

# Karakterisatie van neuromedine U-, tachykinine- en GnRH-verwante receptoren bij *Caenorhabditis elegans*

**Elien VAN SINAY**

Promotor: Prof. Dr. L. Schoofs  
Begeleider: Ir. L. Froominckx

Proefschrift ingediend tot het  
behalen van de graad van  
Master of Science in de  
biochemie en de biotechnologie

Academiejaar 2012-2013

---

© Copyright by K.U.Leuven

Zonder voorafgaande schriftelijke toestemming van zowel de promotor(en) als de auteur(s) is overnemen, kopiëren, gebruiken of realiseren van deze uitgave of gedeelten ervan verboden. Voor aanvragen tot of informatie i.v.m. het overnemen en/of gebruik en/of realisatie van gedeelten uit deze publicatie, wend u tot de K.U.Leuven, Faculteit Wetenschappen, Geel Huis, Kasteelpark Arenberg 11, 3001 Leuven (Heverlee), Telefoon +32 16 32 14 01.

Voorafgaande schriftelijke toestemming van de promotor(en) is eveneens vereist voor het aanwenden van de in dit afstudeerwerk beschreven (originele) methoden, producten, schakelingen en programma's voor industrieel of commercieel nut en voor de inzending van deze publicatie ter deelname aan wetenschappelijke prijzen of wedstrijden.

## DANKWOORD

Bij de aanvang van dit eindwerk wil ik een dankwoord richten tot allen die hebben bijgedragen tot de realisatie ervan en die mij hebben gesteund gedurende deze periode.

Helemaal bovenaan het lijstje prijkt mijn begeleidster, Lotte Frooninckx. Steeds weer stond ze klaar met goede raad en moedigde ze me aan bij elke stap die ik zette. Haar toewijding en onuitputtelijke enthousiasme maakten van mijn laatste jaar er eentje om niet meer te vergeten. In het bijzonder wens ik ook mijn promotor, professor Liliane Schoofs, te bedanken voor het wekken van mijn interesse voor dit onderzoeksdomein en het kritisch evalueren van deze tekst. Nick Suetens en Luc Vanden Bosch ben ik dankbaar voor de vele praktische hulp, alsook Joost Van Duppen en Sven Zels voor het sequencen van mijn stalen. Maar ook alle anderen van het HSV labo verdienen een eervolle vermelding. Jullie zorgden voor een aangename sfeer en gaven deze ervaring net dat tikkeltje meer! Tevens een ‘dikke merci’ aan alle mede-thesisstudenten, voor hun luisterend oor en de oppeppende gesprekken.

Dit is ook een uitgelezen kans om mijn ouders en familie eens in de bloemetjes te zetten. Ondanks dat jullie nooit helemaal precies wisten wat ik deed, heb ik steeds op jullie onvoorwaardelijke steun kunnen rekenen.

Tot slot wil ik me graag nog even richten tot mijn lieve vriend, Vincent. Dankjewel voor je interesse, je optimisme en de ontspannende momenten. Dankjewel voor de morele steun en de aanmoedigingen tijdens mijn studietijd en bij de tot standkoming van dit eindwerk. Dankjewel om steeds weer in mij te geloven.

## INHOUDSOPGAVE

Dankwoord .....	ii
Lijst met gebruikte afkortingen .....	vi
Lijst met figuren .....	viii
Lijst met geraadpleegde elektronische bronnen .....	x
I. Inleiding en doelstelling.....	1
II. Literatuurstudie .....	3
1. <i>C. elegans</i> .....	3
1.1 <i>C. elegans</i> als modelorganisme .....	3
1.2 Levenscyclus .....	4
1.3 Anatomie .....	6
2. G-proteïne-gekoppelde receptoren (GPCRs) .....	9
2.1 Inleiding .....	9
2.2 Structuur en classificatie .....	9
2.3 Signalering via GPCRs .....	10
2.4 Ontwezing van GPCRs .....	11
3. Neuropeptiden .....	13
3.1 Neuropeptiden bij <i>C. elegans</i> .....	14
3.2 Gonadotropine-releasing hormoon en adipokinetisch hormoon .....	15
3.3 De tachykinine peptidenfamilie.....	17
3.4 De neuromedine U/pyrokinine peptidenfamilie .....	20
3.5 De thyrotropine-releasing hormoon peptidenfamilie .....	22
III. Materialen en methoden .....	23
1. <i>C. elegans</i> kweek.....	23
1.1 Gebruikte <i>C. elegans</i> stammen.....	23
1.2 Cultuur op Nematode Growth Medium (NGM) .....	23
1.3 Cultuur van mannetjes .....	24
1.4 Invriezen van wormen.....	25
2. Kloneren van weesreceptoren.....	26
2.1 Amplificatie van het receptor cDNA.....	26
2.2 Agarose gelelektroforese .....	27
2.3 TOPO TA klonering en transformatie van competente <i>E. coli</i> cellen .....	28
2.3.1 TOPO TA klonering.....	29
2.3.2 Transformatie van competente TOP10 cellen .....	29
2.3.3 Transformatie van competente DH5 $\alpha$ cellen .....	30
2.4 Kolonie PCR .....	30
2.5 Opzuiveren van het plasmide DNA door middel van miniprep.....	31
2.6 Sequentiebepaling van het insert op basis van de Sanger methode .....	32
2.7 Opzuiveren van endotoxine-vrij plasmide DNA op grote schaal door middel .. van maxiprep .....	34
3. Cellulaire assays voor het ontwezen van GPCRs .....	35

3.1	Aequorine bioluminescentie screening.....	35
3.1.1	Celkweek van CHO-WTA11 en CHO-PAM28 cellen .....	35
3.1.2	Transfectie van CHO-WTA11 en CHO-PAM28 cellen .....	36
3.1.3	Aequorine bioluminescentie screening .....	37
3.2	CRE-luciferase reporter assay .....	39
3.2.1	Celkweek van HEK 293T cellen .....	39
3.2.2	Transfectie van HEK 293T cellen .....	39
3.2.3	cAMP metingen met behulp van een CRE-luciferase reporter assay..	40
4.	Analyse van NaCl chemotaxis en bewegingsactiviteit bij deletiemutanten.....	42
4.1	Uitkruisen van een mutante <i>C. elegans</i> lijn .....	42
4.2	'Single worm' PCR .....	43
4.3	Synchronisatie van <i>C. elegans</i> .....	44
4.4	Analyse van NaCl chemotaxis.....	45
4.5	Analyse van bewegingsactiviteit.....	48
5.	Aanmaak van GFP reporterconstructen .....	50
5.1	Aanmaak van GFP reporterconstructen in een pSM vector.....	50
5.1.1	Amplificatie van het receptor gDNA en de promoter .....	51
5.1.2	Restrictie .....	52
5.1.3	Defosforylatie .....	53
5.1.4	Ligatie en transformatie van competente <i>E. coli</i> cellen .....	53
5.1.5	Kolonie PCR .....	54
5.2	Aanmaak van GFP reporterconstructen met behulp van de PCR fusie .....	55
5.2.1	Amplificatie van het <i>GFP</i> gen en de promoter van het doelwitproteïne... .....	56
5.2.2	Fusie van het geamplificeerde promoter DNA en GFP .....	58
5.2.3	Lithiumchloride clean-up .....	58
5.2.4	Micro-injectie.....	59
IV.	Resultaten.....	60
1.	Kloneringen.....	61
1.1	Een kandidaat neuromedine U/pyrokinine receptor (NMUR-1).....	61
1.1.1	<i>In silico</i> data-analyse.....	61
1.1.2	Klonering.....	61
1.2	Een kandidaat TRH receptor (NMUR-4).....	62
1.2.1	<i>In silico</i> data-analyse.....	62
1.2.2	Klonering.....	62
2.	Ontwezen van receptoren .....	63
2.1	De GnRH-verwante receptoren.....	63
2.2	Een kandidaat tachykinine receptor (CE16937) .....	64
2.3	Een kandidaat tachykinine receptor (TKR-1).....	66
2.4	Een kandidaat neuromedine U/pyrokinine receptor (NMUR-1).....	66

2.5	Een kandidaat TRH receptor (NMUR-4).....	67
3.	Analyse van NaCl chemotaxis en bewegingsactiviteit bij deletiemutanten.....	67
3.1	Uitkruisen van de mutante <i>C. elegans</i> lijn C49A9.7( <i>ok1620</i> ) deficiënt in de ... tachykinine receptor.....	67
3.2	Analyse van NaCl chemotaxis.....	68
3.3	Analyse van bewegingsactiviteit.....	71
4.	Aanmaak van GFP reporterconstructen in een pSM vector.....	72
4.1	GFP reporterconstruct voor de NMUR-1 receptor .....	72
4.2	GFP reporterconstruct voor de tachykinine-achtige receptor CE16937 .....	73
5.	Aanmaak van GFP reporterconstructen met behulp van de PCR fusie techniek ..	73
5.1	GFP reporter construct voor de tachykinine-achtige receptor CE16397.....	73
5.2	GFP reporterconstruct voor de tachykinine neuropeptide precursor.....	74
V.	Discussie .....	76
1.	Kloneringen.....	76
1.1	Een kandidaat neuromedine U/pyrokinine receptor (NMUR-1).....	76
1.2	Een kandidaat TRH receptor (NMUR-4).....	76
2.	Ontwezen van receptoren .....	77
2.1	De GnRH-verwante receptoren.....	77
2.2	Een kandidaat tachykin receptor (CE16937).....	77
2.3	Een kandidaat tachykin receptor (TKR-1) .....	80
2.4	Een kandidaat neuromedine U/pyrokinine receptor (NMUR-1).....	80
2.5	Een kandidaat TRH receptor (NMUR-4).....	82
3.	Analyse van NaCl chemotaxis.....	82
4.	Analyse van bewegingsactiviteit.....	83
5.	Aanmaak van GFP reporterconstructen .....	84
VI.	Samenvatting.....	86
VII.	Summary .....	87
VIII.	Referenties .....	88
IX.	Addendum .....	94
1.	Risicoanalyse.....	94
2.	Synthetische peptiden gebruikt voor het ontwezen van <i>C. elegans</i> GPCRs .....	96
3.	Figuren .....	103

## LIJST MET GEBRUIKTE AFKORTINGEN

AC	adenylaat cyclase
ACh	acetylcholine
AKH	adipokinetisch hormoon
BGH	runder groeihormoon
BSA	runder serumalbumine
cAMP	cyclisch adenosinemonofosfaat
CGC	Caenorhabditis Genetics Center
CHO-cellen	Chinese hamster ovariumcellen
CRE	cAMP response element
CRH	corticotropine-releasing hormoon
DAG	diacylglycerol
DCV	<i>dense-core vesicle</i>
EKA	endokinine A
EKB	endokinine B
EKC	endokinine C
EKD	endokinine D
EMS	ethylmethaansulfonaat
FSH	follikelstimulerend hormoon
GABA	$\gamma$ -aminoboterzuur
GDP	guanosinedifosfaat
GFP	groen fluorescent proteïne
GTP	guanosinetrifosfaat
GnRH	gonadotropine-releasing hormoon
GnRHR	gonadotropine-releasing hormoon receptor
GPCR	G-proteïne-gekoppelde receptor
HEK-cellen	humane embryonale niercellen
HK-1	hemokinine-1
HK-1(4-11)	hemokinine-1 residu 4 tot en met 11
icv	intracerebroventriculair
IP <sub>3</sub>	inositol 1,4,5-trisfosfaat
IPC	insuline producerende cel
LH	luteïniserend hormoon
MALDI-TOF MS	matrix geassisteerde laser desorptie/ionization vluchttijd massaspectrometrie
MCS	multipele kloneringssite
NKA	neurokinine A
NKB	neurokinine B
NMS	neuromedine S

NMU	neuromedine U
NMUR	neuromedine U receptor
NP $\gamma$	neuropeptide $\gamma$
NPK	neuropeptide K
PCR	polymerase kettingreactie
PIP <sub>2</sub>	fosfatidylinositol 4,5-bisfosfaat
PLC $\beta$	fosfolipase C $\beta$
PK	pyrokinine
PKA	proteïne kinase A
PKC	proteïne kinase C
PKR	pyrokinine receptor
PVK	periviscerokinine
RP-HPLC	<i>reversed phase</i> hoge druk vloeistofchromatografie
SEM	standard error of the mean
SP	substantie P
SSV	kleine synaptische vesikels
TAC	tachykinine precursorgen
TRH	thyrotropine-releasing hormoon
TRP	tachykinine gerelateerd peptide
TSH	thyroïd stimulerend hormoon
UTR	onvertaalde regio
UV/TMP	ultraviolet trimethylpsoralen



## LIJST MET FIGUREN

- Figuur 1 Levenscyclus van *C. elegans* bij 22-25°C.
- Figuur 2 Anatomie van een adulte hermafrodit en een adult mannetje.
- Figuur 3 De 3 klassieke G-proteïne gemedieerde signaaltransductiewegen.
- Figuur 4 De omgekeerde farmacologie strategie voor de ontwezing van GPCRs.
- Figuur 5 Kruisingsschema met als doel het aantal achtergrondmutaties in de mutante *C. elegans* lijnen te verminderen.
- Figuur 6 Aanmaak van een PCR fusieconstruct.
- Figuur 7 Voorspelling van de zeven transmembranaire structuur van de NMUR-1 receptor.
- Figuur 8 Elektroforetisch gescheiden 200 bp DNA ladder (links) en PCR-product bij annealingstemperatuur van 50°C (a), 55°C (b) en 60 °C (c).
- Figuur 9 Elektroforetisch gescheiden 200 bp DNA ladder (links) en insert in een pcDNA3.1/V5-His-Topo vector.
- Figuur 10 Voorspelling van de zeven transmembranaire structuur van de NMUR-4 receptor.
- Figuur 11 Dosis-respons curves van het effect van de peptiden TK-1 en TK-2 op de *C. elegans* CE16937 receptor geëxprimeerd in CHO-WTA11 cellen geïncubeerd bij 37°C en 28°C (aequorine bioluminescentie screening).
- Figuur 12 Dosis-respons curves van het effect van de peptiden TK-1 en TK-2 op de *C. elegans* CE16937 receptor geëxprimeerd in HEK 293T cellen geïncubeerd bij 37°C (CRE-luciferase reporter assay).
- Figuur 13 Dosis-respons curves van het effect van het peptide nlp-44a op de *C. elegans* NMUR-1 receptor geëxprimeerd in CHO-WTA11 cellen geïncubeerd bij 37°C en 28°C (aequorine bioluminescentie screening).
- Figuur 15 De gemiddelde chemotaxis index voor 25 mM NaCl van naïeve wild type N2, *osm-9(ky10)* en C49A9.7(*ok1620*) wormen.
- Figuur 16 De gemiddelde chemotaxis index voor 25 mM NaCl van NaCl geconditioneerde wild type N2, *osm-9(ky10)* en C49A9.7(*ok1620*) wormen.
- Figuur 17 De gemiddelde chemotaxis index voor 25 mM NaCl van naïeve (open balken) en NaCl geconditioneerde (gevulde balken) wild type N2, *osm-9(ky10)* en C49A9.7(*ok1620*) wormen.
- Figuur 18 De gemiddelde bewegingsactiviteit per worm voor wild type N2 wormen en CE16937 deletiemutanten in vloeibaar medium.
- Figuur 19 Elektroforetisch gescheiden 1 kb DNA ladder (links) en fusie PCR-product bij annealingstemperatuur van 60°C (a, b en c).
- Figuur 20 Elektroforetisch gescheiden 1 kb DNA ladder (links) en fusie PCR-product bij annealingstemperatuur van 50°C (a, b en c).

- Figuur 21 Lokalisatie van de tachykinine neuropeptide precursor met behulp van een GFP fusieconstruct.
- Figuur a Bioluminescentie toename geïnduceerd door TK-1 en TK-2 in CE16937 CHO-WTA11 expresserende cellen bij 37°C in functie van de tijd (aequorine bioluminescentie screening).
- Figuur b Bioluminescentie toename geïnduceerd door TK-1 en TK-2 in CE16937 CHO-PAM28 expresserende cellen bij 37°C in functie van de tijd (aequorine bioluminescentie screening).
- Figuur c Bioluminescentie toename geïnduceerd door nlp-44a in NMUR-1 CHO-WTA11 expresserende cellen bij 37°C in functie van de tijd (aequorine bioluminescentie screening).
- Figuur d De sequentie van het C49A9.7 gen dat codeert voor een tachykinine-achtige receptor (CE16937).

## **LIJST MET GERAADPLEEGDE ELEKTRONISCHE BRONNEN**

<http://www.wormatlas.org>

<http://www.wormbase.org>

<http://www.wormbook.org>

<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM>

<http://www.promega.com/techserv/tools/biomath/calc05.htm>

<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>

## I. INLEIDING EN DOELSTELLING

Communicatie tussen cellen onderling en tussen cellen en hun omgeving is essentieel voor de regulatie van fundamentele biologische processen zoals bv. groei, metabolisme, reproductie, homeostase, gedrag en ontwikkeling. Deze communicatie verloopt via signaaltransductiewegen, waarbij een extracellulair signaal wordt gedetecteerd door een functionele membraanreceptor, die een intracellulair signaal voortbrengt. G-proteïne gekoppelde receptoren (GPCRs) vertegenwoordigen de grootste familie van membraanreceptoren en vormen vandaag de belangrijkste groep van moleculaire doelwitmoleculen voor zowel chemische bestrijdingsmiddelen in de landbouw als therapeutische geneesmiddelen. Daarom is en blijft de identificatie en karakterisatie van GPCRs één van de hoofddoelen van wetenschappelijk onderzoek in de industrie en in vele academische instellingen. Een groot aantal GPCRs wordt geactiveerd door neuropeptidische liganden. Dit zijn kleine proteïnen die geproduceerd worden door zenuwcellen en dienen als neuromodulators en neurotransmitters.

De kleine bodemnematode *Caenorhabditis elegans* is een ideaal modelorganisme in de studie van dergelijke neuropeptidische signaalsystemen. Het zenuwstelsel van deze rondworm bestaat uit slechts 302 neuronen bij volwassen hermafrodieten. Dit kan erg eenvoudig lijken, maar desondanks zijn de biochemische signaalprocessen verrassend gelijkend aan deze in meer complexe organismen, inclusief die bij de mens. Dankzij de publicatie van het volledige *C. elegans* genoom werd het bovendien mogelijk om nieuwe leden van de GPCR familie en hun neuropeptidische liganden *in silico* te voorspellen op basis van sequentiegelijkenissen met hun homologe genen in vertebraten en insecten (The *C. elegans* Sequencing Consortium, 1998). De voorspellingen geven aan dat 7% van de voorspelde proteïne-coderende genen in het *C. elegans* genoom GPCRs vertegenwoordigen (Schiöth & Fredriksson, 2005). Deze GPCRs behoren allen tot de rhodopsine en secretine familie. Daarnaast werden tot op heden 119 neuropeptide-precursorgenen geïdentificeerd (Husson *et al.*, 2007). Ondanks deze voorspellingen zijn er nog een groot aantal nematode GPCRs waarvan het endogene ligand niet gekend is, de zogenaamde weesreceptoren. Het zoeken naar de onbekende liganden van dergelijke weesreceptoren wordt bijgevolg ontwezen genoemd.

Deze studie beoogt de karakterisatie van vier neuropeptidische signaalwegen bij *C. elegans*. De eerste signaalweg is homoloog met de gonadotropine-releasing hormoon (GnRH) signaalweg bij vertebraten en de adipokinetisch hormoon (AKH) signaalweg bij insecten. Het genoom van *C. elegans* codeert voor acht GnRH-achtige receptoren (GNRR-1 tot en met GNRR-8). Eén van de voorspelde GnRH-achtige receptoren, GNRR-1, werd reeds ontweesd door Lindemans *et al.* (2009a). Zij toonden bovendien aan dat het downreguleren van de receptor en/of het ligand nlp-47 via RNAi

zorgt voor uitstel van het eileggedrag. Om meer inzicht te krijgen in de endocriene signalen die de reproductie regelen, trachten we de overige voorspelde *C. elegans* GnRH-achtige receptoren (GNRR-2, GNRR-3, GNRR-5, GNRR-7 en GNRR-8) te ontwezen.

Verder bestuderen we in deze studie twee tachykinine-achtige receptoren (CE16937 en TKR-1). We trachten beide GPCRs te ontwezen en de aanmaak van GFP lokalisatieconstructen laat ons toe om het *in vivo* expressiepatroon van de CE16937 receptor en zijn liganden te bepalen. Via diverse fenotyperingsexperimenten van een deletiemutant van de CE16937 receptor hebben we ook onderzocht of de functie van deze tachykinine receptor geconserveerd is.

De omgekeerde farmacologie benadering hebben we eveneens aangewend in de zoektocht naar het ligand voor een thyrotropine-releasing hormoon-achtige receptor (NMUR-4) en de NMUR-1 receptor die homoloog is aan de neuromedine U receptor (NMUR) bij vertebraten en aan de pyrokinine receptoren (PKR) bij insecten. Tot slot hebben we ook voor de NMUR-1 receptor getracht een GFP reporterconstruct aan te maken voor de *in vivo* lokalisatie.

## II. LITERATUURSTUDIE

### 1. *C. elegans*

#### 1.1 *C. elegans* als modelorganisme

In de jaren 1960 introduceerde Sydney Brenner de vrijlevende bodemnematode *Caenorhabditis elegans* als een nieuw modelorganisme voor ontwikkelingsbiologie en genetica (Brenner, 1974). Sindsdien is *C. elegans* uitgegroeid tot één van de meest bestudeerde diermodellen, mede dankzij het gemak waarmee het diertje in het laboratorium te kweken is. De volwassen wormen worden ongeveer 1 mm groot en kunnen daardoor eenvoudig en goedkoop gecultiveerd worden op agarplaten gezaaid met een laagje *E. coli* OP50 als voedingsbron. In 1969 ontwikkelde John Sulston een manier om de wormen voor een langere termijn te bewaren in vloeibare stikstof (Sulston & Hodgkin, 1988). Dit maakt het continu opkweken niet langer noodzakelijk. In 1998 werd *C. elegans* het eerste multicellulair organisme waarvan het volledige genoom gekend was (The *C. elegans* Sequencing Consortium, 1998). De relatief beperkte omvang van het *C. elegans* genoom, zo'n 97 Mb, vereenvoudigt de genetische analyse van dit organisme. Verder heeft deze worm een snelle reproductiecyclus, bij 20°C duurt het ongeveer drieënhalve dag tot de eitjes ontwikkeld zijn tot adulte wormen. Bij ongeslachtelijke voortplanting legt *C. elegans* ongeveer 300 eieren, bij geslachtelijke voortplanting kan dit zelfs oplopen tot meer dan 1000 eieren. De nematode is bovendien transparant, wat het mogelijk maakt de celdifferentiatie en andere ontwikkelingsprocessen *in vivo* te observeren. Dit stelde onderzoekers in staat om de celafstamming van elke somatische cel in kaart te brengen (Sulston & Horvitz, 1977). *C. elegans* is overigens één van de meest eenvoudige organismen met een zenuwstelsel. Een adulte hermafrodiet heeft exact 959 somatische cellen, waarvan 302 neuronen. Alle neurale en synaptische verbindingen, kortom het connectoom, werden ontrafeld gebruikmakend van seriële-sectie elektronenmicroscopie (White *et al.*, 1986).

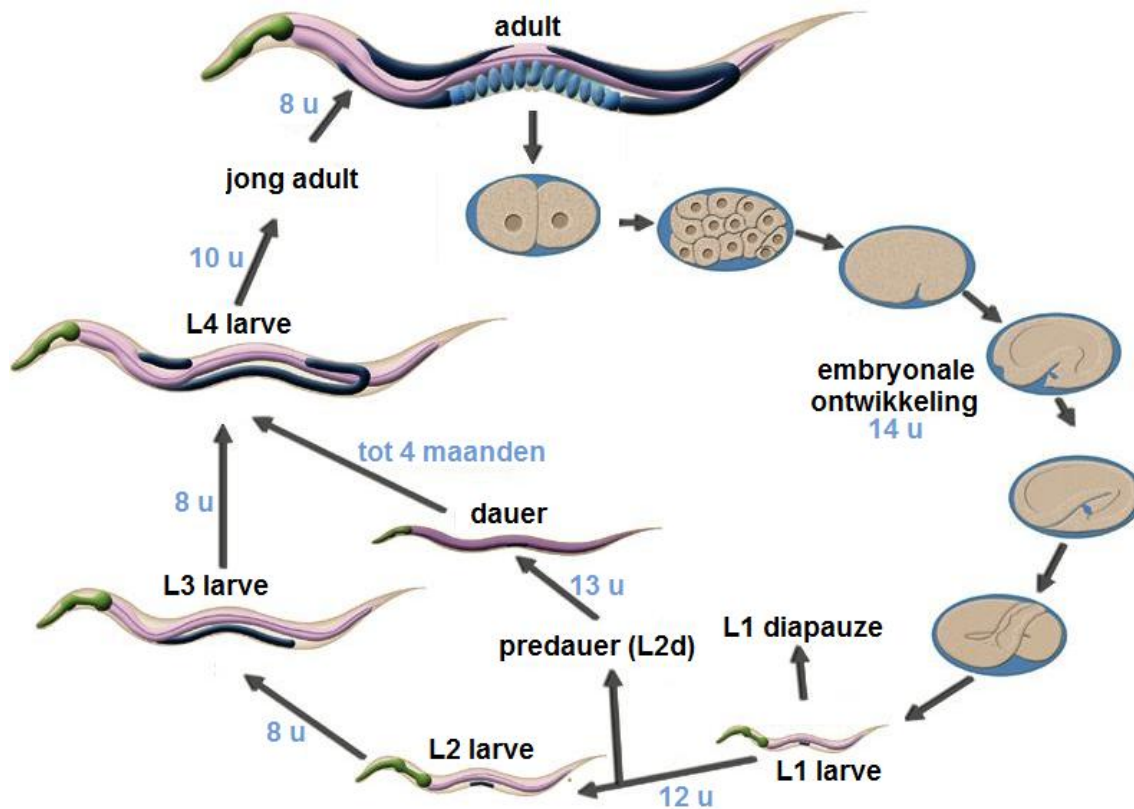
Het belang van *C. elegans* in wetenschappelijk onderzoek kan nauwelijks onderschat worden. Zo verkreeg Sydney Brenner samen met Robert Horvitz en John Sulston de Nobelprijs voor de fysiologie en geneeskunde voor hun ontdekkingen betreffende de genetische regulatie van orgaanontwikkeling en geprogrammeerde celdood in deze worm. De 2006 Nobelprijs voor de fysiologie en geneeskunde werd toegekend aan Andrew Fire en Craig C. Mello voor de ontdekking van het mechanisme van RNA-interferentie. Onderzoek op *C. elegans* werd in 2008 nogmaals bekroond met de Nobelprijs voor de scheikunde voor Martin Chalfie's werk op het groen fluorescente proteïne (GFP).

## 1.2 Levenscyclus

*C. elegans* heeft twee natuurlijk voorkomende geslachten: XX hermafrodieten en XO mannetjes (Nigon, 1949). Het reproductieve systeem van de hermafrodiet bestaat uit twee U-vormige armen die elk opgebouwd zijn uit een ovarium, een oviduct en een spermatheca die samenkomen in een gemeenschappelijke uterus. Tijdens het laatste larvaal stadium treedt spermatogenese op en de rijpe zaadcellen worden opgeslagen in het spermatheca. Oögenese vindt pas later plaats op volwassen leeftijd. De eicellen worden bevrucht wanneer ze doorheen het spermatheca naar de uterus migreren. De bevruchte embryo's ontwikkelen ongeveer 150 minuten in de uterus waarna ze via de vulva de buitenwereld bereiken. Hermafrodieten hebben dus de mogelijkheid om zichzelf voort te planten in afwezigheid van andere soortgenoten. Indien er echter mannetjes aanwezig zijn, zullen de hermafrodieten bij voorkeur paren en het sperma van het mannetje gebruiken om de eicellen te bevruchten. Bij zelfbevruchting worden ± 300 eitjes geproduceerd, maar bij kruisbevruchting kan dit aantal zelfs oplopen tot 1000. Mannetjes worden gegenereerd door een spontane non-disjunctie van het X-chromosoom tijdens de meiose wat resulteert in XX en 0 gameten. Een bevruchte 0 gameet zal uitgroeien tot een XO mannetje. Dit gebeurt echter zelden; slechts 0,1% van de nakomelingen bij zelfbevruchting zijn mannetjes (Ward & Carrel, 1979). Bij kruisbevruchting worden 50% mannelijke nakomelingen geproduceerd.

De mogelijkheid tot zelfbevruchting maakt *C. elegans* een erg nuttig organisme in genetisch onderzoek. Een homozygote hermafrodiet zal namelijk genetisch identieke nakomelingen genereren waardoor een mutante stam eenvoudig kan worden behouden. Bij kruisbevruchting kunnen mutaties doorgegeven worden naar andere stammen wat dan weer belangrijk is wanneer men verschillende eigenschappen wil samenvoegen.

De levenscyclus van *C. elegans* is afhankelijk van bepaalde omgevingsinvloeden, zoals de temperatuur en de hoeveelheid beschikbaar voedsel. Onder ideale omstandigheden zullen de wormen nadat ze uit de eitjes zijn gekomen vier larvale stadia doorlopen en zich ontwikkelen tot een reproductieve adult (Fig. 1). Het einde van elk larvaal stadium wordt gekenmerkt door een vervelling, waarbij een nieuwe stadiumspecifieke cuticula wordt gesynthetiseerd en de oude wordt afgeworpen. Tijdens de vervellingsperiode stopt de farynx even met pompen en houdt de larve op met bewegen. Deze periode van rust wordt *lethargus* genoemd en kan volgens Raizen *et al.* (2008) vergeleken worden met een slaap-achtige toestand.



**Figuur 1** Levenscyclus van *C. elegans* bij 22-25°C. De bodemnematode doorloopt vier larvale stadia en ontwikkelt zich vervolgens tot een reproductieve adult. In ongunstige omstandigheden kunnen de larven overgaan in een diapauze toestand (L1 diapauze en dauer). Uit Worm Atlas. <http://wormatlas.org/hermaphrodite/introduction/Introframeset.html>

De embryo's beginnen hun ontwikkeling in de uterus van de hermafroditische moeder. Zodra de eitjes 28 tot 30 cellen bevatten, komen ze via de vulva in de buitenwereld terecht. Ongeveer 12 u later is de embryonale ontwikkeling voltooid. De eitjes bevatten nu volledig gevormde larven met 558 cellen. De larven hebben een ontwikkeld motorisch systeem en er kan een onderscheid gemaakt worden tussen de twee geslachten. De eerste tekenen van seksueel dimorfisme verschijnen reeds 510 minuten na de bevruchting wanneer twee hermafrodit-specifieke neuronen in het mannetje en vier mannelijk-specifieke neuronen in de hermafrodit geprogrammeerde celdood ondergaan (Sulston *et al.*, 1983). De postembryonale ontwikkeling wordt geactiveerd doordat de larven zich voeden nadat ze uit de eitjes zijn gekomen (Ambros, 2000). In afwezigheid van voedsel zullen de larven niet verder ontwikkelen en overgaan in een L1 diapauze toestand. De cellen van deze larven zijn geblokkeerd in de G1 fase en kunnen zich niet delen. Hoewel L1 diapauze larven beter bestand zijn tegen omgevingsstress, ondergaan ze geen morfologische veranderingen (Johnson *et al.*, 1984). Dergelijke larven kunnen zes tot tien dagen overleven zonder voedsel. Indien er wel voedsel beschikbaar is, zullen de celdelingen hervat worden en kunnen de L1 larven zich verder ontwikkelen tot L2 larven. Net zoals de L1 larven, hebben ook de L2 larven de mogelijkheid om over te gaan in een diapauze toestand als de



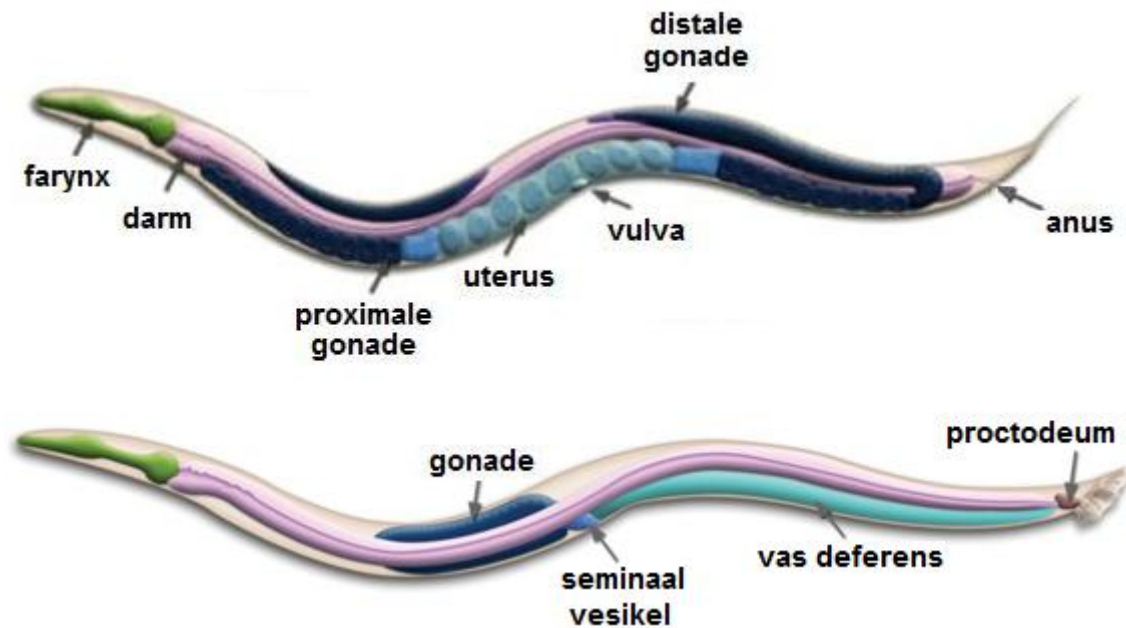
omgevingscondities ongunstig zijn voor verdere groei, bijvoorbeeld bij een te hoge temperatuur, overbevolking of voedseltekort. Deze signalen leiden tot de vorming van morfologisch verschillende L2d larven (Cassada & Russel, 1975). De L2d larven kunnen zich zowel in dauerlarven als in L3 larven ontwikkelen, afhankelijk van het al dan niet voortduren van de dauerinducerende omgevingsparameters (Riddle, 1988). Een gespecialiseerde cuticula beschermt de dauerlarven tegen de ongunstige omgevingsinvloeden. De dauerlarven voeden zich niet, hebben een aangepast metabolisme (Wadsworth & Riddle, 1989) en bewegen nauwelijks. Tevens kunnen dauerlarven vier tot acht maal langer overleven dan normaal (Klass & Hirsh, 1976). Wanneer de omgevingscondities weer gunstig zijn, beginnen de dauerlarven zich opnieuw te voeden en vervellen ze tot L4 larven. Tot slot ontwikkelen de L4 larven zich tot reproductieve adulten. Ongeveer 60 tot 65 u na de bevruchting (bij 22-25°C), zullen de nieuwe volwassen hermafrodieten hun eerste eitjes leggen en daarmee hun driedaagse reproductieve levenscyclus voltooien (Byerly *et al.*, 1976). Na de vruchtbare periode van drie tot vier dagen leeft de adulte hermafrodiet nog ongeveer tien tot vijftien dagen.

### 1.3 Anatomie

Tijdens de ontwikkeling van een hermafrodiet ontstaan 1090 somatische cellen, waarvan er 131 geprogrammeerde celdood ondergaan (Driscoll, 1995). De adulte hermafrodiet heeft bijgevolg 959 somatische cellen, waarvan 302 neuronen. De volwassen mannetjes daarentegen hebben 1031 somatische cellen, waarvan 381 neuronen. Deze extra neuronen zijn voornamelijk betrokken bij het mannelijk paargedrag (White, 1988). Hoewel het adulte mannetje meer cellen heeft, is hij slanker en iets korter dan de hermafrodiet.

Het typische bouwplan van nematoden bestaat in essentie uit twee concentrische cilinders die van elkaar gescheiden zijn door een met vocht gevulde ruimte, het pseudocoeloom (Wood, 1988). De buitenste cilinder is opgebouwd uit de cuticula, de hypodermis, het excretiestelsel, de neuronen en de spieren. De binnenste cilinder omvat de farynx, de darm en bij adulten de gonaden (Fig. 2). Al deze weefsels staan onder een interne hydrostatische druk zodat de lichaamsvorm behouden wordt.

De cuticula wordt gesecreteerd door de onderliggende hypodermis en beschermt de worm tegen de omgeving (Lints & Hall, 2009a). Bij de overgang naar een volgend larvaal stadium, wordt een nieuwe cuticula gesynthetiseerd en wordt de oude afgeworpen. De cuticula is stadiumspecifiek en verschilt onder andere in de samenstelling en in relatieve dikte.



**Figuur 2** Anatomie van een adulte hermafrodiet (boven) en een adult mannetje (onder). Merk hierbij op dat de verhoudingen niet conform de werkelijkheid zijn. Adulte mannetjes zijn namelijk kleiner en dunner dan hun hermafrodiete leeftijdsgenoten. Uit Worm Atlas. <http://wormatlas.org/hermaphrodite/introduction/Introframeset.html>

Het excretiestelsel is opgebouwd uit vier verschillende celtypen: een poriecel, een kanaalcel, een excretiecel en een paar kliercellen (Altun & Hall, 2009a). De nucleï van al deze cellen zijn gelegen aan de ventrale zijde van het kop, ter hoogte van de terminale uitstulping van de farynx. Dit systeem zorgt voor osmoregulatie en het verwijderen van afvalstoffen, analoog aan het excretiestelsel bij de mens.

De dwarsgestreepte lichaamsspieren zijn gerangschikt in vier longitudinale rijen, twee ventrale en twee dorsale, langs de hele lengte van de worm en zijn vastgehecht aan de cuticula. Het afwisselend samentrekken van het ene en relaxeren van het andere paar spieren, zorgt voor de typische sinusoïdale beweging van de worm. Kleinere, gladde spieren zijn terug te vinden in de farynx en rond de vulva, de darm en de anus (Altun & Hall, 2009a).

De adulte *C. elegans* hermafrodiet heeft 302 neuronen die twee onafhankelijke zenuwstelsels vormen: een groot somatisch zenuwstelsel bestaande uit 282 neuronen en een kleiner faryngaal zenuwstelsel met 20 neuronen. De systemen staan in verbinding met elkaar via een paar RIP interneuronen (Altun & Hall, 2011). De cellichamen van de meeste neuronen bevinden zich rond de farynx, langs de ventrale middellijn en in de staart. Alle neuronen, zowel in de hermafrodiet als in het mannetje, zijn individueel geïdentificeerd. De verbindingen tussen de neuronen in de hermafrodiet zijn ontrafeld aan de hand van elektronenmicroscopische foto's van seriële dunne secties (White *et al.*, 1986).

