

**Funktionelle Charakterisierung zweier  
Levamisolrezeptor-assoziiierter Proteine  
in *C. elegans* – NRA-2 und NRA-4**

Dissertation zur Erlangung des  
naturwissenschaftlichen Doktorgrades  
der Goethe-Universität Frankfurt

vorgelegt beim Fachbereich Biochemie, Chemie und Pharmazie  
der Johann Wolfgang Goethe-Universität  
in Frankfurt am Main

von  
Ruth B. Almedom  
aus Asmara

Frankfurt 2013

*Meinen Eltern Zufan und Bairu*

ይቸንዮላይ

Eingereicht am: .....

bei der Fakultät für Biochemie

1. Gutachter: .....

2. Gutachter: .....

der Dissertation

1. Prüfer: .....

2. Prüfer: .....

3. Prüfer: .....

des Öffentlichen Promotionskolloquiums

Tag des Öffentlichen Promotionskolloquiums: .....

Doktorurkunde ausgehändigt am: .....

---

Teile der vorliegenden Arbeit wurden veröffentlicht in:

1) **Ruta B Almedom**, Jana F Liewald, Guillermina Hernando, Christian Schultheis, Diego Rayes, Jie Pan, Thorsten Schedletzky, Harald Hutter, Cecilia Bouzat, and Alexander Gottschalk

*An ER-resident membrane protein complex regulates nicotinic acetylcholine receptor subunit composition at the synapse*

EMBO J. 2009 September 2; 28(17): 2636–2649.

2) Alexander Gottschalk, **Ruta B Almedom**, Thorsten Schedletzky, Scott D Anderson, John R Yates III and William R Schafer

*Identification and characterization of novel nicotinic receptor-associated proteins in *Caenorhabditis elegans**

EMBO J. 2005 Jul 20;24(14):2566-78

---

## **Erklärung**

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die Dissertation „Funktionale Charakterisierung zweier Levamisolrezeptor-assoziiierter Proteine in *C. elegans* – NRA-2 und NRA-4“ selbständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Ich erkläre außerdem, dass diese Dissertation weder in gleicher oder anderer Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Ich habe früher außer den mit dem Zulassungsgesuch urkundlich vorgelegten Graden keine weiteren akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht.

Frankfurt, den

Ruth Almedom

## Zusammenfassung

Nikotinische Acetylcholin Rezeptoren (nAChR) sind ligandengesteuerte Ionenkanäle der pentameren Cys-Loop Familie, welche nach Bindung des Neurotransmitters Acetylcholin exzitatorische Signale in Muskeln und Neuronen vermitteln.

Während die Funktion der Rezeptoren an der synaptischen Membran relativ gut untersucht wurde, gibt es bis heute kaum Erkenntnisse über die intrazellulären Prozesse und Proteine, die der selektiven Assemblierung von homologen Untereinheiten zu funktionalen Rezeptorpentameren zugrundeliegen. Folgende Fragen sind deshalb relevant: (i) Wie erfolgt die Selektion der richtigen Untereinheiten für eine Subtypkombination aus dem vielfältigen *pool* der möglichen Homologen? (ii) Wie wird sichergestellt, dass nur jeweils die richtige Subtypkombination zur richtigen Zeit an die synaptische Membran transportiert wird?

Das *C. elegans* Genom kodiert für mehr als 29 nAChR Untereinheiten-Gene und besitzt damit die größte Anzahl bekannter Homologe innerhalb der untersuchten Arten. An der neuromuskulären Synapse (NMJ) des Nematoden sind zwei Typen von nAChR bekannt: der heteromere Levamisolrezeptor (L-AChR) und der homomere Nikotinrezeptor (N-AChR). Innerhalb dieser Arbeit wurde der funktionale Zusammenhang zwischen den nikotinischen Rezeptoren der NMJ von *C. elegans* und einem neuen rezeptorassoziierten ER-Proteinkomplex der Proteine NRA-2 und NRA-4 untersucht. Ihre vertebraten Homologe Nicalin und Nomo wurden zuerst im Zebrafisch im Zusammenhang mit dem TGF- $\beta$  Signalweg beschrieben. Im Gegensatz dazu konnte hier eine direkte Wirkung der *C. elegans* Proteine NRA-2 und NRA-4 auf die nAChR Aktivität demonstriert werden, wobei der TGF- $\beta$  Signalweg nicht betroffen ist. Auch wirkt sich der Effekt auf die nACh-Rezeptoren nicht indirekt über den TGF- $\beta$  Signalweg aus, wie in Untersuchungen mit TGF- $\beta$  Mutanten im Vergleich zu *nra-2* Mutanten gezeigt werden konnte. Stattdessen hat die Einzel- und Doppel-Mutation der Proteine einen Agonist-spezifischen Einfluss auf die elektrophysiologischen Eigenschaften von L-AChR und N-AChR im adulten Muskel sowie in embryonalen Zellen. Die subzellulären Lokalisationsstudien demonstrierten, dass die beiden Proteine im ER von Muskelzellen wirken und dort mit Rezeptoruntereinheiten co-lokalisieren. Durch Quantifizierung der synaptischen Oberflächenmengen spezifischer,

fluoreszenzmarkierter Untereinheiten in Wildtyp und Mutanten ließ sich weiterhin nachweisen, dass die relative Menge der  $\alpha$ -Untereinheiten UNC-38 und UNC-29 an der synaptischen Oberfläche reduziert bzw. erhöht ist. Die relative Menge der Untereinheit LEV-1 des L-AChRs blieb jedoch unverändert. Diese Veränderung der Untereinheiten im funktionalen Subtyp schien direkt einen Einfluss auf die beobachtete Veränderung der Rezeptoraktivität in *nra-2* Mutanten zu haben. Neben den bekannten Untereinheiten der nAChR an der NMJ von *C. elegans* spielen hier offenbar noch weitere Untereinheiten eine Rolle. Die zusätzliche Mutation der Untereinheit *acr-8* in *nra-2* Mutanten revertiert den Einfluss der *nra-2* Einzelmutation auf die Aktivität des L-AChR. Vermutlich war die veränderte Aktivität in *nra-2* Mutanten zum Teil ein Resultat des Einbaus der ACR-8-Untereinheit in funktionale Pentamere. Im Wildtyp dagegen verhindert die Aktivität von NRA-2 (und NRA-4) wahrscheinlich den Einbau der zusätzlichen  $\alpha$ -Untereinheit ACR-8 in die Rezeptoren.

Basierend auf diesen Ergebnissen lässt sich die Hypothese formulieren, dass der NRA-2/NRA-4 Komplex im ER von *C. elegans* als Kontrollinstanz fungiert. Sie sorgt dafür, dass nur die jeweils „korrekten“ Untereinheiten in funktionale Rezeptoren eingebaut bzw. andere vom Einbau in das Pentamer abgehalten werden. Beim Fehlen aktiver NRA-2 bzw. NRA-4 Proteine in Mutanten kann es jedoch zu einem Verlust der Assemblierungskontrolle im ER kommen. Dies führt zur Integration von nicht vorgesehenen  $\alpha$ -Untereinheiten (z. B. ACR-8) in Pentamere, welche an die Oberfläche transportiert werden. Diese Pentamere mit neuer Stöchiometrie weisen veränderte Agonist Bindungseigenschaften der Rezeptoren gegenüber Wildtyp auf. Daraus leitet sich eine Veränderung der Aktivität und pharmakologischen Eigenschaften von nAChR ab.

# Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung.....	- 6 -
Inhaltsverzeichnis .....	- 8 -
1 Einleitung.....	- 1 -
1.1 Die nAChR der Vertebraten .....	- 1 -
1.1.1 Struktur .....	- 1 -
1.1.2 Muskuläre und Neuronale nAChR .....	- 3 -
1.1.3 Assemblierung von nAChR .....	- 6 -
1.1.3.1 Qualitätskontrolle und intrazellulärer Transport.....	- 7 -
1.2 Die neuromuskuläre Synapse .....	- 10 -
1.3 <i>C. elegans</i> - ein neurobiologischer Modellorganismus .....	- 13 -
1.3.1 Anatomie und Lebenszyklus .....	- 13 -
1.3.2 Ein genetisches Model für die Neurobiologie .....	- 14 -
1.3.3 Das neuromuskuläre System von <i>C. elegans</i> .....	- 16 -
1.3.3.1 Die neuromuskuläre Synapse von <i>C. elegans</i> .....	- 17 -
1.3.3.2 nAChR an der neuromuskulären Synapse.....	- 19 -
1.3.3.3 Der Levamisolrezeptor (L-AChR) und der Nikotinrezeptor (N-AChR) .....	- 19 -
1.3.4 Assemblierung und intrazellulärer Transport von nAChR.....	- 22 -
1.3.5 Zielsetzung.....	- 23 -
2 Material und Methoden.....	25
2.1 Material.....	25
2.1.1 Standards.....	25
2.1.2 Organismen.....	25
2.1.3 Antikörper.....	25
2.1.4 Enzyme .....	26
2.1.5 Oligonukleotide.....	26
2.1.6 Plasmide.....	27
2.1.7 Kits .....	28
2.1.8 Geräte .....	29
2.2 Methoden .....	- 30 -
2.2.1 Molekularbiologische Methoden.....	- 30 -

---

2.2.2	Klonierungen.....	- 31 -
2.2.3	Mikrobiologische Methoden.....	- 34 -
2.2.3.1	Kultivierung von <i>E. coli</i> .....	- 34 -
2.2.3.2	Herstellung transformationskompetenter <i>E. coli</i> .....	- 34 -
2.2.4	Zellkultur Methoden.....	- 35 -
2.2.4.1	Kultivierung und Transfektion von HeLa Zellen.....	- 35 -
2.2.5	Allgemeine biochemische Methoden.....	- 35 -
2.2.5.1	Affinitätsaufreinigung von Peptid-Antikörpern aus Kaninchenserum zum Nachweis endogener Proteine.....	- 35 -
2.2.5.2	SDS-Polyakrylamid Gelelektrophorese (PAGE), Western Blot und Immundetektion ...	- 37 -
2.2.5.3	Strippen von Immunoblots.....	- 40 -
2.2.5.4	Überprüfung der aufgereinigten Peptid-Antikörper im Western Blot.....	- 40 -
2.2.6	<i>Caenorhabditis elegans</i> Methoden.....	- 41 -
2.2.6.1	Generelle Handhabung und Kultivierung von <i>Caenorhabditis elegans</i> .....	- 41 -
2.2.6.2	Entfernen von Kontaminationen.....	- 42 -
2.2.6.3	Staging.....	- 42 -
2.2.6.4	Mutantenstämme.....	- 43 -
2.2.6.5	Transgene <i>C. elegans</i> Stämme.....	- 44 -
2.2.6.6	Ko-Injektionsmarker.....	- 45 -
2.2.6.7	RNAi.....	- 46 -
2.2.6.8	Lokomotion.....	- 47 -
2.2.6.9	Quantifizierung der Bewegungsrate in Flüssigkeit.....	- 47 -
2.2.6.10	Muscimol Assays.....	- 47 -
2.2.6.11	Nikotin- und levamisol -vermittelte Paralyse Assays.....	- 48 -
2.2.6.12	Statistik.....	- 48 -
2.2.6.13	Kreuzung.....	- 48 -
2.2.6.14	Genotypisierung.....	- 49 -
2.2.6.15	Biochemische <i>C. elegans</i> Methoden.....	- 51 -
2.2.6.16	Immunhistochemische <i>C. elegans</i> Methoden.....	- 51 -
2.2.6.17	Immunhistochemische Überprüfung der aufgereinigten Peptid-Antikörper.....	- 53 -
2.2.6.18	Quantifizierung von Fluoreszenz an Nervensträngen.....	- 56 -
2.2.6.19	Fluoreszenzmikroskopie.....	- 57 -
2.2.6.20	<i>Whole Cell Voltage Clamp</i> – Elektrophysiologie.....	- 57 -
2.2.6.21	<i>Single-Channel</i> Aufnahmen an embryonischen Muskel Zellen.....	- 57 -
3	Ergebnisse.....	- 59 -
3.1	NRA-2 und NRA-4: Gene, Allele und Proteine.....	- 59 -
3.1.1	Charakterisierung von <i>nra-2</i> und seinen Allelen <i>tm1453</i> und <i>ok1731</i> .....	- 59 -

---

3.1.2	Charakterisierung von <i>nra-4</i> und seinen Allelen <i>hd127</i> und <i>tm2656</i> .....	- 61 -
3.1.3	NRA-2 und NRA-4 sind Homologe von Nicalin und Nomo.....	- 63 -
3.2	<i>Nra-2</i> , und <i>nra-4</i> Mutanten beeinflussen die Aktivität des nAChR in <i>C. elegans</i> .....	- 67 -
3.2.1	RNAi <i>knock down</i> von <i>nra-2</i> und <i>nra-4</i> erzeugt Resistenz gegenüber cholinergen Agonisten.....	- 68 -
3.2.2	Mutation von <i>nra-2</i> und <i>nra-4</i> führt zu signifikanter Resistenz gegenüber Nikotin und Levamisol .....	- 69 -
3.2.3	Einfluss von NRA-2 und NRA-4 auf den UNC-129 abhängigen TGF- $\beta$ Signalweg.....	- 71 -
3.2.4	Einfluss von NRA-2 und NRA-4 auf den GABA <sub>A</sub> Rezeptor Signalweg .....	- 72 -
3.2.5	Lokomotionsanalyse der <i>nra-2</i> und <i>nra-4</i> Mutanten .....	- 73 -
3.2.6	Cholinerge Einwärtsströme in <i>nra-2</i> und <i>nra-4</i> Mutanten sind signifikant reduziert .....	- 75 -
3.3	Analyse der subzellulären Lokalisation von NRA-2 und NRA-4 .....	- 78 -
3.3.1	Die Promotoren von <i>nra-2</i> und <i>nra-4</i> exprimieren in Muskeln, Neuronen und anderen Zelltypen.....	- 78 -
3.3.2	NRA-2 und NRA-4 lokalisieren in ER-ähnlichen Strukturen in <i>C. elegans</i> Muskelzellen ...	- 80 -
3.3.3	Analog zum Vertebraten homologen Nicalin lokalisiert NRA-2::EGFP im ER von HELA Zellen.....	- 82 -
3.3.4	NRA-2::GFP lokalisiert nicht an der postsynaptischen Membran.....	- 83 -
3.3.5	NRA-2::mCHERRY zeigt keine Co-Lokalisation mit dem ERES Marker SEC-23::GFP ....	- 85 -
3.3.6	NRA-2 co-lokalisiert mit Untereinheiten des Levamisol-Rezeptors im ER, jedoch nicht an der Postsynapse .....	- 87 -
3.4	Einfluss von <i>nra-2</i> und <i>nra-4</i> auf cholinerge Neurotransmission in Mutanten essentieller und nicht-essentieller N- und L-AChR Untereinheiten.....	- 90 -
3.4.1	Einfluss von <i>nra-2</i> auf Lokomotion und Agonist-induzierte Paralyse in Mutanten essentieller N- und L-AChR Untereinheiten .....	- 91 -
3.4.2	Die Mutation von <i>nra-2</i> hat eine Erhöhung der Acetylcholin-Sensitivität von L-AChR und N-AChR zur Folge .....	- 93 -
3.4.3	Eigenschaften einzelner L-AChR Kanäle in <i>nra-2</i> Mutanten sind verändert.....	- 95 -
3.4.4	Einfluss von <i>nra-2</i> auf Paralyse- und Lokomotion von Mutanten nicht-essentieller Rezeptoruntereinheiten .....	- 98 -
3.5	Mechanismus des Wirkens von NRA-2 und NRA-4 auf nAChR- Untereinheiten in <i>C. elegans</i> -	102 -
3.5.1	NRA-2 und RIC-3 agieren in unterschiedlichen Signalwegen imER .....	- 103 -
3.5.2	NRA-2 beeinflusst die Zusammensetzung von nAChR Untereinheiten .....	- 104 -
4	Diskussion.....	- 109 -
4.1	Genomische Deletionsmutanten : <i>nra-2</i> und <i>nra-4</i> .....	- 113 -
4.2	NRA-2/NRA-4 im Vergleich mit den Homologen Nicalin/Nomo.....	- 115 -
4.2.1	Funktionaler Vergleich der Proteinkomplexe.....	- 115 -
4.2.2	Einfluss der Lokalisation und Expression auf die Funktionalität .....	- 117 -

---

4.3	Aktivität von nAChR-auf der Ebene einzelner Kanäle .....	- 118 -
4.4	Regulation der Untereinheitenzusammensetzung von synaptischen nAChR.....	- 120 -
4.4.1	Einfluss der Verfügbarkeit von Untereinheiten auf die Pentamer-Stöchiometrie.....	- 121 -
4.4.2	Einfluss von NRA-2 und NRA-4 auf die Assemblierung von verfügbaren Untereinheiten im ER.....	- 122 -
4.4.3	Protein-vermittelte Assemblierungs-Kontrolle.....	- 124 -
4.5	Das Modell .....	- 125 -
4.6	Ausblick .....	- 128 -
5	Literaturverzeichnis .....	- 130 -
	Abkürzungsverzeichnis .....	- 146 -
6	Danksagung.....	- 148 -
7	Lebenslauf.....	- 149 -

# 1 Einleitung

## 1.1 Die nAChR der Vertebraten

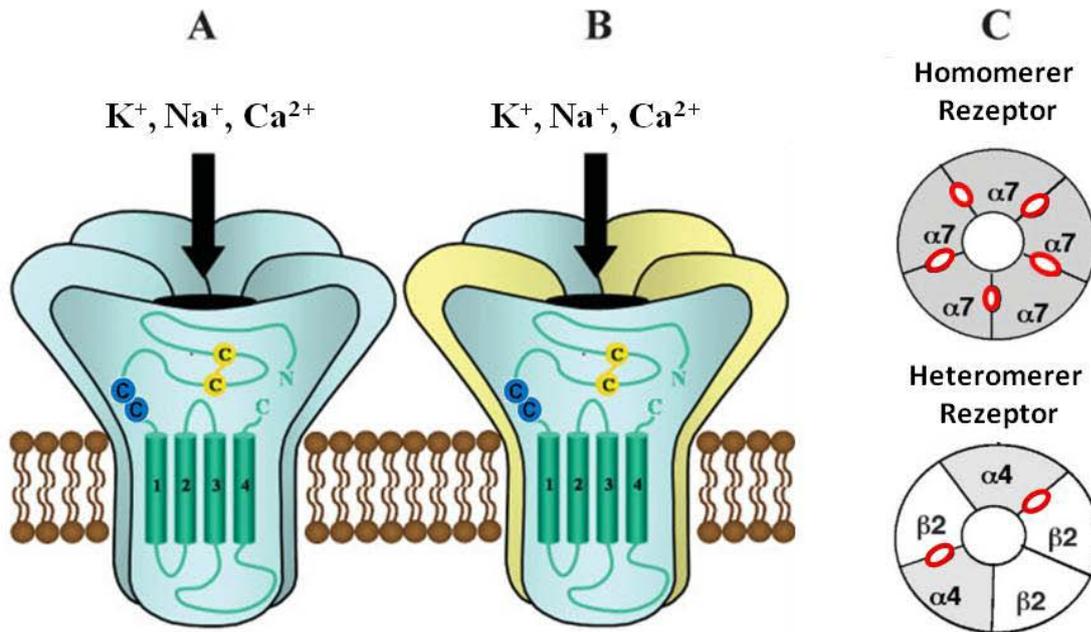
### 1.1.1 Struktur

Nikotinische Acetylcholinrezeptoren (nAChR) gehören zur Superfamilie der *Cys-Loop* Liganden-gesteuerten Ionenkanäle (*Cys-Loop LGICs*) (Kalamida et al., 2007) und ermöglichen schnelle, synaptische Signalweiterleitungen in Invertebraten und Vertebraten über eine transiente Erhöhung der Kationenpermeabilität an der Membran (Fleming et al., 1997; Lena and Changeux, 1998; Richmond and Jorgensen, 1999).

Die Superfamilie der pentameren *LGIC* besteht aus zwei Familien kationenselektiver Kanäle, den nAChR und Serotonin/5-Hydroxytryptamin Rezeptoren (5-HT) und zwei Familien anionenselektiver Kanäle, den  $\gamma$ -Aminobuttersäure (GABA)- und Glycin-Rezeptoren (Darlison et al., 2005; Kirsch, 2006; Lester et al., 2004; Ortells and Lunt, 1995; Reeves and Lummis, 2002).

Alle *Cys-Loop LGICs* sind Pentamere, welche einen zentralen Ionenkanal umgeben. Sie sind entweder aus fünf gleichen Untereinheitentypen zu homomeren oder aus bis zu vier verschiedenen Untereinheitentypen zu heteromeren Rezeptoren zusammengesetzt (Changeux; Gotti et al., 2009; Kalamida et al., 2007; Tsetlin and Hucho, 2009; Unwin, 1995) (siehe Abbildung 1). Alle Untereinheiten bestehen aus vier transmembranen Segmenten (M1-M4) und der N-terminalen, extrazellulären Liganden-Bindungsdomäne so wie einer charakteristischen Cysteinschleife nahe der Transmembrandomäne, dem *Cys-Loop* (Devillers-Thiery et al., 1993). Der Namensgebende *Cys-Loop* ist ein hochkonserviertes Signaturelement aus einer Disulfid-Brücke, die aus zwei Cysteinen mit einem Abstand von 13 Aminosäureresten gebildet ist (Karlin, 2002; Miyazawa et al., 1999) (Cys-Loop Gene Ontology ID:GO 0005230) (siehe Abbildung 1 A und B, blau).

Ein intrazellulär gelegener *Loop* (Schleife) zwischen M3 und M4 spielt eine Rolle bei der Assemblierung von Rezeptoren und der Modulation ihrer Funktion (Valor et al., 2002; Yu and Hall, 1994) (Siehe Abbildung 1).



**Abbildung 1: Struktur des nikotinischen Acetylcholinrezeptors.** (A) und (B) Schematische Darstellung des homomeren bzw. heteromeren nAChRs bestehend aus fünf Untereinheiten ( $\alpha$ -Untereinheiten: blau; nicht- $\alpha$ -Untereinheiten: hellgelb; Cys-Loop: blau; Doppel-Cystein Motiv: gelb). (C) Untereinheitenzusammensetzung in homomeren und heteromeren Rezeptoren und Lokalisation der ACh-Bindestelle (rot). Abbildung adaptiert aus (Jones and Sattelle, 2004) und (Gotti and Clementi, 2004).

In nAChR wird die Liganden-Bindestelle von verschiedenen Regionen (A-F Loops) der N-terminalen Domäne gebildet, wobei zwei aufeinanderfolgende Cysteine im C-Loop (Doppel-Cystein Motiv, siehe Abbildung 1 A und B, gelb markiert) für die Bindung des Agonisten Acetylcholin essentiell sind (Kao et al., 1984; Kao and Karlin, 1986).

Untereinheiten mit dem Doppel-Cystein Motiv werden  $\alpha$ -Untereinheiten genannt, während diejenigen Untereinheiten, denen das Motiv fehlt, zu den nicht- $\alpha$ -Untereinheiten gehören ( $\beta$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$  und  $\gamma$ ). Sowohl  $\alpha$ - als auch nicht- $\alpha$ -Untereinheiten tragen zur pharmakologischen Spezifität der resultierenden nAChR Subtypen bei (Luetje and Patrick, 1991). Die Liganden-Bindestellen befinden sich jeweils an der Schnittstelle zwischen einer  $\alpha$ - und ihrer benachbarten nicht- $\alpha$ -Untereinheit (siehe Abbildung 1 C). Wegen ihrer strukturellen Unterschiede haben die verschiedenen nicht- $\alpha$ -Untereinheiten in heteromeren Rezeptoren Auswirkungen auf die Affinität der ACh-Bindestellen im funktionalen Subtyp (Blount and Merlie, 1989; Changeux and Edelstein, 1998; Corringer et al., 2000; Papke et al., 1993; Sine, 2002). Zur Bildung eines funktionalen Rezeptors müssen mindestens zwei Liganden-Bindungsstellen in einem Pentamer besetzt sein. Nur dann wird der Rezeptor aktiviert und

eine transiente Öffnung des integralen Kationenkanals induziert (Hille, 1992; Miyazawa et al., 2003; Unwin, 1995).

Die Rolle von nAChR bei der cholinergen Neurotransmission an Muskeln und Neuronen von Vertebraten und Invertebraten ist bereits gut charakterisiert (Changeux and Edelstein, 1998). Allerdings lässt die Expression dieser Rezeptoren in nicht-neuronalen Zellen wie Haut-Keratinocyten, epithelialen Zellen der Bronchien (Macklin et al., 1998), endothelialen Zellen des arteriellen Systems (Bruggmann et al., 2002) und Makrophagen (Wang et al., 2003) auf noch weitere bisher unbekannte Funktionen für nAChR schließen (Wessler and Kirkpatrick, 2008).

Begünstigt wird diese große Diversität in Funktion und Pharmakologie der nikotinischen Acetylcholinrezeptoren durch die Vielfalt der möglichen  $\alpha$ -Untereinheiten und das Vorhandensein von nicht- $\alpha$ -Untereinheiten verschiedenen Typs (Boyd, 1997).

### **1.1.2 Muskuläre und Neuronale nAChR**

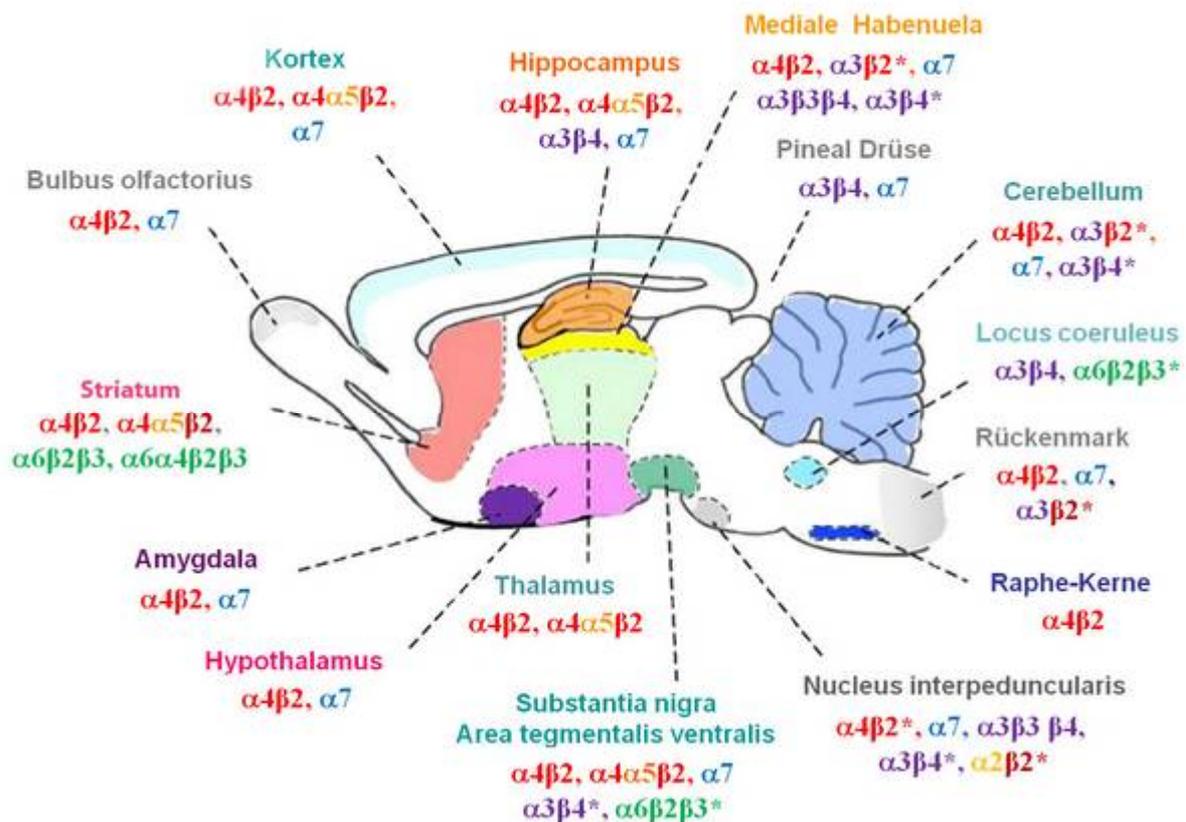
Bisher ließen sich 17 Gene für Rezeptor-Untereinheiten in Vertebraten identifizieren (Millar, 2003). Dabei formen die Untereinheiten  $\alpha 2$ – $\alpha 10$  und  $\beta 2$ – $\beta 4$  den neuronalen Typ und die Untereinheiten des Typs  $\alpha 1$ ,  $\beta 1$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  und  $\epsilon$  den Muskeltyp (Dani and Bertrand, 2007; Le Novere et al., 2002).

Der muskuläre nAChR lokalisiert in hoher Dichte an der neuromuskulären Synapse (Corringer et al., 2000; Huh and Fuhrer, 2002). Die nAChR der neuromuskulären Synapse sind entscheidend für die Kommunikation von Gehirn zu Muskel: Sie ermöglichen synaptische Transmission durch Anregung der neuromuskulären Endplattenpotentiale, die zu Aktionspotentialen und Kontraktionen der Skelettmuskelzellen führen. Bis heute wurde jeweils nur ein funktionaler nAChR-Subtyp im embryonalen bzw. im adulten Muskel identifiziert ( $2\alpha 1\beta 1\gamma\delta$  bzw.  $2\alpha 1\beta 1\epsilon\delta$ ) (Dani and Bertrand, 2007; Mishina et al., 1986; Plazas et al., 2005).

Die bekannten Untereinheiten und Subtypen neuronaler nAChR sind weitaus komplexer. Ihre Untereinheiten  $\alpha 2$ – $\alpha 10$  und  $\beta 2$ – $\beta 4$  sind homolog zu den muskulären Rezeptoruntereinheiten. Durch die Vielfalt an nAChR- Homologen ergibt sich bei neuronalen nAChR eine große Diversität der Untereinheitenzusammensetzung (Le Novere et al., 2002; Millar, 2003). Die Untereinheiten kombinieren in verschiedenen Stöchiometrien zu funktionalen, neuronalen nAChR Pentameren, welche im gesamten peripheren (PNS) und zentralen Nervensystem

(ZNS) zu finden sind (Corringer et al., 2000; Ortells and Lunt, 1995; Sargent, 1993; Sgard et al., 2002) (siehe Abbildung 2).

In Vertebraten erfolgt die Nomenklatur der Subtypen entsprechend der Komposition ihrer Untereinheiten, ohne auf die Stöchiometrie einzugehen (Beispielweise bezeichnet  $\alpha 4\beta 2$  Rezeptoren, in denen nur  $\alpha 4$  und  $\beta 2$  Untereinheiten vorkommen). Gibt es für einen Subtypen keine klare Definition, wird das durch ein Sternchen angezeigt (siehe Abbildung 2: violett =  $\alpha 3\beta 4^*$ ) (Luetje, 2004; Luetje and Patrick, 1991; Lukas et al., 1999).



**Abbildung 2:** Typen und Lokalisationen bekannter nAChR im ZNS. Abbildung adaptiert von Cecilia Gotti ([http://www.in.cnr.it/project\\_data.php?PID=42](http://www.in.cnr.it/project_data.php?PID=42)).

Die Stöchiometrie der exprimierten Untereinheiten kann die pharmakologischen Eigenschaften des funktionalen Rezeptors beeinflussen (Gotti et al., 2006; Kuryatov et al., 2008; Steinlein and Bertrand, 2008). Basierend darauf identifizierten pharmakologische Studien mit  $\alpha$ -Bungarotoxin ( $\alpha$ -BgTx) in Vertebraten zwei Klassen von neuronalen nAChR (Lukas and Bencherif, 1992). Diese Substanz ist ein Inhaltsstoff des Gifts der Natter *Bungarus multicinctus*, welches eine kovalente Bindung mit muskulären nAChR eingeht und durch Inhibition ihrer Funktion eine Muskelparalyse verursacht (Barnard et al., 1977). Mit Hilfe dieser Substanz wurden die neuronalen nAChR in die Klassen der  $\alpha$ -BgTx-sensitiven und -nichtsensitiven Rezeptoren unterteilt:

Die  $\alpha$ -BgTx-sensitiven homomeren und heteromeren Rezeptoren bilden die Mitglieder der ersten Klasse neuronaler nAChR, bestehend aus den Untereinheiten  $\alpha 7$ ,  $\alpha 8$ ,  $\alpha 9$  und/oder  $\alpha 10$ . Sie weisen eine geringe Affinität zur Bindung von Nikotin und anderen nikotinischen Agonisten auf. Die Klasse der  $\alpha$ -BgTx-insensitiven Rezeptoren bilden die ausschließlich heteromeren Rezeptoren aus den Untereinheiten  $\alpha 2-6$  und  $\beta 2-4$ . Rezeptoren dieser Klasse binden Nikotin und andere nikotinische Agonisten mit hoher Affinität (Gotti and Clementi, 2004; Gotti et al., 2007; Lindstrom, 2000).

Die Vielfalt der Untereinheiten ermöglicht eine Vielzahl an neuronalen Rezeptor Subtypkombinationen mit verschiedenen strukturellen, funktionellen und pharmakologischen Eigenschaften. Zu den wichtigsten neuronalen Rezeptoren in Säugern gehören  $\alpha 3\alpha 5\beta 4$  und  $\alpha 4\beta 2$  Kombinationen, die vor allem an der Postsynapse von autonomen, ganglionären Neuronen schnelle, cholinerge Neurotransmissionen vermitteln (Jones et al., 1999; Le Novere et al., 2002; Lindstrom, 2000, 2003) (siehe Abbildung 2).

Die Untersuchung der Zusammensetzung und Lokalisation von nAChR Pentamer-Subtypen und deren Einfluss auf ihre Funktion ist auch im Fokus der (medizinischen) Forschung. Grund dafür ist die Korrelation von einigen humanen, neuropathologischen Krankheiten mit Veränderungen der nAChR-Gene oder ihrer Expression, wie beispielsweise bei einer Form der Epilepsie (Bertrand, 2002), dem Schizophrenie Syndrom (Freedman et al., 1997) und Autismus (Perry et al., 2001). Weiterhin wurden die nAChR in Zusammenhang mit Krankheiten wie Parkinson (Anglade and Whitcup, 1995; Anglade et al., 1993; Quik et al., 2004), Alzheimer (Bierer et al., 1995; Perry et al., 1995; Perry et al., 1990; Terzano et al., 1998) und dem Tourette Syndrom (Picciotto and Zoli, 2002) gebracht. Nicht zu vergessen ist die am weitesten verbreitete nAChR-assoziierte Pathologie: die Nikotinabhängigkeit (Dani and De Biasi, 2001; Dani et al.; Laviolette and van der Kooy, 2004).

Bei der Untersuchung von nAChR-assoziierten Krankheiten erweist es sich jedoch als besonders schwierig, die jeweiligen Phänotypen und Symptomatiken, ausschließlich basierend auf pharmakologischen Antworten, spezifischen Rezeptor-Subtypen oder Untereinheiten zuzuordnen. Denn zum einen fehlen untereinheitenspezifische Liganden und zum anderen werden in vielen Neuronen multiple Subtypen exprimiert (Conroy and Berg, 1995; Hogg and Bertrand, 2004).

Ein erfolgreicher Ansatz der Untersuchung der subtyp- bzw untereinheitenspezifischen Rezeptorantwort gelang mit der Herstellung von *knock-out* Mäusen, welchen ein oder mehr

Gene für bestimmte nAChR Untereinheiten fehlten. Gezielte, quantitative Re-Expression („*knock-back*“) der jeweils deletierten nAChR Untereinheiten im Gehirn der *knock-out* Mäuse und anschließende elektrophysiologische Untersuchungen wiesen nach, dass bestimmte Untereinheiten für bestimmte Funktionen verantwortlich sind. Darüberhinaus konnten einige Zusammenhänge zwischen der Funktionalität, Lokalisation und Nikotin-Pharmakologie von bestimmten Subtypen sowie ihrem Einfluss auf das Verhalten in komplexen, neurobiologischen Systemen erkannt werden (Mameli-Engvall et al., 2006; Maskos et al., 2005).

### 1.1.3 Assemblierung von nAChR

Die Oligomerisierung von funktionalen nAChR erfolgt im ER und erfordert einen geordneten Ablauf der Assemblierung von korrekten Untereinheiten in der richtigen Reihenfolge (Green and Millar, 1995; Millar and Harkness, 2008; Smith et al., 1987). Nach ihrer Assemblierung im ER werden die Rezeptoren mit Hilfe von COPII Vesikeln auf dem sekretorischen Weg zur synaptischen Membran transportiert. Dort aggregieren sie als Antwort auf ein neuronales Signal, indem die Rezeptoren über Interaktion mit den Proteinen Rapsyn und Dystroglykan mit dem Cytoskelett verankert werden (Borges et al., 2008; Burden et al., 1983; Goldman et al., 1988; McMahan, 1990; Nitkin et al., 1987; Smith et al., 1987).

Die Assemblierung der Untereinheiten im ER ist streng reguliert. Nur die korrekt assemblierten Pentamere können das ER verlassen und werden zum Golgi-Apparat transportiert. Jedoch ist der genaue Mechanismus bisher nicht vollständig geklärt und zudem besonders komplex bei LGICs. Denn bereits im frühen Stadium ist eine strenge Qualitätskontrolle der Rezeptor Assemblierung erforderlich, um sicherzustellen, dass sich die richtigen Untereinheiten zusammenfinden und nur funktionale Rezeptoren an die Zelloberfläche transportiert werden (Green and Millar, 1995). Dieser hochregulierte Prozess ist essentiell zur Etablierung und Erhaltung einer effizienten synaptischen Transmission. Jedoch ist er durch die strenge Qualitätskontrolle auch relativ ineffizient. Beispielsweise erreichen in Maus-Muskelzellen nur 30% der vorliegenden Untereinheiten in funktionalen Rezeptoren die synaptische Oberfläche (Merlie and Lindstrom, 1983).

Bisher haben vor allem Untersuchungen zur Assemblierung des nAChR aus vertebreten Skelettmuskeln zur Aufklärung dieser Prozesse im ER beigetragen. Im Vergleich zu den neuronalen Vorgängen ist die Koordination der Untereinheitenassemblierung im adulten Muskel vereinfacht, da lediglich ein Subtyp exprimiert wird. Die Zusammensetzung muskulärer nAChR wird durch diese Limitierung zu einem geordneten Prozess, bei dem sich

die Untereinheiten in einer fixierten Stöchiometrie und auf streng kontrollierte Art und Weise zusammenfügen (Green and Millar, 1995; Wang and Abood, 1996). Bei der Assemblierung spielen die Bindungsaffinitäten der Untereinheiten zueinander eine maßgebliche Rolle, wie verschiedene *in vitro* Studien belegen (Green and Millar, 1995).

Zurzeit werden zwei Modelle der Assemblierung muskulärer nAChR beschrieben: Nach dem *heterodimer* Modell formieren sich zuerst  $\alpha\gamma$  und  $\alpha\delta$  Dimere, die sich zu  $\alpha\gamma\alpha\delta$  Tetrameren zusammenlagern und schließlich durch den Einbau der  $\beta$ -Untereinheit ein vollständiges Pentamer bilden (Green and Millar, 1995; Wanamaker et al., 2003). Dem sequentiellen Modell zufolge lagern sich zuerst  $\alpha\gamma\beta$  Trimere zusammen, gefolgt von einem Einbau der  $\delta$ -Untereinheit zum Tetramer und dem finalen Einbau der zweiten  $\alpha$ -Untereinheit zum Pentamer (Wanamaker et al., 2003). Die initiale Zusammenlagerung der Untereinheiten zum Dimer scheint dabei eine Konformationsänderung zu bewirken. Sie erhöht seine Stabilität und induziert eine Steigerung seiner Affinität zum dritten (bzw. vierten) Bindungspartner (Green and Claudio, 1993; Paulson et al., 1991; Wanamaker et al., 2003).

Die große Zahl neuronaler nAChR Untereinheiten dagegen erfordert sicherlich zusätzliche Kontrollmechanismen bei der Regulation. Denn von den vielen potentiell möglichen Kombinationen wurden bisher nur wenige funktionale Subtypen tatsächlich identifiziert (Gotti et al., 2007). Möglicherweise spielt der lange, cytoplasmatische Loop zwischen den transmembran Domänen M3 und M4 eine Rolle. Dieser enthält Sequenzen, welche in jeder Untereinheit einzigartig sind. Aminosäurereste im cytoplasmatischen Loop, nahe dem intrazellulären Ende von M4, beeinflussen die Assemblierung von Untereinheiten sowie elektrophysiologische Eigenschaften der Rezeptoren (Castelan et al., 2007; Kuo et al., 2005; Valor et al., 2002; Yu and Hall, 1994).

Zugesprochen werden den intrazellulären Loops unter anderem auch Rollen in der Regulation des intrazellulären nAChR Transports (Keller et al., 2001; Ren et al., 2005; Temburni et al., 2000; Williams et al., 1999; Williams et al., 1998; Xu et al., 2006) und bei der Interaktion mit dem Cytoskelett zum *Clustering* von Rezeptoren (Bencherif and Lukas, 1993; Feng et al., 1998; Maimone and Enigk, 1999; Yu and Hall, 1994).

#### 1.1.3.1 Qualitätskontrolle und intrazellulärer Transport

Die allgemeine und spezifische Assemblierungs- und Qualitätskontrolle der nAChR Reifung beginnt bereits innerhalb des ER. Chaperone wie Hsp70/Bip und Calnexin vermitteln die korrekte Faltung und Assemblierung von Proteinen und verhindern Aggregationen und Interaktionen von und mit falsch gefalteten Proteinen (Blount and Merlie, 1991; Chang et al.,

1997; Forsayeth et al., 1992; Gelman et al., 1995; Keller et al., 1996; Keller and Taylor, 1999). Untereinheiten mit fehlerhafter Faltung, falscher Interaktion oder inkorrekt Assemblierung werden durch das Degradationssystem im ER (ERAD: ER-assoziierte Degradation) abgebaut (Christianson and Green, 2004; Wanamaker et al., 2003).

Beim Transport von ER zur Plasmamembran tragen weitere Proteine zur Qualitätskontrolle von Rezeptoren bei: Rapsyn ist bekannt als ein cytoplasmatisches Protein, welches nAChR an der synaptischen Membran aggregiert. Zusätzlich wurde ihm eine Rolle als Chaperon bei der Zielfindung von assemblierten Muskel-nAChR von ER zu Plasmamembran nachgewiesen (Borges et al., 2008; Marchand et al., 2002).

Weiterhin erlauben spezifische, intrinsische Motive der nAChR Untereinheiten eine Kontrolle der korrekten Assemblierung: Das ER-Retentionssignal in der ersten transmembran Domäne jeder Untereinheit und ER-Exportsignale im großen intrazellulären Loop zwischen M3 und M4 (Keller et al., 2001; Wang et al., 2002). In ordnungsgemäß gefalteten und oligomerisierten Untereinheiten wird das Retentionssignal maskiert. Auf diese Weise wird ein Weitertransport aus dem ER in den Golgi-Apparat gewährleistet bzw. eine ER-Retention verhindert (Keller et al., 2001; Ren et al., 2005; Wang et al., 2002). Innerhalb des Golgi-Apparates spielen die 14-3-3 Proteine eine Rolle. Denn sie regulieren den Weitertransport bzw. die ER Retention von nACh-Rezeptoren mittels Maskierung bzw. Demaskierung von COPII Erkennungssequenzen auf dem Rezeptor (Jeanclos et al., 2001; Mrowiec and Schwappach, 2006).

Die 14-3-3 Proteine sind bereits an der Regulation der Rezeptoren innerhalb des ER beteiligt. Sie binden spezifisch an phosphorylierte  $\alpha 4$ -nAChR Untereinheiten und stabilisieren diese so in dem Kompartiment (Jeanclos et al., 2001; Mrowiec and Schwappach, 2006). Dieser Mechanismus regt seinerseits die Assemblierung von  $\alpha 4\beta 2$ -nAChRs im ER an, welche dann vermehrt an die Oberfläche transportiert werden (Bermudez and Moroni, 2006).

Auch beim Transport vom Golgi-Apparat zur Plasmamembran sind intrinsische Sequenzmotive von Bedeutung (Ren et al., 2005; Xu et al., 2006). Wichtig für den Transport neuronaler  $\alpha 4\beta 2$  nAChR sind dabei zwei hydrophobe Reste im cytoplasmatischen Loop der Untereinheiten  $\alpha 4$  und  $\beta 2$  (Ren et al., 2005).

Viele der Regulationsmechanismen werden durch externe Faktoren, wie die Aktivierung membranständiger Rezeptoren induziert. Eine Erhöhung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$  Konzentration, wie sie nach Depolarisation der Zelle vorkommt, induziert den verstärkten Transport von nAChR vom Golgi-Apparat an die Zelloberfläche (Lin et al., 2002).

Vermutlich reguliert das Protein VILIN-1 im Golgi-Apparat den  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Transport verschiedener Rezeptoren an die Oberfläche (Coussen et al., 2005; Lin et al., 2002; Nashmi et al., 2003; Zhao et al., 2009). Weitere Einblicke in die Regulation von nAChR konnten anhand von Studien zur Langzeit Nikotinexposition gewonnen werden. Nachweislich hat die Dauer der Ligandenbindung Einfluss auf die Expression der Rezeptoren in Abhängigkeit von Subtyp, Zelltyp und Zellstadium (Kuryatov et al., 2005).

Die gezielte Degradation von Untereinheiten stellt einen weiteren Faktor der Assemblierungskontrolle dar. Dabei ist zum Beispiel das Protein Ubiquilin-1 beteiligt, welches die Nikotin-induzierte Überexpression reguliert, indem es direkt an die  $\alpha 3$  oder  $\alpha 4$ -Untereinheiten bindet. Dies hat zur Folge, dass diese im Proteasom abgebaut und so aus dem *pool* der zur Assemblierung verfügbaren Untereinheiten entfernt werden (Ficklin et al., 2005).

Die oben aufgeführten proteinvermittelten Regulationsmechanismen wirken weniger auf den initialen Selektionsprozess von Untereinheiten innerhalb des ER ein als auf die nach der Assemblierung folgende Kontrolle. Die limitierte Zahl bekannter exprimierter Subtypen und die im Vergleich dazu hohe Zahl möglicher Stöchiometrien deuten auf weitaus komplexere Regulationsmechanismen hin. Diese müssen noch während des Assemblierungsprozesses wirken, um die notwendige Spezifität zu erzielen (Keller and Taylor, 1999; Wanamaker et al., 2003). Bisher ist über diesen Prozess und die daran beteiligten Proteinen wenig bekannt.

Ein potentieller Kandidat, welcher an der Selektion spezifischer Rezeptor-Untereinheiten für einen Rezeptor Subtyp beteiligt sein könnte, ist das ER-Protein RIC-3 (Lansdell et al., 2005; Williams et al., 2005). Dieses evolutiv hochkonservierte Protein wurde erstmals in *C. elegans* identifiziert und ist an der Reifung von nAChR beteiligt (Halevi et al., 2003). Es wurde in *Screens* nach Supressoren einer letalen Mutation der nAChR Untereinheit DEG-3, sowie in *Screens* nach Mutanten mit Defekten in cholinergem Neurotransmission und der NMJ identifiziert, was darauf hindeutet dass es sowohl neuronale als auch muskuläre nAChR in *C. elegans* beeinflusst (Miller et al., 1996; Nguyen et al., 1995; Treinin and Chalfie, 1995; Treinin et al., 1998).

Im Vergleich scheint das vertebrate Homologe hRIC-3 als molekulares Chaperon abhängig vom Rezeptor Subtyp zu agieren. Demnach hat es die Fähigkeit zur Selektion von bestimmten Untereinheiten im ER. Humanes RIC-3 ermöglicht die korrekte Faltung von  $\alpha 7$ -nAChRs und erlaubt damit ihren Weitertransport aus dem ER. Weiterhin wurde gezeigt, dass RIC-3 subtypspezifisch die Oberflächenexpression von  $\alpha 7$ -nAChR erhöht und dagegen die

---

Oberflächenexpression von  $\alpha 4\beta 2$ -nAChR inhibiert (Castillo et al., 2006; Halevi et al., 2003). Über den zugrundeliegenden Mechanismus der Selektion gibt es bisher kaum Erkenntnisse.

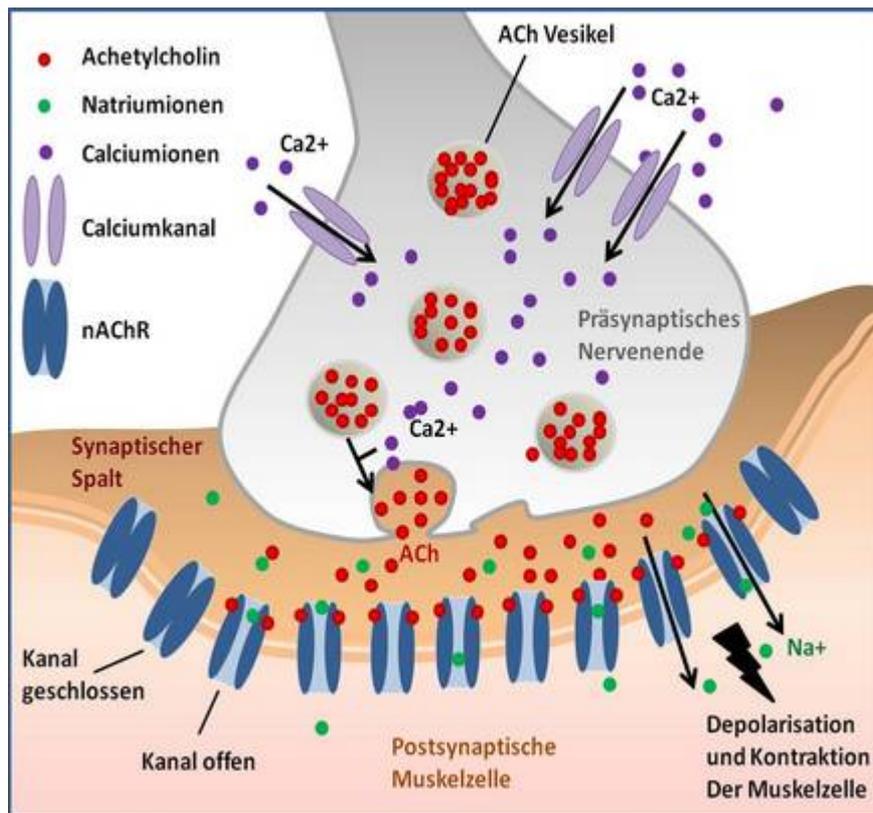
## 1.2 Die neuromuskuläre Synapse

Chemische Synapsen sind spezialisierte Zell-Zell-Kontakte, an denen Informationen zwischen zwei Neuronen oder Neuron und Muskel vermittelt werden. Die sogenannte *neuromuscular junction* (NMJ) oder neuromuskuläre Synapse stellt eine spezielle Form der Synapse dar, an welcher die Signalübertragung zwischen Motoneuronen und (Skelett)-Muskelzellen stattfindet.

Am axonalen Ende des Motoneurons (präsynaptische Zelle) befindet sich die sogenannte aktive Zone, eine spezialisierte Region der präsynaptischen Plasmamembran. An dieser akkumulieren Membranvesikel mit Neurotransmittern (Dresbach et al., 2001). Die Aktivierung des Motoneurons durch ein ankommendes Aktionspotential induziert die Fusion der Vesikel mit der Plasmamembran und die Ausschüttung des Neurotransmitters in den synaptischen Spalt (Jahn and Scheller, 2006; Jin and Garner, 2008; Schoch and Gundelfinger, 2006; Sudhof, 2004). Der Neurotransmitter bindet dann an spezifische Rezeptoren auf der postsynaptischen Membranoberfläche und löst eine Antwort in der nachgeschalteten Muskelzelle aus. Die postsynaptische Region ist aufgrund der Akkumulation multimerer Proteinkomplexe, unter anderem mit Funktionen in der Reizaufnahme und -weiterleitung, auch bekannt als *Postsynaptische Dichte* (PSD) (Heupel et al., 2008; Kim and Sheng, 2004).

Je nach ihrer Ionenspezifität oder dem von ihnen aktivierten *second messenger*-System wirken die Neurotransmitter-Rezeptoren auf die postsynaptische Zelle inhibitorisch oder exzitatorisch.

Die NMJ verfügt über drei Hauptstrukturelemente: die präsynaptische Region an der Nervenendigung, den synaptischen Spalt und die postsynaptische Oberfläche. Die Strukturelemente bzw. spezialisierten Regionen besitzen eine für sie spezifische „Komposition“ von Organellen und Molekülen (Ruff, 2003). Diese wurde mit Hilfe moderner mikroskopischer und biochemischer Methoden fast vollständig aufgeklärt (Dai and Peng, 1998; Marques and Santo Neto, 1998; Melamed et al., 1993).



**Abbildung 3: Die Neuromuskuläre Synapse.** Schematische Darstellung der vertebreten neuromuskulären Endplatte. Spannungsabhängigen Calciumkanäle (hell-violett);  $\text{Ca}^{2+}$  Ionen (dunkel-lila); Neurotransmitter Acetylcholin (rot); nikotinischer Acetylcholin Rezeptor/nAChR (blau);  $\text{Na}^{+}$  Ionen (grün). Abbildung: R. Almedom.

Die präsynaptische Region zeichnet sich vor allem durch die Existenz synaptischer Vesikel aus, die Neurotransmitter enthalten und präzise gegenüber von postsynaptischen Membranen mit hoher AChR Dichte lokalisiert sind (siehe Abbildung 3). Sie verfügen über Proteine, welche an verschiedenen Schritten des Vesikelzyklus beteiligt sind: die Beladung des Vesikels mit Neurotransmittern und deren Translokation zur aktiven Zone, dem Ort der Vesikelfusion (Klenchin and Martin, 2000; Slepnev and De Camilli, 2000; Sudhof, 2000). Die Orte der Neurotransmitter-Ausschüttung sind außerdem durch die Existenz von Calcium-Kanälen und dem SNARE-Komplex gekennzeichnet. Dieser große, makromolekulare Komplex dient dazu, die Fusion der Vesikel mit der präsynaptischen Membran zu vermitteln (Seagar et al., 1999; Sudhof, 2004). Erreicht ein Aktionspotential das Nervenende werden die präsynaptischen Calciumkanäle des P/Q Typs aktiviert.  $\text{Ca}^{2+}$  Ionen aus dem synaptischen Spalt strömen in die Zelle und induzieren dort die Fusion der synaptischen Vesikel mit der Plasmamembran. Es folgt die Ausschüttung eines Neurotransmitters in den synaptischen Spalt. Der Mechanismus der SNARE-vermittelten synaptischen Vesikelfusion ist noch nicht vollständig geklärt. Er erfordert Konformationsänderungen und Interaktionen von

verschiedenen Proteinen auf dem Vesikel sowie der Plasmamembran der Nervenendigung (Jorquera et al., 2012; Pavlos et al., 2001; Sudhof, 2004; Yao et al., 2011).

Die postsynaptische Nervenendigung hat eine auffällig hohe Dichte von nACh-Rezeptor-*Clustern* (Sanes and Lichtman, 1999) (siehe Abbildung 3). Diese *Cluster* werden durch andere multimere Proteinkomplexe mit Funktionen im *Clustering*, der Zell-Adhäsion und Signalweiterleitung ermöglicht. Die Proteine  $\alpha$ - und  $\beta$ -Dystroglykan verankern die Rezeptoren mit dem intrazellulären Cytoskelett (Matsumura et al., 1992; Winder, 1996; Winder et al., 1995). Andere Proteine vermitteln durch Aggregation die Bildung von nAChR *Microclustern*, indem sie intra- und extrazelluläre Interaktionen mit den Rezeptoren eingehen. Dazu gehören das bereits erwähnte intrazelluläre Protein Rapsyn (Borges et al., 2008; Burden et al., 1983; Froehner, 1991; Noakes et al., 1993; Sealock et al., 1984) und Agrin, ein Protein des synaptischen Spalts, welches vom Motoneuronen sekretiert wird (McMahan, 1990).

Die neuromuskuläre Synapse in Vertebraten ist rein cholinerg - es befinden sich also nur nAChR an der Postsynapse. nAChR sind exzitatorische Rezeptoren, da sie den Einstrom von  $\text{Na}^+$  oder  $\text{Ca}^{2+}$  erlauben und damit eine Depolarisation der Membran auslösen (siehe Abbildung 3). Durch das *Clustering* der Rezeptoren an den Zonen synaptischer Aktivität werden Orte hoher Rezeptordichte gebildet (Sanes and Lichtman, 1999). Dies führt zu einer optimalen Signalübertragung von Neuron zu Muskel über den synaptischen Spalt.

Der GABA<sub>A</sub> Rezeptor bildet hier einen weiteren stark vertretenen LGIC der *Cys-Loop* Familie und da er der wichtigste inhibitorische Rezeptor im zentralen Nervensystem (ZNS) ist. Nach Bindung seines Neurotransmitters GABA bewirkt dieser Rezeptor inhibitorische Reizweiterleitungen an der Postsynapse. Einströmende, negativ geladene  $\text{Cl}^-$  Ionen lösen in Folge eine Hyperpolarisation des Motorneurons aus.

Neben Agrin zählen die Acetylcholin Esterase (AChE) und Proteine der extrazellulären Matrix wie Laminin, Kollagen und Neuregulin zu den wichtigsten Proteinen des synaptischen Spalts (Sanes, 2003; Yurchenco and O'Rear, 1994). Die Proteine der extrazellulären Matrix und Agrin sind an der Bildung von Rezeptor*clustern* an der Postsynapse beteiligt. Dagegen ist die AChE für den Abbau des Neurotransmitters Acetylcholin im synaptischen Spalt zuständig und leitet damit die Beendigung des Signals ein (Hall and Sanes, 1993).

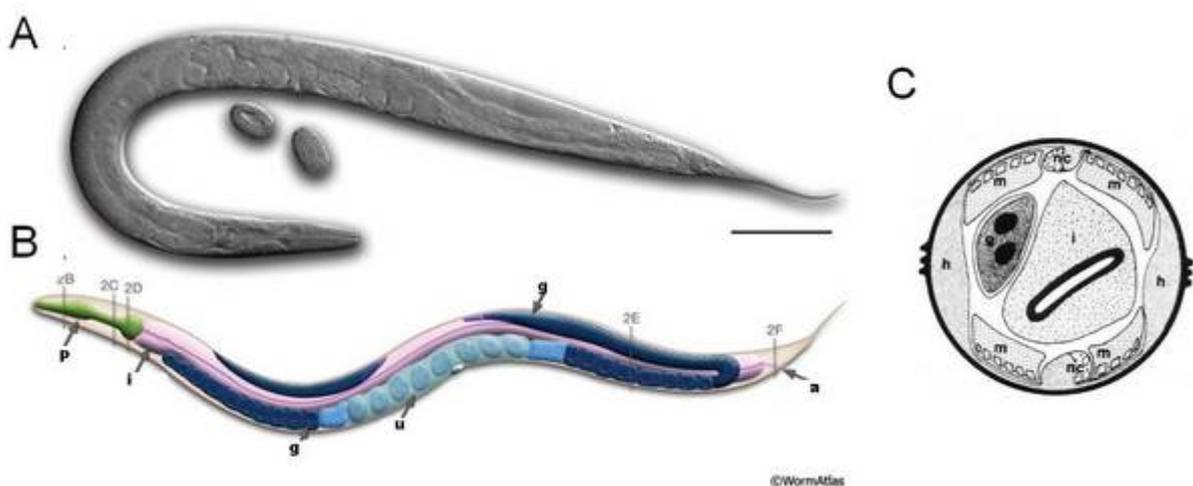
Die Hauptstrukturelemente der neuromuskulären Synapse sind hochkonserviert und bilden ein komplexes aufeinander abgestimmtes System. Viele der zugrunde liegenden Proteine und Mechanismen sind bis heute noch nicht bekannt. Dies liegt unter anderem an dem komplexen Nervensystem der Vertebraten. Viele dieser Faktoren sind innerhalb der Spezies in Struktur

und Funktion hoch konserviert. Daher fokussiert sich die heutige Forschung und die vorliegende Forschungsarbeit besonders auf die Untersuchung von weniger komplexen neurobiologischen Modellorganismen.

### 1.3 *C. elegans* - ein neurobiologischer Modellorganismus

#### 1.3.1 Anatomie und Lebenszyklus

*Caenorhabditis elegans* ist ein frei lebender Nematode, der aus sich zersetzendem, biologischem Material isoliert wurde und sich von Bakterien ernährt (Blaxter, 1998; Brenner, 1974). Adulte Tiere erreichen eine Körperlänge von etwa 1mm und haben einen Durchmesser von ca. 64  $\mu\text{m}$ . Sie haben den für Nematoden üblichen bilateral symmetrischen Körperaufbau, sind jedoch nicht segmentiert (siehe Abbildung 4 A und B). Die Tiere sind von einer *Cuticula* umgeben, welche hauptsächlich aus Kollagen besteht, das von den Zellen der darunterliegenden Hypodermis sezerniert wird (Cox et al., 1981a; Cox et al., 1981b; Johnstone, 1994; Kramer, 1994). Diese dünne Hypodermissschicht verbindet auch die in vier longitudinalen Streifen entlang des Körpers angeordnete Körperwandmuskulatur mit der äußeren Cuticula (Johnstone et al., 1992; Kramer et al., 1988). Der innere Tubus besteht aus dem muskulären Pharynx und dem Intestinaltrakt, welcher den gesamten Körper durchzieht (siehe Abbildung 4 C).



**Abbildung 4: Adulter Hermaphrodit.** (A) DIC Aufnahme eines adulten Hermaphroditen. Linke laterale Seite. Größenbalken entspricht 0,1mm. (B) Schematische Darstellung der anatomischen Strukturen eines adulten Hermaphroditen. (C) Posteriorer Querschnitt. (a) Anus; (g) Gonade; (h) Hypodermis; (i) Intestinaltrakt; (m) Muskel; (nc) ventraler und dorsaler Nervenstrang; (p) Pharynx; (u) Uterus. Quellen: (Edwards and Wood, 1983) und Wormatlas <http://www.wormatlas.org>.

Die Tiere sind vornehmlich als Hermaphroditen zu finden und besitzen zwei X-Chromosomen. Im Vergleich kommen männliche Genotypen in einer Wildtyp-Population nur zu 0,2% vor. Diese sind im Durchmesser und in der Länge kleiner und besitzen einen zur Paarung verwendeten, flachen Fortsatz am Schwanzende (Corsi, 2006). Durch die Möglichkeit, sich sexuell zu vermehren, wird die Auffrischung und Vermischung des genetischen *pools* ermöglicht und die Anpassung an sich verändernde Umweltbedingungen erleichtert.

