine der einfachsten Formen des Gedächtnisses. Hierbei handelt es sich um die erlernte Gewöhnung an einen harmlosen Reiz. Dies bedeutet, dass nach mehrfacher wiederholter Repräsentation eines harmlosen Reizes die Reaktion darauf stetig abnimmt, bis sie völlig zum Erliegen kommt. Je nach Trainingsprotokoll kann diese Gewöhnung bis zu mehreren Tagen andauern. Habituation ist hoch konserviert und ein Verhaltensmuster, das auch bei sehr einfachen vielzelligen Organismen zu finden ist und untersucht werden kann. Zur Untersuchung des Zusammenspiels innerhalb eines neuronalen Netzwerkes, welches für die Habituation des Rückzugsreflexes (Ausweichreaktion nach Berührung) verantwortlich ist wurde hier der Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) als Modellorganismus verwendet. Aufgrund seines einfachen, nur 302 Zellen umfassenden, Nervensystems eignet sich *C. elegans* sehr gut für Grundlagenforschung in diesem Bereich.

Das neuronale Netzwerk, das verantwortlich ist für den Rückzugsreflex ist in drei Ebenen organisiert. Wahrgenommen wird der Reiz von sensorischen Neuronen (ASH, ALM, AVM, PLM, PVM). Die Weiterleitung erfolgt über verschiedene Interneuronen (AVA, AVB, AD, AVE, PVC) hin zu den Motorneuronen, welche die Muskeln innervieren und somit die Reaktion auf den in erster Ebene wahrgenommenen Reiz auslösen.

Mit Hilfe von optogenetischen Werkzeugen wurde hier untersucht welche Rolle das Interneuronenpaar AVA innerhalb dieses Netzwerkes spielt und an welche Zellen des Netzwerkes an der kurzzeitigen Habituation des Reizes, nach einem einfachen Lernprotokoll, beteiligt sind.

Zuerst musste eine Möglichkeit gefunden werden die zur Verfügung stehenden optogenetischen Werkzeuge zellspezifisch zu exprimieren. In dieser Arbeit wurden hierfür Rekombinasesysteme verwendet, die es ermöglichten zur Expression eine Kombination aus 2 verschiedenen Promotoren zu verwenden. Beide Promotoren dürfen hierbei nur in einer Zelle, der Zielzelle, überlappen. Es konnte zellspezifische Expression des Kationenkanals Channelrhodopsin 2 (ChR2) in den beiden Zellpaaren AVAL/R und ASHL/R (nimmt aversive Reize wahr) erreicht werden.

Zur Untersuchung der Habituation wurde zusätzlich noch ein Wurmstamm verwendet, welcher ChR2 unter dem *mec-4* Promotor exprimiert. ChR2 ist hier in den Mechanorezeptorneuronen (MRNs) ALM, AVM, PLM und PVM exprimiert. Die hier durchgeführten Experimente deuten darauf hin dass den MRNs die größte Rolle bei der Ausbildung einer Habituation zukommt. Es gibt jedoch auch Hinweise darauf,

dass AVA zusätzlich eine Rolle spielt.

Im weiteren Verlauf der Arbeit wurde die Rolle von AVA genauer untersucht. AVA gilt als der Hauptsignalgeber für eine Rückwärtsbewegung (spontan und nach Reizeingang). Es konnte gezeigt werden dass eine Unterbrechung der 'Gap Junctionen' zwischen AVA und PVC eine stärkere Reaktion zur Folge haben. AVA scheint also durch PVC inhibiert zu werden. Ebenfalls mit AVA direkt interagierende Neuronen sind AVD und AVE. Mit den hier zur Verfügung stehenden Mitteln konnte die genaue Modulation von AVA durch diese Zellen jedoch nicht gezeigt werden.

In dieser Arbeit konnte der Grundstein für eine funktionale Aufklärung des Nervensystems von *C. elegans* gelegt werden. Vor allem durch die Möglichkeit der zellspezifischen Expression kann es zukünftig gelingen das Zusammenspiel der einzelnen Nervenzellen und ihren Anteil an einem bestimmtem Verhalten zu untersuchen.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich herzlich bedanken

bei Herrn Prof. Dr. Alexander Gottschalk für die Möglichkeit diese Arbeit in seiner Arbeitsgruppe anzufertigen, so wie seine Unterstützung dabei auch schwierige Phasen zu meistern.

bei Herrn Prof. Dr. Robert Ernst für die Übernahme der Zweitkorrektur.

bei Frau Dr. Jana Liewald für ihren Rat und ihre Erfahrung die mir oft weitergeholfen haben.

bei der gesamten Arbeitsgruppe für die gute Atmosphäre, viele interessante Gespräche, die Beantwortung meiner Fragen, die unglaublichen Mengen an Kuchen und die vielen gemeinsam durchgestandenen Höhen und Tiefen.

bei Julia und Michael für die abschließende Rechtschreibkorrektur, mir ist bewusst, dass dies eine fast unbezwingbare Aufgabe ist.

bei meinen Freunden die mir beigebracht haben auch mal Pause zu machen und dass nicht immer alles auf Anhieb perfekt laufen muss.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern und Großeltern, die mir das Studium ermöglicht haben und mich beim Erreichen meines Abschlusses unterstützt haben.

Ohne Euch wäre ich nicht da wo ich jetzt bin!

Hiermit versichere ich, Cornelia Schmitt, dass ich die vorliegende Arbeit ausschließlich unter Zuhilfenahme der angegebenen Quellen und Hilfsmittel selbstständig verfasst habe.
Frankfurt, den

Cornelia Schmitt