Het hermafrodiet reproductiesysteem verschilt aanzienlijk van dat van het mannetje (Lints & Hall, 2009b). Zo heeft de hermafrodiet twee U-vormige armen die elk opgebouwd zijn uit een ovarium, een oviduct en een spermatheca, waarin spermatogenese optreedt tijdens het laatste larvale stadium, gevolgd door oögenese op volwassen leeftijd (Fig. 2). Het mannetje daarentegen heeft slechts één U-vormige gonade, opgebouwd uit een testis, een spermatheca en een vas deferens, waarin enkel spermacellen worden geproduceerd. Het vas deferens is net zoals het uiteinde van het spijsverteringsstelsel verbonden met de cloaca, die via de anus uitmondt in de buitenwereld. Daarnaast heeft de hermafrodiet ook een eilegapparaat dat bevruchting en maturatie van de eicellen toelaat. De bevruchte embryo's verlaten de uterus via de vulva, een opening in de ventrale hypodermis die ook dienst doet als ingang voor mannelijk sperma. Ook de staart van beide geslachten vertoont een uitgesproken seksueel dimorfisme. De hermafrodiete staart is vrijwel ongespecialiseerd en loopt uit in een dunne punt. De mannelijke staart is daarentegen voorzien van diverse gespecialiseerde structuren, zoals de spicules in de cloaca, die hem in staat stellen de vulva van de hermafrodiet te lokaliseren en te copuleren.

Het spijsverteringsstelsel, bestaande uit de farynx, de darm en de anus, vormt samen met de gonaden een afzonderlijke buis die gescheiden is van de cuticula door het pseudocoeloom (Wood, 1988). Net zoals andere bodemnematoden voedt *C. elegans* zich met bacteriën in suspensie. De bacteriën worden opgenomen via de mondholte die uitmondt in een neuromusculaire buis, de farynx. De farynx fungeert als een pomp en transporteert de bacteriën verder tot in de darm. In de afwezigheid van voedsel pompt de farynx gemiddeld éénmaal per seconde. In aanwezigheid van voedsel neemt de pompsnelheid toe tot ongeveer viermaal per seconde. Tijdens de pompbewegingen wordt het merendeel van de vloeistof waarin de bacteriën gesuspendeerd zijn terug uitgestoten via de mond. De farynx is dus niet enkel een pomp, maar zorgt ook voor het concentreren van de voedselpartikels (Altun and Hall, 2009c). De darm ligt in het verlengde van de farynx en mondt uit in het rectum en de anus waarlangs de uitwerpselen worden afgegeven. Ontlasting is een periodiek gebeuren en vindt plaats iedere 50 seconden.

## 2. G-proteïne-gekoppelde receptoren (GPCRs)

### 2.1 Inleiding

Communicatie tussen cellen onderling en tussen cellen en hun omgeving is essentieel voor de regulatie van fundamentele biologische processen zoals bv. groei, metabolisme, reproductie, homeostase, gedrag en ontwikkeling. Deze communicatie verloopt via signaaltransductiewegen, waarbij een extracellulair signaal binnen de cel wordt doorgegeven en een bijhorende respons wordt uitgelokt. Een cel kan deze signalen echter maar detecteren wanneer ze functionele membraanreceptoren bezit waarop het signaalmolecule kan binden.

G-proteïne-gekoppelde receptoren (GPCRs) vertegenwoordigen de grootste familie van membraanreceptoren. Ze vervullen een belangrijke rol in diverse fysiologische en pathofysiologische processen, en zijn erg populaire doelwitten voor therapeutische geneesmiddelen (Filmore, 2004). Het menselijk genoom codeert voor meer dan 800 GPCRs (Fredriksson *et al.*, 2003), wat ruwweg overeenkomt met 4% van de proteïne-coderende genen. Op basis van sequentiegegevens met GPCRs in vertebraten en insecten, wordt hun aandeel in *C. elegans* geschat op 7% van de voorspelde proteïne-coderende genen (Schiöth & Fredriksson, 2005). Dit buitengewoon groot aantal GPCRs in *C. elegans* zou kunnen voortvloeien uit een verregaande afhankelijkheid van chemosensatie, als compensatie voor de afwezigheid van visuele en auditieve systemen. De endogene liganden voor deze receptoren zijn zeer divers en omvatten onder meer ionen zoals  $\text{Ca}^{2+}$  en protonen, aminozuren, glycoproteïnen, peptiden, nucleïnezuren, vetzuren, smaakstoffen, geurstoffen en zelfs fotonen. Van heel wat GPCRs zijn de endogene liganden echter nog onbekend, deze worden weesreceptoren genoemd.

### 2.2 Structuur en classificatie

Alle GPCRs zijn opgebouwd uit zeven hydrofobe transmembraan  $\alpha$ -helices van 22 tot 24 aminozuren, vandaar dat ze ook wel 7-transmembraanreceptoren of 'serpentine' receptoren worden genoemd. Het zijn integrale membraanproteïnen met een extracellulaire N-terminus en een cytoplasmatische C-terminus. De zeven transmembraan domeinen zijn met elkaar verbonden via drie extracellulaire en drie intracellulaire lussen. Deze extracellulaire lussen bevatten twee sterk geconserveerde cysteïneresidu's die disulfidebruggen vormen en zo de receptor stabiliseren.

Op basis van hun primaire sequentie werden de genen van deze receptoren historisch ingedeeld in 3 hoofdgroepen: A, B en C (Schwartz *et al.*, 2003). In 2003 werd een alternatief classificatiesysteem, aangeduid met het acroniem GRAFS, voorgesteld op basis van fylogenetische analyses (Fredriksson *et al.*, 2003). Dit systeem verdeelt de GPCRs in 5 families: glutamaat, rhodopsine, adhesie, frizzled/taste2 en secretine. Alle

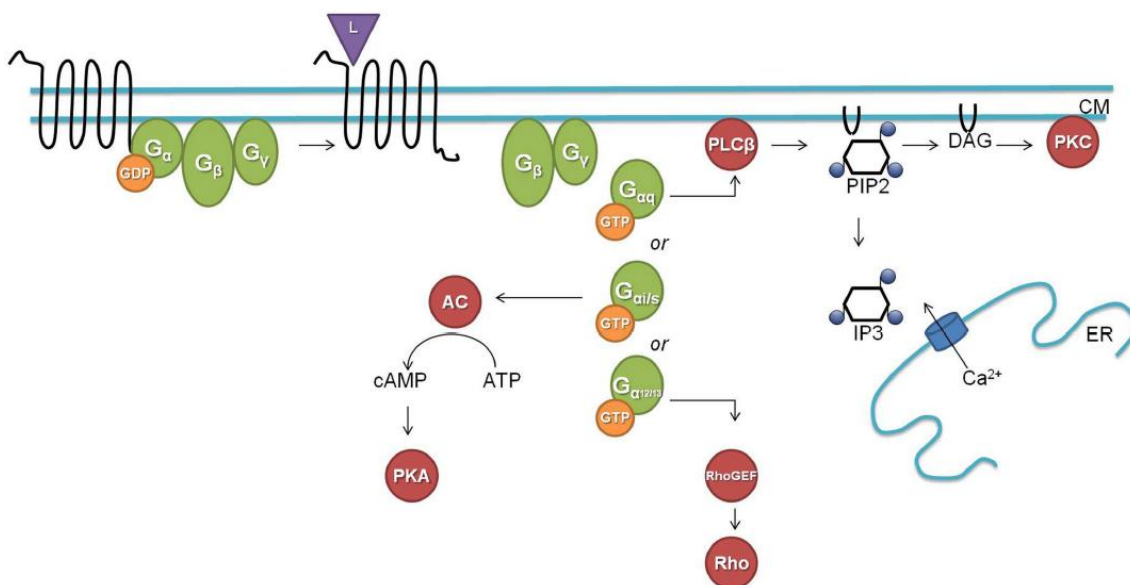
voorspelde *C. elegans* neuropeptide GPCRs behoren tot de rhodopsine en secretine familie. De rhodopsine familie is veruit de grootste GPCR familie bij alle vertebraten en deze receptoren binden een erg diverse groep liganden, waaronder prostaglandines, chemokines, glycoproteïnen, peptiden en amines. De glutamaat receptor familie bindt voornamelijk kleine liganden, zoals glutamaat,  $\gamma$ -aminoboterzuur (GABA) en  $\text{Ca}^{2+}$ . De secretine en adhesie receptoren binden daarentegen overwegend grote liganden. Ze hebben bovendien een lang extracellulair N-terminaal domein dat betrokken is bij de binding van liganden. Een bijkomende groep wordt gevormd door de receptoren van de *frizzled/taste2* familie. Er is echter nog heel wat discussie of deze receptoren al dan niet direct koppelen aan G-proteïnen (Schulte *et al.*, 2007).

### 2.3 Signalering via GPCRs

GPCRs worden geactiveerd door extracellulaire stimuli en geven dit signaal door via heterotrimere G-proteïnen. Heterotrimere G-proteïnen bestaan uit een  $\alpha$ -,  $\beta$ - en  $\gamma$ -subeenheid. In de inactieve vorm is dit complex via de  $\alpha$ -subeenheid gebonden aan guanosine difosfaat (GDP). Wanneer een GPCR geactiveerd wordt door binding van zijn ligand, ondergaat de receptor een conformationele verandering waardoor GDP wordt uitgewisseld voor guanosinetrifosfaat (GTP). Het geactiveerde G-proteïne komt hierdoor los van de receptor en valt uiteen in de GTP-gebonden  $\alpha$ -subeenheid en het  $\beta\gamma$ -dimeer. Vervolgens kunnen beide subeenheden het signaal overbrengen naar downstream effectormoleculen. De  $\alpha$ -subeenheid kan voor zijn eigen desactivatie zorgen door GTP opnieuw uit te wisselen voor GDP. De GTP hydrolyse kan bovendien versneld worden door accessorische proteïnen die gekend zijn als regulatoren van G-proteïne signalisatie (Watson *et al.*, 1996). De inactieve  $\alpha$ -subeenheid vormt dan opnieuw een heterotrimeer complex door te binden aan een  $\beta\gamma$ -dimeer waardoor een nieuwe cyclus van activatie en desactivatie kan plaatshebben. Naast desactivatie van de  $\alpha$ -subeenheid, wordt ook de GPCR zelf gedesactiveerd door een proces dat algemeen omschreven wordt als desensitisatie. Desensitisatie wordt geïnitieerd door fosforylatie wat verder leidt tot de internalisering van de receptor. G-proteïne receptor kinasen (Ritter & Hall, 2009) fosforyleren de geactiveerde receptor, wat de GPCR toegankelijk maakt voor specifieke adapterproteïnen. Vervolgens wordt de receptor getransporteerd naar clathrine-gecoate membraandomeinen waar internalisering van de receptor plaatsvindt. Na internalisering kunnen de GPCRs gerecycleerd worden, wat betekent dat ze opnieuw naar de plasmamembraan worden getransporteerd. Een andere mogelijkheid is dat de receptoren worden afgebroken door hydrolytische enzymen in de lysosomen.

Er zijn 3 klassieke G-proteïne gemedieerde signaaltransductiewegen, afhankelijk van het  $G\alpha$ -subtype ( $G\alpha_s$ ,  $G\alpha_{i/o}$ ,  $G\alpha_q$  en  $G\alpha_{12/13}$ , Fig. 3). De effector van  $G\alpha_s$  en  $G\alpha_{i/o}$  is het cyclisch adenosinemonofosfaat (cAMP)-genererend enzym, adenylaat cyclase (AC).

Beide G-proteïnen werken antagonistisch;  $G\alpha_s$  stimuleert AC in tegenstelling tot  $G\alpha_{i/o}$  dat de activiteit van AC inhibeert. cAMP is een secundaire boodschapper en reguleert de activiteit van het cAMP-afhankelijke proteïne kinase A (PKA). Het  $G\alpha_q$ -proteïne activeert het enzym fosfolipase C $\beta$  (PLC $\beta$ ), dat vervolgens het membraangebonden fosfatidylinositol 4,5-bisfosfaat (PIP $_2$ ) splitst in de secundaire boodschappermoleculen diacylglycerol (DAG) en inositol 1,4,5-trisfosfaat (IP $_3$ ). DAG diffundeert langs het plasmamembraan en activeert er proteïne kinase C (PKC). IP $_3$  migreert naar het endoplasmatisch reticulum en bindt er aan IP $_3$ -afhankelijke Ca $^{2+}$  kanalen wat leidt tot een intracellulaire Ca $^{2+}$  toename.  $G\alpha_{12/13}$  activeert Rho-afhankelijke signaaltransductiewegen. Maar ook de  $\beta\gamma$ -dimeer kan downstream effectors reguleren, zoals ondermeer ionenkanalen en bepaalde isovormen van AC en PLC.



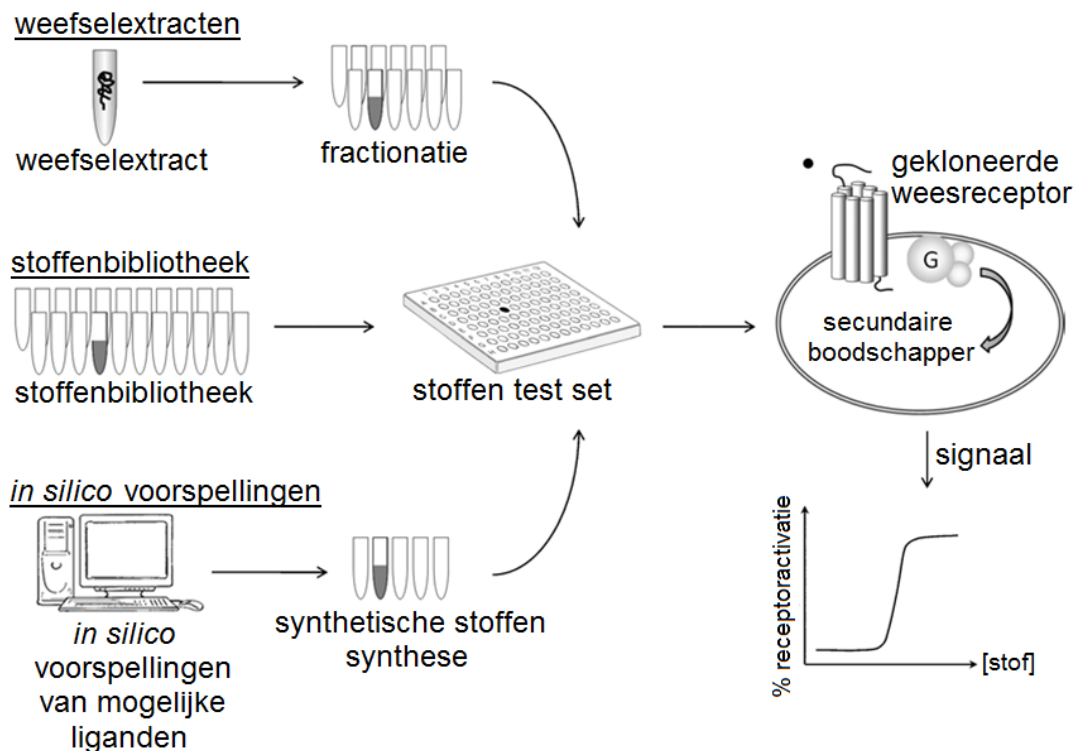
**Figuur 3** De 3 klassieke G-proteïne gemedieerde signaaltransductiewegen (Frooninckx *et al.*, 2012).  $G\alpha_s$  en  $G\alpha_{i/o}$  stimuleren of inhiberen respectievelijk de activiteit van AC en reguleren zo de concentratie van cAMP.  $G\alpha_q$  activeert PLC, wat leidt tot de vorming van DAG en IP $_3$ .  $G\alpha_{12/13}$  reguleert Rho-afhankelijke signaaltransductiewegen.

## 2.4 Ontwezing van GPCRs

Dankzij de publicatie van het volledige *C. elegans* genoom werd het mogelijk om nieuwe leden van de GPCR familie *in silico* te voorspellen op basis van sequentiegegevens met GPCRs bij vertebraten en insecten (The *C. elegans* Sequencing Consortium, 1998). Een cruciale stap in de karakterisatie van deze voorspelde GPCRs is de identificatie van hun endogene liganden. Hiertoe kan een omgekeerde farmacologie benadering worden aangewend als een algemene en high throughput ontwezigingsstrategie (Fig. 4). Deze methodologie houdt in dat de receptor tot expressie wordt gebracht in een heteroloog expressiesysteem. Vaak worden hiervoor Chinese hamster ovariumcellen (CHO-cellen) of humane embryonale niercellen (HEK-cellen) gebruikt, vanwege hun efficiëntie om functionele GPCRs tot

expressie te brengen (Beets *et al.*, 2011). Vervolgens worden de getransfecteerde cellen gescreend met een set van kandidaat-liganden en wordt de activatie van de receptor gemeten (Civelli *et al.*, 2006). Deze set van kandidaat-liganden kan worden samengesteld op basis van *in silico* voorspellingen en RP-HPLC fracties van biologische weefselextracten. Een alternatieve aanpak is het random screenen van grote stoffenbibliotheken bestaande uit synthetische kopieën van gekende en voorspelde GPCR liganden (Janssen *et al.*, 2008; Beets *et al.*, 2012).

De laatste jaren werden er heel wat cellulaire assays ontwikkeld die de accumulatie van secundaire boodschappermoleculen zoals cAMP of  $\text{Ca}^{2+}$  monitoren, om zo weesreceptoren te koppelen aan hun activerende liganden (Beets *et al.*, 2011). Het  $\text{Ca}^{2+}$ -mobilisatie assay is waarschijnlijk één van de meest gebruikte methoden. Deze aanpak is gebaseerd op de detectie van  $\text{Ca}^{2+}$  dat wordt vrijgezet uit het endoplasmatisch reticulum wanneer  $\text{G}\alpha_q$ -gekoppelde GPCRs worden geactiveerd. Hoewel  $\text{G}\alpha_s$ - en  $\text{G}\alpha_{i/o}$ -gekoppelde GPCRs normaal niet resulteren in de mobilisatie van intracellulair  $\text{Ca}^{2+}$ , kunnen ze daartoe gemanipuleerd worden door expressie van een promiscue G-proteïne, zoals de  $\text{G}\alpha_{16}$ -subeenheid, of een chimeer G $\alpha$ -proteïne dat wel koppelt aan de  $\text{Ca}^{2+}$  signaalweg. De resulterende intracellulaire  $\text{Ca}^{2+}$  toename kan gedetecteerd worden door bioluminescente proteïnen zoals aequorine, of door fluorescente calciumindicatoren (bv. Fluo-4). Op deze manier kan de accumulatie van  $\text{Ca}^{2+}$  gebruikt worden als een *readout* om de activatie van GPCRs te beoordelen.



**Figuur 4** De omgekeerde farmacologie strategie voor de ontzeping van GPCRs (Beets *et al.*, 2012). De set van kandidaat-liganden kan worden samengesteld op basis van weefselextracten, random samengestelde bibliotheken en *in silico* voorspellingen. Een activerend ligand zorgt voor een dosis-afhankelijke toename in de receptor activiteit.

### 3. Neuropeptiden

Communicatie tussen neuronen onderling en tussen neuronen en andere celtypen, zoals spiercellen en kliercellen, gebeurt via neurohormonen of synapsen. Een synaps is een directe verbinding die een elektrische impuls doorgeeft van een presynaptisch neuron naar een postsynaptische cel via de vrijstelling van signaalmoleculen. Deze signaalmoleculen binden op specifieke receptoren in het postsynaptisch celmembraan en afhankelijk van het type receptor volgt een excitatorische of inhibitorische respons. Excitatorische signalen depolariseren het postsynaptische celmembraan en bevorderen het ontstaan van een actiepotentiaal. Inhibitorische signalen hebben een omgekeerde werking; ze hyperpolariseren het postsynaptische celmembraan waardoor de kans op het optreden van een actiepotentiaal wordt verkleind.

De klassieke signaalmoleculen in het centrale en perifere zenuwstelsel zijn kleine neurotransmitters. Voorbeelden hiervan zijn acetylcholine (ACh), aminozuren zoals  $\gamma$ -aminoboterzuur (GABA) en glutamaat, stikstofmonoxide (NO) en monoamines zoals serotonine en dopamine. Daarnaast kunnen ook neuropeptiden instaan voor chemische communicatie tussen neuronen en deze boodschappers vormen de grootste klasse van signaalmoleculen in het dierenrijk. Neuropeptiden verschillen van neurotransmitters in zowel grootte als de wijze waarop ze worden gesynthetiseerd en vrijgesteld (Salio *et al.*, 2006).

Neuropeptiden variëren in lengte van drie (thyrotropine-releasing hormoon) tot meer dan 100 aminozuurresidu's. Ze beschikken bijgevolg over een groter aantal herkenningsplaatsen voor receptoren. Dit wordt weerspiegeld in een hogere bindingsaffiniteit (met waarden in nmol/l of  $\mu$ mol/l versus mmol/l) en selectiviteit van neuropeptiden voor hun receptoren (Mains & Eipper, 1999). Maar hun biosynthese is misschien wel het meest opvallende verschil tussen de twee klassen van boodschappermoleculen. Neuropeptiden worden gecodeerd in het genoom en hun synthese vindt bijgevolg plaats in het cellichaam. Ze worden aanvankelijk gesynthetiseerd als een groot, inactief precursorproteïne dat het preprohormoon wordt genoemd. Dit molecuul bevat naast het propeptide ook een N-terminaal signaalpeptide dat zorgt voor translocatie van de peptideketen doorheen het ruw endoplasmatisch reticulum membraan. Tegelijkertijd wordt het signaalpeptide afgesplitst door peptidasen zodat het inactieve prohormoon overblijft. Dit prohormoon bestaat uit één of meerdere peptidesequenties, geflankeerd door dibasische processing sites, meestal KR of RR. In het Golgi-apparaat wordt het prohormoon samen met proteolytische enzymen verpakt in secretievesikels. Proproteïne convertasen zijn endopeptidasen en zorgen voor een verdere splitsing van het prohormoon ter hoogte van de processing site, waarbij de twee basische aminozuren worden verwijderd ter vorming van het mature peptide. Ondertussen verplaatsen de secretievesikels zich van het cellichaam naar de axonuiteinden toe. Zodra een actiepotentiaal het plasmamembraan van het



axonuiteinde depolariseert, wordt de inhoud van de secretievesikels vrijgesteld in de synaptische spleet via exocytose. Opmerkelijk is dat precursormoleculen van evolutionair oudere soorten vaak meerdere kopieën van hetzelfde bioactieve peptide bevatten (Grimmelikhuijzen *et al.*, 1996). Dit fenomeen doet zich eveneens voor bij zoogdieren, maar is eerder uitzonderlijk; zo codeert de thyrotropine-releasing hormoon (TRH) precursor van de rat voor vijf kopieën van het TRH tripeptide (Bulant *et al.*, 1990). Daarnaast zijn er heel wat precursoren die verschillende bioactieve peptiden bevatten, zoals het pro-opiomelanocortin preprohormoon (Mains *et al.*, 1990). De biosynthese pathway van de klassieke neurotransmitters is heel wat eenvoudiger. Deze boodschappermoleculen zijn niet genomisch gecodeerd, maar worden enzymatisch gesynthetiseerd uitgaande van kleine precursormoleculen, vaak aminozuren, in de uiteinden van de axonen. Bovendien worden heel wat neurotransmitters gerecycleerd door het presynaptische neuron en heropgenomen in synaptische vesikels. Verder verschillen beide signaalmoleculen in de wijze waarop ze worden opgeslagen en gesecreteerd (Mains & Eipper, 1999). De klassieke neurotransmitters worden bewaard in kleine synaptische vesikels (SSVs) die vooral gelokaliseerd zijn in groepjes in de synaptische zone. De bioactieve neuropeptiden bevinden zich in grote *dense-core vesicles* (DCVs) die ontstaan in het Golgi-apparaat. In tegenstelling tot SSVs liggen DCVs vaak verspreid over het hele zenuwuiteinde (Strand, 1999; Salio *et al.*, 2006). Terwijl de inhoud van SSVs wordt vrijgesteld als respons op een kortstondige toename van de cytoplasmatische calciumconcentratie in de synaptische zone, lijkt de vrijstelling van neuropeptiden uit DCVs afhankelijk te zijn van een algemene verhoging van de calciumconcentratie in het hele axonuiteinde (Strand, 1999; Salio *et al.*, 2006).

### 3.1 Neuropeptiden bij *C. elegans*

Net zoals andere Metazoa gebruikt *C. elegans* kleine neurotransmitters, waaronder ACh, aminozuren, stikstofmonoxide en biogene amines, voor de intercellulaire communicatie (Brownlee & Fairweather, 1999). Daarnaast codeert het *C. elegans* genoom voor een grote verscheidenheid aan neuropeptiden, welke betrokken blijken bij een groot aantal fysiologische processen zoals beweging, reproductie, sociaal gedrag, mechano- en chemosensatie, leren en geheugen (Li & Kim, 2008). Deze worden net zoals neuropeptiden in andere diersoorten, gecodeerd als een groot precursormolecuul dat processing en post-translationele modificaties ondergaat ter vorming van het bioactieve neuropeptide (Husson *et al.*, 2007). De neuropeptide-genen komen tot expressie in sensorische, motorische en interneuronen. Sommige worden eveneens geëxprimeerd in niet-neuronale weefsels, zoals de somatische gonaden, de darm en de hypodermis van de vulva (Li & Kim, 2008).

Sinds de publicatie van het *C. elegans* genoom in 1998 (The *C. elegans* Sequencing Consortium) getuigen heel wat *in silico* voorspellingen en peptidomische studies van een grote diversiteit aan neuropeptiderge bioregulatoren bij deze kleine nematode. Momenteel zijn er 119 neuropeptide-precursorgenen geïdentificeerd (Frooninckx *et al.*, 2012), die worden onderverdeeld in drie grote families volgens hun geconserveerde sequentiemotieven. Eénendertig neuropeptide-coderende genen behoren tot de FMRFamide-achtige peptide (*flp*) familie op basis van C-terminale sequentiegelijkenissen met het tetrapeptide FMRFamide, dat voor het eerst werd geïsoleerd uit de centrale ganglia van de mollusk *Mercenaria mercenaria* (Price & Greenberg, 1977a,b). Alle *flp*'s vertonen een variatie op het motief X/Y-X-R-Famide, waarbij X een apolair, hydrofoob (L, I, M of V) en Y een aromatisch aminozuuresidu voorstellen (Husson *et al.*, 2007). Verder behoren 40 genen tot de familie van de insuline-achtige peptiden (*ins*). Ze worden allen gekarakteriseerd door een signaalpeptide, een A- en een B-keten, met uitzondering van INS-1 en INS-18, die ook een tussenliggende C-keten bevatten. Peptiden die geen overeenkomsten vertonen met de FMRFamide- of insuline-achtige peptiden worden ingedeeld in een derde groep, de neuropeptide-achtige proteïne (*nlp*) familie. Tot op heden zijn er 48 *nlp* precursorgenen geïdentificeerd.

### 3.2 Gonadotropine-releasing hormoon en adipokinetisch hormoon

Bij vertebraten wordt de voortplanting gereguleerd door het gonadotropine-releasing hormoon (GnRH) dat geproduceerd en gesecreteerd wordt door neuronen in de hypothalamus (Fink, 1988). Ter hoogte van de gonadotrope cellen in de hypofyse activeert GnRH zijn receptor, de gonadotropine-releasing hormoon receptor (GnRHR). Dit leidt tot de synthese en vrijstelling van de gonadotropines, het follikelstimulerend hormoon (FSH) en het luteïniserend hormoon (LH). FSH en LH zijn neurohormonen en worden via het bloed getransporteerd naar de gonaden, waar ze onder meer de gametogenese en de productie van geslachtshormonen reguleren. Deze hypothalamus-hypofyse-gonade-as is sterk geconserveerd bij vertebraten.

In onze groep wordt de volgende hypothese onderzocht: Zou het voorkomen van een dergelijk reproductiesysteem kunnen teruggaan tot voor de divergentie van protostomia en deuterostomia, ongeveer 700 miljoen tot één miljard jaar geleden? Toenemend bewijs hiervoor wordt geleverd door het stijgend aantal geïdentificeerde GnRH-achtige peptiden bij invertebraten (Iwakoshi *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2008; Tsai & Zhang, 2008).

Bij de fruitvlieg *Drosophila melanogaster* en de zijdegworm *Bombyx mori* komen receptoren voor die sterk gelijken op de GnRHRs bij vertebraten. Deze receptoren binden echter niet aan een GnRH-achtig peptide, maar aan het adipokinetisch hormoon (AKH) (Staubli *et al.*, 2002). De insect adipokinetische hormonen zijn korte

peptide neurohormonen opgebouwd uit acht tot elf aminozuren. Ze worden gesynthetiseerd, opgeslagen en afgegeven door specifieke cellen in het glandulair gedeelte van de corpora cardiaca (O'Shea en Rayne, 1992), een neurohemaal orgaan dat beschouwd wordt als het equivalent van de hypofyse. Alle gekende AKHs zijn N-terminaal geblokkeerd door een pyroglutamaat residu en op enkele uitzonderingen na hebben ze allen een geamideerde C-terminus. Niet-geamideerde AKHs werden teruggevonden bij de vlinder *Vanesse cardui* (Kollisch *et al.*, 2000), de mot *Spodoptera frugiperda* (Abdel-Latif & Hoffmann, 2007) en bij de nematoden.

De vliegactiviteit van insecten initieert de vrijstelling van AKHs (Van der Horst, 2003). Het binden van AKHs aan hun G-proteïne gekoppelde receptoren op cellen van het vetlichaam is de eerste stap in een reeks gecoördineerde signaaltransductie processen die uiteindelijk leiden tot de mobilisatie van koolhydraten en lipiden (Gäde & Auerswald, 2003). Beide substraten worden via de hemolymfe naar de vliegsperen getransporteerd. Koolhydraten, voornamelijk trehalose, voorzien insecten van energie tijdens de eerste periode van de vlucht. Bij langdurige vliegactiviteit wordt de energie geleverd door het mobiliseren van endogene triacylglycerolreserves, net zoals bij vele andere diersoorten.

Fylogenetisch onderzoek toont aan dat de AKH-peptiden sterk verwant zijn aan GnRHs. Beide peptiden zijn ongeveer even lang en hebben een paar sleutelaminozuren gemeenschappelijk. Hetzelfde geldt ook voor een aantal andere peptiden die gerelateerd zijn aan AKH, zoals corazonine, adipokinetisch hormoon/corazonine-gerelateerde peptiden en *red pigment-concentrating hormone*. Al deze peptiden kunnen worden ingedeeld bij eenzelfde GnRH superfamilie op basis van hun peptidestructuur (Roch *et al.*, 2011; Lindemans *et al.*, 2011).

Gebaseerd op de verwantschap tussen AKHs en GnRHs en gecombineerde *in silico* technieken, slaagden Lindemans *et al.* (2009a) erin om één van de *C. elegans* GnRHR homologen te ontwezen. Zowel *Drosophila* AKH als het *C. elegans* peptide nlp-47 activeren de GNRR-1 receptor bij de worm. Analooq aan de AKH receptor bij insecten en de vertebraat GnRHR, verloopt de verdere signaalweg via een  $G\alpha_q$ -proteïne met  $Ca^{2+}$  als secundair boodschappermolecule. Aangezien AKH betrokken is bij de mobilisatie van lipiden, werd nagegaan of ook het *C. elegans* homoloog nlp-47 hierbij een rol speelt. Verder werd onderzocht of GNRR-1 en zijn ligand betrokken zijn bij de regulatie van de voortplanting, de belangrijkste functie van het vertebraat GnRH. RNAi knockdown van de receptor of van de nlp-47 neuropeptide precursor of van beiden, resulteerde niet in een toename van de vetopslag in vergelijking met wild type wormen. GnRHR- en/of GnRH-deficiënte wormen vertoonden daarentegen wel uitstel van het eileggedrag en een verminderd aantal nakomelingen.

### 3.3 De tachykinine peptidenfamilie

De geschiedenis van de tachykinine peptidenfamilie begint in 1931, wanneer Von Euler en Gaddum (Von Euler & Gaddum, 1931) een onbekende stof isoleren uit de hersenen en darmen van paarden en aantonen dat deze substantie contracties van het jejunum en hypotensie uitlokt in konijnen. Het actieve bestanddeel wordt aangeduid als substantie P (SP); P verwijzend naar de poedervorm van de actieve stof. Pas 40 jaar later werd de aminozuursequentie van SP opgehelderd (Chang & Leeman, 1971). SP werd lange tijd beschouwd als het enige tachykinine bij zoogdieren, tot de ontdekking van neurokinine A (NKA; neuromedine L, of substantie K) en neurokinine B (NKB; neuromedine K) nieuwe inzichten bracht (Kangawa *et al.*, 1983; Kimura *et al.*, 1983). Verder werden ook twee biologisch actieve N-terminaal verlengde vormen van neurokinine A waargenomen, namelijk neuropeptide  $\gamma$  (NP $\gamma$ ; Tatemoto *et al.*, 1985) en neuropeptide K (NPK; Kage *et al.*, 1988). Deze tachykininen worden gecodeerd door twee humane genen: tachykinine precursor 1 (*TAC1*) en tachykinine precursor 3 (*TAC3*). Alternatieve splicing van het humane *TAC1* gen leidt tot vier mRNA transcripten ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  en  $\delta TAC1$ ). SP wordt gecodeerd door alle vier de transcripten, NKA door  $\beta$  en  $\gamma TAC1$ , NPK door  $\beta TAC1$  en NP $\gamma$  door  $\gamma TAC1$  (Nawa *et al.*, 1983; Kawaguchi *et al.*, 1986; Lai *et al.*, 1998; Tabel 1). Het humane *TAC3* gen codeert enkel voor de sequentie van NKB. (Kotani *et al.*, 1986).

Meer dan tien jaar later werd een derde - en voorlopig laatste - tachykinine precursorgen (*TAC4*) ontdekt bij zoogdieren. Deze doorbraak leidde tot de identificatie van een nieuwe en diverse groep van tachykininen, de hemokininen en endokininen (Kurtz *et al.*, 2002; Page *et al.*, 2003). Uitgaande van een *in silico* benadering voorspelden Kurtz *et al.* (2002) twee vormen van het humane hemokinine-1, HK-1 en HK-1(4-11). Page *et al.* (2003) identificeerden vervolgens endokinine A (EKA) en endokinine B (EKB), twee N-terminaal verlengde vormen van HK-1 en HK-1(4-11), en de neuropeptiden endokinine C (EKC) en endokinine D (EKD). Alternatieve splicing van het humane *TAC4* gen leidt tot vier alternatieve mRNA transcripten ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  en  $\delta TAC4$ ). EKB wordt gecodeerd door alle vier de transcripten, EKA en EKC door  $\alpha TAC4$  en EKD door  $\beta TAC4$ . De tachykininen bij zoogdieren worden gekarakteriseerd door de aanwezigheid van de gemeenschappelijke C-terminale aminozuursequentie F-X-G-L-M-NH<sub>2</sub>, waarbij X steeds een hydrofoob aminozuurresidu is (Discussie: Tabel x). EKC en EKD bezitten een alternatief motief waarbij het C-terminale methionineresidu gesubstitueerd is door een leucineresidu (F-X-G-L-L-NH<sub>2</sub>). De biologische activiteit van de nauw verwante tachykinine peptiden wordt gemedieerd door G-proteïne gekoppelde receptoren. Tot op heden zijn er drie vertebraat tachykinine receptoren gekend, NK1, NK2, en NK3, en deze behoren tot de rhodopsine familie.

**Tabel 1** Neuropeptiden van de tachykinine peptidenfamilie bij zoogdieren worden gecodeerd door drie precursorgen. Bij wijze van voorbeeld worden de alternatieve mRNA transcripten van de humane *TAC* genen weergegeven in onderstaande tabel.

gen	mRNA transcript	peptiden gecodeerd door transcript	referentie
<b>TAC1</b>	<i>αTAC1</i>	SP	Nawa <i>et al.</i> , 1983
	<i>βTAC1</i>	SP, NKA, NPK	Nawa <i>et al.</i> , 1983
	<i>γTAC1</i>	SP, NKA, NPY	Kawaguchi <i>et al.</i> , 1986
	<i>δTAC1</i>	SP	Lai <i>et al.</i> , 1998
<b>TAC3</b>	<i>αTAC3</i>	NKB	Kotani <i>et al.</i> , 1986
	<i>βTAC3</i>	NKB	Kotani <i>et al.</i> , 1986
	<i>γTAC3</i>	-	Kotani <i>et al.</i> , 1986
<b>TAC4</b>	<i>TAC4</i>	HK-1, HK-1(4-11)	Kurtz <i>et al.</i> , 2002
	<i>αTAC4</i>	EKA, EKB, EKC	Page <i>et al.</i> , 2003
	<i>βTAC4</i>	EKB, EKD	Page <i>et al.</i> , 2003
	<i>γTAC4</i>	EKB	Page <i>et al.</i> , 2003
	<i>δTAC4</i>	EKB	Page <i>et al.</i> , 2003

De tachykininen vormen een multifunctionele en evolutionair geconserveerde peptidenfamilie en komen zowel voor bij invertebraten als vertebraten. Ze spelen een belangrijke rol in neurotransmissie en/of als neuromodulators in het centrale en perifere zenuwstelsel (Maggi *et al.*, 1993; Otsuka & Yoshioka, 1993). Net zoals tal van andere peptiden, kunnen ze ook fungeren als autocriene, paracriene of endocriene boodschappermoleculen in niet-neuronaal weefsel.

Substantie P, beter gekend onder de Engelse benaming *substance P*, is het best bestudeerde lid van de tachykinine familie. Dit neuropeptide is onder meer betrokken bij nociceptie, het vermogen om weefselbeschadiging of dreigende weefselbeschadiging waar te nemen. SP wordt vrijgegeven als respons op diverse, (potentieel) gevaarlijke stimuli in de dorsale hoorn van het ruggenmerg, wat leidt tot een verhoogde pijngevoeligheid (Severini *et al.*, 2002). Heel wat pijnlijke aandoeningen, zoals perifere neuropathie, fibromyalgie en osteoarthritis, gaan gepaard met verhoogde SP waarden in de cerebrospinale vloeistof. Desondanks zijn NK1 receptor antagonisten niet in staat de pijn te verlichten bij deze patiënten. SP is verder ook betrokken bij het induceren van de braakreflex en het moduleren van fysiologische en gedragsresponsen in stressvolle en angstwekkende situaties (Hornby, 2011; Ebner & Singewald, 2006). NK1 antagonisten blijken ditmaal wel werkzaam als geneesmiddel voor emesis en als antidepressivum (Kramer *et al.*, 1998). Zo is Aprepitant een commercieel beschikbare SP antagonist die gebruikt wordt voor de behandeling van chemotherapie-geïnduceerde misselijkheid.

In het spijsverteringsstelsel reguleren de tachykininen ondermeer de samentrekking van de gladde spieren in de darmen, de secretie van water en elektrolyten door het epithelium en de vasculaire permeabiliteit (Shimizu *et al.*, 2008). De tachykininen zijn tevens betrokken bij de immuunrespons van het spijsverteringsstelsel, het ademhalingsstelsel en het bewegingsapparaat (O'Connor *et al.*, 2004). Tijdens een ontsteking worden de tachykinine receptoren op immuuncellen geactiveerd wat resulteert in een verhoogde proliferatie van lymfocyten, een toenemende immunoglobuline-productie en een stijging van de cytokine-secretie door lymfocyten, monocyten, macrofagen en *mast*cellen. Daarnaast zorgen de tachykininen voor lokale vasodilatatie en een veranderde vasculaire permeabiliteit waardoor het transport van leukocyten naar de omliggende weefsels wordt gefaciliteerd. Andere onderzoeksgroepen postuleerden bovendien de betrokkenheid van tachykininen bij de homeostase van het beenmerg (Greco *et al.*, 2004), het botmetabolisme (Liu *et al.*, 2007) en de inductie van agressief gedrag (Katsouni *et al.*, 2009) bij zoogdieren.