Zur asexuellen Vermehrung sind die Hermaphroditen in der Lage Oozyten zu produzieren, die sie in der Gonade mit eigenen Spermien befruchten (Selbstung). Im Laufe seines viertägigen, reproduktiven Lebensabschnitts legt ein Hermaphrodit ca. 200 - 250 Eier (Hirsh et al., 1976). Die Nachkommen entwickeln sich dann innerhalb von 36 Stunden und über 4 Larvalstadien (L1- L4) zu einem adulten Tier. In diesem Stadium können *C. elegans* 14- 20 Tage überleben (Klass and Hirsh, 1976).

Bei geringer verfügbarer Nahrung und hohen Populationszahlen gehen die geschlüpften Tiere in das sogenannte Dauer-Larven Stadium über, welches ein Beispiel für eine fakultative Diapause darstellt (Cassada and Russell, 1975). Dieser alternative Weg ist eine Entwicklung zu einer dritten Larvenform und auf Dispersion und Langzeit-Überleben spezialisiert. Die Nahrungszufuhr läutet das Ende der Diapause ein und die normale Entwicklung setzt ein (Golden and Riddle, 1982).

### **1.3.2 Ein genetisches Model für die Neurobiologie**

Seit Einführung von *C. elegans* in die Molekularbiologie durch Sydney Brenner 1967 hat sich „der Wurm“ als beliebtes Modell zur Untersuchung komplexer Systeme etabliert (Brenner, 1974, 2009). Zu den klaren Vorzügen des Nematodens gegenüber anderen Modellorganismen gehören seine geringe Größe, der kurze Lebenszyklus, die Fähigkeit der Selbst-Fertilisation sowie einfache Kultur (Lagerung bei Raumtemperatur, Ernährung von Bakterien). Besonders in der Neurobiologie hat sich *C. elegans* gegenüber anderen Modellorganismen als vorteilhaftes Untersuchungsobjekt behauptet.

S. Brenner und J. Sulston nutzen unter anderem den Vorteil der Viabilität vieler Mutanten sowie die simple genetische Manipulation in genetischen Screens. Mit Hilfe von Selektion nach Verhalten und pharmakologisch induzierten Antworten gelang es ihnen, die viele Gene mit Funktionen der synaptischen Transmission zu identifizieren (Brenner, 1974; Sulston and Brenner, 1974). Es zeigte sich, dass die synaptischen Proteine von *C. elegans* mit einigen wenigen Ausnahmen zwischen den Spezies hochkonserviert sind. Damit bietet *C. elegans* die

Möglichkeit, universell wichtige Proteine und Prozesse in einem relativ simplen System zu untersuchen. Zusätzlich wurde mit der Sequenzierung des Genoms von *C. elegans* 1998 ein Durchbruch erzielt, der den Organismus zu einem begehrten Untersuchungsobjekt machte: Zu der Zeit waren von keinem anderen, multizellulären Organismus so viele Informationen zugänglich.

Die Ergebnisse der ersten Experimente von Brenner und Sulston an EMS induzierten genetischen Mutanten erlaubten bereits tiefe Einblicke in die Entwicklung des Nervensystems (Brenner, 1974). 1993 identifizierten die Wissenschaftler den kompletten embryonalen Zell – Stammbaum, der das Muster aller Zellteilungen von der befruchteten Oozyte bis zum adulten Tier kartiert. Auf der Basis von elektronenmikroskopischen Aufnahmen konnte nicht nur jede der 959 somatischen Zellen, sondern auch die 302 Neuronen klar identifiziert und erstmals ein vollständiges Diagramm der Verbindungen aller Nervenzellen rekonstruiert werden (Chen et al., 2006; White et al., 1986) „*wiring diagram*“ (<http://www.wormatlas.org> ) Aus diesem Diagramm lassen sich Information über die Identität, Morphologie und die synaptische Verbindung eines jeden Neurons im adulten Hermaphroditen ziehen. Auf dieser Basis wurden hypothetische, neuronale Kreisläufe erstellt, welche bis heute als Basis für *C. elegans* Verhaltensstudien herangezogen werden (Chalfie et al., 1985; Gray et al., 2005; Mori and Ohshima, 1995). Das Wissen über die neuronalen Verbindungen lässt aber weder Rückschlüsse über deren Funktion noch über die in Beziehung stehenden molekularen Mechanismen zu, was weitergehende Studien notwendig macht (Schafer, 2005).

Die wichtigsten Erkenntnisse bei der Erforschung der synaptischen Neurotransmission von *C. elegans* sind zu einem erheblichen Teil mit Hilfe von Mutanten gewonnen worden. So ließen sich zum Beispiel Gene und ihre Funktion aufgrund des Defekts in der cholinergen Neurotransmission an der NMJ ihrer Mutanten beschreiben (Gengyo-Ando et al., 1993; Gottschalk et al., 2005; Hedgecock et al., 1990; Iwasaki et al., 1997; Jorgensen et al., 1995; Maruyama and Brenner, 1991; Rand and Johnson, 1995). Diese Mutanten sind anhand ihres zum Teil stark veränderten Bewegungs-Phänotyps (*uncoordinated*, kurz: *unc*) leicht zu identifizieren und erlauben es, gezielt ihren Einfluss auf die Aktivität von Rezeptoren der NMJ zu untersuchen. Agonist- und Antagonist-induzierte Verhaltens- und pharmakologische Studien ermöglichen Einblicke in die Muskel- und Nervenaktivität am lebenden Organismus. Zusätzlich bietet die Methode der Elektrophysiologie die Möglichkeit, die Aktivität auf der Ebene einzelner neuromuskulärer Synapsen zu untersuchen (Francis et al., 2003; Richmond et al., 1999; Richmond and Jorgensen, 1999).

Der Organismus zeigt sich weiterhin extrem adaptierbar an neue Methoden wie z. B. RNAi zum selektiven „Ausschalten“ von Gen-Funktionen auf der Ebene der Transkription (Fire et al., 1998). So wurde in *C. elegans* der erste Genom-weite RNAi *Screen* durchgeführt und identifizierte mehr als 100 neue Genen mit spezieller Funktion in der Neurotransmission (Kamath and Ahringer, 2003). Ständige Verbesserungen und Verfeinerungen dieser und anderer Methoden, zum Beispiel mit der Herstellung sensitiver Stämme trugen dazu bei ein inzwischen fast vollständiges Bild der beteiligten Proteine und Prozesse zu entwerfen (Kennedy et al., 2004; Sieburth et al., 2005; Vashlishan et al., 2008). Inzwischen gilt das *C. elegans* Nervensystem als das am besten beschriebene neurobiologische Modell.

Auf molekularer Ebene ist das Nervensystem von *C. elegans* dabei nicht viel weniger komplex als das der Säuger, wodurch oft Rückschlüsse auf die Funktion von Genen in höheren Organismen gezogen werden können (Bargmann, 1998; Kenyon, 1988). Forschungen am Nervensystem von *C. elegans* haben sogar die erste Identifizierung von bis dahin unbekannt Mitgliedern verschiedener Proteinfamilien ermöglicht, deren Homologe in Säugern erst daraufhin entdeckt wurden. Dazu gehören die Beschreibung des ersten GABA-Transporters UNC-47, des ersten Glutamat-Transporters EAT-4 oder des ersten Mitglieds der Netrin Familie von Proteinen mit Funktionen in der Axon *Guidance* (Hedgecock et al., 1990; Ishii et al., 1992; Lee et al., 1999; McIntire et al., 1997). Die *C. elegans* Forschung hat zu wichtigen Einblicken in die Funktionen des Nervensystems höherer Organismen beigetragen.

Die Entwicklung neuester Techniken, die es erlauben, die neuronalen und molekularen Zusammenhänge in *C. elegans* auf der Ebene von Genom, mRNA und Protein zu manipulieren und Auswirkungen auf das Verhalten *in situ* und in Echtzeit zu untersuchen, machen den Wurm zum hervorragenden Untersuchungsobjekt für neurobiologische Fragestellungen und erhöhen seine Attraktivität als Forschungsobjekt.

### 1.3.3 Das neuromuskuläre System von *C. elegans*

Das Nervensystem von *C. elegans* folgt dem für Nematoden typischen, simplen, bilateral-symmetrischen Körperbauplan (Albertson and Thomson, 1976; Hall and Russell, 1991; White et al., 1976, 1986). Ein adulter *C. elegans* Hermaphrodit besitzt 302 Neuronen, welche in anterioren bzw. posterioren Ganglien zusammengeschlossen sind (Hall and Russell, 1991; White et al., 1976). Ihre Axone verlaufen gebündelt in Nervenbahnen, entlang der dorsoventralen Achse zwischen Hypodermis und Pseudocoelom. Sie bilden den größeren ventralen Strang (*ventral cord*, VC) und dem weniger markanten, dorsalen Strang (*dorsal cord*, DC) (White et al., 1976) (Wormatlas <http://www.wormatlas.org>). Das Zentrum des

Nervensystems bildet der anterior gelegene Nervenring, welcher aus den sechs anterioren Ganglien (*head neurons*), den Fortsätzen der vier posterioren Ganglien (*tail neurons*) sowie den Fortsätzen von mehr als der Hälfte der 302 Neuronen besteht (White et al., 1986).

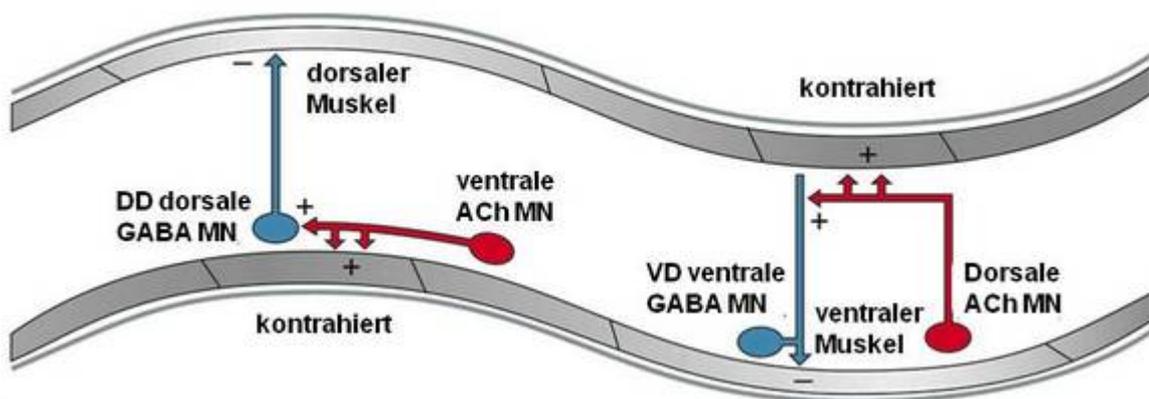
Die Neuronen können ziemlich genau zu gleichen Anteilen den funktionalen Gruppen der sensorischen Neuronen, Motorneuronen und Interneuronen zugeordnet werden. Sensorische Neuronen lassen sich an ihren spezialisierten Fortsätzen erkennen, Motorneuronen dagegen durch das Vorhandensein der neuromuskulären Synapsen. Die Nervenzellen von *C. elegans* bilden gemeinsam 7000 synaptische Verbindungen, von denen sich 2000 an neuromuskulären Synapsen befinden (White et al., 1986). Wie bei Invertebraten üblich werden hier Synapsen zwischen Neuronen normalerweise *en passant* (entlang des Axons) gebildet. Jedes Neuron besitzt mehrere präsynaptische Regionen, die über die gesamte Länge des Axons verteilt sind. Die Muskelzellen bilden Projektionen aus, sogenannte Muskelarme, die zu den präsynaptischen Nervenendigungen reichen und dort die NMJ ausbilden (Stretton, 1976; Sulston and Horvitz, 1977; White et al., 1986). Im Vergleich dazu handelt es sich bei der NMJ von Säugern üblicherweise um einfach innervierte Muskelzellen mit *en plaque* Morphologie. Dabei richten die Motorneuronen teilweise mehrere Axonprojektionen zu den Zielzellen aus und bilden jeweils am Ende der Projektionen Synapsen aus. Die Muskelzellen von *C. elegans* an der neuromuskulären Synapse sind also spezieller Natur. Die aus Vertebraten bekannte Anordnung wird hier umgekehrt.

*C. elegans* hat insgesamt 95 Körperwandmuskeln, die für die Bewegungen des Körpers und des Kopfes benötigt werden und die generell so aufgebaut sind, wie die gestreiften Skelettmuskeln von Vertebraten. Neben der Ausbildung von Muskelarmen zählen die Streifung (Rosenbluth, 1965), die Größe und Anordnung der dünnen und dicken Filamente (Epstein and Thomson, 1974; Mackenzie and Epstein, 1980; Waterston et al., 1974) sowie die Tatsache, dass der *C. elegans* Muskel nicht zu Synzytien (multinukleären Zellen) fusioniert (Sulston and Horvitz, 1977) zu den deutlichsten Unterschieden zu vertebraten Skelettmuskeln.

#### 1.3.3.1 Die neuromuskuläre Synapse von *C. elegans*

Der molekulare Aufbau der Präsynapse sowie die essentiellen Komponenten und Prozesse der Exocytose sind hochkonserviert zwischen Säugern (siehe Abschnitt 1.2) und Nematoden: Fast jedes wichtige Gen hat ein *C. elegans* Homolog, wie zum Beispiel: Syntaxin, Synaptobrevin, *unc-18/nsec-1*, Synaptotagmin und *rab-3* (Gengyo-Ando et al., 1993; Jorgensen et al., 1995; Nonet et al., 1993; Nonet et al., 1998; Nonet et al., 1997; Saifee et al., 1998).

Während die molekularen Prozesse und die beteiligten Proteine hochkonserviert sind weist die NMJ von *C. elegans* doch einen grundlegenden Unterschied gegenüber der von Vertebraten auf: Die neuromuskuläre Synapse in Vertebraten ist rein cholinerg (nur nAChR an der postsynapse) und GABA Transmissionen finden ausschliesslich zu Motorneuronen statt. Dagegen sind in *C. elegans* beide Rezeptoren an der postsynaptischen Muskeloberfläche präsent. Daraus ergibt sich folgender Mechanismus bei der Aktivierung: Entsprechend der NMJ von Vertebraten induziert ein ankommendes Aktionspotential den Prozess der Fusion synaptischer Vesikel mit der präsynaptischen Membran und die Ausschüttung des Neurotransmitters in den synaptischen Spalt (Del Castillo, 1968; Del Castillo et al., 1967).



**Abbildung 5: Zusammenspiel von GABA- und nACh-Motorneuronen bei der Lokomotion.** Die Zellkörper der Motorneuronen (MN) befinden sich im ventralen Nervenstrang (VC). Die DD und VD GABA Neuronen (blau) bilden Synapsen zu dorsalen und ventralen Körperwandmuskeln. Cholinerge Motorneuronen (rot) senden exzitatorische Signale zu den ventralen und dorsalen Muskeln, sowie zu den GABA MN selbst aus. Abbildung adaptiert aus (Schuske et al., 2004).

Die Ausschüttung von Acetylcholin durch exzitatorische Motoneuronen führt zur Aktivierung von nAChR an der Postsynapse und so zur Kontraktion des Muskels. Dagegen führt die Ausschüttung von GABA<sub>A</sub> durch inhibitorische Motoneuronen zur Muskelrelaxation (Johnson and Stretton, 1987; Jorgensen et al., 1995; Walrond and Stretton, 1985). Entsprechend ist das Zusammenspiel der Rezeptoren essentiell für die gleichförmige Sinusbewegung des Körpers bei der Fortbewegung von *C. elegans*: Die Ausschüttung von Acetylcholin auf der einen Seite des Körpers führt zur Kontraktion der Körperwandmuskulatur. Gleichzeitige Aktivierung von GABA Motorneuronen auf der anderen Seite induziert Relaxation von Muskeln (kontralaterale Inhibition, siehe Abbildung 5).

Eine Ausnahme bilden die spezialisierten Pharynxmuskeln. Sie werden zwar von drei cholinergen Neuronen innerviert und ebenfalls durch ACh erregt (McKay et al., 2004; Raizen

et al., 1995), jedoch durch Glutamat statt GABA<sub>A</sub> inhibiert (Avery and Horvitz, 1990; Li et al., 1997; Raizen et al., 1995).

### 1.3.3.2 nAChR an der neuromuskulären Synapse

Das *C. elegans* Genom kodiert für mehr als 29 Gene für nAChR Untereinheiten und besitzt damit die größte Anzahl bekannter Homologe innerhalb der Arten. Im Vergleich dazu haben Vertebraten 17 Mitglieder und *Drosophila* kodiert für zehn nAChR-Homologe (Grauso et al., 2002; Karlin, 2002). Basierend auf Sequenzhomologien wurden die *C. elegans* nAChR Untereinheiten in fünf Hauptgruppen unterteilt (Jones and Sattelle, 2004; Mongan et al., 1998; Mongan et al., 2002). Dabei erfolgte die Bezeichnung der Gene für nAChR Untereinheiten meist mit den Buchstaben *acr* für *acetylcholinereceptor* und die der Gruppen erfolgte generell nach dem Namen der ersten, identifizierten Untereinheit der Gruppe (Mongan et al., 1998). Neben diesen bestätigten *C. elegans* nAChR Genen finden sich 32 weitere mit großer Homologie, die jedoch nach Sequenzanalysen zur Gruppe der *lgc* (*ligand gated ion-channels*: Gene für ligandengesteuerte Ionenkanäle) zusammengefasst wurden (Jones et al., 2007; Jones and Sattelle, 2004; Mongan et al., 1998; Mongan et al., 2002).

Neben der Familie der AChRs weist auch die übergeordnete Superfamilie der *Cys-loop* LGIC's in *C. elegans* eine höhere Diversität auf. Sie umfasst Mitglieder wie den Histaminrezeptor (Gisselmann et al., 2002), den GABA<sub>A</sub>-Rezeptor (Beg and Jorgensen, 2003; Schuske et al., 2004), Serotonin-Rezeptoren (Ranganathan et al., 2000), verschiedene Glutamat Rezeptoren (Cully et al., 1994; Horoszok et al., 2001; Vassilatis et al., 1997) und einen zusätzlichen Acetylcholin Rezeptor (Yassin et al., 2001). Diese große Diversität an Liganden und Liganden-Ionen Selektivität innerhalb der LGIC Superfamilie wird offenbar dadurch ermöglicht, dass ihre Ionenkanalstruktur genügend Flexibilität aufweist.

### 1.3.3.3 Der Levamisolrezeptor (L-AChR) und der Nikotinrezeptor (N-AChR)

Es existieren viele *C. elegans* Mutanten von Genen für nAChR Untereinheiten. Mit Ihrer Hilfe lassen sich die genaue Funktion der Gene und ihr Einfluss auf die cholinerge Neurotransmission untersuchen. Die Kombination von Genetik und pharmakologischen Studien bietet dabei enorme Vorteile (Gottschalk et al., 2005; Lewis et al., 1980a; Waggoner et al., 2000). Beispielsweise führt die Inkubation von *C. elegans* mit dem exogenen nAChR Agonisten Levamisol durch Bindung des Liganden zur Daueraktivierung des L-AChR. Das hat die Hyperkontraktion der Muskeln und Paralyse zur Folge und ist schließlich tödlich. Die Untersuchung von *C. elegans* Mutanten mit Resistenz gegenüber der Wirkung von Levamisol

wurde von Lewis erfolgreich zur Identifikation von Proteinen der cholinergen Neurotransmission eingesetzt (Lewis et al., 1980a; Lewis et al., 1980b).

Bisher konnten vier funktionale nAChR Typen unterschieden werden: Der Levamisol-sensitive nAChR (LevR oder L-AChR) und der Nikotin-sensitive nAChR (NicR, ACR-16 oder N-AChR), die beide Rezeptoren der Körperwandmuskeln sind (Fleming et al., 1997; Lewis et al., 1987b; Richmond and Jorgensen, 1999) sowie der EAT-2 Rezeptor der pharyngealen Muskeln (Raizen et al., 1995). Zu den neuronalen Rezeptoren zählen der DEG-3/DES-2 Rezeptor, welcher mit der (zell-autonomen) Degradation von sensorischen Neuronen assoziiert wird (Ben-Ami et al., 2005; Treinin and Chalfie, 1995) und ein heteromerer Rezeptor mit der nicht- $\alpha$ -Untereinheit ACR-2, welcher wichtig für die Regulation der Aktivität von exzitatorischen Motorneuronen ist (Barbagallo et al., 2010; Jospin et al., 2009).

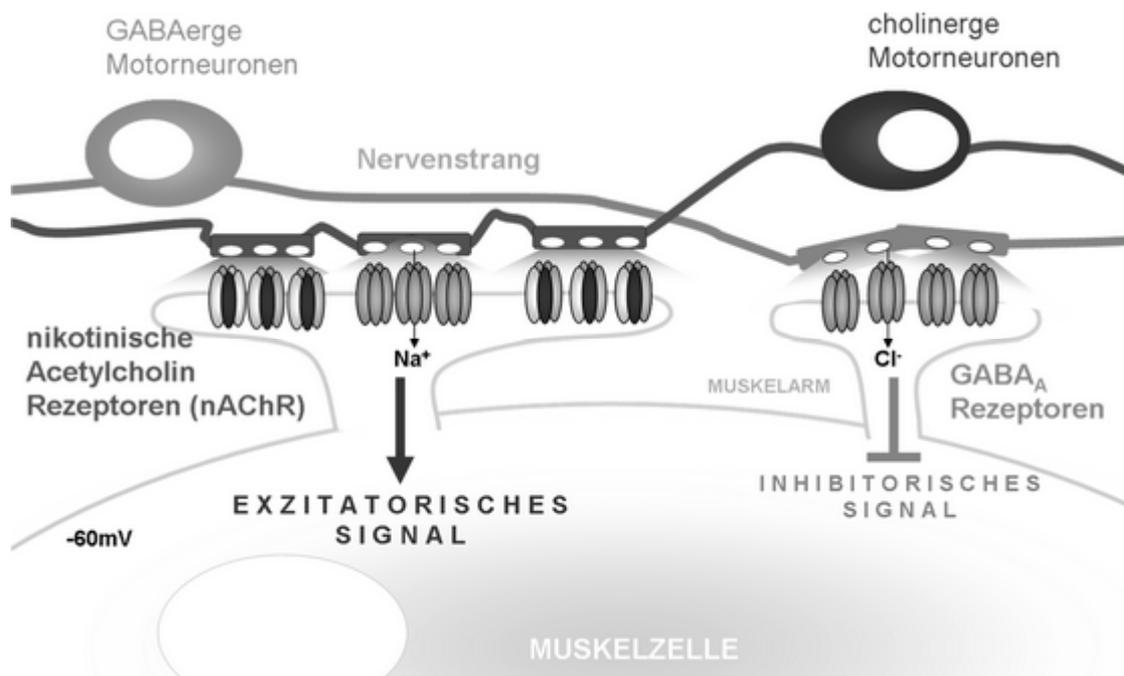
In genetischen *Screens* nach Mutanten mit Resistenz gegen Levamisol wurden drei L-AChR-Untereinheiten identifiziert, welche essentiell für die Aktivität des Levamisolrezeptors sind: Die  $\alpha$ -Untereinheiten UNC-38 und UNC-63 und die nicht- $\alpha$ -Untereinheit UNC-29 (Culetto et al., 2004; Fleming et al., 1997; Lewis et al., 1987b; Richmond and Jorgensen, 1999). Neben diesen wurden Gene für weitere nAChR-Untereinheiten identifiziert, deren Mutation eine „schwache“ Resistenz gegen Levamisol induzierte. Diese stellen die nicht-essentiellen Untereinheiten des L-AChRs dar: Die  $\alpha$ -Untereinheit LEV-8 und die nicht- $\alpha$ -Untereinheit LEV-1 (Culetto et al., 2004; Fleming et al., 1997; Lewis et al., 1987b; Towers et al., 2005).

Von Fleming et al. konnte nach heterologer Expression von UNC-38, UNC-29 und LEV-1 in *Xenopus* Oocyten Levamisol-induzierte Ströme nachgewiesen werden, die jedoch relativ kleine Amplituden aufwiesen. Die Beteiligung weiterer Untereinheiten an der Bildung des nativen und voll funktionsfähigen LevR war offenbar notwendig (Culetto et al., 2004; Fleming et al., 1997; Towers et al., 2005). Erst die Expression aller fünf L-AChR Untereinheiten (*unc-38*, *unc-29*, *unc-63*, *lev-1* and *lev-8*) sowie der zusätzlichen Proteine RIC-3, UNC-50 und UNC-74 war ausreichend, um einen voll funktionsfähigen Rezeptor in *Xenopus* Oozyten zu rekonstituieren (Boulin et al., 2008). RIC-3, UNC-50 und UNC-74 sind Proteine des ER und des Golgi-Apparats mit Funktionen in der Biogenese von nAChR (Eimer et al., 2007; Halevi et al., 2002).

*Microarray profiling* an *C. elegans* Zellen identifizierte neben den fünf oben beschriebenen L-AChR Untereinheiten die zwei weiteren  $\alpha$ -Untereinheiten ACR-8 und ACR-16 im *C. elegans* Muskel. Elektrophysiologische Studien wiesen zudem den homopentameren Nikotin-sensitiven N-AChR an der NMJ von *C. elegans* aus der Untereinheit ACR-16 nach (Ballivet

et al., 1996; Francis et al., 2005; Touroutine et al., 2005). Weiterführende Messungen am Muskel von *C. elegans* konnten schließlich bestätigen, dass die cholinergen Ströme an der neuromuskulären Synapse ausschließlich auf die Aktivität der L-AChR und N-AChR zurückzuführen sind (Francis et al., 2005; Richmond and Jorgensen, 1999; Touroutine et al., 2005). Bisher ließen sich keine weiteren funktionalen Subtypen nikotinischer Rezeptoren an der neuromuskulären Postsynapse nachweisen.

Die zwei Rezeptoren zeigen neben den Unterschieden in ihrer Untereinheitenzusammensetzung auch deutliche Unterschiede in ihren pharmakologischen Eigenschaften (Richmond and Jorgensen, 1999). Während der L-AChR durch den exogenen Agonisten Levamisol aktiviert werden kann, ist er insensitive gegen Nikotin. Der N-AChR dagegen kann durch Bindung von Nikotin aktiviert werden, ist jedoch insensitive gegen Levamisol (Richmond et al., 1999; Richmond and Jorgensen, 1999). Beide Rezeptoren binden den endogenen Agonisten Acetylcholin, steuern aber unterschiedlich zu den cholinergen Einwärtsströmen bei: Der heteromere L-AChR trägt nur zu etwa 30% zum ACh-induzierten Strom bei und hat eine langsame Desensibilisierungsrate, wie in Mutanten ohne funktionalen N-AChR gezeigt werden konnte. Dagegen bildet der N-AChR etwa 70% der ACh-induzierten Ströme aus und weist eine schnelle Desensibilisierung auf (Francis et al., 2005; Richmond et al., 1999; Richmond and Jorgensen, 1999; Touroutine et al., 2005).



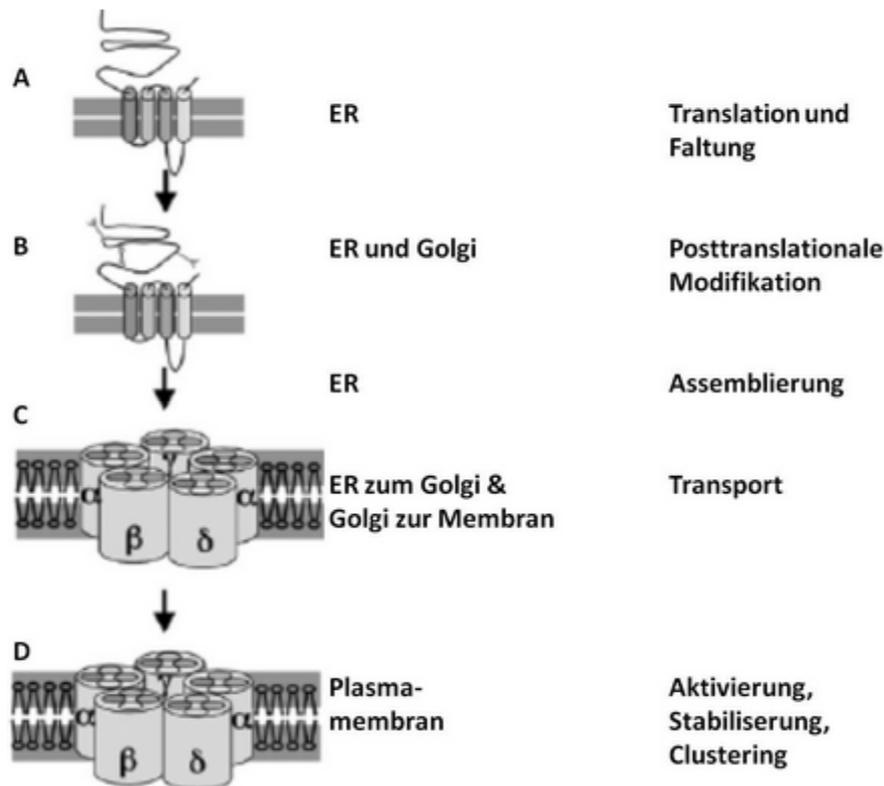
**Abbildung 6:** Neuromuskuläre Synapse von *C. elegans*. Neben dem GABA<sub>A</sub>R bilden der Nikotinrezeptor (auch ACR-16 Rezeptor oder N-AChR) und der Levamisolrezeptor (auch LevR oder L-AChR) die bestuntersuchten nAChR an der NMJ von *C. elegans*. Abbildung adaptiert von A. Gottschalk.

Neben den zwei exzitatorischen LGIC stellt der GABA<sub>A</sub> Rezeptor den dritten pharmakologisch unterschiedlichen Rezeptor der NMJ von *C. elegans* dar und ist ein Homopentamer der Untereinheit UNC-49 (Bamber et al., 1999; Bamber et al., 2005; Richmond and Jorgensen, 1999). *C. elegans* kodiert für vier homologe GABA<sub>A</sub> Untereinheiten, dennoch wurde bisher nur der UNC-49 Typ in einem funktionalen Rezeptor an der NMJ identifiziert und trägt alleine zum messbaren GABA<sub>A</sub>-induzierten Strom bei (Bamber et al., 2005). Dennoch ist zu bemerken, dass die vier Mitglieder der *C. elegans* UNC-49 Gen-Familie die größte Homologie innerhalb der Spezies aufweisen. Entsprechend konnte in *Xenopus* Oozyten ein funktioneller, heteromerer Rezeptor aus dem *C. elegans* Gen GAB-1 und zusätzlichen GABA<sub>A</sub>-R Untereinheiten aus anderen Nematoden rekonstituiert werden (Feng et al., 2002).

#### **1.3.4 Assemblierung und intrazellulärer Transport von nAChR**

Wie bereits für die nAChR der Vertebraten beschrieben erfordert die Biogenese von funktionalen nAChR eine komplexe Regulationsmaschinerie (siehe Abschnitt 1.1.3). Innerhalb dieses Kreislaufs interagieren Proteine mit nAChR und regulieren die Prozesse. Die Identifikation der an solchen Reifungsprozessen beteiligten Proteine in *C. elegans* erfolgte oft in *Screens* nach Mutanten mit Defekten in cholinergem Transmission (Gottschalk et al., 2005; Lewis et al., 1987b; Lewis et al., 1980a; Waggoner et al., 2000).

Die Assemblierung der Rezeptoren erfolgt nach den in Abbildung 7 dargestellten Schritten. RIC-3 ist essentiell für die Reifung von nikotinischen Acetylcholinrezeptoren im ER von *C. elegans* Muskeln und Neuronen (Halevi et al., 2002; Halevi et al., 2003). Dabei nutzt das Protein verschiedene konservierte Aminosäurereste zur Interaktion mit den Untereinheiten unterschiedlicher nAChR Subtypen. Es beeinflusst ihre Oberflächenexpression und die funktionellen sowie pharmakologischen Eigenschaften der Rezeptoren, beispielweise bei DEG-2/DES-3 nAChR (Ben-Ami et al., 2005; Cohen Ben-Ami et al., 2009).



**Abbildung 7: Schematische Darstellung der nAChR Organisation und Reifung.** (A, B) Schematische Darstellung einzelner nAChR-Untereinheiten vor, bzw. nach der posttranslationalen Modifikation in ER und Golgi. Glykosylierung der extrazellulären Reste und Disulfidbrückenbindung führen zur Formation des Cys-Loops. (C, D) Schematische Darstellung des assemblierten Rezeptors mit jeder Untereinheit dargestellt als einfache Säule, welche aus vier transmembran Domänen besteht. Die Bezeichnung der Untereinheiten ( $2\alpha\beta\gamma\delta$ ) erfolgte in Anlehnung an den nAChR Rezeptor in Skelettmuskeln. Die hier nacheinander dargestellten Schritte (A-D) erfolgen *in vivo* parallel zueinander. Abbildung adaptiert nach Treinin, 2008.

Die korrekt assemblierten Proteine passieren die sogenannten *ER exit sites*, spezialisierte Regionen mit einem Multiproteinkomplex welcher als COPII Vesikelkomplex bekannt ist und den Transport zum Golgi-Apparat vermittelt (Smith et al., 1987). SEC-23 ist eine Komponente dieses Komplexes in *C. elegans* und kann an diesen *exit sites* nachgewiesen werden (Roberts et al., 2003). Im Golgi-Apparat agiert das Protein UNC-50, dessen Funktion darin liegt, die korrekt assemblierten L-AChR zur synaptischen Membran zu leiten und so vor der Proteasom-vermittelten Degradation zu schützen (Eimer et al., 2007). Die Kenntnisse über weitere Faktoren, die außerhalb der bekannten Maschinerie der ER Qualitätskontrolle agieren, sind in *C. elegans* sowie bei Vertebraten noch limitiert.

### 1.3.5 Zielsetzung

Mit dem Ziel, Faktoren zu identifizieren, welche die Assemblierung, den Transport und die Funktion von L-AChR in *C. elegans* beeinflussen, wurde von A. Gottschalk eine Tandem-Affinitäts-Chromatographie (TAP) mit L-AChR Untereinheiten durchgeführt und die co-isolierten Proteine über Massenspektrometrie identifiziert (Gottschalk et al., 2005). Neben

den bereits benannten L-AChR Untereinheiten des funktionalen Pentamers (UNC-63, UNC-38, UNC-29, LEV-8 and LEV-1) konnten damit die zusätzlichen Untereinheiten ACR-8 und ACR-12 isoliert werden. Weiterhin wurde demonstriert, dass ACR-8 in *C. elegans* Muskelzellen exprimiert und dort an der Ausbildung von bisher unbekanntem L-AChR Subtypen beteiligt sein könnte. Dagegen kommt ACR-12 ausschließlich in Motorneuronen vor (Gottschalk et al., 2005).

Dieses Resultat weist auf die Existenz weiterer Subtypen mit bisher unbekannter Stöchiometrie im *C. elegans* Muskel hin. Analog zu den nAChR in Vertebraten impliziert das Vorhandensein multipler Subtypen auch komplexe intrazelluläre Kontrollmechanismen, die zur korrekten Reifung und selektiven Assemblierung dieser nAChR Subtypen im *C. elegans* Muskel erforderlich sind. Zu den weiteren Proteinen, die in diesem TAP Ansatz isoliert wurden und in Levamisol-Screens resistent waren, zählen LEV-10, ein Oberflächenprotein mit Funktionen im Clustering von L-AChR an der Synapse (Gally et al., 2004) und die bereits beschriebenen Proteine RIC-3 und UNC-50.

Zudem wurden zwei bisher nicht im Zusammenhang mit nAChR in *C. elegans* beschriebene, evolutionär konservierte Proteine isoliert, NRA-2 und NRA-4 (**n**icotinic **r**eceptor **a**ssociated). Ziel dieser Arbeit ist es, diese zwei Proteine anhand von genetischen, biochemischen, elektrophysiologischen und verhaltensbiologischen Methoden funktional zu charakterisieren. Um zusätzlich Hinweise auf die Funktion der Proteine in *C. elegans* zu gewinnen, werden die invertebraten Proteine außerdem auf mögliche Parallelen mit ihren vertebraten Homologen hin untersucht. Anschließend wird der Einfluss von NRA-2 und NRA-4 auf nAChR an der neuromuskulären Synapse in *C. elegans* näher beleuchtet.

Basierend auf den Ergebnissen wird ein Modell postuliert, welches den funktionalen Zusammenhang zwischen den Proteinen und nAChR in *C. elegans* beschreibt und möglicherweise einen wichtigen Baustein zur Erklärung der bisher wenig erforschten Prozesse der selektiven Untereinheitenassemblierung von nikotinischen Rezeptoren im ER von *C. elegans* bietet.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Standards

GeneRuler 100Bp DNA Ladder Plus	Fermentas
GeneRuler 1Kb DNA Ladder	Fermentas
1Kb Plus DNA Ladder	Invitrogen
Prestained Protein Marker, Broad Range	New England Biolabs

#### 2.1.2 Organismen

<i>Escherichia coli</i> ; DH5 $\alpha$	F- $\Phi$ 80d lacZ $\Delta$ M15 $\Delta$ (lacZYA-avgF) U169 recA- endA- hsdR17 (rk -, mk +) phoA snp E44 $\lambda$ - thi -1 gyr A96 rel A1 (Gibco BRL)	
OP-50	E. coli Mutante mit Uracil-mangel und geringerer Teilungsrate	Brenner 1974)
HeLa Zellen	adhärent wachsende Epithelzellen eines humanen Zervixkarzinoms (Scherer, 1953)	(9CB0535, BioWhittaker)
<i>C. elegans</i>	Siehe Abschnitt 2.2.6.4	

#### 2.1.3 Antikörper

Primäre Antikörper	Verdünnung	Hersteller
Kaninchen anti-NRA-2 #252, Polyklonaler affinitätsgereinigter Peptid-Antikörper gegen C-terminales Peptid: CHSQTLEGTVAAIRKSIF	1:100 – 1:500(IF), 1:300(WB)	Peptide Specialty Laboratories GmbH
Kaninchen anti-UNC-29 #1957, Polyklonaler affinitätsgereinigter Peptid-Antikörper gegen C-terminales Peptid: CLDRLKEKYDTASNIP	1:200 (IF), 1:500 (WB)	Peptide Specialty Laboratories GmbH
Maus anti-UNC-17, monoklonaler Antikörper	1:500 in Antikörperpuffer	J. Rand
Maus anti-HA, monoklonal, Klon 16B12, Alexa488 Konjugat	1:100 in Injektionspuffer	Molecular Probes A-21287
Maus anti-HA, monoklonal, Klon 16B12, Alexa594 Konjugat	1:100 in Injektionspuffer	Molecular Probes A-21288
Maus anti-cMYC, monoklonal, Klon 9E10, Cy3 Konjugat	1:200 in Injektionspuffer	Sigma M-5546
Sekundäre Antikörper / Seren	Verdünnung	Hersteller
Alexa Fluor 568 aus Ziege, anti-Kaninchen IgG	1:4000	Molecular Probes A-21287
Alexa Fluor 488 aus Ziege, anti-Maus IgG	1:3000	Molecular Probes A-11011
Anti-Maus bzw. Anti-Ziege Antikörper	1:5000	Sigma-Aldrich
Ziegenserum	10% (v/v)	Sigma-Aldrich

## 2.1.4 Enzyme

Alle Enzyme wurden mit den vom Hersteller mitgelieferten Reaktionspuffern sowie bei den empfohlenen Reaktionsbedingungen eingesetzt.

Enzym	Puffer	Hersteller
Expand Long Template Enzyme Mix	Expand Long Template Puffer 1	Roche
CIP alkalische Phosphatase	Antarktische Phosphatase Reaktionspuffer	New England Biolabs
DNase	DNase-Puffer	Sigma
Klenow Fragment		Fermentas
Phusion-DNA-Polymerase	5x HF-Puffer	Finnzymes
Proteinase K	Eigens hergestellter Single Egg/Worm Lysis Buffer (SEWLB) 1:200	Signal Aldrich
Taq-DNA-Polymerase	Taq-PCR-Puffer	New England Biolabs
Expand Long Template PCR-System	Puffer 1	Roche
T4 DNA-Ligase	10x T4 Ligase Puffer	Fermentas
T4 Polynukleotidkinase	10x T4 Polynukleotid Kinase Reaktionspuffer	New England Biolabs
Restriktionsenzyme	Jeweils zugehöriger Puffer	Fermentas oder NEB

## 2.1.5 Oligonukleotide

Oligonukleotide wurden bei MWG Biotech AG bestellt und nach Erhalt in einer Konzentration von 100 pm/ml in deionisiertem Wasser gelöst und eingefroren. Vor dem Einsatz in PCR-Reaktionen wurde der Stock 1:10 verdünnt, um eine Konzentration von 10 pm/ $\mu$ l zu erhalten.

Name / Verwendungszweck	Sequenz 5' -3'
<b>Für die Genotypisierung von <i>nra-2</i> (<i>ok1731</i>) und <i>nra-2</i> (<i>tm1453</i>)</b>	
oRBA 26 for	GGAAAGTGACCAAACTGTAG
oRBA 27 rev	CATGCGTGTGCCTTTAACTG
oRBA 14 for	CCACTGAATATTGTTGGTCGC
oRBA 15 rev	GCGATTTTGAGTGACACCAAATGC
<b>Für die Genotypisierung von <i>nra-4</i> (<i>tm2565</i>)</b>	
oRBA 53 for	GGA ATG TTC CAA CGC TGA TAT CCA C
oRBA 54 rev	GTC CCA ACT TCT GGT GTC TAC
oRBA 55 for	GGT GGA AAA GGT GCT GGA TCT G
oRBA 56 rev	TCC TTG GTG GTG GCT TCA GA
<b>Für die Genotypisierung von <i>nra-4</i> (<i>hd127</i>)</b>	
oRBA 57 for	GCG AAA ATT CGT GCC TGA G
oRBA 58 rev	GTC AGC AAT CGA ACC TGA AG
oRBA 59 for	TGC GCC AAG ATT ACG GTT C
oRBA 60 rev	CCG GTC AAG TGG AAG ACG AG
<b>Für die Genotypisierung von <i>acr-16</i> (<i>ok789</i>)</b>	
oAG302 for	GGTGCATTGGGTTCCACCGGG
oAG303 rev	CTGCCAAGACTTGTCAACCC
oAG308 for	CAGTGACAACCTGTGGAGCGAAACG
oAG309 rev	GAAGACTGTCGATGCAGTAACCAC
<b>Für die Sequenzierung der yk cDNA-Klone</b>	
pME18S for	TAGAGAAAAAACCTCCCACA
ME 1250 rev	TGTGGGAGGTTTTTCTCTA
<b>Für die Sequenzierung der Nicalin cDNA</b>	
RZPD M13 forward	GCTATTACGCCAGCTGGCGAAAGGGGATGTG
RZPD M13 reverse	CCCCAGGCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCG
Nicalin sequence for	CCAGACATGCCGGTGTTCAC
<b>Für die NOMO2 cDNA Sequenzierung</b>	

Name / Verwendungszweck	Sequenz 5' -3'
NOMO2 seq for 1	CAGGTGTCTCTGAGAAAC
NOMO2 seq for 2	GTCATTCCGCCTTGAGAAC
NOMO2 seq for 3	GATGACGTGTCTGCAGTTGAGTTC
NOMO2 seq for 4	CTGGCAGGCCGTAAGCTTTG
<b>Für die Klonierung von <i>nra-2</i> Promotor und Gen</b>	
oRBA10 : <i>pnra-2</i> for-short	GGCCGCTGCAGTTCCTGAAAATTTTCAATTTTTGCAAAG
oRBA11-1: <i>pnra-2</i> rev-short	CCGGCCCCGGGCTGAAAAAACATATCTTAAGCTC
oRBA12 : <i>nra-2</i> for	CCCGGGATGCAGGATGAAATCATCGATTTTTTC
oRBA13 : <i>nra-2</i> rev	GGTACCCCGAAGATCGATTGCGAATGGCTG
<b>Für Klonierung von <i>nra-4</i> Promotor und Gen</b>	
<i>pnra-4</i> for - long	GAAATGAAATAAGCTGCTAATTTTTTAAAACTACCCAGACGC
<i>pnra-4</i> rev	GCAGGCATGCAAGCTGATCTGGAAAAATTCGAGATTATTGAATG
<b>Für die Klonierung von <i>nra-4</i>(cDNA) in pPD95.79:: <i>pnra-4</i>::gfp</b>	
<i>nra-4</i> for	TCAAGCTTGCATGCCTGCAGATGGGTTCTTTACCTTTAATACTCTTATC
<i>nra-4</i> rev	CCTCTAGAGTCGACCTGCAGCTTTACGTTTCTATGATGATTATCAGCGG
<i>nra-4</i> MscI for	CCGGCTGGCCACAATCACCGCTAAGACTAC
<i>nra-4</i> MscI rev	CCGGCTGGCCAAGTCGACCTGCAGCTTTACG
<b>Für die Klonierung eines N-terminalen 3xHA-tags in den pPD95.79::<i>nra-2</i>(cDNA)::GFP Vektor</b>	
oRBA 67b	GGCCGGGGTCCCAGCAAGTTGGATACCCGATGATGTTCC
oRBA 68b	CCGGCCGGGACCCAGCGTAGTCTGGGACGTCG
<b>Für die Klonierung von vertebralem Nicalin in pPD95.79</b>	
oRBA79 : Nicalin for	GGCCGTCTAGAATGCTGAAGGCGTCTTGTCTGC
oRBA80 : Nicalin rev	GGCCGACCGGTCCTGTGTCTTGGCCCTCACGAG
<b>Für die Klonierung von Lev-8::3xHA aus Lev-8::GFP</b>	
oRBA63 : Lev-8 for Age1	GCCGGACCGGTG TTC CCA CCG CAA C
oRBA64 : Lev-8 rev	GCCGGTCTAGAGGTGTTAAGAACGTTGATGGTTCCCTC
oRBA65 : HA-L8-for	CCGGCTCTAGAGGTATTTTCTACCCGTATGATGTTCC
oRBA66 : HA-L8-rev	CCGGCCCATGGCTCGAGTCATTAAGCGTAGTCTGG
oRBA88 for	CTGAGCTCAGGATCCACTCCGTGTGTAC
oRBA89 rev	ACACGGAGTGGATCCTGAGCTCAGGTAC
<b>Für die Klonierung von <i>nra-2</i> und <i>nra-4</i> Fragmenten in den pmal -2px Vektor zur Aufreinigung und Immunisierung</b>	
oRBA73 ( <i>nra-2</i> for)	GGCCGGAATTCGTTTCCCTTGGGTGCAAGAAGCTC
oRBA74 ( <i>nra-2</i> rev)	GGCCGGGATCCCTAGGAATCAGCGCCAGGCGAG
oRBA75 ( <i>nra-4</i> short for)	GGCCGGAATTCGAGGACCTCGTCTTCCACTTG
oRBA76 ( <i>nra-4</i> short rev)	GGCCG GGATCCCTACGCCTGGGAAACCACAACTTTTTG
oRBA77 ( <i>nra-4</i> long for)	GGCCGGAATTCGAGATCTCGCATCCGGCAGAAATTG
oRBA78 ( <i>nra-4</i> long rev)	GGCCGGGATCCCTAGAGTGGAGCATTGGTGACTTCATC
<b>Zur Sequenzierung von Plasmiden mit C-terminalem <i>myc</i>-Tag</b>	
Myc Sequenzierungsoligo rev	TCAACGACGTTGGCGTCGATCA

## 2.1.6 Plasmide

In der untenstehenden Tabelle sind die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide, sowie die im Zuge der Arbeit hergestellten Konstrukte beschrieben.

Bezeichnung	Hersteller/Beschreibung
<b>Generelle Expressionsvektoren</b>	
TOPO TA	Expressionsvektor mit T-Überhängen zur erleichterten Klonierung von PCR-Fragmenten mit A-Überhang
pEGFP.N3	Eukaryontischer Expressionsvektor zur Expression von Fusionsproteinen, die mit dem C-Terminus von EGFP fusioniert sind (Clontech, Heidelberg)
DsRed-ER	(Clontech, Heidelberg)
pPD95.79	<i>C. elegans</i> Expressionsvektor für C-terminal markierte GFP-Fusionsproteine (Fire et al., 1990)
pPD96.52	<i>C. elegans</i> Expressionsvektor mit <i>myo-3</i> Promotorsequenz für Muskelspezifische Expression von Proteinen (Fire et al., 1990)
pENTRY:: <i>mcherry</i>	<i>C. elegans</i> Expressionsvektor mit Rot-Fluoreszierendem Proteintag
<b>Fluoreszenzmarkierte Levamisolrezeptor-Untereinheiten</b>	
pAG8( <i>plev-1::lev-1::ha::6xhis::3xha</i> )	<i>C. elegans</i> Expressionsvektor mit Gen für LEV-1 Untereinheit des Levamisolrezeptors fusioniert mit C-terminalem HA zur Detektion durch Injektion fluoreszenzmarkierter Antikörper (Gottschalk et al., 2005)
pAG9( <i>punc-38::unc-38-myc::6xhis::2xmyc</i> )	<i>C. elegans</i> Expressionsvektor mit Gen für UNC-38 Untereinheit des Levamisolrezeptors fusioniert mit C-terminalem MYC zur Detektion durch Antikörperinjektion (Fleming et al., 1997)
<i>punc-29::unc-29::gfp</i> (LJH5)	<i>C. elegans</i> Expressionsvektor mit Gen für UNC-29 Untereinheit des Levamisolrezeptors fusioniert mit GFP für subzelluläre Lokalisationsstudien (Gottschalk et al., 2005)
<i>pacr-13::acr-13::6xhis::3xha</i>	<i>C. elegans</i> Expressionsvektor mit Gen für ACR-13/LEV-8 Untereinheit. C-terminal fusioniert and 6 Kopien Histidin und drei Kopien HA Peptidsequenz
<i>pacr-16::acr-16::9xmyc</i>	<i>C. elegans</i> Expressionsvektor mit Gen für ACR-16 Untereinheit des Nikotinrezeptors C-terminal fusioniert mit 9 Kopien der MYC-Peptidsequenz (M. Francis, V. Maricq)

Bezeichnung	Hersteller/Beschreibung
<i>podr-2::odr-2::3xha</i>	<i>C. elegans</i> Expressionsvektor mit Gen für das neuronales Oberflächenprotein ODR-2 (Chou et al., 2001) C-terminal fusioniert mit drei HA Kopien.
pABR020a ( <i>psec:23::sec-23::gfp</i> )	<i>C. elegans</i> Expressionsvektor mit GFP markiertem ERES Markerprotein SEC-23 (Roberts et al., 2003)
<b>cDNA Klone</b>	
<i>nra-2</i> cDNA	Klon yk1703e11 von Y. Kohara)
<i>nra-4</i> cDNA	Klon yk1373f10 von Y. Kohara)
Humane nicalin cDNA	Klon DKFZp761P041
<i>Nomo2</i> -cDNA	humanes Gen für NOMO2 IRAT Klon; Nr. :NM_173614 XM_936703
<b>Expressionsvektoren mit <i>nra-2</i> cDNA</b>	
<i>pmyo-3::nra-2(cDNA)::gfp</i>	pPD95.79 mit <i>nra-2</i> cDNA und <i>myo-3</i> Promotor
<i>pmyo-3::nra-2(cDNA)::yfp</i>	pPD95.79 mit <i>nra-2</i> cDNA und <i>myo-3</i> Promotor und C-terminalem YFP
<i>pmyo-3::nra-2(cDNA)::mcherry</i>	pPD95.79 mit <i>nra-2</i> cDNA und <i>myo-3</i> Promotor und C-terminalem mCHERRY
<i>pmyo-3::3xHA::nra-2(cDNA)::gfp</i>	pPD95.79:: <i>nra-2::gfp</i> mit N-terminaler 3-fach Insertion der HA- Peptidsequenz
<i>Pegfp::nra-2 (cDNA)::egfp</i>	pEGFP.N3 mit <i>nra-2</i> cDNA fusioniert im Leseraster mit C-terminalem EGFP im eukaryontischen Expressionsvektor
<b>Expressionsvektoren mit <i>nra-4</i> cDNA</b>	
<i>pnra-4::gfp</i>	pPD95.79 mit genomischem Promotor für <i>nra-4</i>
<i>pmyo-3::nra-4(cDNA)::gfp</i>	Insertion der <i>nra-4</i> cDNA via PstI in den pPD95.79:: <i>pnra-4::gfp</i> Vektor
<b>Humanes Nicalin in <i>C. elegans</i> Expressionsvektor</b>	
<i>pmyo-3::nicalin (cDNA)::gfp</i>	Insertion von Nicalin (Klon DKFZp761P041) via XbaI/AgeI in den pPD.95.79:: <i>nra-2::gfp</i> Vektor
<b><i>E. coli</i> Expressionsvektoren zur Aufreinigung von trunkiertem NRA-2 und NRA-4 Protein und Immunisierung</b>	
<i>pmal2px:: mpb</i>	<i>Expressions Vektor mit Fusionsgen für Maltose-Bindeprotein (NEB)</i>
<i>pmal2px:: mpb::nra-2Frag</i>	<i>pMAL2px E.Coli Expressionsvektor fusioniert mit 500bp nra-2 Fragment</i>
<i>pmal2px:: mpb::nra-4shortFrag</i>	<i>pMAL2px E.Coli Expressionsvektor fusioniert mit 569bp nra-4 Fragment</i>
<i>pmal2px:: mpb::nra-4longFrag</i>	<i>pMAL2px E.Coli Expressionsvektor fusioniert mit 749bp nra-4 Fragment</i>

## 2.1.7 Kits

Alle Kits wurden entsprechend den Herstellerangaben angewendet.

Kit Bezeichnung	Hersteller/Firma
GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit	Amersham Biosciences
QIAquick PCR Purification Kit	QIAGEN
NucleoSpin	Macherey-Nagel
Nucleobond PC 100	Macherey-Nagel
BD-Infusion PCR- System	BD Biosciences
Expand Long Template PCR-System	Roche

## 2.1.8 Geräte

Gerät	Firma
<b>Millipore Anlage</b>	
Milli Q-Plus water system	Millipore
<b>Waagen</b>	
Mettler PM 460 Waage	Mettler
<b>Reaktionsgefäße</b>	
Eppendorf Gefäße	Greiner
Falcon Reaktionsgefäße, steril 15 and 50 ml	Greiner
<b>Immunhistochemie/Western</b>	
Filterpapier	Whatman
Microliter Kanülen	Hamilton
Semidry Apparat	Bio-Rad
Lumi-Imager F1	Roche
Nitrozellulose Membran	Schleicher& Schüll
<b>Mikroskope</b>	
SMZ 645	Nikon
Zeiss Axiovert 200	Zeiss
Konfokales LASER-Scanning Mikroskop LSM 510 Meta	Zeiss
Stereomikroskop	Leica
<b>Kameras</b>	
Axiocam MRM Kamera	Zeiss
Axiovision Kamera	
Gel Dokumentation:DC290 Zoom	Kodak
<b>Bildbearbeitungssysteme</b>	
Axiovert software	Zeiss
Imaris	Zeiss

Gerät	Firma
Photoshop CS2	Microsoft
ImageJ software	NIH
<b>Zentrifugen</b>	
BIOFUGE pico	Heraeus
BIOFUGE primo R	Heraeus
Centrifuge 5415R	Eppendorf
<b>Inkubatoren</b>	
Unitron Inkubator	INFORS
Kelvitron t	Heraeus
FOC 225E Refrigerated Incubator	VELT scientifica
<b>Injektion von DNA in <i>C. elegans</i></b>	
Injektionsapparaturen	Märzhäuser
Mikropipettenpuller Model-P97	Sutter
<b>Molekularbiologie</b>	
PCR-Gerät T1 Thermocycler	Biometra
Gellaufkammer Whatman	Biometra
Spektrophotometer- NanoDrop ND-1000	Thermo Fisher Scientific
Stromversorgung Standard Power Pack P25	Biometra
<b>Weiteres</b>	
pH-Meter Cyberscan 510	EUTECH Instruments
Pipetten ABIMATE	Abimed HT
Vortex Genie 2	Scientific Industries
Heizblock Rotilabo-Block-Heater H250	Roth
UV-Bestrahlungsgerät Stratalinker	Stratagene

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Molekularbiologische Methoden

Für funktionale Studien wurde die DNA verschiedener Gene entweder aus bereits vorhandenen Konstrukten oder aus genomischer DNA amplifiziert. Auch wurden Fragmente durch Restriktion bereits vorhandener Konstrukte erhalten. Die für die Amplifikation mittels PCR verwendeten Oligonukleotide sind in Abschnitt 2.1.5 aufgelistet. Allgemeine molekularbiologische Methoden, wie präparativer Restriktionsverdau, (De)Phosphorylierung und Ligation wurden entsprechend den Angaben des Herstellers und unter Verwendung der mitgelieferten Enzyme und Puffer durchgeführt. Die Präparation geringer (100-200 ng) und größerer (1-2 µg) Mengen Plasmid DNA zur Analyse, Sequenzierung, Klonierung oder Injektion in *C. elegans* erfolgten unter Verwendung der ‚NucleoSpin‘ und ‚NucleoBond‘ Kits (Macherey und Nagel) nach Angaben des Herstellers. Die Aufreinigung von DNA nach der Auftrennung im Agarosegel erfolgte mit Hilfe des ‚GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit‘ (Amersham Biosciences) oder dem ‚QIAquick Gel Extraction Kit‘ (QIAGEN). Zusätzliche Aufreinigung von DNA erfolgte mit Hilfe des QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN) und einer Phenol : Chloroform : Isoamylalkohol-Extraktion mit anschließender Ethanol Fällung (Sambrook, 1989). Die jeweilige DNA Menge wurde photometrisch mit Hilfe des ‚NanoDrop‘ Photometers bestimmt. Die Qualität der DNA wird über das Verhältnis  $A_{260}/A_{280}$  bestimmt, wobei 1.8 das Optimum darstellt.

#### Verwendete Puffer und Lösungen für Molekularbiologische Methoden

TAE	40 mM Tris/Essigsäure 2 mM EDTA pH 8,5
DNA-Probenpuffer (6x)	60 % (w/v) Glycerol 0,25 % (w/v) Bromphenolblau 0,25 % (w/v) Xylencyanolblau in TAE
dNTP-Mix	10 mM dATP 10 mM dCTP 10 mM dGTP 10 mM dTTP

## Polymerase Ketten Reaktion (PCR)

Zur Amplifikation von Ziel DNA aus genomischer DNA oder vorhandenen Konstrukten wurde der ‚Phusion Polymerase Kit‘ (Finnzymes) verwendet.

Die PCRs wurden nach dem folgenden Pipettierschema angesetzt.

PCR-Ansatz	Menge
DNA	150 – 250 ng
dNTP-Mix	10 mM
Oligo 1	10 pm/μl
Oligo 2	10 pm/μl
5x HF – Puffer	10,0 μl
Phusion - Polymerase	0.5-1.0 U
H <sub>2</sub> O	ad 50,0 μl

Das dabei verwendete PCR-Programm für den Reaktionszyklus wurde wie folgt gewählt:

	PCR – Schritt	Temperatur	Zeit
1	Initialisierung	98 °C	30 s
2	Denaturierung	98 °C	6 s
3	Anlagerung	60 °C	Anlagerung bei T <sub>m</sub> +3°C (> 20nt)
4	Elongation	72 °C	15-30 s/kb
5	Finale Elongation	72 °C	6 min
6	Ende	4 °C	Bis zur Entnahme

Die Schritte zwei bis vier werden dabei 30 mal wiederholt. Bei der Klonierung der mittels Phusion Polymerase erzeugten Fragmente ist zu beachten, dass sogenannte *blunt ends* erzeugt wurden.

### 2.2.2 Klonierungen

Konstrukt	Beschreibung der Klonierung
Expressionsvektoren mit <i>nra-2</i> cDNA	

Konstrukt	Beschreibung der Klonierung
<i>pmyo-3::nra-2 (cDNA)::gfp</i>	Die cDNA von <i>nra-2</i> wurde aus dem Klon <i>yk1703e11</i> (Y. Kohara) durch PCR mit den Oligos oRBA12 und oRBA13 amplifiziert. Das Fragment wurde N-terminal von GFP über XmaI/KpnI Restriktion in den pPD95.79 Vektor kloniert. Der <i>pmyo-3</i> Promotor wurde über HindIII und BamHI aus dem pPD96.52 Vektor subkloniert. Dazu wurden die BamHI Überhänge mit Hilfe des Klenow Fragments entfernt und das Fragment in den zuvor mit HindIII und SmaI geschnittenen Zielvektor <i>nra-2(cDNA)::gfp</i> ligiert.
<i>pmyo-3::nra-2 (cDNA)::yfp</i>	Zur Klonierung von des 'yellow fluorescent Protein' YFP C-terminal von <i>nra-2(cDNA)</i> wurde die YFP Sequenz aus dem pPD132.102 Vektor über Restriktion mit HindIII/KpnI gegen die GFP Sequenz im <i>pmyo-3::nra-2(cDNA)::gfp</i> ausgetauscht.
<i>pmyo-3::nra-2 (cDNA)::mcherry</i>	Für diese Klonierung wurde die GFP Sequenz aus dem Plasmid pPD95.79:: <i>pmyo-3::nra-2(cDNA)::gfp</i> über Restriktion mit KpnI und EcoRI entfernt und im Austausch die Sequenz des rot-fluoreszierenden Proteins mCHERRY eingefügt um <i>pmyo-3::nra-2(cDNA)::mcherry</i> zu erhalten. Diese wurde zuvor aus dem pEntry-mCHERRY Plasmid über KpnI/EcoRI isoliert
<i>pmyo-3::3xha::nra-2 (cDNA)::gfp</i>	Um N-terminal 3xHA-markiertes NRA-2::GFP Protein zu erhalten wurde eine Sequenz, die für 3 Kopien des HA Peptids kodiert mit den Oligos oRBA 67b und 68b aus dem pAG8 Klon amplifiziert und anschließend über SanDI in den <i>pmyo-3::nra-2::gfp</i> Vektor kloniert.
<i>pEGFP.N3::nra-2 (cDNA)::egfp</i>	Um NRA-2 in HeLa Zellen zu exprimieren wurde <i>nra(cDNA)</i> aus einem TOPO- <i>nra-2(cDNA)</i> Klon in den pEGFP-N3 Vektor (Clontech) nach Restriktion mit KpnI/EcoRI subkloniert. Anschließend erfolgte die Insertion von den hybridisierten Oligos oRBA88 and oRBA89 via KpnI, um das Leseraster mit EGFP im eukaryontischen Expressionsvektor pEGFP.N3 herzustellen.

