

Kurstag 4: Genetik mit *C. elegans*

WS 2013/14

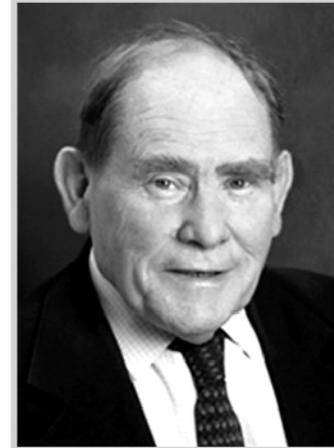
Ralf Baumeister, Wolfgang Maier, Ekkehard Schulze, Mark Seifert

Inhalt

1.	Die Etablierung von <i>Caenorhabditis elegans</i> als Modellsystem.....	30
2.	Die Biologie von <i>C. elegans</i>	30
2.1.	Natürlicher Lebenszyklus	30
2.2.	<i>C. elegans</i> als Laborzucht	31
2.3.	Anatomie	32
2.4.	Genetische Nomenklatur	36
2.5.	Punnet Quadrate	37
3.	Experimente	39
3.1.	Kennenlernen von Wildtyp <i>C. elegans</i>	39
3.2.	Unterscheidung verschiedener larvaler Stadien	40
3.3.	Erkennung von Männchen	41
3.4.	Mutanten mit morphologischen Defekten.....	42
3.5.	Mutanten mit mechanosensorischen Defekten	44
3.5.1.	„Berührungs-Sensitivitäts-Test“ (<i>Mechanosensation assay</i>).....	45
3.5.2.	„Nasenberührungs-Test“ (<i>Nose touch assay</i>)	46
3.6.	Auswertung zweier Kreuzungsexperimente	46
3.6.1.	Auswertung der F1-Generation.....	47
3.6.2.	Auswertung der F2-Generation.....	47

1. Einleitung: Die Etablierung von *Caenorhabditis elegans* als Modellsystem

Die Etablierung von *C. elegans* als Modellsystem für fundamentale biologische Forschung begann 1963 mit den Bemühungen von Sydney Brenner, einem Molekularbiologen am Medical Research Council Laboratory of Molecular Biology in Cambridge, England. Die außerordentlichen Erfolge, die zu diesem Zeitpunkt bei der Untersuchung der molekularen Grundlagen von biologischen Prozessen in Bakterien erzielt worden waren, veranlassten Brenner zu der Annahme, dass ähnliche Ansätze auch in komplexeren Organismen möglich sind. Um dieses Problem anzugehen suchte Brenner nach einem Organismus, der in ähnlicher Weise zu untersuchen sei wie Bakterien oder Viren. Er entschied sich für die Nematodenart *C. elegans*.



Sydney Brenner

Nematoden haben eine kurze Lebensspanne, produzieren durch sexuelle Reproduktion eine große Anzahl von Nachkommen und können sehr leicht in einem Labor kultiviert werden.

Die sexuelle Fortpflanzung erfolgt durch Selbstbefruchtung in den Hermaphroditen oder durch Geschlechtsverkehr mit Männchen, was das System für genetische Studien außerordentlich nützlich macht. Die Selbstbefruchtung erlaubt die Produktion und Zucht genetisch identischer Linien. Zudem sind Nematoden hochdifferenzierte Organismen, die aus weniger als 1000 Zellen bestehen, was die Untersuchung der Funktion, Entwicklung und Differenzierung einzelner Zellen erlaubt.

Wie Brenner vor 40 Jahren vorgeschlagen hatte, wurden alle Zellen und ihre Zellstammbäume in *C. elegans* identifiziert. Zudem wurden zahlreiche Gene entdeckt, die an der Entwicklung und Differenzierung von Zellstammbäumen beteiligt sind. 2002 erhielt Sydney Brenner den Nobelpreis in Physiologie und Medizin zusammen mit John Sulston und Robert Horvitz für ihre Entdeckung von Genen in *C. elegans*, die an der Organentwicklung und dem programmierten Zelltod beteiligt sind.

2. Die Biologie von *C. elegans*

2.1. Natürlicher Lebenszyklus

C. elegans gehört zu den Nematoden oder Rundwürmern. Zu den Nematoden gehören sowohl freilebende wie auch parasitäre Arten. Neben dem Studium fundamentaler biologischer Vorgänge hat das Verständnis der *C. elegans* Biologie auch eine wichtige ökonomische und medizinische Bedeutung. Etwa 50% der Weltbevölkerung ist mit parasitischen Nematoden infiziert und parasitische Pflanzennematoden verursachen einen wirtschaftlichen Schaden von etwa 80 Milliarden Dollar jährlich.

Die Größe der Nematoden reicht von 1mm bis 35cm Länge. *C. elegans* ist ein im Erdreich lebender Wurm mit einer Größe von ca. 1mm. Die Lebensstrategie von *C. elegans* ist an die Lebensbedingungen angepasst, die bezüglich der Futter- und Wasserverfügbarkeit und Temperatur stark variieren können.

Eine erwachsene Wurmpopulation besteht hauptsächlich aus Hermaphroditen mit einem Anteil an Männchen von ca. 0.1%. Selbstbefruchtete Hermaphroditen produzieren etwa 300 Nachkommen, während die durch Männchen befruchteten Hermaphroditen bis zu 1000 Nachkommen produzieren können.

Unter optimalen Laborbedingungen ist die durchschnittliche Lebenserwartung von *C. elegans* 2 bis 3 Wochen. Bei 25°C beträgt die Embryogenese (vom Zeitpunkt der Eibefruchtung bis zum Schlüpfen der Nachkommen) 14h. Die Postembryonale Entwicklung durchläuft in 35 Stunden vier Larvenstadien (L1-L4).

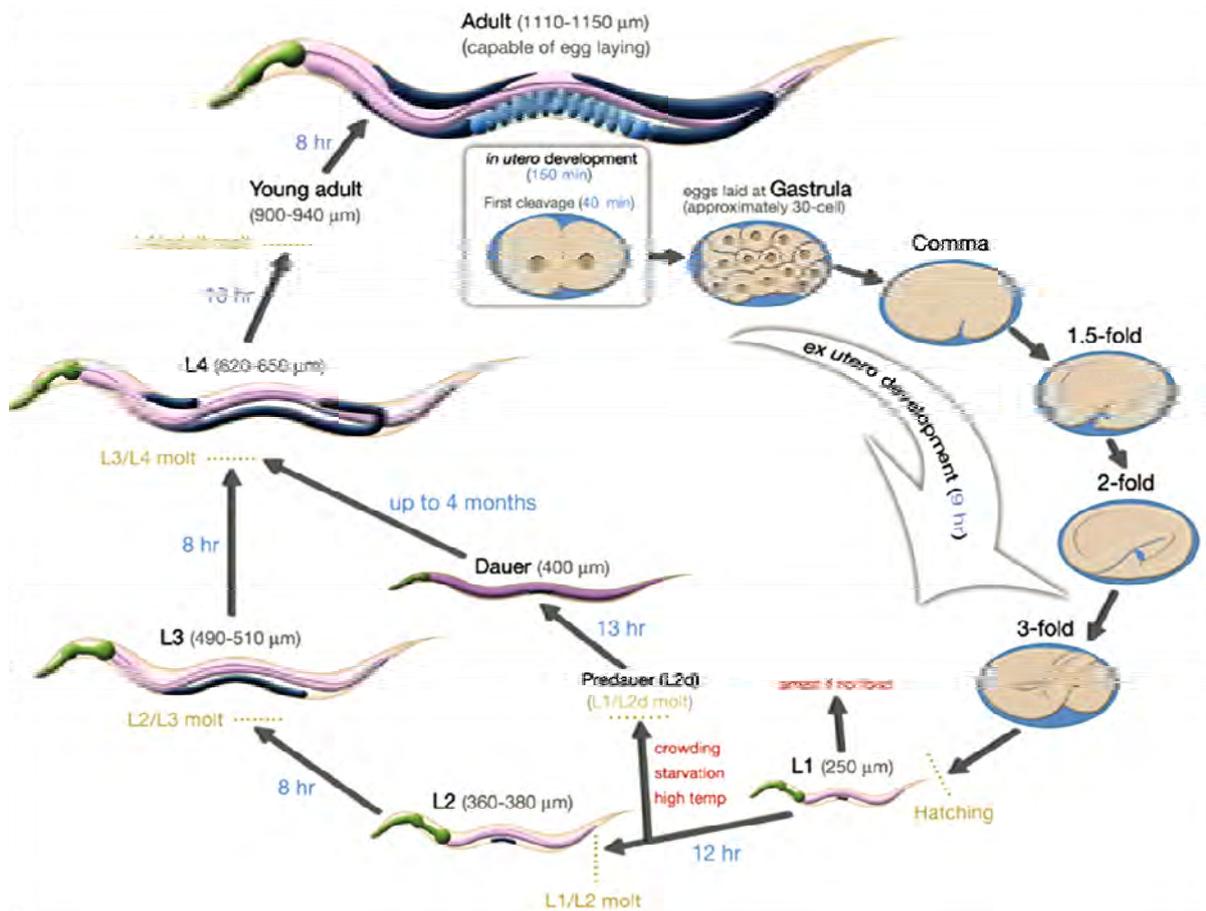


Abbildung 1. Lebenszyklus von *C. elegans* bei 22 °C. Die Angabe in blau zeigt das Zeitintervall im jeweiligen Entwicklungsabschnitt. Die Länge des Tieres ist beim jeweiligen Stadium in µm angegeben.