Een aantal invertebrate soorten, behorende tot de Arthropoda, Crustacea, Mollusca, Echiura en Nematoda, produceren peptiden die sequentiegelijkenissen vertonen met leden van de vertebraat tachykinine familie (Schoofs *et al.*, 1990; Satake *et al.*, 2003; Van Loy *et al.*, 2009). Een eerste groep, de tachykinine-gerelateerde peptiden (TRPs), bevat neuropeptiden geïsoleerd uit neuronaal en/of darmweefsel en wordt gekarakteriseerd door het gemeenschappelijk C-terminale motief F-X-G-Y-R-NH<sub>2</sub>, analoog aan de vertebraat tachykinine consensussequentie F-X-G-L-M-NH<sub>2</sub>. Deze neuropeptiden vertonen, net zoals de vertebraat tachykininen, een myotroop effect op de darm. De TRPs hebben daarnaast nog heel wat andere functies; ze stimuleren contracties van de oviducten, induceren de vrijstelling van het adipokinetisch hormoon uit de corpora cardiaca van de treksprinkhaan *Locusta migratoria* en stimuleren de biosynthese van feromonen bij de zijderups *Bombyx mori* (Satake *et al.*, 2003). Winther *et al.* (2006) bestudeerden de functie van de *Drosophila* TRPs gebruikmakend van een RNAi construct om de expressie van het TRP prohormoon gen *dtk* te onderdrukken. TRP-deficiënte larven en adulte vliegen vertonen een verminderde geurperceptie van benzaldehyde, butanol en isoamylacetaat. Deze vliegen blijken bovendien meer actief te zijn dan wildtype controles; ze wandelen langere afstanden en zijn een groter deel van hun tijd actief. Immunohistochemische labeling toont aan dat de TRP-neuronen in de buurt liggen van de insuline-producerende cellen (IPCs), die de TRP receptor DTKR tot expressie brengen (Birse *et al.*, 2011). Knockdown van DTKR in de IPCs leidt tot een toename van TRP transcripten bij gevoederde vliegen en een verlengde levensduur van uitgehongerde vliegen (Birse *et al.*, 2011). De 'invertebrate tachykininen' vormen een tweede groep van neuropeptiden met sequentiehomologie aan de vertebraat tachykinine familie. Deze peptiden zijn uitsluitend aanwezig in de speekselklier van een aantal invertebrate soorten, waaronder de gele koortsmug

*Aedes aegypti*, en vertonen het vertebraat consensusmotief. Er wordt verondersteld dat deze inv-TKs een belangrijke rol spelen in predatie en hun functie uitvoeren via de vertebraat tachykinine receptoren in het prooidier.

### 3.4 De neuromedine U/pyrokinine peptidenfamilie

Tijdens hun zoektocht naar nieuwe biologisch actieve peptiden, isoleerden de groep van Minamino, Kangawa en Matsuo heel wat kleine neuropeptiden uit het ruggenmerg van varkens. Net zoals de eerder beschreven tachykininen neurokinine A en neurokinine B, werd ook neuromedine U (NMU) hierbij ontdekt (Minamino *et al.*, 1985a). Dit peptide dankt zijn naam aan het vermogen om gladde spieren van de uterus (vandaar het suffix 'U') van ratten te doen samentrekken. Opzuivering en karakterisatie van het varken-NMU leidde tot de identificatie van twee peptiden: een icosapentapeptide (NMU-25) en een octapeptide (NMU-8) dat identiek is aan de C-terminus van NMU-25. NMU werd later ook opgezuiverd en gesequeneerd uit andere vertebraatsoorten, waaronder mensen, ratten, cavia's, honden, konijnen, kippen, kikkers en goudvissen (Brighton *et al.*, 2004). Ze bevatten allen, met uitzondering van goudvis NMU-21 en NMU-25, het identieke C-terminale pentapeptide F-R-P-R-N-NH<sub>2</sub> terwijl in zoogdieren zelfs de zeven C-terminale aminozuurresidu's geconserveerd zijn: F-L-F-R-P-R-N-NH<sub>2</sub> (Discussie: Tabel y). De sterke conservering van deze motieven wijst op het belang van deze regio voor de biologische activiteit van de peptiden.

In 2005 werd er onverwacht een nieuw peptide ontdekt in de hersenen van de rat dat erg gelijkend is aan NMU (Mori *et al.*, 2005). Dit neuropeptide komt sterk tot expressie in de suprachiasmatische nucleus van de hypothalamus en kreeg bijgevolg de naam neuromedine S (NMS). NMS werd verder ook aangetroffen in de humane hypothalamus en die van andere zoogdieren, en in amfibieën. NMU en NMS delen hetzelfde geamideerde C-terminale motief en binden eveneens aan dezelfde receptoren NMUR1 en NMUR2.

NMUR1 is een GPCR die in 1988 gekloneerd werd uitgaande van humane en muis cDNA bibliotheken op basis van homologie met de groeihormoon secretagoge receptor en de neurotensin receptor (respectievelijk 33% en 29% sequentiehomologie). Een omgekeerde farmacologie benadering leidde tot de identificatie van NMU als ligand voor deze weesreceptor. Het *NMUR2* gen werd geïdentificeerd op basis van sequentiegelijkenis met *NMUR1*. Interactie van NMU en NMS met hun receptoren resulteert in intracellulaire Ca<sup>2+</sup>-mobilisatie en stimulatie van fosfolipase C $\beta$ . Deze effecten worden gemedieerd door een G $\alpha_q$ -proteïne. NMUR1 komt voornamelijk tot expressie in perifere weefsels, NMUR2 in het centrale zenuwstelsel.

Ondanks een waaier aan gerapporteerde activiteiten, is de precieze fysiologische rol van NMU nog niet opgehelderd (Brighton *et al.*, 2004). Het vermogen om contracties te stimuleren in gladde spieren is één van de best gedocumenteerde functies,

waargenomen in diverse weefsels en bij verschillende diersoorten. NMU stimuleert bij de mens ondermeer gladde spiercontracties van het ileum en de urineblaas. Minamino *et al.* (1985b) toonden aan dat intraveneuze toediening van NMU zorgt voor een snelle en langdurige toename van de arteriële bloeddruk bij ratten. Meer recente studies namen eerder een lichte en transiënte toename waar (Brighton *et al.*, 2004). Ander onderzoek wijst dan weer op een rol in de regulatie van de hypothalamus-hypofyse-bijnier as (Malendowicz *et al.*, 2012). Een subcutane injectie of intracerebroventriculaire (icv) toediening van NMU bij ratten verhoogt de concentratie van het adenocorticotroop hormoon en corticosteroiden in het bloed via stimulatie van corticotropine-releasing hormoon (CRH) secretie. Ook bij vogels is NMU betrokken bij de regulatie van deze endocriene as. Een icv toediening van NMU bij kippen zorgt voor een significante opregulatie van de CRH-transcripten in de hypothalamus. Aangezien de hypothalamus-hypofyse-bijnier as centraal staat in de regulatie van stress, is het niet verwonderlijk dat NMU betrokken is bij de centrale en perifere regulatie van de stress respons. Onderzoek hiernaar werd ondermeer uitgevoerd door Hanada *et al.* (2001), die stress-gerelateerd gedrag waarnam bij ivc-geïnjecteerde ratten. Verder veroorzaakt NMU een verminderde voedselopname en gewichtsverlies. En net zoals heel wat andere hypothalamus peptiden die eetgedrag beïnvloeden, draagt ook NMU bij aan de regulatie van maagzuursecretie en maaglediging (Brighton *et al.*, 2004).

Tot op heden werd de aanwezigheid van een NMU signaalweg enkel beschreven bij vertebraten. De insect pyrokinine (PK) precursorgen, namelijk *capability* (*capa*) en *hugin*, zijn homologen van het vertebraat NMU (Melcher *et al.*, 2006). *Drosophila hugin* codeert voor een peptide met het PK C-terminale F-X-P-R-L-NH<sub>2</sub> motief, Drm-PK-2 genoemd. Dit peptide vertoont opvallende sequentiegelijkenissen met het NMU-8 bij zoogdieren. Beide peptiden zijn octameren en ze hebben drie van de acht aminozuren en een amidegroep gemeen in het C-terminale pentapeptide. Het PK in de kakkerlak *Periplaneta americana* heeft zelfs vier van de acht aminozuren gemeenschappelijk, opnieuw maken deze deel uit van de laatste vijf residu's. Insect pyrokininen en NMU-8 zijn bovendien functioneel gerelateerd. Ze hebben beide een myostimulatorische werking en zijn betrokken bij eetgedrag (Schoofs *et al.*, 1993). Het *hugin* precursorgen codeert daarnaast nog voor een tweede neuropeptide, *hugy*, dat erg gelijkend is aan het ecdysis-triggering hormoon van *Drosophila*. Ectopische expressie van *hugin* in de fruitvlieg leidt tot larvale dood tijdens of net na ecdysis (Meng *et al.*, 2002). Wellicht is *hugy* hiervoor verantwoordelijk door het vroegtijdig induceren van ecdysisgedrag (Verleyen *et al.*, 2004). Het *Drosophila capa* gen codeert voor drie peptiden, twee periviscerokinen (CAPA-PVK-1 en CAPA-PVK-2), die hun naam danken aan de periviscerale organen waar ze worden opgeslagen en vrijgesteld, en één pyrokinine (CAPA-PK of Drm-PK-1) met een geconserveerde F-X-P-R-L-NH<sub>2</sub> C-terminus. In heel wat insecten oefenen deze CAPA peptiden een krachtige myotrope werking uit op



verschillende spieren (Predel & Wegener, 2006). In andere insecten vertonen ze sterke diuretische of antidiuretische effecten.

Lindemans *et al.* (2009b) bestudeerden een neuropeptide-receptor signaalsysteem dat homoloog is aan NMU en PK in het modelorganisme *C. elegans*. Met behulp van een bio-informatische analyse vonden ze het ligand van de pyrokinine weesreceptor (Ce-PK-R). Het activerend peptide (AFFYTPRI-NH<sub>2</sub>) is afgeleid van de nlp-44 precursor die eveneens codeert voor twee periviscerokinine-achtige peptiden. Deze gegevens wijzen op het bestaan van een ancestraal NMU-CAPA signaalsysteem dat reeds aanwezig was vóór de divergentie van Protostomia en Deuterostomia.

### 3.5 De thyrotropine-releasing hormoon peptidenfamilie

Het humane thyrotropine-releasing hormoon (TRH) wordt geproduceerd door neuronen van de paraventriculaire nucleus in de hypothalamus. Via een poortadersysteem wordt TRH naar de hypofyse getransporteerd. Door te binden aan zijn G-proteïne gekoppelde receptor in het celmembraan van de thyrotrope cellen, stimuleert TRH de vrijstelling van het thyroïd stimulerend hormoon (TSH). Dit hormoon zet op zijn beurt de schildklier aan tot het produceren van de schildklierhormonen thyroxine (T<sub>4</sub>) en trijodothyronine (T<sub>3</sub>), die een essentiële rol spelen in ontwikkeling, groei en cellulair metabolisme. De endocriene klieren die betrokken zijn bij deze reeks van opeenvolgende signalen staan bekend als de hypothalamus-hypofyse-schildklieras.

TRH is oorspronkelijk genoemd naar zijn vermogen om de vrijstelling van TSH te stimuleren, maar blijkt momenteel meerdere, soortafhankelijke hypofysiotrope effecten uit te voeren (Galas *et al.*, 2009). Bij vissen en amfibieën heeft TRH zelfs helemaal geen invloed op de productie van TSH, maar zorgt daarentegen voor de vrijstelling van groeihormoon, prolactine en  $\alpha$ -melanocyt-stimulerend hormoon. Bij vogels activeert TRH de vrijzetting van zowel TSH als groeihormoon en bij sommige zoogdieren is TRH een stimulator van TSH, prolactine en groeihormoon secretie.

Ondanks deze grote verscheidenheid aan hypofysiotrope activiteiten, is de sequentie van het TRH peptide (pGlu-His-Pro-NH<sub>2</sub>) geconserveerd in alle vertebratsoorten, wat duidt op een sterke evolutionaire druk om de primaire structuur te bewaren. In alle phyla wordt TRH gesynthetiseerd uitgaande van een groot precursormolecule dat meerdere kopieën bevat van het propeptide Gln-His-Pro-Gly. Zo codeert de TRH precursor in kippen en knaagdieren voor vijf, in mensen voor zes en in amfibieën zelfs voor zeven herhalingen van het propeptide (Galas *et al.*, 2009).

Tot op heden is de aanwezigheid van TRH en schildklierhormonen enkel aangetoond bij vertebraten. Wel zijn er aanwijzingen dat het *C. elegans* gen *nmur-4* codeert voor een ortholoog van de TRH receptor. Ook de *Drosophila* FMRF-amide receptor wordt door Hewes en Taghert (2001) geklassificeerd binnen de TRH receptoren.

### III. MATERIALEN EN METHODEN

#### 1. *C. elegans* kweek

##### 1.1 Gebruikte *C. elegans* stammen

In deze studie wordt gebruik gemaakt van wild type N2 wormen (Bristol) en homozygote deletiemutanten (Tabel 2). De deletiemutanten worden gegenereerd met ethylmethaansulfonaat (EMS) of 4,5',8-trimethylpsoralen, een crosslinking agens dat geactiveerd wordt door ultraviolet licht (UV/TMP). De mutante lijnen werden besteld bij het *Caenorhabditis* Genetics Center (CGC).

**Tabel 2** Overzicht van de gebruikte mutante lijnen.

stamnaam	gemuteerd gen	gemuteerd allel	deletiegrootte	mutageen
RB1423	<i>CE16937</i>	<i>ok1620</i>	737 bp	EMS
CX10	<i>osm-9</i>	<i>ky10</i>	ongekend	ongekend

##### 1.2 Cultuur op Nematode Growth Medium (NGM)

*C. elegans* kan goedkoop gecultiveerd worden op een vaste NGM agarbodem met een laagje *E. coli* OP50 als voedingsbron. *E. coli* OP50 is auxotroof voor uracil waardoor de groei op een uracil-arme NGM agarbodem sterk wordt ingeperkt. De bacterielaag blijft bijgevolg dun en dit vereenvoudigt de observatie van de wormen. Bij het zaaien van de platen moet er op toegekeken worden dat de bacterielaag in het midden van de plaat wordt aangebracht. Wanneer de laag zich uitstrekt tot aan de rand van de petriplaat, kruipen meer wormen langs de zijkant omhoog waardoor ze uitdrogen en sterven. Tweemaal per week worden de wormen overgebracht op een nieuwe petriplaat om te voorkomen dat ze ondervoed worden. Dit gebeurt via 'chunking', een techniek waarbij met een gesteriliseerde scalpel een blokje agar uit de oude petriplaat wordt gesneden en overgebracht op een nieuwe voedingsbodem. De cultuurplaten worden vervolgens in een incubator geplaatst bij 20°C.

##### Oplossingen

- fosfaatbuffer (1 M, pH 6) (108,3 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 35,6 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ; aanlengen met gedestilleerd water tot 1 l)

##### Methode

##### **bereiding van het NGM cultuurmedium (1 l)**

- voeg aan een 1 l fles volgende producten toe:
  - 17 g agar (Sigma-Aldrich)
  - 3 g NaCl
  - 7,5 g Bacto Peptone (BD)
- leng aan met gedestilleerd water tot 1 l en autoclaveer

- laat afkoelen tot  $\pm 50^{\circ}\text{C}$

werk verder onder de laminaire flowkast:

- voeg toe:
  - 1 ml cholesterol (5 mg/ml in ethanol)
  - 1 ml  $\text{CaCl}_2$  (1 M)
  - 1 ml  $\text{MgSO}_4$  (1 M)
  - 25 ml fosfaatbuffer (1 M)

### **aanmaak van Luria-Bertani (LB) cultuurmedium (1 l)**

- weeg 25 g LB broth af en leng aan met gedestilleerd water tot 1 l
- autoclaveer

### **zaaien van NGM platen**

werk onder de laminaire flowkast:

- breng met een steriel entoog een *E. coli* OP50 kolonie van de streepenting over in 5 ml LB medium
- incubeer overnacht in een schudincubator bij  $37^{\circ}\text{C}$
- vul twee derde van de petriplaten (doorsnede 90 mm) met NGM cultuurmedium
- laat drogen zodat het NGM cultuurmedium kan stollen
- breng op elke plaat 150  $\mu\text{l}$  *E. coli* OP50 ('zaaien') aan en strijk dit gelijkmatig uit
- incubeer overnacht bij  $37^{\circ}\text{C}$  en bewaar de gezaaide platen bij  $4^{\circ}\text{C}$

### ***C. elegans* kweek**

- plaats de NGM platen voor aanvang op kamertemperatuur

werk onder de laminaire flowkast:

- breng de wormen over op een nieuwe cultuurplaat via 'chunking': snij met een steriel scalpel een blokje agar uit de oude cultuurplaat en leg dit omgekeerd op een nieuwe voedingsbodem
- plaats de cultuurplaten omgekeerd in een incubator bij  $20^{\circ}\text{C}$

## **1.3 Cultuur van mannetjes**

Mannelijke wormen worden gegenereerd door een spontane non-disjunctie van het X-chromosoom tijdens de meiose. Dit gebeurt echter zelden waardoor slechts 0,1% van de nakomelingen bij zelfbevruchting mannetjes zijn (Ward & Carrel, 1979). Bij kruisbevruchting worden 50% mannelijke nakomelingen geproduceerd. Aangezien reproductie via zelfbevruchting efficiënter verloopt dan via kruisbevruchting, dienen meerdere mannetjes bij één hermafrodiet geplaatst te worden om voldoende mannelijke nakomelingen te bekomen. Om de cultuur van mannetjes in stand te houden, dient deze handeling bovendien elke generatie herhaald te worden. Het verplaatsen van individuele of een klein aantal wormen gebeurt met een worm picker. Dit is een platinum draadje, met een afgeplat uiteinde dat dienst doet als spatel, dat vastgeklemd is in een houder.

Methode

- breng met behulp van een worm picker één L4 *C. elegans* hermafrodiet en vijf *C. elegans* mannetjes van een cultuurplaat over op een kleine NGM plaat (doorsnede 35 mm) gezaaid met 30 µl *E. coli* OP50
- plaats dit plaatje omgekeerd in een incubator bij 20°C
- herhaal dit tweemaal per week om de cultuur van mannetjes in stand te houden

**1.4 Invriezen van wormen**

*C. elegans* lijnen kunnen voor een langere periode worden bewaard door ze in te vriezen bij -80°C. Dit maakt het continu opkweken niet langer noodzakelijk. Vers uitgehongerde jonge larven (L1 en L2 stadium) overleven het invriezen het best. Het is tevens belangrijk de wormen traag in te vriezen. Daarom wordt gebruik gemaakt van cryogene buisjes en een piepschuimen doosje. De toevoeging van glycerol aan het invriesmedium heeft een beschermend effect en verhoogt de overlevingskansen van de wormen.

Oplossingen

- M9 buffer (5 g NaCl; 6 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 3 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 1 ml MgSO<sub>4</sub> (1M); pH 7,4; aanlengen met gedestilleerd water tot 1 l; autoclaveren)
- Soft Agar Freezing Solution (0,58 g NaCl; 0,68 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 30 g glycerol; 0,56 ml NaOH (1 M); 0,4 g agar; aanlengen met gedestilleerd water tot 100 ml; autoclaveren)

Methode

- laat de Soft Agar Freezing Solution smelten in de microgolfoven
- incubeer de gesmolten oplossing ten minste 15 min. bij 50°C
- verzamel ondertussen de vers uitgehongerde wormen van een cultuurplaat door deze af te spoelen met M9 buffer en breng ze over in een falcontube
- centrifugeer 4 min. aan 1300 rpm bij kamertemperatuur
- verwijder het supernatans en herhaal de wasstap tot het supernatans helder is
- los de geprecipiteerde wormen op in 2 ml M9 buffer en plaats 15 min. op ijs
- voeg 2 ml Soft Agar Freezing Solution toe en meng door te pipetteren
- verdeel het mengsel over vier cryogene buisjes
- bewaar de buisjes in een piepschuimen doosje overnacht bij -80°C
- haal de buisjes uit het doosje en verplaats ze naar hun permanente locatie bij -80°C
- controleer enkele dagen later of het invriezen succesvol was door de inhoud van één cryogeen buisje te laten ontdooien, uit te spreiden op een cultuurplaat en enkele uren nadien na te gaan of de wormen nog leven

## 2. Kloneren van weesreceptoren

### 2.1 Amplificatie van het receptor cDNA

Aangezien het genoom van *C. elegans* bekend is, kunnen we de sequenties van de weesreceptoren terugvinden op [www.wormbase.org](http://www.wormbase.org). Op basis van deze sequenties worden genspecifieke primers ontwikkeld (Tabel 3) met een GC-gehalte van 40-60%, een smelttemperatuur van om en bij 50-60°C en een lengte van ongeveer 18-22 bp. Tevens wordt erop toegekeken dat de primers niet de neiging hebben om secundaire structuren te vormen of om onderling te dimeriseren. Het cDNA dat codeert voor de weesreceptoren wordt geamplificeerd met behulp van de polymerase kettingreactie (PCR). Doorgaans is de annealingstemperatuur van de primers 5°C lager dan hun smelttemperatuur. Om de ideale annealingstemperatuur voor het gebruikte primerkoppel te vinden, stellen we een temperatuursgradiënt in. Voor de amplificatie van het receptor cDNA maken we gebruik van de Advantage 2 PCR kit (Clontech). De Advantage 2 PCR kit (Clontech) bevat het TITANIUM *Taq* polymerase, een N-terminale deletie van het *Taq* polymerase, en een TaqStart antilichaam zodat een automatische hot start optreedt. De polymerase mix bevat tevens een kleine hoeveelheid proofreading DNA polymerase, zodat een lager foutenpercentage en bijgevolg een verhoogde betrouwbaarheid wordt verkregen.

**Tabel 3** Overzicht van de gebruikte genspecifieke primers.

genspecifieke primers	sequentie
NMUR-1 TOPO forward	5`-CACCGATTTTCAGCCGAGTGAGA-3`
NMUR-1 TOPO reverse	5`-ACATGATATCGAATTAGCAGGA-3`
NMUR-4 TOPO forward	5`-CACCGATGACGTCAGCCTC-3`
NMUR-4 TOPO reverse	5`-ATGTATCACGGAGTTCCAGC-3`

#### Oplossingen

- Advantage 2 PCR kit (Clontech):
  - Advantage 2 Polymerase Mix (50x) (TITANIUM *Taq* DNA polymerase, een kleine hoeveelheid proofreading polymerase en TaqStart Antibody (1,1 µg/µl) in 50% glycerol; 15 mM Tris-HCl, 75 mM KCl; 0,05 mM EDTA)
  - Advantage 2 PCR buffer (10x) (400 mM Tricine-KOH; 150 mM KOAc; 35 mM Mg(OAc)<sub>2</sub>; 37,5 µg/ml BSA; 0,05% Tween 20; 0,05% Nonidet-P40)
- dNTP mix (10 mM) (10 mM ATP; 10 mM CTP; 10 mM GTP; 10 mM TTP)

#### Methode

- voeg aan een steriel 0,2 ml conisch centrifugeerbuisje volgende oplossingen toe:

- 40 µl milliQ water
  - 5 µl Advantage 2 PCR buffer
  - 1 µl cDNA van N2 *C. elegans* hermafrodieten
  - 1 µl dNTP mix
  - 1 µl forward primer (10 mM)
  - 1 µl reverse primer (10 mM)
  - 1 µl Advantage 2 polymerase
- plaats de stalen in het PCR toestel (TProfessional Thermocycler (Biometra)) en voer de volgende parameters in:
- |      |        |        |                       |                  |
|------|--------|--------|-----------------------|------------------|
|      | 1 min. | 95°C   | hot start denaturatie |                  |
| 30 x | {      | 30 s.  | 95°C                  | denaturatie      |
|      |        | 1 min. | 50°C, 55°C of 60°C    | hybridisatie     |
|      |        | 3 min. | 68°C                  | elongatie        |
|      |        | 3 min. | 68°C                  | finale elongatie |
|      | pauze  | 10°C   | pauze                 |                  |
- start de PCR reactie en bewaar de stalen na afloop bij -20°C

## 2.2 Agarose gelelektroforese

Agarose gelelektroforese is een methode om DNA moleculen te scheiden op basis van hun lengte. Onder invloed van een spanningsverschil migreren de negatief geladen DNA moleculen naar de positieve pool. Kortere DNA moleculen bewegen sneller en migreren verder dan langere DNA moleculen, aangezien deze makkelijker doorheen de poriën van de gelmatrix raken. Om de gescheiden DNA banden te kunnen visualiseren, wordt er GelRed (Biotum) toegevoegd aan de agarose. GelRed bindt aan het DNA door een combinatie van intercalatie en elektrostatische interactie. GelRed fluoresceert wanneer het wordt belicht met UV-licht en geeft zo de plaats van de DNA moleculen in de agarosegel weer. Migratie van een ladder van DNA moleculen met een bekende lengte laat toe de lengte van de gescheiden DNA moleculen te schatten door de ligging van deze DNA banden te vergelijken met de ligging van de referentiebanden van de ladder.

### Materialen

- TAE buffer (50x) (242,5 g Trisbase (CH<sub>2</sub>OH)<sub>3</sub>(NH<sub>2</sub>); 34 g CH<sub>3</sub>COONa·3H<sub>2</sub>O; 18,5 g Titriplex III Na<sub>2</sub>EDTA·3H<sub>2</sub>O), pH 8; aanlengen met milliQ water tot 1 l)

### Methode

#### **TAE buffer (1x) aanmaken**

- Neem 200 ml TAE buffer (50x) en leng dit aan met milliQ water tot 10 l

#### **bereiding van een 1% agarosegel**

- los 1 g agarose (Sigma-Aldrich) op in 100 ml TAE buffer (1x)

- verwarm de oplossing in de microgolf totdat deze kookt
- koel de oplossing af onder de kraan tot  $\pm 50^{\circ}\text{C}$
- voeg 5  $\mu\text{l}$  GelRed (10000x in DMSO) (Biotium) toe en meng
- giet de oplossing in de gelhouder en plaats een kam in de gelvloeistof
- laat de gelvloeistof verder afkoelen zodat deze kan stollen
- wikkel de agarosegel in huishoudfolie en bewaar bij  $4^{\circ}\text{C}$

### **gelelektroforese**

- plaats de agarosegel in de elektroforesetank die gevuld is met TAE buffer (1X)
- voeg 2  $\mu\text{l}$  Orange DNA Loading Dye (6x) (Fermentas) toe aan 8  $\mu\text{l}$  van het DNA staal en meng
- breng dit over in een sleuf van de agarosegel
- breng 5  $\mu\text{l}$  200 bp DNA ladder (Fermentas) in een sleuf van de agarosegel
- stel de stroombron in op 120 V en 150 mA en start het toestel
- plaats de gel na afloop in het ProXima 2500-T (Isogen Life Sciences) toestel en neem een foto

## **2.3 TOPO TA klonering en transformatie van competente *E. coli* cellen**

Het geamplificeerde cDNA van de weesreceptor wordt in een vector geligeerd gebruikmakend van de pcDNA3.1/V5-His TOPO TA Expression Kit (Invitrogen). De kit bevat een gelineariseerde pcDNA3.1/V5-His-TOPO vector met enkelvoudige 3'-thymidine overhangen voor TA klonering en covalent gebonden topoisomerase enzymen. Het sleutelenzym voor TOPO klonering is het DNA topoisomerase I geïsoleerd uit het *Vaccinia* virus, dat functioneert als een restrictie-enzym en een ligase. Dit enzym herkent specifiek de pentameer sequentie 5'-CCCTT-3' en vormt een covalente binding met de fosfaatgroep aan de 3'-thymidine (Shumann, 1991), waarna het enzym het DNA enkelstrengig knipt. De kit benut de religatie activiteit van het topoisomerase I. Zo kunnen de vectoren eenvoudig ligeren aan DNA sequenties met een 5'-adenine overhang. De pcDNA3.1/V5-His-Topo vector heeft een sterke cytomegalovirus (CMV) promotor die zorgt voor constitutieve genexpressie. Een C-terminale V5 epitoom tag kan gebruikt worden voor detectie van het recombinante proteïne met behulp van een anti-V5 antilichaam. Daarnaast bevat de vector een C-terminale polyhistidine (6xHis) sequentie voor de opzuivering van het proteïne door middel van nikkel-affiniteitschromatografie. Het runder groeihormoon (BGH) polyadenylatiesignaal en transcriptie terminatie sequentie zorgen voor verhoogde mRNA stabiliteit. De vector heeft een neomycine en ampicilline resistentiegen voor de positieve selectie van respectievelijk transformante zoogdiercellen en *E. coli* cellen.

### 2.3.1 TOPO TA klonering

#### Materialen

- pcDNA3.1/V5-His TOPO TA Expression Kit (Invitrogen):
  - pcDNA3.1/V5-His-TOPO vector (10 ng/μl plasmide DNA in 50% glycerol; 50 mM Tris-HCl, pH 7,4; 1 mM EDTA; 2 mM DTT; 0,1% Triton X-100; 100 μg/ml BSA; 30 μM phenol red)
  - zoutoplossing (1,2 M NaCl; 0,06 M MgCl<sub>2</sub>)

#### Methode

- voeg aan een steriel 0,5 ml conisch centrifugeerbuisje volgende oplossingen toe:
  - 0,5 - 4 μl geamplificeerd cDNA van de weesreceptor (PCR-product)
  - 1 μl zoutoplossing
  - milliQ water tot een eindvolume van 5 μl
  - 1 μl TOPO vector
- meng dit zachtjes en incubeer 30 min. bij kamertemperatuur

### 2.3.2 Transformatie van competente TOP10 cellen

#### Materialen

- SOC medium (2% Tryptone; 0,5% gistextract; 10 mM NaCl; 2,5 mM KCl; 10 mM MgCl<sub>2</sub>; 10 mM MgSO<sub>4</sub>; 20 mM glucose)
- Luria Broth (LB) agarplaat met ampicilline (50 mg/l) (Sigma-Aldrich):
  - weeg 35 g LB agar af en leng aan met gedestilleerd water tot 1 l
  - autoclaveer
  - laat afkoelen tot ± 50°C

werk verder onder de laminaire flowkast:

- voeg 5 ml ampicilline (10 mg/ml) toe
- vul de petriplaten (doorsnede 90 mm) met ± 25 ml agaroplossing
- laat drogen zodat de agar kan stollen en bewaar de platen bij 4°C

#### Methode

- plaats het waterbad op 42°C, breng het SOC medium op kamertemperatuur en plaats de selectieve LB agarplaten op 37°C
- voeg 2 μl van de TOPO kloneringsreactie toe aan de competente *E. coli* One Shot TOP10 cellen en meng zachtjes
- incubeer 30 min. op ijs
- heat shock de cellen 30 sec. in een warmwaterbad bij 42°C
- plaats de cellen meteen op ijs

werk verder onder de laminaire flowkast:

- voeg 250 μl SOC medium toe



- incubeer de cellen 1 uur horizontaal in een schudincubator bij 37°C
- breng 50 - 200 µl over op een selectieve LB agarplaat
- incubeer overnacht bij 37°C

### 2.3.3 Transformatie van competente DH5α cellen

#### Materialen

- SOC medium (2% Tryptone; 0,5% gistextract; 10 mM NaCl; 2,5 mM KCl; 10 mM MgCl<sub>2</sub>; 10 mM MgSO<sub>4</sub>; 20 mM glucose)

#### Methode

- plaats het waterbad op 42°C, breng het SOC medium op kamertemperatuur en plaats de selectieve LB agarplaten op 37°C
- voeg 1 - 5 µl (1 - 10 ng) van de TOPO kloneringsreactie toe aan de competente *E. coli* Subcloning Efficiency DH5α cellen en meng zachtjes
- incubeer 30 min. op ijs
- heat shock de cellen 20 sec. in een warmwaterbad bij 42°C
- plaats de cellen 2 min. op ijs

werk verder onder de laminaire flowkast:

- voeg 950 µl LB cultuurmedium toe
- incubeer de cellen 1 uur horizontaal in een schudincubator bij 37°C
- breng 50 - 200 µl over op een selectieve LB agarplaat (50 mg/ml ampicilline) (Sigma-Aldrich)
- incubeer overnacht bij 37°C

## 2.4 Kolonie PCR

De vector bevat een ampicilline resistentiegen waardoor enkel transformanten kunnen groeien op een medium met ampicilline. Het is echter mogelijk dat deze transformanten een vector zonder insert hebben opgenomen. Om te achterhalen welke kolonies de vector met insert bevatten, wordt een kolonie PCR uitgevoerd. We maken gebruik van de T7 en BGH 'priming sites' aanwezig op de vector (Tabel 4). Indien er een insert aanwezig is, zal het geamplificeerde fragment beduidend langer zijn, wat kan worden waargenomen door middel van een agarose gelelektroforese.

**Tabel 4** Overzicht van de gebruikte primers.

primers	sequentie
T7 forward primer	5'- TAATACGACTCACTATAGGG -3'
BGH reverse primer	5'- TAGAAGGCACAGTCGAGG -3'

#### Materialen

- REDTaq ReadyMix PCR Reaction Mix (20 mM TrisHCl, pH 8,3; 100 mM KCl; 3 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,002% gelatine; 0,4 mM dNTP mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP);

stabilisatoren; 0,06 U/ $\mu$ l *Taq* DNA polymerase) (Sigma-Aldrich)

### Methode

- voeg aan een steriel 0,2 ml conisch centrifugeerbuisje volgende oplossingen toe:
  - 5,5  $\mu$ l milliQ water
  - 1  $\mu$ l T7 forward primer (10 mM)
  - 1  $\mu$ l BGH reverse primer (10 mM)
  - 12,5  $\mu$ l REDTaq ReadyMix

werk verder onder de laminaire flowkast:

- schraap met een pipetpunt een kolonie van de selectieve LB agarplaat af en los deze op in 50  $\mu$ l steriel water in een 1,5  $\mu$ l conisch centrifugeerbuisje
- voeg hiervan 5  $\mu$ l toe aan de PCR mastermix
- voeg 300  $\mu$ l LB cultuurmedium met ampicilline toe aan de overschot van het koloniemengsel en incubeer overnacht in een schudincubator bij 37°C, bewaar bij 4°C
- plaats het centrifugeerbuisje in het PCR toestel (TProfessional Thermocycler (Biometra)) en voer de volgende parameters in:

	10 min.	95°C	hot start denaturatie	
25 x	{	45 s.	95°C	denaturatie
		45 s.	55°C	hybridisatie
		2 min.	72°C	elongatie
		10 min.	72°C	finale elongatie
	pauze	10°C	pauze	

- controleer de lengte van het fragment via agarose gelelektroforese
- breng 100  $\mu$ l van een kolonie met insert over in 7 ml LB cultuurmedium met ampicilline (50 mg/l) (Sigma-Aldrich)
- incubeer overnacht in een schudincubator bij 37°C, bewaar bij 4°C

## **2.5 Opzuiveren van het plasmide DNA door middel van miniprep**

We isoleren het plasmide DNA uit de getransformeerde *E. coli* cellen met behulp van de GenElute™ HP Plasmid Miniprep Kit (Sigma). Deze procedure is gebaseerd op de alkalische lyse methode van Birnboim en Doly (Birnboim en Doly, 1979). In de eerste stap worden de bacteriecellen gelyseerd door behandeling met een alkaline-SDS lysebuffer. Vervolgens worden een neutralisatie- en bindingsbuffer toegevoegd die chaotrope zouten bevat, waardoor het plasmide DNA adsorbeert aan een silicagel membraan. Onzuiverheden worden weggewassen en ten slotte wordt het zuiver DNA geëluëerd in een klein volume elutiebuffer. We controleren de DNA concentratie met behulp van de Nanodrop ND-1000 Spectrofotometer (Isogen Life Science).

Materialen

- GenElute HP Plasmide Miniprep Kit (Sigma-Aldrich)

Methode

- breng 2 ml van de recombinante bacteriecultuur over in een 2 ml conisch centrifugeerbuisje
- centrifugeer 1 min. aan 13800 x g bij kamertemperatuur
- verwijder het supernatans
- los de celpellet op in 200 µl resuspensiebuffer en vortex
- voeg 200 µl lysebuffer toe en meng door 6-8 maal te inverteren, incubeer max. 5 min op kamertemperatuur
- voeg 350 µl neutralisatie-/bindingsbuffer toe en meng door 4-6 maal te inverteren
- centrifugeer 10 min. aan 13800 x g bij kamertemperatuur
- plaats ondertussen de GenEluteHP Miniprep bindingskolom in een verzamelbuisje en breng er 500 µl kolompreparatiebuffer op aan
- centrifugeer 1 min. aan 13800 x g bij kamertemperatuur
- verwijder het eluaat en breng het cellysaat over op de kolom
- centrifugeer 1 min. aan 13800 x g bij kamertemperatuur
- verwijder het eluaat en breng 500 µl wasbuffer 1 aan op de kolom
- centrifugeer 1 min. aan 13800 x g bij kamertemperatuur
- verwijder het eluaat en breng 750 µl wasbuffer 2 aan op de kolom
- centrifugeer 1 min. aan 13800 x g bij kamertemperatuur
- verwijder het eluaat en centrifugeer nogmaals 1 min. aan 13800 x g bij kamertemperatuur
- breng de kolom over in een nieuwe verzamelbuisje en breng 50 µl elutiebuffer aan op de kolom
- centrifugeer 1 min. aan 13800 x g bij kamertemperatuur
- verwijder de kolom en bepaal de concentratie van het DNA in het verzamelbuisje met behulp van de Nanodrop ND-1000 Spectrofotometer (Isogen Life Science)
- bewaar het plasmide DNA bij -20°C

## **2.6 Sequentiebepaling van het insert op basis van de Sanger methode**

Met een sequentiebepaling kunnen we achterhalen of het correcte insert in de juiste richting werd geligeerd in de vector. We bepalen de nucleotidensequentie volgens de dideoxynucleotidemethode van Sanger (Sanger et al., 1977). Het opgezuiverde plasmide DNA wordt eerst geamplificeerd door middel van PCR. Hierbij worden zowel dNTPs als fluorescente ddNTPs, met voor elke base een andere kleur, gebruikt.

Wanneer een ddNTP wordt ingebouwd, kan de DNA-keten niet verder verlengd worden zodat men eindigt met een mengsel van fragmenten met een verschillende lengte. Vervolgens worden deze DNA fragmenten gescheiden volgens lengte en kan de sequentie bepaald worden door detectie van de fluorescentiekleur.