#### Expressionsvektoren mit *nra-4* cDNA

<i>pnra-4::gfp</i>	Ein 1548 nt großes <i>pnra-4</i> Promoter Fragment wurde mit den Oligos <i>pnra-4_long</i> und <i>pnra-4_rev</i> über PCR aus genomischer DNA amplifiziert und in den zuvor mit HindIII linearisierten pPD95.79 Vektor ligiert. Zur Ligation wurde das BD-InFusion Konierungssystem verwendet.
--------------------	------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

Konstrukt	Beschreibung der Klonierung
<i>pnra-4::nra-4 (cDNA)::gfp</i>	Die <i>nra-4</i> cDNA wurde aus dem Klon <i>yk1373f10</i> (Y. Kohara) mit Hilfe der Oligos <i>nra-4_for</i> und <i>nra-4_rev</i> amplifiziert und nach Restriktion mit PstI in das Plasmid <i>pnra-4::gfp</i> inseriert. Anschließend wurde ein zusätzliches 490nt PCR-Fragment mit dem Oligos <i>nra-4 MscI for/rev</i> hergestellt und zur Herstellung des offenen Leserahmens via MscI in das Plasmid kloniert um das Fusionsgen <i>nra-4(cDNA)::gfp</i> zu erhalten.
<b>Humanes Nicalin in <i>C. elegans</i> Expressionsvektor</b>	
<i>pmyo-3::nicalin (cDNA)::gfp</i>	Die <i>nicalin</i> cDNA (DKFZp761P041) wurde nach vollständiger Sequenzierung via XbaI/AgeI im Austausch für <i>nra-2(cDNA)</i> in den <i>pPD.95.79::nra-2::gfp</i> Vektor kloniert.
<b>Expressionsvektoren mit Rezeptoruntereinheiten</b>	
<i>pacr-13::acr-13::6xhis3xha</i>	Um <i>pacr-13::acr-13::6xhis3xha</i> zu erhalten wurde die <i>6xhis3xha</i> -Sequenz per PCR mit den Oligos <i>oRBA65</i> und <i>oRBA66</i> aus dem <i>pAG8</i> Vektor amplifiziert und mit XbaI und NcoI geschnitten. Gleichzeitig wurde ein in dem Zielvektor <i>pAG22</i> fehlendes 3'Fragment mit den Oligos <i>oRBA63</i> und <i>oRBA64</i> hergestellt und mit den Restriktionsenzymen AgeI and XbaI geschnitten. Beide Fragmente wurden anschließend über eine 3-Wege-Ligation in den zuvor mit AgeI und NcoI geschnittenen <i>pAG22</i> Vektor ( <i>pacr-13::acr-13::gfp</i> ) inseriert.
<i>myo-3::acr-16::3xmyc</i>	Das <i>myo-3::acr-16::9xmyc</i> Plasmid wurde einem partiellen Verdau mit NotI unterzogen und anschließend religiert. Die so erhaltenen Klone mit 3 MYC sequenzen wurden mittels BamHI Verdau und anschließender Sequenzierung mit dem <i>myc</i> -Seq Oligo verifiziert und via Injektion in <i>acr-16(ok789);unc-29(x29)</i> Doppelmutanten auf Funktionalität getestet.
<b><i>E. coli</i> Expressionsvektoren zur Aufreinigung von trunkiertem NRA-2 und NRA-4 Protein</b>	
<i>pmal2px::mpb::nra-2Frag</i>	<i>pmal2px::mpb::nra-2Frag</i> enthält ein 500 bp Fragment von <i>nra-2</i> , welches durch PCR mit den Oligos <i>oRBA73</i> und <i>74</i> hergestellt wurde. Dieses wurde anschließend nach Restriktion mit BamHI und EcoRI in den gleichermaßen geschnittenen <i>pmal2px</i> Vektor kloniert.
<i>pmal2px::mpb::nra-4shortFrag</i>	Zur Klonierung von <i>pmal2px::mpb::nra-4shortFrag</i> wurde ein 569 bp großes Fragment aus dem extracytosolischen Teil des Proteins mit Hilfe der Oligos <i>oRBA75</i> und <i>76</i> amplifiziert und nach Restriktion mit BamHI und EcoRI mit dem ebenfalls geschnittenen <i>pmal2px</i> Expressionsvektor ligiert.
<i>pmal2px::mpb::nra-4longFrag</i>	Ein 749bp großes <i>nra-4</i> Fragment wurde mit den Oligos <i>oRBA77</i> und <i>oRBA78</i> amplifiziert und nach Restriktion mit BamHI und EcoRI in den ebenfalls geschnittenen <i>pmal2px</i> Expressionsvektor kloniert, um <i>pmal2px::mpb::nra-4longFrag</i> zu erhalten.

## 2.2.3 Mikrobiologische Methoden

### 2.2.3.1 Kultivierung von *E. coli*

Zur Klonierung und Amplifikation der unterschiedlichen Konstrukte wurde der *E. coli* Stamm DH5 $\alpha$  verwendet. Die Kultivierung und Verarbeitung der Bakterien erfolgte unter sterilen Bedingungen. Um eine Selektion von positiv transformierten Klonen zu erlauben wurden entsprechende Antibiotika nach Sterilisation des Mediums hinzugefügt.

#### Verwendete Medien zur Kultivierung von *E. coli*

LB-Medium	1 % (w/v) Trypton/Pepton 0,5 % (w/v) Hefeextrakt 1 % (w/v) NaCl
LB-Agar Platten	1 % (w/v) Trypton oder Pepton 0,5 % (w/v) Hefeextrakt 1 % (w/v) NaCl 1,5 % (w/v) Agar
Antibiotika:	Ampizillin 100 mg/ml Kanamyzin 50 mg/ml

### 2.2.3.2 Herstellung transformationskompetenter *E. coli*

Um die Transformation von *E. coli* mit Plasmid-DNA zu ermöglichen muss ihre Zellwand so verändert werden, dass sie die Aufnahme der Konstrukte gewährleistet. Dazu wurden die Zellen mit Hilfe chemischer Behandlung transformationskompetent gemacht.

#### Verwendete Puffer zur Herstellung kompetenter *E. coli*

TBF I	30 mM Kaliumacetat 50 mM MgCl <sub>2</sub> 100 mM RbCl <sub>2</sub> 10 mM CaCl <sub>2</sub> 15 % Glycerin
TBF II	10 mM RbCl <sub>2</sub> 10 mM NaMOPS, pH 7,0 15 mM CaCl <sub>2</sub> 15 % Glycerin

## 2.2.4 Zellkultur Methoden

### 2.2.4.1 Kultivierung und Transfektion von HeLa Zellen

Zur Untersuchung der heterologen Expression von *nra-2*(cDNA) in vertebraten Systemen wurden HeLa-Zellkulturen verwendet.

HeLa-Zellen sind adhären wachsende Epithelzellen eines humanen Cervixkarzinoms (Scherer, 1953). Die Zellen wurden bei 37°C, einer CO<sup>2</sup>-Konzentration von 5% und einer relativen Feuchtigkeit von 95% kultiviert. Am nächsten Tag wurde das Medium gewechselt. Sie wurden in DmEM Medium resuspendiert und in einer T-75 cm<sup>2</sup> Flasche in Kultur gehalten (Ö. Demirel). Nach Erhalt wurden die Zellen bei Erreichen einer ca 80-90%igen Konfluenz umgesetzt. Dazu wurde zuerst das Medium abgesaugt und die Zellen zweimal mit je 5 ml PBS gewaschen. Anschließend wurde das PBS entfernt und die Zellen wurden mit 1,5 ml Trypsin ca. 2 min bei 37°C inkubiert um die Zellen vom Untergrund abzulösen. Die Trypsinisierung wurde mit mindestens 5 ml Kulturmedium abgestoppt und je 1/6 der Zellsuspension auf 3 x 6-Well Platten mit 3 ml DmEM Medium und einem Poly-D Lysin beschichtetem Deckgläschen pro Well überführt.

#### Transfektion:

Die Zellen wurden mit pEGFP.N3, *pEGFP::nra-2*(cDNA)::eGFP und pDsRed-ER mittels ‚Lipofectamine 2000‘ (Invitrogen) transfiziert. Die Anweisungen des Herstellers wurden genau befolgt.

#### Verwendete Puffer und Lösungen

Fötales Kälber Serum (FCS)	(Biochrom AG)
Dulbecco's modifiziertes Eagles Medium (PAA Laboratories)	10% FCS
DmEM	1 mM Natrium Pyruvat
	2 mM L-Glutamin
	100µg/ml Penizillin
	100µg/ml Streptomycin

## 2.2.5 Allgemeine biochemische Methoden

### 2.2.5.1 Affinitätsaufreinigung von Peptid-Antikörpern aus Kaninchenserum zum Nachweis endogener Proteine

Zur Gewinnung von spezifischen Antikörpern gegen NRA-2 und der Rezeptoruntereinheit UNC-29 wurden Kaninchen mit Peptiden (je 15 Aminosäuren) der Proteine immunisiert. Für UNC-29 wurde ein Peptid der Sequenz

CLDRLKEKYDTASNIP am C-Terminus der Untereinheit gewählt, welcher in den extrazellulären Raum ragt (A. Gottschalk). Um einen polyklonalen Peptid-Antikörper gegen NRA-2 zu erhalten wurde ein Peptid der Sequenz CHSQNTLEGTVAAIRKSIF aus dem kurzen, cytosolisch lokalisierten C- Terminus gewählt (Schematische Darstellung des Proteins Abb. 3.1.1). Diese Peptidsequenzen wurden so gewählt, dass sie keine Homologien zu anderen Peptiden in der *C. elegans* Datenbank aufweisen. Nach Immunisierung wird pro Peptid ein Antiserum erwartet, welches ein Gemisch aus mindestens drei spezifischen Antikörpern enthält, wobei ein Antikörper jeweils spezifisch für ein Epitop aus ca. 8 Aminosäuren ist.

Pro Peptid wurden zwei Kaninchen immunisiert um die Wahrscheinlichkeit für den Erhalt eines funktionalen Antikörpers zu erhöhen. Für NRA-2 wurde die Herstellung der Peptide, sowie die Immunisierung von der Firma Peptide Specialty Laboratories GmbH durchgeführt (zur Herstellung von anti-NRA-2: #251 und #252). Das Serum für die Aufreinigung von anti-UNC-29 #1956 und #1957 wurde von A. Gottschalk erhalten.

Zur Affinitätsaufreinigung des polyklonalen Peptid-Antikörpers wurden die finalen Kaninchen-Rohseren verwendet. Peptid Säulen, die jeweils 2 mg Peptid/ml UltraLink Iodoacetyl Gel Matrix enthielten (insgesamt 1 ml), wurden ebenfalls von Peptide Specialty Labs GmbH bezogen. Der Inhalt der Säule wurde auf zwei separate Säulen aufgeteilt, so dass pro Peptid-Antikörper gleichzeitig beide Kaninchenserum aufgereingt werden konnten. Die Säulen wurden mit 10 ml PBS äquilibriert. Anschließend wurde das jeweilige Kaninchen Rohserum mit 7,5 ml PBS verdünnt und in einem 15 ml Falcon Gefäß mit dem Säulenmaterial suspendiert. Zur Bindung der spezifischen Antikörper an die Peptide wurde der Ansatz über Nacht bei 4°C rotiert.

Am darauffolgenden Tag wurde die Suspension in die Säule zurück transferiert wobei der Durchfluss aufgefangen wurde. Dieser wurde zum Ausspülen des restlichen Säulenmaterials aus dem Falcon Gefäß verwendet und nochmals auf die Säule überführt.

Anschließend wurde das Säulenmaterial mit gebundenem Peptid 3 mal mit 10 ml 1x PBS, und 2x mit 10 ml 10 mM  $\text{Na}_3\text{-xH}_x\text{PO}_4$ , pH 6,8 gewaschen. Der Antikörper wurde mit 10 x 0,5 ml 0,1 M Glyzin, pH 2,82-2,85 eluiert, wobei das Eluat zur sofortigen Neutralisation in Eppendorfgefäßen mit 35 µl 1 M Tris-HCl, pH 9,0 aufgefangen und durch Inversion gemischt wurde. Der pH-Wert wurde anschließend mittels

Indikatorpapier nachgeprüft und gegebenenfalls mit 1 M Tris-HCl, pH 9,0 bzw. 0,1 M Glyzin pH 2,8 Puffer angepasst.

Die Säule wurde für zukünftigen Gebrauch regeneriert. Dazu wurde sie zuerst mit 10 ml 10 mM  $\text{Na}_3\text{-xH}_x\text{PO}_4$ , pH 6,8, anschließend mit 2 x 10 ml PBS + 1 M NaCl und schlussendlich mit 2 x 10 ml PBS + 0,05%  $\text{NaN}_3$  gewaschen und bei 4°C gelagert.

Zur Analyse des eluierten Antikörpers wurde zuerst die Proteinkonzentration mit Hilfe der photometrischen Messung der  $\text{OD}_{280}$  im Vergleich zur BSA Standardreihe bestimmt. Die Fraktionen mit der höchsten Konzentration an Antikörper wurden zentrifugiert, in je 100µl aliquotiert, dann 1:1 mit ultra reinem Glycerin gemischt und mit 0,05%  $\text{NaN}_3$  versetzt.

Die so gewonnenen Peptid-Antikörper wurden mit flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert. Im Folgenden wurden die Antikörper auf ihre Spezifität für die beiden Proteine im Western Blot analysiert.

#### Verwendete Puffer und Lösungen

Waschpuffer:

1 x PBS	0,1 M $\text{Na}_3\text{-xH}_x\text{PO}_4$ , pH 7,2
(durch Verdünnen von 10 x PBS)	0,15 M NaCl
	0,02 % $\text{NaN}_3$
10 x PBS	1,5 M NaCl
	1.0 M Natriumhydrogenphosphat pH 7,2
	0,2 % $\text{NaN}_3$

Elutionspuffer:

Natriumhydrogenphosphat, pH 6,8	10 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4$
	10 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4$
	Mischen bis pH 6,8 erreicht ist

Glyzin Puffer

0,1 M Glyzin,  
mit HCl auf pH 2,8 einstellen

Neutralisationspuffer:

1M Tris-HCl, pH 9,0

Lager-Puffer:

1x PBS mit 0,05%  $\text{NaN}_3$

#### 2.2.5.2 SDS-Polyakrylamid Gelelektrophorese (PAGE), Western Blot und Immundetektion

Zur Überprüfung der Spezifität der aufgereinigten Peptid-Antikörper wurde die Methode der SDS Gelelektrophorese mit anschließendem Western Blot angewendet.

Dazu wurde zuerst ein Proteinextrakt aus *C. elegans* nach der Methode der schnellen Proteinextraktion hergestellt (siehe *C. elegans* Methoden Abs. 2.2.6.15.1).

Die PAGE Methode dient der Auftrennung von Proteinen eines Extraktes nach ihrer Größe. Die Proteine bewegen sich dabei durch das Netzwerk aus Polyakrylamid, und können anhand ihres unterschiedlichen Laufverhaltens charakterisiert werden. Dabei lagert sich das anionische Detergenz SDS proportional zur Masse an die Proteine im Extrakt an und verleiht den Proteinen eine negative Ladung. Mit Hilfe dieser Ladung lassen sich die Proteine in einem elektrischen Feld anhand ihrer Größe auftrennen. Zur Auftrennung von Disulfidbrücken kann das Reduktionsmittel DTT hinzugefügt werden. Die Auftrennung der Proteine erfolgte bei einer Spannung von 120-180 Volt.

#### Verwendete Puffer und Lösungen für die SDS Gelelektrophorese

SDS-Laufpuffer	190 mM Glyzin, 25 mM Tris, 0,1 % SDS (w/v), pH 8,6
Trenngel-Puffer	1,5 M Tris/HCl, pH 8, Triton X-1008 0,4% (w/v) SDS
Sammelgel-Puffer	0,5 M Tris/HCl, pH 6,8 0,4% (w/v) SDS
Akrylamid/Bisakrylamid 30%	(Rotiphorese Gel 30)
Ammoniumperoxidsulfat (APS)	10 % (w/v)
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	
Ansatz für 12%-ige Trenngele:	2,82 ml Trenngelpuffer 3,76 ml Akrylamid 2,82 ml H <sub>2</sub> O 70 ul APS 100 ul TEMED
Ansatz für 4%ige Sammelgele	1,1 ml Sammelgelpuffer 650 ul Akrylamid 2,7 ml H <sub>2</sub> O 30 ul APS 20 ul TEMED

---

5 x Probenpuffer:	0,3 M Tris-HCl, pH 6,8 50% (V/V) Glycerin 15% (G/V) SDS 0,015% (G/V) Bromphenolblau 50 mM DTT (nur bei reduzierendem Probenpuffer)
-------------------	---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

---

Für die Analyse mittels Western Blot wird zunächst das Gel aus der SDS PAGE auf eine Nitrozellulose Membran übertragen. Der Transfer erfolgt für 90 min bei 0,8 mA/cm<sup>2</sup>. Um die freien Bindungsstellen vor unspezifischer Interaktion mit den Antikörpern zu schützen wird die Membran nach dem Transfer mit 5% (w/v) Magermilchpulver in TBS über Nacht bei 4° inkubiert.

#### Verwendete Puffer und Lösungen für den Western Blot

Protein-Transferpuffer	25 mM Tris/HCl pH 8,3 150 mM Glyzin, 10 % (v/v) Methanol
TBS	150 mM NaCl 20 mM Tris/HCl, pH 8.0
TBS-T	TBS mit 0.1% Triton X-100
Block Puffer	TBS 5% (w/v) Magermilchpulver 0,1% (v/v) Triton X-100 0,1% (w/v) NaN <sub>3</sub>

---

Die Immunodetektion der transferierten Proteine erfolgte mit Hilfe der spezifischen primären Antikörper. Die Membranen wurden mit der entsprechenden Menge an Antikörper, jeweils verdünnt in TBS (Verdünnungen siehe Abschnitt 2.1.3) für mindestens 2h bei RT oder über Nacht bei 4° inkubiert. Das Sichtbarmachen der markierten Proteine erfolgte durch Inkubation mit einem sekundären Antikörper aus dem Wirtsorganismus des ersten Antikörpers. Der sekundäre Antikörper wurde für etwa 2h bei RT inkubiert. Er ist mit einer Peroxidase aus dem Meerrettich markiert, die mit der ECL Lösung zu einer Lumineszenz-Reaktion führt. Diese Lumineszenz kann mit Hilfe des LUMI-Imagers sichtbar gemacht werden.

### Verwendete Puffer und Lösungen

ECL1 Lösung (frisch ansetzen)	9 ml H <sub>2</sub> O 1 ml 1 M Tris/HCl, pH 8,5 100 µl Luminol (250 mM in DMSO) 44 µl Coumarin Säure (90 mM in DMSO)
ECL2 Lösung (frisch ansetzen)	9 ml H <sub>2</sub> O 1 ml 1 M Tris/HCl, pH 8,5 6,4 µl H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (30 %)

#### 2.2.5.3 *Strippen* von Immunoblots

Ein großer Vorteil der Methode der Lumineszenzreaktion zur Detektion ist die Möglichkeit des *Strippen* und Wiederverwenden. Durch *Strippen* können alle Reagenzien des Blots von der Membran abgelöst werden, wobei die Antigene weitgehend auf dem Blot fixiert bleiben. So wird eine mehrmalige Markierung des Blots mit wechselnden Antikörpern oder Antikörperkonzentrationen ermöglicht.

Zur Durchführung wird der *Strip* Puffer im Wasserbad auf 50°C und anschließend gemeinsam mit dem Blot bei 50°C und unter Schütteln 15- 30 Minuten inkubiert. Dann wird der Blot 3x in 1x TBS gewaschen und kann zum Blockieren und für folgende Immunmarkierungen eingesetzt werden.

### Verwendete Puffer und Lösungen

<i>Strip</i> -Puffer	100 mM β-Mercaptoethanol, 2 % SDS, 62,5 mM Tris/HCl, pH 6,8
----------------------	-------------------------------------------------------------------

#### 2.2.5.4 Überprüfung der aufgereinigten Peptid-Antikörper im Western Blot

Die Peptid-Antikörper gegen NRA-2 und UNC-29 (anti-NRA-2: #251 und #252; anti-UNC-39 #1956 und #1957) wurden zuerst im Western Blot untersucht.

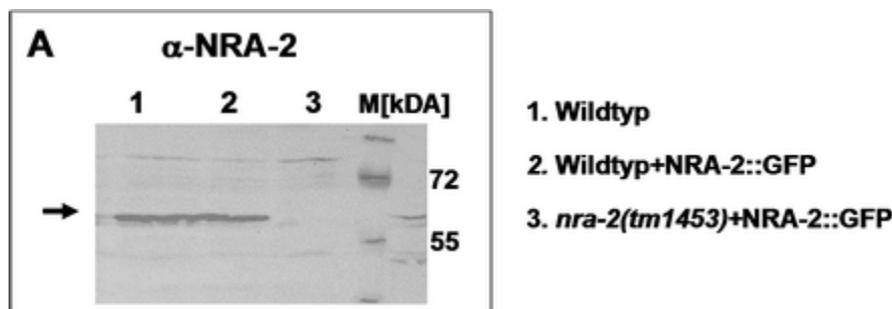
Zur Bestimmung der Spezifität des NRA-2 Antikörpers wurde ein Extrakt aus Wildtyp, NRA-2::GFP exprimierenden Wildtyp, sowie NRA-2::GFP exprimierenden Mutantenstamm *tm1453* hergestellt. Pro Tasche wurden 25µl Gesamt-Wurm Proteinextrakt aufgetragen. Die Überprüfung der Peptid-Antikörper ergab, dass Antikörper #251 nicht für einen Nachweis von NRA-2 im Western Blot geeignet ist.

Das Ergebnis des Proteinnachweises durch den  $\alpha$ -NRA-2 Antikörper #252 deutet darauf, dass der Antikörper im Western Blot das endogene Protein spezifisch erkennt, jedoch kein rekombinantes Fusionsprotein NRA-2::GFP der Größe 91kDa in Wildtyp und *nra-2* Mutanten nachweist (siehe Abbildung 8).

Die hergestellten NRA-2 Peptid-Antikörper #251 und #252 wurden daher in dieser Arbeit nicht für immunchemische Untersuchungen mittels Westernblot eingesetzt.

Proteingröße: Wildtyp: endogenes NRA-2 : 61,2kDa

Proteingröße: NRA-2::GFP Fusionsprotein : 91 kDa



**Abbildung 8: Spezifität des Peptid-Antikörpers #252 im Western Blot.** (A) Der Antikörper #252 gegen NRA-2 weist endogenes Protein nach, jedoch kein rekombinantes Fusionsprotein.

Der Nachweis der endogenen Levamisolrezeptor-Untereinheit UNC-29 mit Hilfe des aufgereinigten Peptid-Antikörpers wurde zuletzt in einer Verdünnung von 1:500 zur Immundetektion nach Western Blot eingesetzt.

Mit dem aufgereinigten UNC-29 Peptid-Antikörper konnte weder ein spezifischer Nachweis von endogenem noch exogenem UNC-29 im Western Blot erbracht werden. Daher wurde dieser Antikörper im Folgenden nicht für immunchemische Nachweise mittels Western Blot eingesetzt (Ergebnis nicht gezeigt).

## 2.2.6 *Caenorhabditis elegans* Methoden

### 2.2.6.1 Generelle Handhabung und Kultivierung von *Caenorhabditis elegans*

Die Nematoden wurden in der Regel bei 20°C auf 96mm Platten mit NGM-Agar (*Nematode Growth Medium*) gehalten, die zuvor mit *E. coli* OP-50 Zellen (Brenner, 1974) angeimpft wurden. Eine Ausnahme bilden hier die temperatursensitiven *lin-15*<sup>+</sup> Mutanten, diese wurden bei 15°C gehalten (siehe auch 2.2.6.4).

Die für Experimente veranschlagten Tiere wurden auf frische NGM-Agar Petrischalen transferiert, sobald die Bakterien abgefressen waren. Zur mittelfristigen Lagerung konnten sie im verhungerten Status bei 15°C bis zu 8 Wochen gehalten, wobei die Würmer in das Dauerlarven-Stadium übergehen. Zum Wiedereinsetzen des normalen Lebenszyklus wurde ein Stück des Agars auf eine frische Petrischale mit Bakterien überführt und bei 20°C entsprechend kultiviert. Für Experimente wurden grundsätzlich erst Würmer der darauf folgenden Generation verwendet.

Zur längeren Lagerung wurden die Tiere in Einfriermedium suspendiert, mittels flüssigem Stickstoffs eingefroren und über mehrere Monate bei -80 Grad gelagert (Sulston and Brenner, 1974).

#### Verwendete Medien und Lösungen

NGM-Agar	0,3 % (w/v) NaCl
	1,7 % (w/v) Agar
	0,25 % (w/v) Trypton/Pepton
	1 mM CaCl <sub>2</sub>
	1 mM MgSO <sub>4</sub>
	25 mM Kaliumphosphat-Puffer
	0,0005 % (w/v) Cholesterol

#### 2.2.6.2 Entfernen von Kontaminationen

Zum Entfernen von Kontaminationen auf NGM-Agar Petrischalen mit einem kleinen Bakterienrasen wurden ca. 5-7 Hermaphroditen, vorzugsweise mit vielen Eiern auf eine sterile NGM-Agar Petrischale überführt und sofort mit einem Tropfen (ca. 50-100ul) Bleichlösung bestehend aus 3.5% Natriumhypochlorit und 500mM NaOH benetzt. Dieses wurde wiederholt, bis sich der Wurm vollständig aufgelöst hat und die Eier freigelegt werden konnten. Nach Inkubation von einem Tag bei 20°C ließen sich bereits geschlüpfte Würmer ausmachen. Würmer, welche das L4 Stadium erreichten wurden auf eine frische NGM-Agar Petrischale übertragen und anschließend für Versuche eingesetzt.

#### 2.2.6.3 Staging

Um miteinander vergleichbare Resultate zu erhalten wurden für alle Versuche junge adulte *C. elegans* eingesetzt. Durch *staging* ist es möglich eine große Anzahl von Tieren des gleichen Entwicklungsstadiums zu erhalten.

Dazu wurden alle Tiere und Eier des gewünschten Stammes mit sterilem H<sub>2</sub>O vollständig von ihrer NGM-Brutschale gewaschen und in ein 15 ml Falcongefäß

überführt. Die finale Menge im Gefäß wurde mit Wasser auf 3,5 ml aufgefüllt. Anschließend wurde 1,5 ml Bleichlösung frisch hergestellt und hinzugegeben. Dieser Ansatz wurde 10 min inkubiert und alle 2 min auf dem Vortexgerät geschüttelt. Danach wurden die lysierten Eier und Würmer für 30 Sekunden bei 1300 x g und RT zentrifugiert und 2x mit sterilem Wasser gewaschen. Der Überstand wurde bis auf 2 ml abgenommen und die verbliebenen Eier tropfenweise auf sterile NGM-Agar mit OP-50 verteilt. Nach 2 Tagen Inkubation bei 20°C haben die Tiere das Stadium junger adulter *C. elegans* erreicht und können für Experimente eingesetzt werden.

#### 2.2.6.4 Mutantenstämme

Zur Untersuchung der Funktion eines Gens wurden Mutantenstämme eingesetzt. *C. elegans* Mutantenstämme sind bei Instituten erhältlich, wie zum Beispiel dem *C. elegans* Genetics Center (CGC) und dem *C. elegans* Gene Knockout Projekt am OMRF, welches Teil des internationalen *C. elegans* Gene Knockout Consortiums ist.

Die Erzeugung von Mutanten kann unter anderem durch EMS Mutagenese oder erfolgen. Da neben der gewünschten Mutation auch andere Gene betroffen sein können, wurden die Mutanten nach Erhalt 4-6 mal rückgekreuzt bevor sie für Experimente eingesetzt wurden. Zur Charakterisierung der jeweiligen Mutation in den erhaltenen Stämmen wurde nach Amplifikation der relevanten DNA Region und anschließender Sequenzierung ein Vergleich mit dem Wildtyp- *C. elegans* Gen durchgeführt ([www.wormbase.org](http://www.wormbase.org)).

#### Verwendete *C. elegans* Stämme:

Stamm	Beschreibung	Herkunft
<b>N2</b>	<i>C. elegans</i> Wildtyp	Bristol
<b>rff-3(pk1426)</b>	RNAi sensitiver Stamm	(Simmer et al., 2002)
<b>lin-15(n765ts)</b>	Temperatursensitive Mutante mit multi-Vulvae	<i>C. elegans</i> Gene Knockout Consortium
<b>RM509</b>	<i>ric-3(md1181)</i>	CGC
<b>ZZ15</b>	<i>lev-8(x15)</i>	J. Richmond
<b>ZZ20</b>	<i>unc-38(x20)</i>	
<b>ZZ37</b>	<i>unc-63(x37)</i>	
<b>RB918</b>	<i>acr-16(ok789)</i>	D. Touroutine & J. Richmond
<b>RB1195</b>	<i>acr-8(ok1240)</i>	
<b>RB1480</b>	<i>nra-2(ok1731)</i>	<i>C. elegans</i> Gene Knockout Consortium
<b>NW987</b>	<i>unc-129(ev554)</i>	J. Culotti
<b>Zx383</b>	<i>nra-2(tm1453)</i> 4x	R. Almedom, S. Mitani/NBRP
<b>Zx384</b>	<i>nra-2(ok1731)</i> 4x	R. Almedom
<b>ZX395</b>	<i>nra-2(tm1453); unc-38(x20)</i>	R. Almedom
<b>ZX441</b>	<i>nra-4(hd127)</i>	H. Hutter, J. Pan
<b>ZX445</b>	<i>nra-2(tm1453); acr-16(ok789)</i>	R. Almedom
<b>ZX453</b>	<i>nra-2(ok1731); nra-4(hd127)</i>	R. Almedom

Stamm	Beschreibung	Herkunft
ZX455	<i>nra-2(tm1453); nra-4(hd127)</i>	R. Almedom
ZX500	<i>nra-2(ok1731); acr-8(ok1240)</i>	R. Almedom
ZX501	<i>nra-2(tm1453); ric-3(md1181)</i>	R. Almedom
ZX502	<i>nra-2(ok1731); unc-38(x20)</i>	R. Almedom
ZX543	<i>nra-2(ok1731); nra-4(tm2656)</i>	R. Almedom
ZX544	<i>nra-4(tm2656)</i>	S. Mitani/NBRP

### 2.2.6.5 Transgene *C. elegans* Stämme

Transgene Stämme dienen vor allem zur Untersuchung der subzellulären Lokalisation von fluoreszenzmarkierten Proteinen sowie für phänotypische „Rescue“-Experimente. Zur Herstellung der transgenen Stämme wurden Mikroinjektionen nach der Standardmethode von Fire 1986 und Mello verwendet (Fire, 1986; Mello et al., 1991). Der dazu verwendete Injektionsmix enthält:

	Konzentration
Plasmid DNA	25 ng/μl
Injektionsmarker	80 ng/μl
10x Injektionspuffer	1x
H <sub>2</sub> O	ad to 15 μl

Die Menge des eingesetzten Ziel Plasmids und des Ko-injektionsmarkers wurde für den jeweiligen Konstrukt optimiert und variiert daher. Die eingesetzten Mengen für die in dieser Arbeit verwendeten Injektionsmische sind in Abschnitt 2.2.6.6 aufgeführt.

Die untenstehende Tabelle zeigt eine Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten transgenen Stämme. Der Nomenklatur des Genotyps der transgenen Tiere ergibt sich wie folgt: *genomischer Genotyp [injiziertes Genkonstrukt; injizierter Marker]* angegeben.

### Verwendete transgene Tiere:

Stamm	Beschreibung	Herkunft
ZxIs1	N2 + zxIs1[plev-1::lev-1::HA-6xHIS-3xHA; rol-6]	A. Gottschalk
ZX15	ljEx42[punc-38::unc-38::MYC::6xHIS::2xMYC; rol-6d]	A. Gottschalk
ZX56	zxEx51[punc-38::unc-38::MYC::6xHIS-2xMYC; podr-2::odr-2::HA; rol-6d]	A. Gottschalk
ZX275	zxIs1[plev-1::lev-1::HA-6xHIS-3xHA; rol-6]	A. Gottschalk
Zx387	<i>nra-2(tm1453); ZxIs1</i>	R. Almedom
Zx386	<i>nra-2(ok1731); ZxIs1</i>	R. Almedom
Zx522	<i>nra-2(ok1731); nra-4(hd127)</i> +ljEx[punc-38::unc-38::MYC::6xHIS::2xmyc; rol-6]	R. Almedom
Zx523	<i>nra-4(hd127)</i> +ljEx[punc-38::unc-38::MYC::6xHIS::2xmyc; rol-6]	R. Almedom
Zx524	<i>nra-2(ok1731)</i> +ljEx[punc-38::unc-38::MYC::6xHIS::2xmyc; rol-6]	R. Almedom
Zx525	<i>nra-2(tm1453)</i> +ljEx[punc-38::unc-38::MYC::6xHIS::2xmyc; rol-6]	R. Almedom

Stamm	Beschreibung	Herkunft
Zx556	<i>nra-2(tm1453)</i> + <i>zxEx[pmyo3::nra-2::GFP;rol-6d]</i>	R. Almedom
Zx568	<i>nra-4(hd127);ZxIs1</i>	R. Almedom
Zx569	<i>nra-2(ok1731);nra-4(hd127);ZxIs1</i>	R. Almedom
ZX574	<i>zxEx52[pnra-4::GFP; rol-6d]</i>	A. Gottschalk
ZX575	<i>nra-4(hd127); acr-16(ok789)</i>	R. Almedom
ZX576	<i>zxEx56[pmyo-3::nra-2(cDNA)::mCHERRY;punc-29::unc-29::GFP; rol-6d]</i>	R. Almedom
ZX577	<i>zxEx57[pmyo-3::nra-2(cDNA)::mCHERRY; psec23::sec23::GFP; rol-6d]</i>	R. Almedom
ZX579	<i>zxEx55[pmyo-3::nra-2(cDNA)::YFP; rol-6d]</i>	R. Almedom
ZX578	<i>nra-2(ok1731);ljEx42;zxEx54[pmyo-3::nra-2(cDNA)::GFP; lin15<sup>+</sup>]</i>	R. Almedom
ZX627	<i>nra-2(ok1731);zxEx63[pmyo-3::3xHA::nra-2(cDNA)::GFP; rol-6d]</i> .	R. Almedom
ZX628	<i>nra-2(ok1731);zxEx58[pmyo-3::Nicalin(human cDNA)::GFP; rol-6d]</i> ,	A. Gottschalk
ZX629	<i>nra-4(hd127); zxEx59[pnra-4::nra-4(cDNA)::GFP; rol-6d]</i> ,	A. Gottschalk
ZX636	<i>lin-15(n765ts);zxEx60[pnra-4::nra-4(cDNA)::VC155; lin-15<sup>+</sup>]; zxEx61[pmyo-3::nra-2(cDNA)::VN173; rol-6d]</i>	A. Gottschalk
ZX639	<i>lin-15(n765ts);zxEx60;zxEx62[pmyo-3::unc-1::VN173; rol-6d]</i>	A. Gottschalk
ZX640	<i>nra-2(ok1731); lin-15(n765ts); zxEx54</i>	R. Almedom

### 2.2.6.6 Ko-Injektionsmarker

Ko-Injektionsmarker dienen zum „Sichtbarmachen“ eines transgenen Stammes, da sie üblicherweise ein Gen kodieren, welches einen starken Phänotyp revertiert oder ihn hervorruft. Dieser Marker sollte so gewählt werden, dass seine Expression die zu untersuchenden Gene nicht beeinflusst. Der in dieser Arbeit am häufigsten eingesetzte Ko-Injektionsmarker ist das Gen *rol-6d*, welches zu einer Kollagen-Überexpression führt (Kramer et al., 1990). Die transgenen Tiere können durch den sogenannten „Roller“ Phänotyp eindeutig von Wildtyptieren unterschieden werden. Jedoch eignet er sich nicht für Stämme, welche für anschließende Verhaltensstudien vorgesehen sind, so wie beispielsweise Lokomotions-Assays. In diesen Fällen wurden bevorzugt Marker wie zum Beispiel GFP (Chalfie et al., 1994) oder andere fluoreszente Markerproteine eingesetzt, die allerdings die Isolierung transgener Tiere nur unter Binokularen mit Fluoreszenzlampen erlauben. Weiterhin wurden Marker Gene eingesetzt, die einen phänotypisch leicht identifizierbaren genetischen Defekt revertieren, wie z.B. *lin15<sup>+</sup>* (Clark et al., 1994).

### Injektionsmixe:

Injektionsplasmide	Konzentration
<i>pmyo3::nra-2::GFP</i>	5 ng/μl
<i>pmyo-3::nra-2(cDNA)::YFP</i>	5 ng/μl
<i>pmyo-3::nra-2(cDNA)::mCHERRY</i>	5 ng/μl
<i>pmyo-3::3xHA::nra-2(cDNA)::GFP</i>	5 ng/μl
<i>pnra-4::GFP</i>	40 ng/μl
<i>pnra-4::nra-4(cDNA)::GFP</i>	5 ng/μl

Injektionsplasmide	Konzentration
<i>pmyo-3::nicalin</i> (human cDNA)::GFP	2 ng/μl
<i>punc-29::unc-29::GFP</i>	25 ng/μl
<i>psec23::sec23::GFP</i>	2 ng/μl
<i>lin15<sup>+</sup></i> (temperatursensitive Mutante mit multi-Vulvae)	80 ng/μl
pRF-4 ( <i>rol-6d</i> ) : "Roller" Phänotyp – Kollagen Überexpression	≥ 80 ng/μl

Verwendete Medien und Lösungen	
Injektionspuffer 10x	200 mM K <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> 30 mM Kaliumcitrat 20 % Polyethylenglykol 6000 pH 7,5

### 2.2.6.7 RNAi

RNAi in *C. elegans* wurde durch Füttern von Bakterien-Stämmen aus der Ahringer RNAi Bakterien Stammsammlung durchgeführt (Kamath and Ahringer, 2003). Die Bakterienstämme, die Vektoren mit Gegenstrang-RNA der gewünschten Gene enthalten, wurden auf 384-Well-Platten vom HGMP erhalten (siehe unten). Die "HGMP Lokalisation" gibt Informationen über Chromosom, Plattennummer und *Well* Position für jeden Klon in der vom HGMP erhaltenen 38-Well-Platte. Zum Beispiel: Name des Gens T05F1.1 (*nra-2*) ist zu finden in der HGMP Lokalisation: I-4D18. Die Bezeichnung I-4D18 definiert das Chromosom 1 (I-), Platte 4 und *Well* D18.

Zweck	Gen	For Primer Seq (5'-3') Rev Primer Seq (5'-3')	HGMP Lokalisation
Test RNA	T05F1.1: <i>nra-2</i>	GGTGCCGTGCTTATTTTCAT CCTTTGAGAGCATCGTAGCC	I-4D18
Test RNA	C02E11.1: <i>nra-4</i>	CTTTTAATGTTTTCAAAAACCCCC TGCAACTGTAACCTTTTCCCTAA	V-1F19
Positiv Kontrolle	Y110A7A.r: <i>unc-63</i>	TGTTTGAAAAAGTTTCCACCTGT TGATCCGCTATATAGGCAACT	I-2E22
Negativ Kontrolle	Vektor alleine HT115 +L4440		2H10

Die jeweiligen Bakterienstämme wurden nach Erhalt in LB Flüssigmedium angezogen und anschließend 200 μl auf NGM-Agar mit 25 μg/ml Ampizillin aufgebracht und für 48h bei RT inkubiert. Zur Induktion der Transkription wurden 100 μl einer 100 mM IPTG Lösung auf den Bakterienrasen getropft. Für die Experimente wurden die RNAi sensitiven *rff-3(pk1426)* Mutantenstämme eingesetzt (Simmer et al., 2002). Nachdem das IPTG getrocknet ist wurden drei L4 Tiere auf den vorbereiteten NGM-Agar überführt und nach weiteren 24h auf einen zweiten, frisch induzierten NGM-Agar überführt. Die jungen, adulten Würmer aus der Nachkommenschaft der drei L4 Tiere

wurden nach 96h in Verhaltensassays eingesetzt. Im vorliegenden Fall wurden Levamisol-vermittelte Paralyse Assays durchgeführt.

Zur Durchführung von Doppel-RNAi wurden zwei RNAi Bakterienstämme 1:1 gemischt und anschließend auf NGM-Agar aufgebracht. Die hier verwendeten HGMP Stämme waren I-4D18 (*nra-2*) und V-1F19 (*nra-4*).

#### 2.2.6.8 Lokomotion

Die Untersuchung der Lokomotion gibt sowohl Aufschluss über die Funktion der Körperwandmuskulatur als auch über die Innervation und ist maßgeblich von der Aktivität der nikotinischen Acetylcholinrezeptoren beeinflusst. (Methoden: Behavioral Assays Wormbook) In dieser Arbeit wurde die Quantifizierung der Lokomotionsraten verschiedener Mutanten im Vergleich zum Wildtyp eingesetzt.

Bei allen Verhaltensstudien wurde darauf geachtet, dass die zu examinierenden Würmer auf den Petrischalen und in Flüssigkeit vorsichtig bewegt wurden, um einen Einfluss auf die Bewegung durch mechanische Stimulation zu verhindern.

#### 2.2.6.9 Quantifizierung der Bewegungsrate in Flüssigkeit

Zur Quantifizierung von Lokomotion in Flüssigkeit wurden junge adulte Tiere durch *staging* erhalten. Die Analyse erfolgte in 96 well Platten. Zuerst wurden 50 µl verflüssigtes NGM-Agar pro Vertiefung gegeben. Nach Aushärten des Agars wurden 100 µl steriler M9 Puffer dazugegeben und 10 Tiere der zu vergleichenden Stämme in die Flüssigkeit transferiert. Dabei wurde darauf geachtet, dass möglichst wenig OP-50 Bakterien co-transferiert werden. Nach Ruhen von ca. 1h bei 20° C wurden Schwimmbewegungen der Würmer während einer Minute gefilmt und nachträglich die Körperbeugungen pro Minute ausgezählt. Hierbei wurde eine Schwimmbewegung als vollständige Sinusbewegung des Kopfes definiert.

#### 2.2.6.10 Muscimol Assays

Zur indirekten Untersuchung der Aktivität des inhibitorischen GABA<sub>A</sub> Rezeptors wurde die Bewegungsrate von Wildtyp und der zu testenden Mutanten nach einer 1 stündigen Inkubation in M9-Puffer mit 8 mM Muscimol im Vergleich zu M9-Puffer ohne Muscimol quantifiziert. Muscimol aktiviert den GABA<sub>A</sub> Rezeptor und induziert Muskelrelaxation, was zu einer Verlangsamung der Schwimmmaktivität führt. Die Durchführung des Experiments erfolgte wie in Abschnitt 2.2.6.9 beschrieben.

### 2.2.6.11 Nikotin- und levamisol -vermittelte Paralyse Assays

Nikotin- und Levamisol-vermittelte Paralyse Assays dienen zur *In-situ* Untersuchung der Aktivität von nikotinischen Acetylcholinrezeptoren in *C. elegans* (Gottschalk et al., 2005).

#### **Herstellung von Petrischalen mit Testmedium**

Die Petrischalen mit Medium für die jeweiligen Tests wurden bevorzugt am Tag des Tests oder einen Tag zuvor hergestellt und bei 20°C gelagert. Dazu wurden entweder 31 mM Nikotin oder 0,2 mM Levamisol in verflüssigtes NGM-Agar Medium gegeben. Zur Herstellung der jeweiligen Platten wurden 2,5 ml des Mediums in 2,5 cm Petrischalen überführt. Sind die Petrischalen getrocknet können die Versuchsstämme überführt und getestet werden.

#### **Durchführung von Paralyse Assays**

Je 30 L4 Tiere der zu testenden Stämme sowie Wildtyp Tiere wurden auf frischen NGM Agar mit einem dünnen OP-50 Bakterienrasen überführt und bei 20 °C angezogen. Am folgenden Tag wurden die nun 30 jungen adulten Tiere auf die Petrischalen mit der zu testenden Droge überführt und im 15 minütigen Abstand nach Reaktion auf mechanischen Reiz hin untersucht (vorsichtiges Antippen mit dem Pick). Die Anzahl der sich bewegenden Würmer wurde über einen Zeitraum von 60-120 Minuten erfasst.

### 2.2.6.12 Statistik

Die in dieser Arbeit gewonnenen Daten wurden mit Hilfe von student'schen t-tests statistisch ausgewertet. Die so ermittelten Standardfehler des Mittelwertes (*standard error of the mean*, s.e.m.) wurden als Fehlerbalken in die jeweiligen Graphen eingefügt. Alle Daten wurden mit einem Konfidenzlevel von 95% analysiert. Die statistisch signifikanten Unterschiede zum Wildtyp wurden jeweils über dem Balken/Graphen angegeben. Signifikante Unterschiede zwischen Mutanten wurden entsprechend markiert. Die jeweiligen *p*-Werte wurden mit \*-Symbolen gekennzeichnet. Dabei galt:  $p \leq 0,05$ : \*;  $p \leq 0,01$ : \*\* und  $p \leq 0,001$ : \*\*\*. Lag der *p*-Wert über 0,05 wurden die Werte als nicht signifikant unterschiedlich eingestuft.

### 2.2.6.13 Kreuzung

Kreuzungen von Würemern dienen vor allem zur Herstellung von Doppel- oder Mehrfachmutanten, sowie zum Austausch transgener Arrays.

Ungefähr zwei bis drei L4 Hermaphroditen eines Stammes wurden dabei mit ca. 12 L4 Männchen der zu kreuzenden Tiere eines anderen Stammes in die Mitte einer NGM Petrischale mit einem stecknadelgrossen Bakterienfleck transferiert und über Nacht bei RT inkubiert. Am Folgetag wurden die mit großer Wahrscheinlichkeit befruchteten Hermaphroditen (P01 – P03 = Parentalgeneration) vereinzelt. Hinweis auf eine erfolgreiche Kreuzung war das Vorkommen einer erhöhten Zahl von Männchen in der F1 Nachkommenschaft oder von Tieren mit Ausprägung eines Ko-injektionsmarkers, z.B dem „Roller“-Phänotyp, im Falle von transgenen Tieren.

Anschließend wurden 10 Tiere der heterozygoten F1 Nachkommenschaft vereinzelt und die F2 und Folgegeneration mittels PCR auf ihren Genotyp untersucht. Homozygote, also positive Linien des gewünschten Genotyps wurden nochmals mittels Genotypisierung von 10 einzelnen Tieren verifiziert (siehe unten).

Die für die Kreuzungen notwendigen Männchen wurden entweder mittels Hitzeschock (Inkubation von L4 Tieren bei 30°C für 5-6 Stunden) oder durch Kreuzung Hermaphroditen mit Männchen des gleichen Stammes hergestellt.

#### 2.2.6.14 Genotypisierung

Zur Bestimmung des Genotyps einer neu erhaltenen Mutante, sowie zur Validierung des gewünschten Genotyps der Nachkommen nach Kreuzungen oder Rückkreuzungen wurden Genotypisierungs-PCRs durchgeführt. Dabei wurden Oligonukletidpaare gewählt, die innerhalb, sowie ausserhalb der Deletion oder Mutation liegen.

Vor der Durchführung der PCR wurden einzelne oder mehrere Tiere der zu untersuchenden Petrischale, sowie einer Wildtyp-Kontrolle für 15 min bei -80°C in 2,5 µl SEWLB Puffer (*Single Worm and Egg Lysis Buffer*) mit 0,2µg/µl Proteinase K inkubiert und anschliessend für 1h bei 60°C lysiert. Die Proteinase wurde in einem Folgeschritt bei 95°C für 15 min deaktiviert. Die DNA ist nun frei zugänglich für Oligonukleotide und Polymerase.

Die Genotypisierungs PCR wurde standardmäßig nach dem folgenden Rezept durchgeführt:

SEWLB Wurm Lysat: 2,5 µl wurde zu je 1,2µl in zwei Reaktionsgefäße aufgeteilt und der folgende PCR-Mix hinzugefügt.

PCR-Ansatz	Menge
Wurmlysat	1,2µl (0.1–1 ng/ml)
dNTPs	0,5µl (je10mM)
Oligo 1	0,2µl (10 pm/µl)
Oligo 2	0,2µl (10 pm/µl)
10x PCR Puffer	2,5µl
H <sub>2</sub> O	20,1µl
Taq Polymerase	0,2µl (1,25 U)
Gesamtmenge	25 µl

Oligo 1 bzw. 2 bezeichnen dabei das jeweils gewählte Oligonukleotidpaar zur Ermittlung der Mutation (sogenannte „innere und äußere“ Oligos, siehe Abschnitt 2.1.5).

Das PCR Programm für alle in dieser Arbeit durchgeführten Genpotypisierungen wurde jeweils für jedes Oligonukleotidpaar etabliert und optimiert. Im Allgemeinen folgte der Zyklus folgendem Programm:

PCR – Schritt	Temperatur	Zeit
1 Initialisierung	95°C	60sek
2 Denaturierung	95°C	30sek
3 Anlagerung	52-56°C	30sek
4 Verlängerung	72 °C	90sek →Wdh:30-40 Zyklen Schritt 2-4
5 Finale Verlängerung	72 °C	10min
6 Ende	4 °C	bis zur Entnahme

#### Verwendete Puffer

SEWLB	10 mM Tris/HCl pH 8,3
Single Egg and Worm Lysis Puffer	50 mM KCl
	2,5 mM MgCl <sub>2</sub>
	0,45 %(v/v)Tween 20
	0,05 % (v/v)Gelatine

---

10x PCR-Puffer	100mM Tris/HCl (pH 8,3)
	500mM KCl
	15mM MgCl <sub>2</sub>
	0,001% Gelatine

---

### 2.2.6.15 Biochemische *C. elegans* Methoden

#### 2.2.6.15.1 Herstellung von Wurmproteinextrakt

Folgendes Protokoll ist geeignet zur Präparation von kleinen Mengen *C. elegans* Proteinextrakt, zum direkten Einsatz in der SDS PAGE eingesetzt. Dazu wird eine kleine (6cm) NGM Platte mit dem gewünschten Stamm bis kurz vor Verbrauch aller Bakterien gehalten. Die Würmer werden mit kaltem dH<sub>2</sub>O heruntergewaschen, in Eppendorfgefäße überführt und kurz zentrifugiert. Die Würmer werden wiederholt mit kaltem H<sub>2</sub>O gewaschen bis der Überstand klar ist. Anschließend werden sie bei 2500 rpm für 1 Minute pelletiert und der Überstand wird abgenommen. Das Pellet wird in 30 µl ESB aufgenommen und sofort für 3 min. bei 100°C erhitzt, wobei die Proteine denaturiert werden. Dann erfolgt die Zugabe von ca. 30 µl 0.2 mm Glass Beads. Das Gemisch wird 2 Minuten auf dem Vortex geschüttelt. Dabei wird die Cuticula der Würmer aufgebrochen. Nach wiederholter Zugabe von 70 µl ESB und weiterem *Vortexen* erfolgt noch einmal die kurze Inkubation für 1 Minute bei 100°C und ein kurzer Zentrifugationsschritt. Pro Gelkammer können 5-20 µl aufgetragen werden.

#### Verwendete Puffer

ESB:	2 %	SDS
	80 mM	Tris (pH 6.8)
	10 %	Glyzerin
	1.5 %	DTT
	0.1 mg/ml	Bromphenolblau

---

### 2.2.6.16 Immunhistochemische *C. elegans* Methoden

#### 2.2.6.16.1 *Freeze Crack* – Methode (modifiziert nach J.Duerr (11/99))

Die Immunhistochemie dient zur Markierung von endogenen Proteinen bzw. heterolog exprimierten Proteinen. Dazu wurden junge adulte Würmer nach dem *Stagen* (siehe 2.2.6.3) in M9 Puffer aufgenommen und tropfenweise auf Poly-L-Lysin-beschichtete

Objektträger aufgetragen. Anschließend wurde ein zweiter beschichteter Objektträger aufgelegt und zusammengepresst. Dieser „Sandwich“ wurde auf Trockeneis gefroren und konnte bei Bedarf bei  $-80^{\circ}\text{C}$  langfristig gelagert werden. Zur Durchführung der Immunfärbung wurden die Objektträger nach 10 Minuten auf Trockeneis belassen und anschließend auseinandergelöst. Dabei bleibt die Cuticula der Tiere an der Poly-L-Lysin schicht haften und die Tiere werden im idealen Fall in zwei Hälften gebrochen. Somit wurden das Wurminnere und bzw. die Epitope frei zugänglich für die immunhistochemische Markierung.

### **Fixieren**

Zur Fixierung wurden die einzelnen Objektträger mit den angehafteten Tieren für 4 Minuten in Acteon und daraufhin für 2 Minuten mit Methanol inkubiert. Nach der Fixierung wurden sie mit eiskaltem PBS abgewaschen und in 15 ml Falcon Gefäße überführt. Nach 2-maligem Waschen mit kaltem Antikörperpuffer (2x Zentrifugation für 2 Minuten bei  $4^{\circ}\text{C}$  für und 1100rpm in der Tischzentrifuge) wurde der Überstand vorsichtig abgenommen.

### **Blockieren**

Unspezifische Bindungsstellen wurden mit Ziegen Serum blockiert, da der sekundäre Antikörper aus der Ziege gewonnen wurde. Dazu wurden die Würmer in 500  $\mu\text{l}$  Antikörperpuffer mit 10% Ziegen Serum aufgenommen und in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und für 2h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Würmer 3x mit kaltem Antikörperpuffer gewaschen (Zentrifugation für 2 Minuten bei  $4^{\circ}\text{C}$  und 1100 rpm in der Tischzentrifuge) und der Überstand vorsichtig abgenommen.

### **Immunfärbung**

Die primären Antikörper wurden in Antikörperpuffer mit 10% Ziegen Serum verdünnt (Verdünnungen siehe Abschnitt 2.1.3) und in die 1,5 ml Reaktionsgefäße mit den Würmern gegeben. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei  $4^{\circ}\text{C}$ . Nach 3-maligem Waschen wurden die Würmer in sekundärem Antikörper (Verdünnungen siehe 2.1.3) für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Würmer 2x in kaltem Antikörperpuffer gewaschen und der finale Waschschrift erfolgte in kaltem PBS. Der Überstand wurde bis auf 50  $\mu\text{l}$  abgenommen. Zum Einsetzen für die Mikroskopie wurden 5  $\mu\text{l}$  der Wurmsuspension auf einen Objektträger aufgetragen und mit einem Tropfen Mounting Medium versetzt. Anschließend wurde ein Deckglas auf den Tropfen

aufgebracht und der Objektträger für mindestens eine Stunde bei Raumtemperatur an einem dunklen Ort zum Trocknen gelagert. Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen erfolgten idealerweise noch am Tag der Färbung. Bei Lagerung der Objekte bei 4°C im Dunkeln konnte die Fluoreszenz für einige Wochen erhalten werden.

### Verwendete Puffer und Lösungen

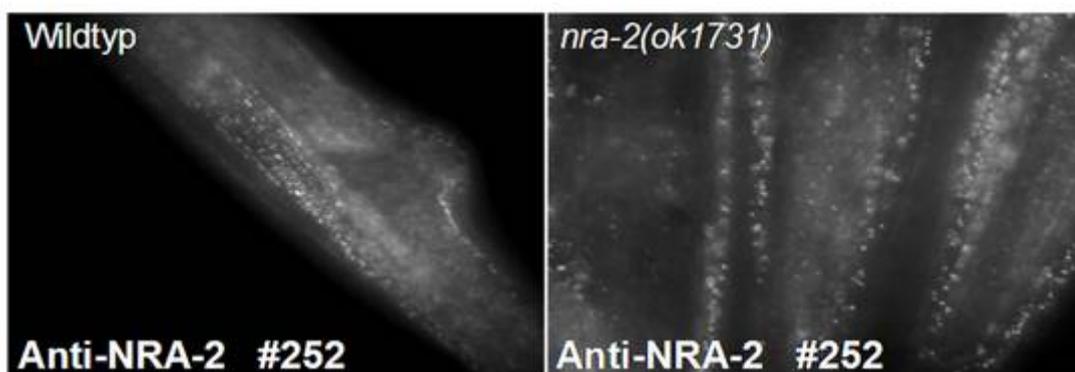
Antikörper Puffer (11)	100 ml 10x PBS 0,5 % (v/v) Triton X-100 1mM EDTA, pH 8 0,1 % (w/v) BSA 0,05 % (w/v) Natriumazid pH 7,2 mit HCl einstellen und bei 4 °C lagern
Blocking Puffer	10 % (v/v) Ziegen Serum (Sigma)
Mounting Medium	25 % Glycerol 10 % Mowiol 0,2 M Tris/HCl, pH 8,5 für 1-2 h bei 50 °C rühren aliquotieren und bei -20°C lagern Vor Gebrauch: 2,5 % DABCO hinzufügen und bei RT dunkel lagern
PBS pH 7,2	11 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 3,2 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 1,5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 2 g Natriumazid pH mit NaOH einstellen, autoklavieren, bei RT lagern

### 2.2.6.17 Immunhistochemische Überprüfung der aufgereinigten Peptid-Antikörper

Durch Immunhistochemische Färbung von Wildtyp- und Mutantentieren wurde die Spezifität der affinitätsaufgereinigten Peptid-Antikörper (anti-NRA-2 #251 und #252;

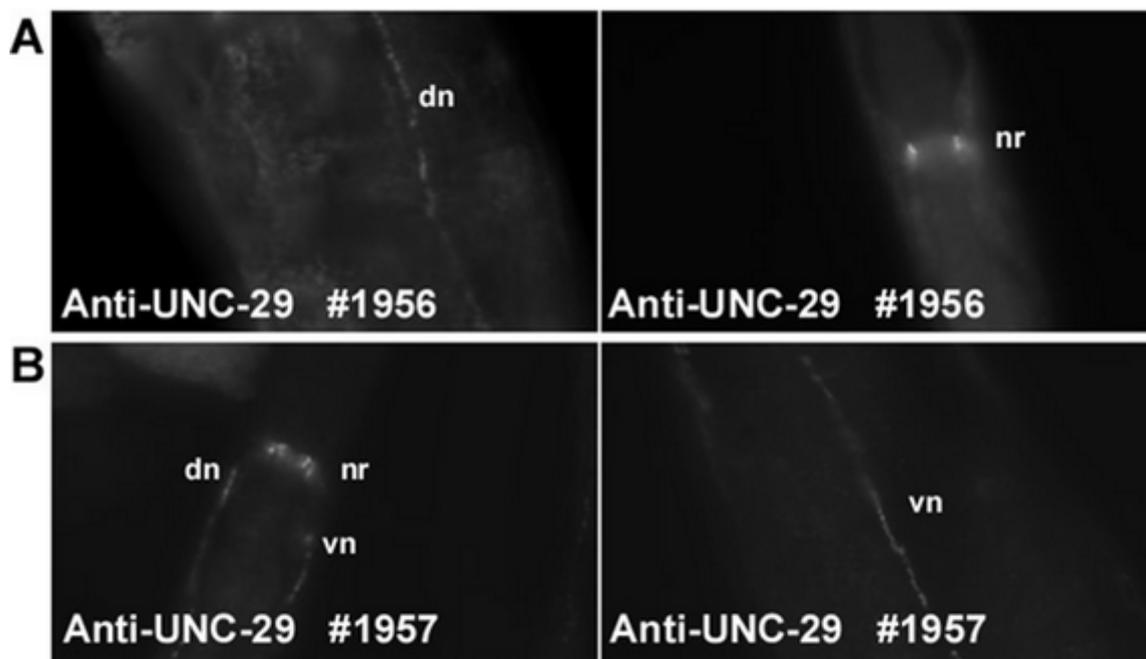
bzw. anti-UNC-29 #1956 und #1957) vor Einsatz in der subzellulären Analyse auf ihre Funktionalität hin überprüft.

Dazu wurde zuerst die Cuticula von Wildtyp Tieren, sowie *nra-2(ok1731)* Mutanten mit der *Freeze Crack*-Methode aufgebrochen und so die Epitope im Körperinneren zugänglich für die Antikörper gemacht. Die Tiere wurden zuerst in Antikörperpuffer mit 10 % Ziegen Serum inkubiert, um unspezifische Bindungen zu blockieren und mit den 1:200 verdünnten NRA-2-spezifischen Peptid-Antikörpern #251 und #252 oder den UNC-29-spezifischen Antikörpern #1956 und #1957 über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach anschließendem Waschen und Inkubieren mit dem rot-fluoreszierenden sekundären Antikörper (Alexa Fluor 568; siehe 2.1.3) für 2h bei Raumtemperatur wurden die immunmarkierten Würmer auf Objektträger aufgetragen und mit Mowiol versehen. Die Überprüfung der immunhistologischen Markierung erfolgte mittels Zeiss Axiovert Fluoreszenzmikroskop.



**Abbildung 9: Spezifität des Peptid-Antikörpers  $\alpha$ -NRA-2 #252 in der Immunhistochemie.** Der Peptid-Antikörper #252 erkennt unspezifische Strukturen immunhistochemische Markierung in Wildtyp sowie *nra-2* Mutanten. Die Aufnahmen wurden am Zeiss Axiovert Fluoreszenzmikroskop gemacht. Der Größenbalken entspricht 10 $\mu$ m

Nach Inkubation mit dem NRA-2 spezifischen Peptid-Antikörper #251 in fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen keine spezifische Färbung demonstriert werden (nicht gezeigt). Im Vergleich waren nach Färbung mit dem NRA-2-Antikörper #252 Strukturen erkennbar, die Muskelsträngen ähneln (siehe Abbildung 9), jedoch sowohl in Wildtyp sowie in *nra-2* Mutanten nachweisbar sind. Beide Peptid-Antikörper für NRA-2 sind also nicht geeignet für die Verwendung in immunhistologischen Experimenten und wurden daher im Folgenden nicht für subzelluläre Lokalisationsstudien verwendet.



**Abbildung 10: Spezifität der Peptid-Antikörper für UNC-29 in der immunhistochemischen Färbung.** Immunhistochemische Markierung von Wildtyptieren mit UNC-29 spezifischen Peptid-Antikörpern #1956 (A) und #1957(B). dn: dorsaler Nervenstrang; vn: ventraler Nervenstrang; nr: Nervenring. Die Aufnahmen wurden am Zeiss Axiovert Fluoreszenzmikroskop gemacht. Der Größenbalken entspricht 10 $\mu$ m.

Die Überprüfung der Peptid-Antikörper #1956 und #1957 gegen UNC-29 konnte ihre Spezifität in der immunhistochemischen Markierung bestätigen (siehe Abbildung 10 A und 10B). Nach immunhistochemischer Markierung von Wildtyptieren mit UNC-29 spezifischen Peptid-Antikörpern #1956 und (B) #1957 ist eine spezifische Detektion von endogenem UNC-29 in den für Levamisolrezeptoren erwarteten Strukturen entlang der dorsalen und ventralen Nervenstränge, sowie am Nervenring erkennbar. Der spezifische Antikörper #1957 gegen UNC-29 wurde im Folgenden zur subzellulären Analyse verwendet. Zur weiteren Untersuchung der subzellulären Lokalisation von NRA-2 wurden rekombinante Fusionsproteine mit GFP, YFP oder mCHERRY verwendet.