Bei limitierter Nahrungsverfügbarkeit bilden sich nach der zweiten Larvalhäutung sogenannte Dauerlarven, die keine Nahrung aufnehmen. Sie zeigen neben strukturellen und metabolischen Veränderungen auch Änderungen im Verhalten die zu einer deutlich erhöhten Lebensspanne führen. Im Rahmen der verlängerten Lebenserwartung wird der Zustand solange aufrechterhalten bis sich die Lebensbedingungen gebessert haben. Bei normaler Futterverfügbarkeit nehmen Dauerlarven Nahrung zu sich und entwickeln sich zu L4-Larven weiter.

2.2. *C. elegans* als Laborzucht

Für Laborexperimente wird der *C. elegans* Stamm mit der Bezeichnung ‚Bristol N2‘ verwendet (oder kurz nur: ‚N2‘).

Auch andere Stämme werden in Abhängigkeit der experimentellen Anforderungen verwendet. Beispielsweise zeigt der ‚Bergerac‘ Stamm eine erhöhte Mutationsrate, die durch das Tc1 Transposon verursacht wird. Der ‚Hawaii‘ Stamm CB4856 unterscheidet sich von N2 durch eine große Anzahl von Einzelnukleotid-Polymorphismen (‚single nucleotide polymorphisms‘ oder SNPs), was die genetische Kartierung von Mutationen erleichtert.

Die Laborzucht von *C. elegans* ist einfach und kostengünstig. Die Tiere werden typischerweise auf Petrischalen mit *E. coli* als Futterquelle gezüchtet. *C. elegans* kann auch in großen Mengen in Flüssigkultur gezüchtet werden. Wurmstämme können als gefrorene Kulturen in flüssigem Stickstoff für unbestimmte Zeit konserviert werden, was die Kulturstrategien und Kosten für eine hohe Anzahl von Mutanten dramatisch reduziert.

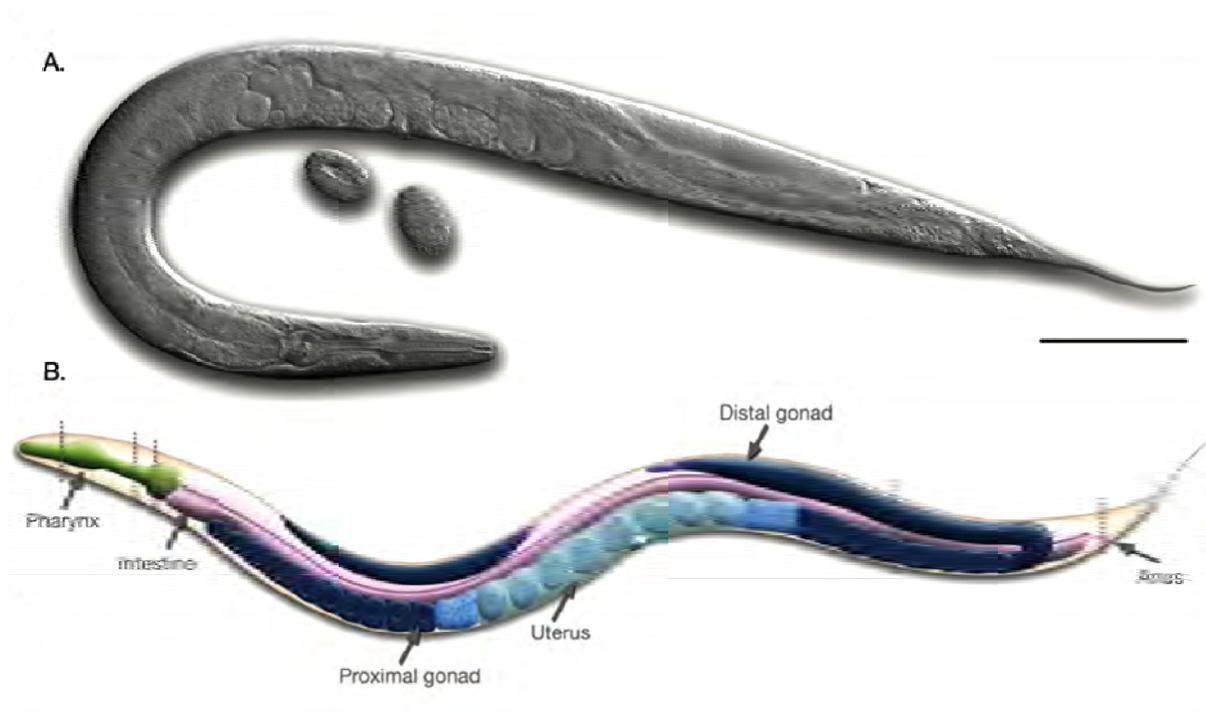


Abbildung 2. Anatomie eines adulten *C. elegans* Hermaphroditen.

A. Differentielle Interferenz Kontrast Mikroskopie (DIK bzw. engl. DIC) Aufnahme eines adulten Wurm. Größenstandard 0.1mm.

B. Schematische Darstellung eines Wurmes.

2.3. Anatomie

Wie alle Nematoden hat *C. elegans* einen unsegmentierten, zylindrischen Körper, der zu den Enden hin verjüngt. Die Körperwand besteht aus einer widerstandsfähigen Kollagen-Kutikula. Unter der Kutikula befindet sich die Hypodermis gefolgt von den Muskeln und Nervenzellen. Die flüssigkeitsgefüllte Körperhöhle (Pseudocoel genannt) trennt die Körperwand von den inneren Organen. Die Körperform wird durch den hydrostatischen Druck im Pseudocoel aufrechterhalten.

Frisch geschlüpfte L1-Larven bestehen aus 558 Zellen. Zusätzliche Zellteilungen der somatischen Zellen während der 4 Larvenstadien führen zu einer Erhöhung der Zellzahl auf 959 bei adulten Hermaphroditen und 1031 bei adulten Männchen. Die Linie der somatischen Zellen ist höchst invariant. Diese Invarianz kombiniert mit der Visualisierung mittels Differentieller Interferenz Kontrast Mikroskopie (DIC) ermöglichte die Erstellung des kompletten Zelllinienstammbaumes von *C. elegans*.

Trotz der geringen Gesamtzellzahl zeigt *C. elegans* einen erstaunlich hohen Grad an Differenzierung. Viele physiologische Funktionen aus dem Säugersystem besitzen Analoge in *C. elegans*.

Die „Haut“ (Hypodermis)

Die „Wurmhaut“ oder Hypodermis ist ein Epithel das unter der Kutikula liegt. Hypodermale Zellen sezernieren die Kutikula, stellen Substrate für die Zell- und Axonmigration bereit und dienen als Speicher für Lipide und andere Moleküle. Die Hypodermis ist an der Phagozytose apoptotischer Zellen beteiligt und besitzt auch eine osmoregulatorische Funktion. Die meisten hypodermalen Zellen besitzen mehrere Zellkerne (Synzytium).

Muskulatur

C. elegans ist ein hervorragender Organismus um die Physiologie, Struktur, Molekularbiologie und die Entwicklung von Muskelzellen zu studieren. Der Wurm besitzt einige leicht zu beobachtende Eigenschaften, welche die Suche nach Genen, die an der Entwicklung oder Funktion der Muskelzellen beteiligt sind, erleichtern. Auch Mutationen, welche schwere Bewegungsdefekte verursachen, können untersucht werden, denn für die Befruchtung der Hermaphroditen ist die Beweglichkeit der Tiere nicht notwendig.

C. elegans besitzt sowohl gestreifte wie auch nichtgestreifte Muskulatur. Die gestreiften Körperwandmuskelzellen sind deutlich in der Überzahl. Diese sind longitudinal entlang der Körperwand angeordnet und sind für die Lokomotion der Tiere verantwortlich.