### Materialen

- BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems):
  - BigDye Terminator v1.1 Ready Reaction Mix (TRR mix):
  - Big Dye Terminator v1.1 Sequencing buffer 5X

### Methode

#### **sequencing PCR**

- voeg aan een steriel 0,2 ml conisch centrifugeerbuisje volgende oplossingen toe:
  - 2 µl DNA
  - 1 µl primer (T7 of BGH; 3,2 mM)
  - 2 µl TRR mix (BigDye)
  - 3 µl Sequencing buffer (5x)
  - 12 µl milliQ water
- plaats de stalen in het PCR toestel (TProfessional Thermocycler (Biometra)) en voer de volgende parameters in:
 

	2 min.	96°C	hot start denaturatie	
25 x	{	30 s.	96°C	denaturatie
		15 s.	50°C	hybridisatie
		2 min. 30 s.	60°C	elongatie
		2 min.	60°C	finale elongatie
	pauze	10°C	pauze	

#### **DNA precipitatie**

- voeg aan een steriel 0,5 ml conisch centrifugeerbuisje volgende oplossingen toe:
  - 50 µl 95% ethanol
  - 2 µl Natriumacetaat (3 M)
  - 2 µl EDTA (125 mM)
  - 20 µl PCR-product
- incubeer 15 min. bij kamertemperatuur
- centrifugeer 20 min. aan maximale snelheid bij 4°C
- verwijder het supernatans
- voeg 250 µl 70% ethanol toe en vortex kort
- centrifugeer 10 min. aan maximale snelheid bij kamertemperatuur
- verwijder het supernatans

- incubeer 2 min. met open deksel bij 90°C in TRIO Heated Lid (Biometra) zodat ethanol kan verdampen
- los de stalen op in 15 µl EDTA (0,1 mM) en vortex
- incubeer 2 min. bij 96°C in TRIO Heated Lid (Biometra) zodat denaturatie plaatsvindt
- plaats de stalen meteen bij 4°C tot ze gesequeneerd worden met de 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems)

## **2.7 Opzuiveren van endotoxine-vrij plasmide DNA op grote schaal door middel van maxiprep**

Het transfecteren van eukaryote cellen vereist een grote hoeveelheid plasmide DNA, namelijk 7,5 µg DNA per T75 cultuurfles. Bovendien is het belangrijk dat dit DNA endotoxine-vrij is, aangezien endotoxines de viabiliteit van de eukaryote cellen en de transfectie-efficiëntie verlagen (Butash *et al.*, 2000). We maken daarom gebruik van de EndoFree Plasmid Maxi KIT (Qiagen) om het plasmide DNA op te zuiveren.

### Materialen

- EndoFree Plasmid Maxi Kit (Qiagen)

### Methode

#### **bacteriecultuur, cellen precipiteren en alkalische cellyse**

- breng 200 µl van de celsuspensie over naar een erlenmeyer met 200 ml LB cultuurmedium met ampicilline (50 mg/l) (Sigma-Aldrich)
- incubeer overnacht in een schudincubator bij 37°C
- koel de neutralisatiebuffer door deze op ijs te plaatsen
- centrifugeer de celsuspensie 20 min. aan 6000 x g bij 4°C
- resuspendeer de celpellet in 10 ml resuspensiebuffer
- voeg 10 ml lysebuffer toe en meng door 4-6 maal te inverteren
- incubeer 5 min. bij kamertemperatuur
- schroef ondertussen de QIAfilter Cartridge dop op de opening van de QIAfilter Cartridge
- voeg 10ml gekoelde neutralisatiebuffer toe en meng door 4-6 maal te inverteren

#### **het cellysaat ophelderen**

- breng het cellysaat over in de QIAfilter Cartridge
- incubeer 10 min. bij kamertemperatuur
- verwijder de dop van de QIAfilter Cartridge opening, breng de zuiger in de Cartridge en filtreer het cellysaat in een falcontube
- voeg 2,5 ml endotoxine verwijderingsbuffer toe aan het gefiltreerde lysaat en meng door ongeveer 10 maal te inverteren
- incubeer 30 min. op ijs

**het plasmide DNA binden, wassen en elueren met behulp van een QIAGEN-tip**

- voeg ondertussen 10 ml equilibratiebuffer toe aan een QIAGEN-tip 500 en laat deze leeglopen door de zwaartekracht
- breng het gefiltreerde lysaat over in de geëquilibreerde QIAGEN-tip 500 en laat deze leeglopen door de zwaartekracht
- was de QIAGEN-tip 500 tweemaal met 30 ml wasbuffer
- elueer het plasmide DNA met 15 ml elutiebuffer en vang op in een nieuwe falcontube

**het plasmide DNA precipiteren, wassen en resuspenderen**

- voeg 10,5 ml isopropanol toe (werk onder de trekkast) en centrifugeer 30 min. aan 15000 x g bij 4°C zodat het plasmide DNA wordt geprecipiteerd
- was de DNA pellet met 5 ml endotoxine-vrij 70% ethanol en centrifugeer 10 min. aan 15000 x g bij 4°C
- droog de pellet aan de lucht en los het plasmide DNA op in 100 µl endotoxine-vrije Tris-EDTA buffer

**concentratiebepaling van het plasmide DNA**

- bepaal de concentratie van het opgezuiverde plasmide DNA met behulp van de Nanodrop ND-1000 Spectrofotometer (Isogen Life Science)
- bewaar het plasmide DNA bij -20°C

**3. Cellulaire assays voor het ontwezen van GPCRs****3.1 Aequorine bioluminescentie screening****3.1.1 Celkweek van CHO-WTA11 en CHO-PAM28 cellen**

Om de GPCRs te ontwezen, maken we gebruik van de omgekeerde farmacologie benadering. Hierbij wordt de gekloneerde receptor tot expressie gebracht in een heteroloog expressiesysteem, namelijk Chinese hamster ovarium (CHO)-WTA11 cellen (Euroscreen). Deze cellen brengen de luminescente reporter apoaequorine en het promiscue  $G\alpha_{16}$  stabiel tot expressie, tesamen met een zeocine-resistentie gen nodig voor selectie. Om te achterhalen welk G-proteïne betrokken is in de signaaltransductieweg, maken we gebruik van CHO-PAM28 cellen, welke enkel het apoaequorine en het zeocine-resistentiegen tot expressie brengen. De cellijnen worden opgegroeid als monolaag cultuur in Dulbecco's Modified Eagle's Medium Nutrient Mixture F-12 Ham (DMEM/F12) bij 37°C en 5% CO<sub>2</sub>. Tweemaal per week worden de cellen gesplitst met een trypsine-EDTA oplossing.

Methode**bereiding van het compleet DMEM cultuurmedium voor CHO cellen**

werk onder de laminaire flowkast:

- neem 50 ml uit een 500 ml fles DMEM Nutrient Mixture F-12 Ham (Sigma-Aldrich) en bewaar dit serumvrij DMEM cultuurmedium in een T25 cultuurfles met CO<sub>2</sub> schroefdop (Techno Plastic Products AG)
- voeg aan het overige toe:
  - 50 ml foetaal kalfsserum (10%) (Sigma-Aldrich)
  - 5 ml penicilline/streptomycine (1%) (10000 U/mL penicilline en 10 mg/ml streptomycine in 0,9% NaCl) (Invitrogen)
  - 1 ml zeocine (100 mg/ml) (Invitrogen)
  - 1 ml fungison in DMSO (1,25 mg/ml in DMSO)
- meng en bewaar bij 4°C

### **CHO cellen splitsen (T25 cultuurfles)**

werk onder de laminaire flowkast:

- plaats het compleet DMEM cultuurmedium en de 0,25% trypsine-EDTA oplossing (Sigma-Aldrich) 30 min. voor aanvang op kamertemperatuur
- verwijder het oude cultuurmedium uit de cultuurfles
- voeg 1,5 ml van een 0,25% trypsine-EDTA oplossing toe
- verwijder de 0,25% trypsine-EDTA oplossing wanneer de cellen bolvormig zijn
- maak de cellen los van de bodem door tegen de fles te kloppen
- verzamel de cellen door de wand van de fles herhaaldelijk af te spoelen met 7 ml compleet DMEM cultuurmedium
- breng hiervan 0,5 ml over naar een nieuwe T25 cultuurfles met 7 ml compleet DMEM cultuurmedium
- incubeer bij 37°C en 5% CO<sub>2</sub>

### **3.1.2 Transfectie van CHO-WTA11 en CHO-PAM28 cellen**

De cellen worden getransfecteerd met het receptorconstruct bij 60% confluente. Als transfectiereagens wordt er gebruik gemaakt van Lipofectamine LTX (Invitrogen). Lipofectamine LTX bevat positief geladen lipiden die in waterig milieu liposomen vormen waarin het negatief geladen DNA plasmide wordt omkapseld. De DNA-bevattende liposomen fuseren met het plasmamembraan zodat het DNA in de cel kan worden opgenomen.

#### Methode (T75 cultuurfles)

werk onder de laminaire flowkast:

- plaats het serumvrij DMEM cultuurmedium 30 min. voor aanvang op kamertemperatuur
- wikkel een steriel polystyreenbuisje in aluminiumfolie zodat het transfectiemengsel wordt beschermd tegen het licht
- breng 3 ml serumvrij DMEM cultuurmedium in dit steriel polystyreenbuisje

- voeg druppelsgewijs 7,5 µg DNA (receptorconstruct) en 18,75 µl Plus reagens (Invitrogen) toe en meng door met het buisje voorzichtig op het werkblad te tikken
- incubeer 5 min. bij kamertemperatuur
- voeg druppelsgewijs 45 µl Lipofectamine LTX (Invitrogen) toe en meng opnieuw door met het buisje voorzichtig op het werkblad te tikken
- incubeer 30 min. bij kamertemperatuur
- verwijder op 3 ml na het oude cultuurmedium uit de T75 cultuurfles
- voeg druppelsgewijs het transfectiemengsel toe aan het cultuurmedium
- incubeer 24 uur bij 37°C en 5% CO<sub>2</sub>
- plaats het compleet DMEM cultuurmedium 30 min. voor aanvang op kamertemperatuur
- voeg 20 ml compleet DMEM cultuurmedium toe aan de getransfecteerde cellen en incubeer 24 uur bij 37°C en 5% CO<sub>2</sub>

### 3.1.3 Aequorine bioluminescentie screening

Vele mariene Coelenterata bevatten een klein proteïne dat door de toevoeging van Ca<sup>2+</sup> een luminescent signaal kan genereren (Shimomura & Johnson, 1970). Eén van deze proteïnen is aequorine dat oorspronkelijk werd geïsoleerd uit de kwal *Aequorea victoria*. CHO-WTA11 en CHO-PAM28 cellen brengen het apoaequorine stabiel tot expressie. Het actieve aequorine wordt gevormd door binding van de chromofore cofactor coelenterazine aan het apoaequorine. In de aanwezigheid van Ca<sup>2+</sup> ondergaat aequorine een conformatieverandering die resulteert in een oxidatieve decarboxylatie waarbij een luminescent signaal bij 469 nm wordt gegenereerd. De getransfecteerde cellen worden gescreend met synthetisch aangemaakte peptiden. Deze peptiden worden bewaard in 80% acetonitrile bij 4°C. De dag voor de eigenlijke screening worden de peptiden gevriesdroogd in de Speedvac concentrator SVC 200H (Savant) en bewaard bij -20°C. De activatie van de receptor wordt nagegaan aan de hand van bioluminescentie metingen. Indien een peptide in staat is de weesreceptor te activeren via Gα<sub>16</sub> (CHO-WTA11) of Gα<sub>q</sub> (CHO-PAM28), leidt dit tot een intracellulaire Ca<sup>2+</sup> toename. In de aanwezigheid van aequorine wordt door het vrijgekomen Ca<sup>2+</sup> een luminescent signaal gegenereerd dat door een bioluminescentiemeter kan worden gedetecteerd. Triton X-100 (0,1%) wordt hierbij gebruikt als positieve controle, BSA cultuurmedium als negatieve controle en 1,5 µM ATP om de functionele respons te controleren.

#### Methodie

#### **de getransfecteerde cellen losmaken (T75 cultuurfles)**

werk onder de laminaire flowkast:

- plaats het compleet DMEM cultuurmedium, het BSA cultuurmedium (0,1% BSA



(Sigma-Aldrich) in DMEM nutrient mixture F-12 Ham) en 0,2% EDTA in PBS (Sigma-Aldrich) 30 min. voor aanvang op kamertemperatuur

- verwijder het cultuurmedium uit de cultuurfles
- voeg 3 ml van een 0,2% EDTA in PBS oplossing toe
- verwijder de 0,2% EDTA in PBS oplossing wanneer de cellen bolvormig zijn
- maak de cellen los van de bodem door tegen de fles te kloppen
- verzamel de cellen door de wand van de fles herhaaldelijk af te spoelen met 10 ml compleet DMEM cultuurmedium en breng dit over in een falcontube
- neem hieruit tweemaal 100 µl om de viabiliteit en het aantal levende cellen te bepalen met de NucleoCounter NC-100+ (Chemotec)

### **de getransfecteerde cellen laden met de cofactor coelenterazine**

werk onder de laminaire flowkast:

- centrifugeer de falcontube met cellen 4 min. aan 800 rpm bij kamertemperatuur
- verwijder het supernatans en resuspendeer de celpellet in BSA cultuurmedium tot een concentratie van  $5 \cdot 10^6$  cellen/ml
- wikkel de falcontube in aluminiumfolie zodat de inhoud wordt beschermd tegen het licht
- voeg coelenterazine h in methanol (500 µM) (Invitrogen) toe tot een concentratie van 10 µl/ml
- incubeer 4 uur bij kamertemperatuur op een zachte schudplaat
- voeg BSA cultuurmedium toe tot een concentratie van  $5 \cdot 10^5$  cellen/ml en incubeer 30 min. bij kamertemperatuur op een zachte schudplaat

### **de compoundplaat klaarmaken**

- los de gevriesdroogde peptiden op in BSA cultuurmedium tot een concentratie van 20 µM en vortex goed
- pipetteer 50 µl van deze peptidenoplossingen in een 96-well microtiterplaat
- pipetteer in een aantal wells 50 µl BSA cultuurmedium (negatieve controle) en 50 µl ATP (3 µM) (positieve controle)
- wikkel de compoundplaat in aluminiumfolie zodat de inhoud wordt beschermd tegen het licht

### **bioluminescentiemeting**

- was de injectoren met 70% ethanol en milliQ water alvorens te beginnen
- plaats de ene injector in een falcontube met celsuspensie en de andere in een falcontube met 0,1% Triton X-100 in 0,1% BSA en prime beide injectoren
- plaats de compoundplaat in de bioluminescentiemeter (Mithras LB 940 luminometer (Berthold technologies, software: MikroWin 2000))
- start de meting

## 3.2 CRE-luciferase reporter assay

### 3.2.1 Celkweek van HEK 293T cellen

Om te achterhalen of de intracellulaire signaaltransductieweg via  $G\alpha_s$  of  $G\alpha_i$  verloopt, maken we gebruik van humane embryonale nier (HEK) 293T cellen, welke noch het apoaequorine noch het promiscue  $G\alpha_{16}$  tot expressie brengen. Cultivatie van de cellijn gebeurt op dezelfde manier als besproken voor CHO cellen. Aan het cultuurmedium wordt echter geen zeocine toegevoegd, aangezien ditmaal niet geselecteerd moet worden voor cellen die apoaequorine en  $G\alpha_{16}$  tot expressie brengen.

#### Methode

#### **bereiding van het compleet DMEM cultuurmedium voor HEK 293T cellen**

werk onder de laminaire flowkast:

- neem 50 ml uit een 500 ml fles DMEM Nutrient Mixture (Sigma-Aldrich) en bewaar in een T25 culturfles met CO<sub>2</sub> schroefdop (Techno Plastic Products AG)
- voeg aan het overige toe:
  - 50 ml foetaal kalfsserum (10%) (Sigma-Aldrich)
  - 5 ml penicilline/streptomycine(1%) (10000 U/mL penicilline en 10 mg/ml streptomycine in 0,9% NaCl) (Invitrogen)
- meng en bewaar bij 4°C

#### **HEK 293T cellen splitsen (T25 culturfles)**

werk onder de laminaire flowkast:

- plaats het compleet DMEM cultuurmedium en de 0,25% trypsine-EDTA oplossing (Sigma-Aldrich) 30 min. voor aanvang op kamertemperatuur
- verwijder het oude cultuurmedium uit de culturfles
- voeg 1,5 ml van een 0,25% trypsine-EDTA oplossing toe
- verwijder de 0,25% trypsine-EDTA oplossing wanneer de cellen bolvormig zijn
- maak de cellen los van de bodem door tegen de fles te kloppen
- verzamel de cellen door de wand van de fles herhaaldelijk af te spoelen met 7 ml compleet DMEM cultuurmedium
- breng hiervan 0,5 ml over naar een nieuwe T25 culturfles met 7 ml compleet DMEM cultuurmedium
- incubeer bij 37°C en 5% CO<sub>2</sub>

### 3.2.2 Transfectie van HEK 293T cellen

De HEK 293T cellen worden op dezelfde wijze getransfecteerd als besproken voor de CHO cellen. Ze dienen echter ook gecontransfecteerd te worden met een reporterconstruct, bestaande uit het luciferasegen van de glimworm (*Photinus pyralis*) downstream van een cAMP response element (CRE) in de luciferase promotor, zodat

de hoeveelheid cAMP in de cellen kan bepaald worden aan de hand van een bioluminescentiemeting.

#### Methode (T75 cultuurfles)

werk onder de laminaire flowkast:

- plaats het Opti-MEM I reduced serum medium (Invitrogen) medium 30 min. voor aanvang op kamertemperatuur
- wikkel een steriel polystyreenbuisje in aluminiumfolie zodat het transfectiemengsel wordt beschermd tegen het licht
- breng 3 ml Opti-MEM medium in dit steriel polystyreenbuisje
- voeg druppelsgewijs 9  $\mu\text{g}$  DNA (6  $\mu\text{g}$  receptorconstruct en 3  $\mu\text{g}$  luciferase reporterconstruct (pCRE(6X)-Luc)) en 18,75  $\mu\text{l}$  Plus reagens (Invitrogen) toe en meng door met het buisje voorzichtig op het werkblad te tikken
- incubeer 5 min. bij kamertemperatuur
- voeg druppelsgewijs 45  $\mu\text{l}$  Lipofectamine LTX (Invitrogen) reagens toe en meng opnieuw door met het buisje voorzichtig op het werkblad te tikken
- incubeer 30 min. bij kamertemperatuur
- verwijder op 3 ml na het oude cultuurmedium uit de T75 cultuurfles
- voeg druppelsgewijs het transfectiemengsel toe aan het cultuurmedium
- incubeer 24 uur bij 37°C en 5% CO<sub>2</sub>
- plaats het compleet DMEM cultuurmedium 30 min. voor aanvang op kamertemperatuur
- voeg 15 ml compleet DMEM cultuurmedium toe aan de getransfecteerde cellen en incubeer 24 uur bij 37°C en 5% CO<sub>2</sub>

### **3.2.3 cAMP metingen met behulp van een CRE-luciferase reporter assay**

Om te achterhalen of de intracellulaire signaaltransductieweg via  $G\alpha_s$  of  $G\alpha_i$  verloopt, worden cAMP metingen uitgevoerd. cAMP wordt geproduceerd door het membraangebonden enzym adenylaats cyclase (AC).  $G\alpha_s$  stimuleert AC, wat leidt tot een cAMP stijging.  $G\alpha_i$  inhibeert de activiteit van AC en zorgt bijgevolg voor een cAMP daling. Een stijging of daling van cAMP is echter moeilijk waarneembaar doordat cAMP in de cel wordt afgebroken door cAMP-fosfodiësterase. Door toevoeging van de cAMP-fosfodiësterase inhibitor 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX), wordt een cAMP stijging beter detecteerbaar. Een cAMP daling komt beter tot uiting door de cellen te preïncuberen met forskoline. Forskoline activeert AC waardoor de cAMP concentratie in de cel initieel hoger is. De hoeveelheid cAMP wordt bepaald met behulp van een CRE-luciferase reporter assay. cAMP activeert het cAMP-afhankelijke proteïne kinase A (PKA), dat op zijn beurt het CRE-bindingsproteïne (CREB) fosforyleert. pCREB bindt vervolgens aan de CRE consensussequentie (5'-TGACCTCA-3') in de luciferase promotor van het reporterconstruct, waardoor de transcriptie van luciferase

wordt geïnduceerd. Luciferase katalyseert de oxidatie van D-luciferine waarbij een luminescent signaal wordt gegenereerd. Een stijging of daling van cAMP kan bijgevolg worden waargenomen als een toename, respectievelijk een afname van het luminescent signaal.

### Materialen

- steadylite plus kit (Perkin Elmer):
  - steadylite plus gevriesdroogd substraat
  - steadylite plus reconstitutiebuffer

### Methode

#### **de getransfecteerde cellen losmaken (T75 cultuurfles)**

werk onder de laminaire flowkast:

- plaats het DMEM/F12 cultuurmedium (DMEM nutrient mixture F-12 Ham zonder fenolrood) (Sigma-Aldrich) en 0,2% EDTA in PBS (Sigma-Aldrich) 30 min. voor aanvang op kamertemperatuur
- verwijder het cultuurmedium uit de cultuurfles
- voeg 3 ml van een 0,2% EDTA in PBS oplossing toe
- verwijder de 0,2% EDTA in PBS oplossing wanneer de cellen bolvormig zijn
- maak de cellen los van de bodem door tegen de fles te kloppen
- verzamel de cellen door de wand van de fles herhaaldelijk af te spoelen met 10 ml DMEM/F12 en breng dit over in een falcontube
- neem hieruit tweemaal 100 µl om de viabiliteit en het aantal levende cellen te bepalen met de NucleoCounter NC-100+ (Chemotec)
- centrifugeer de falcontube met cellen 4 min. aan 800 rpm bij kamertemperatuur
- verwijder het supernatans en resuspendeer de celpellet in DMEM/F12 met 200 µM IBMX (0,1 M) tot een concentratie van  $1 \cdot 10^6$  cellen/ml
- haal de cellen door een naald (18 G)

#### **de compoundplaat klaarmaken**

- los de gevriesdroogde peptiden op in
  - DMEM/F12 met 200 µM IBMX (0,1 M)
  - DMEM/F12 met 200 µM IBMX (0,1 M) en 20 µM forskoline (10 mM) (Sigma-Aldrich)
 tot een concentratie van 20 µM en vortex goed
- pipetteer 50µl van deze peptidenoplossingen in een 96-well microtiterplaat
- pipetteer in een aantal wells 50 µl DMEM/F12 met 200 µM IBMX (en 20 µM forskoline) (negatieve controle)
- pipetteer per well 50 µl van de celsuspensie bij de peptidenoplossing
- wikkel de compoundplaat in aluminiumfolie zodat de inhoud wordt beschermd tegen het licht

- incubeer 3-4 uur bij 37°C en 5% CO<sub>2</sub>

### **Luciferase assay**

- voeg 10,5 ml steadylite plus reconstitutiebuffer toe aan 1 flesje steadylite substraat en invertteer
- incubeer 5 min. bij kamertemperatuur
- pipetteer per well 10 µl steadylite plus reagens
- incubeer 15 min. bij 37°C en 5% CO<sub>2</sub>
- plaats de compoundplaat in de bioluminescentiemeter (Mithras LB 940 luminometer (Berthold technologies, software: MikroWin 2000))
- start de meting

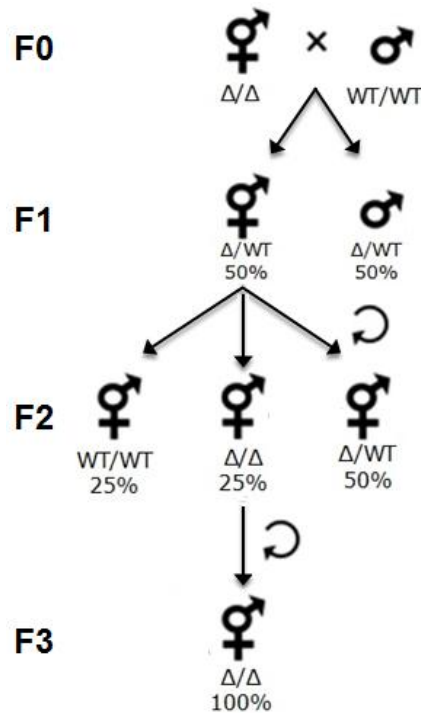
## **4. Analyse van NaCl chemotaxis en bewegingsactiviteit bij deletiemutanten**

### **4.1 Uitkruisen van een mutante *C. elegans* lijn**

De mutante *C. elegans* lijnen afkomstig van het CGC worden bekomen via EMS of UV/TMP mutagenese. Ten gevolge van deze behandeling zijn er naast de gewenste mutatie ook een groot aantal ongewenste mutaties aanwezig. Deze zogenaamde achtergrondmutaties kunnen een effect hebben op het fenotype en dienen daarom zoveel mogelijk verwijderd te worden. Dit wordt bekomen door de mutante lijnen uit te kruisen met wild type N2 wormen (Fig. 5).

#### Methode

- breng met behulp van een worm picker 1 mutante L4 *C. elegans* hermafrodiet en 8 wild type *C. elegans* mannetjes over op een kleine NGM plaat (doorsnede 35 mm) gezaaid met 30 µl *E. coli* OP50
- plaats dit plaatje omgekeerd in een incubator bij 20°C
- zet na 3 tot 4 dagen 6 hermafrodiete F1 nakomelingen apart op kleine NGM platen ('uitsingelen')
- voer een 'single worm' PCR uit op de F1 wormen zodra deze nakomelingen hebben gekregen en selecteer de heterozygote F1 wormen
- zet van elke geselecteerde F1 worm 12 nakomelingen apart op kleine NGM platen
- voer een 'single worm' PCR uit op de F2 wormen zodra deze nakomelingen hebben gekregen en selecteer de F2 wormen die homozygoot zijn voor de mutatie
- de nakomelingen van de geselecteerde F2 wormen zijn bijgevolg ook allen homozygoot voor de mutatie en de mutante lijn is eenmaal uitgekruist
- dit proces wordt herhaald zodat een tweemaal uitgekruiste lijn bekomen wordt



**Figuur 5** Kruisingsschema met als doel het aantal achtergrondmutaties in de mutante *C. elegans* lijnen te verminderen.

#### 4.2 'Single worm' PCR

Om na te gaan of een worm homozygoot of heterozygoot is voor een deletie in een bepaald gen, wordt een 'single worm' PCR uitgevoerd. De wormen worden eerst gelyseerd met behulp van een serine protease zodat het DNA kan vrijkomen. Vervolgens wordt een PCR uitgevoerd met genspecifieke primers (Tabel 5). Het bekomen PCR product wordt gescheiden op basis van lengte met behulp van agarose gelelektroforese om aan te tonen of de mutatie homozygoot of heterozygoot aanwezig is. Indien de wild type en deletieproducten niet of moeilijk van elkaar onderscheiden kunnen worden doordat de deletie erg klein is, of indien het wild type allel te lang is om geamplificeerd te worden, kan gebruik gemaakt worden van zogenaamde 'poison' primers. 'Poison' primers zijn complementair aan een stukje DNA dat in het gedeleteerd gebied is gelegen.

**Tabel 5** Overzicht van de gebruikte genspecifieke primers.

genspecifieke primers	sequentie
CE16937 forward	5`-CTATGGAATCCTGTTCACTA-3`
CE16937 reverse	5`-ACCAACTCGATAATAAGCAGCTG-3`
CE16937 poison (forward)	5`-GTGTATTCACAATGATTGTCATGA-3`

#### Materialen

- lysebuffer (Advantage 2 PCR buffer (1 x) (40 mM Tricine-KOH; 15 mM KOAc; 3,5 mM Mg(OAc)<sub>2</sub>; 3,75 µg/ml BSA; 0,005% Tween 20; 0,005% Nonidet-P40))

(Clontech)

- REDTaq ReadyMix PCR Reaction Mix (20 mM TrisHCl, pH 8,3; 100 mM KCl; 3 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,002% gelatine; 0,4 mM dNTP mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP); stabilisatoren; 0,06 U/μl Taq DNA polymerase) (Sigma-Aldrich)

### Methode

#### **lyse**

- voeg 5 μl proteïnase K (Sigma-Aldrich) (Clontech) toe aan 100 μl lysebuffer (1x) en meng
- breng voor elke worm 4 μl over in een 0,2 ml conisch centrifugeerbuisje
- breng in elk centrifugeerbuisje 1 worm met behulp van een worm picker en incubeer 15 min. bij -80°C
- plaats de stalen in het PCR toestel (TProfessional Thermocycler (Biometra)) en voer de volgende parameters in:
 

1 uur	60°C	lyse
15 min.	95°C	inactivatie
pauze	4°C	pauze
- start de reactie

#### **PCR**

- voeg aan elk centrifugeerbuisje volgende oplossingen toe:
  - 9,5 μl milliQ water
  - 1 μl genspecifieke forward primer (10 mM)
  - 1 μl genspecifieke reverse primer (10 mM)
  - 12,5 μl REDTaq ReadyMix
- plaats de stalen in het PCR toestel (TProfessional Thermocycler (Biometra)) en voer de volgende parameters in:
 

	2 min.	95°C	hot start denaturatie	
25 x	{	30 s.	95°C	denaturatie
		30 s.	55°C	hybridisatie
		3 min.	72°C	elongatie
		10 min.	72°C	finale elongatie
	pauze	10°C	pauze	
- start de PCR reactie
- analyseer op een 1% agarosegel om de lengte van de geamplificeerde PCR product(en) te bepalen

### **4.3 Synchronisatie van *C. elegans***

Om een populatie van gesynchroniseerde *C. elegans* wormen te bekomen, worden ze behandeld met een basische hypochlorietoplossing ('bleachen'). Enkel de eitjes overleven deze behandeling doordat ze een dikkere cuticula hebben die hen

beschermd. Door deze eitjes te laten uitkomen in de afwezigheid van voedsel, zullen de larven niet verder ontwikkelen en overgaan in een L1 diapauze toestand. Dergelijke larven kunnen 6 tot 10 dagen overleven zonder voedsel. Wanneer de gesynchroniseerde wormen vervolgens worden blootgesteld aan voedsel, zullen de L1 larven zich verder ontwikkelen. De wormen bevinden zich nu allen in hetzelfde stadium.

### Materialen

- S-basaal buffer (5,85 g NaCl; 1 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 6 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; aanlengen met gedestilleerd water tot 1 l; autoclaveren)
- bleach-oplossing (0,5 ml NaOH (5 M); 1 ml 5% NaOCl)

### Methode

- spoel de wormen van de cultuurplaten met S-basaal buffer en breng ze over in een falcontube
- centrifugeer 4 min. aan 1100 rpm bij 15°C
- verwijder het supernatans op 3,5 ml na
- los de geprecipiteerde wormen op in het resterende supernatans en voeg dit toe aan de bleach-oplossing
- inverteer 3 tot 4 min. totdat de adulte wormen breken en de eitjes vrij in de oplossing drijven
- voeg meteen 5 ml 60% sucrose-oplossing toe en meng
- druppel 1 ml S-basaal buffer bovenop het mengsel
- centrifugeer 4 min. aan 1100 rpm bij 15°C

werk verder onder de laminaire flowkast:

- breng de eitjes, die zich in de sucrose/S-basaal scheidingslaag bevinden, met een steriel pasteurpipet over naar een falcontube met 10 ml S-basaal
- centrifugeer 4 min. aan 1100 rpm bij 15°C
- verwijder het supernatans op 2 ml na en voeg 10 ml S-basaal toe
- los de geprecipiteerde eitjes op in het resterende supernatans en herhaal de wasstap nog 4 maal
- plaats de falcontube met de eitjes in een roterend rek in een incubator bij 20°C
- wacht tot de eitjes uitgekomen zijn en breng de L1 larven over naar een NGM plaat gezaaid met *E. coli* OP50 (max. 2000 wormen/plaat)
- plaats de cultuurplaten in een incubator bij 20°C

## **4.4 Analyse van NaCl chemotaxis**

We bestuderen het zout chemotaxis gedrag van wild type en mutante *C. elegans* lijnen aan de hand van de vier-kwadrant plaat chemotaxis test. Dit assay wordt eveneens gebruikt om de gustatorische plasticiteit - dit is de respons van *C. elegans* op 25 mM NaCl na eerdere blootstelling aan 100 mM NaCl - van deze lijnen te onderzoeken. De



chemotaxis index wordt berekend als  $CI = (A-C)/(A+C)$ , met A het aantal wormen op de kwadranten met 25 mM NaCl (1 en 3) en N het aantal wormen op de controlekwadranten (2 en 4).

### Materialen

- fosfaatbuffer (1 M) (108,9 g  $KH_2PO_4$ ; 34,84 g  $K_2HPO_4$ ; aanlengen met milliQ water tot 1 l)
- M9 buffer (6 g  $Na_2HPO_4$ ; 3 g  $K_2HPO_4$ ; 5 g NaCl; 1 ml  $MgSO_4$  (1M); aanlengen met milliQ water tot 1 l)
- CTX buffer (5 mM  $KH_2PO_4/K_2HPO_4$ ; 1mM  $CaCl_2$ ; 1 mM  $MgSO_4$ ; aanlengen met milliQ water tot 1 l)
- CTX buffer gesupplementeerd met NaCl (5 mM  $KH_2PO_4/K_2HPO_4$ ; 1mM  $CaCl_2$ ; 1 mM  $MgSO_4$ ; 100 mM NaCl; aanlengen met milliQ water tot 1 l)
- bleach-oplossing (0,5 ml NaOH (5 M); 1 ml 13% NaOCl (Acros Organics))

### Methode

#### *dag 1:*

- bereiding van het NGM cultuurmedium met milliQ water (§1.2)
- vul de petriplaten (doorsnede 90 mm) met 28 ml NGM cultuurmedium
- laat overnacht drogen op de bench zodat het NGM cultuurmedium kan stollen

#### *dag 2:*

- breng op elke plaat 200  $\mu$ l *E. coli* OP50 ('zaaien') aan
- laat de bacteriën overnacht groeien op de bench en bewaar de gezaaide platen bij 4°C

#### *dag 3:*

- plaats de NGM platen voor aanvang op kamertemperatuur
- chunk 2 tot 3 platen per lijn (positieve controle (N2), negatieve controle (*osm-9(ky10)*) en mutante lijn)
- plaats de cultuurplaten omgekeerd in een incubator bij 20°C

#### *dag 6:*

##### synchronisatie van *C. elegans*:

- spoel de wormen van de cultuurplaten met M9 buffer en breng ze over in een falcontube
- laat de wormen gedurende 5 minuten bezinken
- verwijder het supernatans op 2 ml na
- los de geprecipiteerde wormen op in het resterende supernatans en breng dit over in een 2 ml microcentrifugeerbuisje
- laat de wormen gedurende 5 minuten bezinken
- verwijder het supernatans op 0,5 ml na
- voeg 250  $\mu$ l bleach-oplossing toe, inverteer tweemaal en incubeer 4 min.

- voeg 800 µl M9 buffer toe en inverteer
- centrifugeer 1 min. aan 2000 rpm
- verwijder het supernatans en voeg 1,5 ml M9 buffer toe
- los het precipitaat op in het resterende supernatans en herhaal de wasstap tweemaal
- verwijder het supernatans en verdeel het precipitaat op een NGM plaat gezaaid met *E. coli* OP50
- plaats de cultuurplaten in een incubator bij 25°C

*dag 7:*

- plaats de NGM platen voor aanvang op kamertemperatuur
- verdeel de cultuurplaat in 6-10 chunks naargelang het aantal wormen dat uit de eitjes is gekomen en breng elke chunk over op een NGM plaat
- plaats de cultuurplaten in een incubator bij 25°C

*dag 8:*

- los 17 g agar (Sigma-Aldrich) op in 900 ml milliQ water, autoclaveer en plaats overnacht in een incubator bij 50°C

*dag 9:*

- plaats de cultuurplaten op de bench zodat de jong adulte wormen kunnen acclimatiseren

**aanmaak gebufferde agar** (1,7% agar, 5 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ ; 1mM  $\text{CaCl}_2$ ; 1 mM  $\text{MgSO}_4$ )

- voeg aan de geautoclaveerde agaroplossing volgende producten toe:
  - 1 ml  $\text{CaCl}_2$  (1 M; met milliQ water)
  - 1 ml  $\text{MgSO}_4$  (1 M; met milliQ water)
  - 25 ml fosfaatbuffer (1 M; met milliQ water)
- leng aan met milliQ water tot 1 l

**aanmaak gebufferde agar gesupplementeerd met NaCl** (1,7% agar, 5 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ ; 1mM  $\text{CaCl}_2$ ; 1 mM  $\text{MgSO}_4$ ; 25 mM NaCl)

- voeg aan de geautoclaveerde agaroplossing volgende producten toe:
  - 1 ml  $\text{CaCl}_2$  (1 M; met milliQ water)
  - 1 ml  $\text{MgSO}_4$  (1 M; met milliQ water)
  - 25 ml fosfaatbuffer (1 M; met milliQ water)
  - 5 ml NaCl (5 M; met milliQ water)
- leng aan met milliQ water tot 1 l

**vier-kwadrant petriplaten klaarmaken**

- vul twee tegenover elkaar gelegen kwadranten van vier-kwadrant petriplaten (Falcon X plate, BD) met 13,5 ml gebufferde agar gesupplementeerd met NaCl

- vul de andere twee kwadranten met agar zonder NaCl
- laat 1 uur drogen op de bench zodat de agar kan stollen
- vul de scheidingen van de kwadranten met gebufferde agar net voor het uitvoeren van de test

#### **chemotaxis assay (gustatory plasticity)**

- spoel de wormen van de cultuurplaten met CTX buffer (gesupplementeerd met NaCl) en breng ze over in een falcontube
- laat de wormen gedurende 5 minuten bezinken
- verwijder het supernatans op 1 ml na
- voeg 10 ml CTX buffer (gesupplementeerd met NaCl) toe en herhaal de wasstap tweemaal
- plaats 100-200 wormen op het snijpunt van de vier-kwadranten plaat en verwijder de overtollige vloeistof (in tweevoud)
- incubeer de platen 10 min. op de bench (compenseer voor omgevingsinvloeden door de 2 platen in in een verschillende oriëntatie te plaatsen)
- tel het aantal wormen op de vier kwadranten en bereken de chemotaxis index

### **4.5 Analyse van bewegingsactiviteit**

We bestuderen de bewegingsactiviteit van wild type en mutante *C. elegans* lijnen in aan- en afwezigheid van voedsel met behulp van de WormMicrotracker (Designplus). Dit toestel detecteert beweging aan de hand van een fijne bundel infrarood licht. Elke microtiterplaatwell wordt minstens eenmaal doorkruist door een infrarode lichtstraal en wordt meer dan tienmaal per seconde gescand. Wanneer wormen nabij de lichtbundel komen of er doorheen bewegen, worden veranderende lichtintensiteiten waargenomen door de fototransistor als gevolg van lichtverstrooiing. Het gedetecteerde signaal wordt vervolgens digitaal verwerkt waarbij de bewegingsactiviteit gedurende een bepaalde periode wordt berekend.