#### 2.2.6.17.1 Injektion von Antikörpern zur Quantifizierung der Fluoreszenz rekombinater Proteine an Nervensträngen

Die Methode der Injektion von fluoreszenzmarkierten Antikörpern wurde von A. Gottschalk entwickelt und beschrieben (Gottschalk and Schafer, 2006). Sie eignet sich zur *in-situ* Markierung der extrazellulären Aminosäuren eines heterolog exprimierten Membranproteins.

Zur Markierung und Quantifizierung der synaptischen Levamisolrezeptor Untereinheiten in *nra-2* und *nra-4* Mutanten wurden zuerst transgene Mutanten- und Wildtypiere erzeugt, die eine extrazelluläre, mit MYC- oder HA-Peptid-markierte, Rezeptoruntereinheiten exprimieren. Dann wurde ein fluoreszenzmarkierter anti-HA oder anti-MYC Antikörper im Verhältnis 1:200 mit 1x Injektionspuffer verdünnt und mit Hilfe des Mikromanipulators zielgenau in den Cuticula-Bauchhöhlen Zwischenraum injiziert. Die Würmer wurden anschliessend ca. 12 h bei 20°C und unter Lichtausschluss inkubiert. Zur Untersuchung fluoreszenzmarkierter extrazellulärer Epitope wurden die Tiere auf Objektträger gebracht. Um Austrocknen zu verhindern und die Tiere zu immobilisieren wurde der Objektträger zuvor mit einem ausgehärteten Tropfen 2,5 %igem Agarosegel in M9 Puffer mit 20 mM Natriumazid versehen. Anschließend wurden die Würmer auf das Agarosegel-*Pad* gegeben, mit einem Tropfen M9 Puffer versehen und mit einem Deckglas bedeckt. Die Untersuchung erfolgte zeitnah im Fluoreszenzmikroskop mit zugehöriger Software.

#### **2.2.6.17.2 Immunhistochemische Markierung endogener Proteine zur Quantifizierung von Fluoreszenz an Nervensträngen**

Zur Quantifizierung endogener UNC-29 Untereinheiten an der Synapse wurde das Epitop an den Nervensträngen mittels *Freeze-Crack* Methode zugänglich gemacht (siehe Abschnitt 2.2.6.16.1). Die zu untersuchenden Tiere wurden mit dem, zuvor aufgereinigten, UNC-29-spezifischen Peptid-Antikörper #1957 sowie mit einem monoklonalen anti-UNC-17 Antikörper markiert. Das präsynaptische Protein UNC-17 (vesikulärer Acetylcholin Transporter) (Alfonso et al., 1993) wurde co-markiert und diente als Referenz für die Quantifizierung von Fluoreszenz an der Postsynapse.

Als sekundärer Antikörper dienten Alexa Fluor 568 Ziege anti-Kaninchen IgG (rot) zum Nachweis von  $\alpha$ -UNC-29 und Alexa Fluor 488 Ziege anti-Maus IgG (grün) zum Nachweis von  $\alpha$ -UNC-17. Weitere Angaben zu den Antikörpern siehe auch Abschnitt 2.1.3.

#### **2.2.6.18 Quantifizierung von Fluoreszenz an Nervensträngen**

Zur Quantifizierung der Fluoreszenzintensität an Nervensträngen wurde die Software Image J verwendet.

Der ventrale Nervenstrang der immunhistochemisch oder durch Injektion von fluoreszenzmarkierten Antikörpern markierten Tiere wurde im Bereich zwischen Vulva

und Nervenring am Fluoreszenzmikroskop aufgenommen. Die so erhaltenen Bilder wurden mit der Bildbearbeitungssoftware Image J analysiert, indem die Intensität der Pixel durch Nachzeichnen der Nervenstränge per Hand quantifiziert wurde. Die durchschnittliche Intensität der Fluoreszenz entlang der Synapse von Wildtyptieren wurde mit der von Mutanten verglichen und graphisch aufgetragen. Die Fluoreszenz von UNC-29 wurde jeweils zur UNC-17 Fluoreszenz im Wildtyp normalisiert.

#### 2.2.6.19 **Fluoreszenzmikroskopie**

Die subzelluläre Lokalisation von Proteinen mit fluoreszierendem Fusionsprotein oder nach immunhistochemischer Markierung wurde mittels Fluoreszenzmikroskopie ermittelt. Dazu wurden die aus den Schritten 2.2.6.16.1 und 2.2.6.17.1 erhaltenen Objektträger mit den zu untersuchenden Tieren mit dem konfokalen Laser Scanning Mikroskop (CLSM) bzw. dem Axiovert 300 Mikroskop mit einem 10x Objektiv oder 100x Immersionsobjektiv untersucht. Die Aufnahmen am Axiovision Mikroskop wurden mit der AxioCam MRM Kamera und der zugehörigen Software von (Zeiss) aufgenommen. Am CLSM wurde eine LASER-Diode bei 450nm zur Aufnahme der DAPI Fluoreszenz, der Argon LASER bei 488 nm für Alexa Fluor 488 oder GFP und ein 543 nm HeNe LASER zum Nachweis von mCHERRY oder DsRED verwendet.

Die Bilder wurden nachträglich mit der Bildbearbeitungssoftware Adobe Photoshop 7.0 oder IMARIS bearbeitet.

#### 2.2.6.20 **Whole Cell Voltage Clamp – Elektrophysiologie**

Die sogenannte *Patch Clamp*-Technik ist eine Methode der Elektrophysiologie die es erlaubt direkt Ströme einzelner Ionenkanäle an der Zellmembran zum Beispiel von Muskelzellen zu messen (Neher and Sakmann, 1992). Die elektrophysiologischen Messungen von Strömen an präparierten Muskelzellen von *C. elegans* wurde entsprechend der Beschreibung in der Literatur von Jana Liewald durchgeführt (Goodman et al., 1998; Raizen and Avery, 1994; Richmond and Jorgensen, 1999; Rogers et al., 2001).

#### 2.2.6.21 **Single-Channel Aufnahmen an embryonischen Muskel Zellen**

Die Funktionalität der Rezeptoren am Muskel von Wildtyp und *nra-2* Mutanten sollte näher auf der Ebene einzelner Kanäle untersucht werden. Diese Methode wurde von der Gruppe um Cecilia Bouzat etabliert und durchgeführt (Universität Bahia Blanca, Argentinien).

---

Dazu werden embryonale Muskelzellen aus dem L1 Wildtyp bzw. entsprechenden Mutanten isoliert und kultiviert. Die embryonalen Muskelzellen sind dabei anhand ihrer spindelförmigen Morphologie zu identifizieren, die der von adulten Körperwand-Muskelzellen *in vivo* entspricht (Christensen et al., 2002; Touroutine et al., 2005). Durch eine an der Zelle angebrachte Patch-Clamp Pipette kann dann die Aktivität eines einzelnen Kanals genau untersucht werden (Christensen et al., 2002; Rayes et al., 2007). Zur Charakterisierung der nAChR in Muskeln auf der Ebene einzelner Kanäle wurde zuerst der PD 4251 Stamm untersucht. Dieser enthält Wildtyp nAChR und exprimiert zusätzlich GFP in Körperwand Muskelzellen. Auf diese Weise sind die Muskelzellen leicht durch Fluoreszenz zu identifizieren (Rayes et al., 2007). Anschließend wurden einzelne nAChR Kanäle in Wildtyp gemessen und sichergestellt, daß die Kanäle in PD4251 und N2 sich nicht unterscheiden. Die Muskelzellen aus Wildtyp Embryos konnten eindeutig im optischen Mikroskop gegenüber anderen Zelltypen über ihre spezifische Morphologie identifiziert werden. Nach dieser Verifizierung konnte die Untersuchung der Muskelzellen von hier untersuchten Mutanten erfolgen.

Die elektrophysiologischen Messungen sowie ihre Auswertung wurden von Cecilia Bouzat and der Universität Bahia Blanca, Argentinien durchgeführt und folgten der Beschreibung in Rayes et al., 2007 und Almedom et al., 2009.

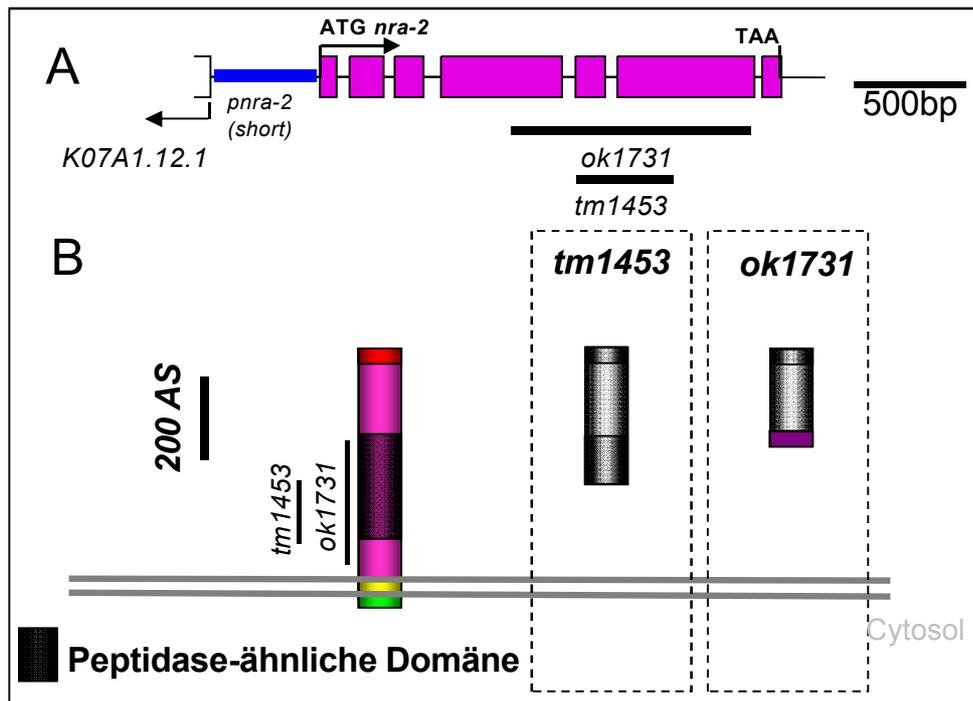
## 3 Ergebnisse

### 3.1 NRA-2 und NRA-4: Gene, Allele und Proteine

#### 3.1.1 Charakterisierung von *nra-2* und seinen Allelen *tm1453* und *ok1731*

Da das Genom von *C. elegans* vollständig sequenziert ist, konnte *nra-2* mit Hilfe von [www.wormbase.org](http://www.wormbase.org) und anderen Datenbanken genauer analysiert werden. Das *nra-2*-Gen in *C. elegans* ist auf Chromosom I lokalisiert. Die 1969 bp (Basenpaare) große kodierende Region hat sieben Exons und eine cDNA von 1674 bp. Basierend auf ESTs (Expressed Sequence Tags) liegt *nra-2* in nur einer Spleißvariante vor ([www.wormbase.org](http://www.wormbase.org)). Anhand von Ergebnissen der Sequenzierung der von Yuji Kohara zur Verfügung gestellten cDNA Klone (yk1703e11, yk1508d09, yk1533g12) konnte dies bestätigt werden. Die potentielle Promotorregion des *nra-2*-Gens erstreckt sich auf 450 bp nicht-kodierender Sequenz stromaufwärts des Start-Codons (siehe Abbildung 11). In Absatz 3.3.1 wird diese mögliche Promotorregion näher untersucht.

Das 557 Aminosäuren (AS) große NRA-2 Protein besitzt einen 515 AS langen extracytosolischen Anteil und eine cytosolische Domäne von 20 AS. NRA-2 enthält eine putative Aminopeptidasedomäne, die wahrscheinlich nicht funktional ist, da die für ihre Aktivität kritischen Aminosäuren in NRA-2 nicht konserviert sind.



**Abbildung 11: NRA-2 ist ein Transmembranprotein des Typs I.** (A) Schematische Darstellung von genomischem *nra-2*. Promoterregion (blau), Exons (violett) (Sequenzinformationen wurden aus [www.wormbase.org](http://www.wormbase.org), sowie der NCBI Datenbank bezogen). Die Lokalisation der Deletionen in *tm2453* und *ok1731* ist markiert. (B) Schematische Darstellung des NRA-2 Proteins, sowie der postulierten Produkte von Deletionsmutanten *tm1453* und *ok1731*. Der lange Proteinanteil befindet sich im extracytosolischen Raum und beherbergt die Peptidase Domäne (dunkel-lila), transmembran Domäne (gelb; 20 AS), cytosolischer Proteinanteil (grün; 23 AS). Die Signalsequenz (rot) wurde mit Hilfe von *SignalP* vorhergesagt.

Der mutierte Stamm *nra-2(tm1453)* wurde von Dr. S. Mitani/NBRP erhalten. Die homozygote Mutante *tm1453* weist eine C-terminale Deletion von 434 nt zwischen Exon 4 und Exon 6 auf sowie eine zusätzliche Insertion von 8 nt (1096/1097-TTGATAAA-1530/1531). Die Mutation resultiert durch eine Verschiebung des Leserasters in ein frühes STOP Codon wodurch entweder die Expression verhindert oder aber ein verkürztes Protein exprimiert wird, bei dem 294 AS der extracytosolischen Domäne erhalten bleiben (siehe schematische Darstellung der Proteine Abb. 11 und 12 und Sequenzabgleich Abschnitt 3.1.3).

Die Mutante *nra-2(ok1731)* wurde vom *Vancouver Gene Knockout Lab* (*C. elegans* Gene Knockout Consortium) isoliert. Die mutierte Region des Gens wurde per PCR amplifiziert und sequenziert und so die Deletion analysiert. Die homozygote genomische Mutante weist eine Deletion von 1119 nt am C-Terminus auf, bei der noch 212 AS der extracytosolischen Domäne erhalten bleiben. Ausserdem besitzt die Mutante eine Insertion von 4 Aminosäuren am C-Terminus (siehe Sequenzabgleich in Abschnitt 3.1.3).

Beide *C. elegans nra-2* Mutanten wurden nach Erhalt mindestens fünf mal gegen den Wildtyp zurückgekreuzt, um Hintergrundmutationen zu minimieren.

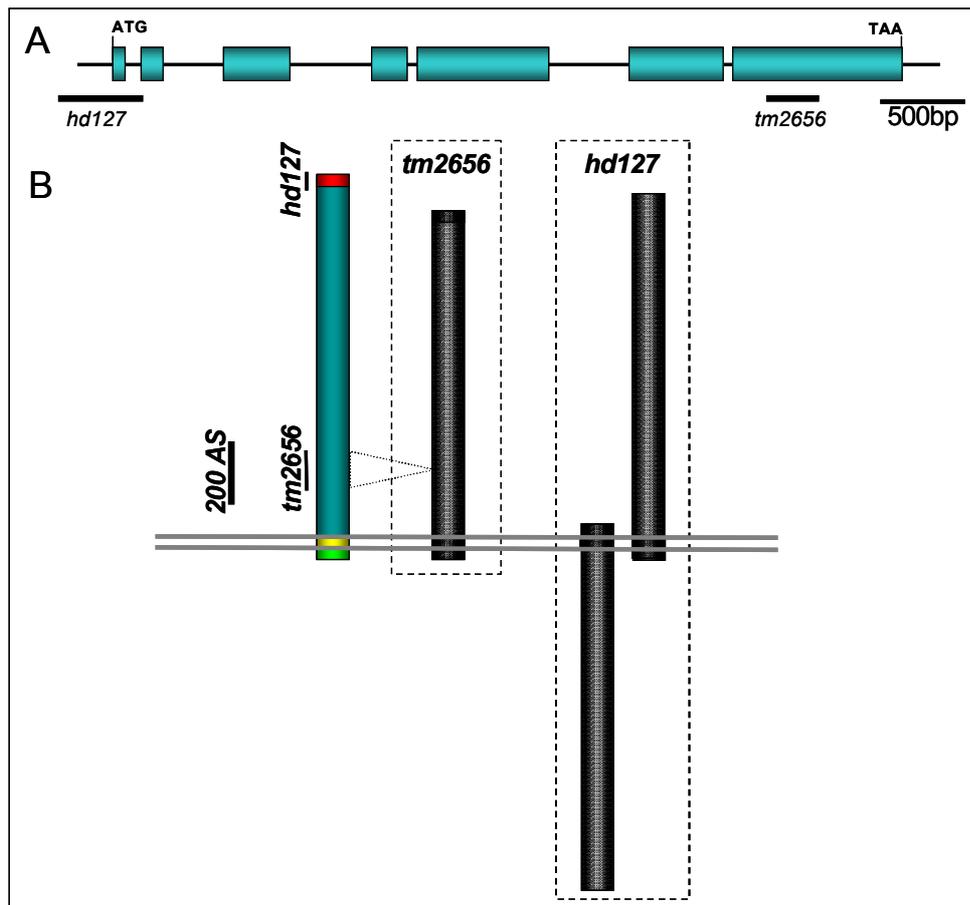
### 3.1.2 Charakterisierung von *nra-4* und seinen Allelen *hd127* und *tm2656*

Das *nra-4* Gen liegt im *C. elegans* Genom auf Chromosom V und besitzt acht Exons. Nach vorliegenden ESTs ([www.wormbase.org](http://www.wormbase.org)) und basierend auf Analysen der Sequenzierungen von cDNA Klonen *yk 1050c11*, *yk 1543c08*, *yk 1525b05*, *yk 1632d03*, *yk 1373f10* (Y. Kohara) liegt sie ebenfalls in nur einer Spleißvariante vor (siehe Abbildung 12 A und Sequenzabgleich Abschnitt 3.1.3). Das Protein hat eine 1068 AS lange extracytosolische Domäne und einen 30 AS cytosolischen Anteil. Es weist keine Domänen oder Motive auf, die weitergehende Rückschlüsse auf seine Funktion zulassen.

Das Allel *nra-4(hd127)* wurde von Harald Hutter erhalten und seine genomische DNA per PCR und anschließender Sequenzierung analysiert. Die Mutation in *hd127* resultiert in eine Deletion am N-terminus des Proteins. Diese Deletion umfasst Teile des putativen Promoters, sowie die ersten 48 AS der kodierenden Sequenz, inklusive der laut *SignalP* vorhergesagten Signalsequenz (siehe Abbildung 12). Der Verlust der Signalsequenz könnte zu einer Degradation des Restproteins führen. Da das zweite Exon nicht von der Deletion betroffen ist und ein alternatives Startcodon besitzt, könnte hier aber auch ein verkürztes Protein trotz fehlender Signalsequenz hergestellt werden. Dieses weist möglicherweise eine veränderte Topologie gegenüber dem Wildtyp-Protein auf.

Anhand von RT-PCR Experimenten konnte ein Transkript mit fehlendem Exon 1 in dieser Mutante nachgewiesen werden, was diese Annahme bekräftigt (C. Schultheis, Daten nicht gezeigt) (Almedom et al., 2009). Da in dieser Mutante auch Teile des Promotors fehlen ist es außerdem möglich, dass dadurch ein verändertes Expressionsmuster resultiert. Die putativen Proteine in der genomischen Deletionsmutante *hd127* sind in Abbildung 12 B schematisch dargestellt.

Die *nra-4(tm2656)* Mutante weist eine Deletion auf, die das Leseraster des offenen Leserahmens nicht verändert. Die Deletion befindet sich im extracytosolischen Teil des Proteins (siehe Abbildung 12 B). Es ist anzunehmen, dass die Topologie des Proteins in dieser Mutante erhalten bleibt.

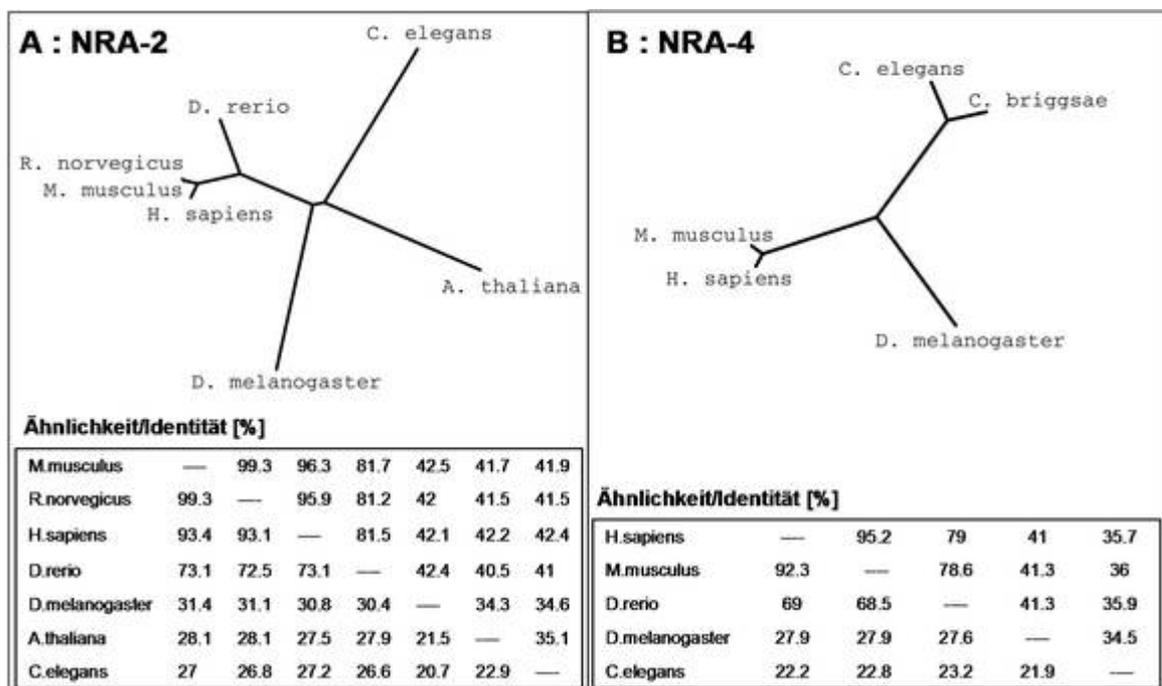


**Abbildung 12: NRA-4 ist ein Transmembranprotein des Typs I.** (A) Schematische Darstellung der genetischen Struktur von *nra-4*. Sequenzinformationen wurden aus [www.wormbase.org](http://www.wormbase.org), sowie der NCBI Datenbank bezogen. Die Region der Deletionen in den Allelen *hd127* und *tm2656* sind Markiert. (B) Schematische Darstellung des NRA-4 Wildtyp Proteins, sowie der putativen Proteine in den Deletionsmutanten. Die Region der Deletionen ist markiert. Signalpeptid (rot); Transmembrandomäne (gelb; 22 AS); cytosolischer Proteinanteil (grün; 30 AS).

Aufgrund einer putativen letalen Hintergrundmutation waren *tm2656* Tiere bei Erhalt von S. Mitani nur heterozygot lebensfähig. Da die bei der Mutagenese entstandenen Hintergrundmutationen offenbar sehr nah am *nra-4* Locus lagen, konnte die *nra-4(tm2656)* Mutation erst nach mehrmaligen Kreuzungen mit dem Wildtyp von der letalen Mutation getrennt werden (die Wahrscheinlichkeit eines *cross-over* erhöht sich mit der Entfernung der Loci zueinander). Wie durch PCR und Sequenzierung der Region im Genom von *nra-4(tm2656)* nachgewiesen werden konnte, fehlen der Mutante die Aminosäuren 816–920 der cytosolischen Domäne. Durch diese Deletion wird der Leserahmen des Proteins nicht beeinflusst. Wie in Abbildung 12 dargestellt, ist anzunehmen, dass das Protein verkürzt ist, wobei sowohl die transmembran-Domäne sowie der cytosolische Anteil intakt sind.

### 3.1.3 NRA-2 und NRA-4 sind Homologe von Nicalin und Nomo

*Nra-2* und *nra-4* kodieren für Transmembranproteine vom Typ I. Zur näheren Analyse der Sequenzen sowie ihrer Verwandtschaft mit Proteinen anderer Spezies wurden Sequenzvergleiche mit Hilfe verschiedener Programme durchgeführt. Mittels bioinformatische Sequenzanalysen der online verfügbaren Aminosäuresequenzen (*GenBank*, *UniProt*) mit Hilfe der Programme *Clustal W* und *Mobyle* durchgeführt erfolgte eine Untersuchung der Homologie und Phylogenie von NRA-2 und NRA-4. Das Ergebnis der Analyse ist in den folgenden Abbildungen dargestellt.



**Abbildung 13: Phylogenetischer Stammbaum und Analyse der Sequenzidentität.** Darstellung der Verwandtschaftsverhältnisse der *C. elegans* Proteine NRA-2 und NRA-4 mit ihren Homologen in Mensch, Maus, Zebrafisch und Fruchtfliege. Der Anteil der Sequenzidentität bzw. -ähnlichkeit in Prozent ist in der Tabelle angezeigt. Die Vergleiche wurden mit ClustalW und der Stammbaum mittels Mobyle erstellt (<http://mobyle.pasteur.fr>).

NRA-2 und NRA-4 so wie ihre Homologen in Mensch, Maus, Ratte, Zebrafisch, Fruchtfliege, *A. thaliana* und anderen Spezies (hier nicht alle gezeigt) sind konserviert (siehe Abbildung 13). Die *C. elegans* Proteine zeigen einen relativ hohen Grad der Sequenzähnlichkeit und -identität besonders zu Proteinen aus Vertebraten und Invertebraten.

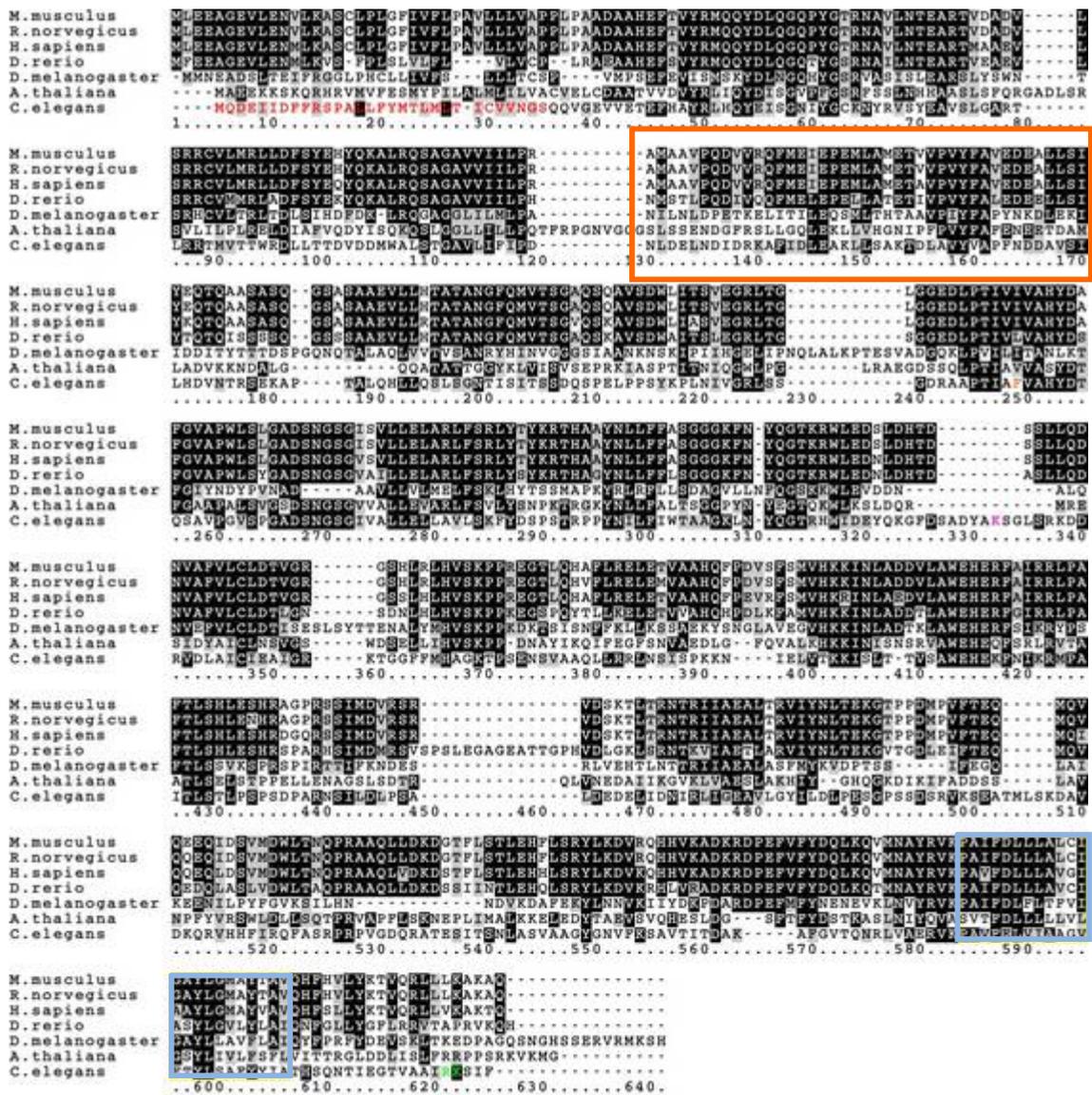


Abbildung 14: Sequenzvergleich von NRA-2, Nicalin und ihren Homologen aus anderen Spezies. transmembran Domäne (blau umrahmt); putatives Signalpeptid (rot); C-Termini der in *tm1453* und *ok1731* gebildeten verkürzten Proteine (violett: *tm1453* und orange *ok1731*). In beiden Fällen erfolgt eine Insertion von 4 Aminosäuren vor dem Stopcodon. Putatives ER-Retentionssignal am C-terminus (grün).

Aus dem Vergleich der Proteine auf Sequenzbasis in Abbildung 13 und 14 ist ersichtlich, dass NRA-2 und NRA-4 Homologe der Proteine Nicalin und Nomo aus Zebrafisch sind. Nicalin ist ein Homolog des Proteins Nicastrin, welches eine Untereinheit der integralen Membranpeptidase,  $\gamma$ -Sekretase ist (Yu et al., 2000).

Die Funktion von Nicalin (**Nicastrin-like Protein**) und Nomo (**Nodal Modulator**) wurde erstmals von Haffner und Haas beschrieben. Die Proteine bilden einen Komplex im ER von Zebrafisch (*Danio rerio*) und wirken antagonistisch auf einen TGF- $\beta$  Signalweg, den Nodal Signalweg (Haffner et al., 2007; Haffner et al., 2004; Haffner and Haas,

---

2004). Möglicherweise bestehen Parallelen der *C. elegans* Proteine NRA-2 und NRA-4 zu der Funktion ihrer Homologen im Zebrafisch.

Die genaue Funktion des Nicalin/Nomo Komplexes in der Morphogenese und Entwicklung von Zebrafisch sowie der genaue Mechanismus des Wirkens der beiden Proteine auf die Aktivität des Zelloberflächen Rezeptors für Nodal ist noch ungeklärt. Jedoch konnte bisher gezeigt werden, dass sich die Proteine gegenseitig in einem Komplex stabilisieren (Haffner et al., 2007; Haffner et al., 2004; Haffner and Haass, 2004).

NRA-2 besitzt eine vermutlich inaktive Peptidase-ähnliche Domäne, die bei Sequenzvergleichen Homologien zu dem Protein Nicastrin hat. Nicalin besitzt seinerseits eine aktive Peptidase Domäne, so wie Peptidasen der M20 und M28 Proteinklassen. Diese besteht in Proteinen der Familie der M20 Zink Metallopeptidasen aus 4  $\beta$ -Strängen und zwei  $\alpha$ -Helices die für die Dimer-Bildung zuständig sind (Van Heeke et al., 1992). NRA-2 fehlen allerdings die zur Dimerisierung benötigten Cysteinreste für Disulfidbrücken. Entsprechend seinem vertebraten Homologen Nicalin lassen auch bei NRA-2 Punktmutationen an den kritischen Positionen in der Peptidase Domäne eine proteolytische Aktivität ausschließen.

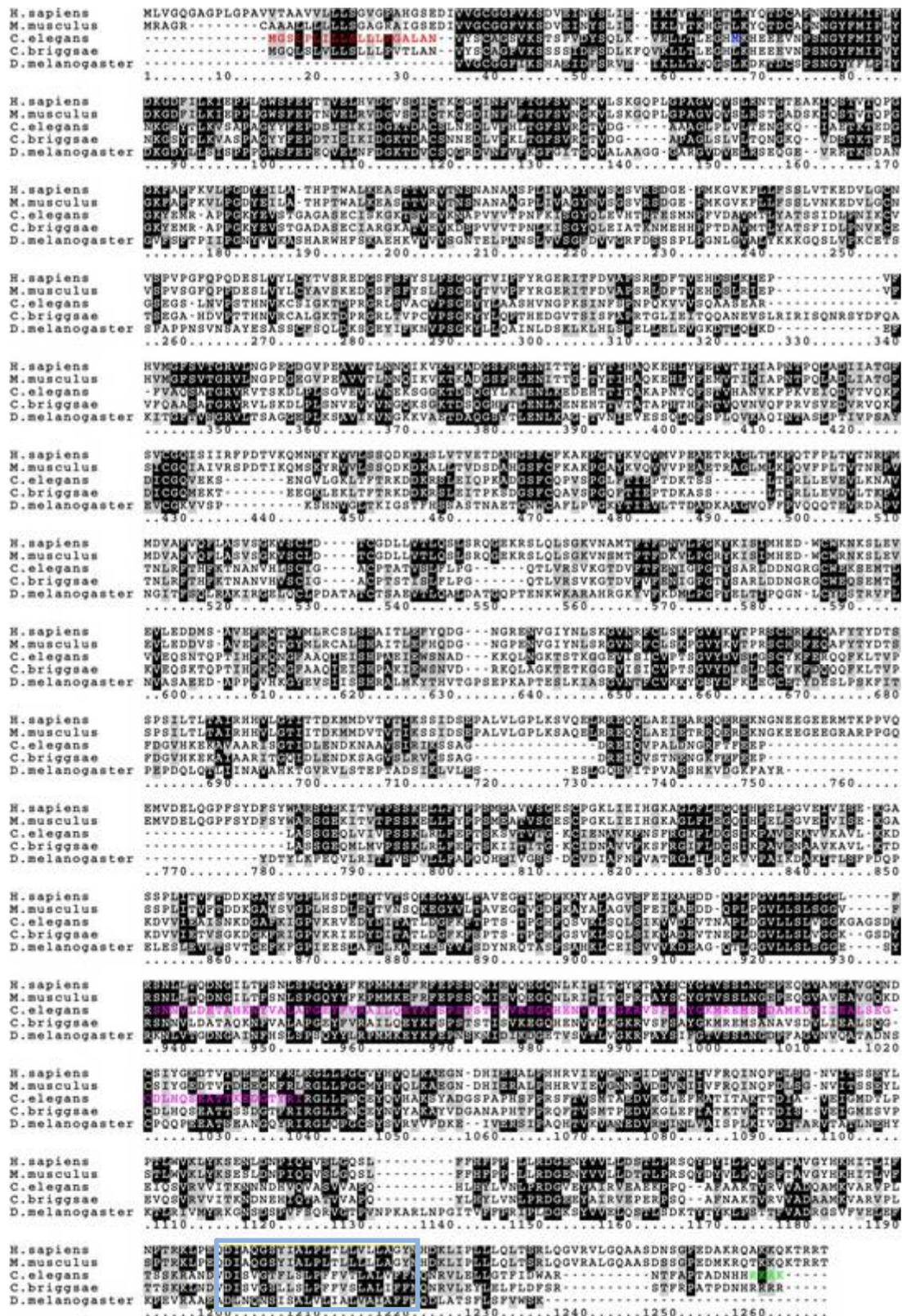
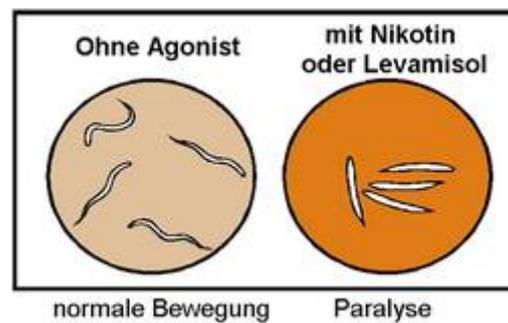


Abbildung 15: Sequenzvergleich von NRA-4, Nomo und seinen Homologen aus anderen Spezies. transmembran Domäne (blau umrahmt); Signalpeptids (rot); putatives alternatives Startcodon des Deletionsproteins in *hd127* Mutanten (blau); fehlende Aminosäuren in *tm2656* Mutante (violett). Am C-Terminus findet sich ein putatives ER-Retentionssignal (grün).

### 3.2 *Nra-2*, und *nra-4* Mutanten beeinflussen die Aktivität des nAChR in *C.*

#### *elegans*

Wie bereits in der Einleitung dieser Arbeit beschrieben, waren die Proteine NRA-2 und NRA-4 im Vorfeld dieser Arbeit bereits durch TAP des L-AChR isoliert und massenspektrometrisch identifiziert worden. Im Folgenden wurde der funktionale Zusammenhang der Proteine mit dem Levamisolrezeptor genauer beleuchtet.



**Abbildung 16: Nikotin- bzw. Levamisol Paralyse Assay.** Schematische Darstellung des Agonist-induzierten Paralyse Assays zur indirekten Messung der Aktivität von nAChR in Wildtyptieren und Mutanten über einen längeren Zeitraum. Abbildung von A. Gottschalk.

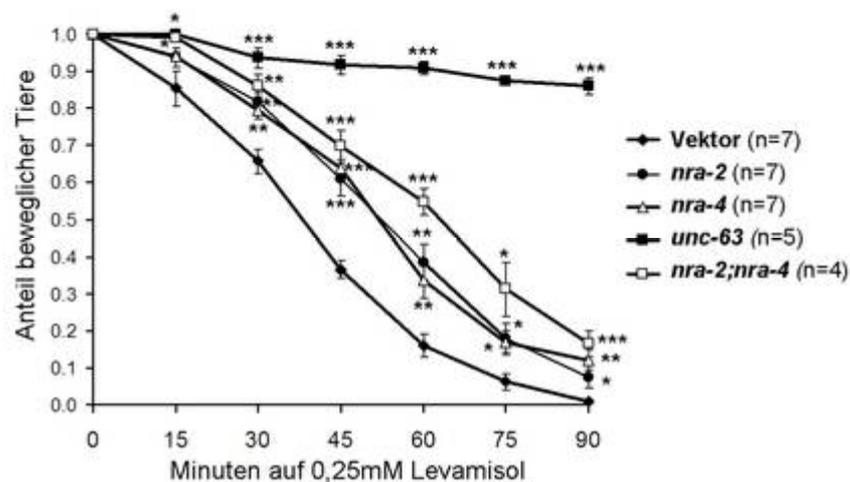
Um den Einfluss von *nra-2* und *nra-4* auf die Rezeptoraktivität zu untersuchen wurden Nikotin/Levamisol Paralyse-Assays durchgeführt. Nikotin und Levamisol Paralyse-Assays sind Langzeit-Untersuchungen der Rezeptoraktivität *in-situ*. Sie erlauben eine direkte Messung der Rezeptoraktivität am lebenden Tier. Die Agonisten gelangen durch die Cuticula in das Pseudocoelom und binden dort an die ACh-Bindestellen des Rezeptors, der so aktiviert wird und eine Muskelkontraktion herbeiführt. Werden die Rezeptoren über Nikotin aktiviert, setzt nach ca. 30 Minuten eine Adaptation ein, da der Rezeptor desensibilisiert wird und die Tiere bewegen sich wieder (siehe Abbildung 16). Im Falle der Aktivierung des Levamisolrezeptors durch die anthelmintische Substanz Levamisol tritt keine Adaptation ein und die Dauerkontraktion der Muskeln führt zu einer kompletten Bewegungslosigkeit bei allen Tieren in einem Zeitraum von ca. 90-120 Minuten in Abhängigkeit von der Konzentration. Diese Methode bietet die Möglichkeit die Aktivität nikotinischer Rezeptoren in verschiedenen Mutanten gegenüber Wildtyp über einen längeren Zeitraum zu vergleichen (genauer zur Methode siehe Abschnitt 2.2.6.11).

### 3.2.1 RNAi knock down von *nra-2* und *nra-4* erzeugt Resistenz gegenüber cholinergen Agonisten

Bereits nach der Aufreinigung mit Levamisolrezeptor Untereinheiten konnte nach RNAi von *nra-2* (Degradierung spezifischer RNA durch Einbringen von doppelsträngiger RNA) eine Resistenz gegenüber Nikotin im Paralyse Assay festgestellt werden (Gottschalk et al., 2005).

Anknüpfend an dieses Experiment wurden innerhalb dieser Arbeit Levamisol-vermittelte Paralyse Assays nach RNAi von *nra-2* und *nra-4* sowie doppel RNAi beider Transkripte durchgeführt. Als Negativkontrolle diente hierbei der leere RNAi Vektor L4440 und als Positivkontrolle erfolgte die Depletion der essentiellen nAChR  $\alpha$ -Untereinheit *unc-63*, welche bei Erfolg des RNAi zu einem stark ausgeprägten Lokomotionsdefizit (*unc*-Phänotyp) führt (genaue Durchführung des RNAi und verwendete Klone der Ahringer *Library* (Kamath and Ahringer, 2003) siehe Methoden, Abschnitt 2.2.6.7).

In Vorversuchen reagierten die Tiere des RNAi sensitiven Mutantenstamms *rnf-3* (*pk1426*) (Simmer et al., 2002) im Vergleich zu N2 besser auf die RNAi und wurden daher für die Experimente gewählt (RNAi von *unc-63* in N2 resultierte nur eine relativ schwache Levamisol-Resistenz).



**Abbildung 17: RNAi von *nra-2* und *nra-4*, sowie *nra-2;nra-4* Doppel-RNAi führt zu ähnlicher Resistenz gegen den Levamisolrezeptor-Agonisten Levamisol.** Degradation der RNA von *nra-2*, *nra-4* oder *unc-63* erfolgte durch Fütterung von Bakterien mit homologen dsRNA-Sequenzen in RNAi sensitiven *rnf-3* (*pk1426*) Mutanten. Die Beweglichkeit der Tiere wurde in einem Levamisol-vermittelten Paralyse Assay über 90 Minuten quantifiziert. Die Anzahl der Getesteten Tiere (n) ist in Klammern angegeben. Statistisch signifikante Unterschiede zum Wildtyp sind markiert: \* P<0.05; \*\* P<0.01; \*\*\* P<0.001. Statistik siehe auch Abschnitt 2.2.6.12.

Das Ergebnis zeigt eine signifikante Resistenz gegenüber Levamisol induzierter Paralyse nach RNAi von *nra-2* und *nra-4*. Im Falle von Doppel-RNAi lässt sich keine signifikante Verstärkung gegenüber der Einzel-RNAi von *nra-2* oder *nra-4* beobachten. Das deutet auf eine Aktivität beider Proteine im gleichen Signalweg.

Wie erwartet führt die Depletion der essentiellen Rezeptoruntereinheit *unc-63* zu einer fast vollständigen Resistenz gegenüber Levamisol. Bei einer RNA-Interferenz ist allerdings davon auszugehen, dass die Transkripte nicht vollständig abgebaut werden und möglicherweise noch Protein in geringen Mengen gebildet wird. Folgeuntersuchungen mit genomischen Deletionsmutanten sind daher zur Verifizierung notwendig.

### **3.2.2 Mutation von *nra-2* und *nra-4* führt zu signifikanter Resistenz gegenüber Nikotin und Levamisol**

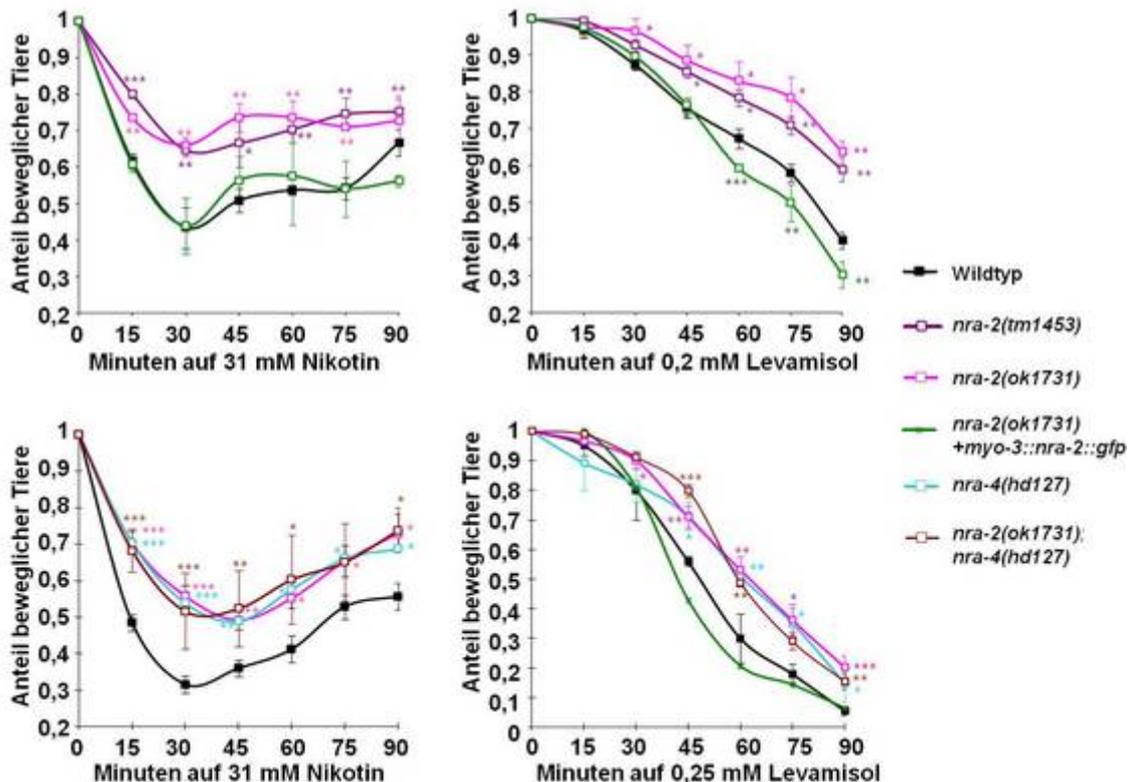
Die vielversprechenden Ergebnisse der RNAi Experimente wurden nachfolgend anhand von genomischen Deletionsmutanten untersucht.

Diese Experimente wurden mit den *nra-2* Mutanten *tm1453*, *ok1731* und den *nra-4* Mutanten *hd127* und *tm2656* sowie den jeweiligen, durch Kreuzung erhaltenen Doppelmutanten durchgeführt (Beschreibung der Mutanten siehe Abschnitt 2.2.6.4, Kreuzung Abschnitt 2.2.6.13). Alle in Verhaltensstudien getesteten Mutanten wurden zuvor mindestens fünf mal gegen den Wildtyp zurückgekreuzt. Die *nra-2* und *nra-4* Mutanten waren nach Rückkreuzung phänotypisch nicht von Wildtyp Tieren zu unterscheiden.

Die Ergebnisse der Nikotin und Levamisol-vermittelten Paralyse Experimente an genomischen Mutanten bestätigten die nach RNAi beobachtete signifikante Resistenz gegenüber Nikotin und Levamisol. Die transgene Expression von NRA-2::GFP im Muskel von *nra-2* Mutanten revertierte diesen Phänotyp. Möglicherweise ein Hinweis darauf, dass dieses Protein zell-autonom im Muskel agiert und dort die Rezeptoraktivität beeinflusst. In folgenden Lokalisationsstudien wurde diese Annahme überprüft (siehe auch Abschnitt 3.3.2).

Auch die transgene Expression von NRA-4::GFP in *nra-4(hd127)* Mutanten durch seinem endogenen Promotor konnte den Phänotyp auf Wildtyp Niveau revertieren (A. Gottschalk, nicht gezeigt). Der beobachtete Resistenz-Phänotyp in Paralyse-Assays ist also auch bei *hd127* Mutanten spezifisch auf die Mutation von *nra-4* zurückzuführen.

Die Mutante *nra4(tm2656)* dagegen zeigte im Vergleich zu Wildtyp Tieren keine Resistenz im Agonist-induzierten Paralyse Assay (Almedom et al., 2009). Die Funktion der L-AChR scheint in diesen Mutanten also nicht beeinträchtigt zu sein. Möglicherweise hat die Deletion in der *nra-4(tm2656)* Mutante keine Auswirkungen auf die Aktivität von NRA-2. Zur weiteren Untersuchung des Einflusses von NRA-4 auf die Aktivität von nikotinischen Rezeptoren wurde daher die *hd127* Mutante herangezogen.



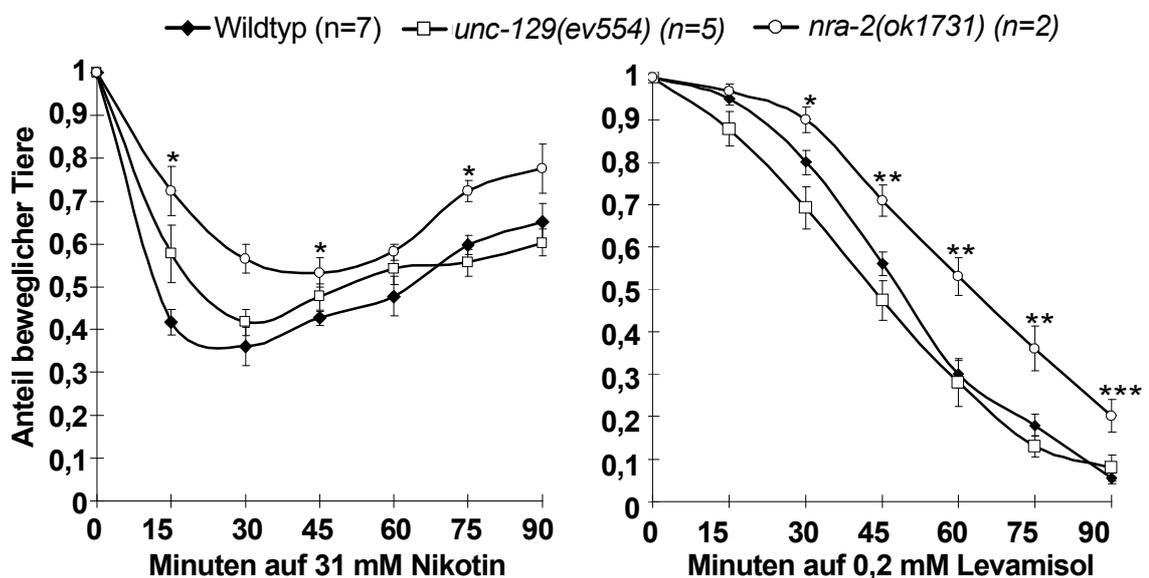
**Abbildung 18:** *Nra-2* und *nra-4* Mutanten zeigen Resistenz gegenüber cholinergen Agonisten. Je 30 junge adulte Tiere der zu testenden Stämme wurden über einen Zeitraum von 90 Minuten auf NGM Platten 31 mM Nikotin (A) oder 0,2/0,25 mM Levamisol (B) ausgesetzt und die Paralyse über die Zeit quantifiziert und graphisch aufgetragen. Die Experimente wurden 3-15 mal wiederholt. Statistisch signifikante Unterschiede zum Wildtyp sind markiert: \*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$ ; \*\*\*  $P < 0,001$ . Statistik siehe auch Abschnitt 2.2.6.12.

Um zu untersuchen, ob in *nra-2;nra-4* Doppelmutanten ähnliche Auswirkungen auf die Rezeptoraktivität zu beobachten sind, wurden *nra-2(ok1731); nra-4(hd127)* Doppelmutanten hergestellt. In Levamisol- und Nikotin-Paralyse Assays konnte hier keine Verstärkung des in Einzelmutanten beobachteten Phänotyps festgestellt werden. Dieses Ergebnis stützt die Annahme, dass beide Proteine im gleichen Signalweg im Muskel wirken und dort die Aktivität von nAChR in *C. elegans* beeinflussen.

### 3.2.3 Einfluss von NRA-2 und NRA-4 auf den UNC-129 abhängigen TGF- $\beta$ Signalweg

Entsprechend der Funktionen des Nicalin/Nomo Komplexes (Haffner et al., 2004) könnte ein NRA-2/NRA-4 Komplex auch in *C. elegans* TGF- $\beta$  vermittelte Signalwege beeinflussen. Diese wirken dann entweder indirekt auf Funktion und Expression von nAChR oder induzieren selbst die Resistenz. Daher wurden im Folgenden mögliche Parallelen im Signalweg zwischen den vertebreten und den invertebraten Homologen untersucht.

In *C. elegans* sind bisher fünf TGF- $\beta$  Liganden beschrieben worden, von denen drei bekannter Funktion sind: *daf-7* (Ren et al., 1996; Schackwitz et al., 1996), *dbl-1* (Morita et al., 1999; Suzuki et al., 1999) und *unc-129* (Colavita et al., 1998). Dabei kontrolliert *daf-7* das Dauerlarven Stadium und *dbl-1* beeinflusst die Körperlänge der Nematoden. *UNC-129* wird in dorsalen Muskeln und anderen Geweben exprimiert und beeinflusst die Motorneuron-vermittelte Leitung dorso-ventraler Axone. So wie nikotinische Acetylcholin Rezeptoren wirkt dieses Protein in einem muskulär und neuronal aktiven TGF- $\beta$  Signalweg mit. Daher wurden *unc-129(ev554)* Mutanten mittels Levamisol- und Nikotin-induzierten Aktivitätsstudien auf veränderte Sensitivität der nAChR gegenüber cholinergen Agonisten getestet.



**Abbildung 19: Die Mutation von *unc-129* im TGF- $\beta$  Signalweg beeinflusst nicht die Sensitivität gegenüber cholinergen Agonisten in *C. elegans*.** Nikotin und Levamisol-vermittelte Paralyse wurde in *unc-129(ev554)* Mutanten im Vergleich zu Wildtyp und *nra-2(ok1731)* untersucht. Die Anzahl der getesteten Tiere (n) ist in Klammern angegeben. Statistisch signifikante Unterschiede zum Wildtyp sind markiert: \* P<0.05; \*\* P<0.01; \*\*\* P<0.001. Statistik siehe auch Abschnitt 2.2.6.12.

Die Mutation von *unc-129* hatte nachweislich keinen Einfluss auf die Sensitivität der Tiere gegenüber Nikotin- oder Levamisol im Vergleich zum Wildtyp (siehe Abbildung 19). Offenbar ist die bei *nra-2* und *nra-4* Mutanten beobachtete Resistenz gegen die cholinergen Agonisten nicht auf eine Veränderung im UNC-129 vermittelten TGF- $\beta$  Signalweg zurückzuführen.

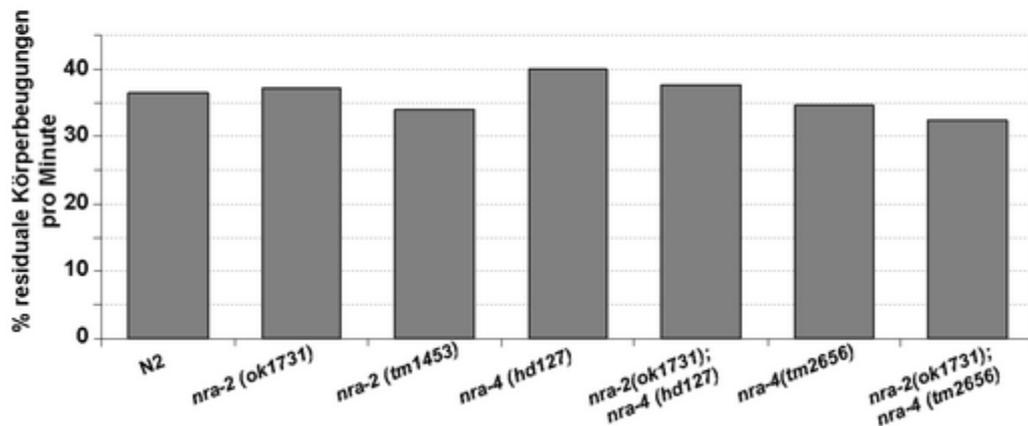
Dieses Ergebnis konnte A. Gottschalk in weitergehenden Versuchen auch für weitere TGF- $\beta$  Liganden- und Rezeptor-Mutanten (*dbl-1(wk70)*, *daf-7(e1372)*, *daf-1(m402)* und *sma-6(wk7)*) bestätigen. Auch hier wurde keine Resistenz gegenüber cholinergen Agonisten festgestellt. Im Gegensatz zu *nra-2(tm1453)* bzw. *ok(1731)* und *nra-4(hd127)* führen die Mutationen der untersuchten Gene des TGF- $\beta$  Signalwegs also nicht zu reduzierter Aktivität nikotinscher Rezeptoren (Almedom et al., 2009).

### 3.2.4 Einfluss von NRA-2 und NRA-4 auf den GABA<sub>A</sub> Rezeptor Signalweg

Es ist denkbar, dass die Funktion eines putativen NRA-2/NRA-4 Komplexes in Muskeln von *C. elegans* auch die Aktivität weiterer ligandengesteuerter Ionenkanäle an der neuromuskulären Synapse neben dem nAChR betrifft.

Um festzustellen, ob die Aktivität des inhibitorischen GABA<sub>A</sub> Rezeptors ebenfalls von NRA-2 und NRA-4 beeinflusst wird, wurde die Muskelkontraktion von Mutanten unter dem Einfluss des GABA<sub>A</sub> Rezeptor-Agonisten Muscimol, anhand von Schwimmbewegungen untersucht. Die *in vivo* Aktivierung des GABA<sub>A</sub> Rezeptors durch Muscimol führt bei Wildtyp Tieren zu einer Verlangsamung der Bewegungsrate in Flüssigkeit (Bamber et al., 1999; Bamber et al., 2005; Richmond and Jorgensen, 1999). Ist die Aktivität des Rezeptors durch Mutation von *nra-2* oder *nra-4* beeinflusst, sollte der Grad der Bewegungsänderung nach Zugabe von Muscimol vom Verhalten der Wildtypiere abweichen.

## Nach Behandlung mit 8mM Muscimol



**Abbildung 20:** *Nra-2* und *nra-4* haben keinen Einfluss auf die Muscimol-vermittelte Reduktion von Schwimmbewegung in *C. elegans*. Mindestens 20 Mutanten-, sowie Wildtypiere wurden in 96-Well Platten mit M9-Puffer mit und ohne 8 mM Muscimol transferiert. Die Quantifizierung der Schwimmbewegungen pro Minute erfolgte nach 1h Inkubation. Die Daten wurden normalisiert zur Schwimmbewegung un behandelter Tiere und sind in Prozent Restbewegung nach Inkubation in 8mM Muscimol angegeben.

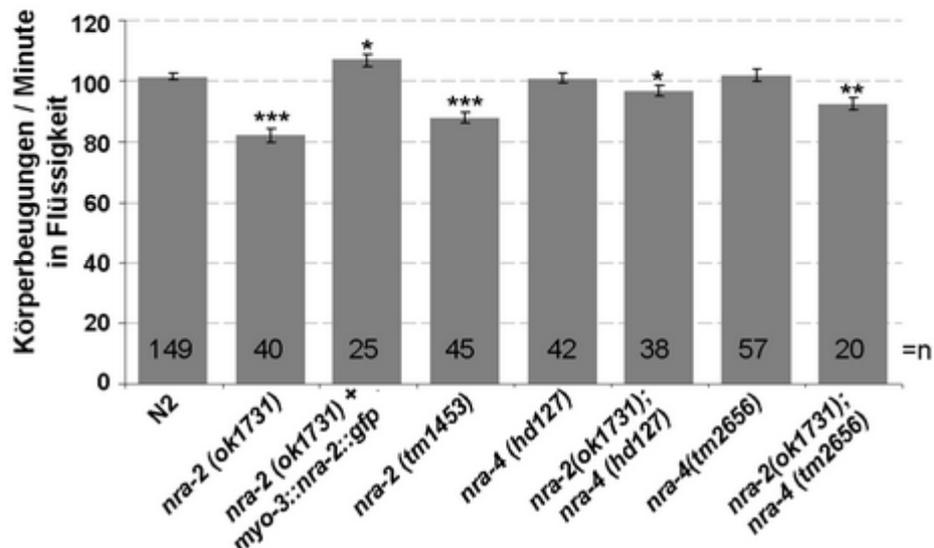
Abbildung 20 zeigt die Veränderung der Bewegungsrate in Prozent nach Zugabe von Muscimol in allen Mutanten im Vergleich zum Wildtyp. Das Ergebnis zeigt eine 60-70-prozentige Reduktion der Lokomotion in Flüssigkeit gegenüber un behandelten Tieren. Es ist keine signifikante Veränderung der Sensitivität gegenüber Muscimol im Vergleich zu Wildtypieren zu beobachten. Der GABA<sub>A</sub> Rezeptorweg wird also weder durch Mutation von *nra-2* und *nra-4*, noch durch Doppelmutation beider Gene beeinflusst. Der putative NRA-2/NRA-4 Komplex hat demnach keinen Einfluss auf inhibitorische GABAerge Rezeptoren und könnte in seiner Funktion im Muskel spezifisch auf nikotinische Acetylcholinrezeptoren wirken.

### 3.2.5 Lokomotionsanalyse der *nra-2* und *nra-4* Mutanten

Nikotinische Acetylcholinrezeptoren in *C. elegans* lokalisieren in Muskeln und Neuronen und sind dort für exzitatorische Signale zwischen Neuronen und den von ihnen innervierten Muskeln an der neuromuskulären Synapse zuständig (Fleming et al., 1997; Richmond and Jorgensen, 1999). Ihre Funktion ist maßgeblich für die Fortbewegung der Tiere. Ist die Aktivität dieser Rezeptoren beeinträchtigt kann das Auswirkungen auf die Bewegungsfähigkeit haben. Im Falle der *nra-2* und *nra-4* Mutanten ist trotz signifikant verminderter nACh Rezeptoraktivität jedoch kein deutlicher Bewegungsphänotyp zur erkennen.

Daher wurde im Folgenden ein möglicher Effekt der *nra-2* und *nra-4* Mutation auf die Bewegung mittels Quantifizierung von Schwimmbewegungen untersucht. Dazu wurden die Tiere in 96-Well Platten mit physiologischem M9-Puffer transferiert und ihre Bewegung gefilmt. Die Körperbeugungen eines Tieres wurden für eine Minute ausgezählt und das Ergebnis graphisch aufgetragen (siehe Abbildung 21).

Die Analyse zeigt eine signifikante Reduktion der Bewegungsrate in Flüssigkeit in beiden *nra-2* Mutanten im Vergleich zu Wildtyptieren. Die verminderte Bewegungsfähigkeit der *nra-2(ok1731)* Mutanten konnte durch spezifische Expression von *NRA-2::GFP* in Muskelzellen wieder auf Wildtyp Niveau gebracht werden. Das deutet darauf hin, dass die Reduktion der Bewegungsrate auf das Fehlen des Proteins in Muskelzellen zurückzuführen ist.