Nichtgestreifte Muskeln sind mit dem Pharynx, Darm, Anus und bei Hermaphroditen mit dem Uterus, der Gonadenwand und der Vulva assoziiert. Diese Muskelzellen sind für das Pumpen des Pharynx, die Darmentleerung, Ovulation, Fertilisation und Eiablage verantwortlich.

Einige nichtgestreifte Muskelzellen befinden sich auch in der Schwanzregion der Männchen, die für die Befruchtung der Hermaphroditen benötigt werden.

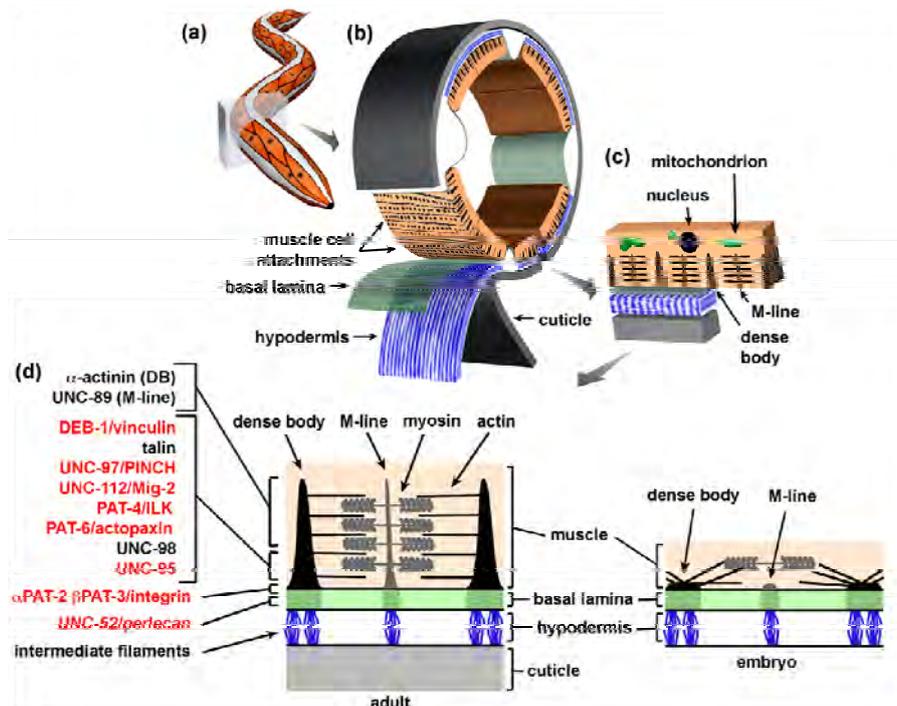


Abbildung 3. Schematischer Aufbau der Muskulatur von *C. elegans*

Das Nervensystem

Das Nervensystem besteht aus 302 Neuronen und 56 Glia- und Stützzellen. Männchen haben 381 Nervenzellen und 92 Glia- und Stützzellen. Durch serielle Rekonstruktion aus elektronenmikroskopischen Aufnahmen konnte John White das gesamte Nervensystem mit allen Verbindungen im Detail kartieren (White et al., 1986).

Das Nervensystem von *C. elegans* wird generell in das Pharynx- und Zentralnervensystem unterteilt. Zwanzig Neuronen innervieren und regulieren die Aktivität des Pharynx. Sie sind durch zwei Interneurone mit dem ZNS verbunden.

Neuronale Ausläufer sind in Bündeln angeordnet, die entlang der Körperachse als longitudinale Fasern oder zirkuläre Kommissuren verlaufen. Die ventralen und dorsalen Nervenstränge entspringen dem um den Pharynx angeordneten Nervenring und sind über Interneurone miteinander verbunden. Die dorsalen Nervenstränge bestehen hauptsächlich aus den Axonen der ventralen Motorneuronen, die über die Kommissuren dorsal geleitet werden. Sensorische Organe, die auf Chemikalien, Temperatur, mechanische Krafteinwirkung und Osmolarität reagieren, sind hauptsächlich in der Kopf- und Schwanzregion angeordnet (siehe auch weiter unten bei dem Versuch 3.5).

Eine wichtige Eigenschaft des Nervensystems von *C. elegans* ist, dass nur drei der 302 Neuronen für das Überleben unter Laborbedingungen notwendig sind, nämlich CANL, CANR und M4. Die CAN (canal associated neurons) Zellen verlaufen entlang des exkretorischen Kanals und könnten eine wichtige Rolle in der systemischen Regulation des Salz- und Wasserhaushaltes spielen. M4 ist ein Pharynxneuron, das die Peristaltik des Pharynx und somit die Nahrungszufuhr reguliert. Die Tatsache, dass die meisten Nervenzellen für das Überleben unter Laborbedingungen nicht benötigt werden, ist ein großer Vorteil für die Untersuchung der Funktionen des Nervensystems (z.B. mit Hilfe von Mutageneseexperimenten).

Der Verdauungstrakt

Der Verdauungstrakt von *C. elegans* besteht aus dem Pharynx, dem Darm und dem Rektum. Der Pharynx von *C. elegans* ist ein Muskelorgan, das kontinuierlich Futter in das Pharynxlumen pumpt, es zerkleinert und in den Darm weiterleitet. Der Pharynx besteht aus Muskel-, Nerven-, Epithel- und Drüsenzellen.

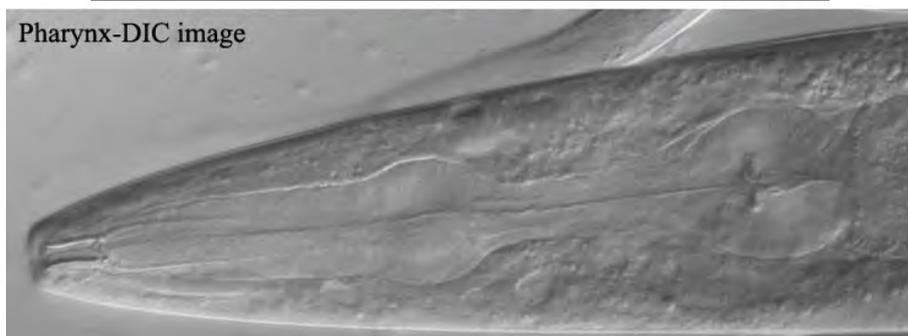
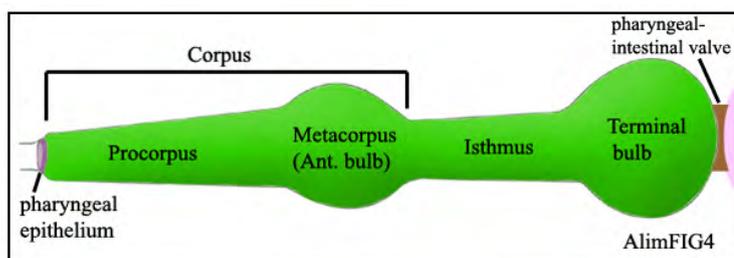


Abbildung 4. Darstellung des Pharynx als schematische Zeichnung (oben) und als DIC Bild (unten)

Der Darm besteht aus 20 Epithelzellen mit apikalen Mikrovilli. Die intestinalen Epithelzellen sezernieren Verdauungsenzyme und absorbieren Nährstoffe.

Das Rektum besteht aus fünf Epithelzellen und in Verbindung mit weiteren Muskelzellen reguliert es die Defäkation.

Das Reproduktionssystem

Die Gonade der adulten Hermaphroditen besteht aus zwei U-förmigen Schläuchen, die über die Spermathek mit einem gemeinsamen Uterus verbunden sind. Die Gonaden sind von Epithelzellen umgeben, die man als „sheath cells“ bezeichnet.

Die distalen Regionen eines jeden Gonadenarmes enthalten die Keimbahnzellkerne, die sich später zu Spermien oder Oozyten entwickeln. Jeder Zellkern ist umgeben von Zytoplasma und einer unvollständigen Zellmembran.

Die Population an Keimbahnzellkernen wird durch Mitose aufrechterhalten, die in der distalen Spitze der Gonade stattfindet. Als „Keimzelle“ wandern die Zellkerne anschließend entlang des Gonadenarmes und beenden ihren mitotischen Zellzyklus bevor die Meiose beginnen kann. Die Bildung der intakten Keimzellmembran (Zellularisierung) findet im proximalen Teil des Gonadenarmes statt.

Während des vierten Larvenstadiums werden ungefähr 150 Spermiden pro Gonadenarm gebildet, die als reife Spermien in der Spermathek gelagert werden.