#### Materialen

- kaliumcitraat (1 M) (20 g  $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$ ; 293,5 g  $C_6H_5K_3O_7 \cdot H_2O$ ; aanlengen met gedestilleerd water tot 1 l; autoclaveren)
- trace metals solution (1,86 g  $Na_2EDTA$ ; 0,69 g  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ ; 0,2 g  $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ ; 0,29 g  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ ; 0,025 g  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ ; aanlengen met gedestilleerd water tot 1 l; autoclaveren en in het donker bewaren)
- S-basaal buffer (5,85 g NaCl; 1 g  $K_2HPO_4$ ; 6 g  $KH_2PO_4$ ; aanlengen met gedestilleerd water tot 1 l; autoclaveren)

#### Methode

##### **aanmaak vloeibare cultuur zonder voedsel**

Werk onder de laminaire flowkast:

- voeg aan een 15 ml falcontube volgende oplossingen toe:
  - 100 µl kaliumcitraat
  - 100 µl trace metal solution
  - 30 µl MgSO<sub>4</sub> (1 M)
  - 30 µl CaCl<sub>2</sub> (1 M)
  - 50 µl nystatine (10 000 U/ml)
  - 10 µl cholesterol in ethanol (5 mg/ml)
  - 20 µl ampicilline (50 mg/ml)
  - 20 µl kanamycine (50 mg/ml)
- leng aan met S-basaal buffer tot 10 ml

### **aanmaak vloeibare cultuur met voedsel**


Werk onder de laminaire flowkast:

- voeg aan een 15 ml falcontube volgende oplossingen toe:
  - 100 µl kaliumcitraat
  - 100 µl trace metal solution
  - 30 µl MgSO<sub>4</sub>
  - 30 µl CaCl<sub>2</sub>
  - 50 µl nystatine
  - 10 µl cholesterol in ethanol
- leng aan met S-basaal buffer tot 10 ml

### **de 96-well microtiterplaat klaarmaken**

- spoel de gesynchroniseerde wormen van de cultuurplaten met S-basaal buffer en breng ze over in een falcontube
- centrifugeer 4 min. aan 1100 rpm bij 15°C
- verwijder het supernatans op 1 ml na
- voeg 10 ml S-basaal buffer toe en herhaal de wasstap nogmaals
- tel het aantal wormen door middel van een druppelschatting en pas het volume aan zodat er 30 wormen in 50 µl S-basaal aanwezig zijn
- centrifugeer de opgegroeide *E. coli* OP50 cultuur 1 min. aan 4500 rpm
- verwijder het supernatans en los de pellet op in 5 ml S-basaal
- meet de optische densiteit (Biowave Co800 Cell density meter (Biochrom)) en pas het volume aan zodat een OD<sub>600 nm</sub> van 1 bekomen wordt
- neem een 96-well microtiterplaat met platte bodem en vul elke well met 200 µl vloeibare cultuur en 50 µl wormen in S-basaal (± 30).
- tel het aantal wormen in elke well
- indien de bewegingsactiviteit wordt getest in aanwezigheid van voedsel, wordt tevens 20 µl *E. coli* OP50 cultuur (OD<sub>600 nm</sub> = 1) toegevoegd
- dek de 96-well microtiterplaat af met folie om uitdroging te voorkomen en perforereer de folie tweemaal per well voor zuurstofvoorziening

### analyse van de bewegingsactiviteit

- plaats de 96-well microtiterplaat in de correcte houder in de WormMicrotracker (Designplus) en voor de volgende handelingen uit:
  - open WMicrotracker Software
  - creëer een nieuw project: Setup > Save > Do you like to update <0\_Default> values? No > vul de projectnaam in > Acceptar
  - voer experimentele parameters in: Setup > Config > Well format: w96f; Acq. Lapse: 480 min; DSP method: 0\_Threshold+Binary (Liquid medium)
  - selecteer experimentele groepen (technische replica's): Setup > Groups > selecteer groep en wijzig naam > klik op de wells om ze toe te wijzen aan deze groep (rechtermuisknop om te deselecteren) > selecteer volgende groep en herhaal > Save
  - voer verdere experimentele parameters in: Main > Tools: *C. elegans* (>L4); >>>> Zero SNR: 2,2
  - start het experiment: klik  > voer datum in > Acceptar

## 5. Aanmaak van GFP reporterconstructen

*C. elegans* is een transparant organisme wat het mogelijk maakt om de expressie van GFP reporterconstructen *in vivo* te visualiseren. In deze thesis worden twee verschillende benaderingen toegepast. Enerzijds worden de promoterregio ( $\pm$  4 kb upstream van het startcodon) en het genomisch DNA van twee weesreceptoren gekloneerd in een gemodificeerde pSM vector (geschonken door C. Bargmann, Rockefeller University, New York, NY). Anderzijds worden lineaire reporterconstructen aangemaakt waarbij de promoterregio van het eiwit van interesse wordt gefuseerd aan het GFP reporter gen. Deze GFP reporterconstructen worden via microinjectie in de distale arm van de gonaden gebracht. De distale kiemcellen delen een gemeenschappelijk cytoplasma, waardoor DNA dat hier geïnjecteerd wordt aan vele nakomelingen kan worden doorgegeven. Deze aanpak leidt gewoonlijk tot de vorming van grote extrachromasomale DNA arrays. Om de selectie van transgene dieren te vergemakkelijken, worden ze geco-injecteerd met de *Pelt-2::mCherry* co-injectiemerker.

### 5.1 Aanmaak van GFP reporterconstructen in een pSM vector

Om het *in vivo* expressiepatroon van een receptor en zijn ligand(en) na te gaan, worden reporterconstructen gegenereerd in een gemodificeerde pSM vector met een GFP reporter sequentie die voorafgegaan wordt door een SL2 trans-splicing sequentie. De SL2 site bestaat uit de intergene regio van het *gpd-2/gpd-3* operon met een evolutionair geconserveerde T-rijke sequentie die noodzakelijk is voor trans-splicing.

Dit heeft als voordeel dat GFP niet als een chimeer, maar als een individueel proteïne getransleerd wordt. De 3'-onvertaalde regio (UTR) van de vector is afgeleid van het myosine zware keten gen *unc-54* en zorgt voor een efficiënte verwerking van de transcripten. Het ampicilline resistentiegen dient voor de positieve selectie van transformante *E. coli* cellen. Het genomisch DNA van de weesreceptoren NMUR-1 en CE16937 wordt tussen de BamHI en SmaI restrictieplaatsen van de multi-pele kloneringssite (MCS) gekloneerd, de corresponderende promoters tussen de NotI en NaeI restrictieplaatsen.

### 5.1.1 Amplificatie van het receptor gDNA en de promoter

Voor de amplificatie van het receptor gDNA en de promoter maken we gebruik van de PfuUltra II Fusion HS DNA Polymerase kit (Agilent Technologies). Deze kit bevat het *PfuUltra II* polymerase dat 3' naar 5' exonuclease proofreading activiteit biedt, en een antilichaam zodat een automatische hot start optreedt. Op basis van de gekende sequenties worden genspecifieke primers ontwikkeld (Tabel 6). De primers bevatten naast de genspecifieke sequentie ook een 5' overhangend uiteinde met een 5'-ACTATG-3' of 5'-CATAGT-3' sequentie om een goede aanhechting van het restrictie-enzym te verzekeren, gevolgd door de herkenningssequentie van het restrictie-enzym.

**Tabel 6** Overzicht van de gebruikte genspecifieke primers. De herkenningssequentie van de restrictie-enzymen worden onderlijnd weergegeven.

genspecifieke primers	sequentie
NMUR-1 promoter forward	5'-ACTATG <u>GCGGCCG</u> CTGTTGGCCATTTCTTCGCT-3'
NMUR-1 promoter reverse	5'-CATAGT <u>GCCGGC</u> GTCTCACTCGGCTGAAATCC-3'
NMUR-1 gDNA forward	5'-ACTATG <u>GGATCC</u> ATGTTGCAAGCTTGCCCTAAC-3'
NMUR-1 gDNA reverse	5'-CATAGT <u>CCCGGG</u> TATGCGTTTGTGGAGTC-3'
CE16937 promoter forward	5'-ACTATG <u>GCGGCCG</u> CCCCACTTTGCTCATTACC-3'
CE16937 promoter reverse	5'-CATAGT <u>GCCGGC</u> TCTGAACTTGTAGAATATTGAAAC-3'
CE16937 gDNA forward	5'-ACTATG <u>GGATCC</u> ATGACAACGTGTCCCCTACCA-3'
CE16937 gDNA reverse	5'-CATAGT <u>CCCGGG</u> TCAGAAATCCGTATGCGCCA-3'

#### Materialen

- *PfuUltra II* Fusion HS DNA Polymerase kit (Agilent Technologies):
  - *PfuUltra II* Fusion HS DNA Polymerase (50x)
  - *PfuUltra II* reactiebuffer
- dNTP mix (25 mM) (25 mM ATP; 25 mM CTP; 25 mM GTP; 25 mM TTP)

#### Methode

- voeg aan een steriel 0,2 ml conisch centrifugeerbuisje volgende oplossingen toe:
  - 40,5 µl milliQ water

- 5 µl *PfuUltra* II reactiebuffer
  - 1 µl gDNA van N2 *C. elegans* hermafrodieten
  - 0,5 µl dNTP mix (25 mM)
  - 1 µl genspecifieke forward primer (10 mM)
  - 1 µl genspecifieke reverse primer (10 mM)
  - 1 µl *PfuUltra* II Fusion HS DNA Polymerase
- plaats de stalen in het PCR toestel (TProfessional Thermocycler (Biometra)) en voer de volgende parameters in:
- |        |        |                    |                       |
|--------|--------|--------------------|-----------------------|
|        | 5 min. | 95°C               | hot start denaturatie |
| 35 x { | 45 s.  | 95°C               | denaturatie           |
|        | 1 min. | 50°C, 55°C of 60°C | hybridisatie          |
|        | 4 min. | 68°C               | elongatie             |
|        | 3 min. | 68°C               | finale elongatie      |
|        | pauze  | 10°C               | pauze                 |
- start de PCR reactie en bewaar de stalen na afloop bij -20°C

### 5.1.2 Restrictie

De geamplificeerde PCR-producten worden gedigesteerd met twee FastDigest restrictie-enzymen (Tabel 7). De MCS van de pSM vector wordt met dezelfde restrictie-enzymen geknipt als het te insereren PCR-product. Op deze manier worden DNA fragmenten gegenereerd met compatibele uiteinden, zodat deze met een DNA ligase aan elkaar geligeerd kunnen worden.

**Tabel 7** Overzicht van de gebruikte FastDigest restrictie-enzymen.

PCR-product	FastDigest restrictie-enzym 1	FastDigest restrictie-enzym 2
NMUR-1 promoter	NotI	NaeI
NMUR-1 gDNA	BamHI	SmaI
CE16937 promoter	NotI	NaeI
CE16937 gDNA	BamHI	SmaI

#### Methode

- voeg aan een 0,5 ml conisch centrifugeerbuisje volgende oplossingen toe:
  - 2 µl FastDigest buffer (10x) (Thermo Scientific)
  - 1 µl FastDigest restrictie-enzym 1 (Thermo Scientific)
  - 1 µl FastDigest restrictie-enzym 2 (Thermo Scientific)
  - x µl pSM vector DNA en geamplificeerd gDNA of promoter DNA van de weesreceptor (PCR-product) (samen max. 1 µg)
- leng aan met milliQ water tot 20 µl
- plaats het centrifugeerbuisje in het TRIO Heated Lid (Biometra) toestel en voer de volgende parameters in:

4 uur	22°C	restrictie
20 min.	65°C	inactivatie
pauze	4°C	pauze

### 5.1.3 Defosforylatie

Na digestie met restrictie-enzymen bevatten uiteinden van de DNA fragmenten een 5'-fosfaatgroep nodig voor ligatie. Om zelfsluiting van de vector te voorkomen, worden de 5'-uiteinden van de vector gedefosforyleerd met behulp van een fosfatase enzym.

#### Materialen

- Antarctic Phosphatase reactiebuffer (10x) (50 mM Bis-Tris-Propane-HCl; 1 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,1 mM ZnCl<sub>2</sub>; pH 6) (New England Biolabs)

#### Methode

- voeg aan een 0,5 ml conisch centrifugeerbuisje volgende oplossingen toe:
  - 2,5 µl Antarctic Phosphatase (5 U/µl) (New England Biolabs)
  - 2,5 µl Antarctic Phosphatase reactiebuffer
  - 20 µl restrictie-oplossing van pSM vector DNA
- plaats het centrifugeerbuisje in het TRIO Heated Lid (Biometra) toestel en voer de volgende parameters in:

30 min.	37°C	defosforylatie
10 min.	65°C	inactivatie
pauze	4°C	pauze

### 5.1.4 Ligatie en transformatie van competente *E. coli* cellen

Het gedigesteerd DNA van de weesreceptor wordt vervolgens in de gedefosforyleerde pSM vector geligeerd gebruikmakend van het T4 DNA ligase (Thermo Scientific). Het T4 DNA ligase katalyseert de vorming van een fosfodiësterbinding tussen de 5'-fosfaatgroep van het insert en de 3'-hydroxylgroep van de gelinealiseerde vector. Om de kans op slagen te verhogen, worden verschillende insert:vector verhoudingen gebruikt.

#### Materialen

- T4 DNA ligase (5 U/µl; in 20 mM Tris-HCl; 1 mM DTT; 50 mM KCl; 0,1 mM EDTA; 50% (v/v) glycerol) (Thermo Scientific)
- T4 DNA ligase buffer (10x) (400 mM Tris-HCl; 100 mM MgCl<sub>2</sub>; 100 mM DTT; 5 mM ATP; pH 7,8) (Thermo Scientific)

#### Methode

- voeg aan een 0,5 ml conisch centrifugeerbuisje volgende oplossingen toe:
- x µl insert DNA (restrictie-oplossing van geamplificeerd gDNA of promotor DNA van de weesreceptor) en y µl pSM vector DNA (gedefosforyleerde restrictie-



oplossing van pSM vector DNA) (samen max. 200 ng DNA)

- 2 µl T4 DNA ligase
- 2 µl buffer
- leng aan met milliQ water tot 20 µl
- plaats het centrifugeerbuisje in het TRIO Heated Lid (Biometra) toestel en voer de volgende parameters in:

4 uur	37°C	ligatie
20 min.	65°C	inactivatie
pauze	4°C	pauze

De vectoren, al dan niet met insert, worden in competente *E. coli* cellen gebracht zoals reeds eerder beschreven in §2.3.2.

### 5.1.5 Kolonie PCR

De pSM vector heeft een ampicilline resistentiegen voor de positieve selectie van transformante *E. coli* cellen. Het is echter mogelijk dat de transformanten een vector zonder insert hebben opgenomen. Om te achterhalen welke kolonies de vector met insert bevatten, wordt een kolonie PCR uitgevoerd met primers die complementair zijn aan de vectorsequentie (Tabel 8). Indien er een insert aanwezig is, zal het geamplificeerde fragment beduidend langer zijn, wat kan worden waargenomen door middel van een agarose gelelektroforese.

**Tabel 8** Overzicht van de gebruikte primers.

genspecifieke primers	sequentie
pSM forward	5'-TGACCATGATTACGCCAAGC-3'
pSM reverse	5'-ACAACCTTTATTGAGAAGAGACC-3'

#### Materialen

- Advantage 2 PCR kit (Clontech):
  - Advantage 2 Polymerase Mix (50x) (TITANIUM Taq DNA polymerase, een kleine hoeveelheid proofreading polymerase en TaqStart Antibody (1,1 µg/µl) in 50% glycerol; 15 mM Tris-HCl, 75 mM KCl; 0,05 mM EDTA)
  - Advantage 2 PCR buffer (10x) (400 mM Tricine-KOH; 150 mM KOAc; 35 mM Mg(OAc)<sub>2</sub>; 37,5 µg/ml BSA; 0,05% Tween 20; 0,05% Nonidet-P40)
- dNTP mix (10 mM) (10 mM ATP; 10 mM CTP; 10 mM GTP; 10 mM TTP)

Methodie

- voeg aan een steriel 0,2 ml conisch centrifugeerbuisje volgende oplossingen toe:
  - 20 µl milliQ water
  - 2,5 µl Advantage 2 PCR buffer
  - 0,5 µl pSM forward primer (10 mM)
  - 0,5 µl pSM reverse primer (10 mM)
  - 0,5 µl Advantage 2 PCR polymerase

werk verder onder de laminaire flowkast:

- schraap met een pipetpunt een kolonie van de selectieve LB agarplaat af en los deze op in 50 µl steriel water in een 1,5 µl conisch centrifugeerbuisje
- voeg hiervan 5 µl toe aan de PCR mastermix
- voeg 300 µl LB cultuurmedium met ampicilline toe aan de overschot van het koloniemengsel en incubeer overnacht in een schudincubator bij 37°C, bewaar bij 4°C
- plaats het centrifugeerbuisje in het PCR toestel (TProfessional Thermocycler (Biometra)) en voer de volgende parameters in:

	1 min.	95°C	hot start denaturatie	
30 x	{	30 s.	95°C	denaturatie
		1 min.	50°C	hybridisatie
		4 min.	68°C	elongatie
		3 min.	68°C	finale elongatie
	pauze	10°C	pauze	

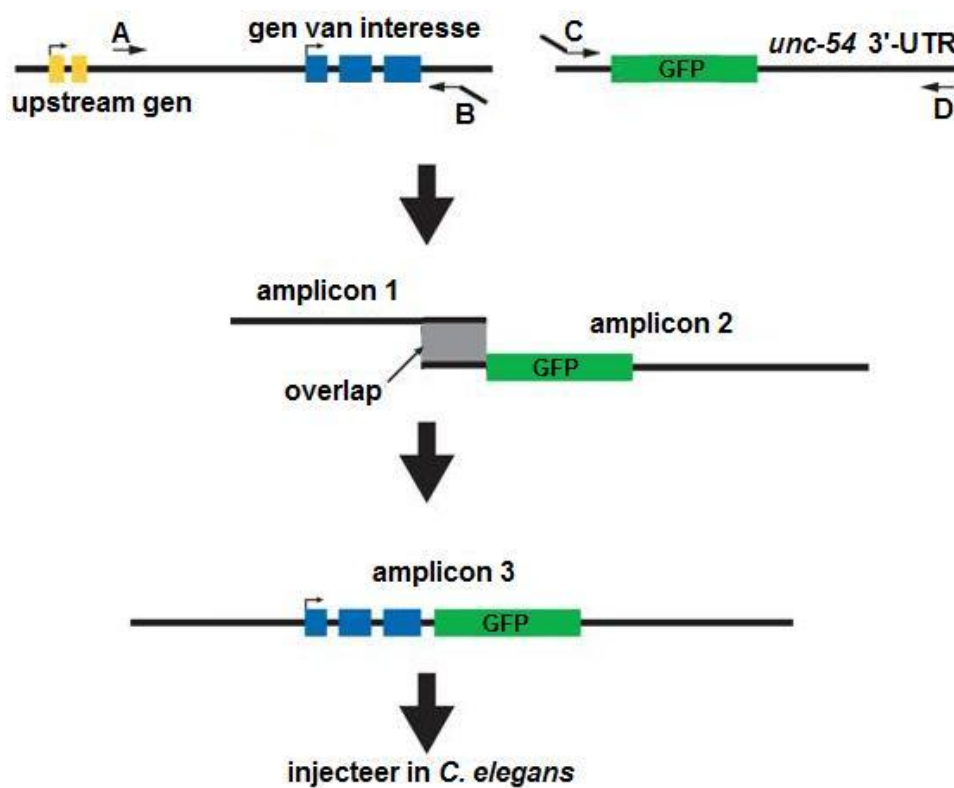
- controleer de lengte van het fragment via agarose gelelektroforese
- breng 100 µl van een kolonie met insert over in 7 ml LB cultuurmedium met ampicilline (50 mg/l) (Sigma-Aldrich)
- incubeer overnacht in een schudincubator bij 37°C, bewaar bij 4°C

## 5.2 Aanmaak van GFP reporterconstructen met behulp van de PCR fusie techniek

In een tweede aanpak worden lineaire reporterconstructen aangemaakt waarbij de promoterregio van het eiwit van interesse wordt gefuseerd aan het GFP reporter gen in eenzelfde open leesraam. Dit verzekert de productie van een chimeer proteïne, bestaande uit het doelwitproteïne en het reporterproteïne. De gevolgde stappen worden schematisch weergegeven in Fig. 6. De *GFP* coderende sequentie geamplificeerd uit de pPD95.75 vector is een variant van het GFP uit de kwal *Aequorea victoria* waarin serine 65, één van de drie residu's in de chromofoor, gemuteerd is naar een cysteïne. Dit GFP bevat bovendien artificiële introns en de *unc-54* 3'-UTR voor een betere expressie.

### 5.2.1 Amplificatie van het *GFP* gen en de promoter van het doelwitproteïne

Voor de amplificatie van het GFP reporter-gen en de promoterregio van de weesreceptor en de neuropeptide precursor maken we gebruik van de PfuUltra II Fusion HS DNA Polymerase kit (Agilent Technologies). Op basis van de gekende sequenties worden genspecifieke primers ontwikkeld (Tabel 9). Primers B bevatten een overhangende regio die complementair is aan het 5'-uiteinde van amplicon 2 zodat GFP in hetzelfde open leesraam ligt. Primer T07C12.15::GFP (C) heeft bovendien een overhangende sequentie die complementair is aan het 3'-uiteinde van amplicon 1. Dit zorgt voor een grotere overlappende regio en vergemakkelijkt het genereren van het fusieconstruct.



**Figuur 6** Aanmaak van een PCR fusieconstruct. Primers A en B amplificeren de genomische regio (amplicon 1). Primer B voegt een 24 bp overlap toe zodat GFP in hetzelfde open leesraam ligt. Primers C en D amplificeren de GFP coderende sequentie met de 3' regulatorische regio van *unc-54* (amplicon 2). Ook primer C kan een overlap toevoegen. In een volgende stap worden beide amplicons aan elkaar gefuseerd doordat de overlappende regio dienst doet als primer. Tot slot wordt het resulterende fusieconstruct opgezuiverd met LiCl en geïnjecteerd in *C. elegans*.

**Tabel 9** Overzicht van de gebruikte genspecifieke primers. De overlappende sequenties worden onderlijnd weergegeven.

genspecifieke primers	sequentie
CE16937 (A)	5'-CGAAATTGTTTCATAGGTTCCATG-3'
CE16937 (B)	5'- <u>CTCCTGAAAATGTTCTATGTTATGCAGATCCATTTTCGTC</u> -3'
CE16937::GFP (C)	5'- <u>CATAACATAGAACATTTTCAGGAG</u> -3'
CE16937::GFP (D)	5'-GGAGCTGCATGTGTCAGAGGTT-3'
T07C12.15 (A)	5'-GGAATGTATTAGACAACAGT-3'
T07C12.15 (B)	5'- <u>TCCTGAAAATGTTCTATGTTATGAGCCCCGCCCACTTTCTG</u> -3'
T07C12.15::GFP (C)	5'-CAGAAAGTGGGCGGGGCT <u>CATAACATAGAACATTTTCAGGA</u> -3'
CE16937::GFP (D)	5'-GGAGCTGCATGTGTCAGAGGTT-3'

### Materialen

- *PfuUltra* II Fusion HS DNA Polymerase kit (Agilent Technologies):
  - *PfuUltra* II Fusion HS DNA Polymerase (50x)
  - *PfuUltra* II reactiebuffer
- dNTP mix (25 mM) (25 mM ATP; 25 mM CTP; 25 mM GTP; 25 mM TTP)

### Methode

- voeg aan een steriel 0,2 ml conisch centrifugeerbuisje volgende oplossingen toe:
  - 40,5 µl milliQ water
  - 5 µl *PfuUltra* II reactiebuffer
  - 1 µl gDNA van N2 *C. elegans* hermafrodieten of pPD95.75 vector
  - 0,5 µl dNTP mix (25 mM)
  - 1 µl genspecifieke forward primer (10 mM)
  - 1 µl genspecifieke reverse primer (10 mM)
  - 1 µl *PfuUltra* II Fusion HS DNA Polymerase
- plaats de stalen in het PCR toestel (TProfessional Thermocycler (Biometra)) en voer de volgende parameters in:
 

	5 min.	95°C	hot start denaturatie	
35 x	{	45 s.	95°C	denaturatie
		1 min.	50°C, 55°C of 60°C	hybridisatie
		4 min.	68°C	elongatie
		3 min.	68°C	finale elongatie
	pauze	10°C	pauze	
- start de PCR reactie en bewaar de stalen na afloop bij -20°C

### 5.2.2 Fusie van het geamplificeerde promoter DNA en GFP

Vervolgens worden beide amplicons aan elkaar gefuseerd doordat de 24 bp overlappende regio dienst doet als primer. Naar het protocol van Nelson & Fitch (2011) worden de amplicons verdund tot 0,1 pmol/ $\mu$ l. De concentratiewaarden bepaald met de Nanodrop ND-1000 Spectrofotometer (Isogen Life Science) dienen daarvoor eerst te worden omgezet van ng/ $\mu$ l naar pmol/ $\mu$ l. Hiervoor wordt een online calculator (<http://www.promega.com/techserv/tools/biomath/calc05.htm>) aangewend.

#### Materialen

- *PfuUltra* II Fusion HS DNA Polymerase kit (Agilent Technologies):
  - *PfuUltra* II Fusion HS DNA Polymerase (50x)
  - *PfuUltra* II reactiebuffer
- dNTP mix (25 mM) (25 mM ATP; 25 mM CTP; 25 mM GTP; 25 mM TTP)

#### Methode

- voeg aan een steriel 0,2 ml conisch centrifugeerbuisje volgende oplossingen toe:
  - 41  $\mu$ l milliQ water
  - 5  $\mu$ l *PfuUltra* II reactiebuffer
  - 1  $\mu$ l amplicon 1 (PCR-product) (0,1 pmol/ml)
  - 1  $\mu$ l amplicon 2 (PCR-product) (0,1 pmol/ml)
  - 1  $\mu$ l dNTP mix (25 mM)
  - 1  $\mu$ l *PfuUltra* II Fusion HS DNA Polymerase
- plaats de stalen in het PCR toestel (TProfessional Thermocycler (Biometra)) en voer de volgende parameters in:
 

	5 min.	95°C	hot start denaturatie	
35 x	{	45 s.	95°C	denaturatie
		1 min.	50°C, 55°C of 60°C	hybridisatie
		6 min.	68°C	elongatie
		3 min.	68°C	finale elongatie
	pauze	10°C	pauze	
- start de PCR reactie en bewaar de stalen na afloop bij -20°C

### 5.2.3 Lithiumchloride clean-up

De kwaliteit van het DNA is essentieel voor het slagen van de transgene experimenten. Onzuiver DNA vermindert de overlevingskansen doordat heel wat contaminanten toxisch zijn voor de embryo's. Het fusieconstruct DNA wordt opgezuiverd door middel van LiCl precipitatie.

### Methodie

- voeg een gelijk volume 4,28 M LiCl (Sigma Aldrich) toe aan het op te zuiveren DNA
- inverteer tienmaal en incubeer 20 min. bij -20°C
- centrifugeer 10 min. aan 14680 rpm bij 4°C
- breng het supernatans over in een gekoeld microcentrifugeerbuisje
- voeg 4/3 volume 100% gekoelde ethanol toe
- centrifugeer 20 min. aan 14680 rpm bij 4°C
- verwijder het supernatans en droog de DNA pellet bij 37°C
- resuspendeer de DNA pellet in een gepast volume milliQ water
- bepaal de concentratie van het opgezuiverde DNA met behulp van de Nanodrop ND-1000 Spectrofotometer (Isogen Life Science)

#### **5.2.4 Micro-injectie**

Transgene *C. elegans* lijnen worden bekomen door exogeen DNA in het cytoplasma van het syncytium van de gonade van dag 1 adulte wild type N2 wormen te injecteren. Het DNA injectiemengsel bestaat uit het GFP reporterconstruct, de dominante *Pelt-2::mCherry* merker die de selectie van transgene dieren vergemakkelijkt en de pL4440 vector die wordt gebruikt als drager DNA. Om de kans op slagen te verhogen, worden telkens 30 wormen geïnjecteed met drie verschillende injectiemengsels (Tabel 10). Vervolgens worden de transgene nakomelingen van de geïnjecteerde wormen geselecteerd op basis van rode fluorescentie in de darmcellen, geïnduceerd door de co-injectiemerker.

**Tabel 10** Samenstelling van de DNA injectiemengsels

<b>genetisch materiaal</b>	<b>mix 1</b>	<b>mix 2</b>	<b>mix 3</b>
GFP reporterconstruct	50 ng/μl	20 ng/μl	5 ng/μl
<i>Pelt-2::mCherry</i>	50 ng/μl	50 ng/μl	70 ng/μl
pL4440 vector	30 ng/μl	30 ng/μl	30 ng/μl

## IV. RESULTATEN

Deze studie beoogt de karakterisatie van enkele voorspelde *C. elegans* neuropeptide GPCRs (Tabel 11). In eerste instantie wordt op zoek gegaan naar de liganden van deze weesreceptoren. Voor het ontwezen van de receptoren wordt de omgekeerde farmacologie benadering aangewend waarbij de receptor tot expressie wordt gebracht in een heteroloog cellulair systeem. Deze strategie laat toe om het activerend ligand *in vitro* te identificeren, zelfs zonder voorafgaande kennis over de downstream signaleringcascade. Het gebruikte assay is bovendien zo ontworpen dat hoge doorvoer screenings eenvoudig kunnen worden uitgevoerd.

Daarnaast bestuderen we de mogelijke rol van het tachykinine signaalsysteem bij *C. elegans*. Onderzoek naar de tachykinine-gerelateerde peptiden (TRPs) bij *Drosophila* toont aan dat deze betrokken zijn bij geurperceptie en bij de regulatie van bewegingsactiviteit (Winther *et al.*, 2006). Met behulp van twee fenotyperingsexperimenten van een deletiemutant van de tachykinine-achtige receptor CE16937 wordt nagegaan of deze functies geconserveerd zijn bij *C. elegans*.

Tot slot worden lokalisatieconstructen gemaakt met het groen fluorescent proteïne (GFP) reporter gen om het *in vivo* expressiepatroon van de receptoren NMUR-1 en CE16937 en de neuropeptiden TK-1 en TK-2 na te gaan. Kennis over de cellulaire lokalisatie van de receptor en zijn ligand(en) kan namelijk nieuwe aanwijzingen geven over de functionele rol van het neuropeptide signaalsysteem daar de positie en de afstamming van alle 959 somatische cellen, alsook de functie van veel van deze cellen, in detail gekend is.

**Tabel 11** Overzicht van de bestudeerde *C. elegans* weesreceptoren.

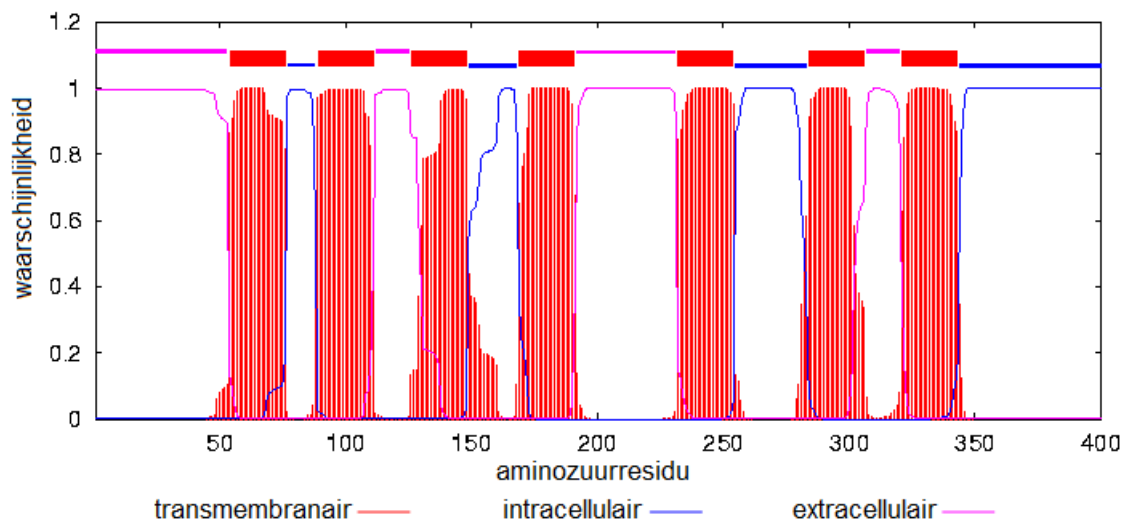
receptor	gen	klonering	ligandbepaling	fenotyperingstest
GNRR-2	<i>gnrr-2</i>		X	
GNRR-3	<i>gnrr-3</i>		X	
GNRR-4	<i>gnrr-4</i>		X	
GNRR-5	<i>gnrr-5</i>		X	
GNRR-7	<i>gnrr-7</i>		X	
GNRR-8	<i>daf-38</i>		X	
CE16937	C49A9.7		X	X
TKR-1	<i>tkr-1</i>		X	
NMUR-1	<i>nmur-1</i>	X	X	
NMUR-4	<i>nmur-4</i>	X	X	

## 1. Kloneringen

### 1.1 Een kandidaat neuromedine U/pyrokinine receptor (NMUR-1)

#### 1.1.1 *In silico* data-analyse

Het gen dat codeert voor de NMUR-1 weesreceptor is gelegen op het X-chromosoom. Dit gen telt 4088 basenparen en is opgebouwd uit 11 exonen. Na splicing wordt een 1203 bp transcript bekomen dat codeert voor een proteïne van 400 aminozuren. Dit proteïne vertoont homologie met de neuromedine U receptor (NMUR) bij vertebraten en de pyrokinine receptoren (PKR) bij insecten. Het TMHMM programma (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) voorspelt dat de NMUR-1 weesreceptor voldoet aan de typische structuur van een GPCR, namelijk zeven transmembranaire helices met drie intracellulaire en drie extracellulaire lussen (Fig. 7). Het aantal transmembranaire helices wordt geschat aan de hand van de hydrofobiciteit van de aminozuren. Het programma bepaalt bovendien de oriëntatie van de receptor op basis van de *positive inside* regel, en de lengte van de helices (Krogh *et al.*, 2001).



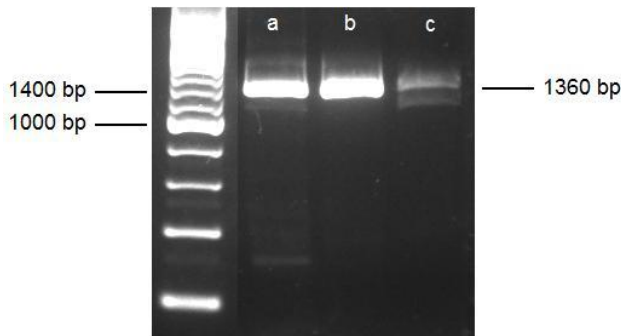
**Figuur 7** Voorspelling van de zeven transmembranaire structuur van de NMUR-1 receptor.

#### 1.1.2 Klonering

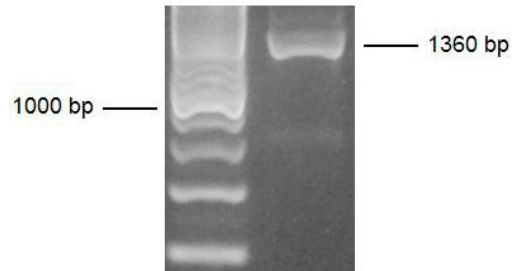
Het cDNA dat codeert voor de weesreceptor werd geamplificeerd met behulp van een temperatuursgradiënt PCR. De genspecifieke forward (5'-CACCGATTTCAGCCGAGT GAGA-3') en reverse primer (5'-ACATGATATCGAATTAGCAGGA-3') werden ontwikkeld aan de hand van het voorspelde open leesraam van het *nmur-1* gen. De resulterende PCR-producten werden geanalyseerd aan de hand van agarose gelelektroforese (Fig. 8). Het PCR-product bekomen met de Advantage 2 PCR kit (Clontech) bij een annealingstemperatuur van 55°C werd vervolgens geligeerd in een pcDNA3.1/V5-His-Topo vector. Chemisch competente *E. coli* DH5α cellen werden getransformeerd met dit plasmide en opgegroeid op een selectieve LB agarplaat met ampicilline. Hierna werd een kolonie PCR uitgevoerd om te achterhalen welke



transformanten een correct insert verworven hadden (Fig. 9). Daarop werd het plasmide DNA geïsoleerd uit de getransformeerde *E. coli* cellen aan de hand van een miniprep. De DNA-sequentie van dit insert werd bepaald met de T7 forward primer en BGH reverse primer. Tot slot werd uit de transformanten met het juiste insert het plasmide DNA op grote schaal opgezuiverd door middel van een maxiprep. We zijn er op deze manier in geslaagd om het gen met de juiste sequentie te verwerven.



**Figuur 8** Elektroforetisch gescheiden 200 bp DNA ladder (links) en PCR-product bij annealingstemperatuur van 50°C (a), 55°C (b) en 60 °C (c).



**Figuur 9** Elektroforetisch gescheiden 200 bp DNA ladder (links) en insert in een pcDNA3.1/V5-His-Topo vector (rechts).

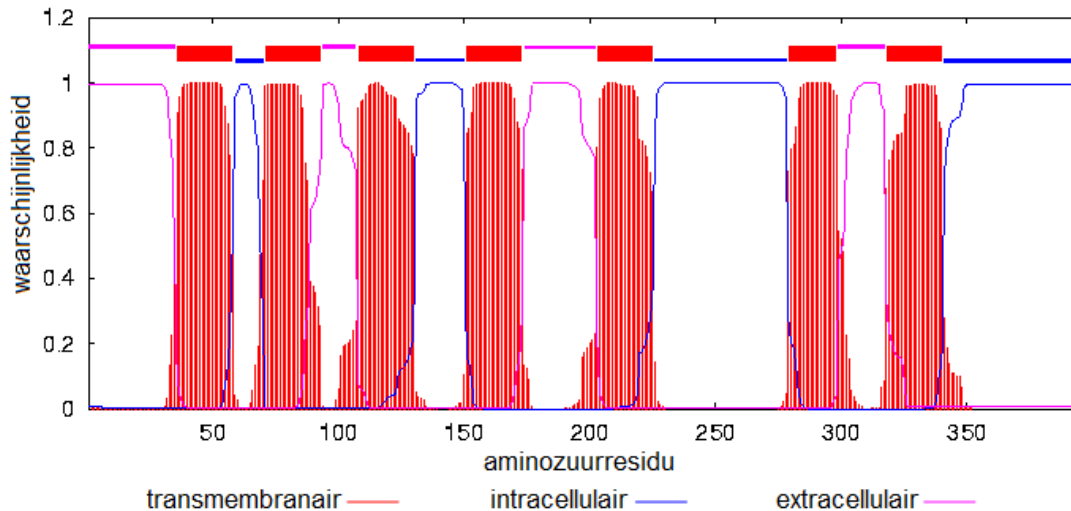
## 1.2 Een kandidaat TRH receptor (NMUR-4)

### 1.2.1 *In silico* data-analyse

Het gen dat codeert voor de NMUR-4 weesreceptor bevindt zich op chromosoom 1 en telt 3040 bp. Het transcript is opgebouwd uit acht exonen die samen 1188 bp lang zijn. Dit wordt vertaald in een proteïne van 395 aminozuren dat homoloog is aan de thyrotropine-releasing hormoon receptor in vertebraten. Een BLASTp analyse van de NMUR-4 receptor levert een E-waarde van  $3 \cdot 10^{-65}$  op voor de humane TRH receptor. Analyse met het TMHMM programma (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) voorspelt dat ook deze weesreceptor bestaat uit zeven transmembranaire helices verbonden door drie intracellulaire en drie extracellulaire lussen (Fig. 10).