**Abbildung 21: Die Mutation von *nra-2* beeinflusst die Bewegungsrate in Flüssigkeit.** In einem Lokomotionstest wurden die *nra-2* und *nra-4* Mutanten auf Veränderung der Bewegung getestet. Eine Schwimmbewegung wurde dabei als vollständige Sinusbewegung des Kopfes definiert. Die Anzahl der Beugungen pro Minute sind gegen den Wildtyp normalisiert. Die Anzahl der examinieren Tiere (n) ist in den Balken angegeben. Statistisch signifikante Unterschiede zum Wildtyp sind markiert: \* P<0.05; \*\* P<0.01; \*\*\* P<0.001. Statistik siehe auch Abschnitt 2.2.6.12.

Interessanterweise hatte die Mutation von *nra-4* hingegen keinen Effekt auf die Bewegungsrate der Mutanten in Flüssigkeit. In den Doppelmutanten ist wiederum eine, wenn auch weniger ausgeprägte, Reduktion der Lokomotion zu beobachten, die wahrscheinlich allein durch Mutation von *nra-2* herbeigerufen wird.

Dieses Ergebnis könnte darauf zurückzuführen sein, dass es sich bei den Allelen nicht um vollständige Null-Mutationen handelt. Die Restproteine in den *nra-4* Mutanten (siehe Abbildung 12) könnten auch in der verkürzten Form noch Restaktivität aufweisen. Es wäre auch denkbar, dass die zur Interaktion mit dem Komplexpartner

relevanten Aminosäurereste noch vorhanden sind und so die Funktion des NRA-4 ‚Volle-Länge‘ Proteins für die Bewegung wiederhergestellt wird. Dieser Effekt ist in der *nra-4(tm2656)* Mutante sogar noch deutlicher ausgeprägt. Weder in Agonist-induzierten nAChR Aktivitätsstudien noch in den Lokomotionsstudien konnte für diese *nra-4* Mutante ein Unterschied zum Wildtyp gefunden werden. Diese Beobachtung könnte dadurch zu erklären sein, dass das Protein in dieser Mutante kaum eine Längenänderung erfährt und so wahrscheinlich seine Konformation und damit Funktion größtenteils noch wahrnehmen kann (siehe Abschnitt 3.1.2). Es wäre außerdem denkbar, dass NRA-2 und NRA-4 zusätzliche Effekte auf den Acetylcholinrezeptor haben, welche sie unabhängig voneinander ausüben.

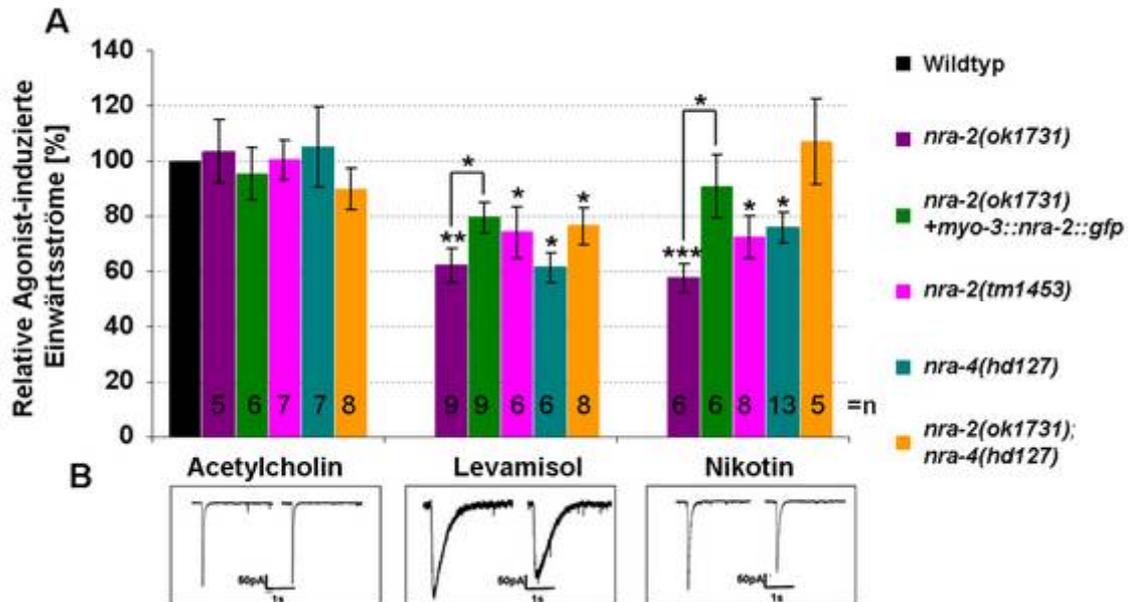
### **3.2.6 Cholinerge Einwärtsströme in *nra-2* und *nra-4* Mutanten sind signifikant reduziert**

Die Nikotin- und Levamisol-induzierten Paralyse-Assays, sowie auch der Muscimol Schwimm-Assay sind Methoden welche eine *in-situ* Analyse des Langzeiteffekts von cholinergen und GABAergen Agonisten auf die Wildtyptiere und Mutanten erlauben. Daneben bietet die Methode der Elektrophysiologie eine etablierte und effiziente Möglichkeit, *in situ* direkte Effekte der Agonist-induzierten Aktivierung ligandengesteuerter Ionenkanäle an einzelnen Zellen zu messen. Die spannungsabhängige *Patch Clamp*-Technik erlaubt die Messung der Einwärtsströme in eine intakte Muskelzelle nach Applikation eines Agonisten, zB. Acetylcholin (*Whole-Cell Voltage-Clamp Electrophysiology*) (Neher and Sakmann, 1992). Die Liganden-induzierten Einwärtsströme lassen Rückschlüsse auf die Aktivität des jeweiligen Ionenkanals zu.

Diese Methode ist für *C. elegans* etabliert (Francis et al., 2003; Richmond and Jorgensen, 1999) und wurde hier von Jana Liewald durchgeführt. Die neuromuskuläre Synapse von *C. elegans* Wildtyp- und Mutantentieren wurde aufpräpariert und nach Druck-Applikation von cholinergen oder GABAergen Agonisten wurden die induzierten Einwärtsströme direkt an der Muskelzelle gemessen.

Um zu untersuchen, ob NRA-2 und NRA-4 einen direkten Einfluss auf die Aktivität von nAChR und GABA<sub>A</sub> Rezeptoren im Muskel von *C. elegans* haben wurden die Einwärtsströme in Einzel-, sowie Doppelmutanten im Vergleich zu Wildtyptieren nach Applikation von Nikotin, Levamisol bzw. Acetylcholin gemessen. Zusätzlich erfolgten Messungen nach Applikation von GABA (Ergebnis hier nicht gezeigt). Die Messungen

wurden mehrmals durchgeführt, gegen den Wildtyp normalisiert und graphisch aufgetragen (siehe Abbildung 22 A).



**Abbildung 22: Elektrophysiologische Messungen bestätigen, dass Levamisol- und Nikotin-induzierte Einwärtsströme in *nra-2* und *nra-4* Mutanten signifikant reduziert sind.** (A) ACh, Nikotin- und Levamisol induzierte Einwärtsströme wurden mittels Patch-Clamp Methode in *nra-2* und *nra-4* Einzel- und Doppelmутanten gemessen und auf Wildtypströme normalisiert. Anzahl der getesteten Tiere (n) ist in den Balken angegeben. (B) Repräsentative Originalströme von Wildtyp gegenüber *nra-2(ok1731)* im Vergleich nach Applikation von  $5 \times 10^{-4}$ M ACh,  $5 \times 10^{-4}$ M Levamisol oder  $10^{-3}$ M Nikotin. Elektrophysiologische Messungen wurden von Jana Liewald zur Verfügung gestellt. Statistisch signifikante Unterschiede zum Wildtyp sind markiert: \*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ ; \*\*\*  $P < 0.001$ . Statistik siehe auch Abschnitt 2.2.6.12.

Die in Abbildung 22 B aufgeführten Ströme zeigen exemplarische Originalspuren der Einwärtsströme, die nach Applikation der jeweiligen Agonisten in *nra-2* Mutanten und *nra-4* Mutanten ausgelöst wurden.

Im Einklang mit dem Muscimol-Assay wurde nach GABA Applikation keine Veränderung der Einwärtsströme in den Mutanten gemessen (hier nicht gezeigt).

Interessanterweise sind in beiden *nra-2* Mutanten so wie in *nra-4(hd127)* Mutanten die Levamisol- als auch Nikotin-induzierte Einwärtsströme signifikant, um ca. 25-30% gegenüber Wildtyp, reduziert (*nra-2(ok1731)*: Levamisol:  $62 \pm 6\%$ ; Nikotin:  $57 \pm 5\%$ ; *nra-2(tm1453)*: Levamisol:  $74 \pm 9\%$ ; Nikotin:  $72 \pm 7\%$ ; *nra-4(hd127)*: Levamisol:  $61 \pm 5\%$ ; Nikotin:  $76 \pm 6\%$ ). Dass dieser Effekt tatsächlich durch den Reduktion der Aktivität von muskulären nAChR resultiert ist daran zu erkennen, dass die muskelspezifische Expression von *NRA-2::GFP* die cholinergen Einwärtsströme in *ok1731* Mutanten wiederherstellt.

Wie bereits besprochen (Einleitung, Abschnitt 1.3.3.3) sind zwei Typen von nAChR in Muskelzellen von *C. elegans* identifiziert worden, der L-Typ nAChR (Levamisolrezeptor) und N-Typ nAChR (Nikotinrezeptor=ACR-16) (Lewis, Fleming et al. 1987; Fleming, Squire et al. 1997; Touroutine, Fox et al. 2005). Diese Rezeptoren tragen beide zu unterschiedlichen Anteilen zum Nikotin-, Levamisol- und Acetylcholin-induzierten Einwärtströmen bei (Richmond and Jorgensen, 1999). Die Reduktion der induzierten Einwärtströme nach Nikotin- so wie nach Levamisolapplikation zeigt, dass die Funktion des L-AChR als auch des N-AChR im Muskel von *C. elegans* durch *nra-2* und *nra-4* beeinflusst werden.

Die Doppelmutanten dagegen weisen nur reduzierte Ströme nach Levamisolapplikation auf (*nra-2(ok1731);nra-4(hd127)*: Levamisol:  $76\pm 7\%$ ). Dabei sind Einwärtströme gegenüber den Einzelmutanten nicht verstärkt reduziert. Die Nikotin-induzierten Ströme der Doppelmutanten blieben unverändert gegenüber Wildtyp. Dieser Effekt könnte auf einen unterschiedlichen Einfluss des ER-ständigen Proteinkomplexes auf die beiden nACh-Rezeptortypen zurückzuführen sein.

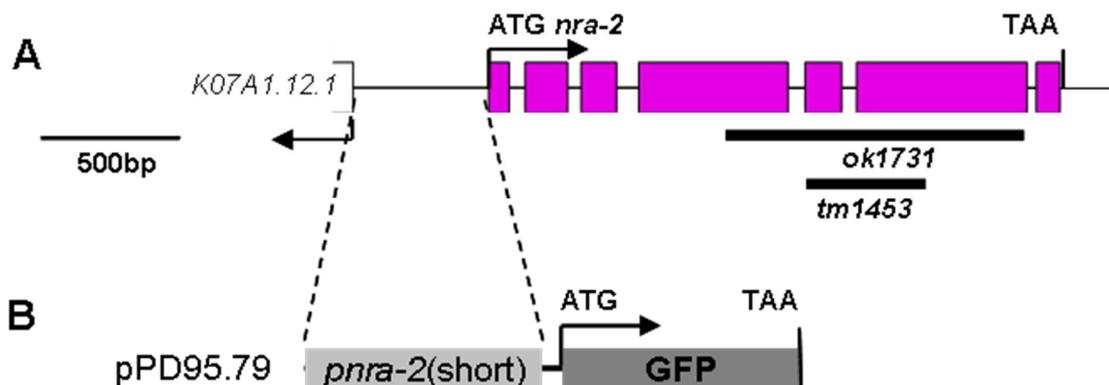
Acetylcholin-induzierte Ströme sind in allen Mutanten unverändert gegenüber Wildtyp trotz der signifikant reduzierten Sensitivität der Rezeptoren gegenüber den exogenen Agonisten Nikotin und Levamisol. Da Acetylcholin von beiden Rezeptortypen gebunden wird, könnte das ein Hinweis auf eine Veränderung der Ligandenbindungsaffinität der Rezeptoren gegenüber den endogenen und exogenen Agonisten durch NRA-2 und NRA-4 zurückzuführen sein. Die Ligandenbindungsstelle lokalisiert an der Schnittstelle einer  $\alpha$ - Untereinheit und der benachbarten Untereinheit und ist in ihrer Bindungsaffinität direkt von den Untereinheiten abhängig (Blount and Merlie, 1989; Changeux and Edelstein, 1998; Corringer et al., 2000; Sine, 2002). Je nach Rezeptorzusammensetzung können sich also die pharmakologischen Eigenschaften von nAChR verändern (Cohen Ben-Ami et al., 2009). Aus diesem Grund ist es denkbar, dass die Proteine durch Funktionen in der Assemblierungskontrolle z.B. mittels posttranslationaler Modifikation einen Einfluss auf die Rezeptorzusammensetzung haben (Blount and Merlie, 1990; Green and Millar, 1995; Mishina et al., 1986).

### 3.3 Analyse der subzellulären Lokalisation von NRA-2 und NRA-4

Im Folgenden werden Studien zur intrazellulären Lokalisation der Proteine in *C. elegans* beschrieben.

#### 3.3.1 Die Promotoren von *nra-2* und *nra-4* exprimieren in Muskeln, Neuronen und anderen Zelltypen

Da die Lokalisation eines Proteins Rückschlüsse auf seine Funktion erlauben kann, wurde das Expressionsmuster von NRA-2 und NRA-4 untersucht. Dazu wurde zuerst die putative Promotorsequenz von NRA-2 bzw. NRA-4 in einen *C. elegans* Expressionsvektor mit C-terminalem GFP (*green fluorescent protein*) kloniert.



**Abbildung 23: Klonierung des putativen Promotors *pnra-2(short)*.** (A) Schematische Darstellung der genomischen Region 5' von *nra-2* (pink). Darstellung adaptiert aus [www.wormbase.org](http://www.wormbase.org). (B) Darstellung des finalen Konstruktes zur Expression in *C. elegans*.

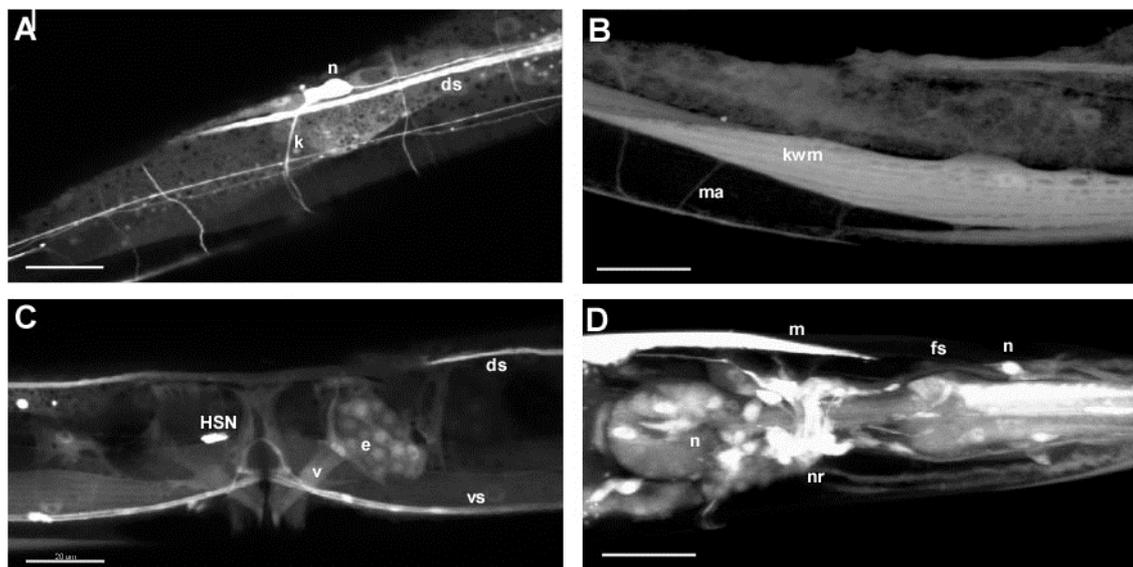
Zuerst wurde die 450 bp große 3'UTR zwischen dem ATG von *nra-2* und seinem vorgeschalteten Gen K07A1.12.1 auf ihre Funktion als Promotor für das nachgeschaltete *nra-2* Gen untersucht. Dazu wurde diese per PCR amplifiziert und in den *C. elegans* Expressionsvektor pPD.95.79 kloniert (Fire et al., 1990). Dieser so generierte *pnra-2(short)*-Vektor enthält eine C-terminal gelegene GFP-Sequenz. Dieses Konstrukt wurde anschließend mit dem *rol-6d* Injektionsmarker in Wildtyp Tiere co-injiziert (Kramer et al., 1990).

Die nicht-kodierende *pnra-2-short* Sequenz induzierte in den transgenen Tieren ausschließlich eine (möglicherweise unspezifische) GFP-Expression in exkretorischen Kanal Zellen (hier nicht gezeigt), allerdings war keine Expression von GFP im Muskel oder anderen Zelltypen zu erkennen. Der muskelspezifische Promotor *pmyo-3* (Okkema et al., 1993) induzierte Expression von funktionalem NRA-2::GFP in vorangegangenen Agonist-induzierten Paralyse Assays (Abschnitt 3.2.2). Demnach ist der hier für

Expressionsstudien verwendete putative Promotor *pnra-2(short)* zur Expression des nachgeschalteten *nra-2* Gens in weiteren Zelltypen nicht ausreichend. Es ist nicht auszuschließen, dass zusätzliche regulatorische Sequenzen zum Beispiel innerhalb der Introns des Gens, in Kombination mit der 450 bp großen nicht-kodierenden 3' Sequenz (*pnra-2(short)*) für die korrekte Expression von *nra-2* notwendig sind (siehe Abschnitt 3.1.1).

Tatsächlich konnte nach Beendigung meiner experimentellen Arbeit gezeigt werden, dass ein längeres *pnra-2* DNA Fragment von 1818 bp, welches zu den bereits in *pnra-2(short)* klonierten Region zusätzlich Teile des vorhergehenden Gens enthält, für die Expression von einem nachgeschalteten GFP Protein in Muskel, Neuronen und weiteren Geweben ausreichend war (A. Gottschalk).

Die putative Promotorsequenz von NRA-4 erstreckt sich über eine 1548 bp große Sequenz, stromaufwärts von der kodierenden Region. Diese Sequenz wurde aus genomischer Wildtyp DNA amplifiziert und in den *C. elegans* Expressionsvektor pPD95.79 kloniert, um pPD95.79::*pnra-4::gfp* zu erhalten. Dieses Plasmid wurde mit dem Roller Marker in Wildtyp Tiere injiziert und die daraus resultierenden transgenen Tiere mittels Fluoreszenzmikroskop analysiert.



**Abbildung 24: Der Promotor von *nra-4* exprimiert in unterschiedlichen Zelltypen.** *pPD95.79::pnra-4::gfp* wurde in Wildtyp Tieren exprimiert und das Expressionsmuster anschließend im CLSM analysiert. Diese Bilder stellen eine 3D Rekonstruktion einzelner konfokaler Schichten dar. Der Größenbalken entspricht 20µm. (A) Expression in Neuronen (n) und Kommissuren (k) entlang des Körpers, sowie im dorsalen Nervenstrang (ds). (B) Körperwandmuskelzellen (kwm) mit Muskelarmen (ma), die auf den ventralen Nervenstrang projiziert werden. (C) Expression von GFP in Vulvamuskeln (v) sowie im dorsalen und ventralen Nervenstrang (ds; vs) und im HSN Neuron (HSN). Ausserdem exprimiert der *nra-4*-Promotor in Zellen des Embryos (e). (D) Kopfregion

---

mit Expression von GFP in pharyngealen Muskelzellen (m), dem Nervenring (nr) und in Neuronen (n) sowie ihren Zellfortsätzen (fs). Größenmaßstab entspricht 5µm.

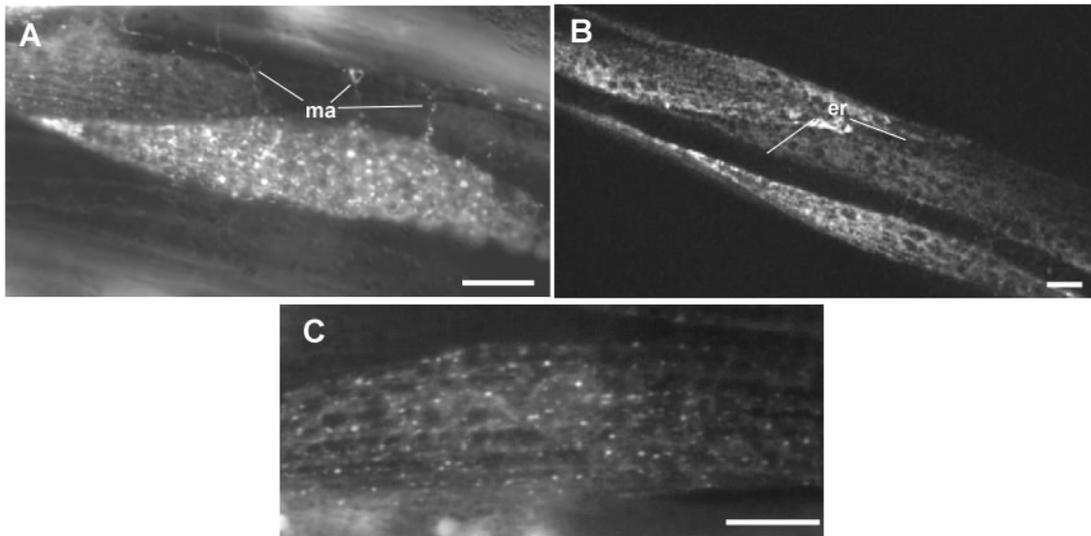
In Abbildung 24 ist das Expressionsmuster von *pnra-4::gfp* zu sehen. *Pnra-4* exprimiert in Muskelzellen, sowie im HSN Neuron und in Neuronen der Kopfregion. Dieses Expressionsmuster ähnelt dem von Levamisol Rezeptoren und deutet darauf hin, dass NRA-4 in diesen Zelltypen mit ihnen interagieren könnte. Weiterhin konnte auch eine Expression in weiteren Zelltypen, sowie Embryo- und im Darmepithel- sowie den Vulvaepithelzellen gezeigt werden, was auf zusätzliche Funktionen von NRA-4 neben seiner potentiellen Interaktion mit dem Levamisolrezeptor hinweist.

### 3.3.2 NRA-2 und NRA-4 lokalisieren in ER-ähnlichen Strukturen in *C. elegans* Muskelzellen

Zur Untersuchung der subzellulären Lokalisation von NRA-2 und NRA-4 konnte für jedes Gen aus der cDNA Datenbank von Yuji Kohara (<http://nematode.lab.nig.ac.jp/db2/index.php>) nach Sequenzierung eine vollständig und fehlerlos vorliegende cDNA isoliert werden.

Zur Untersuchung der intrazellulären Lokalisation von *nra-2* wurde der Klon *yk1703e11 (nra-2(cDNA))* in den pPD.95.79 Vektor kloniert und die muskelspezifische Expression des Gens mittels *myo-3* Promotor erzielt (Okkema et al., 1993). Im Anschluß wurde ein Fusionsprotein von NRA-2 mit einem C-terminalen YFP (*yellow fluorescent protein*) hergestellt, welches zusätzliche Lokalisationsstudien erlaubt. Unter anderem bietet YFP die Möglichkeit für Ko-Expressionsexperimente mit z.B. CFP (*cyan fluorescent protein*), da hier aufgrund unterschiedlichen Anregungs- und Emissionswellenlängen keine Kreuzanregungen auftreten.

Bei der Herstellung der transgenen Tiere zeigte sich, dass die Expression des rekombinaten *nra-2::gfp* Konstrukts in *C. elegans* erst bei einer Reduktion der zur Injektion gewählten DNA-Menge auf auf 2ng/µl erfolgreich war. Im Vergleich dazu werden Konstrukte gewöhnlich in der Menge zwischen 25 und 40 ng/µl injiziert.



**Abbildung 25: Fluoreszenzmarkiertes NRA-2 in intrazellulären retikulären und punktuellen Strukturen im Muskel.** Darstellung exemplarischer Aufnahmen der subzellulären Lokalisation der Fusionsproteine NRA-2::YFP und NRA-2::GFP im Wildtyp. (A) Expression von NRA-2::YFP; Muskelarme (ma); (B) Expression von NRA-2::YFP; ER(er). (C) Expression von NRA-2::GFP. Die Aufnahmen (A) und (B) wurden am CLSM gemacht. Die Aufnahme (C) wurde am Fluoreszenzmikroskop (Zeiss Axiovision) gemacht. Die Größenbalken entsprechen 10µm.

Die so erhaltenen transgenen Tiere wurden im Fluoreszenzmikroskop bzw. mittels CLSM untersucht. NRA-2::YFP lokalisiert in intrazellulären Strukturen, die sich in die Muskelarme (ma) fortziehen (siehe Abbildung 25 A). Das Protein akkumuliert nicht deutlich an den neuromuskulären Synapsen am Ende von Muskelarmen oder an der Plasmamembran. NRA-2::YFP lokalisiert weiterhin in intrazellulären retikulären Strukturen (siehe Abbildung 25 B). Das NRA-2::GFP Fusionsprotein lokalisiert außerdem in Punkta innerhalb der retikulären Strukturen (siehe Abbildung 25 C). Die retikulären Strukturen erinnern an das ER. Übereinstimmend enthält die Proteinsequenz von NRA-2 ein putatives ER-Retentionssignal (Abbildung 14, Abschnitt 3.1.3, Sequenzalignment). In folgenden Co-Lokalisationsstudien mit der Levamisolrezeptor Untereinheit UNC-29 konnte diese Annahme bestätigt werden (siehe Abschnitt 3.3.6).

Die *nra-4* cDNA konnte vollständig aus dem Kohara-Klon *yk1373f10* amplifiziert werden. Die cDNA wurde in den pPD95.79::*pnra-4*::*gfp* Vektor kloniert. So konnte die subzelluläre Lokalisation des Fusionsproteins nach Expression durch den endogenen Promotor ermittelt werden. Das so hergestellte Plasmid *pnra-4*::*nra-4(cDNA)*::*gfp* wurde zusammen mit dem *rol-6d* Co-Injektionsmarker injiziert.

Vergleichbar mit NRA-2::GFP/YFP wurde auch für NRA-4::GFP eine Akkumulation des Proteins in retikulären und punktuellen Strukturen innerhalb des ERs von *C. elegans*

Muskelzellen gefunden (subzelluläre Lokalisation von NRA-4: A. Gottschalk). Entsprechend den Beobachtungen am NRA-2::GFP/YFP Fusionsprotein war auch hier keine deutliche Lokalisation an der Plasmamembran oder den postsynaptischen Nervenenden an Muskelarmen zu beobachten (Almedom et al., 2009).

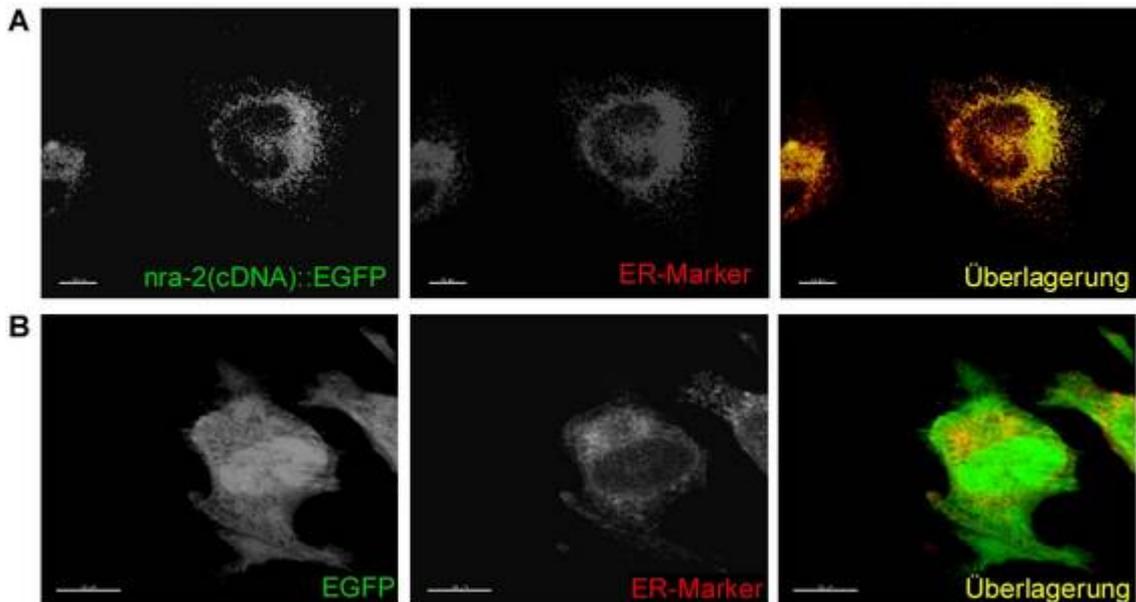
Basierend auf diesen Ergebnissen ist es denkbar, dass NRA-2 und NRA-4, analog zu ihren Vertebraten homologen Nicalin und NOMO, ihre Funktion im ER ausüben.

### **3.3.3 Analog zum Vertebraten homologen Nicalin lokalisiert NRA-2::EGFP im ER von HELA Zellen**

Zur Bestätigung der Lokalisation von im ER wurde die *nra-2* cDNA aus *C. elegans* in den vertebraten Expressionsvektor pEGFP.N3 (Clontech) eingebracht. Dieser Vektor enthält C-terminal die Sequenz des Reportergens EGFP (*enhanced green fluorescent protein*).

Als ER Lokalisationsmarker diente DsRED (Clontech) ein Protein mit einem ‚KDEL‘ ER-Retentionssignal, welches mit einem rot fluoreszierenden Markerprotein fusioniert ist. Eine mögliche Co-Lokalisation von NRA-2::EGFP und DsRED sollte durch ektopische Co-Expression in HeLa Zellen untersucht werden. Als Negativkontrolle diente die Co-Expression des ER-Lokalisationsmarkers DsRED mit dem „leeren“ pEGFP.N3 Vektor, welcher das EGFP allein exprimiert.

Abbildung 26 zeigt die fluoreszenzmikroskopische Aufnahme der HeLa Zellen mit NRA-2::EGFP Expression bzw. mit Negativ-Kontrolle. Das exprimierte Fusionsprotein zeigt eine deutliche Co-Lokalisation mit dem DsRED Marker im ER von HeLa Zellen. Es ist weder eine Lokalisation des NRA-2::EGFP Fusionsproteins in anderen intrazellulären Strukturen noch an der Plasmamembran zu beobachten. Im Vergleich dazu zeigen die EGFP-exprimierende HeLa Zellen eine diffus im Cytosol verteilte grüne Fluoreszenz, die nicht mit dem ER-Marker co-lokalisiert (Abbildung 26 A, B).



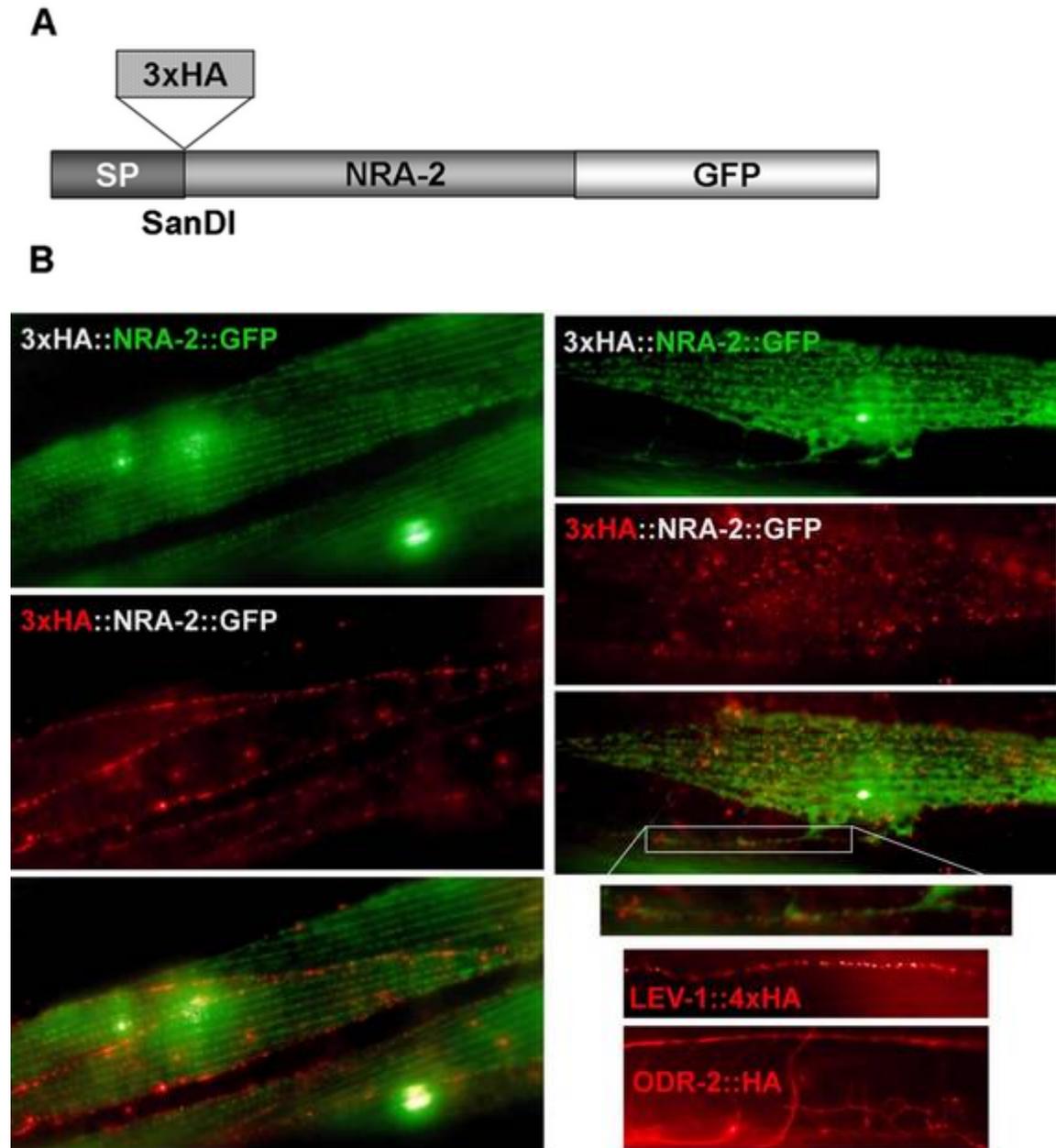
**Abbildung 26: NRA-2::EGFP lokalisiert im ER von HeLa Zellen.** (A) Für co-Lokalisationsstudien wurden HeLa Zellen transient mit *C. elegans nra-2(cDNA)::egfp* (NRA-2::EGFP:grün) und dem ER Marker DsRED-KDEL (rot) ko-transfiziert. Die Zellen wurden nach 48h Expression mit 2%PFA fixiert und im CLSM analysiert. (B) Die transiente Co-Transfektion von HeLa Zellen mit dem leeren pEGFP Vektor (EGFP:grün) und dem ER-Marker DsRED-KDEL (rot) diente als Negativ-Kontrolle. Die Größenbalken entsprechen 10 µm.

Das konservierte ER Retentionssignal von NRA-2 (siehe Sequenzvergleich, Abschnitt 3.1.3) ist offenbar funktional und hält das Protein auch in anderen Systemen im ER zurück. Die Übereinstimmung der subzellulären Lokalisation von NRA-2 und seines vertebraten Homologen Nicalin könnte auf eine ähnliche Funktion der Proteine innerhalb der Spezies hindeuten.

### 3.3.4 NRA-2::GFP lokalisiert nicht an der postsynaptischen Membran

Die bisherigen Resultate deuten auf eine ER-lokalisierte Wirkung von NRA-2 und NRA-4 auf die nAChR Aktivität. Jedoch kann nicht ausgeschlossen werden, ob die Proteine möglicherweise auch Anteil am Transport zur Plasmamembran, Funktionen im Golgi Apparat oder aber an der synaptischen Oberfläche haben. Um diese Möglichkeiten genauer zu untersuchen, wurde das *myo-3::nra-2::gfp* Konstrukt N-terminal, also am extracytosolischen Proteinanteil, mit einem Fusionstag des viralen Glycoproteins Hämagglutinin (HA)- markiert. Dazu wurde eine Sequenz, die für drei Kopien des viralen HA Proteins kodiert, per PCR mit den SandI flankierten Oligonukleotiden oRBA68 und oRBA69 aus dem Vektor pAG8 amplifiziert und anschließend mit SandI geschnitten. Der Zielvektor *pmyo-3::nra-2(cDNA)::gfp* besitzt direkt hinter dem putativen Signalpeptid eine SandI Schnittstelle in die das PCR

Produkt eingefügt werden konnte. Der lange N-terminale Teil des Fusionsproteins mit HA Marker liegt dann also extracytosolisch vor (siehe auch schematische Darstellung des Proteins in Abbildung 11).



**Abbildung 27: HA::NRA-2::GFP wird in geringen Mengen auch an die Plasmamembran dirigiert**  
 (A) Schematische Darstellung der Herstellung des Fusionsproteins durch Insertion von HA in die SanDI Schnittsstelle von *nra-2(cDNA)::gfp*. Signalpeptid (SP). (B) Expression von 3xHA::NRA-2::GFP in Wildtyp Tieren, Bilder: A. Gottschalk. Die Vergrößerung zeigt den Nachweis und von 3xHA::NRA-2::GFP im Vergleich zur Lokalisation der synaptischen AChR-Untereinheit LEV-1:4xHA und des neuronalen Oberflächenproteins ODR-2::HA nach Injektion von anti- HA. Die Größenbalken entsprechen 20 µm.

Nach Schneiden des Signalpeptids (SP), während der Prozessierung des Proteins im Organismus wird der HA-Proteinanhang in den extrazellulären Raum, bzw. in das ER Lumen exponiert (Abbildung 27 A). Lokalisiert HA::NRA-2::GFP an der

Plasmamembran kann das extrazellulär vorliegende HA Markerprotein mittels Injektion von fluoreszenzmarkierten Anti-HA Antikörpern in das Pseudocoelom nachgewiesen werden (Abbildung 27 B, rot) (Gottschalk and Schafer, 2006). Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen 3xHA::NRA-2::GFP exprimierender Tiere zeigen, dass das Protein zwar deutlich im ER lokalisierte (grün), jedoch auch an der Zelloberfläche zu finden war (rot) (Abbildung 27 B). Die Oberflächenlokalisierung des Fusionsproteins war an den äußersten Rändern der Muskelzellen bzw. an den Grenzflächen zwischen den einzelnen Muskelzellen zu sehen. Im Gegensatz zur nACh- und GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren war das Protein allerdings nicht entlang der Nervenstränge detektierbar. Im Vergleich dazu ist die Expression der Levamisolrezeptor-Untereinheit LEV-1::4xHA und des neuronalen Oberflächenproteins ODR-2::HA entlang der Oberfläche von Synapsen dargestellt. Da der Nachweis von HA-markiertem NRA-2::GFP keine Ähnlichkeit dazu aufweist, kann nicht von der Präsenz des Proteins an Synapsen ausgegangen werden (siehe Abbildung 27, Vergleich Vergrößerung).

Zusammenfassend sprechen die Ergebnisse für eine Interaktion von NRA-2 mit dem Levamisolrezeptor im ER jedoch vermutlich nicht an der postsynaptischen Membran. Die NRA-2::GFP Zelloberflächenexpression könnte ein Resultat der Überexpression darstellen und aus ineffizienter ER-Retention des Fusionsproteins im Zuge des intrazellulären Transports resultieren. Dabei entkommt das Protein zu geringen Mengen aus dem ER und landet an der Oberfläche.

### **3.3.5 NRA-2::mCHERRY zeigt keine Co-Lokalisation mit dem ERES Marker SEC-23::GFP**

Der Transport von sekretorischen- oder Membranproteinen zur Plasmamembran erfordert intrazelluläre Vorgänge wie Biogenese und gerichteten Transport im sekretorischen Weg (Mei and Xiong, 2003). Der *coat protein complex II* (COPII) spielt dabei eine wichtige Rolle (Smith et al., 1987). Er besteht aus zwei Protein Komplexen, Sec23p-Sec24p; Sec13p-Sec31p; so wie dem Protein Sar1p. Dieser Komplex ist häufig an den *ER Exit Sites* (ERES) zu finden, (Roberts et al., 2003; Smith et al., 1987). Die ERES sind funktionale Strukturen am ER, an welchen sekretorische und membranständige Proteine in Transportvesikel verfrachtet werden.

Die Proteine des COPII Komplexes sind für den geregelten Transport von Vesikeln mit sekretorischen und Membran gebundenen Proteinen von ER zum Trans-Golgi Netzwerk (TGN) zuständig (Jeanclos et al., 2001; Mrowiec and Schwappach, 2006). SEC-23, ein Bestandteil des COPII Komplexes, wurde im Zuge von Forschungen an Oogenese und

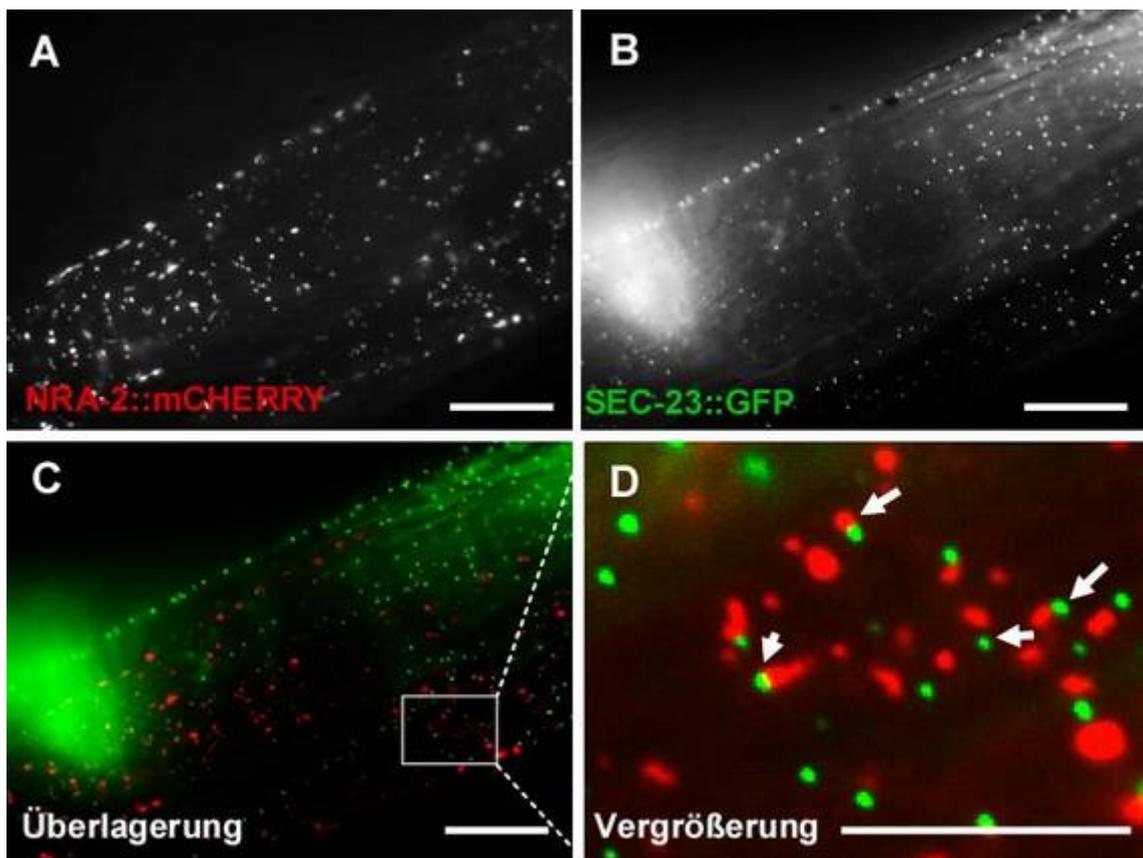
Morphogenese von *C. elegans* als Markerprotein für ERES eingesetzt (Roberts et al., 2003). Ein GFP Fusionsmarker C-terminal von SEC-23 erlaubt die Untersuchung der subzellulären Lokalisation. Zur Durchführung von Co-Lokalisationsstudien von NRA-2 mit SEC-23 GFP wurde der transgene Stamm und das Plasmid von Roberts et al. erhalten.

Mit Hilfe dieses Experiments sollte überprüft werden, ob NRA-2 - ähnlich zu SEC-23 - in einem Komplex im ER von Muskelzellen wirkt, indem es an den ERES die Selektion der zum Transport vorgesehenen nikotinischen Rezeptorsubtypen reguliert. Diese Hypothese würde eine Erklärung für die veränderten Agonist-induzierten Ströme in *nra-2* Mutanten bieten. Durch einen Einfluss des Proteins bei der Verfrachtung und dem Transport an ERES könnten Subtypen mit anderen pharmakologischen Eigenschaften an die postsynaptische Oberfläche gelangen.

Um einen subzellulären Vergleich der Expressionsmuster zu erlauben, wurde NRA-2 C-terminal mit dem rot-fluoreszierenden Protein mCHERRY fusioniert. Beide Plasmide sowie der *rol-6d* Marker wurden in Wildtyptiere co-injiziert; *pmyo-3::nra-2::yfp* zu 5ng/μl und *psec-23::sec-23::gfp* zu 2ng/μl. Die Injektion von höheren Mengen dieser DNA war toxisch für die eventuell gebildeten transgenen Tiere. Außerdem wiesen einige Nachkommen der injizierten Tiere Entwicklungsdefekte auf. Das könnte auf einen Gendosis-Effekt von NRA-2 und SEC-23 hindeuten.

Die erhaltenen transgenen Tiere wurden im CLSM analysiert. In Abbildung 28 B ist eine deutliche Akkumulation von SEC-23::GFP an ERES zu sehen. Auch das Fusionsprotein NRA-2::mCHERRY weist zum Teil ein ähnliches punktförmiges Expressionsmuster auf wie der ERES-Marker (siehe Abbildung 28 A und B). Das Markerprotein mCHERRY an Transmembranproteinen zu Aggregationen führen was bei der Interpretation von Co-lokalisationsexperimenten berücksichtigt werden muss. In der Vergrößerungsdarstellung ist jedoch keine deutliche Co-Lokalisation von SEC-23::GFP und NRA-2::mCHERRY zu erkennen (siehe Abbildung 28 D). Dennoch lokalisieren beide Fusionsproteine in deutlicher Nähe zueinander (siehe Abbildung 28 C und D).

Schlussfolgernd kann davon ausgegangen werden, dass NRA-2 nicht an den *ER Exit Sites* konzentriert wird.



**Abbildung 28: NRA-2::mCHERRY co-lokalisiert nicht mit SEC-23::GFP an ERES.** NRA-2::mCHERRY und SEC-23::GFP wurden im Muskel von *C. elegans* co-exprimiert und im CLSM analysiert. (A) NRA-2::mCHERRY Lokalisation (rot) (B) SEC-23::GFP Lokalisation (grün), Protein des COPII Komplexes welches ERES markiert. (C) Überlagerung; NRA-2::mCHERRY (rot); SEC-23::GFP (grün). (D) Vergrößerung eines Ausschnitts. Die Größenbalken in A, B, C entsprechen 10 µm und der Größenbalken in D entspricht 5 µm.

### 3.3.6 NRA-2 co-lokalisiert mit Untereinheiten des Levamisol-Rezeptors im ER, jedoch nicht an der Postsynapse

Analog zu ihren vertebraten Homologen konnte in vorangegangenen Experimenten eine Lokalisation von NRA-2 und NRA-4 im ER von Muskelzellen gezeigt werden. Weiterhin wurde die Präsenz von transgenem NRA-2 an der Plasmamembran demonstriert, wobei es nicht an der synaptischen Membran lokalisiert. NRA-2::mCHERRY wurde intrazellulär in punktuellen Strukturen nahe des ERES Markers SEC-23::GFP nachgewiesen. Das deutet auf eine mögliche Funktion des Proteins bei der Vorbereitung zum Transport von assemblierten nikotinischen Rezeptoren im ER von *C. elegans* Muskelzellen. Dort könnte NRA-2 sowohl im ER mit den Rezeptoruntereinheiten interagieren, als auch anschließend mit diesen an die Zelloberfläche transportiert werden.

Um eine mögliche Interaktion von NRA-2 mit Rezeptoruntereinheiten im ER zu untersuchen, wurden Co-Lokalisationsstudien von NRA-2::GFP bzw. NRA-2::mCHERRY Fusionsproteinen mit überexprimierten sowie endogenen Rezeptoruntereinheiten durchgeführt.

L-AChR Untereinheiten sind in *C. elegans* nur bei einer Überexpression im ER mittels Fluoreszenzmarkierung sichtbar. Erst dann liegen sie dort offenbar in ausreichender Menge vor, die es erlaubt ihre Lokalisation in subzellulären Kompartimenten zu beobachten. Bei immunhistochemischer Markierung endogener Rezeptoren dagegen sind die akkumulierten Proteine nur an Postsynapsen entlang der Nervenstränge zu erkennen (siehe 2.1 Methoden Abschnitt 2.2.6.17, UNC-29 Färbung mittels Peptid-Antikörper). Diese charakteristischen Expressionsmuster sind offenbar auf die Expressionsmengen endogener bzw. rekomanter Proteine zurückzuführen. Es kann davon ausgegangen werden, dass beide ein realistisches Bild der subzellulären Lokalisation von nAChR im ER als auch an der synaptischen Membran darstellen.

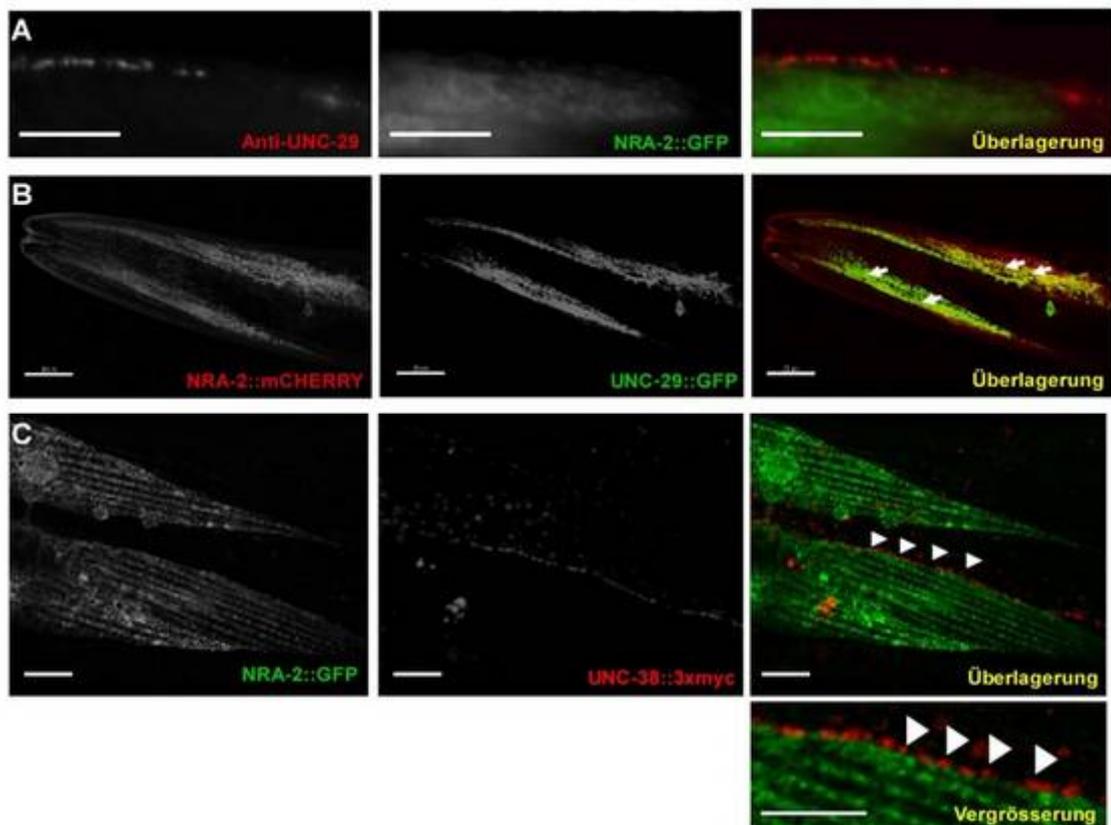
Mit Hilfe der Injektion von fluoreszenzmarkierten Antikörpern konnte die Lokalisation von 3xHA::NRA-2::GFP an der synaptischen Membran bereits ausgeschlossen werden (siehe Ergebnisse, Abschnitt 3.3.5): Die Oberflächenlokalisierung des NRA-2 Fusionsproteins war zwar an den äußersten Rändern der Muskelzellen, jedoch im Gegensatz zu Rezeptoren der NMJ, nicht entlang der Nervenstränge detektierbar. Daher wurde nun eine mögliche Co-Lokalisation von NRA-2 und den nAChR Rezeptoruntereinheiten im ER untersucht.

Dazu wurden NRA-2::mCHERRY und UNC-29::GFP in Wildtyptieren co-exprimiert. Die daraus resultierenden transgenen Tiere wurden fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Abbildung 29 B zeigt eine deutliche Co-Lokalisierung der beiden Proteine im ER von *C. elegans* Muskelzellen (siehe Abbildung 29 B).

Darauffolgend wurde die subzelluläre Lokalisation von NRA-2::GFP und endogenen Rezeptoruntereinheiten an der Synapse untersucht. Um endogenes UNC-29 entlang der Synapsen nachzuweisen, wurde der zuvor aufgereinigte Peptid-Antikörper #1957 für immunhistochemische Färbungen mittels der *Freeze-Crack* Methode verwendet (siehe Abschnitt 2.2.5.1). Die Immunfärbung erfolgte an transgenen Tieren, welche NRA-2::GFP in Muskelzellen exprimieren. Die Fluoreszenz von NRA-2::GFP konnte durch Verzicht von Methanol bei der Fixierung der Proben erhalten werden. Nach Inkubation mit dem spezifischen Peptid-Antikörper folgte die Fluoreszenzmarkierung von endogenem UNC-29 mit Hilfe eines Alexa568-markierten sekundären Antikörpers.

Abbildung 29 A zeigt deutlich die subzelluläre Lokalisation von NRA-2::GFP in Muskelzellen so wie die synaptische Lokalisation von endogenem UNC-29. Dieser Ansatz konnte jedoch keine Co-Lokalisation beider Proteine in Muskel-ER oder an den synaptischen Enden von Muskelarmen zeigen. NRA-2::GFP und endogenes UNC-29 weisen also keine Co-Lokalisation auf (siehe Abbildung 29 A; Überlagerung).

Dieses Ergebnis könnte allerdings auch durch den Vergleich von endogen- und rekombinant exprimierter Proteine bedingt sein. Zur Überprüfung dieser Möglichkeit wurde das Co-lokalisations Experiment mit zwei transgen exprimierten Proteinen wiederholt: dem rekombinanten NRA-2::GFP und einer C-terminal MYC- markierten UNC-38 Untereinheit.



**Abbildung 29: NRA-2 co-lokalisiert mit Levamisolrezeptoruntereinheiten im ER von Muskelzellen, jedoch nicht an der Synapse.** (A) Co-Färbung von endogenem UNC-29 mit dem spezifischen Peptid-Antikörper (#1957, 1:200) und transgenem NRA-2::GFP nach *Freeze Crack* und methanolfreier Fixierung. (B) Co-Expression von NRA-2::mCHERRY (rot) und UNC-29::GFP (grün) in Wildtypmuskeln. Exemplarische Darstellung der Co-Lokalisation in Kopfmuskeln (siehe Pfeile). (C) Co-Expression von NRA-2::GFP (grün) und UNC-38::3xMYC (rot) in Wildtypmuskeln. Die Tiere wurden 48 h vorher mit einem fluoreszenz-markierten Myc-Antikörper injiziert, um die extrazellulär exponierten MYC Peptide der UNC-38 Untereinheiten zu markieren. Die Pfeilspitzen deuten auf die synaptisch akkumulierten UNC-38::3xMYC Untereinheiten. Die Aufnahmen wurden am CLSM gemacht. Die Größenbalken entsprechen 7  $\mu$ m.

Diese Co-Expression von exogenem NRA-2::GFP und UNC-38::MYC stützt die vorangegangenen Ergebnisse. Das überexprimierte UNC-38::MYC wurde durch Injektion von rot-fluoreszierenden MYC-Antikörpern in die Bauchhöhle markiert. Anschließend wurden die transgenen Tiere im CLSM analysiert. In keinem Fall war eine Co-Lokalisation von synaptischem UNC-38 und NRA-2::GFP zu beobachten (siehe Abbildung 29 C).

Das Ergebnis bestätigt die Annahme, dass NRA-2 (und potentiell NRA-4) wahrscheinlich im ER, jedoch nicht an postsynaptischen Nervenenden mit dem Levamisolrezeptor interagiert.

### **3.4 Einfluss von *nra-2* und *nra-4* auf cholinerge Neurotransmission in Mutanten essentieller und nicht-essentieller N- und L-AChR Untereinheiten**

Die unterschiedliche Agonist-Sensitivität der Rezeptoren im *nra-2*- und *nra-4*-Mutantenhintergrund kann im Prinzip durch veränderte Bindungsaffinität der Agonisten an der Ligandenbindungsstelle der Untereinheiten hervorgerufen werden. Andererseits kann die veränderte Untereinheitenzusammensetzung von Rezeptoren dafür verantwortlich sein. Für beide Mutanten wurde keine Veränderung der ACh-induzierten Ströme beobachtet. Da sowohl der Levamisolrezeptor als auch der Nikotinrezeptor zu den ACh-induzierten Strömen beitragen wurden die Rezeptoren im Folgenden einzeln auf ihre Aktivität nach ACh- Applikation untersucht. Dies erfolgte anhand von N- und L-ACh-Rezeptormutanten.

Zum Einen sollte der Einfluss des ACR-16 Rezeptors (Touroutine et al., 2005) auf die beobachteten ACh-Ströme in *nra-2* bzw. *nra-4* Mutanten isoliert untersucht werden. Dazu wurde der Einfluss der *nra-2(ok1731)* Mutation auf die Neurotransmission in der *unc-38(x20)* Mutante gemessen. UNC-38 ist eine essentielle  $\alpha$ -Untereinheit des L-AChRs und führt in den Mutanten zu einer Auslöschung des Levamisolrezeptor-induzierten Stroms (Fleming et al., 1997).

Desweiteren wurde die Aktivität des Levamisolrezeptors (L-AChR) mit Hilfe von *acr-16(ok789)* Mutanten isoliert untersucht, einer Mutante in der die Funktion des Nikotinrezeptors ACR-16 vollständig ausgeschaltet ist. Der Nikotinrezeptor ACR-16 wurde bereits in der Einleitung genauer beschrieben (siehe Abschnitt 1.3.3.3). Er ist ein Homopentamer aus der  $\alpha$ -Untereinheit ACR-16 (Ballivet et al., 1996; Francis et al., 2005; Touroutine et al., 2005).

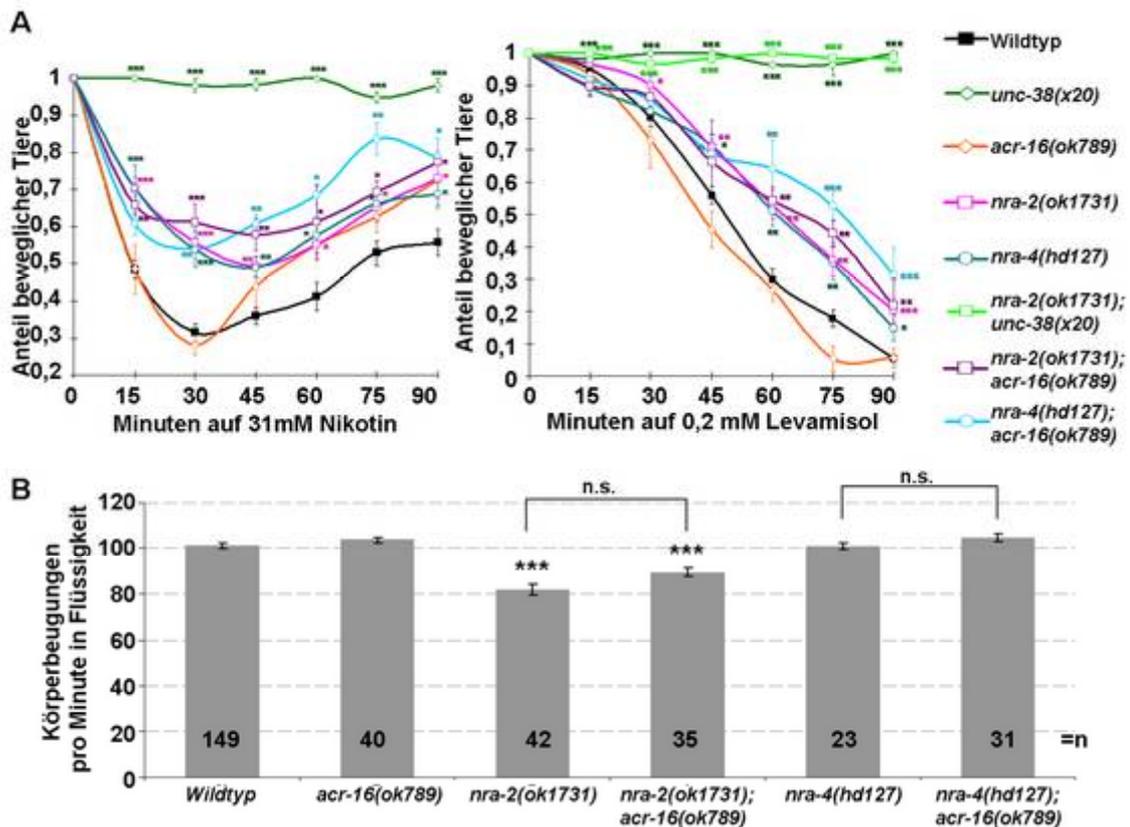
### 3.4.1 Einfluss von *nra-2* auf Lokomotion und Agonist-induzierte Paralyse in Mutanten essentieller N- und L-AChR Untereinheiten

Die Sensitivität von Mutanten essentieller  $\alpha$ -Untereinheiten gegenüber cholinergen Agonisten wurde zuerst in in Nikotin- und Levamisol-induzierten Paralyse Assays untersucht. Anschließend wurde die cholinerge Neurotransmission in Mutanten über Lokomotionsstudien mittels Schwimm-Assays analysiert.