Im adulten Wurm entstehen die fertigen Oozyten, die im proximalen Teil des Gonadenarmes angeordnet sind. Die Oozyten verweilen in der Diakinese der Prophase I bis sie den proximalen Teil des Gonadenarms erreicht haben. In der späten Phase der Oogenese durchläuft die Oozyte, welche sich in direkter Nachbarschaft zur Spermathek befindet eine meiotische Reifung. 5-6 Minuten nach Beginn der Reifung ovuliert die Oozyte in die Spermathek, wo diese fertilisiert wird. Die meiotische Teilung wird im Uterus vollendet wo unmittelbar die Embryogenese beginnt. In einem reifen Hermaphroditen findet alle 20-40 Minuten eine Ovulation statt.

Nichtverpaarte Hermaphroditen produzieren unter standardisierten Laborbedingungen somit etwa 300 Nachkommen über einen Zeitraum von 3 Tagen.

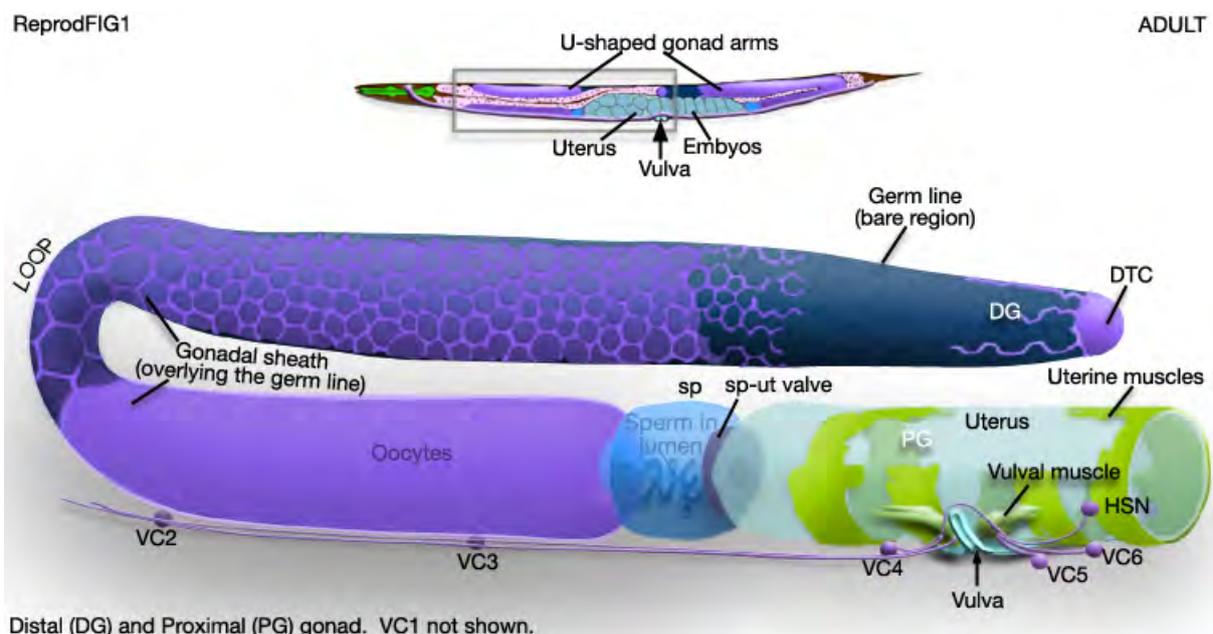


Abbildung 5. Das Reproduktionssystem von *C. elegans*

2.4. Genetische Nomenklatur

In *C. elegans* werden die Gene nach folgenden Regeln benannt: Jeder Genname besteht aus einer Buchstabenabkürzung (in der Regel drei Buchstaben, seit kurzem sind auch vier Buchstaben zugelassen), einem Minuszeichen, und einer Zahl (alles kursiv).

Die Buchstabenabkürzung gibt im Allgemeinen einen Hinweis auf den Phänotyp (z.B. Lon für ‚long‘, also längere Tiere als Wildtyp). Gene, die denselben Phänotyp hervorrufen, werden durchnummeriert. Die Zahl gibt also einen Hinweis, wie viele Gene mit diesem Phänotyp schon identifiziert wurden (z.B.: *lon-3*). Eine römische Zahl (I, II, III, IV oder V; bzw. ein X für das X-Chromosom) hinter dem Gen kennzeichnet das Chromosom, auf dem das Gen liegt.

Für jedes Gen können unabhängig mehrere Allele isoliert werden. Jede unabhängig isolierte Mutation bekommt eine Allelbezeichnung (ein oder zweikleine Buchstaben, die auf das Labor hinweisen und eine fortlaufende Nummer; alles kursiv); also z.B. *e2175*.

Jedes Labor kennzeichnet die selbst hergestellten Stämme (also auch z.B. die Stämme, die aus einer Kreuzung mit anderen mutanten Stämmen hervorgegangen sind) mit einer fortlaufenden Nummerierung. Auch hier ist die 2-3 Buchstabenabkürzung ein Hinweis, in welchem Labor der Stamm entstanden ist; z.B.: CB4123 (Großbuchstaben, nicht-kursiv).

Beispiel: Gen: *lon-3*
 Allel: *e2175*
 Stamm: CB4123
 Chromosom: V
Zusammen: CB4123: *lon-3 (e2175)V*

2.5. Punnet Quadrate

Zur Darstellung einer genetischen Kreuzung kann man ein Punnet Quadrat ausfüllen. Hier ist ein Beispiel einer Kreuzung:

Cross of $unc-22(e66)\overline{IV}$ ♀ with wildtype N2 ♂

The $unc-22$ mutant hermaphrodites are homozygote mutant.

Their gametes are: $unc-22$

Chromosome \overline{IV} in N2 is wildtype, so their gametes are: $+$

P0

♂ \ ♀	$unc-22$	$unc-22$
	$+$	$\frac{unc-22}{+}$
$+$	$\frac{unc-22}{+}$	$\frac{unc-22}{+}$

F1

Results: all F1 animals have the same genotype: $\frac{unc-22(e66)\overline{IV}}{+}$

Question: How do the progeny of $\frac{unc-22(e66)\overline{IV}}{+}$ look like?

Gametes: $+$ or $unc-22(e66)$ [for ♀ and for ♂]

F1

♂ \ ♀	$+$	$unc-22$
	$+$	$\frac{+}{+}$
$unc-22$	$\frac{+}{unc-22}$	$\frac{unc-22}{unc-22}$

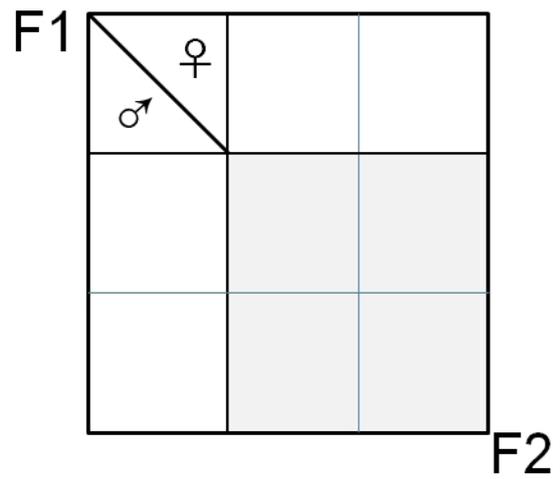
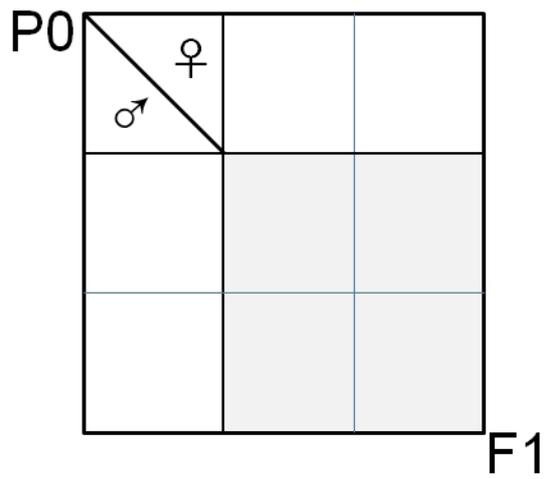
F2

Results: Phenotype: 3:1 ($unc-22$ is recessive)