### 1.2.2 Klonering

Het cDNA dat codeert voor de weesreceptor werd geamplificeerd met behulp van een temperatuursgradiënt PCR. De genspecifieke forward (5`-CACCAGATGACGTCAGCC TC-3`) en reverse primer (5`-ATGTATCACGGAGTTCCAGC-3`) werden ontwikkeld aan de hand van het voorspelde open leesraam van het *nmur-4* gen. De resulterende PCR-producten werden geanalyseerd aan de hand van agarose gelelektroforese. Het PCR-product bekomen met de Advantage 2 PCR kit (Clontech) bij een annealingstemperatuur van 60°C stemde overeen met de voorspelde lengte (1198 bp). Dit DNA fragment werd geligeerd in een pcDNA3.1/V5-His-Topo vector waarmee chemisch competente *E. coli* TOP10 cellen werden getransformeerd en opgegroeid op



**Figuur 10** Voorspelling van de zeven transmembranaire structuur van de NMUR-4 receptor.

een selectieve LB agarplaat met ampicilline. Om te achterhalen welke transformanten een correct insert verworven hadden, werd een kolonie PCR uitgevoerd. Vervolgens werd met een miniprep het plasmide DNA geïsoleerd uit de getransformeerde *E. coli* cellen. De DNA-sequentie van dit insert werd bepaald met de T7 forward primer en BGH reverse primer. Tot slot werd uit de transformanten met het juiste insert het plasmide DNA op grote schaal opgezuiverd door middel van een maxiprep. We zijn er op deze manier in geslaagd om het gen met de juiste sequentie te isoleren. Aangezien het ProXima 2500-T (Isogen Life Sciences) toestel tijdelijk buiten gebruik was, konden er geen foto's worden gemaakt van de gelelektroforetische scheidingen.

## 2. Ontwezen van receptoren

### 2.1 De GnRH-verwante receptoren

Het *C. elegans* genoom codeert voor acht GnRH-achtige receptoren (GNRR-1 tot en met GNRR-8). Eén van de voorspelde GnRH-achtige receptoren, GNRR-1, werd reeds ontweerd door Lindemans *et al.* (2009a) met behulp van het Fluo-4 fluorescentie assay. In deze studie trachten we GNRR-2, GNRR-3, GNRR-5, GNRR-7 en GNRR-8 te ontwezen met het aequorine bioluminescentie assay. Het DNA van deze receptoren was bij aanvang van dit project reeds beschikbaar in een eukaryote expressievector. We transfecteerden CHO-WTA11 cellen met de receptorconstructen en screenen de cellen met een set van synthetische peptiden (10  $\mu$ M) (Addendum: Tabel a). Deze lijst met kandidaat-liganden werd samengesteld op basis van *in silico* voorspellingen. De synthetische peptiden (80% zuiver) werden verder opgezuiverd met behulp van *reversed phase* hoge druk vloeistofchromatografie (RP-HPLC) en de zuiverheid werd nagegaan met matrix geassisteerde laser desorptie/ionisatie vluchtijd massaspectrometrie (MALDI-TOF MS). De peptiden waren echter niet in staat één van de GnRH-achtige receptoren te activeren.

## 2.2 Een kandidaat tachykinine receptor (CE16937)

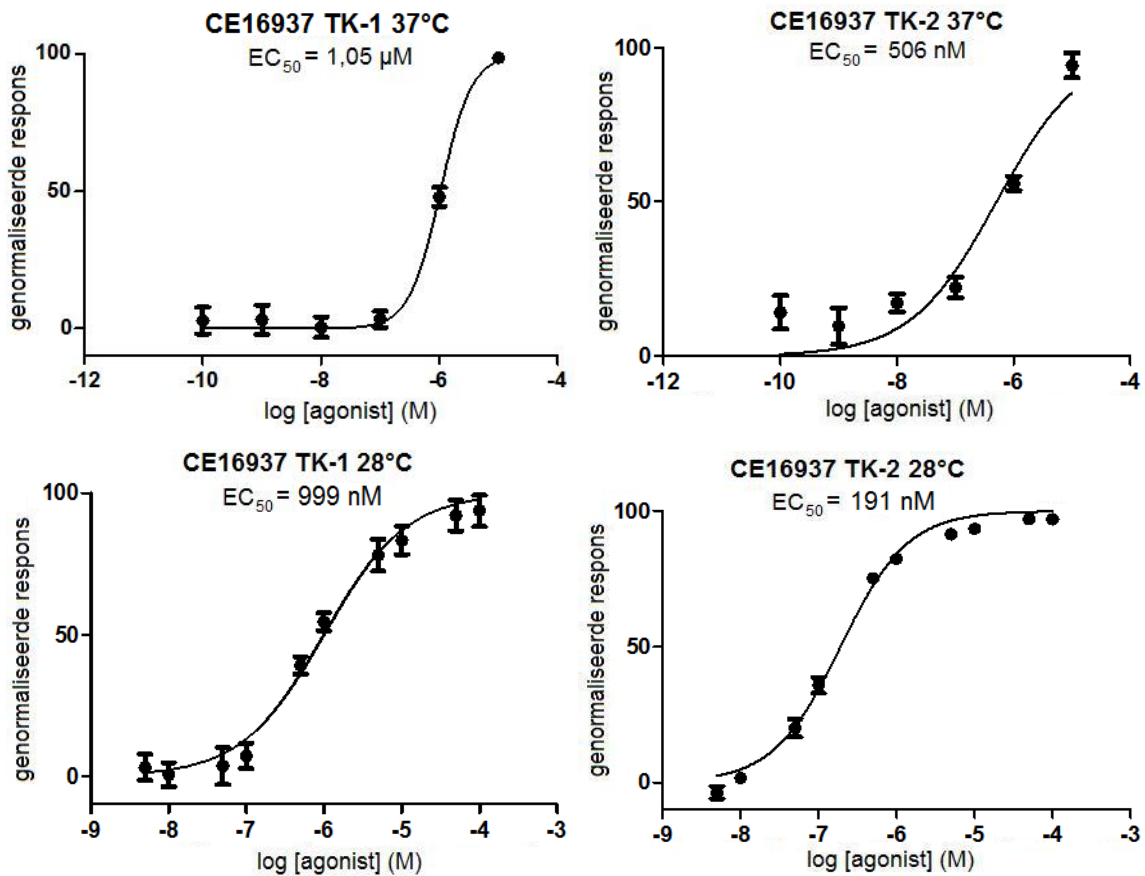
De CE16937 weesreceptor wordt gecodeerd door het C49A9.7 gen dat zich op chromosoom 4 bevindt. Het gen telt 3624 bp en is opgebouwd uit negen exonen. Na splicing ontstaat een 1176 bp transcript dat codeert voor een proteïne met 391 aminozuren. Dit proteïne vertoont homologie met de humane SP receptor (NK1 receptor; E-waarde:  $8,1 \cdot 10^{-56}$ ). Ook voor CE16937 was bij de start van deze studie reeds een eukaryote expressievector met het receptor DNA voorhanden. We transfekteerden CHO-WTA11 cellen met het receptorconstruct en screenden de cellen met een bibliotheek van voorspelde *C. elegans* peptiden (10  $\mu$ M) (Addendum: Tabel b). Dertien peptiden bleken in staat de receptor te activeren en zorgden voor een luminescentiepiek: nlp-2b, nlp-23c, nlp-46, flp-1b, flp-1e, flp-1f, flp-1i, flp-1g, flp-4b, flp-6a, flp-18h, flp-21 en flp-23a. De receptoractivatie kon echter niet worden bevestigd in een tweede screening met de peptiden in opgezuiverde vorm.

Daarnaast screenden we de getransfekteerde CHO-WTA11 cellen met twee peptiden (TK-1: SGPSSASEGEAYAFPGLR-NH<sub>2</sub> en TK-2: VPMMSLKGLR-NH<sub>2</sub>) die op basisch van een fylogenetische studie werden voorspeld de receptor te activeren. Beide peptiden bleken in staat een luminescent signaal te genereren (Addendum: Fig. a). Om dit resultaat te bevestigen, werden de EC<sub>50</sub>-waarden bepaald (Fig. 11). Dit is de concentratie van het peptide nodig om een halfmaximale respons te verwerven. De aequorine bioluminescentie screening werd bovendien herhaald met CHO-WTA11 cellen die 24 uur na transfectie een temperatuur shift ondergingen van 37°C naar 28°C. Opnieuw werd een dosis-respons curve opgesteld waaruit de EC<sub>50</sub>-waarden werden afgeleid (Fig. 11).

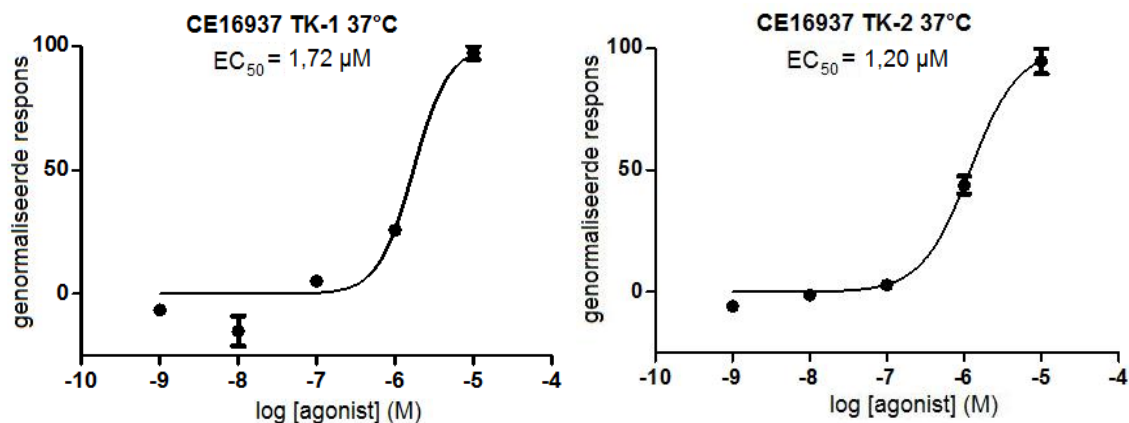
Om te achterhalen welk G-proteïne betrokken is in de downstream signaaltransductieweg, werd een *cell-based* assay uitgevoerd met CHO-PAM28 cellen. Deze brengen de luminescente reporter apoaequorine stabiel tot expressie, maar niet het promiscue G $\alpha_{16}$ . Dit laat toe de accumulatie van intracellulaire calciumionen als gevolg van G $\alpha_q$ -activatie te detecteren. Beide peptiden bleken in staat een luminescent signaal te genereren wat er op wijst dat de receptoractivatie leidt tot een intracellulaire Ca<sup>2+</sup> toename (Addendum: Fig. b).

Vervolgens testten we of activatie van de CE16937 receptor gepaard gaat met veranderingen in cAMP waarden als gevolg van G $\alpha_s$ - of G $\alpha_i$ -activatie. Hiertoe werden HEK 293T cellen gecotransfekteerd met het receptorconstruct en een CRE-luciferase reporterconstruct. Stimulatie van de CE16937 expresserende cellen met TK-1 en TK-2 in de aanwezigheid van IBMX resulteerde in een dosis-afhankelijke toename van de luciferase bioluminescentie. De EC<sub>50</sub>-waarden voor TK-1 (EC<sub>50</sub> = 1,72  $\mu$ M) en TK-2 (EC<sub>50</sub> = 1,2  $\mu$ M) worden afgeleid uit de dosis-respons curve (Fig. 12). Wanneer de peptiden werden getest in de aanwezigheid van forskoline, was er geen effect op de

cAMP hoeveelheid waar te nemen. Dit suggereert dat de geactiveerde CE16937 receptor koppelt aan de  $G\alpha_s$  signaaltransductieweg.



**Figuur 11** Dosis-respons curves van het effect van de peptiden TK-1 en TK-2 op de *C. elegans* CE16937 receptor geëxprimeerd in CHO-WTA11 cellen geïncubeerd bij 37°C en 28°C (aequorine bioluminescentie screening). Dit zijn de verzamelde gegevens van drie onafhankelijke metingen. Foutenbalken, SEM.



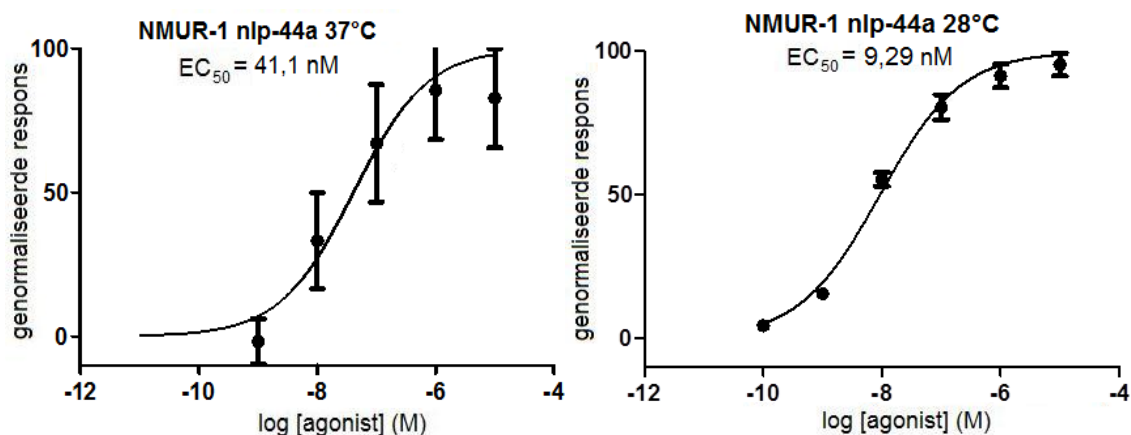
**Figuur 12** Dosis-respons curves van het effect van de peptiden TK-1 en TK-2 op de *C. elegans* CE16937 receptor geëxprimeerd in HEK 293T cellen geïncubeerd bij 37°C (CRE-luciferase reporter assay). Dit zijn de verzamelde gegevens van drie onafhankelijke metingen. Foutenbalken, SEM.

### 2.3 Een kandidaat tachykinine receptor (TKR-1)

Het gen dat codeert voor de voorspelde TKR-1 receptor is gelegen op chromosoom drie en telt 3812 bp. Het transcript is opgebouwd uit acht exonen die samen 1221 bp lang zijn en wordt getransleerd tot een proteïne van 406 aminozuren. Net zoals de CE16937 receptor, vertoont de TKR-1 receptor homologie met de humane NK1 receptor (E-waarde:  $8 \cdot 10^{-49}$ ). Het DNA van deze receptor was bij het begin van deze studie reeds beschikbaar in een eukaryote expressievector. We transfecteerden CHO-WTA11 cellen met het receptorconstruct en screenden de cellen met een bibliotheek van voorspelde *C. elegans* peptiden (10  $\mu$ M) (Addendum: Tabel b). Ook werd receptoractivatie nagegaan voor de twee peptiden TK-1 (SGPSSASEGEAYAFPLRGLR-NH<sub>2</sub>) en TK-2 (VPMMSLKGLR-NH<sub>2</sub>). Het ligand voor de TKR-1 receptor werd echter niet gevonden. Geen enkel peptide was in staat een respons uit te lokken.

### 2.4 Een kandidaat neuromedine U/pyrokinine receptor (NMUR-1)

Het receptor cDNA werd succesvol gekloneerd in de eukaryote expressievector pcDNA3.1/V5-His-TOPO. Er werd getracht de receptor te ontwezen door het receptorconstruct tot expressie te brengen in CHO-WTA11 cellen en deze te screenen met een bibliotheek van voorspelde *C. elegans* peptiden (10  $\mu$ M) (Addendum: Tabel b). Het peptide nlp-44a bleek in staat de NMUR-1 receptor te activeren en zorgde bijgevolg voor een bioluminescent signaal (Addendum: Fig. c). De dosis-respons curve leverde een EC<sub>50</sub>-waarde op in het nanomolaire bereik (Fig. 13). De aequorine bioluminescentie screening werd bovendien herhaald met CHO-WTA11 cellen die 24 uur na transfectie een temperatuur shift ondergingen van 37°C naar 28°C. Opnieuw werd een dosis-respons curve opgesteld waaruit de EC<sub>50</sub>-waarde werd afgeleid (Fig. 13).



**Figuur 13** Dosis-respons curves van het effect van het peptide nlp-44a op de *C. elegans* NMUR-1 receptor geëxprimeerd in CHO-WTA11 cellen geïncubeerd bij 37°C en 28°C (aequorine bioluminescentie screening). Dit zijn de verzamelde gegevens van twee onafhankelijke metingen. Foutenbalken, SEM.

## 2.5 Een kandidaat TRH receptor (NMUR-4)

Het receptor cDNA werd succesvol gekloneerd in de eukaryote expressievector pcDNA3.1/V5-His-TOPO. Vervolgens werd de receptor tot expressie gebracht in CHO-WTA11 cellen. Deze ondergingen een temperatuur shift van 37°C naar 28°C 24 uur na transfectie. De cellen werden gescreend met een bibliotheek van voorspelde *C. elegans* peptiden (10 µM) (Addendum: Tabel b). De peptiden waren echter niet in staat de NMUR-4 receptor te activeren.

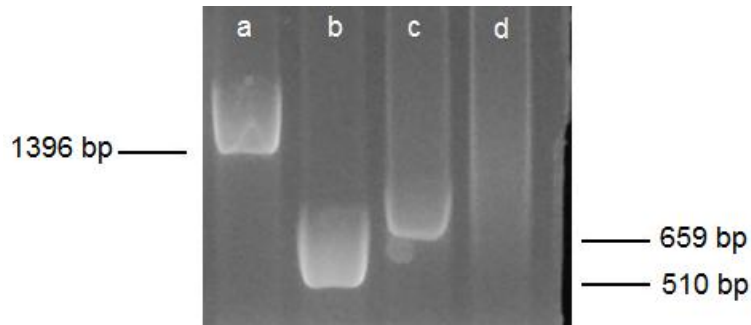
## 3. Analyse van NaCl chemotaxis en bewegingsactiviteit bij deletiemutanten

### 3.1 Uitkruisen van de mutante *C. elegans* lijn C49A9.7(ok1620) deficiënt in de tachykinine receptor

In deze studie werd gebruik gemaakt van de mutante *C. elegans* lijn C49A9.7(ok1620). Deze lijn is homozygoot voor het ok1620 allel. Dit allel bevat een deletie van 737 bp in het C49A9.7 gen dat codeert voor de CE16937 receptor (Addendum: Fig. d). De deletiemutant werd gegenereerd door de OMRF Knockout Group na behandeling van *C. elegans* wormen met het mutageen ethylmethaansulfonaat. Ten gevolge van deze behandeling zijn er naast de gewenste mutatie ook een groot aantal ongewenste mutaties aanwezig. Deze zogenaamde achtergrondmutaties kunnen een effect hebben op het fenotype en dienen bijgevolg zoveel mogelijk verwijderd te worden. Daarom werd de mutante lijn tweemaal uitgekruisd met wild type N2 wormen. Aanvankelijk werd een mutante hermafrodiet samengeplaatst met acht wild type N2 mannetjes. Met behulp van een 'single worm' PCR werd een heterozygote nakomeling geselecteerd. Na zelfbevruchting zullen één kwart van de nakomelingen opnieuw homozygoot zijn voor het ok1620 allel. Ook deze wormen worden geselecteerd met een 'single worm' PCR. De PCR werd uitgevoerd met een genspecifieke forward primer (5'-CTATGGAATCCTGTTCACTA-3'), reverse primer (5'-ACCAACTCGATAATAAGCA GCTG-3') en interne poison primer (5'-GTGTATTCAATGATTGTCATGA-3'). Selectie van de heterozygote en homozygote wormen gebeurde na analyse van de lengte van de bekomen PCR-producten (Tabel 12, Fig. 14). We zijn er op deze manier in geslaagd tweemaal uitgekruiste homozygote deletiemutanten te bekomen.

**Tabel 12** Lengte van de geamplificeerde fragmenten bekomen met een 'single worm' PCR. Merk op dat het mutante ok1620 allel niet kan geamplificeerd worden met de interne poison primer.

allel	forward en reverse primer	interne poison en reverse primer
wild type allel	1396 bp	510 bp
mutante op1620 allel	659 bp	-



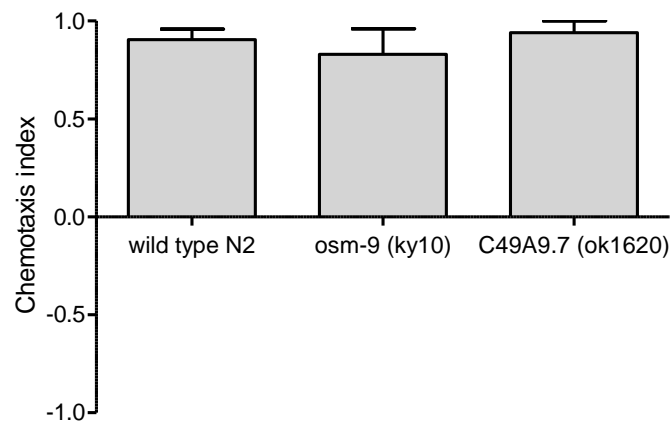
**Figuur 14** Elektroforetisch gescheiden PCR-product van een wild type N2 worm met forward en reverse primer (a) en interne poison en reverse primer (b) en een tweemaal uitgekruiste homozygote deletiemutant met forward en reverse primer (c) en interne poison en reverse primer (d).

### 3.2 Analyse van NaCl chemotaxis

Een knockdown door middel van RNAi resulteert voor zowel de *Drosophila* tachykinine gerelateerde peptiden als hun receptor in een verminderde geurperceptie (Winther *et al.*, 2006; Winther & Ignell, 2010). In dit project werd nagegaan of de *C. elegans* tachykinine-achtige receptor CE16937 eveneens betrokken is in chemosensatie door het zout chemotaxis gedrag van tweemaal uitgekruiste C49A9.7(ok1620) deletiemutanten te vergelijken met dat van wild type N2 wormen. We maakten hiervoor gebruik van de vier-kwadrant plaat chemotaxis test waarbij twee controle kwadranten gevuld werden met gebufferde agar (2 en 4) en twee test kwadranten met gebufferde agar gesupplementeerd met 25 mM NaCl (1 en 3). De gesynchroniseerde jong adulte wormen werden op het snijpunt van de vier-kwadranten plaat geplaatst. Na tien minuten werd de verdeling van de wormen over de vier kwadranten bepaald en de bijbehorende chemotaxis index berekend (Tabel 13). Wormen die zich op de scheidingslijn tussen twee kwadranten bevonden, werden niet in rekening gebracht.

**Tabel 13** Verdeling van het aantal wormen over de vier kwadranten na 10 min. incubatie. De chemotaxis index voor 25 mM NaCl werd berekend als  $CI = ((1+3)-(2+4))/(1+2+3+4)$ . De test werd in tweevoud uitgevoerd voor naïeve *osm-9(ky10)* wormen en in viervoud voor naïeve wild type N2 en C49A9.7(*ok1620*) wormen.

	kwadrant				CI	gem. CI
	1	2	3	4		
wild type N2	24	1	1	0	0,92	0,91
	21	0	0	3	0,75	
	9	0	32	1	0,95	
	8	0	67	0	1,00	
<i>osm-9 (ky10)</i>	17	5	11	0	0,70	0,83
	33	0	13	1	0,96	
C49A9.7 ( <i>ok1620</i> )	2	0	24	0	1,00	0,94
	36	0	5	0	1,00	
	4	2	11	0	0,76	
	12	0	6	0	1,00	



**Figuur 15** De gemiddelde chemotaxis index voor 25 mM NaCl van naïeve wild type N2, *osm-9(ky10)* en C49A9.7(*ok1620*) wormen. Foutbalken, SEM.

De gemiddelde chemotaxis index voor 25 mM NaCl bedroeg 0,91 voor naïeve wild type N2 wormen; 0,83 voor naïeve *osm-9(ky10)* wormen en 0,94 voor naïeve wormen mutant voor de CE16937 receptor. De hoge positieve chemotaxis index geeft aan dat de wormen sterk worden aangetrokken door 25 mM NaCl. De drie geteste *C. elegans* lijnen blijken bovendien niet significant ( $P < 0,05$ ) te verschillen van elkaar in hun zout chemotaxis gedrag (Fig. 15).

De vier-kwadrant plaat chemotaxis test werd eveneens gebruikt om de gustatorische plasticiteit van wild type N2 wormen en de twee mutante lijnen uit de eerste test te bestuderen. De gesynchroniseerde jonge adulte wormen werden gedurende 15 minuten blootgesteld aan een attractieve NaCl concentratie (100 mM) in afwezigheid van voedsel vooraleer ze op het snijpunt van de vier-kwadranten plaat werden geplaatst. Na tien minuten werd de verdeling van de wormen over de vier kwadranten



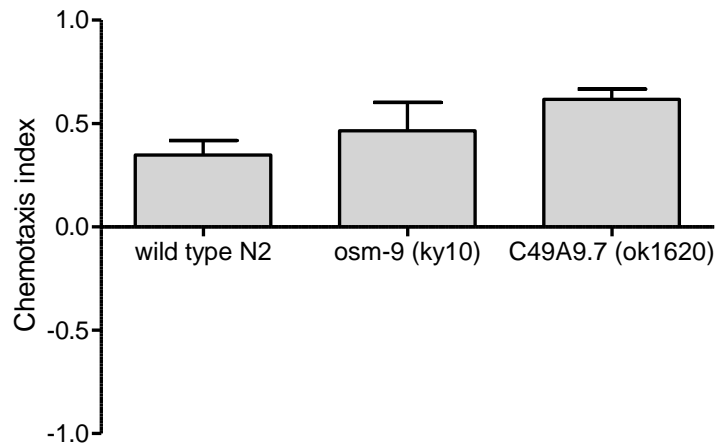
bepaald en de bijbehorende chemotaxis index berekend (Tabel 14). Wormen die zich op de scheidingslijn tussen twee kwadranten bevonden, werden niet in rekening gebracht.

**Tabel 14** Verdeling van het aantal wormen over de vier kwadranten na 10 min. incubatie. De chemotaxis index voor 25 mM NaCl werd berekend als  $CI = ((1+3)-(2+4))/(1+2+3+4)$ . De test werd in viervoud uitgevoerd voor NaCl geconditioneerde wild type N2, *osm-9(ky10)* en C49A9.7(*ok1620*) wormen.

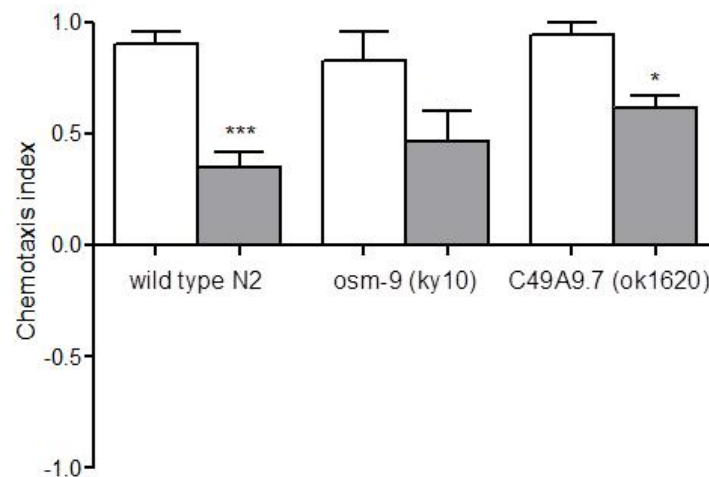
	kwadrant				CI	gem. CI
	1	2	3	4		
wild type N2	27	13	21	13	0,30	0,34
	32	18	34	29	0,17	
	26	11	29	9	0,47	
	29	12	60	22	0,45	
<i>osm-9 (ky10)</i>	17	4	41	15	0,51	0,46
	25	18	17	15	0,12	
	42	3	33	6	0,79	
	12	2	16	9	0,44	
C49A9.7 ( <i>ok1620</i> )	31	9	35	6	0,63	0,62
	57	8	52	8	0,74	
	30	10	65	14	0,60	
	50	16	44	15	0,50	

De gemiddelde chemotaxis index voor 25 mM NaCl bedroeg 0,34 voor NaCl geconditioneerde wild type N2 wormen; 0,46 voor NaCl geconditioneerde *osm-9(ky10)* wormen en 0,62 voor NaCl geconditioneerde wormen mutant voor de CE16937 receptor. De positieve chemotaxis index geeft aan dat de wormen ook na conditionering nog worden aangetrokken door 25 mM NaCl. De drie geteste *C. elegans* lijnen blijken bovendien niet significant ( $P < 0,05$ ) te verschillen van elkaar in hun zout chemotaxis gedrag na conditionering met 100 mM NaCl in afwezigheid van voedsel (Fig. 16).

De respons van NaCl geconditioneerde wormen werd vergeleken met de respons van naïeve wormen (Fig. 17). De respons is significant verschillend voor wild type N2 wormen ( $P < 0,001$ ) en C49A9.7 deletiemutanten ( $P < 0,05$ ). Zoals eerder aangetoond door Jansen *et al.* (2002) vertoont *C. elegans* een verminderde aantrekking tot 25 mM NaCl indien ze eerder werden blootgesteld aan 100 mM NaCl in combinatie met een negatieve stimulus, in dit geval de afwezigheid van voedsel.



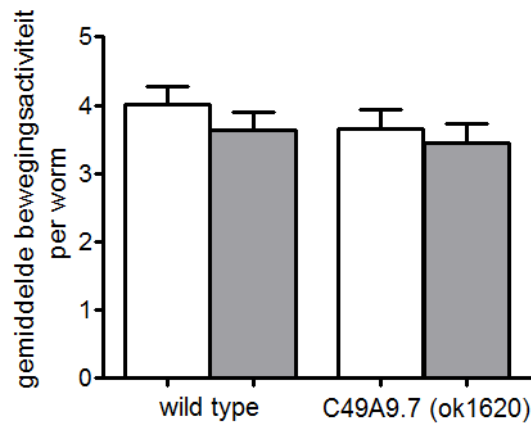
**Figuur 16** De gemiddelde chemotaxis index voor 25 mM NaCl van NaCl geconditioneerde wild type N2, *osm-9(ky10)* en C49A9.7(*ok1620*) wormen. Foutbalken, SEM.



**Figuur 17** De gemiddelde chemotaxis index voor 25 mM NaCl van naïeve (open balken) en NaCl geconditioneerde (gevulde balken) wild type N2, *osm-9(ky10)* en C49A9.7(*ok1620*) wormen. De respons van NaCl geconditioneerde wormen werd vergeleken met de respons van naïeve wormen. Foutbalken, SEM. \*\*\*  $P < 0,001$ . \*  $P < 0,05$ .

### 3.3 Analyse van bewegingsactiviteit

Knockdown van het *Drosophila dtk* gen dat codeert voor zes tachykinine gerelateerde peptiden, resulteert in actievere vliegen (Winther *et al.*, 2006). De tachykinine deficiënte vliegen leggen grotere afstanden af en zijn een groter deel van de tijd actief. Om na te gaan of deze functie geconserveerd is in *C. elegans*, werd het zwemgedrag van tweemaal uitgekruiste C49A9.7(*ok1620*) deletiemutanten vergeleken met dat van wild type N2 wormen. De testen werden uitgevoerd in een 96-well microtiterplaat met behulp van de WormMicrotracker (Designplus). Elke well werd gevuld met vloeibaar medium en ongeveer 30 gesynchroniseerde L4 wormen. Indien de bewegingsactiviteit werd getest in aanwezigheid van voedsel, werd tevens *E. coli* OP50 cultuur aan de wells toegevoegd. De voortbeweging van de wormen werd gedurende acht uur gemeten, waarna voor beide lijnen de gemiddelde activiteit per worm werd berekend (Fig. 18).



**Figuur 18** De gemiddelde bewegingsactiviteit per worm voor wild type N2 wormen en CE16937 deletiemutanten in vloeibaar medium. Het experiment werd uitgevoerd in zowel aanwezigheid (open balken) als afwezigheid (gevulde balken) van voedsel. Dit zijn de verzamelde gegevens van drie onafhankelijke metingen met in het totaal 36 geteste wormen per conditie. Foutbalken, SEM.

De gemiddelde bewegingsactiviteit per worm in aanwezigheid van voedsel bedroeg 4,010 voor wild type N2 wormen en 3,665 voor CE16937 deletiemutanten. In afwezigheid van voedsel bedroeg de gemiddelde bewegingsactiviteit per worm 3,628 voor wild type N2 wormen en 3,454 voor C49A9.7(ok1620) wormen. De bewegingsactiviteit van CE16937 deletiemutanten blijkt niet significant te verschillen van wild type N2 wormen in vloeibaar medium en dit resultaat is onafhankelijk van de aan- of afwezigheid van voedsel.

## 4. Aanmaak van GFP reporterconstructen in een pSM vector

### 4.1 GFP reporterconstruct voor de NMUR-1 receptor

De promoterregio en het gDNA van de GPCR NMUR-1 werden geamplificeerd met behulp van een temperatuursgradiënt PCR. De resulterende PCR-producten werden geanalyseerd aan de hand van agarose gelelektroforese. Ook hun sequentie werd geverifieerd na ligatie in de pCR4-TOPO vector (Invitrogen). De PCR-fragmenten bekomen bij een annealingtemperatuur van 60°C en de pSM vector werden gedigesteerd met de geschikte restrictie-enzymen. Vervolgens trachtten we de DNA fragmenten te ligeren in de gelinealiseerde pSM vector ter vorming van een *Pnmur-1::nmur-1 SL2 gfp* construct. Competente *E. coli* TOP10 cellen werden getransformeerd met het ligatiemengsel en opgegroeid op een selectieve LB agarplaat met ampicilline. Met behulp van een kolonie PCR werd ten slotte nagegaan welke transformanten een correct insert verworven hadden. We zijn er op deze wijze in geslaagd de promoterregio en het gDNA van de NMUR-1 receptor te amplificeren. Het is echter niet gelukt om transformanten te bekomen met een correct insert.

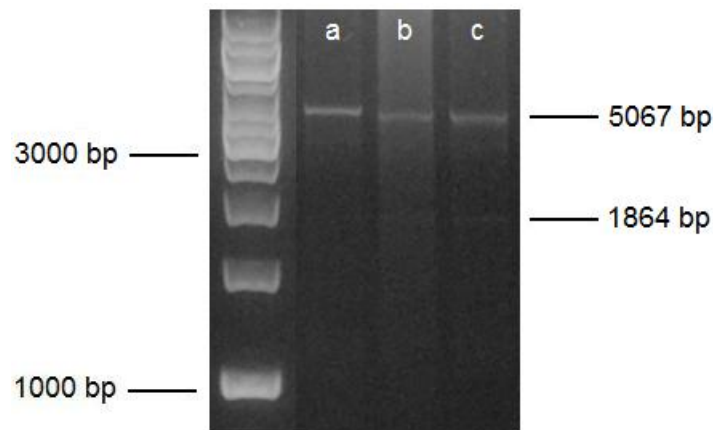
## 4.2 GFP reporterconstruct voor de tachykinine-achtige receptor CE16937

De promoterregio en het gDNA van de CE16937 receptor werden geamplificeerd met behulp van een temperatuursgradiënt PCR. De resulterende PCR-producten werden geanalyseerd aan de hand van agarose gelelektroforese. Ook hun sequentie werd geverifieerd na ligatie in de pCR4-TOPO vector (Invitrogen). De PCR-fragmenten bekomen bij een annealingstemperatuur van 60°C en de pSM vector werden gedigesteerd met de geschikte restrictie-enzymen. Met behulp van het T4 DNA ligase trachtten we de geknipte DNA fragmenten te ligeren in de gelinealiseerde pSM vector ter vorming van een *PC49A9.7::C49A9.7 SL2 gfp* construct. Competente *E. coli* TOP10 cellen werden getransformeerd met het ligatiemengsel en opgegroeid op een selectieve LB agarplaat met ampicilline. Met behulp van een kolonie PCR werd ten slotte nagegaan welke transformanten een correct insert verworven hadden. We zijn er op deze wijze in geslaagd de promoterregio van de CE16937 receptor te amplificeren. Het kloneren van het C49A9.7 gDNA was echter niet succesvol. Het is daarnaast ook niet gelukt om transformanten te bekomen met een correct insert.

## 5. Aanmaak van GFP reporterconstructen met behulp van de PCR fusie techniek

### 5.1 GFP reporterconstruct voor de tachykinine-achtige receptor CE16397

Allereerst werd de promoterregio van de CE16937 receptor geamplificeerd met behulp van een temperatuursgradiënt PCR. Het GFP reporter-gen werd bekomen uit de pPD95.75 vector. In een tweede PCR werd een lineair *PC49A9.7::gfp* reporterconstruct aangemaakt door de promoterregio in hetzelfde open leesraam te fuseren aan het GFP reporter-gen (Fig. 19).

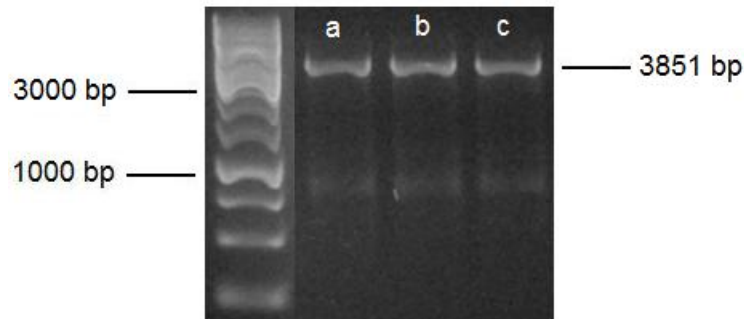


**Figuur 19** Elektroforetisch gescheiden 1 kb DNA ladder (links) en fusie PCR-product bij annealingstemperatuur van 60°C (a, b en c). Het bandje van het GFP fragment is ook nog lichtjes zichtbaar bij 1864 bp.

Dit fusieproduct werd opgezuiverd via de LiCl methode. Het GFP reporterconstruct werd ten slotte samen met de *Pelt-2::mCherry* co-injectiemerker in de distale arm van de gonaden geïnjecteerd. De nakomelingen van de geïnjecteerde wormen vertoonden echter geen expressie van het *PC49A9.7::gfp* receptortransgen.