Zur Untersuchung des Einflusses von NRA-2 auf die Nikotinrezeptor Aktivität wurden *nra-2(ok1731);unc-38(x20)* Doppelmutanten erzeugt, da hier die Aktivität des Levamisolrezeptors ausgeschaltet ist. So wie der *unc-38(x20)* Stamm weisen diese Doppelmutanten einen *unc* Phänotyp auf und können anhand dessen leicht vom Wildtyp oder den *nra-2(ok1731)* Mutanten unterschieden werden. Bei der Erzeugung wurden die aus der Kreuzung beider Mutanten hervorgegangenen Nachkommen der F2 Generation zuerst nach dem *unc-38(x20)* Phänotyp selektiert und anschließend nach dem *nra-2(ok1731)* Genotypisiert.

Der Effekt der *nra-2* Mutation auf die Levamisolrezeptor Aktivität wurde vor dem Hintergrund der *acr-16* Mutation analysiert. Für diese Experimente wurde ein *acr-16(ok789)* Mutantenstamm erhalten. Nach Analyse der Mutation mittels Sequenzierung und anschließender Etablierung einer Genotypisierung wurde der Mutant für Experimente eingesetzt. Durch Kreuzung von *nra-2(ok1731)* und *acr-16(ok789)* Mutanten wurden Doppelmutanten beider Allele hergestellt und über Genotypisierung verifiziert.

Abbildung 30 zeigt die Ergebnisse der Reaktion dieser Mutanten in Agonist-induzierten Paralyse Assays und nach Lokomotionsstudien. Während die *unc-38(x20)* Mutanten aufgrund der fehlenden Levamisolrezeptor Aktivität fast vollständig resistent gegenüber Levamisol/Nikotin-vermittelter Paralyse sind, zeigen die *acr-16(ok789)* Mutanten interessanterweise keine Unterschiede zum Wildtyp (siehe Abbildung 30 A). Die *nra-2(ok1731);unc38(x20)* Doppelmutanten verhalten sich dabei wie *unc-38(x20)* Einzelmutanten. Beispielsweise ist hier das Ergebnis des Levamisol-induzierten Paralyse Tests gezeigt (siehe Abbildung 30 A: hellgrün). In dieser Doppelmutante dominiert der Phänotyp der *unc-38(x20)* Mutanten im Paralyse Assay den der *nra-2(ok1731)* Mutation und ermöglicht keine genauere Untersuchung des Effekts der Doppelmutation.



**Abbildung 30: L-AChR- und N-AChR-Mutanten verhalten sich unterschiedlich in Paralyse- und Lokomotions Assays.** (A) Nikotin- bzw. Levamisol-Paralyse Assays wurden mit den L- bzw. N-AChR-Mutanten *unc-38(x20)* und *acr-16(ok789)* durchgeführt. Die Versuche wurden 2-7 mal wiederholt. (B) Schwimmbewegungen pro Minute von *acr-16(ok789)* Mutanten wurden im Vergleich mit *nra-2* und *nra-4* Einzelmутanten sowie mit Doppelmutanten quantifiziert. Die Anzahl der getesteten Tiere (n) ist in den Balken angegeben. Statistisch signifikante Unterschiede zum Wildtyp sind markiert: \* P<0.05; \*\* P<0.01; \*\*\* P<0.001. Statistik siehe auch Abschnitt 2.2.6.12.

Nach dem bisherigen Wissensstand der Forschung ist davon auszugehen, dass die Nikotin-induzierten Einwärtsströme an *C. elegans* Muskelzellen vollkommen ausgelöscht sind, wenn der Nikotinrezeptor ACR-16 fehlt (Ballivet et al., 1996; Francis et al., 2005; Touroutine et al., 2005). Wie jedoch am Beispiel von *unc-38(x20)* zu sehen ist, zeigen sich Levamisolrezeptor Mutanten neben Levamisol auch resistent gegenüber Nikotin. Dagegen verhalten sich Mutanten des Nikotinrezeptors *acr-16(ok789)* wie Wildtyp auf Nikotin und Levamisol, erfahren also eine Agonist-induzierte Daueraktivierung des L-AChR Rezeptors und Muskelhyperkontraktion. Das lässt darauf schließen, dass die Aktivität des ACR-16 Rezeptors in solch einem Agonist-induzierten Paralyse Assay nicht messbar ist.

Wie bereits zuvor erläutert, ist der Paralyse Assay ein *in vivo* Langzeittest zur indirekten Messung der Aktivität von nAChR in *C. elegans* mittels Muskelhyperkontraktion. Grund für das unterschiedliche Verhalten der N- und L-AChR Mutanten in diesem Test

sind wahrscheinlich die unterschiedlichen Desensitisierungsraten der beiden Rezeptoren. Während die Levamisol-induzierten Peak-Einwärtsströme langsam desensibilisieren, zeigen ACR-16 Rezeptor-abhängige Nikotin-induzierte Peak-Einwärtsströme eine schnelle Desensitisierungsrate (Beispielströme siehe Abbildung 31 A; Messung Jana Liewald).

Die Doppelmutante *nra-2(ok1731); unc38(x20)* verhielt sich in diesem Experiment wie die Rezeptormutante allein. Die *acr-16(ok789)* Doppelmutanten mit *nra-2(ok1731)* oder *nra-4(hd127)* hingegen verhielten sich entsprechend den Phänotypen der *nra-2* oder *nra-4* Einzelmutanten und zeigten einen ähnlichen Grad der Paralyse. Mit Hilfe der Methode des Agonist-induzierten Paralyseassays kann also kein Effekt der Mutation von *nra-2* und *nra-4* auf die Aktivität des Levamisolrezeptors bzw. des Nikotinrezeptors allein untersucht werden.

Die Lokomotionsstudien in Flüssigkeit zeigten ein ähnliches Ergebnis. Die *acr-16(ok789)* Einzelmutanten haben keinen *unc*-Phänotyp. Entsprechend zeigten Sie auch in den hier vorliegenden Lokomotionsstudien keine Unterschiede gegenüber Wildtyptieren. In Doppelmutation mit *nra-2(ok1731)* allerdings dominierte auch hier, wie zuvor im Langzeit-Paralyse Assay, der Phänotyp von *nra-2* bzw. *nra-4* Einzelmutanten (Abbildung 30 B).

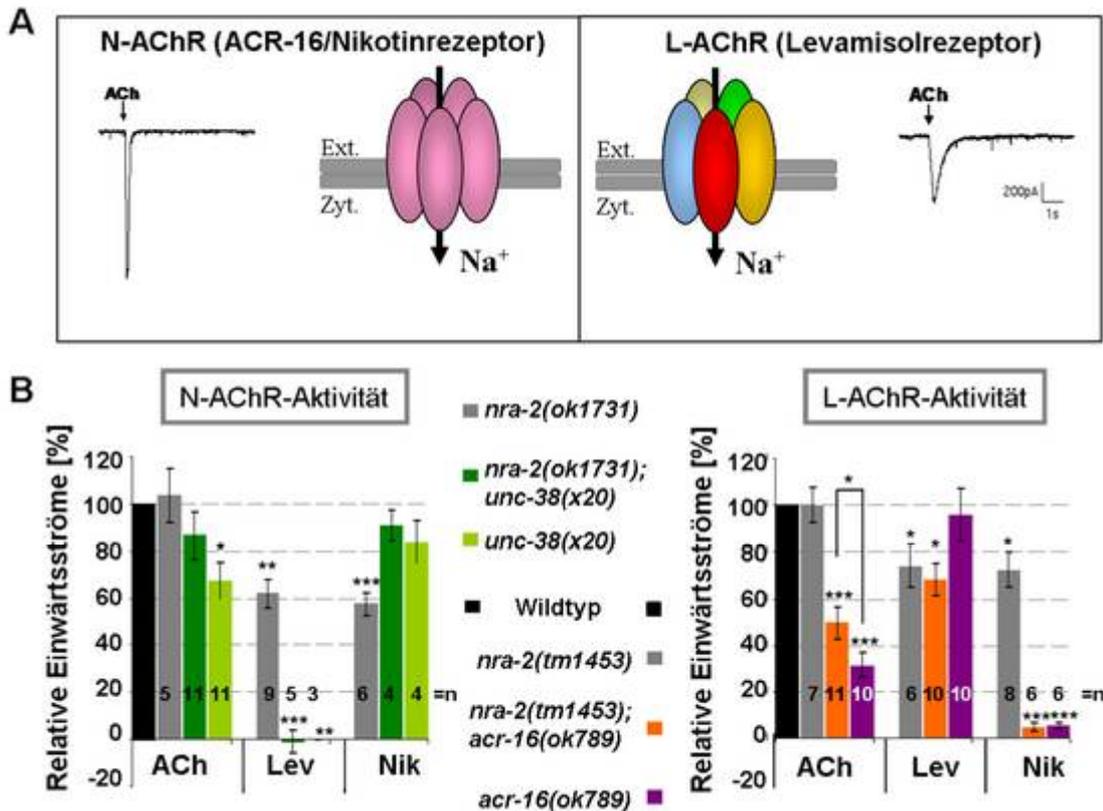
Im Vergleich sind die *unc-38(x20)* Tiere aufgrund ihrer starken Bewegungsdefizienz bereits fast vollständig unbeweglich. Dies blieb auch in den Doppelmutanten unverändert (Daten nicht gezeigt).

### **3.4.2 Die Mutation von *nra-2* hat eine Erhöhung der Acetylcholin-Sensitivität von L-AChR und N-AChR zur Folge**

Die direkte Untersuchung der Aktivität beider Rezeptortypen unabhängig voneinander wurde anschließend mittels der direkten *Whole-Cell Voltage-Clamp* Elektrophysiologie ermöglicht. Dazu wurden die ACh-induzierten Einwärtsströme in N- bzw. L-ACh-Rezeptormutanten von J. Liewald im *nra-2* Mutanten-Hintergrund gemessen.

Die jeweiligen Rezeptor-Einzelmutanten *acr-16(ok789)* und *unc-38(x20)* verhielten sich in dieser Messmethode erwartungsgemäß: Die Mutation des Nikotinrezeptors in *acr-16(ok789)* führte zur vollständigen Abwesenheit von Einwärtsströmen nach Nikotinapplikation (siehe Abbildung 31 B, orange), wobei die Mutation der essentiellen Levamisolrezeptor Untereinheit *unc-38* die Levamisol-induzierten Strömen auslöschte

(siehe Abbildung 31 B, grün) (Fleming et al., 1997). Zu den ACh-induzierten Strömen tragen beide Rezeptortypen in unterschiedlichem Maße bei (L-AChR: ~30%, N-AChR: ~70%; siehe Abbildung 31 A).



**Abbildung 31: Die Sensitivität von L- und N-AchR gegenüber Acetylcholin nimmt in Abhängigkeit von *nra-2* zu.** (A) Repräsentative Peak Einwärtsströme in Nikotinrezeptormutanten (links) und Levamisolrezeptormutanten (rechts). Levamisolrezeptor-abhängige Einwärtsströme, gemessen in *acr-16(ok789)* Mutanten. Nikotinrezeptorabhängige Einwärtsströme, gemessen in *unc-38(x20)* Mutanten. (B) Relative Agonist-induzierte Einwärtsströme in *nra-2*-Mutanten und *acr16(ok789)* bzw. *unc38(x20)*, sowohl in Einzel- als Doppelmultation. Die elektrophysiologischen Messungen wurden von Jana Liewald durchgeführt. Die Anzahl der getesteten Tiere (n) ist in den Balken angegeben. Statistisch signifikante Unterschiede zum Wildtyp sind markiert: \*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ ; \*\*\*  $P < 0.001$ . Statistik siehe auch Abschnitt 2.2.6.12.

In *nra-2;acr-16* Doppelmultanten ließ sich der Einfluss der *nra-2* Mutation auf die Aktivität des L-AChR isoliert untersuchen (siehe Abbildung 31 B, grün). Nach Applikation des natürlichen Agonisten Acteylcholin zeigten die Doppelmultanten signifikant erhöhte ACh-induzierte Ströme gegenüber *acr-16(ok789)* Einzelmultanten. Die Mutation von *nra-2* hat also einen *gain-of-function*-Effekt auf die ACh Sensitivität des Levamisolrezeptors. Die durch exogene Agonisten induzierten Ströme in *nra-2;acr-16* Doppelmultanten dagegen entsprachen den Einwärtsströmen der jeweiligen Einzelmultanten (siehe Abbildung 31 A, L-AChR-Aktivität). Hier war also kein Einfluss auf die Agonistsensitivität in Abhängigkeit von der Doppelmultation zu erkennen.

In *nra-2;unc-38* Doppelmutanten wurde die Sensitivität des N-AChRs gegenüber endogenen und exogenen Agonisten unabhängig vom Levamisolrezeptor untersucht. Die durchschnittlichen ACh-induzierten Ströme waren auch hier im Vergleich zu denen in *nra-2* Mutanten tendenziell erhöht. Die gemessenen Einwärtsströme nach Applikation von Nikotin bzw. Levamisol dagegen, entsprachen wieder denen von *nra-2* (signifikant reduzierte Nikotin-induzierte Ströme), bzw. *unc-28* Einzelmutanten (vollständig ausgelöschte Levamisol-induzierte Ströme) (siehe Abbildung 31 A: N-AChR-Aktivität). In *nra-4(hd127);acr-16(ok789)* Doppelmutanten dagegen war weder eine Erhöhung der ACh- noch der Levamisol-induzierten Ströme messbar. Die Nikotin-induzierten Einwärtsströme waren entsprechend dem Phänotyp von *acr-16(ok789)* Einzelmutanten stark reduziert (nicht gezeigt). Im Vergleich zu den Beobachtungen in *nra-2* Mutanten könnten diese Unterschiede entweder Allel-spezifische Effekte darstellen oder ein Indiz auf zusätzliche Funktionen der Proteine ausserhalb des putativen NRA-2/NRA-4-Komplexes im ER sein.

Diese Ergebnisse demonstrieren einen Agonist-spezifischen Einfluss der Mutation von *nra-2* auf die Funktion der N- und L-AChR. Diese Effekte waren in der direkten Messmethode der Elektrophysiologie messbar, jedoch nicht im Langzeit-Aktivitäts Test, dem Paralyse-Assay.

Möglicherweise ändern sich die Bindungseigenschaften und damit die Aktivität der Rezeptoren in Abhängigkeit des Agonisten. Im Folgenden sollte daher untersucht werden, ob die erhöhten ACh-induzierten Einwärtsströme durch eine Veränderung der Kanalöffnungszeiten bzw. Rezeptor-Desensibilisierungsraten ausgelöst wurden.

### **3.4.3 Eigenschaften einzelner L-AChR Kanäle in *nra-2* Mutanten sind verändert**

Die unterschiedliche Aktivität der Rezeptortypen in Abhängigkeit des jeweiligen Agonisten kann ein Resultat von veränderten Bindungseigenschaften sein; zum Beispiel durch *nra-2*-abhängige Veränderung von posttranslationalen Modifikationen der Rezeptoren. Zur genaueren Untersuchung dieser Frage wurde der Einfluss der *nra-2(ok1731)* Mutation auf die Eigenschaften der ligandengesteuerten Ionenkanäle gegenüber endogenen und exogenen Agonisten mittels *Single-Channel Patch Clamp* Experimenten auf der Ebene einzelner Kanäle genauer beleuchtet (Qian et al., 2008; Rayes et al., 2007). Diese Experimente wurden von Cecilia Bouzat (Universität Bahia Blanca, Argentinien) durchgeführt.

Die Messungen wurden an kultivierten embryonalen Muskelzellen aus Wildtyptieren bzw. *nra-2* Mutanten durchgeführt. Im L1 Larvalstadium ist nur die Population des Levamisol-sensitiven L-AChR nachzuweisen, wie frühere Studien der Gruppe an der Aktivität einzelner nAChR-Kanäle in embryonalen Muskelzellen zeigten (Rayes et al., 2007).

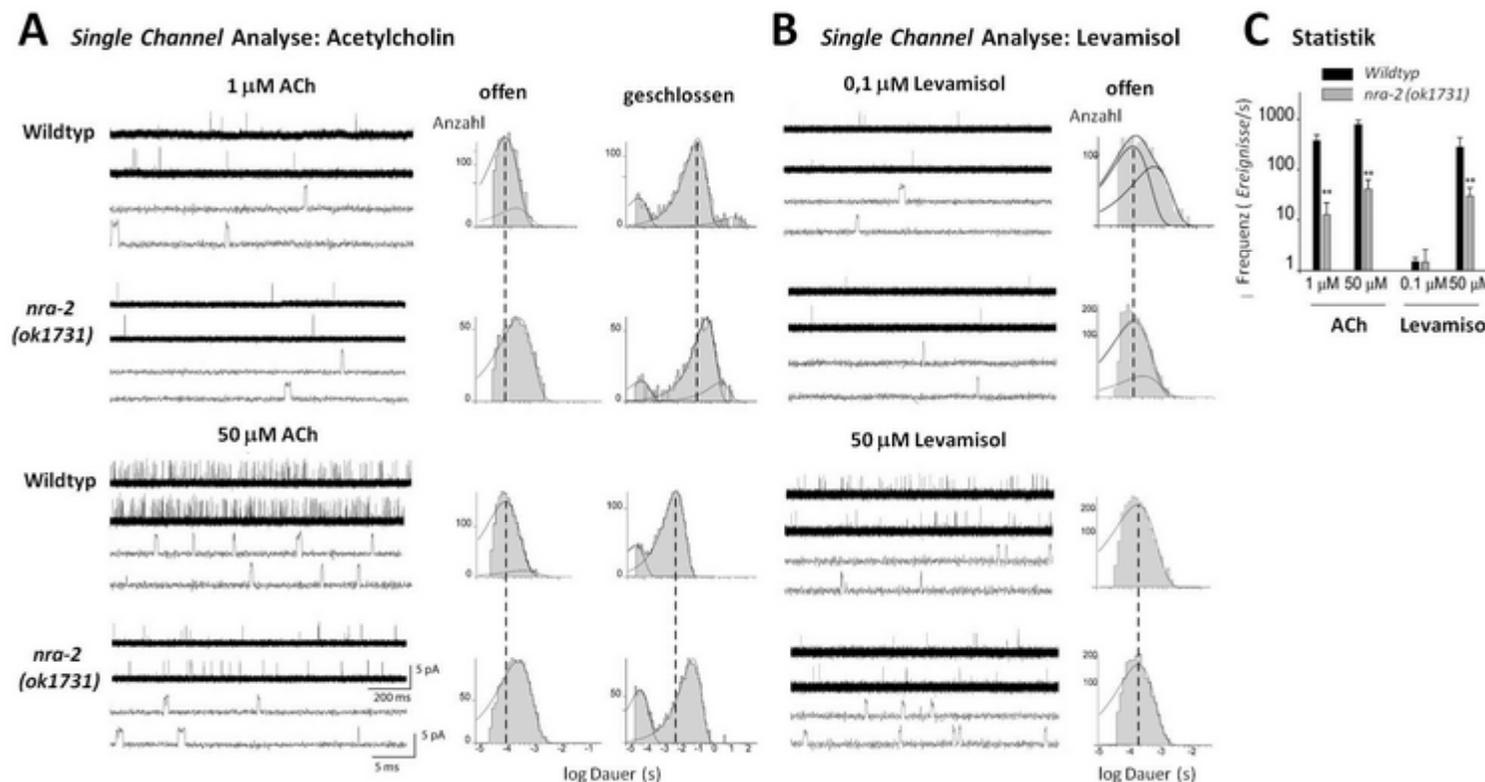
Mit Hilfe dieser Methode wurde die Aktivität einzelner L-AChR-Kanäle in *nra-2(ok1731)* Mutanten nach Applikation verschiedener Konzentrationen ACh oder Levamisol auf eine Veränderung der Kanalöffnungszeiten und Desensibilisierungsraten im Vergleich zum Wildtyp analysiert.

Erst bei Applikation höherer Agonistkonzentrationen konnten die Kanäle in *nra-2* Mutanten detektiert werden (siehe Abbildung 32 A, B). In beiden Fällen erhöhte sich die Frequenz von Kanalöffnungs- und Schliessereignissen mit der Konzentration, blieb aber in *nra-2* Mutanten signifikant reduziert gegenüber Wildtyp (siehe Abbildung 32 C). Dieses Ergebnis ist konsistent mit der Reduktion der Levamisol-induzierten Einwärtsströmen in *Whole-Cell Patch-Clamp* Messungen. Allerdings erklärt das nicht die erhöhten Einwärtsströme nach ACh-Applikation.

Dagegen könnte die Reduktion der Frequenz von Kanalöffnungs-Ereignissen sowohl auf eine Veränderung der Rezeptorkomposition oder der Desensibilisierungsrate hindeuten; möglicherweise hervorgerufen durch Veränderung eines Rezeptor-regulierenden Proteins.

Levamisol agiert bei höheren Konzentrationen als *open channel blocker* (Qian et al., 2008; Robertson et al., 1994) was eine Erklärung für die Reduktion der durchschnittlichen Kanal-Öffnungszeiten bei Applikation von 50µM Levamisol bietet. Das Ergebnis könnte auch auf reduzierte Sensitivität des Rezeptors gegenüber Levamisol in *nra-2* Mutanten hinweisen.

Zusammenfassend konnten die Resultate der Einzelkanal-Analyse unsere bisherigen Levamisol-induzierten Messungen in *nra-2* Mutanten bestätigen: Die Reduktion der Frequenz von Kanalöffnungs-Ereignissen in Mutanten geht einher mit reduzierten Levamisol-induzierten Einwärtsströmen in elektrophysiologischen Messungen.



**Abbildung 32: Die Eigenschaften einzelner Kanäle sind verändert in *nra-2(ok1731)* Mutanten.** Darstellung und Analyse des Stroms durch einzelne L-AChR Kanäle und Rezeptoren kultivierter embryonaler Muskelzellen aus Wildtyp und *nra-2(ok1731)* Mutanten mittels *Patch-Clamp* Studien. Aktivität einzelner Kanäle wurde an den Zellen nach Applikation von 1 µM (oben) und 50 µM (unten) Acetylcholin (A) bzw. 0,1 µM (oben) bzw. 50 µM (unten) Levamisol (B) gemessen. (A) und (B) links: Darstellung repräsentativer Spuren von Kanalöffnungsereignissen sowie dem gemessenen Strom (3,5 pA). Rechts: Darstellung von Histogrammen zur Dauer der „offen“ bzw. „geschlossen“-Zeiten. (C) Frequenz von Kanalöffnungsereignissen/Minute in Mutanten und Wildtypen wurde quantifiziert und grafisch aufgetragen. Bei allen Messungen wurde ein Haltepotential von 100 mV angelegt. Die Zahlen im Graphen sind als Mittelwerte mit Standardabweichung angegeben. Die Messungen wurden von Cecilia Bouzat und ihrer Gruppe durchgeführt. Abbildung adaptiert von A. Gottschalk aus Almedom et al., 2009. Statistisch signifikante Unterschiede zum Wildtyp sind markiert: \*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$ ; \*\*\*  $P < 0,001$ . Statistik siehe auch Abschnitt 2.2.6.12.

Im Falle der ACh- Applikation war eine ca. dreifache Verlängerung der Kanal-Öffnungszeiten messbar, was unsere Beobachtungen aus elektrophysiologischen Studien im *Whole Cell* Ansatz stützt. Entgegen der Erwartungen zeigten die Rezeptoren eine geringere Frequenz von Kanal-Öffnungsereignissen, was nicht mit den erhöhten ACh-induzierten Einwärtströmen bei *Whole Cell Voltage Clamp* Untersuchungen korreliert. Trotzdem kann anhand dieser Daten bestätigt werden, dass *nra-2(ok1731)* zu einer Agonist-spezifischen Veränderung der Sensitivität von L-AChR führt.

Diese Ergebnisse könnten darauf hinweisen, dass *nra-2* in Abhängigkeit des Entwicklungsstadiums der Tiere unterschiedliche Effekte auf Levamisolrezeptoren hat. Weiterhin bieten die Messungen einen Hinweis auf einen Einfluss von NRA-2 auf die Rezeptorenaktivität über die Veränderung ihrer Zusammensetzung, ihrer Desensibilisierungsrate oder ihrer Oberflächendichte ausübt. Ebenso sind diese Einflüsse nebeneinander denkbar.

In den folgenden Versuchen wurde die Möglichkeit des Vorkommens verschiedener Populationen von L- und/oder N- AChR in Abhängigkeit von *nra-2* untersucht.

#### **3.4.4 Einfluss von *nra-2* auf Paralyse- und Lokomotion von Mutanten nicht-essentieller Rezeptoruntereinheiten**

Auf Basis der bisherigen Ergebnisse stellt sich die Frage, auf welche Weise *nra-2* und *nra-4* die Funktion von L- und N- AChR in *C. elegans* beeinflussen. Die Ergebnisse auf Ebene einzelner Kanäle bestätigen die über *Whole Cell- Voltage Clamp* Studien erhaltenen Daten und lassen einen Einfluss der Mutation von *nra-2* auf die Zusammensetzung der L-AChR vermuten. Daraus resultiert die agonistspezifische Veränderung ihrer Aktivität. Jedoch ist der Mechanismus des Einflusses von NRA-2 und NRA-4 noch unklar.

Die Tandem-Affinitätsaufreinigung der zusätzlichen  $\alpha$ -Untereinheiten ACR-8, ACR-12 und ACR-13/LEV-8 mit Levamisolrezeptor-Untereinheiten weist bereits auf die Existenz von Rezeptorpentameren mit variierender Untereinheitenzusammensetzung hin (Gottschalk et al., 2005). Neben Levamisolrezeptoren welche aus den bekannten essentiellen Untereinheiten UNC-63, UNC-38 und der essentiellen nicht- $\alpha$ -Untereinheit UNC-29, sowie den zusätzlichen Untereinheiten LEV-1 und ACR-

13/LEV-8 zusammengesetzt sind (Culetto et al., 2004; Fleming et al., 1997; Towers et al., 2005) gibt es jedoch noch keine bekannten Populationen. Es wäre denkbar, dass diese zusätzlichen Subtypen in unterschiedlichen Entwicklungsstadien oder aber zelltypspezifisch aktiv sind.

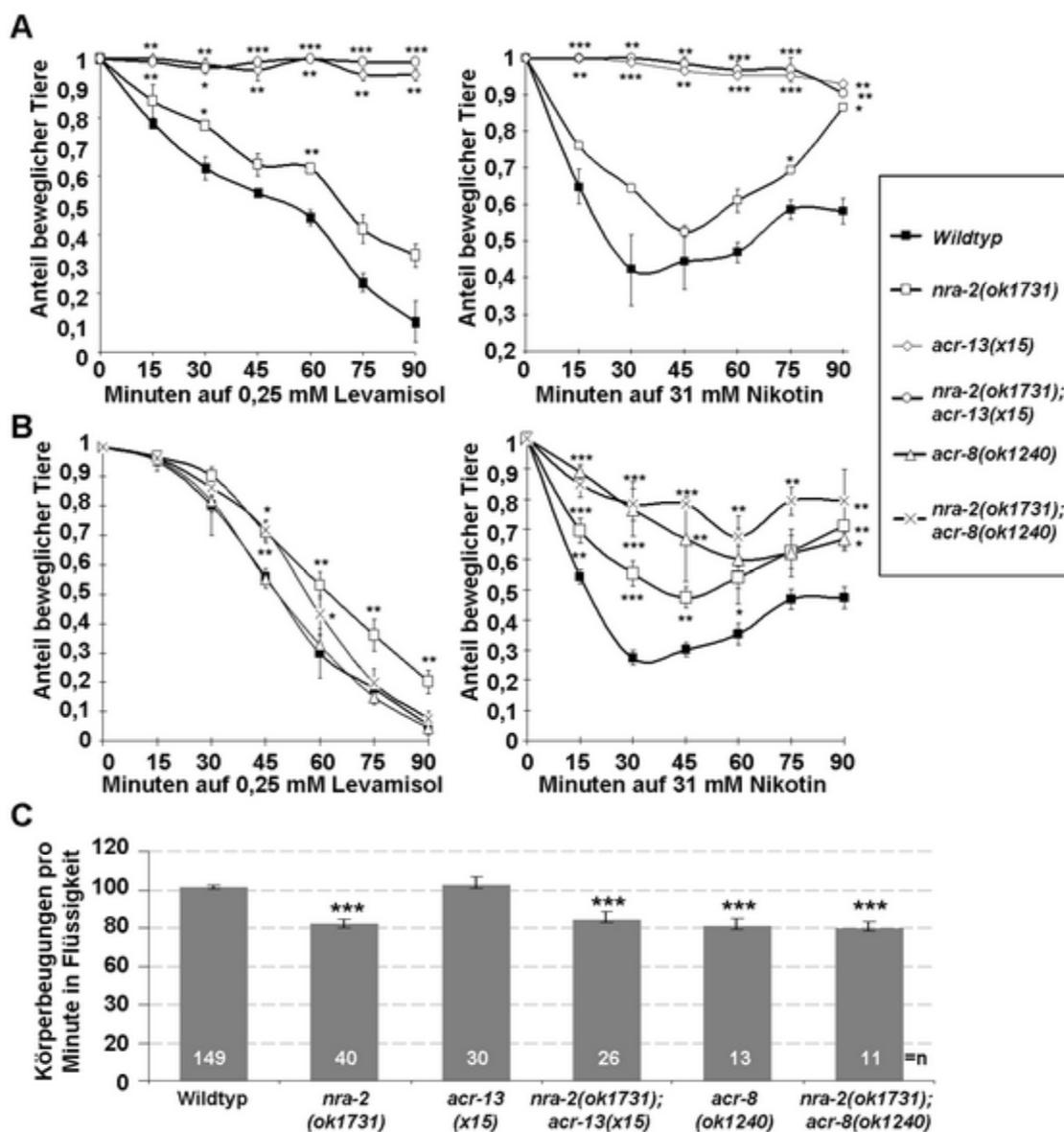
Unsere Beobachtungen könnten erste Hinweise auf die Regulation der nACh-Rezeptoren Zusammensetzung durch NRA-2 darstellen. So könnte es in *nra-2* Mutanten zum Einbau zusätzlicher  $\alpha$ -Untereinheiten in die Rezeptorpentamere kommen, was wiederum die Bindungsaffinität und Aktivität der funktionalen Rezeptoren entsprechend unserer Beobachtungen verändern würde. Auch könnte das Fehlen der *nra-2*-Aktivität die Bildung von Rezeptor Subtypen mit mehr als nur einer UNC-38 Untereinheit begünstigen. Zur Untersuchung dieser Hypothese sollte der Einfluss der zusätzlichen  $\alpha$ -Untereinheiten (ACR-8 und ACR-13/LEV-8) auf die Bindungsaffinität der Agonisten sowie auf die nAChR Aktivität untersucht werden.

Die zusätzlichen Untereinheiten ACR-8, ACR-13/LEV-8 und ACR-12 sind nicht-essentiell und gehören zu der ACR-8-Gruppe von nAChR in *C. elegans*. Alle Mitglieder dieser Gruppe sind  $\alpha$ -Untereinheiten, die u.a. atypische Acetylcholin Bindestellen aufweisen. Basierend auf den Ergebnissen der Aufreinigung mit den L-AChR-Untereinheiten UNC-29 und LEV-1, sind diese Proteine offenbar in bisher unbeschriebenen Heteropentameren präsent, wobei ACR-8 und ACR-13/LEV-8 im Muskel exprimiert werden. ACR-12 dagegen nur in Neuronen (Jospin et al., 2009).

Zuerst wurde die Aktivität der *C. elegans* nAChR in den genomischen Mutanten *acr-8(ok1240)* und *acr-13/lev8(x15)* mittels Nikotin- und Levamisol-induzierten Paralyse Assays sowie indirekt in Lokomotions-Studien analysiert.

Die *acr-13/lev-8* Mutanten sowie *acr-13/lev-8;nra-2* Doppelmutatnen zeigen fast vollständige Resistenz gegenüber beiden exogenen Agonisten in Paralyse Assays (siehe Abbildung 33). Diese Beobachtung ähnelt dem zuvor ermittelten Phänotyp von *unc-38(x20)* Mutanten (siehe Abbildung 33). Allerdings zeigte sich die verminderte Rezeptoraktivität vor allem in der Kopf- und Nackenregion der Tiere, wie in Lokomotionsstudien bestätigt wurde. Denn hier zeigten die Tiere in ihren Schwimmbewegungen keinen Unterschied zum Wildtyp, was auf normale Aktivität

von nAChR an neuromuskulären Synapsen der Körperwandmuskeln hindeutet (siehe Abbildung 33 C).

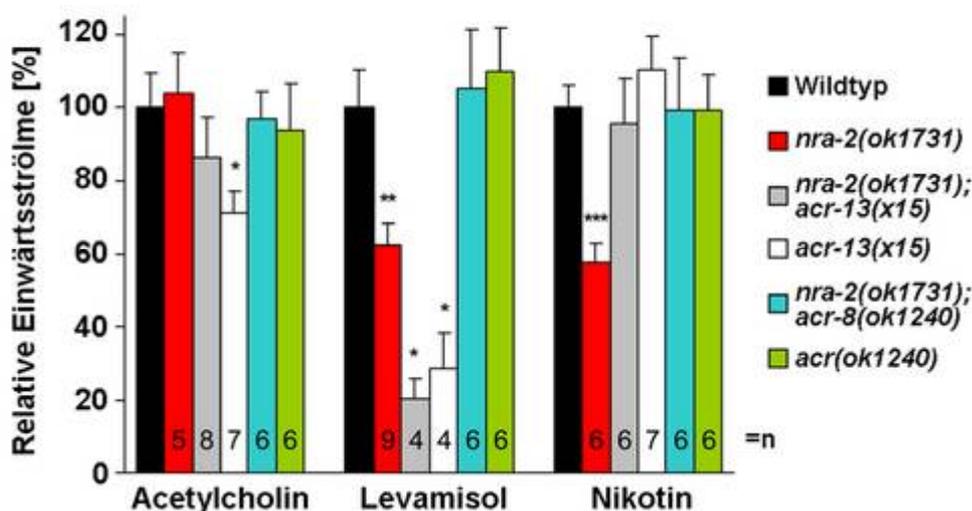


**Abbildung 33: Untersuchung der cholinergen Neurotransmission in Mutanten von *acr-8* und *acr-13/lev-8*.** Nikotin- und Levamisol- vermittelte Paralyse Assays mit (A) *acr-13/lev-8(x15)* und (B) *acr-8(ok1240)* Mutanten und Doppelmutanten mit *nra-2(ok1731)*. Die Versuche wurden 2-7 mal wiederholt und gemittelt. (C) Indirekte Untersuchung der cholinergen Neurotransmission an der Körperwandmuskulatur durch Quantifizierung von Körperbeugungen pro Minute in M9 Puffer. Die Anzahl der Tiere (n) ist in den Balken angegeben. Statistisch signifikante Unterschiede zum Wildtyp sind markiert: \* P<0.05; \*\* P<0.01; \*\*\* P<0.001. Statistik siehe auch Abschnitt 2.2.6.12.

In Mutanten der nicht-essentiellen  $\alpha$ -Untereinheit ACR-8 wurde in Agonist-induzierten Paralyse-Assays signifikante Resistenz gegenüber Nikotin, jedoch nicht gegenüber Levamisol nachgewiesen (siehe Abbildung 33 A, B). Auch in

Doppelmutation mit *nra-2(ok1731)* war nur eine schwache Resistenz zu beobachten, im Vergleich zu der signifikanten Resistenz in *nra-2(ok1731)* Einzelmutanten. Die *acr-8(ok1240)* Mutation kompensiert also zu einem gewissen Grad, die in *nra-2(ok1731)* Mutanten beobachtete Levamisolresistenz.

Die Aktivität von nAChR an der NMJ wurde anschließend indirekt über Analyse der Lokomotion in Flüssigkeit untersucht. Die Lokomotionsstudien zeigten eine signifikant verminderte Bewegungsfähigkeit der *acr-8(ok1240)* Tiere im Vergleich zu Wildtyp, was ein Indiz für verminderte nAChR-Aktivität in Körperwandmuskelzellen ist. In Doppelmutanten mit *nra-2* konnte keine signifikante Verstärkung dieses Phänotyps beobachtet werden (siehe Abbildung 33 C).



**Abbildung 34: *Acr-13/lev-8(x15)* und *acr-8(ok1240)* kompensieren reduzierte cholinerge Einwärtsströme in *nra-2* Mutanten.** Mutanten der nicht-essentiellen  $\alpha$ -Untereinheiten ACR-13/LEV-8 und ACR-8 und Doppelmutanten mit *nra-2(ok1731)* wurden von Jana Liewald mittels ‚Whole Cell Voltage Clamp‘ Messungen untersucht. Die relativen Einwärtsströme nach Applikation von Acetylcholin, Levamisol oder Nikotin wurden auf den Wildtyp normalisiert und in Prozent angegeben. Abbildung adaptiert aus Almedom et al., 2009. Die Anzahl der gemessenen Tiere (n) ist in den Balken angegeben. Statistisch signifikante Unterschiede zum Wildtyp sind markiert: \*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ ; \*\*\*  $P < 0.001$ . Statistik siehe auch Abschnitt 2.2.6.12.

Mittels elektrophysiologischer Studien von Jana Liewald konnten diese Ergebnisse teilweise bestätigt werden: In *acr-13/lev-8(x15)* Mutanten sowie *nra-2;acr-13/lev-8* Doppelmutanten wurden entsprechend reduzierte Levamisol-induzierte Einwärtsströme nachgewiesen (siehe Abbildung 34). Die nAChR-abhängigen Nikotin-induzierten Ströme blieben allerdings sowohl in der *acr-13/lev-8(x15)* Mutante als auch in *nra-2;acr-13/lev-8* Doppelmutanten unverändert. Die in *nra-2* Einzelmutanten signifikant

reduzierten Nikotin-induzierten Ströme werden offenbar durch zusätzliche Mutation von *acr-13/lev-8* revertiert, also in Doppelmutanten wieder auf Wildtyp Niveau gebracht.

Interessanterweise wies die Mutation der Rezeptoruntereinheit *acr-8* in elektrophysiologischen Messungen keinen Unterschied der Acetylcholin-, Levamisol- oder Nikotin-induzierten Einwärtsströme gegenüber Wildtyp auf. Allerdings trat auch hier in *nra-2;acr-8* Doppelmutanten eine Reversion der in *nra-2* Einzelmutanten signifikant reduzierten Nikotin- und Levamisol-induzierten Einwärtsströme auf Wildtypniveau ein. Die *acr-8* Mutation sowie die *acr-13/lev-8* Mutation unterdrückt also den Einfluss von *nra-2(ok1731)* auf die N- und/oder L-AChR Aktivität.

Diese Ergebnisse liefern einen Hinweis auf eine mögliche Beteiligung der beiden zusätzlichen nAChR Untereinheiten ACR-8 und ACR-13/LEV-8 an bisher nicht beschriebenen, aktiven L-AChR Subtypen in *C. elegans*. Offenbar weisen diese Subtypen eine veränderte Funktionalität und Pharmakologie im Vergleich zum bekannten L-AChR der neuromuskulären Synapse auf.

Im Wildtyp scheint NRA-2 dabei den Einbau dieser Untereinheiten in L- wie auch N-AChR zu verhindern. Dagegen werden diese Untereinheiten bei Mutation von *nra-2* mit höherer Wahrscheinlichkeit in funktionale Rezeptoren eingebaut und an die synaptische Oberfläche transportiert. So wurde in *nra-2(tm1453)* bzw. *(1731)* und auch *nra-4(hd127)* Mutanten die veränderte Rezeptor-Aktivität und -Sensitivität gegenüber Agonisten beobachtet. In *acr-13/lev-8;nra-2* oder *acr-8;nra-2* Doppelmutanten wäre dieser Einbau der alternativen Untereinheiten nicht mehr gewährleistet und könnte einer anderen  $\alpha$ -Untereinheit den Einbau in das Pentamer ermöglichen. Das wiederum geht mit einer Veränderung der Rezeptorantwort auf Agonisten einher.

### **3.5 Mechanismus des Wirkens von NRA-2 und NRA-4 auf nAChR-**

#### **Untereinheiten in *C. elegans***

Die bisherigen Ergebnisse deuten auf eine Wirkung von NRA-2 und NRA-4 im ER. Ein putativer Komplex aus beiden Proteinen scheint dort die Aktivität von N- und L-AChR in *C. elegans* zu beeinflussen. *Patch-Clamp* Untersuchungen auf der Ebene ganzer Zellen und auch einzelner Kanäle konnten bestätigen, dass die Mutation von

*nra-2* die Aktivität der Rezeptoren Agonist-spezifisch verändert. Diese Effekte können unterschiedlichen Mechanismen im ER zugrunde liegen. Zum einen kann die Funktionsweise der Rezeptoren durch eine NRA-2/NRA-4 induzierte Veränderung der posttranslationalen Modifikationen beeinflusst werden. Das kann im ER auf der Ebene der Rezeptorbiogenese stattfinden. Weiterhin ist die Aktivität der Rezeptoren direkt durch ihre Bindung von Agonisten über ihre  $\alpha$ -Untereinheiten und z. B. ihre Affinität und Desensibilisierungsrate reguliert. In *nra-2* Mutanten können zusätzliche  $\alpha$ -Untereinheiten in N- und/oder L-AChR eingebaut werden und einen direkten Effekt auf die Aktivität der Rezeptoren haben, wie anhand von *acr-8(ok1240)* und *acr-13/lev-8(x15)* Mutanten gezeigt werden konnte.

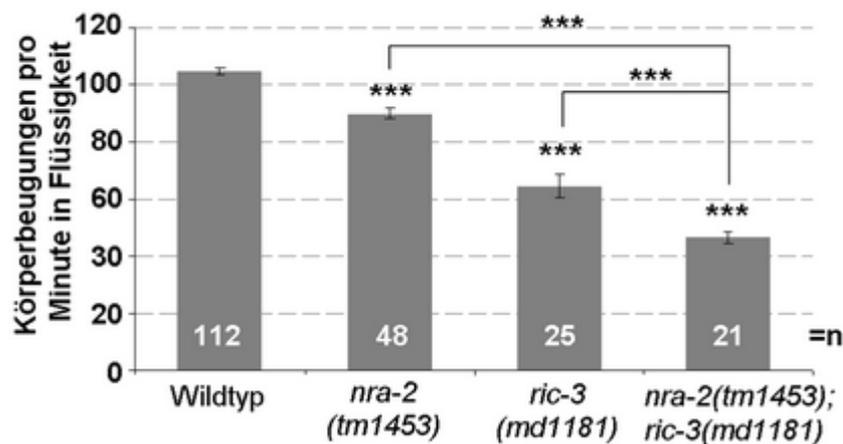
Zur weitergehenden funktionalen Charakterisierung sollten diese möglichen Mechanismen der Wirkung von NRA-2 und NRA-4 näher beleuchtet werden.

### **3.5.1 NRA-2 und RIC-3 agieren in unterschiedlichen Signalwegen imER**

Wie bereits in der Einleitung beschrieben ist RIC-3 ein konserviertes ER-residentes Protein, welches essentiell für die Biogenese und den Transport von nAChR in *C. elegans* ist (Halevi et al., 2002). Das Protein besitzt 2 transmembran Domänen und 2 Coiled-Coil Domänen und reguliert die Zusammenführung von Untereinheiten verschiedener nAChR Typen im ER (Biala et al., 2009; Gottschalk et al., 2005; Gottschalk and Schafer, 2006; Halevi et al., 2002).

RIC-3 und der putative NRA-2/NRA-4 Komplex weisen Parallelen in der subzellulären Lokalisation auf und ihre genomischen Mutanten verhalten sich zudem ähnlich resistent in Agonist-induzierten Paralyse Assays (Gottschalk et al., 2005; Gottschalk and Schafer, 2006). Es wäre also denkbar, dass dem Wirken der Proteine ein ähnlicher Mechanismus, wenn nicht der gleiche, zugrunde liegt.

Um eine potentielle genetische Interaktion von NRA-2 und RIC-3 zu untersuchen, wurde die Auswirkung der Doppelmutation von *ric-3(md1181)* und *nra-2(ok1731)* auf die Aktivität der nikotinischen Rezeptoren indirekt durch Quantifizierung der Lokomotion in einem Schwimmassay untersucht.



**Abbildung 35: NRA-2 und RIC-3 beeinflussen die Aktivität von *C. elegans* nAChR durch unterschiedliche Signal-Transduktionswege.** Die Bewegungsrate in M9 Puffer von *nra-2(tm1454)* und *ric-3(md1181)* Einzel- und Doppelmutanten wurde im Vergleich zu Wildtyp Tieren quantifiziert und graphisch aufgetragen. Die Anzahl der getesteten Tiere (n) ist in den Balken angegeben. Statistisch signifikante Unterschiede zum Wildtyp sind jeweils über den Balken markiert: \* P<0.05; \*\* P<0.01; \*\*\* P<0.001. Statistik siehe auch Abschnitt 2.2.6.12.

Abbildung 35 demonstriert eine signifikant reduzierte Lokomotion der jeweiligen Einzelmutanten *nra-2(tm2453)* und *ric3(md1181)* gegenüber Wildtyp in Flüssigkeit. Dabei weisen die *ric-3* Mutanten eine stärkere Lokomotionsdefizienz auf. Dies resultiert aus verminderter nAChR-Aktivität in den *ric-3* Mutanten, hervorgerufen durch Reduktion des Anteils aktiver nAChR an der neuromuskulären Postsynapse (Halevi et al., 2002).

Interessanterweise war die durchschnittliche Bewegungsrate der Doppelmutanten signifikant stärker reduziert im Vergleich zu der von Einzelmutanten. Dieses Ergebnis deutet darauf, dass die Proteine RIC-3 und NRA-2 die Aktivität der Rezeptoren in voneinander unabhängigen Signal-Transduktionswegen im ER beeinflussen. Damit stellen NRA-2 und NRA-4 eine Möglichkeit der Regulation von nAChR Aktivität neben dem RIC-3-Mechanismus dar.

### 3.5.2 NRA-2 beeinflusst die Zusammensetzung von nAChR Untereinheiten

Die Prozesse der Untereinheiten-Selektion und -Assemblierung sind bis heute ungeklärt. Eine Auswahl verschiedener Untereinheiten könnte zeitgleich im ER präsent sein. Über unbekannte Regulationsmechanismen werden die jeweils richtigen Untereinheiten in Rezeptoren eingebaut und an die Synapse transportiert. Ein Komplex aus NRA-2 und NRA-4 könnte in diesem Szenario eine Rolle in der

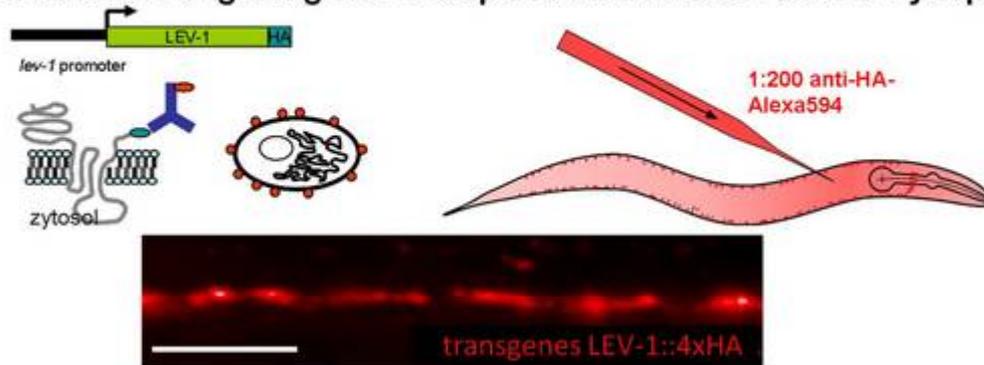
Regulation des Transports korrekt assemblierter N- und L-AChR vom ER an die Postsynapse spielen. Weiterhin wäre denkbar, dass dieser Komplex in der Auswahl der zum Einbau vorgesehenen Untereinheiten aus dem vorliegenden *Pool* beteiligt ist. Davon ausgehend könnte das Fehlen der Proteine in den *nra-2* bzw. *nra-4* Mutanten zu veränderten Rezeptorkompositionen in Mutanten und dadurch zu einer Veränderung der Rezeptoraktivität führen.

Diese Annahme wurde überprüft, indem der Anteil der bekannten L-AChR Untereinheiten LEV-1, UNC-38 und UNC-29 in synaptischen Levamisolrezeptoren von *nra-2*, *nra-4* Mutanten und Wildtyp quantifiziert und verglichen wurde.

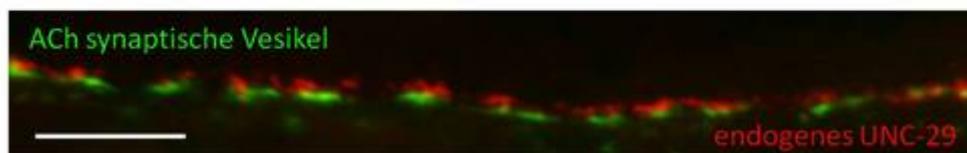
Die Quantifizierung der Untereinheiten in Rezeptoren an der Synapse erfolgte indirekt über die Messung der Fluoreszenzintensität nach immunchemischer Markierung von heterolog exprimierten Untereinheiten LEV-1 (C-terminal mit 4x HA Peptid markiert) und UNC-38 (C-terminal mit 3xMYC Peptid markiert- Material 2.1.6 und Methoden 2.2.6.17.1) bzw. der endogenen Untereinheit UNC-29 (Methoden 2.2.6.17.2).

Die Fluoreszenzmarkierung der heterolog exprimierten Untereinheiten erfolgte nach der von A. Gottschalk etablierten Methode der *in vivo* Injektion von fluoreszenzmarkierten Antikörpern zur Markierung extrazellulärer Proteine oder Proteinepitope in *C. elegans* (Gottschalk and Schafer, 2006). Zur Quantifizierung des Anteils der endogenen Untereinheit UNC-29 in synaptischen Rezeptoren von Mutanten und Wildtyp wurde der zuvor gereinigte Peptid-Antikörper verwendet. Vor dem Einsatz wurde dieser auf seine Spezifität in der Immunhistochemie untersucht (Methoden 2.2.6.17). Die Menge von UNC-29 an der Postsynapse wurde nach Doppelfärbung zu der ermittelten Menge des vesikulären Acetylcholintransporters UNC-17 (Alfonso et al., 1993) normalisiert, dessen Expression nicht von den Mutationen betroffen ist (Daten nicht gezeigt; Beispielfärbung: Abbildung 36 B). Dazu wurde eine Doppelfärbung von UNC-29 und UNC-17 in *nra-2* und *nra-4* Mutanten sowie Doppelmutanten durchgeführt.

### A: Quantifizierung exogener Rezeptoruntereinheiten an der Synapse



### B: Quantifizierung des endogenen synaptischen UNC-29 Proteins



**Abbildung 36: Methode zur Quantifizierung endogener und heterolog exprimierter Untereinheiten in *C. elegans*** (A) Schematische Darstellung der Methode am Beispiel der HA-markierten LEV- Untereinheit. Das extrazellulär exponierte Epitop (grün) kann durch Injektion eines fluoreszenzmarkierten Antikörpers (rot) Markiert werden. Beispielaufnahme am Fluoreszenzmikroskop. (B) Beispielaufnahme nach Markierung endogener Proteine UNC-17 (grün; Beispiel: ACh synaptische Vesikel) und UNC-29 (rot). Die Größenbalken entsprechen 10  $\mu\text{m}$ . Abbildung z. T adaptiert aus Gottschalk und Schafer 2006.

Die relative Fluoreszenz entlang der ventralen Nervenstränge zwischen Kopfregion und Vulva wurde bei allen Ansätzen quantifiziert und graphisch aufgetragen (siehe Abbildung 37).

Die Ergebnisse zeigen deutlich, dass die relative Menge der essentiellen  $\alpha$ -Untereinheit UNC-38 in beiden *nra-2* Mutanten, sowie in *nra-4* Mutanten signifikant reduziert gegenüber Wildtyp ist (siehe Abbildung 37, weiss). Auch in *nra-2(ok1731);nra-4(hd127)* Doppelmutanten war eine tendenziell verringerte Fluoreszenzintensität gegenüber Wildtyp messbar. Entsprechend konnte in *nra-4(hd127)* Mutanten eine Veränderung der relativen UNC-29-Menge beobachtet werden. Hier war jedoch interessanterweise ein signifikanter Anstieg im Vergleich zum Wildtyp messbar (siehe Abbildung 37, grau). Die relative Oberflächenmenge der nicht-essentiellen nicht- $\alpha$ -Untereinheit LEV-1 entlang der Synapsen blieb dabei unverändert in allen Mutanten gegenüber Wildtyp (siehe Abbildung 37, schwarz).

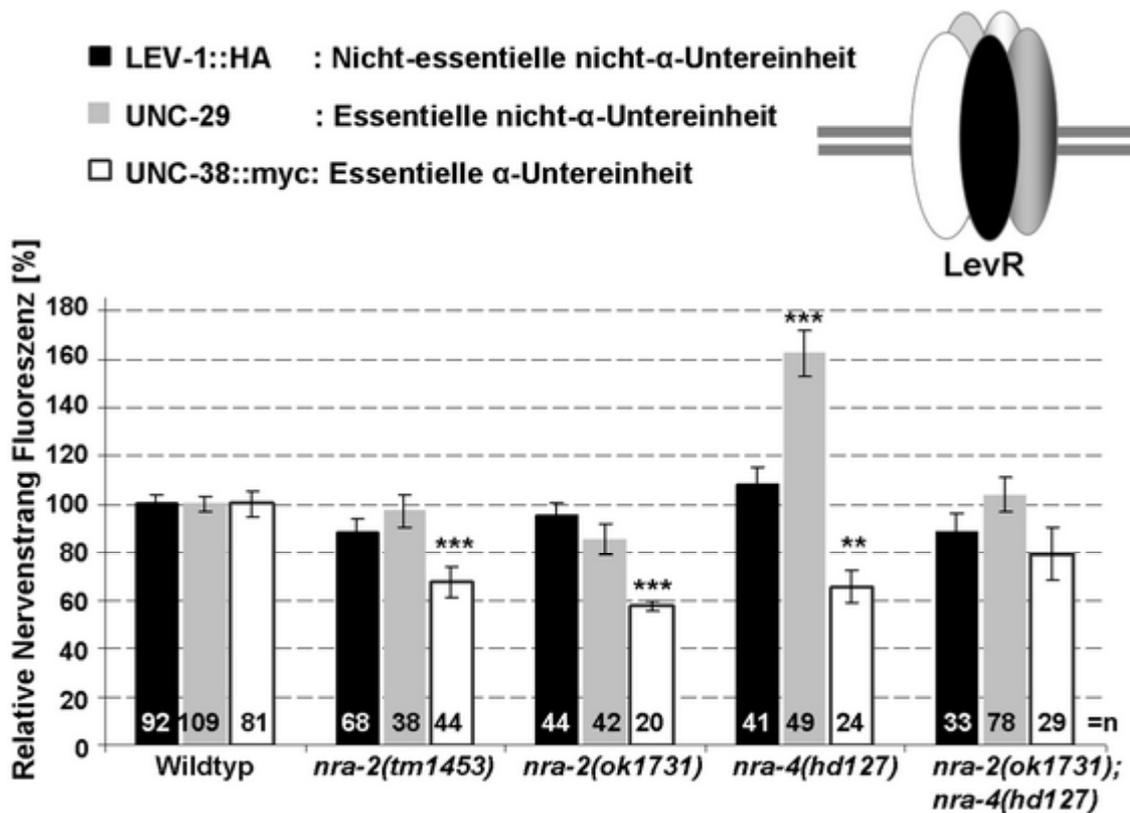


Abbildung 37: Die Mutation von *nra-2* bzw. *nra-4* hat unterschiedlichen Einfluss auf die synaptische Expression bestimmter L-AChR Untereinheiten. Die relative Menge von endogenen und exogen exprimierten Levamisolrezeptor Untereinheiten entlang der Nervenstränge wurde mittels Messung der Fluoreszenzintensität nach Immunmarkierung gemessen. Die Wildtypwerte wurden auf 100 gesetzt und die entsprechenden Mutanten auf den Wert normalisiert. Die Anzahl der getesteten Tiere (n) ist in den Balken angegeben. Statistisch signifikante Unterschiede zum Wildtyp sind markiert: \* P<0.05; \*\* P<0.01; \*\*\* P<0.001. Statistik siehe auch Abschnitt 2.2.6.12.

Diese Ergebnisse stützen die Hypothese, dass NRA-2 und NRA-4 die relative Zusammensetzung von L-ACh Rezeptoren Gen- und Allel-spezifisch beeinflussen. Die Proteine könnten zum Beispiel am Export von assemblierten Rezeptoren in einer Art Qualitätskontrolle beteiligt sein. So wäre eine veränderte Agonistsensitivität darüber zu erklären, dass unterschiedliche Populationen von Rezeptoren an der Oberfläche der Mutanten vorliegen - in diesem Fall zum Beispiel Rezeptoren mit mehr UNC-29 Untereinheiten in *nra-4(hd127)* und mit signifikant weniger UNC-38 Untereinheiten in *nra-2* und *nra-4* Mutanten. Die vorangegangenen Experimente deuten ausserdem auf eine Beteiligung von ACR-8 und ACR-13/LEV-8 hin. Basierend auf diesen Ergebnissen könnte der Einbau der zusätzlichen  $\alpha$ -Untereinheiten ACR-8 und ACR-13/LEV-8 in *nra-2* Mutanten die reduzierte Zahl von

UNC-38 Untereinheiten in assemblierten Rezeptoren ersetzen. Infolgedessen könnten nAChR Populationen auftreten, welche je nach Art und Anzahl der eingebauten ( $\alpha$ -) Untereinheiten eine veränderte Agonist- Bindungsaffinität und somit abweichende Rezeptoraktivität aufweisen.

Diese Annahme wurde mittels Quantifizierung der Untereinheiten ACR-8 und ACR-13/LEV-8 durch Injektion von fluoreszenzmarkierten Antikörpern nach Abschluss meiner praktischen Arbeit von A. Gottschalk bestätigt (Almedom et al., 2009). Hier zeigte sich dass der Anteil von ACR-8 in Rezeptoren an der Oberfläche in *nra-2(ok1731)* Mutanten signifikant erhöht war, während der Anteil der  $\alpha$ -Untereinheit UNC-38 signifikant reduziert ist. Die Funktion von NRA-2 hat also reziproken Einfluss auf die synaptische Expression von ACR-8 und UNC-38.

## 4 Diskussion

Das *C. elegans* Genom kodiert für die größte Zahl bekannter nAChR Gene. Das Genom bietet also potentiell die Grundlage für eine große Zahl von möglichen Untereinheitenkombinationen zu funktionalen nAChR Pentameren. Jedoch sind bis heute nur relativ wenig funktionale Rezeptor Subtypen bekannt. Ähnlich verhält es sich bei den neuronalen nAChR der Vertebraten. Auch hier wurden noch nicht viele funktionale neuronale nAChR Subtypen identifiziert, obwohl die Zahl der kodierten Untereinheiten für ihre mögliche Existenz spricht. Bei ihrer Untersuchung kommt hier erschwerend hinzu, dass manche Rezeptor Subtypen nur in bestimmten Zellen des Nervensystems exprimiert werden und viele verschiedene Rollen ausüben können.

In *C. elegans* Muskelzellen werden zwei der in *C. elegans* bekannten nAChR Subtypen exprimiert, der Levamisolrezeptor (L-AChR) und der Nikotinrezeptor (N-AChR), die sich pharmakologisch deutlich voneinander unterscheiden und deren Untereinheitenzusammensetzung weitestgehend aufgeklärt ist (Lewis et al., 1987a; Richmond and Jorgensen, 1999). Der Levamisol-insensitive N-AChR ist ein Homopentamer der Untereinheit ACR-16 (Francis et al., 2005; Touroutine et al., 2005) und der L-AChR ist ein Heteropentamer, bestehend aus den alternativen  $\alpha$ -Untereinheiten (UNC-38, UNC-63 und LEV-8) und den nicht- $\alpha$ -Untereinheiten (UNC-29 und LEV-1) (Brown et al., 2006; Fleming et al., 1997; Richmond and Jorgensen, 1999). Darüberhinaus wurden die zusätzlichen  $\alpha$ -Untereinheiten ACR-8 und ACR-12 mit den L-AChR Untereinheiten UNC-29 und LEV-1 co-isoliert (Gottschalk et al., 2005), wobei ACR-12 ausschließlich in Neuronen vorkommt (Jospin et al., 2009). Ausgehend von der Annahme, dass mehr als fünf L-AChR-Untereinheiten im *C. elegans* Muskel exprimiert werden, ist auf die Existenz weiterer, unbekannter L-AChR Subpopulationen mit unterschiedlicher Stöchiometrie zu schließen. Die exakte Untereinheitenzusammensetzung des an der neuromuskulären Synapse aktiven L-AChR ist bis heute nicht bekannt.

Der Reifung von funktionalen nAChR liegt offenbar ein komplexer Mechanismus zugrunde, der sowohl die gezielte Expression und Assemblierung von ausgesuchten Untereinheiten als auch den selektiven Oberflächentransport bestimmter Rezeptor-Subtypen, in Abhängigkeit von Entwicklungsstadium und Gewebe, reguliert (Kues et al., 1995; Witzemann et al., 1989). Die Identifikation von nAChR-assoziierten Proteinen stellt dabei einen wichtigen Schritt zur Aufklärung von Mechanismen dar, welche die synaptische Expression von Rezeptor-Subtypen kontrollieren.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Rolle der zwei Proteine NRA-2 und NRA-4 (NRA = *nicotinic receptor associated*) untersucht, die von A. Gottschalk in einer Tandem-Affinitäts-Aufreinigung mit dem L-AChR co-isoliert wurden (Gottschalk et al., 2005). Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die Proteine vermutlich einen Komplex im ER von Muskelzellen bilden und dort die Untereinheitenzusammensetzung von funktionalen nAChR an der postsynaptischen Membran der neuromuskulären Synapse beeinflussen (Almedom et al., 2009).

NRA-2 und NRA-4 sind evolutiv konservierte Transmembranproteine des Typs I, ohne bisher beschriebene Funktion in *C. elegans*. Die Analyse von genomischen Deletionsmutanten der Proteine zeigte, dass beide Mutanten signifikant resistent gegenüber den spezifischen cholinergen Agonisten Nikotin und Levamisol sind und deutliche Defekte in der Lokomotion im Vergleich zu Wildtyp Tieren aufweisen. Jedoch haben *nra-2* und *nra-4* Mutanten unveränderte Reaktionen auf GABAerge Agonisten, was auf ihren spezifischen Einfluss auf LGIC der nAChR-Subfamilie an der NMJ hindeutet.