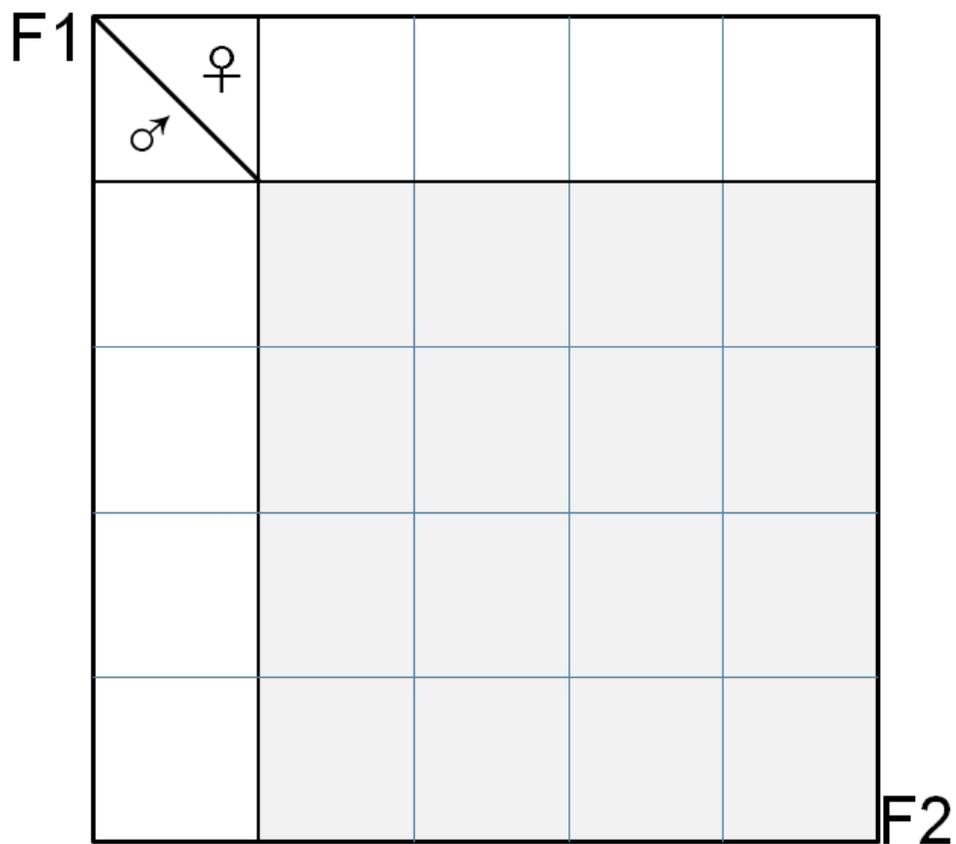
Genotype: [wildtype: mutant]

1:2:1 (25% are homozygote mutant)

Hier sind weitere Punnet Quadrate zum Üben:



Punnet Quadrat für die Segregation von zwei Merkmalen:



3. Experimente:

3.1. Kennenlernen von Wildtyp *C. elegans*

Ziel: Mit diesem Experiment sollen Sie sich mit dem Wildtyp von *Caenorhabditis elegans* vertraut machen. Mit Hilfe des Stereomikroskops können einige wichtige Gewebe unterschieden werden.

Material: Sie bekommen kleine Petrischalen auf denen Wildtyp Tiere verschiedener Stadien enthalten sind.

Aufgabe: Versuchen Sie den Aufbau und die wichtigsten Gewebe adulter Tiere zu erkennen. Auf der Platte werden adulte Hermaphroditen und Larven verschiedenen Alters sein. Die adulten Hermaphroditen erkennen Sie an der Größe (es sind die größten Tiere auf der Platte). Außerdem werden Sie erkennen, dass die adulten Hermaphroditen bereits Eier in sich tragen.

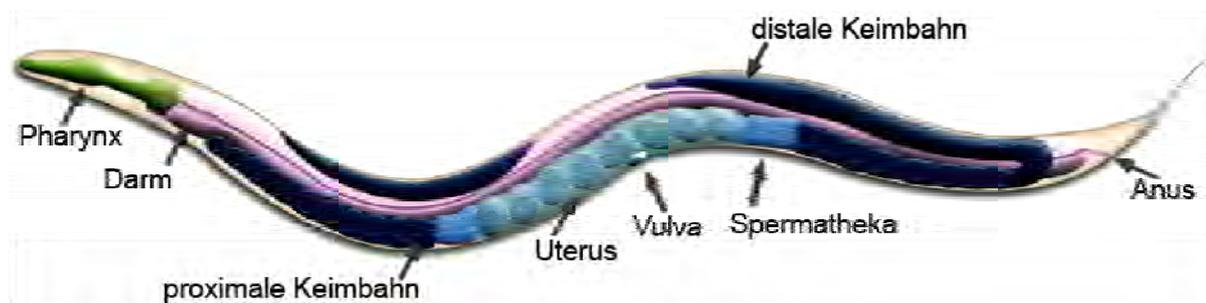


Abbildung 6. Übersicht der wichtigsten Organe eines adulten *C. elegans* Hermaphroditen

In der größten Vergrößerung lassen sich weitere Details der adulten Tiere erkennen. Am anterioren Ende befindet sich der Pharynx (Schlund). Die Mundöffnung ist von radialen Muskeln umgeben, deren Pumpbewegung bereits im Stereomikroskop zu sehen ist. Ebenfalls zu erkennen sind die zwei runden Verbreiterungen des Pharynx. Am hinteren Ende des Pharynx befinden sich zahnähnliche Strukturen (engl.: ‚grinder‘; ist mit diesem Mikroskop nicht zu sehen), die das Futter zerkleinern und in den Darm weiterbefördern.

Anschließend an den Pharynx ist der Darm zu sehen. Er erscheint deutlich dunkler als andere Gewebe (zumindest solange die Tiere genug Futter zur Verfügung haben). Der Darm zieht sich durch den ganzen Körper, je nach Körperabschnitt mehr auf der dorsalen oder ventralen Seite.

In der Körpermitte befindet sich an der ventralen Seite die Vulva, die in den adulten Tieren nicht mehr zu erkennen ist. In den L4 Larvenstadien dient die sich entwickelnde Vulva als einfachstes Erkennungsmerkmal für Hermaphroditen dieses Stadiums (dazu später mehr). Anterior und posterior der Vulva befindet sich der Uterus, der zwei oder mehr Eier beinhalten kann. Vom Uterus erstreckt sich in beide Richtungen die Keimbahn (Gonade). Jeder Gonadenarm erstreckt sich U-förmig, wobei sich der distale Teil in der Körpermitte (oder sogar darüber hinaus) befinden kann.

3.2. Unterscheidung verschiedener larvaler Stadien

Ziel: Mit diesem Experiment sollen Sie sich mit den verschiedenen Larvenstadien von *C. elegans* vertraut machen.

Material: Benutzen Sie dafür die gleichen, kleinen Petrischalen auf denen Sie gerade die adulten Tiere beobachtet haben.

Aufgabe: Versuchen Sie die verschiedenen Larvenstadien an Hand der Abbildung zu erkennen. Auf der Platte sollten Tieren aller Stadien vorhanden sein. Nachdem Sie die adulten Tiere schon unterscheiden können, suchen Sie jüngere und kleinere Tiere. Larven des ersten Stadiums (L1) sind unwesentlich größer als Eier. Sie lassen sich nur in der größten Vergrößerung des Stereomikroskops erkennen.