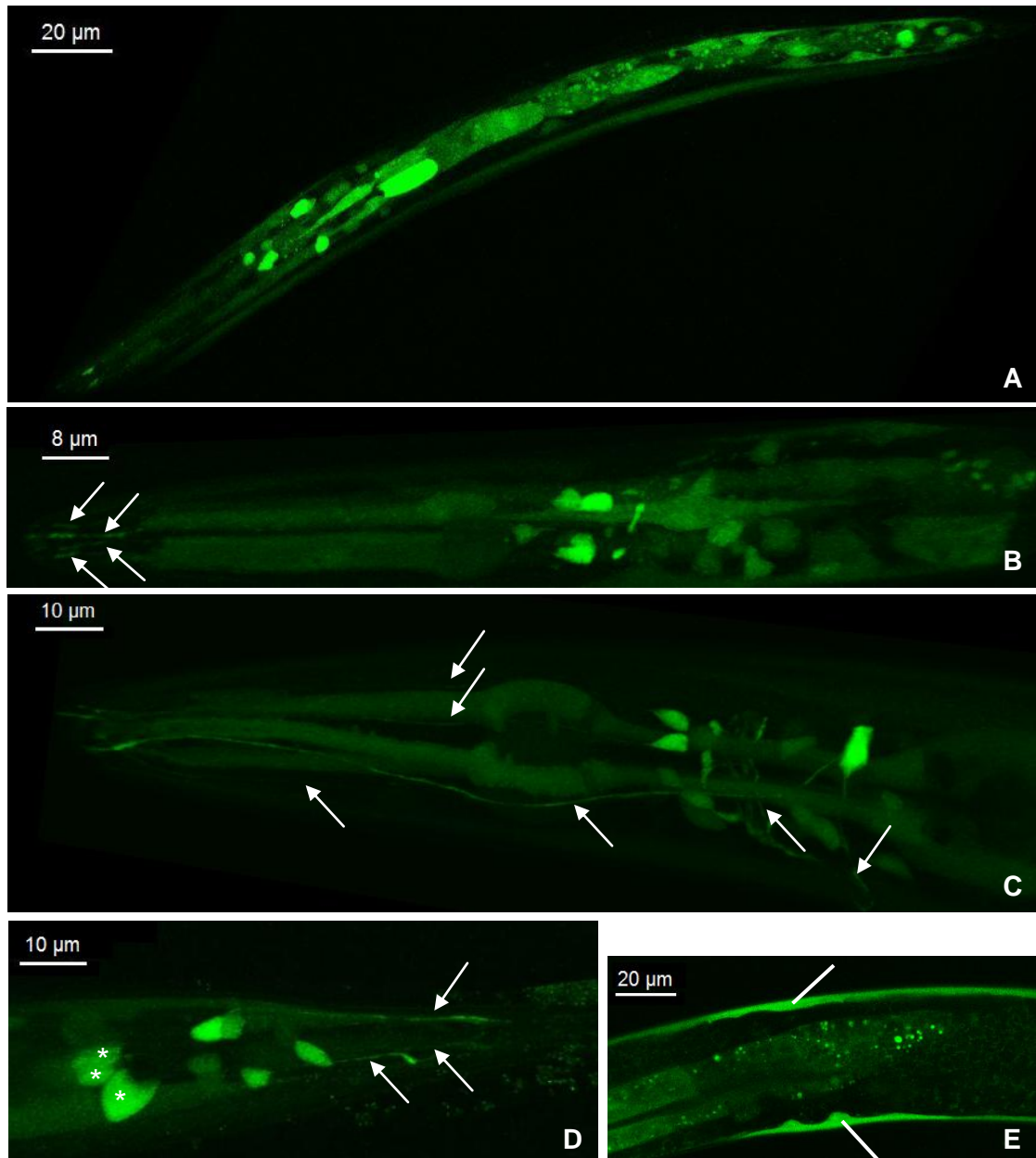
## 5.2 GFP reporterconstruct voor de tachykinine neuropeptide precursor

Met behulp van een temperatuursgradiënt PCR werd de promoterregio van de *T07C12.15* tachykinine neuropeptide precursor geamplificeerd. Het GFP reportergen werd bekomen uit de *pPD95.75* vector. In een tweede PCR werden de promoterregio en GFP reportergen aan elkaar gefuseerd in hetzelfde open leesraam doordat een 41 bp overlappende regio fungeerde als primer (Fig. 20). Dit reporterconstruct werd opgezuiverd via de LiCl methode en vervolgens via micro-injectie in de distale arm van de gonaden gebracht. Om de selectie van transgene dieren te vergemakkelijken, werd het geco-injecteerd met de *Pelt-2::mCherry* co-injectiemerker. We zijn er op deze manier in geslaagd transgene dieren te bekomen. Expressie van het *PT07C12.15::gfp* transgen werd gevisualiseerd met behulp van een Olympus Fluoview FV1000 (IX81) confocale microscoop. Confocale Z-stack projecties werden geëxporteerd via Imaris 7.2 (Olympus) (Fig. 21).



**Figuur 20** Elektroforetisch gescheiden 1 kb DNA ladder (links) en fusie PCR-product bij annealingstemperatuur van 50°C (a, b en c).

Expressie van het *PT07C12.15::gfp* transgen werd waargenomen in een aantal neuronen en hun uitlopers in de kop- en staartregio van hermafroditische wormen, alsook in spieren van de lichaamswand. Verder vertoont de farynx een zwakke fluorescentie. Het is echter onduidelijk of dit te wijten is aan autofluorescentie of het gevolg is van expressie in de faryngale spieren. Niet-neuronale expressie kan ook gedetecteerd worden in de rectale kliercellen *rectD* en *rectVL/R*. Fluorescentie waargenomen in de darm is afkomstig van de *Pelt-2::mCherry* co-injectiemerker.



**Figuur 21** Lokalisatie van de tachykinine neuropeptide precursor met behulp van een GFP fusieconstruct. Confocale Z-stack projecties tonen het expressiepatroon van het *PT07C12.15::gfp* transgen in L1 en L4 hermafrodieten. **A** Expressie van de neuropeptide precursor *T07C12.15* in een L1 hermafrodiet. **B en C** Expressie van het *PT07C12.15::gfp* transgen in de kopregio van een L1 en L4 hermafrodiet, respectievelijk. De pijlen wijzen naar de uitlopers van neuronen in de faryngale zenuwring waarin het GFP reporter gen tot expressie komt. **D** Expressie van het *PT07C12.15::gfp* transgen in de staartregio van een L4 hermafrodiet. De pijlen wijzen naar neuronale uitlopers. De asteriksen duiden de drie rectale klier cellen (rectD en rectVL/R) aan. **E** Ook in de spieren van de lichaamswand wordt expressie van het *PT07C12.15::gfp* transgen waargenomen (L4 hermafrodiet).

## V. DISCUSSIE

### 1. Kloneringen

#### 1.1 Een kandidaat neuromedine U/pyrokinine receptor (NMUR-1)

Het *C. elegans* genoom codeert voor vier neuromedine U (NMU) receptor homologen (NMUR-1 tot en met NMUR-4). Eén van deze NMU-achtige receptoren, NMUR-2, werd recent ontweerd gebruikmakend van een bio-informatica aanpak (Lindemans *et al.*, 2009b). Rekening houdend met de algemene kenmerken van een neuropeptide precursor en het typische pyrokinine motief, resulteerde hun *in silico* zoektocht in de identificatie van het *nlp-44* neuropeptide precursorgen. Deze precursor is 86 aminozuren lang en codeert voor drie peptiden die geflankeerd worden door mono- en dibasische knipplaatsen. De eerste twee peptiden (APHPSSALLVPYPRV-NH<sub>2</sub> en LYMARV-NH<sub>2</sub>) vertonen sequentiegelijkenissen met de periviscerokinenen (PVKs). Het derde peptide (AFFYTPRI-NH<sub>2</sub>) is verwant met de pyrokininen (PKs) en is bovendien C-terminaal gelegen in de precursor, wat overeenkomt met de structurele organisatie van de CAPA precursoren bij insecten. Met behulp van een Ca<sup>2+</sup>-mobilisatie assay werd de activatie van de NMUR-2 receptor door het PK-achtige peptide bevestigd. Deze gegevens wijzen op de aanwezigheid van een PK receptor en een CAPA-achtige precursor bij *C. elegans*. Dit roept meteen de vraag op of het genoom van deze nematode ook voor een CAPA-PVK receptor codeert. Een BLASTp zoekopdracht met de *D. melanogaster* Drm-CAPA receptor als input sequentie levert een E-waarde van 5.10<sup>-55</sup> op voor de NMUR-1 receptor. Deze receptor heeft reeds een toegewezen fenotype. Maier *et al.* (2010) toonden aan dat NMUR-1 betrokken is bij de voedselbronafhankelijke regulatie van levensduur. De levensduur van wild type *C. elegans* is namelijk afhankelijk van de *E. coli* stam waarop ze leven. Deze voedselafhankelijke functie is in overeenstemming met reeds gekende voedsel-geassocieerde functies van andere leden van de NMU signaaltransductieweg bij zoogdieren (Brighton *et al.*, 2004) en insecten (Melcher *et al.*, 2006). Analyse met het TMHMM programma voorspelt dat de NMUR-1 receptor beschikt over zeven transmembranaire domeinen verbonden via drie intracellulaire en drie extracellulaire lussen, analoog aan de typische GPCR topologie. In deze studie zijn we erin geslaagd de NMUR-1 receptor te kloneren in een eukaryote expressievector met het oog op de ontwezing van de receptor in een heteroloog cellulair expressiesysteem.

#### 1.2 Een kandidaat TRH receptor (NMUR-4)

De NMUR-4 receptor werd geselecteerd voor verder onderzoek op basis van sequentiegelijkenissen met de vertebraat thyrotropine-releasing hormoon (TRH) receptor. Men moet echter in gedachten houden dat de TRH receptor erg goed aligneert met de vertebraat NMU receptor, hetgeen duidt op een gemeenschappelijke

evolutionaire oorsprong. Dit kan verklaren waarom de NMUR-4 receptor, die oorspronkelijk werd geklassificeerd binnen de familie van NMU-achtige receptoren, in BLAST zoekopdrachten ook een lage E-waarde geeft voor TRH receptoren. De TRH receptor wordt namelijk verondersteld een uitvinding te zijn van de Chordata, aangezien er tot op heden nog geen bewijs is van de aanwezigheid van een TRH receptor bij invertebraten. De NMUR-4 receptor werd in dit project succesvol gekloneerd in een eukaryote expressievector, wat het mogelijk maakt de receptor tot expressie te brengen in zoogdiercellen.

## 2. Ontwezen van receptoren

### 2.1 De GnRH-verwante receptoren

Het *C. elegans* genoom codeert voor acht GnRH-achtige receptoren (GNRR-1 tot en met GNRR-8). Eén van de voorspelde GnRH-achtige receptoren, GNRR-1, werd reeds ontweesd door Lindemans *et al.* (2009a) uitgaande van een *in silico* benadering. Het activerend ligand blijkt een GnRH/AKH-achtig neuropeptide te zijn dat gelijkenissen vertoont met zowel de insecten AKHs als de GnRHs van Tunicata en vertebraten. Dit wijst er op dat het ontstaan van GnRH-achtige peptiden dateert van vóór de divergentie van Protostomia en Deuterostomia. Om meer inzicht te krijgen in de evolutie van deze neuropeptiderge signaalweg, trachtten we de overige voorspelde *C. elegans* GnRH-achtige receptoren (GNRR-2, GNRR-3, GNRR-5, GNRR-7 en GNRR-8) te ontwezen. Aangezien eerder uitgevoerde  $Ca^{2+}$ -mobilisatie assays met een bibliotheek van 261 synthetische *C. elegans* peptiden (Addendum: Tabel b) niet in staat waren de weesreceptoren te koppelen aan hun activerend ligand, werd in deze studie een andere benadering aangewend. Analoog aan de bio-informatica aanpak toegepast door Lindemans *et al.* (2009a,b) werden verscheidene *in silico* zoekprogramma's gecombineerd om GnRH/AKH/corazonine-achtige peptiden te identificeren in het genoom van *C. elegans*. De set van kandidaat-liganden werd bovendien uitgebreid met insecten AKHs en corazonine peptiden (Addendum: Tabel a). De peptiden waren echter niet in staat één van de GnRH-achtige receptoren te activeren. In de toekomst zou een derde strategie, gebruikmakend van RP-HPLC fracties van *C. elegans* extracten, uitgevoerd kunnen worden om alsnog de GnRH-achtige receptoren te ontwezen.

### 2.2 Een kandidaat tachykin receptor (CE16937)

De tachykinine (neurokinine)-achtige receptorgroep bij *C. elegans* bestaat uit twaalf GPCRs die allen behoren tot de rhodopsine familie. Mertens *et al.* (2006) ontweesde één van deze receptoren, namelijk NPR-22a. In tegenstelling tot wat verwacht werd, kon de receptor niet geactiveerd worden door SFDRMGGTEFGLM-NH<sub>2</sub>, het enige voorspelde tachykinine-achtige peptide bij *C. elegans*. Dit peptide wordt gecodeerd



door het *nlp-8* neuropeptide precursorgen en bezit een C-terminaal G-L-M-NH<sub>2</sub> tripeptide, net zoals het kenmerkende vertebraat motief F-X-G-L-M-NH<sub>2</sub>. In plaats daarvan zorgden een groep van FMRFamide-gerelateerde peptiden voor een dosisafhankelijke activatie van de NPR-22a receptor. Ook de voorspelde CE16937 receptor behoort tot de tachykinine (neurokinine)-achtige receptorgroep. In de zoektocht naar het ligand van deze receptor hebben we in deze studie de omgekeerde farmacologie strategie gehanteerd. De getransfecteerde zoogdiercellen werden enerzijds gescreend met een bibliotheek van voorspelde *C. elegans* peptiden (Addendum: Tabel b). Dertien peptiden bleken in staat de receptor te activeren en zorgden voor een luminescentiepiek: *nlp-2b*, *nlp-23c*, *nlp-46*, *flp-1b*, *flp-1e*, *flp-1f*, *flp-1i*, *flp-1g*, *flp-4b*, *flp-6a*, *flp-18h*, *flp-21* en *flp-23a*. Het voorspelde tachykinine-achtige peptide *nlp-8c* bleek ook hier niet voor een respons te zorgen. De receptoractivatie kon echter niet worden bevestigd in een tweede screening met de peptiden in opgezuiverde vorm. Vervolgens screenden we de getransfecteerde cellen met twee peptiden (TK-1: SGPSSASEGEAYAFPGLR-NH<sub>2</sub> en TK-2: VPMMSLKGLR-NH<sub>2</sub>) die op basisch van een fylogenetische studie werden voorspeld de receptor te activeren. Beide peptiden genereerden een dosisafhankelijke respons met een EC<sub>50</sub>-waarde van 1,05 µM voor TK-1 en 506 nM voor TK-2. Dit betekent dat de peptiden in staat zijn te binden aan de receptor en deze ook functioneel te activeren. TK-1 en TK-2 bezitten bovendien een C-terminaal G-X-R-NH<sub>2</sub> tripeptide, net zoals de F-X-G-Y-R-NH<sub>2</sub> consensussequentie van de invertebrate TRPs (Tabel 15). Herhaling van de aequorine bioluminescentie screening met CHO-WTA11 cellen die 24 uur na transfectie een temperatuur shift ondergingen van 37°C naar 28°C resulteerde in EC<sub>50</sub>-waarden die niet significant verschillend waren van de eerder bekomen waarden, namelijk 999 nM voor TK-1 en 191 nM voor TK-2. Het idee voor deze temperatuurshift kwam van Kubiak *et al.* (2003), die bemerkten dat een temperatuursovergang naar 28°C essentieel was voor de functionele expressie van de *C. elegans* C10C6.2 receptor in zoogdiercellen. Dosis-respons curven voor receptoractivatie van *Drosophila* en zoogdier receptoren resulteren in EC<sub>50</sub>-waarden in het nanomolaire of zelfs subnanomolaire bereik. Hiermee vergeleken zijn de gemeten EC<sub>50</sub>-waarden voor de TK-1 en TK-2 peptiden relatief hoog. Dit kan te wijten zijn aan het heterologe karakter van het cellulaire expressiesysteem. Het zou kunnen dat de *C. elegans* receptoren niet enkel lagere temperaturen nodig hebben, maar ook andere accessorische proteïnen voor een correcte opvouwing en functionele expressie. Er moet bovendien worden opgemerkt dat de in deze studie bekomen dosis-respons curven nog niet optimaal zijn. Een groter aantal gegevens, voornamelijk in de exponentiële fase van de curve, zal gegenereerd moeten worden om een nauwkeurigere EC<sub>50</sub>-waarde te kunnen bepalen. De receptorscreening met getransfecteerde CHO-PAM28 cellen suggereert dat receptoractivatie, net zoals bij de

vertebrate homologen (Severini *et al.*, 2002), leidt tot een intracellulaire  $\text{Ca}^{2+}$  toename via  $\text{G}\alpha_q$ . Daarnaast wijst het CRE-luciferase reporter assay er op dat de geactiveerde CE16937 receptor signaleert via een  $\text{G}\alpha_s$  proteïne.

**Tabel 15** Aminozuursequentie van TK-1, TK-2, verschillende zoogdier tachykininen en invertebrate tachykinine-achtige peptiden. Het kenmerkende C-terminale motief wordt vetgedrukt weergegeven.

soort	aminozuursequentie
<i>Caenorhabditis elegans</i> TK-1	SGPSSASEGEAYAFPGLR-NH <sub>2</sub>
<i>Caenorhabditis elegans</i> TK-2	VPMMSLKGLR-NH <sub>2</sub>
<b>TRP's</b> (met de F-X-G-Y-R-NH <sub>2</sub> consensussequentie)	
<i>Locusta migratoria</i> TK-1	GPSGFYGVN-NH <sub>2</sub>
<i>Locusta migratoria</i> TK-2	APLSGFYGVN-NH <sub>2</sub>
<i>Locusta migratoria</i> TK-3	APQAGFYGVN-NH <sub>2</sub>
<i>Locusta migratoria</i> TK-4	APSLGFHGVN-NH <sub>2</sub>
<i>Culex salinarius</i> TK-1	APSGFMGMR-NH <sub>2</sub>
<i>Culex salinarius</i> TK-2	APYGFTGMR-NH <sub>2</sub>
<i>Culex salinarius</i> TK-3	APSGFFGMR-NH <sub>2</sub>
<i>Drosophila melanogaster</i> TK-1	APTSSFIGMR-NH <sub>2</sub>
<i>Drosophila melanogaster</i> TK-2	APLAFVGLR-NH <sub>2</sub>
<i>Drosophila melanogaster</i> TK-3	APTGFTGMR-NH <sub>2</sub>
<i>Drosophila melanogaster</i> TK-4	APVNSFVGMR-NH <sub>2</sub>
<i>Drosophila melanogaster</i> TK-5	APNGFLGMR-NH <sub>2</sub>
<i>Schistocerca gregaria</i> TK	GNTKKAVPGFYGTR-NH <sub>2</sub>
<b>inv-TK's en vertebrate tachykininen</b> (met de F-X-G-L-M-NH <sub>2</sub> consensussequentie)	
<i>Eledone aldovrandi</i> Eledoisin	pEPSKDAFIGLM-NH <sub>2</sub>
<i>Aedes aegypti</i> Sialokinin 1	NTGDKFYGLM-NH <sub>2</sub>
<i>Aedes aegypti</i> Sialokinin 2	DTGDKFYGLM-NH <sub>2</sub>
<i>Octopus vulgaris</i> TK-1	KPPSSSEFIGLM-NH <sub>2</sub>
<i>Octopus vulgaris</i> TK-2	KPPSSSEFVGLM-NH <sub>2</sub>
Zoogdieren SP	RPKPQQFFGLM-NH <sub>2</sub>
Zoogdieren NKA	HKTDSFVGLM-NH <sub>2</sub>
Zoogdieren NKB	DMHDFVGLM-NH <sub>2</sub>
Zoogdieren NPy	DAGHGQISHKRHKTDSFVGLM-NH <sub>2</sub>
Zoogdieren NPK	DADSSIEKQQVALLKALYGHGQISHKRHKTDSFVGLM-NH <sub>2</sub>

### 2.3 Een kandidaat tachykin receptor (TKR-1)

Ook de TKR-1 receptor is één van de twaalf tachykinine (neurokinine)-achtige receptoren in *C. elegans*. Deze receptor is mogelijks betrokken in de regulatie van het lipidemetabolisme, daar een knockdown van *tkr-1* via RNAi resulteert in een vermindering van het vetgehalte in wild type N2 wormen en *daf-2(e1370)* deletiemutanten (Ashrafi *et al.*, 2003). Expressie van het *tkr-1* gen werd reeds waargenomen in de *socket* cellen van de anterieure en posterieure deirid sensilla (ADE<sub>so</sub> en PDE<sub>so</sub>) vanaf het L2 larvaal stadium tot op volwassen leeftijd (Barret *et al.*, 1996). In deze studie trachtten we de TKR-1 receptor te ontwezen aan de hand van een aequorine bioluminescentie assay. Het ligand voor de TKR-1 receptor werd echter niet gevonden. Geen enkel peptide uit de bibliotheek van voorspelde *C. elegans* peptiden (Addendum: Tabel b), noch TK-1 of TK-2, was in staat een respons uit te lokken. Een mogelijke vervolgstudie zou een set van kandidaat-liganden kunnen samenstellen aan de hand van een bio-informatica zoektocht, waarbij rekening gehouden wordt met de gemiddelde lengte van een neuropeptide precursor, de aanwezigheid van een N-terminaal signaalpeptide en een mono- of dibasische knipplaats achter de peptidesequentie in de precursor en de algemene kenmerken van tachykinine neuropeptiden en hun precursoren.

### 2.4 Een kandidaat neuromedine U/pyrokinine receptor (NMUR-1)

De NMUR-1 receptor werd met een bibliotheek van voorspelde *C. elegans* peptiden (Addendum: Tabel b) gescreend voor activatie. Stimulatie van de NMUR-1 expresserende cellen met het peptide *nlp-44a* (APHPSSALLVPYPRV-NH<sub>2</sub>) resulteerde in een dosis-afhankelijke toename van de luciferase bioluminescentie. De EC<sub>50</sub>-waarde bekomen met cellen geïncubeerd bij 37°C (EC<sub>50</sub> = 41,1 nM) was niet significant verschillend van de waarde bekomen met cellen die een temperatuurshift hadden ondergaan naar 28°C (EC<sub>50</sub> = 9,29 nM). Ook hier geldt dat de bekomen dosis-respons curve nog niet optimaal is. Een screening met meerdere peptide concentraties is noodzakelijk om een nauwkeurige EC<sub>50</sub>-waarde te kunnen genereren. Verder onderzoek is nodig om te achterhalen welk G-proteïne betrokken is in de signaaltransductieweg. Analoog aan de studie van de CE16937 receptor, kunnen hiervoor CHO-PAM28 en HEK 293T cellen gebruikt worden. Het activerend ligand wordt gecodeerd door het *nlp-44* neuropeptide precursorgen, net zoals het ligand van de NMUR-2 receptor. Deze resultaten zijn consistent met de veronderstelling dat het *nlp-44* gen een CAPA-achtige precursor is. Nlp-44a vertoont bovendien de L-X-X-X-P-R-V-NH<sub>2</sub> consensussequentie van insect PVKs (Tabel 16). Omwille van gelijkenis met het periviscerokinine-achtige signaalsysteem in insecten, kan de NMUR-1 receptor gezien worden als het *C. elegans* homologo van de CAPA-PVK receptor.

**Tabel 16** Aminozuursequenties van nlp-44a, nlp-44c, een aantal zoogdier en vertebraat NMU peptiden en insect PK/PVK peptiden. Het kenmerkende C-terminale motief wordt vetgedrukt weergegeven.

<b>soort</b>	<b>aminozuursequentie</b>
<i>Caenorhabditis elegans</i> nlp-44a	APHPSSALLVPY <b>PRV-NH<sub>2</sub></b>
<i>Caenorhabditis elegans</i> nlp-44c	AFFYTP <b>RI-NH<sub>2</sub></b>
<b>neuromedine U bij zoogdieren</b> (met de F-L-F-R-P-R-N-NH <sub>2</sub> consensussequentie)	
<i>Homo sapiens</i> NMU-25	FRVDEEFQSPFASQSRGY <b>FLFRPRN-NH<sub>2</sub></b>
<i>Sus scrofa</i> NMU-25	FKVDEEFQGPIVSQNRRY <b>FLFRPRN-NH<sub>2</sub></b>
<i>Sus scrofa</i> NMU-8	<b>YFLFRPRN-NH<sub>2</sub></b>
<i>Rattus norvegicus</i> NMU-23	YKVNEYQGPVAPSGGF <b>FLFRPRN-NH<sub>2</sub></b>
<i>Mus musculus</i> NMU-20	EYQSPSVGQSKGY <b>FLFRPRN-NH<sub>2</sub></b>
<i>Cavia porcellus</i> NMU-9	<b>GYFLFRPRN-NH<sub>2</sub></b>
<i>Canis lupus familiaris</i> NMU-25	FRLDEEFQGPIASQVRRQ <b>FLFRPRN-NH<sub>2</sub></b>
<i>Canis lupus familiaris</i> NMU-8	<b>QFLFRPRN-NH<sub>2</sub></b>
<i>Oryctolagus cuniculus</i> NMU-25	FPVDEEFQSPFGSRSGY <b>FLFRPRN-NH<sub>2</sub></b>
<b>neuromedine U bij vertebraten</b> (met de F-R-P-R-N-NH <sub>2</sub> consensussequentie)	
<i>Gallus gallus</i> NMU-25	YKVDEDLQGAGGIQSRGY <b>FLFRPRN-NH<sub>2</sub></b>
<i>Gallus gallus</i> NMU-9	<b>GYFLFRPRN-NH<sub>2</sub></b>
<i>Litoria caerulea</i> NMU-23	SDEEVQVPGGVISNGY <b>FLFRPRN-NH<sub>2</sub></b>
<i>Bombina maxima</i> NMU-28	RDSSGIVGRPF <b>FLFRPRN-NH<sub>2</sub></b>
<i>Rana temporaria</i> NMU-25	LKPDEELQGGVLSRGY <b>FVFRPRN-NH<sub>2</sub></b>
<b>pyrokinine bij insecten</b> (met de F-X-P-R-L-NH <sub>2</sub> consensussequentie)	
<i>Drosophila melanogaster</i> PK-1	TGPSASSGLW <b>FGPRL-NH<sub>2</sub></b>
<i>Drosophila melanogaster</i> PK-2	<b>SVPFKPRL-NH<sub>2</sub></b>
<i>Periplaneta americana</i> PK	<b>LVPFRPRL-NH<sub>2</sub></b>
<i>Locusta migratoria</i> PK-1	DSGDEWPQQPF <b>VPRN-NH<sub>2</sub></b>
<i>Locusta migratoria</i> PK-2	pQSVPT <b>FTPRL-NH<sub>2</sub></b>
<i>Schistocerca gregaria</i> PK-1	GAAPAAQ <b>FSPRL-NH<sub>2</sub></b>
<b>periviscerokinine bij insecten</b> (met de L-X-X-X-P-R-V-NH <sub>2</sub> consensussequentie)	
<i>Drosophila melanogaster</i> PVK-1	GANMGLYAF <b>PRV-NH<sub>2</sub></b>
<i>Drosophila melanogaster</i> PVK-2	ASGLVAF <b>PRV-NH<sub>2</sub></b>
<i>Periplaneta americana</i> PVK-1	GASGLIPVMRN <b>-NH<sub>2</sub></b>
<i>Periplaneta americana</i> PVK-2	GSSSGLISM <b>PRV-NH<sub>2</sub></b>
<i>Locusta migratoria</i> PVK-1	<b>AAGLFQFPRV-NH<sub>2</sub></b>

## 2.5 Een kandidaat TRH receptor (NMUR-4)

De omgekeerde farmacologie benadering wordt eveneens aangewend in de zoektocht naar het ligand van een thyrotropine-releasing hormoon-achtige receptor (NMUR-4). De receptor wordt hiervoor gescreend met een bibliotheek van voorspelde *C. elegans* peptiden (Addendum: Tabel b). Er bleek echter geen enkel peptide in staat een bioluminescent signaal te genereren. In de toekomst zou een set van kandidaat-liganden kunnen worden samengesteld op basis van *C. elegans* extracten of *in silico* voorspellingen. Het is echter zeer moeilijk om via de BLAST tool een TRH-achtig peptide te identificeren in het genoom van *C. elegans*, aangezien enkel de sequentie die codeert voor het biologisch actieve peptide samen met de flankerende basische aminozuren geconserveerd is in een neuropeptide precursorproteïne. Voor het TRH peptide betekent dit dat enkel de korte [KR,RR]QHP[GKR,GRR] sequentie geconserveerd is en kan gebruikt worden als input voor het scannen van proteïne databases op zoek naar mogelijke overeenkomsten. De Loof *et al.* (2012) voerden deze zoekopdracht uit en vonden geen enkele match in de protostomia waarbij zowel het peptide als de dibasische knipplaatsen aanwezig waren.

## 3. Analyse van NaCl chemotaxis

Neerregulatie van het *dtk* precursorgen dat codeert voor de tachykinine-gerelateerde peptiden bij *Drosophila* resulteerde in een verminderde geurperceptie van afstotende stoffen (Winther *et al.*, 2006). In een vervolgstudie werd de tachykinine receptor neergereguleerd in de lokale neuronen van de antennale lob en dit leidde eveneens tot een verminderde geurperceptie, ditmaal een verminderde aantrekking tot voedingsgerelateerde geuren (Winther & Ignell, 2010). De CE16937 receptor van *C. elegans* vertoont sterke gelijkenissen met de *Drosophila* tachykinine receptor (BLASTp E-waarde:  $9,7 \cdot 10^{-58}$ ). Daarom werd in dit project onderzocht of ook de CE16937 receptor een rol speelt in chemotactisch gedrag. We bepaalden hiervoor de chemotaxis index voor 25 mM NaCl van naïeve en NaCl geconditioneerde wild type N2, *osm-9(ky10)* en C49A9.7(*ok1620*) wormen. Wild type *C. elegans* wormen worden aangetrokken door lage zoutconcentraties (0,1 - 200 mM). Deze respons wordt voornamelijk gemedieerd door de ASE neuronen, maar ook de ADF, ASG en ASI neuronen dragen ertoe bij (Bargmann & Horvitz, 1991). Hogere zoutconcentraties (> 200 mM) zijn aversief voor wormen. Dit is vermoedelijk te wijten aan een algemeen vermijdingsgedrag van hoge osmolariteit waarbij de ASH neuronen betrokken zijn (Hukema *et al.*, 2006). De balans tussen attractie en aversie is echter ook afhankelijk van eerdere ervaringen. Wanneer de wormen worden blootgesteld aan 100 mM NaCl in de afwezigheid van voedsel, zullen ze attractieve zoutconcentraties minder aantrekkelijk vinden of zelfs vermijden doordat ze de aanwezigheid van zout associëren met de afwezigheid van voedsel (Jansen *et al.*, 2002). Naïeve *osm-9(ky10)*

wormen vertonen hetzelfde NaCl chemotaxis gedrag als wild type N2 wormen, maar zijn echter deficiënt in gustatorische plasticiteit (Hukema *et al.*, 2006). De bekomen resultaten zijn consistent met wat reeds is neergeschreven in de wetenschappelijke literatuur. De NaCl geconditioneerde wormen vertonen een significant minder sterke aantrekking tot 25 mM NaCl, met uitzondering van de *osm-9(ky10)* mutanten. De conditionering met 100 mM NaCl zorgt echter niet voor de verwachte negatieve chemotaxis index. Dit kan te wijten zijn aan omgevingsfactoren, aangezien dit assay erg gevoelig is aan ondermeer de luchtvochtigheid, temperatuur, droogheid van de assay platen, vibraties enzoverder. Wormen deficiënt in de tachykin-achtige receptor CE16937 blijken een normaal zout chemotaxis gedrag en gustatorische plasticiteit te vertonen. De chemotaxis index van zowel naïeve als NaCl geconditioneerde C49A9.7(*ok1620*) wormen wijkt niet significant af van de waarde bekomen met wild type N2 wormen. Om deze bevindingen te bevestigen zal het assay in de toekomst nog herhaald moeten worden, aangezien het experiment slechts op één enkel tijdstip werd uitgevoerd.

#### 4. Analyse van bewegingsactiviteit

Tachykinine-deficiënte *Drosophila* blijken energiekker te zijn dan wildtype controles; ze wandelen langere afstanden en zijn een groter deel van hun tijd actief (Winther *et al.*, 2006). Met behulp van de WormMicrotracker (Designplus) trachtten we na te gaan of deze functie geconserveerd is bij *C. elegans*. Hiervoor werd het zwemgedrag van C49A9.7(*ok1620*) deletiemutantanten vergeleken met dat van wild type N2 wormen. De bewegingsactiviteit van de deletiemutantanten in vloeibaar medium blijkt niet significant te verschillen van dat van wild type N2 wormen en dit resultaat is onafhankelijk van de aan- of afwezigheid van voedsel. We merkten echter op dat de gemiddelde bewegingsactiviteit per worm afhankelijk was van het aantal wormen in de well. Aangezien de wormen via een druppel werden toegevoegd, varieerde het aantal tussen de verschillende wells. We raden daarom aan het experiment in de toekomst te herhalen met een vast aantal wormen per well. Dit kan bekomen worden door de wormen rechtstreeks over te brengen van de cultuurplaat naar het vloeibaar medium met behulp van een worm picker.

*C. elegans* beschikt bovendien over een tweede vorm van voortbeweging, namelijk kruipen, die wordt gebruikt wanneer de worm zich wil verplaatsen over een vaste bodem. Er zijn aanwijzingen dat kruip- en zwemgedrag niet louter twee uitersten zijn van eenzelfde bewegingsvorm, maar daarentegen twee verschillende gedragvormen representeren (Pierce-Shimomura *et al.*, 2008). Beide vormen vertonen namelijk een verschillende kinematica, waarbij kruipen wordt gekenmerkt door een S-vormige houding en zwemmen door een C-vormige houding. De kruip- en zwembeweging wordt bovendien gegenereerd door afzonderlijke patronen van spiercontractie. Er is bijgevolg

nog verder onderzoek nodig naar de betrokkenheid van het tachykinine signaalsysteem bij de regulatie van kruipgedrag, zowel in aan- als afwezigheid van voedsel. Deze testen kunnen eveneens worden uitgevoerd met behulp van de WormMicrotracker (Designplus).

## 5. Aanmaak van GFP reporterconstructen

GFP reporterconstructen zijn uitgegroeid tot de belangrijkste tool voor de analyse van expressiepatronen in *C. elegans* omdat deze nematode een aantal kenmerken vertoont die het gebruik van GFP begunstigen. Een specifiek voordeel is zijn transparantheid en kleine diameter. Dit maakt het mogelijk om de expressie van GFP reporter genen *in vivo* te observeren onder een gewone microscoop uitgerust met een fluorescente lichtbron. Kennis over de cellulaire lokalisatie van een proteïne kan bovendien belangrijke informatie verstrekken over de fysiologische functie ervan, aangezien de positie en de afstamming van alle 959 somatische cellen, alsook de functie van veel van deze cellen, in detail gekend is.

We zijn er in deze studie in geslaagd een stabiele transgene *C. elegans* lijn te bekomen gebruikmakend van de PCR fusie techniek. Het transcriptionele *PT07C12.15::gfp* reporterconstruct voor de tachykinine neuropeptide precursor werd hiervoor samen met de *Pelt-2::mCherry* co-injectiemerker in de syncytiale gonade geïnjecteerd. De gebruikte co-injectiemerker codeert voor het rood fluorescent merker proteïne mCherry onder controle van de darmspecifieke *elt-2* promotor, waardoor transgene dieren visueel geselecteerd konden worden. Met behulp van een confocale microscoop werd vervolgens het expressiepatroon van het *PT07C12.15::gfp* transgen gevisualiseerd. Expressie van deze neuropeptide precursor werd waargenomen in een aantal kop- en staartneuronen van hermafrodiete wormen, alsook in spiercellen van de lichaamswand en in de rectale kliercellen. De GFP-expresserende neuronale cellichamen in de kopregio zijn gelegen ter hoogte van de faryngale isthmus en beschikken over uitlopers die zich uitstrekken naar de tip van de neus en uitlopers die in de zenuwring rond de farynx lopen. De GFP-expresserende neuronen in de staartregio liggen posterieur ten opzichte van de rectale kliercellen en hebben uitlopers richting het staartuiteinde. Dit zou er op kunnen wijzen dat het precursorproteïne van TK-1 en TK-2 tot expressie wordt gebracht in amphide en phasmide neuronen. *C. elegans* heeft twaalf paar amphide sensorische neuronen, waarvan elf paar chemosensorische neuronen die instaan voor het detecteren van chemische stoffen en één paar thermosensorische neuronen. De twee phasmide neuronen moduleren vermijdingsgedrag als respons op afstotende stoffen. Om de transgen-expresserende neuron te identificeren, kan gebruik gemaakt worden van een Dil kleuring. Dil (1,1'-dioctadecyl-3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchloraat) is een rood fluorescente lipofiele kleurstof die wordt opgenomen door zes amphide

(ADL, ASH, ASI, ASJ, ASK, AWB) en twee phasmide (PHA en PHB) neuronen, waarschijnlijk via hun gecilieerde uiteinden. Celidentificatie gebeurt bovendien best in L1 stadium wormen, aangezien de exacte lokatie van sommige cellen kan variëren op latere leeftijd. Verder moet worden nagegaan of de waargenomen fluorescentie in de spiercellen werkelijk het gevolg is van expressie van het tachykinine precursor transgen. Dit resultaat is namelijk erg ongewoon voor een neuropeptide precursorproteïne, dat normaal voorkomt in neuronen, neurosecretorische cellen of kliercellen.

Micro-injectie met het *PC49A9.7::gfp* fusieproduct voor de tachykinine receptor CE16937 resulteerde daarentegen niet in een transgene *C. elegans* lijn. De nakomelingen van de geïnjecteerde wormen vertoonden geen rood fluorescent signaal in de darmcellen, wat er op wijst dat de transformatie niet succesvol was. De micro-injectie dient bijgevolg herhaald te worden zodat ook het expressiepatroon van de CE16937 receptor kan bestudeerd worden.

We hebben in dit project eveneens geprobeerd om translationele GFP reporterconstructen aan te maken in een reporter-gen vector. Er werd hierbij geopteerd voor de pSM SL2 GFP vector. Deze heeft, in tegenstelling tot andere reporter-gen vectoren, een SL2 trans-splicing site die ervoor zorgt dat GFP als een individueel proteïne wordt getransleerd. Er worden bijgevolg geen chimere producten gevormd, die vaak minder fluorescent zijn door hun intrinsieke instabiliteit, of die zelfs toxisch kunnen zijn voor de cel. We zijn er echter niet in geslaagd het genomisch DNA van de weesreceptoren NMUR-1 en CE16937 en hun corresponderende promoters in de vector te ligeren. De reporterconstructen dienen bijgevolg nog verder afgewerkt te worden, zoda de cellulaire lokalisatie van de weesreceptoren kan worden geanalyseerd.