Elektrophysiologische Ableitungen am Muskel bestätigten und erweiterten diese Beobachtungen. Der Levamisol- und der Nikotinrezeptor (L- und N- AChR) wiesen in *nra-2* und *nra-4* Mutanten veränderte Sensitivität gegenüber ihren endogenen und exogenen Agonisten auf. Bei isolierter Untersuchung der beiden nAChR Rezeptortypen im *nra-2*- bzw. *nra-4*-Mutantenhintergrund ließen sich signifikant reduzierte Einwärtsströme nach Applikation der jeweiligen Rezeptortyp-spezifischen Agonisten Levamisol (aktiviert L-AChR) und Nikotin (aktiviert N-AChR) messen. Das lässt auf reduzierte Aktivität des Levamisol- und des Nikotinrezeptors in *nra-2* bzw. *nra-4* Deletionsmutanten schließen.

Jedoch war die ACh-Sensitivität des L-AChR signifikant erhöht (in *acr-16;nra-2* Doppelmutanten) und auch die Aktivität des N-AChR in (in *unc-38;nra-2* Doppelmutanten) war tendenziell höher (Ergebnisse 3.4.1). Der zuvor in *nra-2*- bzw. *nra-4* Einzelmутanten gemessene ACh-induzierte Gesamtstrom könnte demnach durch Summierung der erhöhten ACh-induzierten Ströme beider Rezeptortypen zu erklären sein (Ergebnisse; Abschnitt 3.2.6). Demgegenüber ist es auch möglich, dass die erhöhten ACh-induzierten Ströme in *acr-16;nra-2* oder *unc-38;nra-2* eine Folge von kompensatorischen Veränderungen der Rezeptoraktivität sind. Durch die erhöhte ACh-Sensitivität des L-AChRs wird die fehlende Aktivität des N-AChR ausgeglichen oder kompensiert.

NRA-2 und NRA-4 haben demnach einen Einfluss auf die Aktivität von beiden bekannten nAChR an der NMJ von *C. elegans*. Interessanterweise zeigten *nra-2(ok1731);nra-4(hd127)* Doppelmutanten signifikant reduzierte Levamisol-induzierte Einwärtsströme, jedoch keine Reduktion der Nikotin-induzierten Ströme. Ein Hinweis auf eine potentiell unterschiedliche Wirkung der ER-ständigen Proteine auf die beiden Typen von nAChR. Die unterschiedlichen Kanaleigenschaften der zwei Rezeptortypen haben generell Unterschiede im Verhalten und in den elektrophysiologischen Phänotypen von Rezeptormutanten zur Folge. Beispielsweise desensitisiert der L-AChR deutlich langsamer als der N-AChR. Tatsächlich konnte in später durchgeführten Studien mittels Langzeit-Stimulation von cholinergen Neuronen in Channelrhodopsin-2 (ChR2)-exprimierenden Tieren (T. Schedletzky, J. Liewald) (Almedom et al., 2009) nachgewiesen werden, dass der unterschiedliche ACh-induzierte Strom von L-AChR in *nra-2* Mutanten auf eine Veränderung der Desensitisierungsrate zurückzuführen ist.

Prinzipiell können solche Agonist-spezifischen Veränderungen der funktionalen Eigenschaften des Rezeptors zwar auch auf veränderte posttranslationale Modifikationen zurückzuführen sein (Changeux et al., 1998; Changeux and Edelstein, 1998; Mishina et al., 1986; Swope et al., 1999; Wanamaker et al., 2003). Jedoch weisen die hier erbrachten Ergebnisse eher auf Agonist-spezifische Veränderungen der Funktionalität durch die Veränderung der Untereinheiten-Kompositionen und/oder einer daraus erfolgten Veränderung der Liganden-Bindungs-Affinität hin (Changeux

and Edelstein, 1998). In dieser Arbeit konnten wichtige Erkenntnisse anhand von Quantifizierung spezifischer Untereinheiten an der synaptischen Oberfläche ermittelt werden. So gelang es, einen deutlichen Zusammenhang zwischen Aktivitätsänderung und Untereinheitenkomposition, in Abhängigkeit von NRA-2 und NRA-4, herzustellen.

Die Ergebnisse zeigen eine signifikante Änderung der Untereinheitenzusammensetzung von synaptisch exprimierten L-AChR Pentameren in *nra-2* oder *nra-4* Einzel- und Doppelmутanten. Zusätzlich ließ sich die mögliche Präsenz von weiteren, pharmakologisch unterschiedlichen L-AChR Subtypen mit abweichender Stöchiometrie an der neuromuskulären Membran nachweisen. Die synaptische Menge der essentiellen  $\alpha$ -Untereinheit UNC-38 in *nra-2* Mutanten war signifikant reduziert, während die synaptische Menge der nicht-essentiellen  $\alpha$ -Untereinheit ACR-8 erhöht war. Das könnte damit zu erklären sein, dass die ACR-8-Untereinheit, bei Abwesenheit des NRA-2/NRA-4-Komplexes, alternativ an Stelle von UNC-38 in funktionale Pentamere eingebaut wird. Diese Hypothese wird durch die vollständige Reversion des Paralyse-Phänotyps von *nra-2*-Mutanten durch Mutation von *acr-8* gestützt. Im Umkehrschluss ist NRA-2 im ER von Wildtypieren möglicherweise dafür verantwortlich, alternative Untereinheiten, so wie ACR-8 bei der Rezeptor-Assemblierung aus funktionalen Pentameren herauszuhalten, um somit die Bildung des Wildtyprezeptors zu ermöglichen.

Basierend auf diesen Ergebnissen lassen sich für NRA-2 und NRA-4 in *C. elegans* zwei mögliche Wirkungsmechanismen postulieren: (i) Der Komplex von NRA-2 und NRA-4 könnte die Auswahl und Bereitstellung der korrekten Untereinheiten zur Assemblierung eines funktionalen Pentamers innerhalb des ER regulieren. (ii) Dieser Komplex lässt aus bereits vorhandenen ER-ständigen Subtypen, nur diejenigen Pentamere zum Weitertransport zu, die jeweils in der Zelle benötigt werden.

Während die Mechanismen, welche die Lokalisation von nAChR an der postsynaptischen Membran regulieren relativ gut untersucht sind (Sanes and Lichtman, 2001) ist über die Regulation der gezielten Expression und Assemblierung von bestimmten Untereinheiten vergleichsweise wenig bekannt. Einen wichtigen

Schritt zur Aufklärung der Mechanismen stellt die Identifikation von nAChR-assoziierten Proteinen dar, welche die synaptische Expression von Rezeptor-Subtypen kontrollieren. Auf Basis dieser Ergebnisse können diese Proteine wichtige Funktionen bei der Reifung der Rezeptoren im ER von *C. elegans* übernehmen. Möglicherweise bieten sie einen Einblick in das bisher wenig erforschte Gebiet der Assemblierung spezifischer Kombinationen von Untereinheiten zu multimeren Ionenkanälen.

#### 4.1 Genomische Deletionsmutanten : *nra-2* und *nra-4*

Für die Experimente dieser Arbeit wurden genomische *nra-2* bzw. *nra-4*-Deletionsmutanten entweder vom Caenorhabditis Genetics Center (*cgc*) bezogen oder in Zusammenarbeit mit Harald Hutter (Simon Fraser University, Kanada) isoliert. Mittels PCR und nach anschließender Sequenzierung konnten die deletierten Regionen in den Mutanten genau bestimmt werden und erlaubten Rückschlüsse auf die Expression der dort verbleibenden Proteinabschnitte.

*Nra-2*- bzw. *nra-4*-Mutanten weisen übereinstimmende sowie unterschiedliche Phänotypen auf. Während in in Agonist-induzierten Rezeptoraktivitäts Assays vergleichbare Reaktionen zu beobachten sind, haben *nra-4(hd127)* Mutanten im Gegensatz zu *nra-2(ok1731)* Mutanten erhöhte UNC-29-Expressionsmengen an der Synapse. Zudem ist die Lokomotion in Flüssigkeit nicht reduziert. Diese Beobachtungen entsprechen nicht eindeutig den Erwartungen, gemäß der postulierten Funktion der Proteine als Komplex im ER mit Einfluss auf die Rezeptor-Aktivität.

Die unterschiedlichen Effekte lassen sich eventuell dadurch erklären, dass es sich bei *nra-4(hd127)* wahrscheinlich nicht um eine Nullmutation handelt. Das erste Exon und ein Teil des Promotors sind durch die Mutation deletiert. Die fehlenden Sequenzen und führen zu einer Beeinträchtigung oder verhindern sogar die Transkription des Proteins. Allerdings sind in *C. elegans* kryptische Promotoranteile aktiv, die auch hier wirksam sein könnten (Goetinck and Waterston, 1994; Leung-Hagesteijn et al., 1992). Trotz fehlender Sequenzanteile des Promotors und des ersten Exons könnte die Transkription in *nra-4* Mutanten eingeleitet werden. Zudem existiert ein alternatives START Codon in der *nra-4* Sequenz, welches ebenfalls zur Transkription genutzt werden könnte. Das bietet gute Voraussetzungen für die Expression eines verkürzten

Proteins mit Hilfe kryptischer Promotoranteile in den *nra-4(hd127)* Mutanten. Es ist demnach denkbar, dass in *hd127* Mutanten ein verkürztes Protein produziert wird, welches wegen der fehlenden Signalsequenz eine veränderte Topologie aufweist (siehe Ergebnisse, Abschnitt 3.1.2). Über die genaue Auswirkung, die das Fehlen der Signalsequenz auf das exprimierte Protein hat sowie über die Funktionalität des putativen Restproteins, lässt sich allerdings nur spekulieren.

Auch die vorliegenden *nra-2* Mutanten *ok1731* und *tm1453* könnten noch Restproteine exprimieren (siehe Ergebnisse, Abschnitt 3.1.1). In Anbetracht dessen erweist sich die Interpretation der Verhaltensweisen von Einzel- und vor allem Doppelmutanten als schwierig. In beiden genomischen Deletionsmutanten sind Abschnitte der luminalen, transmembranen und cytosolischen Domäne des Gens betroffen. Die hier exprimierten und verkürzten Proteine werden wahrscheinlich sezerniert oder nach Retention im ER degradiert (Siehe Ergebnisse, Abschnitt 3.1.1).

Ausgehend davon, dass in den *nra-2* bzw. *nra-4* Mutanten tatsächlich Proteinteile exprimiert werden, die in das ER sezerniert werden, oder aber eine veränderte Topologie in der ER Membran aufweisen wäre eine Interaktion mit nAChR Untereinheiten durchaus noch denkbar. Die gemeinsam ausgeübte Funktion kann somit teilweise erhalten bleiben.

Die Phänotypen der genomischen Mutanten decken sich mit denen nach RNAi. Allerdings kann auch bei einer RNA Interferenz nie von einem vollständigen Abbau aller Transkripte ausgegangen werden, also auch nicht von einem vollständigen Fehlen des Proteins. Die Effekte der Depletion nach RNAi sowie der Deletion/Insertion nach genomischer Mutation sind demnach wahrscheinlich abgeschwächte Phänotypen, die aus reduzierter, aber nicht völlig ausgelöschter Proteinfunktion resultieren.

Tatsächlich konnte nach Abschluss meiner Arbeit in nachfolgenden Studien mittels RT-PCR ein verkürztes Transkript ohne Exon 1 in *nra-4(hd127)* Mutanten bestätigt werden (C. Schultheis). Allerdings gibt das noch keinen Aufschluss darüber, ob und in welchen Geweben daraus ein funktionales Protein exprimiert wird. Weiterführende Expressions- und Interaktionsstudien mit Hilfe von sequenzspezifischen Antikörpern in Wildtyp Tieren und Deletionsmutanten sollten Aufschluss über die zur Interaktion und Funktion relevanten Sequenz- und Proteinanteile geben können.

Die teilweise voneinander abweichenden Phänotypen der *nra-2* und *nra-4* Mutanten könnten außerdem auf zusätzliche, voneinander unabhängige Funktionen der Proteine hinweisen. In Übereinstimmung mit dieser Annahme exprimiert der Promotor für *nra-4* außer im Muskel auch in anderen Geweben und Zelltypen.

## 4.2 NRA-2/NRA-4 im Vergleich mit den Homologen Nicalin/Nomo

### 4.2.1 Funktionaler Vergleich der Proteinkomplexe

Die Proteinkomplexe NRA-2/NRA-4 und Nicalin/Nomo wurden erstmals in verschiedenen Organismen und in unterschiedlichem Kontext beschrieben.

Nicalin und Nomo interagieren in *Danio rerio* und sind Antagonisten eines speziellen TGF- $\beta$  Signalwegs (Haffner and Haass, 2004). Die Autoren postulierten einen Effekt des Nicalin/Nomo Komplexes auf Rezeptoren für TGF- $\beta$  ähnliche Liganden. Der Komplex könnte dabei an Cripto oder andere Membran-assoziierte Co-Rezeptoren oder Inhibitoren binden. Auf diese Weise antagonisiert er die Aktivität der heterodimeren Typ I und Typ II Activin Rezeptoren indirekt über Gegenspieler (Gray et al., 2003). Durch ihr Wirken im ER könnten Nicalin und Nomo auch die Sekretion oder Zelloberflächenexpression von TGF- $\beta$  Antagonisten regulieren (Haffner et al., 2007; Haffner et al., 2004). Ein Zusammenhang der vertebraten Proteine mit nAChR Rezeptoren in Zebrafisch wurde bisher nicht untersucht, ist demnach auch nicht auszuschließen. Es stellt sich die Frage, ob und inwieweit die Funktion der Proteine evolutionär konserviert ist.

Den Ergebnissen zufolge stellen die heterologe Expression des *C. elegans* Proteins in humanen Zell-Linien sowie die Expression humaner Nicalin cDNA in *C. elegans* einen Anhaltspunkt für eine potentiell konservierte Proteinfunktion dar. Bei beiden heterologen Expressionen lokalisierten beide Proteine im ER. NRA-2::GFP co-Lokalisiert dabei mit dem ER-Marker DsRED in HeLa Zellen. Allerdings ist zu bedenken auch transgener Überexpression eines Proteins hier zur Akkumulation im ER führen kann.

In nachfolgenden Agonist-induzierten Paralyse-Experimenten liess sich jedoch zusätzlich darlegen, dass die Expression von humanem Nicalin in *nra-2* Mutanten den

Defekt in der cholinergen Neurotransmission teilweise wiederherstellt (Gottschalk et al., 2005) was wiederum für eine konservierte Proteinfunktion spricht.

Dieses Ergebnis deutet auf eine zusätzliche Funktion des Vertebraten-Komplexes Nicalin/Nomo bei der Regulation von nAChR hin. Dabei ist es allerdings wahrscheinlicher, dass der Komplex in Neuronen agiert, da diese im Gegensatz zu Skelettmuskeln eine Vielzahl verschiedener Untereinheiten exprimieren (Corringer et al., 2000; Ortells and Lunt, 1995; Sargent, 1993; Sgard et al., 2002). Hier könnten Immuno-histochemische Untersuchungen mit folgender Tandem-Affinitäts-Aufreinigung des Nicalin/Nomo-Komplexes aus neuronalem Gewebe (beispielsweise Rattenhirn) helfen, mögliche Interaktionen von Nicalin und Nomo mit neuronalen nAChR Untereinheiten aufzudecken.

Die partielle Reversion des *nra-2*-induzierten Defekts cholinerg Neurotransmission durch transgene Expression von humanem Nicalin kann aber auch auf eine Implikation von TGF- $\beta$  Signalwegen an der Postsynapse von *C. elegans* hindeuten. Überstimmend mit dieser Hypothese konnte postsynaptischem TGF- $\beta$  in *Drosophila* eine Rolle bei der Formation der neuromuskulären Synapse zugeschrieben werden. Der zugrunde liegende Signalweg ist dabei auf eine bisher nicht beschriebene Weise an die Aktivität des Muskels gekoppelt (Dudu et al., 2006; Rawson et al., 2003). Prinzipiell wäre es also möglich, dass NRA-2 und NRA-4, entsprechend ihren Zebrafisch Homologen, auch in *C. elegans* die TGF- $\beta$  Aktivität beeinflussen und so indirekt die nAChR Aktivität verändern.

UNC-129 ist das einzige bisher beschriebene Protein des TGF- $\beta$  Signalwegs mit Funktionen im Nervensystem (Colavita et al., 1998). Wie jedoch innerhalb dieser Arbeit gezeigt werden konnte, hat die Mutation von *unc-129* im Gegensatz zur *nra-2* Mutation keinen Einfluss auf die cholinerge Neurotransmission (siehe Ergebnisse, Abschnitt 3.2.2, 3.2.5, 3.2.6). Eine potentielle Beteiligung weiterer untersuchter TGF- $\beta$  Mutanten wie z.B. *dbl-1*, welches den GABA<sub>A</sub> Signalweg an der NMJ beeinflusst (Vashlishan et al., 2008), konnte ebenfalls in anschließenden Agonist-induzierten Paralyse Assays ausgeschlossen werden (A.Gottschalk).

Es bleibt unwahrscheinlich, dass veränderte TGF- $\beta$  Signalwege den Phänotyp von *nra-2* Mutanten in *C. elegans* erwirken. Die direkte co-Isolation der hier untersuchten

Proteine NRA-2 und NRA-4 mit nAChR Untereinheiten (Gottschalk et al., 2005) deutet zusätzlich auf einen TGF- $\beta$ -unabhängigen Effekt auf die cholinerge Neurotransmission hin.

Eine Implikation von zwei bisher nicht untersuchten, zusätzlich im *C.elegans* Genom kodierten TGF- $\beta$  Liganden bei der cholinergen Neurotransmission kann nicht ausgeschlossen werden (Savage-Dunn, 2005).

#### 4.2.2 Einfluss der Lokalisation und Expression auf die Funktionalität

Die Vertebraten Homologen Nicalin und Nomo wurden erstmals im ER von Zebrafisch beschrieben (Haffner et al., 2004). Im Einklang mit ihren Homologen lokalisieren und agieren die *C. elegans* Proteine NRA-2 und NRA-4 nachweislich im gleichen Kompartiment, dem ER. Ihr evolutiv konserviertes ER-Retentionssignal wirkt auch bei heterologer Expression in HeLa Zellen (siehe Ergebnisse 3.1.1 und 3.1.2). In nachfolgenden Bimolekularen Komplementations-Assays (BiFC) wies A. Gottschalk eine physikalische Interaktion von NRA-2 und NRA-4 im ER von *C. elegans* nach (Almedom et al., 2009). Die subzelluläre Lokalisation des NRA-2/NRA-4 –Komplexes und ihren Homologen Nicalin/Nomo ist demnach zwischen Invertebraten und Vertebraten konserviert.

Studien mit N-terminal HA-markiertem NRA-2::GFP zeigten geringe Mengen des transgenen Proteins an der Zelloberfläche (A. Gottschalk) (Gottschalk and Schafer, 2006). Die N-terminal HA-markierten NRA-2::GFP Fusionsproteine lassen sich verstreut, außerhalb der synaptischen Endigungen lokalisieren. Diese Regionen sind allerdings irrelevant für die cholinerge Neurotransmission an der NMJ. Der Nachweis von transgen exprimiertem HA::NRA-2::GFP an der Plasmamembran ist vermutlich ein Artefakt der Überexpression des Proteins. Dabei könnte eine Teilmenge des gebildeten Fusionsproteins fälschlicherweise in Transportvesikel zur Plasmamembran verpackt und erst im Zuge des Vesikelrecyclings in das innere der Zelle zurückgeführt werden.

Nicalin/Nomo und NRA-2/NRA-4 agieren zwar in unterschiedlichen Signalwegen, trotzdem könnte ihre Interaktion im Komplex ähnlich sein. Haffner und Kollegen

wiesen einen Zusammenhang zwischen der Reduktion der Nicalin-Expressionsmengen und einer Reduktion der Nomo Expression nach (Haffner et al., 2007; Haffner et al., 2004). Entsprechend ist eine gegenseitige Abhängigkeit der Expressionsmenge von NRA-2- und NRA-4 denkbar. Dadurch erfolgt eine gegenseitige Stabilisierung beider Proteine durch die Komplexbildung.

Einen Hinweis darauf bietet die Herstellung transgener Tiere mit rekombinatem *nra-2* oder *nra-4*. Die Injektion geringer DNA-Mengen (5ng/μl bzw. 2ng/μl) war erforderlich, um die Expression des Transgens in Wildtyp und Mutanten zu gewährleisten bzw. die Aggregation des Proteins innerhalb der Zellen zu verhindern. Möglicherweise deutet das auf eine Dosis-Abhängigkeit der Proteinfunktion und/oder auf einen dominant –negativen Effekt hin, der bei zu hoher Expression des Proteins zu Aggregatsbildung oder Degradation führt.

Zur genaueren Untersuchung des Zusammenhangs zwischen der Lokalisation, Funktion und Expression der endogenen Proteine, in Abhängigkeit des jeweiligen Bindungspartners, bedarf es allerdings spezifischer Antikörper. Diese standen im Laufe dieser Arbeit nicht zur Verfügung (siehe Methoden 2.2.5.4, Herstellung und Überprüfung spezifischer Peptid-Antikörper).

Mit der Klonierung der ER-luminalen Sequenzen des *nra-2* bzw. *nra-4* Gens in *E. coli* Expressionsvektoren wurde in dieser Arbeit bereits ein erster und wichtiger Schritt zur Herstellung domänenspezifischer Antikörper eingeleitet (Siehe Abschnitt 2.1.6 und 2.2.2; Plasmide und Klonierungen). Mit Hilfe solcher Antikörper wird es in weiterführenden Experimenten möglich sein, genauere Aussagen über Struktur-Funktions-Zusammenhänge von Wildtyp und Mutantenproteinen zu treffen.

### **4.3 Aktivität von nAChR-auf der Ebene einzelner Kanäle**

Elektrophysiologische Messungen nach Applikation von Levamisol und Acetylcholin auf der Ebene einzelner Kanäle wurden von C. Bouzat durchgeführt und sollten die von J. Liewald nach der *whole-cell* Methode erbrachten Ergebnisse bestätigen und vertiefen (Rayes et al., 2007). *Whole-cell*-Studien am adulten Muskel wiesen bei isolierter Untersuchung des L-AChRs in *nra-2* Mutanten die Reduktion von

Levamisol-induzierten Strömen nach. Dagegen waren die Acetylcholin-induzierten Ströme erhöht.

Ebenfalls bestätigten Analysen einzelner Kanäle am embryonischen Muskel die Veränderung funktionaler Eigenschaften des L-AChR, in Abhängigkeit der Mutation von *nra-2*. Die signifikante Abnahme der Kanal-Öffnungszeiten und ein Rückgang der Öffnungswahrscheinlichkeiten von L-AChR nach Applikation von Levamisol entsprachen den Ergebnissen der *whole-cell voltage clamp* Messungen am adulten Muskel. Die dabei gemessenen reduzierten Levamisol-induzierten Ströme korrelieren also mit den Messungen an einzelnen Kanälen des embryonalen Muskels.

Die Einzelkanal-Analyse zeigte aber auch eine Reduktion der Kanal-Öffnungsfrequenz nach ACh Applikation. Das lässt erwarten, dass die ACh induzierten Einwärtsströme in adulten Muskelzellen von Mutanten ebenfalls verringert sind. Hier wurden jedoch erhöhte ACh-induzierte Ströme gemessen. Interessanterweise war in Einzelkanalstudien auch eine Verlängerung der Offenzeiten in Mutanten in Reaktion auf ACh messbar. Dies könnte eine mögliche Erklärung für diese Diskrepanz als auch für die erhöhten ACh-induzierten Ströme in adulten *nra-2* Mutanten darstellen. Die reduzierte Häufigkeit von Kanalöffnungen könnte dabei durch verlängerte Offenzeiten der Kanäle kompensiert werden. In der Summe ergäbe sich dann, wie tatsächlich im *whole-cell*-Ansatz gemessen, eine Erhöhung des ACh-induzierten Stroms an der NMJ.

Durch Langzeit-Ausschüttung von ACh mit Hilfe des Licht-induzierbaren Ionenkanals Channelrhodopsin-2 (ChR-2) konnten Liu und Jorgensen deutlich zeigen, dass der L-AChR und der N-AChR unterschiedliche Desensitisierungskinetiken aufweisen. Während Nikotinrezeptoren (gemessen an *unc-38* Mutanten) schnell und vollständig desensitisierten, zeigten Levamisolrezeptoren (gemessen an *acr-16* Mutanten) langsame Desensitisierungsraten (Liu et al., 2009). Ähnlich konnte in weiterführenden Experimenten von T. Schedletzky und J. Liewald gezeigt werden, dass Licht-induzierte Langzeit-Ausschüttung von ACh am adulten Muskel von *nra-2* Mutanten längere Desensitisierungsraten des L-AChR an der postsynaptischen Membran erzielte (Almedom et al., 2009; Liewald et al., 2008). Entsprechend könnte die reduzierte

Frequenz von Kanalöffnungen in *nra-2* Mutanten ein Resultat der *nra-2*-induzierten L-AChR Desensibilisierung sein.

Die Einzelkanalstudien bestätigen also die Änderung der funktionalen Eigenschaften des L-AChR in *nra-2* Mutanten und deuten auf Agonist-spezifische Veränderungen der Rezeptorkinetik hin.

Es bleibt allerdings zu beachten, dass die Ergebnisse aus embryonalen Muskelzellen nicht direkt mit *whole-cell* Messungen des adulten Muskels zu vergleichen sind. In embryonalen Muskelzellen von *C. elegans* werden ebenfalls sieben L-AChR Untereinheiten exprimiert, von denen fünf Untereinheiten das funktionale L-AChR Pentamer bilden (Fox et al., 2007). Die Stöchiometrie des embryonalen Rezeptors ist allerdings noch nicht aufgeklärt und könnte sich von der des Rezeptor-Subtyps im adulten Muskel unterscheiden. Ebenso könnten sich im Laufe der Entwicklung die mit den Rezeptoren interagierenden Proteine, welche Einfluss auf seine Oberflächenverteilung, Expression und Funktion haben ändern. Beispielsweise setzt erst nach der Innervierung der Muskelzelle das *Clustering* von nAChR an der Synapse und damit die Interaktion mit Proteinen wie LEV-10 ein (Gally et al., 2004).

Einzelkanal Messungen zeigten schließlich eine Rezeptor-Population im embryonalen Muskel von *nra-2* Mutanten. Diese wiesen nachweislich veränderte kinetische Eigenschaften gegenüber Wildtyp auf. Möglicherweise hat NRA-2 bereits im frühen Entwicklungsstadium des *C. elegans* Muskels einen Einfluss auf die Aktivität von Rezeptoren, die durch Beeinflussung ihrer Zusammensetzung vermittelt werden könnte. Die Rezeptor Assemblierung im ER ohne funktionales NRA-2 Protein könnte zur Bildung verschiedener Subtypen führen und damit derartige abweichende kinetische Eigenschaften induzieren.

#### **4.4 Regulation der Untereinheitenzusammensetzung von synaptischen nAChR**

Wie bereits beschrieben hat die Mutation von *nra-2* und *nra-4* Einfluss auf die cholinerge Neurotransmission an der Synapse. Dieser Effekt betrifft offenbar beide Typen von nAChR an der NMJ von *C. elegans* und führt sogar zur Veränderung der Agonist-Sensitivität. Die Funktion des neuen Proteinkomplexes entfaltet sich dabei im

ER von *C. elegans* Muskelzellen, wo er die Aktivität von Rezeptoren an der Oberfläche beeinflusst.

Der größte Teil der Prozesse die der Reifung von funktionalen nAChR unterliegen erfolgt im ER (Anderson and Blobel, 1981; Merlie et al., 1981; Merlie and Sebbane, 1981; Merlie et al., 1982; Smith et al., 1987), dem Ort der Lokalisation des NRA-2/NRA-4 Komplexes. Wie bereits in der Einleitung beschrieben unterliegen die nAChRs und andere LGICs bei der Reifung strengen Qualitätskontrollen und anderen Regulationsmechanismen. Durch Kontrolle der Assemblierung und Reifung der nAChR im ER könnte die Repräsentation der Zahl und des Typs von Rezeptoren an der Oberfläche beeinflusst werden und so auch ihre Funktionalität bzw. die cholinerge Neurotransmission an der Postsynapse (Merlie and Lindstrom, 1983). Es stellt sich die Frage wodurch die Selektion der zum Einbau verwendeten Untereinheiten reguliert wird.

#### **4.4.1 Einfluss der Verfügbarkeit von Untereinheiten auf die Pentamer-Stöchiometrie**

Am Beispiel von neuronalen nAChR konnte gezeigt werden, dass bereits die Verfügbarkeit bestimmter Untereinheiten im ER gegenüber anderen ihre Repräsentation in einem Pentamer beeinflussen kann. Bei der Untersuchung von  $\alpha 4$  und  $\beta 2$  Untereinheiten in *Xenopus* Oozyten änderte sich Stöchiometrie der Untereinheiten im funktionalen Pentamer in Abhängigkeit des Verhältnisses der  $\alpha 4$  und  $\beta 2$  Untereinheiten im Pool. Dies konnte durch transgene Expression zusätzlicher akzessorischer Untereinheiten bestätigt werden. Auf diese Weise konnte das Auftreten von Rezeptor-Subtypen mit veränderter Agonist-Affinität und sogar einem veränderten pharmakologischem Profil induziert werden (Kuryatov et al., 2008; Moroni and Bermudez, 2006; Tapia et al., 2007; Zwart and Vijverberg, 1998). Auch in *Ascaris suum* waren zwei funktionale, pharmakologisch unterschiedliche Subtypen nach heterologer Expression von nAChR Untereinheiten nachweisbar. Die Stöchiometrie dieser Subtypen war abhängig vom Verhältnis der zwei injizierten Untereinheitentypen (Williamson et al., 2009). Interessanterweise sind diese Untereinheiten Homologe von UNC-38 und UNC-29 aus *C. elegans*. Im Gegensatz zu den *C. elegans* Proteinen, reichen diese zwei Untereinheiten allerdings zur Bildung

funktionaler L-AChR-Homologer Rezeptoren aus, ohne weitere Untereinheiten und/oder zusätzliche Faktoren zu benötigen. Durch die Verfügbarkeit der Untereinheiten und über deren Expressionmenge kann also ihr Einbau in das funktionale Rezeptorpentamer reguliert und die finale Stöchiometrie festgelegt werden (Boulin et al., 2008; Culetto et al., 2004; Fleming et al., 1997; Williamson et al., 2009). Es scheint, dass die Untereinheiten dabei um den Einbau im Pentamer konkurrieren. Der Anteil bestimmter Untereinheiten in einem Pentamer kann also zumindest zum Teil über die Kontrolle der Expressionsmengen einer einzelnen Untereinheit beeinflusst werden. Dabei ist es natürlich unerlässlich, dass die jeweiligen Untereinheiten in einem Pentamer kompatible Oberflächen haben (siehe auch Abschnitt 1.1.3, Assemblierung von Rezeptoren).

Die Assemblierung von Rezeptoren entsprechend der Verfügbarkeit ihrer Untereinheiten im ER ist aber nicht völlig unabhängig von zusätzlichen Regulationsmechanismen. Beispielsweise bindet das Protein Ubiquilin-1 in Vertebraten nach Aktivierung durch Nikotin-induzierte Mechanismen an neuronalen  $\alpha 3$  oder  $\alpha 4$  nAChR Untereinheiten und führt diese der Degradation im Proteasom zu. So wird die Verfügbarkeit bestimmter Untereinheiten im Pool durch zusätzliche Faktoren reduziert und der Einbau anderer vorhandener Untereinheiten gefördert (Ficklin et al., 2005). Darüber hinaus gibt es jedoch kaum Anhaltspunkte über Proteine, welche in diese Regulation der Assemblierung involviert sein könnten.

#### **4.4.2 Einfluss von NRA-2 und NRA-4 auf die Assemblierung von verfügbaren Untereinheiten im ER**

Anhand von Studien mit nAChR *knock-out* Mäusen untersuchten David et al. die Untereinheitenzusammensetzung von heteropentameren nAChR im *Ganglion cervicale superius* (oberes Halsganglion). Die heteropentameren Rezeptoren am oberen Halsganglion bestehen aus den Untereinheiten  $\alpha 3$ ,  $\alpha 5$ ,  $\beta 2$ , und  $\beta 4$ , welche zu Rezeptor-Subtypen mit verschiedenen funktionalen Eigenschaften assemblieren (Mandelzys et al., 1995; Mao et al., 2006; McGehee and Role, 1995; Putz et al., 2008). Interessanterweise zeigten funktionale Studien an  $\beta 4$  *knock-out* Mäusen, dass die Neurotransmission zwischen Ganglien auch bei Fehlen der  $\beta 4$ -Untereinheit unverändert bleibt, obwohl die Zahl der Rezeptoren an der Oberfläche abnimmt. Das

---

Fehlen der Untereinheit wird vermutlich durch die Bildung alternativer Rezeptor-Subtypen mit veränderter Aktivität kompensiert (David et al., 2010).

Analog dazu könnte auch in *C. elegans* das Fehlen bestimmter Rezeptoruntereinheiten möglicherweise durch den Einbau von alternativen Untereinheiten kompensiert werden und so die Rezeptoraktivität erhalten. NRA-2 und NRA-4 könnten bei den hier zugrundeliegenden Mechanismen der Regulation des Assemblierungsprozesses eine Rolle spielen: In Mutanten mit fehlenden L-AChR Untereinheiten könnten die beiden Proteine die Wahrscheinlichkeit für die Substitution durch bestimmte  $\alpha$  – Untereinheiten in ein funktionales Pentamer reduzieren, während sie die für den Einbau anderer fördern. Da die Zahl und der Typ von  $\alpha$ -Untereinheiten in einem Rezeptor auch seine Spezifität und Sensitivität gegenüber den Liganden beeinflusst, würde das in *nra-2* und *nra-4* Mutanten die veränderten funktionalen Eigenschaften der Rezeptoren an der Oberfläche zur Folge haben. So liessen sich auch die Phänotypen erklären, die nach ACh-Applikation in *nra-2* und *nra-4* Deletionsmutanten in *C. elegans* zu beobachten waren: In Abwesenheit von NRA-2/NRA-4 werden also Rezeptore-Subtypen an die Oberfläche transportiert, die sich von denen im Wildtyp durch ihre Untereinheiten Komposition und entsprechend in ihren pharmakologischen Eigenschaften unterscheiden (siehe Abschnitt 3.5.2.).

Mehrere Untereinheiten können gleichzeitig im ER vorliegen und einander substituieren bzw. miteinander um eine Stelle im Pentamer kompetieren (Fox et al., 2007; Gottschalk et al., 2005). Ausgehend von dieser Annahme, wäre es denkbar, dass Subtypen mit variierender Zahl und Typen von  $\alpha$ -Untereinheiten in Rezeptoren assembliert werden können (Williamson et al., 2009). Im Falle des L-AChR in *C. elegans* wurden 5 verschiedene  $\alpha$ -Untereinheiten (UNC-63, UNC-38, ACR-8, LEV-8 und ACR-12) mit nicht- $\alpha$ -Untereinheiten UNC-29 und LEV-1 co-isoliert (Gottschalk et al., 2005). Deletion der essentiellen Untereinheiten (UNC-29, UNC-38 und UNC-63) induziert vollständige Resistenz gegenüber Levamisol. Es ist denkbar, dass die weiteren zwei verfügbaren Plätze im Pentamer von einer der nicht-essentiellen Untereinheiten (LEV-8, ACR-8, LEV-1) eingenommen werden können. Das deutet auf mögliche funktionale Redundanz innerhalb der nAChR Untereinheiten Familie hin. Tatsächlich hat beispielsweise UNC-38 eine zusätzliche, nicht-essentielle Rolle

innerhalb einer DMPP-sensitiven neuronalen nAChR Population und ist dabei Teil eines Heteropentamers unbekannter Zusammensetzung (Ruaud and Bessereau, 2006). Ähnlich ist die Untereinheit LEV-8 nicht essentieller Teil des L-AChR Pentamers, und die *lev-8* Deletionsmutanten zeigen entsprechend nur schwache Resistenz gegenüber Levamisol. Theoretisch könnten andere  $\alpha$ -Untereinheiten das Fehlen von LEV-8 im Pentamer kompensieren (Towers et al., 2005). Tatsächlich bilden die  $\alpha$ -Untereinheiten der nAChR in *Ascaris suum* bei Expression in *Xenopus* Oozyten funktionale Rezeptoren mit variierender Stöchiometrie und pharmakologischen Eigenschaften, in Abhängigkeit der Verfügbarkeit von Untereinheiten im ER aus (Williamson et al., 2009).

Diese Kompensationen, bzw. Substitutionen können jedoch nicht willkürlich sein sondern müssen bestimmten Regeln unterliegen, welche sicherstellen, dass die gebildeten Subtypen erforderlich und funktional sind. Die Assemblierung unterliegt also Regulationsmechanismen, welche ein Zusammenspiel aus (i) Bindungsaffinitäten von Untereinheiten zueinander sein können, (ii) von Zellstadium, Zelltyp und anderen variablen abhängen und/oder (iii) zusätzlichen Kontrollen durch einflussnehmende Proteine unterliegen. Diese Protein-vermittelten Kontrollen können als Qualitätskontrolle agieren und den selektiven Transport korrekt assemblierter Rezeptoren an die Oberfläche kontrollieren oder aber gerichtet die Assemblierung und Substitution bzw. Selektion von Untereinheiten für ein Pentamer lenken. Die subzellulären Prozesse, welche zur Assemblierung der korrekten Untereinheiten nötig sind, und diese anpassen lassen sich allerdings nicht vollständig anhand der heute bekannten Mechanismen und Proteine erklären.

Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten auf einen bisher unbekanntem Regulationsmechanismus mit Beteiligung des ER-Komplexes NRA-2/NRA-4, welcher mit hoher Wahrscheinlichkeit am gerichteten Einbau bestimmter Untereinheiten in das funktionale Pentamer beteiligt ist.

#### **4.4.3 Protein-vermittelte Assemblierungs-Kontrolle**

Die Wahl der richtigen Untereinheiten und der richtigen Stöchiometrie ist wichtig für die Funktionalität eines Rezeptors. Die große Vielfältigkeit von nAChR sowohl in

Struktur, Funktion und Eigenschaften wird über ihrer Assemblierung kontrolliert. Bis heute gibt es dennoch nur wenige Informationen über Proteine, welche diese Prozesse kontrollieren und regulieren.

Proteine mit Funktion im Reifungsprozess von nAChR haben die Fähigkeit einen Einfluss auf die Zahl sowie den Typ der synaptisch exprimierten Populationen auszuüben. Bisher ist nur ein Protein beschrieben worden, welches den Reifungsprozess und nachweislich auch die Zusammensetzung von Untereinheiten im ER, sowie ihre Expression an der Synapse beeinflussen kann. Das ER-residente Protein RIC-3 hat eine essentielle Funktion bei der Reifung von nAChR in *C. elegans* und anderen Spezies und ist in Struktur und Funktion hochkonserviert. In *C. elegans* konnte der Einfluss des Proteins auf die Stöchiometrie von Rezeptoren gezeigt werden. So induzierte RIC-3 bei co-Expression die Erhöhung der DEG-3 Expression an der Synapse, während das Protein die Reduktion des Einbaus der DES-2 Untereinheit in den funktionalen Rezeptor förderte. Diese Veränderung der Stöchiometrie in DEG-3/DES-2 Rezeptoren hat wiederum die Veränderung ihrer funktionalen Eigenschaften zur Folge gehabt (Cohen Ben-Ami et al., 2009). Es wird vermutet dass dieses ER-Transmembranprotein verschiedene Konformationen annehmen kann und so mit unterschiedlichen Rezeptoren und Untereinheiten interagiert und auch ihre Assemblierung unterschiedlich reguliert (Biala et al., 2009; Cohen Ben-Ami et al., 2009; Halevi et al., 2002; Halevi et al., 2003; Lansdell et al., 2005).

Im Gegensatz zu RIC-3 sind NRA-2 und NRA-4 nicht essentiell für die Assemblierung von nAChR Rezeptoren. Die hier beschriebenen Ergebnisse deuten stattdessen darauf, dass die Einflüsse von NRA-2 und NRA-4 auf die nAChR-Aktivität RIC-3-unabhängigen Mechanismen unterliegen und somit einen bisher unbekanntem Weg der Kontrolle und Regulation von Rezeptor-Reifung und –Assemblierung beschreiben.

#### **4.5 Das Modell**

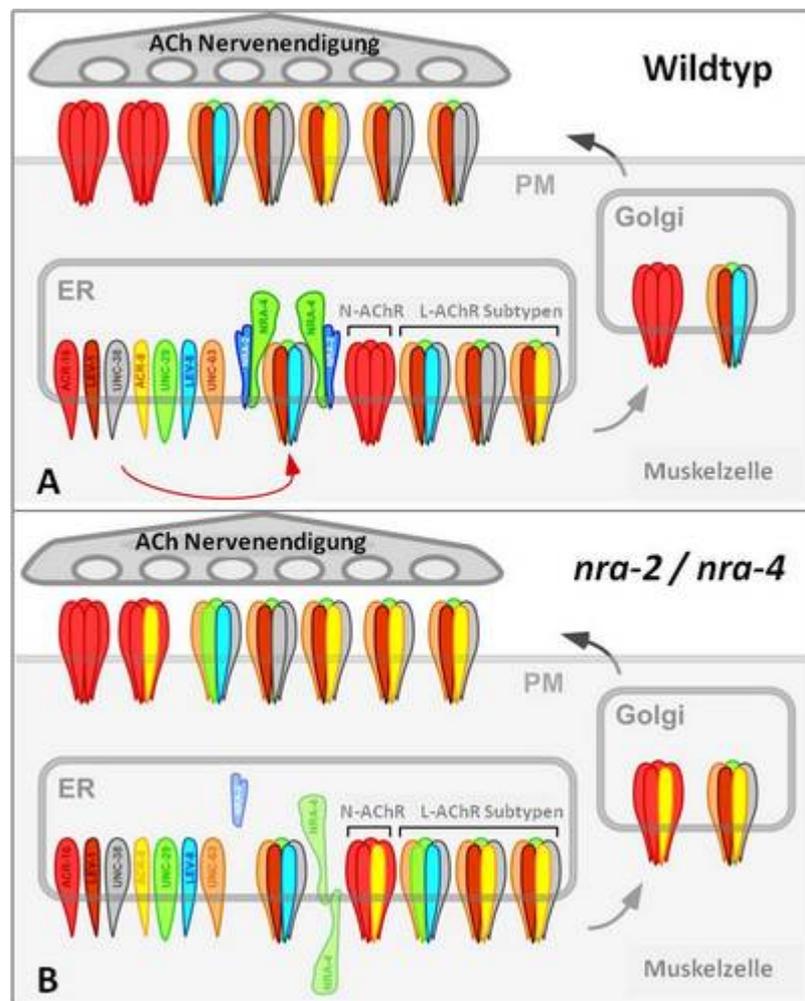
Innerhalb dieser Arbeit wurde mit NRA-2 und NRA-4 erstmals ein Komplex identifiziert, der unabhängig von RIC-3 die Selektion von Untereinheiten für Reife N- und L-nAChR im ER reguliert und als Komplex mit potentiell konservierter Funktion

in der Assemblierungskontrolle von nAChR-Untereinheiten wirkt. Neben der Wahl des exprimierten Subtyps (z.B L- oder N-AChR) stellt die Wahl der  $\alpha$ - und nicht- $\alpha$ -Untereinheiten im reifen nAChR Pentamer eine Möglichkeit zur Kontrolle der cholinergen Neurotransmission dar. Der Komplex beeinflusst nicht nur nachweislich die Aktivität beider Rezeptoren, sondern ist auch für den Einbau der „richtigen“  $\alpha$ - und nicht- $\alpha$ -Untereinheiten in das funktionale Pentamer verantwortlich. Auf diese Weise könnte er auf der Ebene der Assemblierung im ER die Funktion von Rezeptoren über die Kontrolle der Stöchiometrie beeinflussen.

Anhand der Ergebnisse dieser Arbeit wird somit die Existenz eines bisher unbekanntem Regulationsmechanismus mit Beteiligung des ER-Komplexes aus NRA-2, NRA-4 und möglicherweise anderen Proteinen als Kontrollinstanz im ER postuliert. Dieser Komplex vermittelt die Rekrutierung und den selektiven Einbau bestimmter nAChR-Untereinheiten in das funktionale Pentamer bzw. verhindert den Einbau anderer Untereinheiten. Dieser Komplex könnte entsprechend den Funktionen des vertebreten NRA-2-Homologen Nicastrin im Gamma Sekretase Komplex, als „Türsteher“ agieren (De Strooper, 2005): (i) Vollständig oder partiell assemblierte Rezeptoren werden gebunden und zum Weitertransport an ER *Exit Sites* freigegeben oder (ii) einzelne Untereinheiten werden rekrutiert (bzw. andere ausgeschlossen) und möglicherweise mit Hilfe von RIC-3 in das funktionale Pentamer eingebaut (siehe Abbildung 38). In Übereinstimmung mit dieser Hypothese werden Untereinheiten mit veränderter Zusammensetzung vermehrt in Mutanten von NRA-2 und NRA-4 gefunden. Die Proteine sind möglicherweise auch in anderen Zellen und möglicherweise auch unterschiedlichen Entwicklungsstadien für die synaptische Expression der korrekten Untereinheiten zuständig, ohne dabei essentiell für die Lokalisation der Rezeptoren an der Synapse zu sein (Almedom et al., 2009).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der Reifungsprozess die Eigenschaften von Rezeptoren (Expression, Funktion, Pharmakologie) beeinflussen kann, und zwar sowohl durch Repräsentation bestimmter Rezeptor Subtypen an der synaptischen Oberfläche, als auch durch Veränderung der Untereinheiten Stöchiometrie in funktionalen Rezeptoren an der Oberfläche (wahrscheinlich beeinflusst durch NRA-2 und NRA-4). Gegenwärtig gibt es neben der hier postulierten Hypothese keine

Anhaltspunkte für eine andere Kontrollinstanz innerhalb der Zelle bzw. des endoplasmatischen Retikulums, welche die Selektion von Untereinheiten während der Rezeptor-Reifung reguliert. Die hier gezeigten Resultate bilden einen ersten Hinweis auf einen solchen Regulationsmechanismus im *C.elegans* Muskel, der einen Komplex der evolutionär konservierten Proteine NRA-2 und NRA-4 im ER involviert.



**Abbildung 38: Hypothetisches Modell der Funktion von NRA-2/NRA-4 in *C. elegans*.** NRA-2 und NRA-4 regulieren die cholinerge Neurotransmission durch Veränderung der nAChR-Subtyp-Repräsentation oder der Untereinheiten Komposition an der synaptischen Oberfläche. Die Proteine agieren bei der Reifung der nAChR auf der Ebene der Assemblierung, wo sie den Einbau bestimmter Untereinheiten in das funktionale Pentamer kontrollieren. Alternativ könnten bereits assemblierte Populationen vorliegen, welche vor dem Weitertransport an die Oberfläche eine (Qualitäts-) Kontrolle aus NRA-2/NRA4 durchlaufen müssen. Die erste Hypothese ist die effizienteste, da hierdurch keine unnötigen Pentamer-Populationen im ER gebildet werden und stellt somit das favorisierte Modell dieser Arbeit dar. Abbildung adaptiert aus (Almedom et al., 2009).

#### 4.6 Ausblick

Die vorliegende Arbeit charakterisiert die direkte Interaktion zwischen den membranständigen Proteinen NRA-2 und NRA-4 und dem Levamisolrezeptor in *C. elegans*. Mit Hilfe fluoreszenzmikroskopischer Untersuchungen konnte überexprimiertes NRA-2 im ER von *C. elegans* detektiert werden. Dort co-lokalisiert es mit Levamisolrezeptor Untereinheiten. Nach Abschluss meiner Arbeit konnte die direkte physikalische Interaktion außerdem durch BIFC-Studien bewiesen werden (A. Gottschalk).

Zur genaueren Untersuchung des Zusammenhangs zwischen der Lokalisation, Funktion und Expression der endogenen Proteine in Abhängigkeit der An- und Abwesenheit des jeweiligen Bindungspartners bedarf es allerdings spezifischer Antikörper, welche im Laufe dieser Arbeit nicht zur Verfügung standen. Durch den Einsatz domänenspezifischer Antikörper und trunkierter NRA-2 bzw. NRA-4 Proteine in einem Co-Präzipitationsexperiment ist es außerdem möglich die Regionen des Proteins zu identifizieren, welche zur Interaktion relevant sind. Diese Antikörper könnten ebenfalls zur Analyse der putativen der Restproteine in *nra-2* und *nra-4* Mutanten eingesetzt werden und die teils widersprüchlichen Reaktionen der Mutanten, z.B. in Lokomotions Assays erklären. Dies wäre ein interessanter Ansatz für die Zukunft, welcher tiefere Einblicke in das Zusammenspiel von Struktur und Funktion der beteiligten Akteure geben könnte.

Weiterhin wurde innerhalb dieser Arbeit die Beteiligung von NRA-2 und NRA-4 an der korrekten Assemblierung von Levamisol- und vermutlich Nikotinrezeptoren im ER von *C. elegans* demonstriert. Der genaue Mechanismus ihres Einflusses bleibt jedoch unklar. Es wird postuliert, dass die Proteine eine Rolle bei der Selektion und Freigabe der zur Assemblierung vorgesehenen Untereinheiten haben. Entsprechend der Funktion von Nicastrin ist eine Rolle von NRA-2/NRA-4 in einem MultiproteinKomplex denkbar. Dabei ist eine Interaktion mit den bekannten Proteinen zur Reifung von nAChR möglich (ER-Chaperone, UNC-50, etc.). Mittels Co-IP oder TAP Studien lassen sich zusätzliche Interaktionspartner für die beiden ER-Proteine identifizieren, welche Aufschluss über die beteiligten Proteine im putativen Komplex geben können. Auf diese Weise ist es beispielsweise möglich die Interaktion

endogener Rezeptoruntereinheiten mit NRA-2 und NRA-4 zu bestätigen. Die Identifikation dieser Proteine durch Interaktionsstudien mit Hilfe spezifischer Antikörper wird einen großen Beitrag zur Auflösung des zugrundeliegenden Mechanismus darstellen.

Heterologe Expression aller fünf L-AChR Untereinheiten (*unc-38*, *unc-29*, *unc-63*, *lev-1* and *lev-8*) sowie der zusätzlichen Proteine RIC-3, UNC-50 und UNC-74 ermöglichte die Rekonstitution eines voll funktionsfähigen Rezeptors in *Xenopus* Oozyten (Boulin et al., 2008). RIC-3, UNC-50 und UNC-74 sind Proteine des ER und des Golgi-Apparats mit Funktionen in der Biogenese von nAChR in *C. elegans* (Eimer et al., 2007; Halevi et al., 2002). In einem weiterführenden Ansatz wäre es interessant zusätzlich die hier untersuchten alternativen L-AChR Untereinheiten ACR-8 und ACR-13/LEV-8 (Almedom et al., 2009; Gottschalk et al., 2005) in *Xenopus* zu exprimieren. Dieser Ansatz bietet eine hervorragende Möglichkeit die Bildung funktionaler Subtypen aus einem *pool* möglicher Untereinheiten mit und ohne Co-Expression von NRA-2/NRA-4 zu untersuchen. Gemäß dem hier postulierten Modell ist zu erwarten, dass die Präsenz des ER-Komplexes die Bildung von zusätzlichen Subtyp-Populationen verhindert. Im Umkehrschluss sollten ohne NRA-2/NRA-4 Rezeptor Populationen mit unterschiedlicher Pharmakologie zu finden sein.

Die Untersuchung der Funktion der vertebraten Homologen von NRA-2 und NRA-4 schließt den Kreis zu den hier erbrachten Erkenntnissen am invertbraten neurobiologischen Modell. Zum Beispiel bieten Studien an *knock out* Mäusen für Nicalin und Nomo einen Weg: Hier lässt sich die Konservierung der Prozesse direkt durch Untersuchen möglicher Defekte in der Funktion neuronaler nAChR testen.

---

## 5 Literaturverzeichnis

- Albertson, D.G., and Thomson, J.N. (1976). The pharynx of *Caenorhabditis elegans*. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 275, 299-325.
- Alfonso, A., Grundahl, K., Duerr, J.S., Han, H.P., and Rand, J.B. (1993). The *Caenorhabditis elegans* *unc-17* gene: a putative vesicular acetylcholine transporter. *Science* 261, 617-619.
- Almedom, R.B., Liewald, J.F., Hernando, G., Schultheis, C., Rayes, D., Pan, J., Schedletzky, T., Hutter, H., Bouzat, C., and Gottschalk, A. (2009). An ER-resident membrane protein complex regulates nicotinic acetylcholine receptor subunit composition at the synapse. *EMBO J* 28, 2636-2649.
- Anderson, D.J., and Blobel, G. (1981). In vitro synthesis, glycosylation, and membrane insertion of the four subunits of Torpedo acetylcholine receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78, 5598-5602.
- Anglade, E., and Whitcup, S.M. (1995). The diagnosis and management of uveitis. *Drugs* 49, 213-223.
- Anglade, P., Hirsch, E.C., Brandel, J.P., Javoy-Agid, F., Duyckaerts, C., Hauw, J.J., and Agid, Y. (1993). Adrenal transplant, dopaminergic neurons, and Parkinson's disease. *Ann Neurol* 33, 662-663.
- Avery, L., and Horvitz, H.R. (1990). Effects of starvation and neuroactive drugs on feeding in *Caenorhabditis elegans*. *J Exp Zool* 253, 263-270.
- Ballivet, M., Alliod, C., Bertrand, S., and Bertrand, D. (1996). Nicotinic acetylcholine receptors in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *J Mol Biol* 258, 261-269.
- Bamber, B.A., Beg, A.A., Twyman, R.E., and Jorgensen, E.M. (1999). The *Caenorhabditis elegans* *unc-49* locus encodes multiple subunits of a heteromultimeric GABA receptor. *J Neurosci* 19, 5348-5359.
- Bamber, B.A., Richmond, J.E., Otto, J.F., and Jorgensen, E.M. (2005). The composition of the GABA receptor at the *Caenorhabditis elegans* neuromuscular junction. *Br J Pharmacol* 144, 502-509.
- Barbagallo, B., Prescott, H.A., Boyle, P., Climer, J., and Francis, M.M. (2010). A dominant mutation in a neuronal acetylcholine receptor subunit leads to motor neuron degeneration in *Caenorhabditis elegans*. *J Neurosci* 30, 13932-13942.
- Bargmann, C.I. (1998). Neurobiology of the *Caenorhabditis elegans* genome. *Science* 282, 2028-2033.
- Barnard, E.A., Coates, V., Dolly, J.O., and Mallick, B. (1977). Binding of alpha-bungarotoxin and cholinergic ligands to acetylcholine receptors in the membrane of skeletal muscle. *Cell biology international reports* 1, 99-106.
- Beg, A.A., and Jorgensen, E.M. (2003). EXP-1 is an excitatory GABA-gated cation channel. *Nat Neurosci* 6, 1145-1152.
- Ben-Ami, H.C., Yassin, L., Farah, H., Michaeli, A., Eshel, M., and Treinin, M. (2005). RIC-3 affects properties and quantity of nicotinic acetylcholine receptors via a mechanism that does not require the coiled-coil domains. *J Biol Chem* 280, 28053-28060.
- Bencherif, M., and Lukas, R.J. (1993). Cytochalasin modulation of nicotinic cholinergic receptor expression and muscarinic receptor function in human TE671/RD cells: a possible functional role of the cytoskeleton. *J Neurochem* 61, 852-864.
- Bermudez, I., and Moroni, M. (2006). Phosphorylation and function of alpha4beta2 receptor. *J Mol Neurosci* 30, 97-98.
- Bertrand, D. (2002). Neuronal Nicotinic Acetylcholine Receptors and Epilepsy. *Epilepsy Curr* 2, 191-193.

- Biala, Y., Liewald, J.F., Ben-Ami, H.C., Gottschalk, A., and Treinin, M. (2009). The conserved RIC-3 coiled-coil domain mediates receptor-specific interactions with nicotinic acetylcholine receptors. *Mol Biol Cell* *20*, 1419-1427.
- Bierer, L.M., Haroutunian, V., Gabriel, S., Knott, P.J., Carlin, L.S., Purohit, D.P., Perl, D.P., Schmeidler, J., Kanof, P., and Davis, K.L. (1995). Neurochemical correlates of dementia severity in Alzheimer's disease: relative importance of the cholinergic deficits. *J Neurochem* *64*, 749-760.
- Blaxter, M. (1998). *Caenorhabditis elegans* is a nematode. *Science* *282*, 2041-2046.
- Blount, P., and Merlie, J.P. (1989). Molecular basis of the two nonequivalent ligand binding sites of the muscle nicotinic acetylcholine receptor. *Neuron* *3*, 349-357.
- Blount, P., and Merlie, J.P. (1990). Mutational analysis of muscle nicotinic acetylcholine receptor subunit assembly. *J Cell Biol* *111*, 2613-2622.
- Blount, P., and Merlie, J.P. (1991). BIP associates with newly synthesized subunits of the mouse muscle nicotinic receptor. *J Cell Biol* *113*, 1125-1132.
- Borges, L.S., Yechikhov, S., Lee, Y.I., Rudell, J.B., Friese, M.B., Burden, S.J., and Ferns, M.J. (2008). Identification of a motif in the acetylcholine receptor beta subunit whose phosphorylation regulates rapsyn association and postsynaptic receptor localization. *J Neurosci* *28*, 11468-11476.
- Boulin, T., Gielen, M., Richmond, J.E., Williams, D.C., Paoletti, P., and Bessereau, J.L. (2008). Eight genes are required for functional reconstitution of the *Caenorhabditis elegans* levamisole-sensitive acetylcholine receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* *105*, 18590-18595.
- Boyd, R.T. (1997). The molecular biology of neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Crit Rev Toxicol* *27*, 299-318.
- Brenner, S. (1974). The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* *77*, 71-94.
- Brenner, S. (2009). In the beginning was the worm. *Genetics* *182*, 413-415.
- Brown, L.A., Jones, A.K., Buckingham, S.D., Mee, C.J., and Sattelle, D.B. (2006). Contributions from *Caenorhabditis elegans* functional genetics to antiparasitic drug target identification and validation: nicotinic acetylcholine receptors, a case study. *Int J Parasitol* *36*, 617-624.
- Bruggmann, D., Lips, K.S., Pfeil, U., Haberberger, R.V., and Kummer, W. (2002). Multiple nicotinic acetylcholine receptor alpha-subunits are expressed in the arterial system of the rat. *Histochem Cell Biol* *118*, 441-447.
- Burden, S.J., DePalma, R.L., and Gottesman, G.S. (1983). Crosslinking of proteins in acetylcholine receptor-rich membranes: association between the beta-subunit and the 43 kd subsynaptic protein. *Cell* *35*, 687-692.
- Cassada, R.C., and Russell, R.L. (1975). The dauerlarva, a post-embryonic developmental variant of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol* *46*, 326-342.
- Castelan, F., Mulet, J., Aldea, M., Sala, S., Sala, F., and Criado, M. (2007). Cytoplasmic regions adjacent to the M3 and M4 transmembrane segments influence expression and function of alpha7 nicotinic acetylcholine receptors. A study with single amino acid mutants. *J Neurochem* *100*, 406-415.
- Castillo, M., Mulet, J., Gutierrez, L.M., Ortiz, J.A., Castelan, F., Gerber, S., Sala, S., Sala, F., and Criado, M. (2006). Role of the RIC-3 protein in trafficking of serotonin and nicotinic acetylcholine receptors. *J Mol Neurosci* *30*, 153-156.
- Chalfie, M., Sulston, J.E., White, J.G., Southgate, E., Thomson, J.N., and Brenner, S. (1985). The neural circuit for touch sensitivity in *Caenorhabditis elegans*. *J Neurosci* *5*, 956-964.
- Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W.W., and Prasher, D.C. (1994). Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* *263*, 802-805.
- Chang, W., Gelman, M.S., and Prives, J.M. (1997). Calnexin-dependent enhancement of nicotinic acetylcholine receptor assembly and surface expression. *J Biol Chem* *272*, 28925-28932.

- Changeux, J.P. Nicotine addiction and nicotinic receptors: lessons from genetically modified mice. *Nat Rev Neurosci* *11*, 389-401.
- Changeux, J.P., Bertrand, D., Corringer, P.J., Dehaene, S., Edelstein, S., Lena, C., Le Novere, N., Marubio, L., Picciotto, M., and Zoli, M. (1998). Brain nicotinic receptors: structure and regulation, role in learning and reinforcement. *Brain Res Brain Res Rev* *26*, 198-216.
- Changeux, J.P., and Edelstein, S.J. (1998). Allosteric receptors after 30 years. *Neuron* *21*, 959-980.
- Chen, B.L., Hall, D.H., and Chklovskii, D.B. (2006). Wiring optimization can relate neuronal structure and function. *Proc Natl Acad Sci U S A* *103*, 4723-4728.
- Chou, J.H., Bargmann, C.I., and Sengupta, P. (2001). The *Caenorhabditis elegans* odr-2 gene encodes a novel Ly-6-related protein required for olfaction. *Genetics* *157*, 211-224.
- Christensen, M., Estevez, A., Yin, X., Fox, R., Morrison, R., McDonnell, M., Gleason, C., Miller, D.M., 3rd, and Strange, K. (2002). A primary culture system for functional analysis of *C. elegans* neurons and muscle cells. *Neuron* *33*, 503-514.
- Christianson, J.C., and Green, W.N. (2004). Regulation of nicotinic receptor expression by the ubiquitin-proteasome system. *EMBO J* *23*, 4156-4165.
- Clark, S.G., Lu, X., and Horvitz, H.R. (1994). The *Caenorhabditis elegans* locus lin-15, a negative regulator of a tyrosine kinase signaling pathway, encodes two different proteins. *Genetics* *137*, 987-997.
- Cohen Ben-Ami, H., Biala, Y., Farah, H., Elishevitz, E., Battat, E., and Treinin, M. (2009). Receptor and subunit specific interactions of RIC-3 with nicotinic acetylcholine receptors. *Biochemistry* *48*, 12329-12336.
- Colavita, A., Krishna, S., Zheng, H., Padgett, R.W., and Culotti, J.G. (1998). Pioneer axon guidance by UNC-129, a *C. elegans* TGF-beta. *Science* *281*, 706-709.
- Conroy, W.G., and Berg, D.K. (1995). Neurons can maintain multiple classes of nicotinic acetylcholine receptors distinguished by different subunit compositions. *J Biol Chem* *270*, 4424-4431.
- Corringer, P.J., Le Novere, N., and Changeux, J.P. (2000). Nicotinic receptors at the amino acid level. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* *40*, 431-458.
- Corsi, A.K. (2006). A biochemist's guide to *Caenorhabditis elegans*. *Anal Biochem* *359*, 1-17.
- Coussen, F., Perrais, D., Jaskolski, F., Sachidhanandam, S., Normand, E., Bockeaert, J., Marin, P., and Mulle, C. (2005). Co-assembly of two GluR6 kainate receptor splice variants within a functional protein complex. *Neuron* *47*, 555-566.
- Cox, G.N., Kusch, M., DeNevi, K., and Edgar, R.S. (1981a). Temporal regulation of cuticle synthesis during development of *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol* *84*, 277-285.
- Cox, G.N., Kusch, M., and Edgar, R.S. (1981b). Cuticle of *Caenorhabditis elegans*: its isolation and partial characterization. *J Cell Biol* *90*, 7-17.
- Culetto, E., Baylis, H.A., Richmond, J.E., Jones, A.K., Fleming, J.T., Squire, M.D., Lewis, J.A., and Sattelle, D.B. (2004). The *Caenorhabditis elegans* unc-63 gene encodes a levamisole-sensitive nicotinic acetylcholine receptor alpha subunit. *J Biol Chem* *279*, 42476-42483.
- Cully, D.F., Vassilatis, D.K., Liu, K.K., Parens, P.S., Van der Ploeg, L.H., Schaeffer, J.M., and Arena, J.P. (1994). Cloning of an avermectin-sensitive glutamate-gated chloride channel from *Caenorhabditis elegans*. *Nature* *371*, 707-711.
- Dai, Z., and Peng, H.B. (1998). Fluorescence microscopy of calcium and synaptic vesicle dynamics during synapse formation in tissue culture. *Histochem J* *30*, 189-196.
- Dani, J.A., and Bertrand, D. (2007). Nicotinic acetylcholine receptors and nicotinic cholinergic mechanisms of the central nervous system. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* *47*, 699-729.
- Dani, J.A., and De Biasi, M. (2001). Cellular mechanisms of nicotine addiction. *Pharmacol Biochem Behav* *70*, 439-446.