Die Larvenstadien bei *C. elegans*

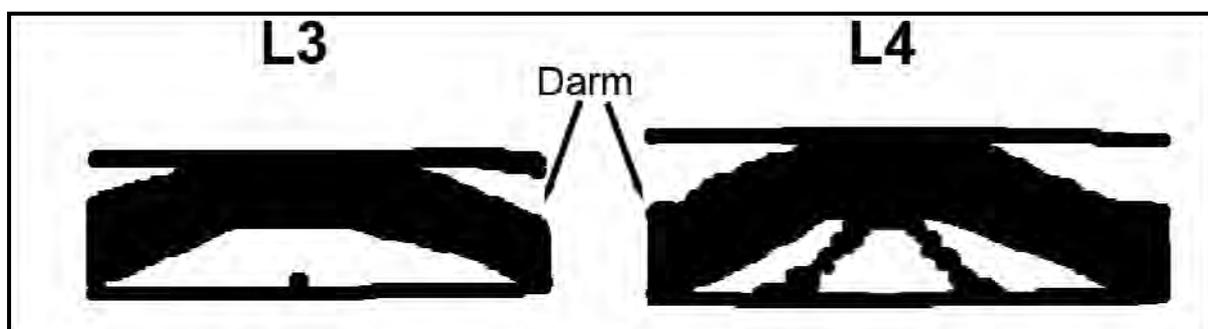
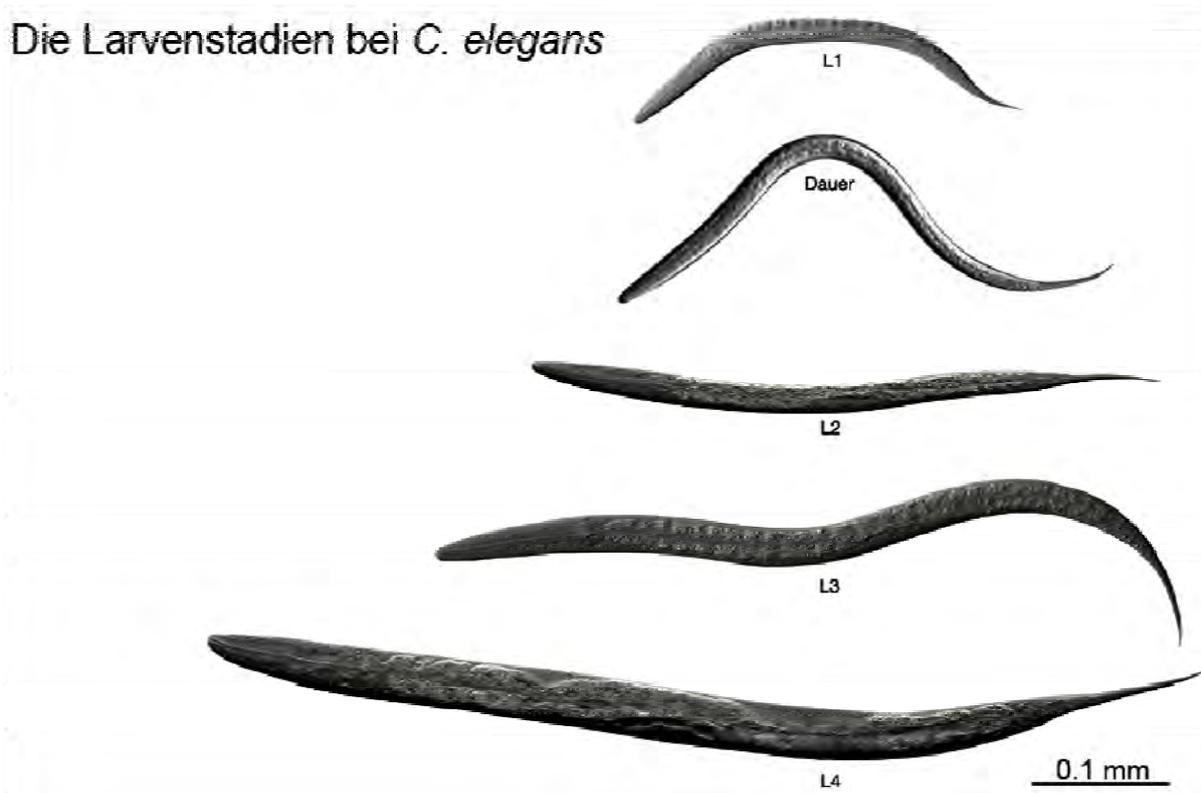


Abbildung 7. Die Abbildung zeigt die verschiedenen Larvenstadien von *C. elegans*.

Der untere Teil der Abbildung zeigt schematisch das wichtigste Erkennungsmerkmal zwischen L3- und L4-Larven. Im L4-Stadium ist in der Körpermitte auf der ventralen Seite die beginnende Invagination der Vulvazellen zu sehen.

Etwas größer und dunkler erscheinen die Larven des zweiten und dritten Larvenstadiums (L2, L3). Im Rahmen unseres Kurses ist es allerdings nicht wichtig, diese Stadien eindeutig voneinander zu unterscheiden.

Wichtig ist allerdings das Erkennen des L4 Stadiums. Hermaphroditen im vierten Larvenstadium werden für genetische Experimente (Kreuzungen) benötigt. Wie schon vorher erwähnt, entwickelt sich in diesem Stadium das Eiablageorgan, die Vulva. In L3 und L4 Tieren ist in der Körpermitte (ventral) ein hellerer Abschnitt zu erkennen. Nur in den L4 Tieren ist allerdings eine zusätzliche Struktur in Form einer Invagination (Einstülpung) zu erkennen (siehe Abbildung 7).

3.3. Erkennung von Männchen

Ziel: In diesem Experiment sollen Sie lernen Männchen von *C. elegans* zu erkennen. Das Erkennen und Isolieren von Männchen ist wichtig für das Ansetzen von Kreuzungen.

Material: Sie bekommen kleine Petrischalen auf denen Wildtyp Tiere oder Tiere einer Mutante (*him-8*) enthalten sind. Auf diesen Platten sollten sich neben den Hermaphroditen auch Männchen befinden.

Aufgabe: Versuchen Sie durch Beobachtung die Männchen auf diesen Platten zu finden. Die Morphologie der Männchen unterscheidet sich von den Hermaphroditen (siehe Abbildung). Die Männchen besitzen eine einarmige Gonade. Am Schwanz des Männchens befindet sich das Kopulationsorgan, das in Form eines Fächers zu sehen ist. Die adulten Männchen sind etwas dünner als gleichaltrige Hermaphroditen.

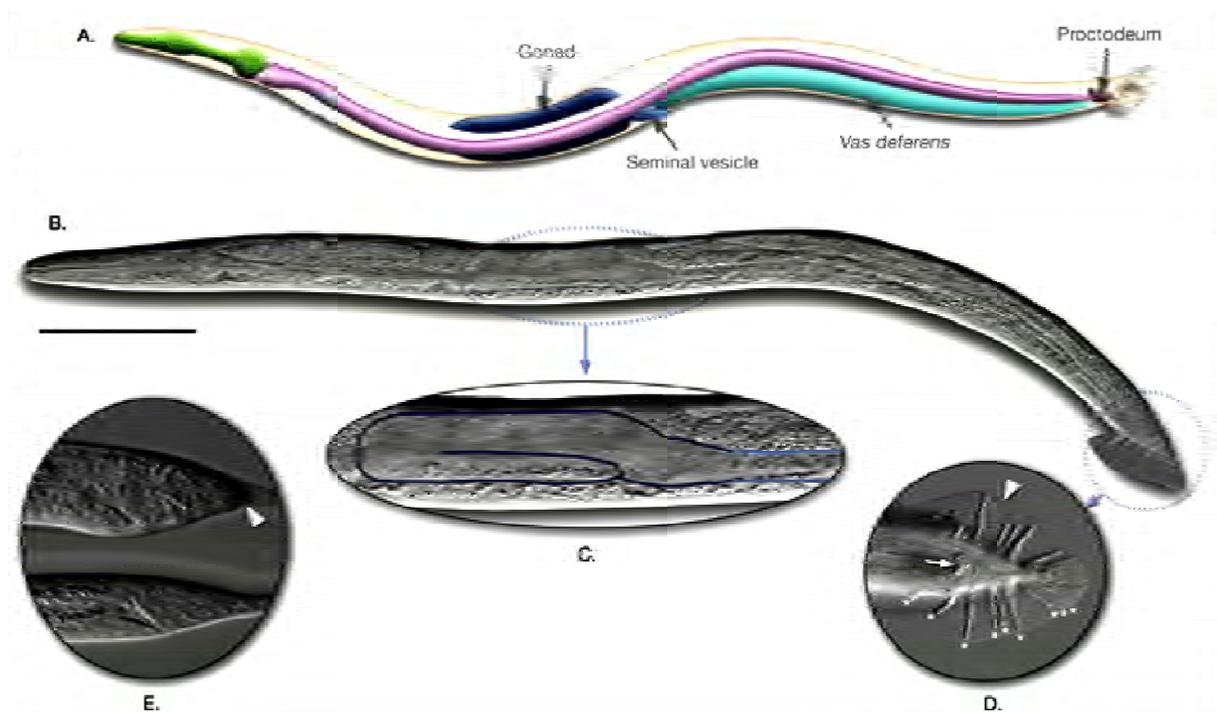


Abbildung 8. Anatomie eines *C. elegans* Männchens mit Ausschnitten von DIC Aufnahmen (B, C-E) und einer schematischen Übersicht (A).

C. elegans ist ein protandrischer Hermaphrodit (zuerst Spermatogenese, dann Oogenese) mit 5 Autosomen und zwei X-Chromosomen (Genotyp XX). Männchen (Genotyp XO) entstehen während der Meiose durch Nondisjunktion (Nichttrennung der X-Chromosomen) mit einer Häufigkeit von etwa 0.2%.

Da sich auch Hermaphroditen auf der Platte befinden, werden Sie auch das Paarungsverhalten beobachten können. Dabei erkennt das Männchen mit den sensorischen Neuronen im Schwanz ein anderes Tier. Mit dem Schwanz wird danach das Tier abgetastet, wobei das Männchen erkennt, ob es sich dabei um einen Hermaphroditen handelt. Hat das Männchen die Vulva eines Hermaphroditen gefunden kommt es zur Kopulation. Die dabei übertragenen Spermien werden in der Spermathek gesammelt und für die Befruchtung der Oozyten verwendet (bevorzugt gegenüber der eigenen Spermien).

3.4. Mutanten mit morphologischen Defekten

Ziel: Kennenlernen verschiedener Mutanten von *C. elegans*

Material: Sie bekommen kleine Petrischalen auf denen homozygot mutante Tiere verschiedener Stadien enthalten sind. Die Platten werden verschiedene Bezeichnungen enthalten, die sie in der Tabelle den entsprechenden Mutationen zuordnen sollen.

Aufgabe: Versuchen Sie durch Beobachtung die morphologischen Veränderungen der Mutanten im Vergleich zu den Wildtyp Tieren zu erkennen. Die Mutationen können zu Größenunterschieden führen, aber auch zu Veränderungen im Verhalten (z.B. im Bezug auf die Fortbewegung, die Reaktion auf leichte oder stärkere Berührungen, oder die Reaktion auf Umwelteinflüsse wie Futter oder Chemikalien).

In *C. elegans* werden Mutanten mit einer Abkürzung aus drei Buchstaben und einer Zahl gekennzeichnet, wobei die Buchstaben in Zusammenhang mit dem Phänotyp oder der molekularen Ursache der Mutation stehen.

So werden z.B. Mutanten, die sich nicht mehr normal bewegen können, als Unc bezeichnet (für: uncoordinated). Hier eine kleine Tabelle mit den häufigsten Bezeichnungen:

Kurzbezeichnung:	steht für:	Phänotyp:
Unc	<u>un</u> coordinated	Bewegung eingeschränkt (keine Bewegung möglich, nur vorwärts oder rückwärts, nur nach links, zusammenzucken oder zittern,
Dpy	<u>du</u> mpy	kurz und dick
Sma	<u>sm</u> all	kurz aber dünner als Dpy
Lon	<u>lo</u> ng	um 50% länger als Wildtyp
Egl	<u>egg</u> laying defective	Probleme mit der Eiablage (keine Vulva vorhanden, fehlende Innervierung der Vulva, Muskeldefekt,)
Him	<u>high</u> incidence of <u>ma</u> les	in den Nachkommen eines Hermaphroditen sind viele Männchen (normal sind 0.2%; bei den Him können es auch 30% Männchen sein)
Mec	<u>me</u> chanosensory abnormality	Probleme der mechanosensorischen Neuronen
Lin	<u>line</u> age defective	Fehler in dem Zellstammbaum (kann verschiedene Gewebe betreffen und daher ganz unterschiedliche Phänotypen hervorrufen)

Die Platten, die Sie bekommen, sind mit einem Buchstaben gekennzeichnet. Vergleichen Sie den Phänotyp der Tiere mit der Beschreibung der Mutanten in der folgenden Tabelle und versuchen Sie eine Zuordnung.

Mutanten:

unc-119: Das Protein UNC-119 ist in allen Nervenzellen exprimiert. UNC-119 ist wichtig für die Entwicklung des Nervensystems. Dazu gehören auch die Verzweigungen der Axone und die Bündelungen („fasciculations“). Defekte in UNC-119 führen zu Störungen der normalen Bewegung, der Chemo- und Mechanorezeption (dazu mehr im nächsten Abschnitt) und der Nahrungsaufnahme.

dpy-11: Das Protein DPY-11 ist im Zytoplasma von epidermalen Zellen lokalisiert. Die Mutation von *dpy-11* führt zu Veränderungen der Körperstruktur und beeinträchtigt die Ausbildung der Rays (=Fächer der Schwanzregion). Die Hermaphroditen erscheinen kürzer und dicker als Wildtyp Tiere.

rol-6: ROL-6 ist ein Kollagen, welches mit dem menschlichen Kettenvorläuferprotein Kollagen-Alpha-1(III) verwandt ist. Es wird in der Epidermis exprimiert. Defekte in ROL-6 führen zu einer Bewegungsstörung, bei der sich die mutanten Würmer immer um die eigene Achse drehen (rollen).

him-8: Wie oben in der Tabelle für Him-Mutanten schon erwähnt, führen auch Defekte in HIM-8 zu einer deutlich höheren Anzahl von Männchen in der Nachkommenschaft als das bei Wildtyp Tieren zu beobachten ist. HIM-8 besitzt ebenfalls zwei

Zinkfingerdomänen. HIM-8 ist wichtig für die Paarung der homologen X-Chromosomen während der Meiose. In *him-8* Mutanten kommt es daher häufiger zu einem Verlust eines X-Chromosoms. Nach der Befruchtung entsteht so ein XO Tier (Männchen).

egl-1: Mutationen in *egl-1* führen zu einem Defekt in der Eiablage (*bag-of-worms*). Der Defekt beruht auf dem Absterben einer Nervenzelle (HSN), die für die Eiablage im Hermaphroditen notwendig ist. EGL-1 ist ein Regulator des programmierten Zelltodes (Apoptose). Defekte in *egl-1* führen zu einem Ausbleiben des Zelltodes. Unser Allel ist eine *gain-of-function* (Überproduktion) und führt zum Absterben der HSN-Nervenzelle.

unc-25: *unc-25* kodiert für ein Protein, welches als Neurotransmitter wirkt. Die Tiere zeigen eine unkoordinierte Bewegung, wobei die normale Vorwärtsbewegung nur schwach betroffen ist. Sie zeigen jedoch nach einer leichten Berührung im Kopfbereich eine ‚*shrinker*‘-Reaktion, in der sich der Wurm zusammenzieht und kürzer erscheint. Diese Reaktion kommt durch einen Defekt in den D-Neuronen zustande, die zwischen den dorsalen und ventralen verlaufen.

3.5. Mutanten mit mechanosensorischen Defekten

Ziel: In diesem Experiment sollen Sie Mutanten testen, die Defekte in den mechanosensorischen Nervenzellen besitzen.

Material: Sie bekommen kleine Petrischalen auf denen Wildtyp Tiere oder Mutanten in den folgenden Gene enthalten sind: *mec-3(e1338)*, *osm-6(p811)*, *che-3(e1378)*. Außerdem benötigen wir für dieses Experiment sogenannte ‚Wimpernpicks‘, die wir selbst herstellen werden.

Aufgabe: In diesem Experiment werden wir Unterschiede im Verhalten testen, das durch direkten Kontakt mit dem Tier ausgelöst wird.

Einführung: Das mechanosensorische Nervensystem von *C. elegans*

Die 302 Nervenzellen im erwachsenen Tier ermöglichen durchaus komplexe Verhaltenweisen. *C. elegans* besitzt verschiedene primitive Sinnesorgane, die als Mechano-, Thermo- und Chemorezeptoren fungieren. Mit Hilfe der Laser-Mikrochirurgie konnten einzelne Neuronen oder Neuronengruppen bestimmten Rezeptoren zugeordnet werden. Die an den unterschiedlichen Rezeptoren beteiligten Gene wurden mit Hilfe genetischer Screens und darauffolgender Verhaltensstudien identifiziert.

Das somatosensorische System von *C. elegans* besteht aus 3 Klassen mechanosensorischer Neuronen (siehe Abb. X):

- I. Die Neuronen ALM, AVM, PLM und PVM besitzen sensorische Endigungen aus 15-Protofilament Mikrotubuli und werden als „Mikrotubuli Berührungssinneszellen“ bezeichnet. ALM und AVM sind mechanosensorische Neuronen im anterioren, PLM und PVM im posterioren Bereich des Wurmes.
- II. Die Neuronen ASH, FLP und OLQ besitzen mit Cilien besetzte sensorische Endigungen und sind für den Fluchreflex des Wurmes verantwortlich, welcher durch die Berührung der Nase ausgelöst wird.
- III. PVD hat undifferenzierte sensorische Endigungen und ist nur bei sehr starken mechanischen Stimuli involviert.