- Dani, J.A., Jenson, D., Broussard, J.I., and De Biasi, M. Neurophysiology of Nicotine Addiction. *J Addict Res Ther* *51*.
- Darlison, M.G., Pahal, I., and Thode, C. (2005). Consequences of the evolution of the GABA(A) receptor gene family. *Cell Mol Neurobiol* *25*, 607-624.
- David, R., Ciuraszkiewicz, A., Simeone, X., Orr-Urtreger, A., Papke, R.L., McIntosh, J.M., Huck, S., and Scholze, P. (2010). Biochemical and functional properties of distinct nicotinic acetylcholine receptors in the superior cervical ganglion of mice with targeted deletions of nAChR subunit genes. *Eur J Neurosci* *31*, 978-993.
- De Strooper, B. (2005). Nicastrin: gatekeeper of the gamma-secretase complex. *Cell* *122*, 318-320.
- Del Castillo, J. (1968). On the nature of synaptic receptors. *J Am Oil Chem Soc* *45*, 313-324.
- Del Castillo, J., De Mello, W.C., and Morales, T. (1967). The initiation of action potentials in the somatic musculature of *Ascaris lumbricoides*. *J Exp Biol* *46*, 263-279.
- Devillers-Thiery, A., Galzi, J.L., Eisele, J.L., Bertrand, S., Bertrand, D., and Changeux, J.P. (1993). Functional architecture of the nicotinic acetylcholine receptor: a prototype of ligand-gated ion channels. *J Membr Biol* *136*, 97-112.
- Dresbach, T., Qualmann, B., Kessels, M.M., Garner, C.C., and Gundelfinger, E.D. (2001). The presynaptic cytomatrix of brain synapses. *Cell Mol Life Sci* *58*, 94-116.
- Dudu, V., Bittig, T., Entchev, E., Kicheva, A., Julicher, F., and Gonzalez-Gaitan, M. (2006). Postsynaptic mad signaling at the *Drosophila* neuromuscular junction. *Curr Biol* *16*, 625-635.
- Edwards, M.K., and Wood, W.B. (1983). Location of specific messenger RNAs in *Caenorhabditis elegans* by cytological hybridization. *Dev Biol* *97*, 375-390.
- Eimer, S., Gottschalk, A., Hengartner, M., Horvitz, H.R., Richmond, J., Schafer, W.R., and Bessereau, J.L. (2007). Regulation of nicotinic receptor trafficking by the transmembrane Golgi protein UNC-50. *EMBO J* *26*, 4313-4323.
- Epstein, H.F., and Thomson, J.N. (1974). Temperature-sensitive mutation affecting myofilament assembly in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* *250*, 579-580.
- Feng, G., Steinbach, J.H., and Sanes, J.R. (1998). Rapsyn clusters neuronal acetylcholine receptors but is inessential for formation of an interneuronal cholinergic synapse. *J Neurosci* *18*, 4166-4176.
- Feng, X.P., Hayashi, J., Beech, R.N., and Prichard, R.K. (2002). Study of the nematode putative GABA type-A receptor subunits: evidence for modulation by ivermectin. *J Neurochem* *83*, 870-878.
- Ficklin, M.B., Zhao, S., and Feng, G. (2005). Ubiquilin-1 regulates nicotine-induced up-regulation of neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *J Biol Chem* *280*, 34088-34095.
- Fire, A. (1986). Integrative transformation of *Caenorhabditis elegans*. *EMBO J* *5*, 2673-2680.
- Fire, A., Kondo, K., and Waterston, R. (1990). Vectors for low copy transformation of *C. elegans*. *Nucleic Acids Res* *18*, 4269-4270.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E., and Mello, C.C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* *391*, 806-811.
- 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., *et al.* (1997). *Caenorhabditis elegans* levamisole resistance genes *lev-1*, *unc-29*, and *unc-38* encode functional nicotinic acetylcholine receptor subunits. *J Neurosci* *17*, 5843-5857.
- Forsayeth, J.R., Gu, Y., and Hall, Z.W. (1992). BiP forms stable complexes with unassembled subunits of the acetylcholine receptor in transfected COS cells and in C2 muscle cells. *J Cell Biol* *117*, 841-847.
- Fox, R.M., Watson, J.D., Von Stetina, S.E., McDermott, J., Brodigan, T.M., Fukushige, T., Krause, M., and Miller, D.M., 3rd (2007). The embryonic muscle transcriptome of *Caenorhabditis elegans*. *Genome Biol* *8*, R188.

- Francis, M.M., Evans, S.P., Jensen, M., Madsen, D.M., Mancuso, J., Norman, K.R., and Maricq, A.V. (2005). The Ror receptor tyrosine kinase CAM-1 is required for ACR-16-mediated synaptic transmission at the *C. elegans* neuromuscular junction. *Neuron* *46*, 581-594.
- Francis, M.M., Mellem, J.E., and Maricq, A.V. (2003). Bridging the gap between genes and behavior: recent advances in the electrophysiological analysis of neural function in *Caenorhabditis elegans*. *Trends Neurosci* *26*, 90-99.
- Freedman, R., Coon, H., Myles-Worsley, M., Orr-Urtreger, A., Olincy, A., Davis, A., Polymeropoulos, M., Holik, J., Hopkins, J., Hoff, M., *et al.* (1997). Linkage of a neurophysiological deficit in schizophrenia to a chromosome 15 locus. *Proc Natl Acad Sci U S A* *94*, 587-592.
- Froehner, S.C. (1991). The submembrane machinery for nicotinic acetylcholine receptor clustering. *J Cell Biol* *114*, 1-7.
- Gally, C., Eimer, S., Richmond, J.E., and Bessereau, J.L. (2004). A transmembrane protein required for acetylcholine receptor clustering in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* *431*, 578-582.
- Gelman, M.S., Chang, W., Thomas, D.Y., Bergeron, J.J., and Prives, J.M. (1995). Role of the endoplasmic reticulum chaperone calnexin in subunit folding and assembly of nicotinic acetylcholine receptors. *J Biol Chem* *270*, 15085-15092.
- Gengyo-Ando, K., Kamiya, Y., Yamakawa, A., Kodaira, K., Nishiwaki, K., Miwa, J., Hori, I., and Hosono, R. (1993). The *C. elegans* unc-18 gene encodes a protein expressed in motor neurons. *Neuron* *11*, 703-711.
- Gisselmann, G., Pusch, H., Hovemann, B.T., and Hatt, H. (2002). Two cDNAs coding for histamine-gated ion channels in *D. melanogaster*. *Nat Neurosci* *5*, 11-12.
- Goetinck, S., and Waterston, R.H. (1994). The *Caenorhabditis elegans* muscle-affecting gene unc-87 encodes a novel thin filament-associated protein. *J Cell Biol* *127*, 79-93.
- Golden, J.W., and Riddle, D.L. (1982). A pheromone influences larval development in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Science* *218*, 578-580.
- Goldman, D., Brenner, H.R., and Heinemann, S. (1988). Acetylcholine receptor alpha-, beta-, gamma-, and delta-subunit mRNA levels are regulated by muscle activity. *Neuron* *1*, 329-333.
- Goodman, M.B., Hall, D.H., Avery, L., and Lockery, S.R. (1998). Active currents regulate sensitivity and dynamic range in *C. elegans* neurons. *Neuron* *20*, 763-772.
- Gotti, C., and Clementi, F. (2004). Neuronal nicotinic receptors: from structure to pathology. *Prog Neurobiol* *74*, 363-396.
- Gotti, C., Clementi, F., Fornari, A., Gaimarri, A., Guiducci, S., Manfredi, I., Moretti, M., Pedrazzi, P., Pucci, L., and Zoli, M. (2009). Structural and functional diversity of native brain neuronal nicotinic receptors. *Biochem Pharmacol* *78*, 703-711.
- Gotti, C., Moretti, M., Gaimarri, A., Zanardi, A., Clementi, F., and Zoli, M. (2007). Heterogeneity and complexity of native brain nicotinic receptors. *Biochem Pharmacol* *74*, 1102-1111.
- Gotti, C., Riganti, L., Vailati, S., and Clementi, F. (2006). Brain neuronal nicotinic receptors as new targets for drug discovery. *Current pharmaceutical design* *12*, 407-428.
- Gottschalk, A., Almedom, R.B., Schedletzky, T., Anderson, S.D., Yates, J.R., 3rd, and Schafer, W.R. (2005). Identification and characterization of novel nicotinic receptor-associated proteins in *Caenorhabditis elegans*. *EMBO J* *24*, 2566-2578.
- Gottschalk, A., and Schafer, W.R. (2006). Visualization of integral and peripheral cell surface proteins in live *Caenorhabditis elegans*. *J Neurosci Methods* *154*, 68-79.
- Grauso, M., Reenan, R.A., Culetto, E., and Sattelle, D.B. (2002). Novel putative nicotinic acetylcholine receptor subunit genes, *Dalpha5*, *Dalpha6* and *Dalpha7*, in *Drosophila melanogaster* identify a new and highly conserved target of adenosine deaminase acting on RNA-mediated A-to-I pre-mRNA editing. *Genetics* *160*, 1519-1533.

- Gray, J.M., Hill, J.J., and Bargmann, C.I. (2005). A circuit for navigation in *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* *102*, 3184-3191.
- Gray, P.C., Harrison, C.A., and Vale, W. (2003). Cripto forms a complex with activin and type II activin receptors and can block activin signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* *100*, 5193-5198.
- Green, W.N., and Claudio, T. (1993). Acetylcholine receptor assembly: subunit folding and oligomerization occur sequentially. *Cell* *74*, 57-69.
- Green, W.N., and Millar, N.S. (1995). Ion-channel assembly. *Trends Neurosci* *18*, 280-287.
- Haffner, C., Dettmer, U., Weiler, T., and Haass, C. (2007). The Nicastrin-like protein Nicalin regulates assembly and stability of the Nicalin-nodal modulator (NOMO) membrane protein complex. *J Biol Chem* *282*, 10632-10638.
- Haffner, C., Frauli, M., Topp, S., Irmeler, M., Hofmann, K., Regula, J.T., Bally-Cuif, L., and Haass, C. (2004). Nicalin and its binding partner Nomo are novel Nodal signaling antagonists. *EMBO J* *23*, 3041-3050.
- Haffner, C., and Haass, C. (2004). The biochemical and genetic odyssey to the function of a nicastrin-like protein. *Neurodegener Dis* *1*, 192-195.
- Halevi, S., McKay, J., Palfreyman, M., Yassin, L., Eshel, M., Jorgensen, E., and Treinin, M. (2002). The *C. elegans ric-3* gene is required for maturation of nicotinic acetylcholine receptors. *EMBO J* *21*, 1012-1020.
- Halevi, S., Yassin, L., Eshel, M., Sala, F., Sala, S., Criado, M., and Treinin, M. (2003). Conservation within the RIC-3 gene family. Effectors of mammalian nicotinic acetylcholine receptor expression. *J Biol Chem* *278*, 34411-34417.
- Hall, D.H., and Russell, R.L. (1991). The posterior nervous system of the nematode *Caenorhabditis elegans*: serial reconstruction of identified neurons and complete pattern of synaptic interactions. *J Neurosci* *11*, 1-22.
- Hall, Z.W., and Sanes, J.R. (1993). Synaptic structure and development: the neuromuscular junction. *Cell* *72 Suppl*, 99-121.
- Hedgecock, E.M., Culotti, J.G., and Hall, D.H. (1990). The *unc-5*, *unc-6*, and *unc-40* genes guide circumferential migrations of pioneer axons and mesodermal cells on the epidermis in *C. elegans*. *Neuron* *4*, 61-85.
- Heupel, K., Sargsyan, V., Plomp, J.J., Rickmann, M., Varoqueaux, F., Zhang, W., and Kriegstein, K. (2008). Loss of transforming growth factor-beta 2 leads to impairment of central synapse function. *Neural Dev* *3*, 25.
- Hille, B. (1992). Pumping ions. *Science* *255*, 742.
- Hirsh, D., Oppenheim, D., and Klass, M. (1976). Development of the reproductive system of *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol* *49*, 200-219.
- Hogg, R.C., and Bertrand, D. (2004). Nicotinic acetylcholine receptors as drug targets. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord* *3*, 123-130.
- Horoszok, L., Raymond, V., Sattelle, D.B., and Wolstenholme, A.J. (2001). GLC-3: a novel fipronil and BIDN-sensitive, but picrotoxinin-insensitive, L-glutamate-gated chloride channel subunit from *Caenorhabditis elegans*. *Br J Pharmacol* *132*, 1247-1254.
- Huh, K.H., and Fuhrer, C. (2002). Clustering of nicotinic acetylcholine receptors: from the neuromuscular junction to interneuronal synapses. *Mol Neurobiol* *25*, 79-112.
- Ishii, N., Wadsworth, W.G., Stern, B.D., Culotti, J.G., and Hedgecock, E.M. (1992). UNC-6, a laminin-related protein, guides cell and pioneer axon migrations in *C. elegans*. *Neuron* *9*, 873-881.
- Iwasaki, K., Staunton, J., Saifee, O., Nonet, M., and Thomas, J.H. (1997). *aex-3* encodes a novel regulator of presynaptic activity in *C. elegans*. *Neuron* *18*, 613-622.

- Jahn, R., and Scheller, R.H. (2006). SNAREs--engines for membrane fusion. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7, 631-643.
- Jeanclous, E.M., Lin, L., Treuil, M.W., Rao, J., DeCoster, M.A., and Anand, R. (2001). The chaperone protein 14-3-3eta interacts with the nicotinic acetylcholine receptor alpha 4 subunit. Evidence for a dynamic role in subunit stabilization. *J Biol Chem* 276, 28281-28290.
- Jin, Y., and Garner, C.C. (2008). Molecular mechanisms of presynaptic differentiation. *Annu Rev Cell Dev Biol* 24, 237-262.
- Johnson, C.D., and Stretton, A.O. (1987). GABA-immunoreactivity in inhibitory motor neurons of the nematode *Ascaris*. *J Neurosci* 7, 223-235.
- Johnstone, I.L. (1994). The cuticle of the nematode *Caenorhabditis elegans*: a complex collagen structure. *Bioessays* 16, 171-178.
- Johnstone, I.L., Shafi, Y., and Barry, J.D. (1992). Molecular analysis of mutations in the *Caenorhabditis elegans* collagen gene *dpy-7*. *EMBO J* 11, 3857-3863.
- Jones, A.K., Davis, P., Hodgkin, J., and Sattelle, D.B. (2007). The nicotinic acetylcholine receptor gene family of the nematode *Caenorhabditis elegans*: an update on nomenclature. *Invert Neurosci* 7, 129-131.
- Jones, A.K., and Sattelle, D.B. (2004). Functional genomics of the nicotinic acetylcholine receptor gene family of the nematode, *Caenorhabditis elegans*. *Bioessays* 26, 39-49.
- Jones, S., Sudweeks, S., and Yakel, J.L. (1999). Nicotinic receptors in the brain: correlating physiology with function. *Trends Neurosci* 22, 555-561.
- Jorgensen, E.M., Hartweg, E., Schuske, K., Nonet, M.L., Jin, Y., and Horvitz, H.R. (1995). Defective recycling of synaptic vesicles in synaptotagmin mutants of *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 378, 196-199.
- Jorquera, R.A., Huntwork-Rodriguez, S., Akbergenova, Y., Cho, R.W., and Littleton, J.T. (2012). Complexin controls spontaneous and evoked neurotransmitter release by regulating the timing and properties of synaptotagmin activity. *J Neurosci* 32, 18234-18245.
- Jospin, M., Qi, Y.B., Stawicki, T.M., Boulin, T., Schuske, K.R., Horvitz, H.R., Bessereau, J.L., Jorgensen, E.M., and Jin, Y. (2009). A neuronal acetylcholine receptor regulates the balance of muscle excitation and inhibition in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS Biol* 7, e1000265.
- Kalamida, D., Poulas, K., Avramopoulou, V., Fostieri, E., Lagoumintzis, G., Lazaridis, K., Sideri, A., Zouridakis, M., and Tzartos, S.J. (2007). Muscle and neuronal nicotinic acetylcholine receptors. Structure, function and pathogenicity. *FEBS J* 274, 3799-3845.
- Kamath, R.S., and Ahringer, J. (2003). Genome-wide RNAi screening in *Caenorhabditis elegans*. *Methods* 30, 313-321.
- Kao, P.N., Dwork, A.J., Kaldany, R.R., Silver, M.L., Wideman, J., Stein, S., and Karlin, A. (1984). Identification of the alpha subunit half-cystine specifically labeled by an affinity reagent for the acetylcholine receptor binding site. *J Biol Chem* 259, 11662-11665.
- Kao, P.N., and Karlin, A. (1986). Acetylcholine receptor binding site contains a disulfide cross-link between adjacent half-cystinyl residues. *J Biol Chem* 261, 8085-8088.
- Karlin, A. (2002). Emerging structure of the nicotinic acetylcholine receptors. *Nat Rev Neurosci* 3, 102-114.
- Keller, S.H., Lindstrom, J., Ellisman, M., and Taylor, P. (2001). Adjacent basic amino acid residues recognized by the COP I complex and ubiquitination govern endoplasmic reticulum to cell surface trafficking of the nicotinic acetylcholine receptor alpha-Subunit. *J Biol Chem* 276, 18384-18391.
- Keller, S.H., Lindstrom, J., and Taylor, P. (1996). Involvement of the chaperone protein calnexin and the acetylcholine receptor beta-subunit in the assembly and cell surface expression of the receptor. *J Biol Chem* 271, 22871-22877.
- Keller, S.H., and Taylor, P. (1999). Determinants responsible for assembly of the nicotinic acetylcholine receptor. *J Gen Physiol* 113, 171-176.

- Kennedy, S., Wang, D., and Ruvkun, G. (2004). A conserved siRNA-degrading RNase negatively regulates RNA interference in *C. elegans*. *Nature* 427, 645-649.
- Kenyon, C. (1988). The nematode *Caenorhabditis elegans*. *Science* 240, 1448-1453.
- Kim, E., and Sheng, M. (2004). PDZ domain proteins of synapses. *Nat Rev Neurosci* 5, 771-781.
- Kirsch, J. (2006). Glycinergic transmission. *Cell Tissue Res* 326, 535-540.
- Klass, M., and Hirsh, D. (1976). Non-ageing developmental variant of *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 260, 523-525.
- Klenchin, V.A., and Martin, T.F. (2000). Priming in exocytosis: attaining fusion-competence after vesicle docking. *Biochimie* 82, 399-407.
- Kramer, J.M. (1994). Genetic analysis of extracellular matrix in *C. elegans*. *Annu Rev Genet* 28, 95-116.
- Kramer, J.M., French, R.P., Park, E.C., and Johnson, J.J. (1990). The *Caenorhabditis elegans* rol-6 gene, which interacts with the *sqt-1* collagen gene to determine organismal morphology, encodes a collagen. *Mol Cell Biol* 10, 2081-2089.
- Kramer, J.M., Johnson, J.J., Edgar, R.S., Basch, C., and Roberts, S. (1988). The *sqt-1* gene of *C. elegans* encodes a collagen critical for organismal morphogenesis. *Cell* 55, 555-565.
- Kues, W.A., Sakmann, B., and Witzemann, V. (1995). Differential expression patterns of five acetylcholine receptor subunit genes in rat muscle during development. *Eur J Neurosci* 7, 1376-1385.
- Kuo, Y.P., Xu, L., Eaton, J.B., Zhao, L., Wu, J., and Lukas, R.J. (2005). Roles for nicotinic acetylcholine receptor subunit large cytoplasmic loop sequences in receptor expression and function. *J Pharmacol Exp Ther* 314, 455-466.
- Kuryatov, A., Luo, J., Cooper, J., and Lindstrom, J. (2005). Nicotine acts as a pharmacological chaperone to up-regulate human alpha4beta2 acetylcholine receptors. *Mol Pharmacol* 68, 1839-1851.
- Kuryatov, A., Onksen, J., and Lindstrom, J. (2008). Roles of accessory subunits in alpha4beta2(\*) nicotinic receptors. *Mol Pharmacol* 74, 132-143.
- Lansdell, S.J., Gee, V.J., Harkness, P.C., Doward, A.I., Baker, E.R., Gibb, A.J., and Millar, N.S. (2005). RIC-3 enhances functional expression of multiple nicotinic acetylcholine receptor subtypes in mammalian cells. *Mol Pharmacol* 68, 1431-1438.
- Laviolette, S.R., and van der Kooy, D. (2004). The neurobiology of nicotine addiction: bridging the gap from molecules to behaviour. *Nat Rev Neurosci* 5, 55-65.
- Le Novere, N., Corringer, P.J., and Changeux, J.P. (2002). The diversity of subunit composition in nAChRs: evolutionary origins, physiologic and pharmacologic consequences. *J Neurobiol* 53, 447-456.
- Lee, R.Y., Sawin, E.R., Chalfie, M., Horvitz, H.R., and Avery, L. (1999). EAT-4, a homolog of a mammalian sodium-dependent inorganic phosphate cotransporter, is necessary for glutamatergic neurotransmission in *caenorhabditis elegans*. *J Neurosci* 19, 159-167.
- Lena, C., and Changeux, J.P. (1998). Allosteric nicotinic receptors, human pathologies. *J Physiol Paris* 92, 63-74.
- Lester, H.A., Dibas, M.I., Dahan, D.S., Leite, J.F., and Dougherty, D.A. (2004). Cys-loop receptors: new twists and turns. *Trends Neurosci* 27, 329-336.
- Leung-Hagesteijn, C., Spence, A.M., Stern, B.D., Zhou, Y., Su, M.W., Hedgecock, E.M., and Culotti, J.G. (1992). UNC-5, a transmembrane protein with immunoglobulin and thrombospondin type 1 domains, guides cell and pioneer axon migrations in *C. elegans*. *Cell* 71, 289-299.
- Lewis, J.A., Elmer, J.S., Skimming, J., McLafferty, S., Fleming, J., and McGee, T. (1987a). Cholinergic receptor mutants of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *J Neurosci* 7, 3059-3071.
- Lewis, J.A., Fleming, J.T., McLafferty, S., Murphy, H., and Wu, C. (1987b). The levamisole receptor, a cholinergic receptor of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Mol Pharmacol* 31, 185-193.

- Lewis, J.A., Wu, C.H., Berg, H., and Levine, J.H. (1980a). The genetics of levamisole resistance in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* *95*, 905-928.
- Lewis, J.A., Wu, C.H., Levine, J.H., and Berg, H. (1980b). Levamisole-resistant mutants of the nematode *Caenorhabditis elegans* appear to lack pharmacological acetylcholine receptors. *Neuroscience* *5*, 967-989.
- Li, H., Avery, L., Denk, W., and Hess, G.P. (1997). Identification of chemical synapses in the pharynx of *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* *94*, 5912-5916.
- Liewald, J.F., Brauner, M., Stephens, G.J., Bouhours, M., Schultheis, C., Zhen, M., and Gottschalk, A. (2008). Optogenetic analysis of synaptic function. *Nat Methods* *5*, 895-902.
- Lin, L., Jeanclos, E.M., Treuil, M., Braunewell, K.H., Gundelfinger, E.D., and Anand, R. (2002). The calcium sensor protein visinin-like protein-1 modulates the surface expression and agonist sensitivity of the alpha 4beta 2 nicotinic acetylcholine receptor. *J Biol Chem* *277*, 41872-41878.
- Lindstrom, J.M. (2000). Acetylcholine receptors and myasthenia. *Muscle Nerve* *23*, 453-477.
- Lindstrom, J.M. (2003). Nicotinic acetylcholine receptors of muscles and nerves: comparison of their structures, functional roles, and vulnerability to pathology. *Ann N Y Acad Sci* *998*, 41-52.
- Liu, Q., Hollopeter, G., and Jorgensen, E.M. (2009). Graded synaptic transmission at the *Caenorhabditis elegans* neuromuscular junction. *Proc Natl Acad Sci U S A* *106*, 10823-10828.
- Luetje, C.W. (2004). Getting past the asterisk: the subunit composition of presynaptic nicotinic receptors that modulate striatal dopamine release. *Mol Pharmacol* *65*, 1333-1335.
- Luetje, C.W., and Patrick, J. (1991). Both alpha- and beta-subunits contribute to the agonist sensitivity of neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *J Neurosci* *11*, 837-845.
- Lukas, R.J., and Bencherif, M. (1992). Heterogeneity and regulation of nicotinic acetylcholine receptors. *Int Rev Neurobiol* *34*, 25-131.
- Lukas, R.J., Changeux, J.P., Le Novere, N., Albuquerque, E.X., Balfour, D.J., Berg, D.K., Bertrand, D., Chiappinelli, V.A., Clarke, P.B., Collins, A.C., *et al.* (1999). International Union of Pharmacology. XX. Current status of the nomenclature for nicotinic acetylcholine receptors and their subunits. *Pharmacol Rev* *51*, 397-401.
- Mackenzie, J.M., Jr., and Epstein, H.F. (1980). Paramyosin is necessary for determination of nematode thick filament length in vivo. *Cell* *22*, 747-755.
- Macklin, K.D., Maus, A.D., Pereira, E.F., Albuquerque, E.X., and Conti-Fine, B.M. (1998). Human vascular endothelial cells express functional nicotinic acetylcholine receptors. *J Pharmacol Exp Ther* *287*, 435-439.
- Maimone, M.M., and Enigk, R.E. (1999). The intracellular domain of the nicotinic acetylcholine receptor alpha subunit mediates its coclustering with rapsyn. *Mol Cell Neurosci* *14*, 340-354.
- Mameli-Engvall, M., Evrard, A., Pons, S., Maskos, U., Svensson, T.H., Changeux, J.P., and Faure, P. (2006). Hierarchical control of dopamine neuron-firing patterns by nicotinic receptors. *Neuron* *50*, 911-921.
- Mandelzys, A., De Koninck, P., and Cooper, E. (1995). Agonist and toxin sensitivities of ACh-evoked currents on neurons expressing multiple nicotinic ACh receptor subunits. *Journal of neurophysiology* *74*, 1212-1221.
- Mao, D., Yasuda, R.P., Fan, H., Wolfe, B.B., and Kellar, K.J. (2006). Heterogeneity of nicotinic cholinergic receptors in rat superior cervical and nodose Ganglia. *Mol Pharmacol* *70*, 1693-1699.
- Marchand, S., Devillers-Thiery, A., Pons, S., Changeux, J.P., and Cartaud, J. (2002). Rapsyn escorts the nicotinic acetylcholine receptor along the exocytic pathway via association with lipid rafts. *J Neurosci* *22*, 8891-8901.
- Marques, M.J., and Santo Neto, H. (1998). Imaging neuromuscular junctions by confocal fluorescence microscopy: individual endplates seen in whole muscles with vital intracellular staining of the nerve terminals. *J Anat* *192 (Pt 3)*, 425-430.

- Maruyama, I.N., and Brenner, S. (1991). A phorbol ester/diacylglycerol-binding protein encoded by the *unc-13* gene of *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* *88*, 5729-5733.
- Maskos, U., Molles, B.E., Pons, S., Besson, M., Guiard, B.P., Guilloux, J.P., Evrard, A., Cazala, P., Cormier, A., Mameli-Engvall, M., *et al.* (2005). Nicotine reinforcement and cognition restored by targeted expression of nicotinic receptors. *Nature* *436*, 103-107.
- Matsumura, K., Ervasti, J.M., Ohlendieck, K., Kahl, S.D., and Campbell, K.P. (1992). Association of dystrophin-related protein with dystrophin-associated proteins in mdx mouse muscle. *Nature* *360*, 588-591.
- McGehee, D.S., and Role, L.W. (1995). Physiological diversity of nicotinic acetylcholine receptors expressed by vertebrate neurons. *Annual review of physiology* *57*, 521-546.
- McIntire, S.L., Reimer, R.J., Schuske, K., Edwards, R.H., and Jorgensen, E.M. (1997). Identification and characterization of the vesicular GABA transporter. *Nature* *389*, 870-876.
- McKay, J.P., Raizen, D.M., Gottschalk, A., Schafer, W.R., and Avery, L. (2004). *eat-2* and *eat-18* are required for nicotinic neurotransmission in the *Caenorhabditis elegans* pharynx. *Genetics* *166*, 161-169.
- McMahan, U.J. (1990). The agrin hypothesis. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* *55*, 407-418.
- Mei, L., and Xiong, W.C. (2003). Two birds with one stone: a novel motif for ACh receptor assembly quality control. *Trends Neurosci* *26*, 178-181.
- Melamed, N., Helm, P.J., and Rahamimoff, R. (1993). Confocal microscopy reveals coordinated calcium fluctuations and oscillations in synaptic boutons. *J Neurosci* *13*, 632-649.
- Mello, C.C., Kramer, J.M., Stinchcomb, D., and Ambros, V. (1991). Efficient gene transfer in *C.elegans*: extrachromosomal maintenance and integration of transforming sequences. *EMBO J* *10*, 3959-3970.
- Merlie, J.P., Hofler, J.G., and Sebbane, R. (1981). Acetylcholine receptor synthesis from membrane polysomes. *J Biol Chem* *256*, 6995-6999.
- Merlie, J.P., and Lindstrom, J. (1983). Assembly in vivo of mouse muscle acetylcholine receptor: identification of an alpha subunit species that may be an assembly intermediate. *Cell* *34*, 747-757.
- Merlie, J.P., and Sebbane, R. (1981). Acetylcholine receptor subunits transit a precursor pool before acquiring alpha-bungarotoxin binding activity. *J Biol Chem* *256*, 3605-3608.
- Merlie, J.P., Sebbane, R., Tzartos, S., and Lindstrom, J. (1982). Inhibition of glycosylation with tunicamycin blocks assembly of newly synthesized acetylcholine receptor subunits in muscle cells. *J Biol Chem* *257*, 2694-2701.
- Millar, N.S. (2003). Assembly and subunit diversity of nicotinic acetylcholine receptors. *Biochem Soc Trans* *31*, 869-874.
- Millar, N.S., and Harkness, P.C. (2008). Assembly and trafficking of nicotinic acetylcholine receptors (Review). *Mol Membr Biol* *25*, 279-292.
- Miller, K.G., Alfonso, A., Nguyen, M., Crowell, J.A., Johnson, C.D., and Rand, J.B. (1996). A genetic selection for *Caenorhabditis elegans* synaptic transmission mutants. *Proc Natl Acad Sci U S A* *93*, 12593-12598.
- Mishina, M., Takai, T., Imoto, K., Noda, M., Takahashi, T., Numa, S., Methfessel, C., and Sakmann, B. (1986). Molecular distinction between fetal and adult forms of muscle acetylcholine receptor. *Nature* *321*, 406-411.
- Miyazawa, A., Fujiyoshi, Y., Stowell, M., and Unwin, N. (1999). Nicotinic acetylcholine receptor at 4.6 Å resolution: transverse tunnels in the channel wall. *J Mol Biol* *288*, 765-786.
- Miyazawa, A., Fujiyoshi, Y., and Unwin, N. (2003). Structure and gating mechanism of the acetylcholine receptor pore. *Nature* *423*, 949-955.

- Mongan, N.P., Baylis, H.A., Adcock, C., Smith, G.R., Sansom, M.S., and Sattelle, D.B. (1998). An extensive and diverse gene family of nicotinic acetylcholine receptor alpha subunits in *Caenorhabditis elegans*. *Receptors Channels* *6*, 213-228.
- Mongan, N.P., Jones, A.K., Smith, G.R., Sansom, M.S., and Sattelle, D.B. (2002). Novel alpha7-like nicotinic acetylcholine receptor subunits in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Protein Sci* *11*, 1162-1171.
- Mori, I., and Ohshima, Y. (1995). Neural regulation of thermotaxis in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* *376*, 344-348.
- Morita, K., Chow, K.L., and Ueno, N. (1999). Regulation of body length and male tail ray pattern formation of *Caenorhabditis elegans* by a member of TGF-beta family. *Development* *126*, 1337-1347.
- Moroni, M., and Bermudez, I. (2006). Stoichiometry and pharmacology of two human alpha4beta2 nicotinic receptor types. *J Mol Neurosci* *30*, 95-96.
- Mrowiec, T., and Schwappach, B. (2006). 14-3-3 proteins in membrane protein transport. *Biol Chem* *387*, 1227-1236.
- Nashmi, R., Dickinson, M.E., McKinney, S., Jareb, M., Labarca, C., Fraser, S.E., and Lester, H.A. (2003). Assembly of alpha4beta2 nicotinic acetylcholine receptors assessed with functional fluorescently labeled subunits: effects of localization, trafficking, and nicotine-induced upregulation in clonal mammalian cells and in cultured midbrain neurons. *J Neurosci* *23*, 11554-11567.
- Neher, E., and Sakmann, B. (1992). The patch clamp technique. *Sci Am* *266*, 44-51.
- Nguyen, M., Alfonso, A., Johnson, C.D., and Rand, J.B. (1995). *Caenorhabditis elegans* mutants resistant to inhibitors of acetylcholinesterase. *Genetics* *140*, 527-535.
- Nitkin, R.M., Smith, M.A., Magill, C., Fallon, J.R., Yao, Y.M., Wallace, B.G., and McMahan, U.J. (1987). Identification of agrin, a synaptic organizing protein from Torpedo electric organ. *J Cell Biol* *105*, 2471-2478.
- Noakes, P.G., Phillips, W.D., Hanley, T.A., Sanes, J.R., and Merlie, J.P. (1993). 43K protein and acetylcholine receptors colocalize during the initial stages of neuromuscular synapse formation in vivo. *Dev Biol* *155*, 275-280.
- Nonet, M.L., Grundahl, K., Meyer, B.J., and Rand, J.B. (1993). Synaptic function is impaired but not eliminated in *C. elegans* mutants lacking synaptotagmin. *Cell* *73*, 1291-1305.
- Nonet, M.L., Saifee, O., Zhao, H., Rand, J.B., and Wei, L. (1998). Synaptic transmission deficits in *Caenorhabditis elegans* synaptobrevin mutants. *J Neurosci* *18*, 70-80.
- Nonet, M.L., Staunton, J.E., Kilgard, M.P., Fergestad, T., Hartwig, E., Horvitz, H.R., Jorgensen, E.M., and Meyer, B.J. (1997). *Caenorhabditis elegans* rab-3 mutant synapses exhibit impaired function and are partially depleted of vesicles. *J Neurosci* *17*, 8061-8073.
- Okkema, P.G., Harrison, S.W., Plunger, V., Aryana, A., and Fire, A. (1993). Sequence requirements for myosin gene expression and regulation in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* *135*, 385-404.
- Ortells, M.O., and Lunt, G.G. (1995). Evolutionary history of the ligand-gated ion-channel superfamily of receptors. *Trends Neurosci* *18*, 121-127.
- Papke, R.L., Duvoisin, R.M., and Heinemann, S.F. (1993). The amino terminal half of the nicotinic beta-subunit extracellular domain regulates the kinetics of inhibition by neuronal bungarotoxin. *Proc Biol Sci* *252*, 141-148.
- Paulson, H.L., Ross, A.F., Green, W.N., and Claudio, T. (1991). Analysis of early events in acetylcholine receptor assembly. *J Cell Biol* *113*, 1371-1384.
- Pavlos, N.J., Xu, J., Papadimitriou, J.M., and Zheng, M.H. (2001). Molecular cloning of the mouse homologue of Rab3c. *Journal of molecular endocrinology* *27*, 117-122.
- Perry, E.K., Lee, M.L., Martin-Ruiz, C.M., Court, J.A., Volsen, S.G., Merrit, J., Folly, E., Iversen, P.E., Bauman, M.L., Perry, R.H., *et al.* (2001). Cholinergic activity in autism: abnormalities in the cerebral cortex and basal forebrain. *Am J Psychiatry* *158*, 1058-1066.

- Perry, E.K., Morris, C.M., Court, J.A., Cheng, A., Fairbairn, A.F., McKeith, I.G., Irving, D., Brown, A., and Perry, R.H. (1995). Alteration in nicotine binding sites in Parkinson's disease, Lewy body dementia and Alzheimer's disease: possible index of early neuropathology. *Neuroscience* *64*, 385-395.
- Perry, E.K., Smith, C.J., Court, J.A., and Perry, R.H. (1990). Cholinergic nicotinic and muscarinic receptors in dementia of Alzheimer, Parkinson and Lewy body types. *J Neural Transm Park Dis Dement Sect 2*, 149-158.
- Piccioletto, M.R., and Zoli, M. (2002). Nicotinic receptors in aging and dementia. *J Neurobiol* *53*, 641-655.
- Plazas, P.V., Katz, E., Gomez-Casati, M.E., Bouzat, C., and Elgoyhen, A.B. (2005). Stoichiometry of the alpha9alpha10 nicotinic cholinergic receptor. *J Neurosci* *25*, 10905-10912.
- Putz, G., Kristufek, D., Orr-Urtreger, A., Changeux, J.P., Huck, S., and Scholze, P. (2008). Nicotinic acetylcholine receptor-subunit mRNAs in the mouse superior cervical ganglion are regulated by development but not by deletion of distinct subunit genes. *J Neurosci Res* *86*, 972-981.
- Qian, H., Robertson, A.P., Powell-Coffman, J.A., and Martin, R.J. (2008). Levamisole resistance resolved at the single-channel level in *Caenorhabditis elegans*. *FASEB J* *22*, 3247-3254.
- Quik, M., Bordia, T., Forno, L., and McIntosh, J.M. (2004). Loss of alpha-conotoxinMII- and A85380-sensitive nicotinic receptors in Parkinson's disease striatum. *J Neurochem* *88*, 668-679.
- Raizen, D.M., and Avery, L. (1994). Electrical activity and behavior in the pharynx of *Caenorhabditis elegans*. *Neuron* *12*, 483-495.
- Raizen, D.M., Lee, R.Y., and Avery, L. (1995). Interacting genes required for pharyngeal excitation by motor neuron MC in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* *141*, 1365-1382.
- Rand, J.B., and Johnson, C.D. (1995). Genetic pharmacology: interactions between drugs and gene products in *Caenorhabditis elegans*. *Methods Cell Biol* *48*, 187-204.
- Ranganathan, R., Cannon, S.C., and Horvitz, H.R. (2000). MOD-1 is a serotonin-gated chloride channel that modulates locomotory behaviour in *C. elegans*. *Nature* *408*, 470-475.
- Rawson, J.M., Lee, M., Kennedy, E.L., and Selleck, S.B. (2003). *Drosophila* neuromuscular synapse assembly and function require the TGF-beta type I receptor saxophone and the transcription factor Mad. *J Neurobiol* *55*, 134-150.
- Rayes, D., Flamini, M., Hernando, G., and Bouzat, C. (2007). Activation of single nicotinic receptor channels from *Caenorhabditis elegans* muscle. *Mol Pharmacol* *71*, 1407-1415.
- Reeves, D.C., and Lummis, S.C. (2002). The molecular basis of the structure and function of the 5-HT3 receptor: a model ligand-gated ion channel (review). *Mol Membr Biol* *19*, 11-26.
- Ren, P., Lim, C.S., Johnsen, R., Albert, P.S., Pilgrim, D., and Riddle, D.L. (1996). Control of *C. elegans* larval development by neuronal expression of a TGF-beta homolog. *Science* *274*, 1389-1391.
- Ren, X.Q., Cheng, S.B., Treuil, M.W., Mukherjee, J., Rao, J., Braunewell, K.H., Lindstrom, J.M., and Anand, R. (2005). Structural determinants of alpha4beta2 nicotinic acetylcholine receptor trafficking. *J Neurosci* *25*, 6676-6686.
- Richmond, J.E., Davis, W.S., and Jorgensen, E.M. (1999). UNC-13 is required for synaptic vesicle fusion in *C. elegans*. *Nat Neurosci* *2*, 959-964.
- Richmond, J.E., and Jorgensen, E.M. (1999). One GABA and two acetylcholine receptors function at the *C. elegans* neuromuscular junction. *Nat Neurosci* *2*, 791-797.
- Roberts, B., Clucas, C., and Johnstone, I.L. (2003). Loss of SEC-23 in *Caenorhabditis elegans* causes defects in oogenesis, morphogenesis, and extracellular matrix secretion. *Mol Biol Cell* *14*, 4414-4426.
- Robertson, S.J., Pennington, A.J., Evans, A.M., and Martin, R.J. (1994). The action of pyrantel as an agonist and an open channel blocker at acetylcholine receptors in isolated *Ascaris suum* muscle vesicles. *Eur J Pharmacol* *271*, 273-282.

- Rogers, C.M., Franks, C.J., Walker, R.J., Burke, J.F., and Holden-Dye, L. (2001). Regulation of the pharynx of *Caenorhabditis elegans* by 5-HT, octopamine, and FMRFamide-like neuropeptides. *J Neurobiol* 49, 235-244.
- Rosenbluth, J. (1965). Ultrastructural organization of obliquely striated muscle fibers in *Ascaris lumbricoides*. *J Cell Biol* 25, 495-515.
- Ruaud, A.F., and Bessereau, J.L. (2006). Activation of nicotinic receptors uncouples a developmental timer from the molting timer in *C. elegans*. *Development* 133, 2211-2222.
- Ruff, R.L. (2003). Neurophysiology of the neuromuscular junction: overview. *Ann N Y Acad Sci* 998, 1-10.
- Saifee, O., Wei, L., and Nonet, M.L. (1998). The *Caenorhabditis elegans* unc-64 locus encodes a syntaxin that interacts genetically with synaptobrevin. *Mol Biol Cell* 9, 1235-1252.
- Sanes, J.R. (2003). The basement membrane/basal lamina of skeletal muscle. *J Biol Chem* 278, 12601-12604.
- Sanes, J.R., and Lichtman, J.W. (1999). Development of the vertebrate neuromuscular junction. *Annu Rev Neurosci* 22, 389-442.
- Sanes, J.R., and Lichtman, J.W. (2001). Induction, assembly, maturation and maintenance of a postsynaptic apparatus. *Nat Rev Neurosci* 2, 791-805.
- Sargent, P.B. (1993). The diversity of neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Annu Rev Neurosci* 16, 403-443.
- Savage-Dunn, C. (2005). TGF-beta signaling. *WormBook*, 1-12.
- Schackwitz, W.S., Inoue, T., and Thomas, J.H. (1996). Chemosensory neurons function in parallel to mediate a pheromone response in *C. elegans*. *Neuron* 17, 719-728.
- Schafer, W.R. (2005). Deciphering the neural and molecular mechanisms of *C. elegans* behavior. *Curr Biol* 15, R723-729.
- Scherer, S.F. (1953). The utilization of a pure strain of mammalian cells (Earle) for the cultivation of viruses in vitro. I. Multiplication of pseudorabies and herpes simplex viruses. *Am J Pathol* 29, 113-137.
- Schoch, S., and Gundelfinger, E.D. (2006). Molecular organization of the presynaptic active zone. *Cell Tissue Res* 326, 379-391.
- Schuske, K., Beg, A.A., and Jorgensen, E.M. (2004). The GABA nervous system in *C. elegans*. *Trends Neurosci* 27, 407-414.
- Seagar, M., Leveque, C., Charvin, N., Marqueze, B., Martin-Moutot, N., Boudier, J.A., Boudier, J.L., Shoji-Kasai, Y., Sato, K., and Takahashi, M. (1999). Interactions between proteins implicated in exocytosis and voltage-gated calcium channels. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 354, 289-297.
- Sealock, R., Wray, B.E., and Froehner, S.C. (1984). Ultrastructural localization of the Mr 43,000 protein and the acetylcholine receptor in Torpedo postsynaptic membranes using monoclonal antibodies. *J Cell Biol* 98, 2239-2244.
- Sgard, F., Charpantier, E., Bertrand, S., Walker, N., Caput, D., Graham, D., Bertrand, D., and Besnard, F. (2002). A novel human nicotinic receptor subunit, alpha10, that confers functionality to the alpha9-subunit. *Mol Pharmacol* 61, 150-159.
- Sieburth, D., Ch'ng, Q., Dybbs, M., Tavazoie, M., Kennedy, S., Wang, D., Dupuy, D., Rual, J.F., Hill, D.E., Vidal, M., *et al.* (2005). Systematic analysis of genes required for synapse structure and function. *Nature* 436, 510-517.
- Simmer, F., Tijsterman, M., Parrish, S., Koushika, S.P., Nonet, M.L., Fire, A., Ahringer, J., and Plasterk, R.H. (2002). Loss of the putative RNA-directed RNA polymerase RRF-3 makes *C. elegans* hypersensitive to RNAi. *Curr Biol* 12, 1317-1319.
- Sine, S.M. (2002). The nicotinic receptor ligand binding domain. *J Neurobiol* 53, 431-446.

- Slepnev, V.I., and De Camilli, P. (2000). Accessory factors in clathrin-dependent synaptic vesicle endocytosis. *Nat Rev Neurosci* 1, 161-172.
- Smith, M.M., Lindstrom, J., and Merlie, J.P. (1987). Formation of the alpha-bungarotoxin binding site and assembly of the nicotinic acetylcholine receptor subunits occur in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 262, 4367-4376.
- Steinlein, O.K., and Bertrand, D. (2008). Neuronal nicotinic acetylcholine receptors: from the genetic analysis to neurological diseases. *Biochem Pharmacol* 76, 1175-1183.
- Stretton, A.O. (1976). Anatomy and development of the somatic musculature of the nematode *Ascaris*. *J Exp Biol* 64, 773-788.
- Sudhof, T.C. (2000). The synaptic vesicle cycle revisited. *Neuron* 28, 317-320.
- Sudhof, T.C. (2004). The synaptic vesicle cycle. *Annu Rev Neurosci* 27, 509-547.
- Sulston, J.E., and Brenner, S. (1974). The DNA of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 77, 95-104.
- Sulston, J.E., and Horvitz, H.R. (1977). Post-embryonic cell lineages of the nematode, *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol* 56, 110-156.
- Suzuki, Y., Yandell, M.D., Roy, P.J., Krishna, S., Savage-Dunn, C., Ross, R.M., Padgett, R.W., and Wood, W.B. (1999). A BMP homolog acts as a dose-dependent regulator of body size and male tail patterning in *Caenorhabditis elegans*. *Development* 126, 241-250.
- Swope, S.L., Moss, S.J., Raymond, L.A., and Huganir, R.L. (1999). Regulation of ligand-gated ion channels by protein phosphorylation. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res* 33, 49-78.
- Tapia, L., Kuryatov, A., and Lindstrom, J. (2007). Ca<sup>2+</sup> permeability of the (alpha4)<sub>3</sub>(beta2)<sub>2</sub> stoichiometry greatly exceeds that of (alpha4)<sub>2</sub>(beta2)<sub>3</sub> human acetylcholine receptors. *Mol Pharmacol* 71, 769-776.
- Temburni, M.K., Blitzblau, R.C., and Jacob, M.H. (2000). Receptor targeting and heterogeneity at interneuronal nicotinic cholinergic synapses in vivo. *J Physiol* 525 Pt 1, 21-29.
- Terzano, S., Court, J.A., Fornasari, D., Griffiths, M., Spurden, D.P., Lloyd, S., Perry, R.H., Perry, E.K., and Clementi, F. (1998). Expression of the alpha3 nicotinic receptor subunit mRNA in aging and Alzheimer's disease. *Brain Res Mol Brain Res* 63, 72-78.
- Touroutine, D., Fox, R.M., Von Stetina, S.E., Burdina, A., Miller, D.M., 3rd, and Richmond, J.E. (2005). *acr-16* encodes an essential subunit of the levamisole-resistant nicotinic receptor at the *Caenorhabditis elegans* neuromuscular junction. *J Biol Chem* 280, 27013-27021.
- Towers, P.R., Edwards, B., Richmond, J.E., and Sattelle, D.B. (2005). The *Caenorhabditis elegans* *lev-8* gene encodes a novel type of nicotinic acetylcholine receptor alpha subunit. *J Neurochem* 93, 1-9.
- Treinin, M., and Chalfie, M. (1995). A mutated acetylcholine receptor subunit causes neuronal degeneration in *C. elegans*. *Neuron* 14, 871-877.
- Treinin, M., Gillo, B., Liebman, L., and Chalfie, M. (1998). Two functionally dependent acetylcholine subunits are encoded in a single *Caenorhabditis elegans* operon. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 15492-15495.
- Tsetlin, V., and Hucho, F. (2009). Nicotinic acetylcholine receptors at atomic resolution. *Curr Opin Pharmacol* 9, 306-310.
- Unwin, N. (1995). Acetylcholine receptor channel imaged in the open state. *Nature* 373, 37-43.
- Valor, L.M., Mulet, J., Sala, F., Sala, S., Ballesta, J.J., and Criado, M. (2002). Role of the large cytoplasmic loop of the alpha 7 neuronal nicotinic acetylcholine receptor subunit in receptor expression and function. *Biochemistry* 41, 7931-7938.
- Van Heeke, G., Denslow, S., Watkins, J.R., Wilson, K.J., and Wagner, F.W. (1992). Cloning and nucleotide sequence of the *Vibrio proteolyticus* aminopeptidase gene. *Biochim Biophys Acta* 1131, 337-340.

- Vashlishan, A.B., Madison, J.M., Dybbs, M., Bai, J., Sieburth, D., Ch'ng, Q., Tavazoie, M., and Kaplan, J.M. (2008). An RNAi screen identifies genes that regulate GABA synapses. *Neuron* 58, 346-361.
- Vassilatis, D.K., Arena, J.P., Plasterk, R.H., Wilkinson, H.A., Schaeffer, J.M., Cully, D.F., and Van der Ploeg, L.H. (1997). Genetic and biochemical evidence for a novel avermectin-sensitive chloride channel in *Caenorhabditis elegans*. Isolation and characterization. *J Biol Chem* 272, 33167-33174.
- Waggoner, L.E., Dickinson, K.A., Poole, D.S., Tabuse, Y., Miwa, J., and Schafer, W.R. (2000). Long-term nicotine adaptation in *Caenorhabditis elegans* involves PKC-dependent changes in nicotinic receptor abundance. *J Neurosci* 20, 8802-8811.
- Walrond, J.P., and Stretton, A.O. (1985). Excitatory and inhibitory activity in the dorsal musculature of the nematode *Ascaris* evoked by single dorsal excitatory motoneurons. *J Neurosci* 5, 16-22.
- Wanamaker, C.P., Christianson, J.C., and Green, W.N. (2003). Regulation of nicotinic acetylcholine receptor assembly. *Ann N Y Acad Sci* 998, 66-80.
- Wang, D.X., and Abood, L.G. (1996). Expression and characterization of the rat alpha 4 beta 2 neuronal nicotinic cholinergic receptor in baculovirus-infected insect cells. *J Neurosci Res* 44, 350-354.
- Wang, H., Yu, M., Ochani, M., Amella, C.A., Tanovic, M., Susarla, S., Li, J.H., Yang, H., Ulloa, L., Al-Abed, Y., *et al.* (2003). Nicotinic acetylcholine receptor alpha7 subunit is an essential regulator of inflammation. *Nature* 421, 384-388.
- Wang, J.M., Zhang, L., Yao, Y., Viroonchatapan, N., Rothe, E., and Wang, Z.Z. (2002). A transmembrane motif governs the surface trafficking of nicotinic acetylcholine receptors. *Nat Neurosci* 5, 963-970.
- Waterston, R.H., Epstein, H.F., and Brenner, S. (1974). Paramyosin of *Caenorhabditis elegans*. *J Mol Biol* 90, 285-290.
- Wessler, I., and Kirkpatrick, C.J. (2008). Acetylcholine beyond neurons: the non-neuronal cholinergic system in humans. *Br J Pharmacol* 154, 1558-1571.
- White, J.G., Southgate, E., Thomson, J.N., and Brenner, S. (1976). The structure of the ventral nerve cord of *Caenorhabditis elegans*. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 275, 327-348.
- White, J.G., Southgate, E., Thomson, J.N., and Brenner, S. (1986). The structure of the nervous system of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 314, 1-340.
- Williams, B.M., Temburni, M.K., Bertrand, S., Bertrand, D., and Jacob, M.H. (1999). The long cytoplasmic loop of the alpha 3 subunit targets specific nAChR subtypes to synapses on neurons in vivo. *Ann N Y Acad Sci* 868, 640-644.
- Williams, B.M., Temburni, M.K., Levey, M.S., Bertrand, S., Bertrand, D., and Jacob, M.H. (1998). The long internal loop of the alpha 3 subunit targets nAChRs to subdomains within individual synapses on neurons in vivo. *Nat Neurosci* 1, 557-562.
- Williams, M.E., Burton, B., Urrutia, A., Shcherbatko, A., Chavez-Noriega, L.E., Cohen, C.J., and Aiyar, J. (2005). Ric-3 promotes functional expression of the nicotinic acetylcholine receptor alpha7 subunit in mammalian cells. *J Biol Chem* 280, 1257-1263.
- Williamson, S.M., Robertson, A.P., Brown, L., Williams, T., Woods, D.J., Martin, R.J., Sattelle, D.B., and Wolstenholme, A.J. (2009). The nicotinic acetylcholine receptors of the parasitic nematode *Ascaris suum*: formation of two distinct drug targets by varying the relative expression levels of two subunits. *PLoS Pathog* 5, e1000517.
- Winder, S.J. (1996). Structure-function relationships in dystrophin and utrophin. *Biochem Soc Trans* 24, 497-501.
- Winder, S.J., Gibson, T.J., and Kendrick-Jones, J. (1995). Dystrophin and utrophin: the missing links! *FEBS Lett* 369, 27-33.
- Witzemann, V., Barg, B., Criado, M., Stein, E., and Sakmann, B. (1989). Developmental regulation of five subunit specific mRNAs encoding acetylcholine receptor subtypes in rat muscle. *FEBS Lett* 242, 419-424.

- Xu, J., Zhu, Y., and Heinemann, S.F. (2006). Identification of sequence motifs that target neuronal nicotinic receptors to dendrites and axons. *J Neurosci* *26*, 9780-9793.
- Yao, J., Gaffaney, J.D., Kwon, S.E., and Chapman, E.R. (2011). Doc2 is a Ca<sup>2+</sup> sensor required for asynchronous neurotransmitter release. *Cell* *147*, 666-677.
- Yassin, L., Gillo, B., Kahan, T., Halevi, S., Eshel, M., and Treinin, M. (2001). Characterization of the deg-3/des-2 receptor: a nicotinic acetylcholine receptor that mutates to cause neuronal degeneration. *Mol Cell Neurosci* *17*, 589-599.
- Yu, G., Nishimura, M., Arawaka, S., Levitan, D., Zhang, L., Tandon, A., Song, Y.Q., Rogaeva, E., Chen, F., Kawarai, T., *et al.* (2000). Nicastrin modulates presenilin-mediated notch/glp-1 signal transduction and betaAPP processing. *Nature* *407*, 48-54.
- Yu, X.M., and Hall, Z.W. (1994). A sequence in the main cytoplasmic loop of the alpha subunit is required for assembly of mouse muscle nicotinic acetylcholine receptor. *Neuron* *13*, 247-255.
- Yurchenco, P.D., and O'Rear, J.J. (1994). Basement membrane assembly. *Methods Enzymol* *245*, 489-518.
- Zhao, C.J., Noack, C., Brackmann, M., Gloveli, T., Maelicke, A., Heinemann, U., Anand, R., and Braunewell, K.H. (2009). Neuronal Ca<sup>2+</sup> sensor VILIP-1 leads to the upregulation of functional alpha4beta2 nicotinic acetylcholine receptors in hippocampal neurons. *Mol Cell Neurosci* *40*, 280-292.
- Zwart, R., and Vijverberg, H.P. (1998). Four pharmacologically distinct subtypes of alpha4beta2 nicotinic acetylcholine receptor expressed in *Xenopus laevis* oocytes. *Mol Pharmacol* *54*, 1124-1131.

## Abkürzungsverzeichnis

A	Ampère
Å	Ångström
ACh	Acetylcholin
AS	Aminosäuren
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosin 5'-triphosphat
BSA	<i>bovine serum albumin / Rinderserum Albumin</i>
cDNA	<i>complementary DNA/Komplementäre DNA</i>
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
CGC	<i>Caenorhabditis Genetics Center</i>
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
Daf-c	<i>constitutive formation of dauer larvae</i>
Daf-d	<i>defective in dauer larva formation/Dauerlarvenformations-defizit</i>
dATP	Desoxyadenosin 5'-triphosphat
DC	<i>dorsal nervecord/Dorsaler Nervenstrang</i>
dCTP	Desoxycytidin 5'-triphosphat
ddNTP	2',3'-Dideoxyribonukleosidtriphosphat
dGTP	Desoxyguanosin 5'-triphosphat
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
dsRNA	Doppelsträngige RNA
DTT	1,4-dithiothreitol
ECFP	<i>enhanced cyan-fluorescent protein</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Reticulum
EtOH	Ethanol
FCS	<i>fetal calf serum/Fötales Kälberserum</i>
GABA	$\gamma$ <i>gamma amino butyric acid /<math>\gamma</math>-Aminobuttersäure</i>
GFP	grün fluoreszierendes Protein
h	Stunden
HeLa	<i>Henrietta Lacks</i> ; Zelllinie aus menschlichen Epithelzellen eines Zervixkarzinoms
HRP	Horse radish Peroxidase
Hz	Hertz
IgG	Immunoglobulin G
kb	Kilobasen
kD	kilo Dalton
L	Liter
LB	<i>Luria Bertani</i>
L-AChR	Levamisolrezeptor
M	Molar
m	Milli
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MN	Motorneuron
$\mu$ l	Mikroliter
min	Minuten
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
$\mu$	mikro
MCS	<i>multiple cloning site/multiple Klonierungsstelle</i>
N-AChR	Nikotinrezeptor
nra	<i>nicotinic receptor associated/Nikotinrezeptor-assoziiert</i>

n.s.	nicht signifikant
N2	Wildtyp <i>C. elegans</i>
nAChR	nikotinischer Acetylcholinrezeptor
NGM	<i>nematode growth medium</i> ; Nematodenwachstumsmedium
NMJ	<i>neuromuscular junction</i> ; neuromuskuläre Synapse
nt	Nukleotide
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid gelelektrophorese
PBS	Phosphate buffered saline/ physiologische phosphatgepufferte Salzlösung
PFA	Paraformaldehyd
pH	<i>Potentia hydrogenii</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> /Polymerasekettenreaktion
PNK	Polynukleotidkinase
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	<i>Reverse transcription polymerase chain reaction</i> /reverse transcription polymerase Kettenreaktion
s	Sekunden
SDS	Sodium Dodecylsulfat
s.e.m.	<i>standard error of the mean</i> , Standardfehler des Mittelwerts
SEWLB	<i>single egg or worm lysis buffer</i>
SNARE	<i>soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor</i>
TAE	Tris-Acetat-EDTA Lösung
Taq	<i>Thermophilus aquaticus</i>
TBS	<i>Tris buffered saline</i> /Tris gepufferte Salzlösung
TBS-T	<i>Tris buffered saline - Triton X-100</i> / Tris gepufferte Salzlösung mit Triton X-100
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylendiamine
U	<i>unit</i> /Einheit
UTR	<i>untranslated region</i> /nicht-translatierte Region
V	Volt
v/v	<i>volume per volume</i> /Volumeneinheiten pro Volumeneinheit
W	Watt
w/v	<i>weight per volume</i> ; Gewichtseinheiten pro Volumeneinheit
wt	Wildtyp
YFP	<i>yellow-fluoreszent protein</i>
zxEx...	systematische Bezeichnung eines extrachromosomalen Transgens
zxIs...	systematische Bezeichnung der genomischen Integration von Transgenen
ZX...	systematische Bezeichnung eines <i>C. elegans</i> Stamms
°C	Grad Celsius

## **6 Danksagung**

Ich bedanke mich sehr herzlich bei Prof. Dr. Alexander Gottschalk für die Bereitstellung dieses Themas und des Arbeitsplatzes, sowie die Unterstützung und Betreuung während dieser Doktorarbeit.

Weiterhin bedanke ich mich herzlich bei Prof. Dr. Walter Volknandt für die Erstellung des zweiten Gutachtens.

Ein großer Dank an die Kollegen des Gottschalk-Labors sowie an Robert Tampé und das gesamte bestehende und ehemalige Team des Instituts für Biochemie. Besonders danke ich Kerstin Zehl für ihr Ohr und ihre Unterstützung.

Ganz besonders möchte ich meiner Familie und meinen Freunden in Frankfurt, Berlin und Asmara dafür danken, dass sie mir die gesamte Zeit über persönlich und telefonisch zur Seite standen. Ohne euch...

Vielen Dank !

---

## 7 Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name Ruth Almedom  
Geburtsdatum 17. Januar 1977  
Geburtsort Asmara (Eritrea)

### Schulbildung

1984-1989 Heinrich-Seidel Grundschule, Berlin  
1989-1996 Ranke Gymnasium, Berlin  
1996 Abitur

### Studium

1997-2002 Studium der Biologie an der Goethe-Universität,  
Frankfurt am Main  
Nov 2001-Juli 2002 Diplomarbeit in der Abteilung für Humangenetik im  
Instut für Biologie an der Goethe-Universität, Frankfurt  
am Main; Betreuerin: Prof. Dr. Anna Starzinski-Powitz;  
Thema: „Identifizierung von Interaktionspartnern der  
zytoplasmatischen Domäne von *Shrew-1*“  
Juli 2002 Diplom mit Auszeichnung an der Goethe-Universität,  
Frankfurt am Main

### Promotion

Seit Aug. 2004 Doktorarbeit am Institut für Biochemie der Goethe-  
Universität Frankfurt am Main;  
Thema: „Funktionelle Charakterisierung zweier  
Levamisolrezeptor-assoziiierter Proteine in *C. elegans* –  
NRA-2 und NRA-4“  
Betreuer: Prof. Dr. Alexander Gottschalk