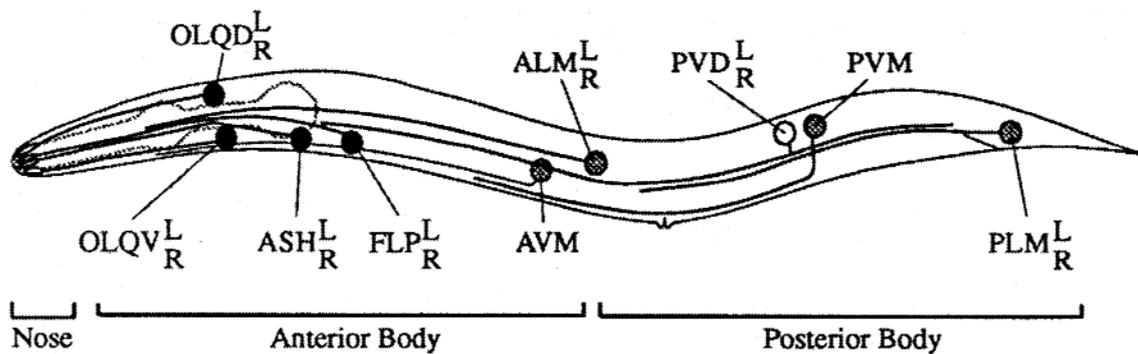
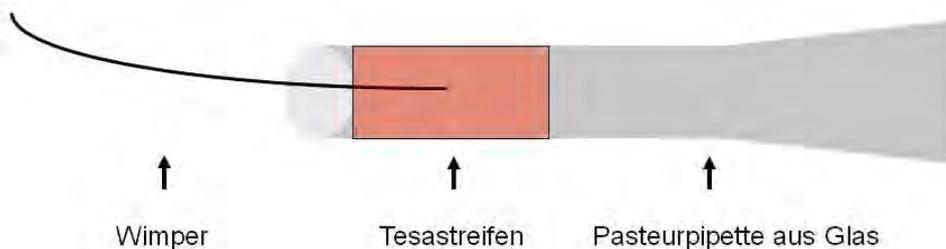


Abbildung 9. Das somatosensorische System von *C. elegans* und seine drei Klassen von mechanosensorischen Neuronen (Kaplan & Horvitz, 1993).

Herstellung eines ‚Wimpernpicks‘:

Nehmen Sie eine Wimper und kleben diese mit einem kleinen Tesastreifen die Wimper an das Ende einer Glas-Pasteurpipette, so dass mindestens die Hälfte der Wimper frei ist.



3.5.1. Test 1: „Berührungs-Sensitivitäts-Test“ (Mechanosensation assay)

Nach Chalfie & Sulston, Dev Biol, 1981

Material:

- NGM Wurmplatten beimpft mit *E. coli* OP50
- Wimper an einer Pasteurpipette

Stämme:

- 1) N2 (Bristol) als Wildtyp
- 2) *mec-3(e1338)*

Übung:

Testen Sie 4 adulte Würmer beider Stämme mit Hilfe einer Wimper auf Berührungssensitivität.

Dazu berühren Sie mit der Spitze der Wimper einmal die anteriore und dann die posteriore Hälfte des Tieres. Reagiert ein Tier nach jeder anterioren Berührung mit einer Rückwärtsbewegung und nach einer posterioren Berührung mit einer Vorwärtsbewegung, wird dieses Ergebnis als positive Reaktion gewertet. Diesen ‚Doppeltest‘ wiederholen sie 10x bei demselben Tier. Halten sie für ihr Protokoll fest, wie oft der Test positiv ausgefallen ist (1 aus 10, 2 aus 10,..oder 10 aus 10). Wiederholen Sie dies mit 4 weiteren Tieren von jedem Stamm. Werten Sie beide Stämme aus (Durchschnittswert pro Stamm).

3.5.2. Test 2: „Nasenberührungs-Test“ (Nose touch assay)

Nach Kaplan & Horvitz, PNAS, 1993

Material:

- NGM Wurmplatten beimpft mit *E. coli* OP50
- Wimper an einer Pasteurpipette

Stämme:

- 1) N2 (Bristol) als Wildtyp
- 2) *osm-6(p811)*
- 3) *che-3(e1378)*

Übung:

Testen Sie 10 adulte Würmer von jedem Stamm je einmal mit Hilfe einer Wimper auf die Reaktion einer Nasenberührung. Dazu halten Sie die Wimper flach (waagrecht) vor ein sich vorwärts bewegendes Tier und verursachen somit eine „Nasen-Kollision“.

Reagieren die Tiere eines Stammes 10 Mal in Folge mit einer Ausweich- oder Rückwärtsbewegung, wird dieses Ergebnis als 100% Reaktion gewertet (10 aus 10). Werten Sie alle drei Stämme aus.

3.6. Auswertung zweier Kreuzungsexperimente

Ziel: Durch die Auswertung zweier Kreuzungsexperimente stellen wir allgemeine Gesetze und Prinzipien der Genetik mit unserem Modellorganismus dar. Nachvollziehbar sind im Einzelnen:

- die 1. Mendelsche Regel (Uniformität der F1)
- die 2. Mendelsche Regel (Verteilung der Merkmale in der F2)
- Geschlechtsgebundene Vererbung
- die Begriffe Phänotyp und Genotyp
- Kopplung von Merkmalen
- Selbstbefruchtung und Fremdbefruchtung bei *C. elegans*, einem protandrischen Zwitter
- Bestimmung des formalgenetischen Abstandes zweier Merkmale durch Messung der Rekombinationsfrequenz in der Einheit cM (Zentimorgan)
- die genetische Nomenklatur von *C. elegans*: wie werden Kreuzungen und Genotypen korrekt dargestellt

Das erste der beiden Kreuzungsexperimente (A) verwendet zwei ungekoppelte rezessive Mutationen, während das zweite (B) die gekoppelte Vererbung zweier rezessiver Merkmale darstellt. In beiden Kreuzungen werden homozygote Doppelmutanten mit dem Phänotyp Dpy („*dumpy*“ für kurz und dick) und dem Phänotyp Unc (*uncoordinated*, also bewegungsdefekte Tiere) als Ausgangsmaterial eingesetzt. Dieses Ausgangsmaterial nennen wir P0, denn es bezeichnet die parentale Generation.

In unserem Experiment erhalten wir eine erste filiale Generation (F1) durch Verpaaren der doppelmutanten Hermaphroditen mit Männchen des Wildtyps. Der Genotyp der P0 ist für Kreuzung A *dpy-11; unc-7*, für Kreuzung B ist er *dpy-11 unc-42*. In beiden Experimenten werden hybride Tiere der F1 vereinzelt. Durch Selbstbefruchtung entsteht dann die filiale Generation 2 (F2).

3.6.1. Auswertung der F1-Generation (getrennt für Kreuzung A und Kreuzung B durchzuführen)

- 1.) Zählen Sie die Tiere der F1 mit dem doppelten Phänotyp *dumpy uncoordinated* getrennt nach Geschlechtern. Wie ist das Verhältnis der Geschlechter dieser Phänotypen?
- 2.) Zählen Sie die Tiere mit dem wildtypischen Phänotyp nach den beiden Geschlechtern getrennt. Wie ist das Verhältnis der Geschlechter dieser Phänotypen?
- 3.) Zählen Sie die Tiere der F1 mit dem einfachen Phänotyp *dumpy* getrennt nach Geschlechtern. Wie ist das Verhältnis der Geschlechter dieser Phänotypen?
- 4.) Zählen Sie die Tiere der F1 mit dem einfachen Phänotyp *uncoordinated* getrennt nach Geschlechtern. Wie ist das Verhältnis der Geschlechter dieser Phänotypen?
- 5.) Bestimmen Sie aus den nun vorliegenden Zahlen das prozentuale Verhältnis der Geschlechter der F1 ohne Berücksichtigung der in 1.) untersuchten Tiere mit dem doppelten Phänotyp.
- 6.) Bestimmen Sie aus den vorliegenden Zahlen das prozentuale Verhältnis der in 1.) ermittelten Tiere zur Gesamtzahl der F1. Welche Bedeutung hat diese Zahl?

A)

	<i>dpy-11; unc-7</i>	<i>wt</i>	<i>dpy-11</i>	<i>unc-7</i>
Hermaphroditen				
Männchen				

B)

	<i>dpy-11 unc-42</i>	<i>wt</i>	<i>dpy-11</i>	<i>unc-42</i>
Hermaphroditen				
Männchen				

3.6.2. Auswertung der F2-Generation (getrennt für Kreuzung A und Kreuzung B durchzuführen)

- 1.) Bestimmen Sie das Verhältnis der Phänotypen für die nicht-gekoppelte Vererbung (A) und die gekoppelte Vererbung (B).

A)

	<i>wt</i>	<i>dpy-11; unc-7</i>	<i>dpy-11</i>	<i>unc-7</i>
Hermaphroditen				

B)

	<i>wt</i>	<i>dpy-11 unc-42</i>	<i>dpy-11</i>	<i>unc-42</i>
Hermaphroditen				

2.) Bestimmen Sie für (B) aus der Frequenz der Rekombinationsereignisse den formalen genetischen Abstand von *dpy-11* und *unc-42*.

1 cM (Zentimorgan) entspricht einem Prozent Rekombination pro Meiose.