## VI. SAMENVATTING

G-proteïne gekoppelde receptoren (GPCRs) vormen vandaag de belangrijkste groep van moleculaire doelwitmoleculen voor therapeutische geneesmiddelen. Een groot aantal GPCRs wordt geactiveerd door neuropeptide liganden. Dit zijn kleine signaal-moleculen die geknipt worden uit een groter precursorproteïne en fungeren als neuromodulators en neurotransmitters in het centrale en perifere zenuwstelsel. Deze studie beoogde de karakterisatie van vier neuropeptidische signaalwegen in het modelorganisme *Caenorhabditis elegans*, een kleine vrijlevende bodemnematode met een aantal unieke eigenschappen die kunnen helpen bij het ontdekken en bestuderen van dergelijke signaalsystemen.

Eerst hebben we twee voorspelde neuropeptide GPCRs gekloneerd in een eukaryote expressievector met het oog op de ontzetting van de receptoren in een heteroloog cellulair expressiesysteem. Deze klonering werd succesvol voltooid voor de neuromedine U/pyrokinine-gerelateerde receptor NMUR-1 en de TRH-gerelateerde receptor NMUR-4. In de zoektocht naar de endogene liganden van deze en zeven andere voorspelde GPCRs (GNRR-2, GNRR-3, GNRR-5, GNRR-7, GNRR-8, CE16937 en TKR-1) werd de omgekeerde farmacologie benadering aangewend. Met behulp van een aequorine bioluminescentie screening werden de CE16937 en NMUR-1 receptor ontweerd. Twee peptiden, TK-1 (SGPSSASEGEAYAFPGLR-NH<sub>2</sub>) en TK-2 (VPMMSLKGLR-NH<sub>2</sub>), die gecodeerd worden door het *T07C12.15* precursorgen, bleken in staat de tachykinine-gerelateerde CE16937 receptor te activeren. Ons onderzoek wees verder uit dat de geactiveerde receptor zowel via een G $\alpha_q$  als een G $\alpha_s$  gemedieerde signaaltransductieweg kan signaleren. Het peptide nlp-44a (APHPSSALLVPYPRV-NH<sub>2</sub>) resulteerde in een dosis-afhankelijke activatie van de NMUR-1 receptor.

Daarnaast trachtten we het tachykinine signaalsysteem in *C. elegans* functioneel te karakteriseren. Met behulp van twee fenotyperingsexperimenten werden het NaCl chemotaxis gedrag en de bewegingsactiviteit van deletiemutanten voor de ontweerde tachykinine receptor bestudeerd. De voorlopige resultaten geven aan dat deze mutanten zich in deze assays gedragen zoals wild type N2 wormen.

Tot slot werd geprobeerd om GFP lokalisatieconstructen te genereren om het *in vivo* expressiepatroon van de tachykinine-gerelateerde receptor CE16937, de neuromedine U/pyrokinine-gerelateerde receptor NMUR-1 en de tachykinine neuropeptide precursor *T07C12.15* te visualiseren. Enkel voor het reporterconstruct voor de tachykinine precursor werd een stabiele transgene *C. elegans* lijn bekomen. Expressie van dit *PT07C12.15::gfp* transgen werd waargenomen in een aantal kop- en staartneuronen van hermafrodiete wormen, alsook in spiercellen van de lichaamswand en in de rectale klieren.

## VII. SUMMARY

G-protein coupled receptors (GPCRs) constitute the most important group of molecular targets for therapeutic drugs. A large number of GPCRs are activated by neuropeptide ligands. These are small signaling molecules that are generated by cleavage from a larger precursor protein and act as neuromodulators and neurotransmitters in the central and peripheral nervous system. This research project aimed at the characterization of four neuropeptidergic signaling pathways in the model organism *Caenorhabditis elegans*, a small free-living soil nematode which exhibits some unique properties that facilitate the discovery and study of such signaling systems.

We cloned two predicted neuropeptide GPCRs in an eukaryotic expression vector with the aim of deorphanising these receptors in an heterologous cellular expression system. The molecular cloning of the Neuromedin U/Pyrokinin-like receptor NMUR-1 and the TRH-like receptor NMUR-4 was successfully completed. In order to identify the endogenous ligands of these and seven other predicted GPCRs (GNRR-2, GNRR-3, GNRR-5, GNRR-7, GNRR-8, CE16937 en TKR-1), we used the reverse pharmacology approach. Using an aequorin bioluminescence screening, we succeeded in deorphanising the CE16937 and NMUR-1 receptor. Two peptides, TK-1 (SGPSSASEGEAYAFPGLR-NH<sub>2</sub>) and TK-2 (VPMMSLKGLR-NH<sub>2</sub>), encoded by the *T07C12.15* precursor gene, which we now designate as the tachykinin precursor gene, were able to activate the tachykinin-like CE16937 receptor. Further research revealed that the activated receptor couples through both G $\alpha_q$  as G $\alpha_s$  proteins. The peptide nlp-44a (APHPSSALLVPYPRV-NH<sub>2</sub>) elicited a dose-dependent activation of the NMUR-1 receptor.

Subsequently, we tried to functionally characterise the tachykinin signaling system in *C. elegans*. For this purpose, we studied the NaCl chemotaxis behaviour and locomotory activity of CE16937 deletion mutants. Our preliminary results indicate that these mutants behave as wild type N2 worms and that tachykinins are not involved in the regulation of these behaviours in *C. elegans*.

Finally, we attempted to generate GFP localisation constructs in order to visualise the *in vivo* expression pattern of the tachykinin-like receptor CE16937, the Neuromedin U/Pyrokinin-like receptor NMUR-1 and the tachykinin neuropeptide precursor T07C12.15. We were able to obtain a stable transgenic *C. elegans* line, but only for the tachykinin precursor reporter construct. Expression of the *PT07C12.15::gfp* transgene was observed in a number of head and tail neurons of hermaphrodite worms, as well as in body wall muscles and in the rectal gland.

## VIII. REFERENTIES

- Altun, Z.F. and Hall, D.H., 2009a. Excretory system. In *WormAtlas*.
- Altun, Z.F. and Hall, D.H., 2009b. Introduction. In *WormAtlas*.
- Altun, Z.F. and Hall, D.H., 2009c. Alimentary system, pharynx. In *WormAtlas*.
- Altun, Z.F. and Hall, D.H., 2011. Nervous system, general description. In *WormAtlas*.
- Ambros, V., 2000. Control of developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **10**:428-433.
- Ashrafi, K., Chang, F.Y., Watts, J.L., Fraser, A.G., Kamath, R.S., Ahringer, J., Ruvkun, G., 2003. Genome-wide RNAi analysis of *Caenorhabditis elegans* fat regulatory genes. *Nature*, **421**:268-272.
- Bargmann, C.I., Horvitz, H.R., 1991. Chemosensory neurons with overlapping functions direct chemotaxis to multiple chemicals in *C. elegans*. *Neuron*, **7**:729-742.
- Barrett, P., Gerard, N.P., Gerard, C., 1996. Cloning and characterization of *tkr-1*, a tachykinin receptor homolog, in *C. elegans*. East Coast Worm Meeting.
- Beets, I., Lindemans, M., Janssen, T., Verleyen, P., 2011. Deorphanizing G protein-coupled receptors by a calcium mobilization assay. *Methods Mol. Biol.*, **798**:377-391.
- Beets, I., Janssen, T., Meelkop, E., Temmerman, L., Suetens, N., Rademakers, S., Jansen, G., Schoofs, L., 2012. Vasopressin/oxytocin-related signaling regulate gustatory associative learning in *C. elegans*. *Science*, **338**:543-545.
- Birnboim, H.C., Doly, J., 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.*, **7**:1513-1523.
- Brenner, S., 1974. The Genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, **7**:71-94.
- Brighton, P.J., Szekeres, P.G., Willars, G.B., 2004. Neuromedin U and its receptors: structure, function and physiological roles. *Pharmacol. Rev.*, **56**:231-248.
- Brownlee, D.J.A. and Fairweather, I., 1999. Exploring the neurotransmitter labyrinth in nematodes. *Trends Neurosci.*, **22**:16-24.
- Bulant, M., Roussel, J-P., Astier, H., Nicolas, P., Vaudry, H., 1990. Processing of thyrotropin-releasing hormone prohormone (pro-TRH) generates a biologically active peptide prepro-TRH-(160-169), which regulates TRH-induced thyrotropin secretion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**:4439-4443.
- Butash, K. A., Natarajan, P., Young, A., Fox, D. K., 2000. Reexamination of the effect of endotoxin on cell proliferation and transfection efficiency. *Biotechniques*, **29**(3):610-614, 616, 618-619.
- Byerly, L., Cassada, R.C., Russell, R.L., 1976. The life cycle of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Dev. Biol.*, **51**:23-33.
- 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.
- Chang, M.M., Leeman, S.E., Niall, H.D., 1971. Amino-acid sequence of substance P. *Nat. New Biol.*, **232**:86-87.
- Civelli, O., Saito, Y., Wang, Z., Nothacker, H.P., Reinscheid, R. K., 2006. Orphan GPCRs and their ligands. *Pharmacol. Ther.*, **110**:525-532.
- De Loof, A., Lindemans, M., Liu, F., De Groef, B., Schoofs, L., 2012. Endocrine archeology: Do insects retain ancestrally inherited counterparts of the vertebrate releasing hormones GnRH, GHRH, TRH, and CRF? *Gen. Comp. Endocrinol.*, **177**:18-27.
- Driscoll, M., 1995. Methods for the study of cell death in the nematode *C. elegans*. *Methods Cell Biol.*, **46**:323-353.
- Ebner, K., and Singewald, N., 2006. The role of substance P in stress and anxiety responses. *Amino Acids*, **31**:251-272.
- Fernald, R.D. and White, R.B., 1999. Gonadotropin-releasing hormone genes: phylogeny, structure, and functions. *Front. Neuroendocrinol.*, **20**:224-240.
- Filmore, D., 2004. It's a GPCR world. *Modern Drug Discovery (American Chemical Society)*, 24-28.

- Fink, G., 1988. Gonadotropin secretion and its control. In: *The Physiology of Reproduction*, 1349-1377. (Knobil, E. and Neill, J., eds.), Raven Press, New York.
- Fredriksson, R., Lagerstrom, M.C., Lundin, L.G., Schioth, H.B., 2003. The G-protein coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Mol. Pharmacol.*, **63**:1256-1272.
- Frooninckx, L., Van Rompay, L., Temmerman, L., Van Sinay, E., Beets, I., Janssen, T., Husson, S.J., Schoofs, L., 2012. Neuropeptide GPCRs in *C. elegans*. *Front. Endocrinol.*, **3**:167.
- Gäde, G., Auerswald, L., 2003. Mode of action of neuropeptides from the adipokinetic hormone family. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **132**(1):10-20.
- Galas, L., Raoult, E., Tonon, M-C., Okada, R., Jenks, B.G., Castaño, J.P., Kikuyama, S., Malagon, M., Roubos, E.W., Vaudry, H., 2009. TRH acts as a multifunctional hypophysiotropic factor in vertebrates. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **164**:40-50.
- Greco, S.J., Corcoran, K.E., Cho, K.J., Rameshwar P., 2004. Tachykinins in the emerging immune system: relevance to bone marrow homeostasis and maintenance of hematopoietic stem cells. *Front. Biosci.*, **9**:1782-1793.
- Grimmelikhuijzen, C.J.P., Leviev, I., Carstensen, K., 1996. Peptides in the nervous systems of cnidarians: Structure, function and biosynthesis. *Int. Rev. Cytol.*, **167**:37-89.
- Hanada, R., Nakazato, M., Murakami, N., Sakihara, S., Yoshimatsu, H., Toshinai, K., Hanada, T., Suda, T., Kangawa, K., Matsukura, S., Sakata, T., 2001. A role for neuromedin U in stress response. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **289**:225-228.
- Herbison, A.E., 2006. Physiology of the gonadotropin-releasing hormone neuronal network. In: *Physiology of reproduction*, 1415–1482. (Neill, J. D., Eds.), Raven Press, New York.
- Hewes, R.S. and Taghert, P.H., 2001. Neuropeptides and neuropeptide receptors in the *Drosophila melanogaster* genome. *Genome Res.*, **11**:1126-1142.
- Hökfelt, T., Millhorn, D., Seroogy, K., Tsuruo, Y., Ceccatelli, S., Lindh, B., Meister, B., Melander, T., Schalling, M., Bartfai, T., 1987. Coexistence of peptides with classical neurotransmitters. *Experientia*, **43**:768-780.
- Hornby, P.J., 2001. Central neurocircuitry associated with emesis. *Am. J. Med.*, **111**(Suppl 8A), 106S-12S.
- Hukema, R., Rademakers, S., Dekkers, M., Burghoorn, J., Jansen, G., 2006. Antagonistic sensory cues generate gustatory plasticity in *Caenorhabditis elegans*. *EMBO J.*, **25**:312-22.
- Husson, S.J., Mertens, I., Janssen, T., Lindemans, M., Schoofs, L., 2007. Neuropeptidergic signaling in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Progress In Neurobiology*, **82**:33-55.
- Iwakoshi, E., Takuwa-Kuroda, K., Fujisawa, Y., Hisada, M., Ukena, K., Tsutsui, K., Minakata, H., 2002. Isolation and characterization of a GnRH-like peptide from *Octopus vulgaris*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **291**:1187-1193.
- Jansen, G., Weinkove, D., Plasterk, R.H., 2002. The G-protein gamma subunit gpc-1 of the nematode *C. elegans* is involved in taste adaptation. *EMBO J.*, **21**:986-994.
- Janssen, T., Meelkop, E., Lindemans, M., Verstraelen, K., Husson, S. J., Temmerman, L., Nachman, R. J., Schoofs, L., 2008. Discovery of a cholecystokinin-gastrin-like signaling system in nematodes. *Endocrinology*, **149**:2826-2839.
- Johnson, T.E., Mitchell, D.H., Kline, S., Kemal, R., Foy, J., 1984. Arresting development arrests aging in the nematode *C. elegans*. *Mech. Age. Dev.*, **28**:23-40.
- Kage, R., McGregor, G.P., Thim, L., Conlon, M., 1988. Neuropeptide gamma: a peptide isolated from rabbit intestine that is derived from gamma-preprotachykinin. *J. Neurochem.*, **50**:1412-1417.
- Kangawa, K., Minamino, N., Fukada, A., Matsuo, H., 1983. Neuromedin K: a novel mammalian tachykinin identified in porcine spinal cord. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **114**:533-540.
- Katsouni, E., Sakkas, P., Zarros, A., Skandali, N., Liapi, C., 2009. The involvement of substance P in the induction of aggressive behavior. *Peptides*, **30**:1586-1591.

- Kawaguchi, Y., Hoshimaru, M., Nawa, H., Nakanishi, S., 1986. Sequence analysis of cloned cDNA for rat substance P precursor: existence of a third substance P precursor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **139**: 1040-1046.
- Kimura, S., Okada, M., Sugita, Y., Kanazawa, I., Munekata, E., 1983. Novel neuropeptides, neurokinin a and b, isolated from porcine spinal cord. *Proc. Jpn. Acad., Ser. B.*, **59**:101-104.
- Klass, M. and Hirsh, D., 1976. Non-ageing developmental variant of *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, **260**:523-525.
- Kotani, H., Hoshimaru, M., Nawa, H., Nakanishi, S., 1986. Structure and gene organization of bovine neuromedin K precursor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**: 7074-7078.
- Kramer, M.S., Cutler, N., Feighner, J., Shrivastava, R., Carman, J., Sramek, J.J., Reines, S.A., Liu, G., Snavely, D., Wyatt-Knowles, E., Hale, J.J., Mills, S.G., MacCoss, M., Swain, C.J., Harrison, T., Hill, R.G., Hefti, F., Scolnick, E.M., Cascieri, M.A., Chicchi, G.G., *et al.*, 1998. Distinct mechanism for antidepressant activity by blockade of central substance P receptors. *Science*, **281**:1640-1645.
- Krogh, A., Larsson, B., von Heijne, G., Sonnhammer, E.L., 2001. Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *J. Mol. Biol.*, **305**:567-580.
- Kubiak, T.M., Larsen, M.J., Zantello, M.R., Bowman, J.W., Nulf, S.C., Lowery, D.E., 2003. Functional annotation of the putative orphan *Caenorhabditis elegans* G-protein-coupled receptor C10C6.2 as a FLP15 peptide receptor. *J. Biol. Chem.*, **278**:42115–42120.
- Kurtz, M.M., Wang, R., Clements, M.K., Cascieri, M.A., Austin, C.P., Cunningham, B.R., Chicchi, G.G., Liu, Q., 2002. Identification, localization and receptor characterization of novel mammalian substance P-like peptides. *Gene*, **296**(1-2):205-12.
- Lai, J.P., Douglas, S.D., Rappaport, E., Wu, J.M., Ho, W.Z., 1998. Identification of a delta isoform of preprotachykinin mRNA in human mononuclear phagocytes. *J. Neuroimmunol.*, **91**: 121-128.
- Lindemans, M., Feng, L., Janssens, T., Husson, S. J., Mertens, I., Gäde, G., Schoofs, L., 2009a. Adipokinetic hormone signaling through the gonadotropin-releasing hormone receptor modulates egg-laying in *Caenorhabditis elegans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**:1642-1647.
- Lindemans, M., Janssen, T., Husson, S.J., Meelkop, E., Temmerman, L., Clynen, E., Mertens, I., Schoofs, L., 2009b. A neuromedin-pyrokinin-like neuropeptide signaling system in *Caenorhabditis elegans*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **379**:760-764.
- Li, C. and Kim, K., 2008. Neuropeptides in *WormBook*, ed. The *C. elegans* Research Community, *WormBook*, doi/10.1895/wormbook.1.142.1.
- Lints, R. and Hall, D.H., 2009a. The cuticle. In *WormAtlas*.
- Lints, R. and Hall, D.H., 2009b. Reproductive system, overview. In *WormAtlas*.
- Liu, D., Jiang, L-S., Dai, L-Y., 2007. Substance P and its receptors in bone metabolism. *Neuropeptides*, **41**:271-283.
- Maggi, C.A., Patacchini, R., Rovero, P., Giachetti, A., 1993. Tachykinin receptors and tachykinin receptor antagonists. *J. Auton. Pharmacol.*, **13**:23-93.
- Maier, W., Adilov, B., Regenass, M., Alcedo, J., 2010. A neuromedin U receptor acts with the sensory system to modulate food type-dependent effects on *C. elegans* lifespan. *PLoS. Biol.*, **8**(5): e1000376.
- Mains, R.E. and Eipper, B.A., 1990. The tissue-specific processing of pro ACTH/endorphin. *Trends Endocrinol. Metab.*, **1**:388-394.
- Mains, R.E. and Eipper, B.A., 1999. The Neuropeptides. In: *Basic Neurochemistry*, 363-382. (Siegel, G.J., Agranoff, B.W., Albers, R.W., *et al.*, eds.), Philadelphia, Lippincott-Raven.
- Malendowicz, L.K., Ziolkowska, A., Rucinski, M., 2012. Neuromedins U and S involvement in the regulation of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. *Front. Endocrinol.*, **3**:156.
- Melcher, C., Bader, R., Walther, S., Simakov, O., Pankratz, M.J., 2006. Neuromedin U and its putative *Drosophila* homolog hugin. *PLoS. Biol.*, **4**(3):e68.

- Meng, X., Wahlstrom, G., Immonen, T., Kolmer, M., Tirronen, M., Predel, R., Kalkkinen, N., Heino, T.I., Sariola, H., Roos, C., 2002. The *Drosophila hugin* gene codes for myostimulatory and ecdysis-modifying neuropeptides. *Mech. Dev.*, **117**:5-13.
- Mertens, I., Clinckspoor, I., Janssen, T., Nachman, R., Schoofs, L., 2006. FMRFamide related peptide ligands activate the *Caenorhabditis elegans* orphan GPCR Y59H11AL.1. *Peptides*, **27**:1291-1296.
- Minamino, N., Sudoh, T., Kangawa, K., Matsuo, H., 1985a. Neuromedins: novel smooth-muscle stimulating peptides identified in porcine spinal cord. *Peptides*, **6**:245-248.
- Minamino, N., Kangawa, K., Matsuo, H., 1985b. Neuromedin-U-8 and neuromedin-U-25 - novel uterus stimulating and hypertensive peptides identified in porcine spinal-cord. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **130**:1078-1085.
- Mori, K., Miyazato, M., Ida, T., Murakami, N., Serino, R., Ueta, Y., Kojima, M., Kangawa, K., 2005. Identification of neuromedin S and its possible role in the mammalian circadian oscillator system. *EMBO J.*, **24**: 325-335.
- Nawa, H., Hirose, T., Takashima, H., Inayama, S., Nakanishi, S., 1983. Nucleotide sequences of cloned cDNAs for two types of bovine brain substance P precursor. *Nature*, **306**: 32-36.
- Nelson, M.D., Fitch, D.H., 2011. Overlap extension PCR: an efficient method for transgene construction. *Methods Mol. Biol.*, **772**:459-470.
- Nigon, V., 1949. Les modalités de la reproduction et le déterminisme de sexe chez quelques Nématodes libres. *Ann. Sci. Nat. Zool.*, Ser. 11, **2**:1-132.
- O'Connor, T.M., O'Connell, J., O'Brien, D.I., Goode, T., Bredin, C.P., Shanahan, F., 2004. The role of substance P in inflammatory disease. *J. Cell. Physiol.*, **201**:167-180.
- Otsuka, M. and Yoshioka, K., 1993. Neurotransmitter functions of mammalian tachykinins. *Phys. Rev.*, **73**:229-308.
- Page, N.M., Bell, N.J., Gardiner, S.M., Manyonda, I.T., Brayley, K.J., Strange, P.G., Lowry, P.J., 2003. Characterization of the endokinins: human tachykinins with cardiovascular activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**(10):6245-50.
- Perez, D.M., 2005. From plants to man: the GPCR "tree of life". *Mol. Pharmacol.*, **67**:1383-1384.
- Pierce-Shimomura, J.T., Chen, B.L., Mun, J.J., Ho, R., Sarkis, R., McIntire, S.L., 2008. Genetic analysis of crawling and swimming locomotory patterns in *C. elegans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**(52):20982-20987.
- Raizen, D.M., Zimmerman, J.E., Maycock, M.H., Ta, U.D., You, Y., Sundaram, M.V., Pack, A.I., 2008. Lethargus is a *Caenorhabditis elegans* sleep-like state. *Nature*, **451**:569-572.
- Predel, R. and Wegener, C., 2006. Biology of the CAPA peptides in insects, *Cell Mol. Life Sci.*, **63**:2477-2490.
- Price, D.A., Greenberg, M.J., 1977a. Purification and characterization of a cardioexcitatory neuropeptide from the central ganglia of a bivalve mollusc. *Prep. Biochem.*, **7**:261-268.
- Price, D.A., Greenberg, M.J., 1977b. Structure of a molluscan cardioexcitatory neuropeptide. *Science*, **197**:670-671.
- Riddle, D.L., 1988. The dauer larva. In: *The nematode Caenorhabditis elegans* (ed. Wood, W.B.). pp 393-412. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Ritter, S.L. and Hall, R.A., 2009. Fine-tuning of GPCR activity by receptor-interacting proteins. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **10**:819-830.
- Roch, G. J., Busby, E. R., Sherwood, N. M., 2011. Evolution of GnRH: Diving Deeper. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **171**:1-16.
- Salio, C., Lossi, L., Ferrini, F., Merighi, A., 2006. Neuropeptides as synaptic transmitters. *Cell Tissue Res.*, **326**:583-598.
- Sanger, F., Nicklen S., Coulson A.R., 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**(12):5463-5467.

- Satake, H., Kwada, T., Nomoto, K., Minakata, H., 2003. Insight into tachykinin-related peptides, their receptors and invertebrate tachykinins: A review. *Zool. Sci.*, **30**:533-549.
- Schiöth, H.B. and Fredriksson, R., 2005. The GRAFS classification system of G-protein coupled receptors in comparative perspective. *Endocrinol.*, **142**:94-101.
- Schoofs, L., Holman, G.M., Hayes, T.K., Nachman, R.J., De Loof, A., 1990. Locustatachykinin I and II, two novel insect neuropeptides with homology to peptides of the vertebrate tachykinin family. *FEBS Lett.*, **261**(2):397-401.
- Schoofs, L., Vanden Broeck, J., De Loof, A., 1993. The myotropic peptides of *Locusta migratoria*: structures, distribution, functions and receptors. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, **23**(8):859-881.
- Schulte, G. and Bryja, V., 2007. The Frizzled family of unconventional G-protein-coupled receptors. *Trends Pharmacol. Sci.*, **28**:518-525.
- Severini, C., Improta, G., Falconieri-Erspamer, G., Salvadori, S., Erspaer, V., 2002. The tachykinin peptide family. *Pharmacol. Rev.*, **54**:285-322.
- Shimizu, Y., Matsuyama, H., Shiina, T., Takewaki, T., Furness, J.B., 2008. Tachykinins and their functions in the gastrointestinal tract. *Cell. Mol. Life Sci.*, **65**:295-311.
- Shimomura, O. and Johnson, F. H., 1970. Calcium binding, quantum yield, and emitting molecule in aequorin bioluminescence. *Nature*, **227**:1356-1357
- Shuman, S., 1991. Recombination mediated by Vaccinia Virus DNA Topoisomerase I in *Escherichia coli* is sequence specific. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**:10104-10108.
- Silver, M.R., Kawauchi, H., Nozaki, M., Sower, S.A., 2004. Cloning and analysis of the lamprey GnRH-III cDNA from eight species of lamprey representing the three families of Petromyzoniformes. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **139**:85-94.
- Sower, S.A., Freamat, M., Kavanaugh, S.I., 2009. The origins of the vertebrate hypothalamic-pituitary-gonadal (HPG) and hypothalamic-pituitary-thyroid (HPT) endocrine systems: new insights from lampreys. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **161**:20-29.
- Staubli, F., Jorgensen, T. J. D., Cazzamali, G., Williamson, M., Lenz, C., Sondergaard, L., Roepstorff, P., Grimmelhuijzen, C. J., 2002. Molecular identification of the insect adipokinetic hormone receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**:3446-3451.
- Strand, F.L., 1999. *Neuropeptides*. MIT Press, Cambridge, MA.
- Sulston, J.E. and Horvitz, H.R., 1977. Post-embryonic cell lineages of the nematode, *Caenorhabditis elegans*. *Dev. Biol.*, **56**:110-56.
- Sulston, J.E., Schierenberg, E., White, J.G., Thomson, J.N., 1983. The embryonic cell lineage of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Dev. Biol.*, **100**:64-119.
- Sulston, J., Hodgkin, J., 1988 Methods. In: *The Nematode Caenorhabditis elegans* (ed. Wood, W.B.). pp 587-606, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Tatemoto, K., Lundberg, J.M., Jornvall, H., Mutt, V., 1985. Neuropeptide K: isolation, structure and biological activities of a novel brain tachykinin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **128**:947-953.
- The *C. elegans* Sequencing Consortium, 1998. Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology. *Science*, **282**:2012-2018.
- Tsai, P. S. and Zhang, L., 2008. The emergence and loss of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) in protostomes: Orthology, phylogeny, structure, and function. *Biol. Reprod.*, **79**:798-805.
- Van Loy, T., Vandersmissen, H.P., Poels, J., Van Hiel, M.B., Verlinden, H., Vanden Broeck, J., 2009. Tachykinin-related peptides and their receptors in invertebrates: A current view. *Peptides*, **31**:520-524.
- Verleyen, P., Clynen, E., Huybrechts, J., Van Lommel, A., Vanden Bosch, L., De Loof, A., Zdarek, J., Schoofs, L., 2004. Fraenkel's pupariation factor identified at last. *Dev. Biol.*, **273**(1):38-47.
- von Euler, U.S. and Gaddum, J.H., 1931. An unidentified depressor substance in certain tissue extracts. *J. Physiol.*, **74**-87.

- Ward, S. and Carrel, J.S., 1979. Fertilization and sperm competition in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Developmental Biology*, **73**:304-321.
- Wadsworth, W.G. and Riddle, D.L., 1989. Developmental regulation of energy metabolism in *Caenorhabditis elegans*. *Dev. Biol.*, **132**:167-173.
- Watson, N., Linder, M.E., Druey, K.M., Kehrl, J.H., Blumer, K.J., 1996. RGS family members: GTPase-activating proteins for heterotrimeric G-protein alpha- subunits. *Nature*, **383**:172-175.
- White, J.G., Southgate, E., Thomson, J.N., Brenner, S., 1986. The structure of the nervous system of the nematode *C. elegans*. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, **314**:1-340.
- White, J., 1988. The Anatomy. In: *The nematode Caenorhabditis elegans* (ed. Wood, W.B.) pp 81-122. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Winther, A.M.E., Acebes, A., Ferrús, A., 2006. Tachykinin-related peptides modulate odor perception and locomotor activity in *Drosophila*. *Mol. Cell. Neurosci.*, **31**:399-406.
- Winther, A.M.E., Ignell, R., 2010. Local peptidergic signaling in the antennal lobe shapes olfactory behavior.
- Wood, W.B., 1988. *The nematode Caenorhabditis elegans*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Wray, S., 2002. Development of gonadotropin-releasing hormone-1 neurons. *Front. Neuroendocrinol.*, **23**:292-316.
- Zhang, L., Tello, J. A., Zhang, W., Tsai, P. S., 2008. Molecular cloning, expression pattern, and immunocytochemical localization of a gonadotropin-releasing hormone-like molecule in the gastropod mollusk, *Aplysia californica*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **156**:201-209.



## **IX. ADDENDUM**

### **1. Risicoanalyse**

Er werd in deze studie gebruik gemaakt van de nematode *Caenorhabditis elegans*. Dit organisme is niet pathogeen voor mensen, dieren en planten. Het is bovendien niet schadelijk voor het leefmilieu of met een verwaarloosbaar risico voor de mens en het leefmilieu op laboratoriumschaal. *C. elegans* behoort daarmee tot risicoklasse 1, net zoals *E. coli* OP50, dat gebruikt wordt als voedingsbron voor deze worm. Er wordt daarom steeds gewerkt volgens de algemene werkvoorschriften die gelden in een laboratorium met inperkingsniveau L1. Daarnaast worden ook de regels van de code voor goede microbiologische praktijk nageleefd. Dit houdt ondermeer in dat er steeds een labjas en handschoenen worden gedragen. Verder zijn eten, drinken, roken, aanbrengen van cosmetica en de opslag van eet- en drinkwaren in het laboratorium verboden. De handen worden gewassen en indien nodig ontsmet (alcohol) voordat het laboratorium wordt verlaten.

Verder wordt er op een veilige manier gewerkt door met een mechanische pipet te pipetteren, opletend te zijn bij het gebruik van de autoclaaf, ervoor te zorgen dat centrifuges in evenwicht staan en correct worden afgesloten en dergelijke meer.

Risicohoudend biologisch afval wordt steeds correct ingezameld in een kartonnen Cordi-does. Scherpe voorwerpen, zoals naalden en mesjes, worden in een naaldcontainer afgevoerd. Vloeibaar afval wordt in een afvalbus gedeponeerd.

Voor het visualiseren van DNA banden na gelelektroforese, wordt er GelRed in DMSO toegevoegd aan de agarose. GelRed wordt ervan verdacht genetische schade te kunnen veroorzaken en behoort daarmee tot afvalcategorie 5: bijzondere afvalvloeistoffen. Daarom wordt er aangeraden voorzichtig om te springen met deze kleurstof. De zone waarbinnen er gewerkt wordt met GelRed wordt afgebakend en de werktabletten worden er bekleed met absorberend papier. Vervuild papier moet als chemisch afval worden afgevoerd. Huidcontact dient te allen tijde vermeden te worden door het dragen van handschoenen, die steeds in het correcte afvalrecipiënt worden gedeponeerd bij het buitengaan van het gecontamineerde lokaal. De afgebakende zone bevat eveneens eigen labomateriaal dat de zone niet meer verlaat. De GelRed bevattende gels worden ingezameld in een plasticen PE-vat. De gebruikte buffers zijn chemisch afval (categorie 5) en dienen apart te worden ingezameld in een afvalbus voor vloeibaar chemisch afval. Gebruikte handschoenen worden afgevoerd als risicohoudend biologisch afval in een PE-vat of een Cordi-does. Bij het bekijken van de gels boven een UV-lamp, dient blootstelling van de ogen en de huid vermeden te worden door het dragen van een labjas en een speciale veiligheidsbril.

De lokalen waar er gewerkt wordt met recombinante cellijnen (CHO en HEK cellen), zijn laboratoria met inperkingsniveau L2. Hier gelden extra veiligheidsmaatregelen,

zoals het dragen van een labogas die het lokaal niet verlaat. 's Avonds en 's nachts wordt deze ruimte ontsmet met UV-licht. Zoals eerder vermeld is dit schadelijk voor de huid en de ogen en dienen deze UV-lampen te worden uitgeschakeld als er iemand aanwezig is in het lokaal.

Een laminaire flowkast beschermt niet alleen het experiment, maar ook de onderzoeker en dient daarom op de correcte manier te worden gebruikt. Het werkblad en de benodigde materialen worden zowel voor als na gebruik ontsmet met 70% ethanol.

Ook het werken met een bunsenbrander moet steeds met volle aandacht gebeuren. Erg belangrijk hierbij is dat brandbare stoffen, zoals ethanol, uit de buurt van de vlam worden gehouden.

## 2. Synthetische peptiden gebruikt voor het ontwezen van *C. elegans* GPCRs

**Tabel a** Lijst met kandidaat-liganden voor de *C. elegans* GnRH-achtige receptoren. p staat voor pyroglutamaat.

naam	aminozuursequentie
<i>Anopheles gambiae</i> ACP	pQVTFSRDWNA-NH <sub>2</sub>
<i>Caenorhabditis elegans</i> F11D11.3	TFQVSSTN-NH <sub>2</sub>
<i>Caenorhabditis elegans</i> F35D2.1	DMNFAVPSW-NH <sub>2</sub>
<i>Caenorhabditis elegans</i> H19M22.3a	pQVKFSRWN
<i>Caenorhabditis elegans</i> H19M22.3b	pQALFFQVKFSRWN
<i>Caenorhabditis elegans</i> nlp-25a1	pQWGGGWNN-NH <sub>2</sub>
<i>Caenorhabditis elegans</i> nlp-25a2	pQWGGGWNNGGGYGNPYGGY-NH <sub>2</sub>
<i>Drosophila melanogaster</i> AKH	pQLTFSPDW-NH <sub>2</sub>
<i>Drosophila melanogaster</i> CRZ	pQTFQYSRGWTN-NH <sub>2</sub>
<i>Locusta migratoria</i> AKH-II	pQLNFSAGW-NH <sub>2</sub>
<i>Nasonia vitripennis</i> ACP	pQVTFSKGGWGP-NH <sub>2</sub>
<i>Rhodnius prolixus</i> AKH	pQLTFSTDW-NH <sub>2</sub>
<i>Schistocerca gregaria</i> AKH-II	pQLNFSTGW-NH <sub>2</sub>
<i>Spirochaeta americana</i> CRZ	pQTFQYSHGWTN-NH <sub>2</sub>
<i>Tribolium castaneum</i> AKH-II	pQLNFTPNW-NH <sub>2</sub>

**Tabel b** Bibliotheek van synthetische *C. elegans* peptiden. p staat voor pyroglutamaat.

naam	aminozuursequentie
nlp-1a	MDANAFRMSF-NH <sub>2</sub>
nlp-1b	MDPNAFRMSF-NH <sub>2</sub>
nlp-1c	VNLDPNSFRMSF-NH <sub>2</sub>
nlp-2a	SIALGRSGFRP-NH <sub>2</sub>
nlp-2b	SMAMGRLGLRP-NH <sub>2</sub>
nlp-2c	SMAYGRQGFRP-NH <sub>2</sub>
nlp-3a	AINPFLDSM-NH <sub>2</sub>
nlp-3b	AVNPFLDSI-NH <sub>2</sub>
nlp-3c	YFDSLQAGQSL-NH <sub>2</sub>
nlp-4a	SLILFVILLVAFAAARPVSEEVDVDR
nlp-4b	DYDPRTEAPRRLPADDDEVDGEDRV
nlp-4c	DYDPRTDAPIRVPVDPEAEGEDRV
nlp-5a	SVSQLNQYAGFDLGGMGL-NH <sub>2</sub>
nlp-5b	ALSFDSLGGMGL-NH <sub>2</sub>
nlp-5c	ALQHFSSLDLGGMGF-NH <sub>2</sub>
nlp-6a	APKQMVFGF-NH <sub>2</sub>
nlp-6b	YKPRSFAMGF-NH <sub>2</sub>
nlp-6c	AAMRSFNMGF-NH <sub>2</sub>
nlp-6d	LIMGL-NH <sub>2</sub>
nlp-6e	MAAPKQMVFGF-NH <sub>2</sub>
nlp-7a	QADFDDPRMFTSSF-NH <sub>2</sub>
nlp-7b	SMDDLDDPRLMTMSF-NH <sub>2</sub>

---

nlp-7c	MILPSLADLHRYTMYD
nlp-7d	LYLKQADFDDPRMFTSSF-NH <sub>2</sub>
nlp-8a	AFDRFDNSGVFSFGA
nlp-8b	AFDRMDNSDFFGA
nlp-8c	SFDRMGGTEFGLM
nlp-8d	YPYLIFPASPSSGDSRRLV
nlp-9a	GGARAFYGFYNAGNS
nlp-9b	GGGRAFNHNANLFRFD
nlp-9c	GGGRAFAGSWSPYLE
nlp-9d	TPIAEAQQAPEDVDDRRELE
nlp-10a	AIPFNGGMY-NH <sub>2</sub>
nlp-10b	STMPFSGGMY-NH <sub>2</sub>
nlp-10c	AAIPFSGGMY-NH <sub>2</sub>
nlp-10d	GAMPFSGGMY-NH <sub>2</sub>
nlp-11a	HISPSYDVEIDAGNMRNLLDI-NH <sub>2</sub>
nlp-11b	SAPMASDYGNQFQMYNRLIDA-NH <sub>2</sub>
nlp-11c	SPAISPAYQFENAFGLSEALERA-NH <sub>2</sub>
nlp-12a	DYRPLQF-NH <sub>2</sub>
nlp-12b	DGYRPLQF-NH <sub>2</sub>
nlp-13a	NDFSRDIMSF-NH <sub>2</sub>
nlp-13b	SGNTADLYDRRIMAF-NH <sub>2</sub>
nlp-13c	pPSYDRDIMSF-NH <sub>2</sub>
nlp-13d	SAPSDFSRDIMSF-NH <sub>2</sub>
nlp-13e	SSSMYDRDIMSF-NH <sub>2</sub>
nlp-13f	SPVDYDRPIMAF-NH <sub>2</sub>
nlp-13g	AEDYERQIMAF-NH <sub>2</sub>
nlp-14a	ALDGLDGSFGFD
nlp-14b	ALNSLDGAGFGFE
nlp-14c	ALDGLDGSFGFD
nlp-14d	ALNSLDGQGFGE
nlp-14e	ALNSLDGNGFGFD
nlp-15a	AFDSLGSFGDNGFN
nlp-15b	AFDSLGSFGAFN
nlp-15c	AFDSLGSFGSFGD
nlp-15d	AFDSLGSFGFTGFE
nlp-15e	AFDTVSTSGFDDFKL
nlp-16a	STEHHRV
nlp-16b	SEGHPHE
nlp-16c	ATHSPEGHIVAKDDHHGHE
nlp-16d	SSDSHHGHQ
nlp-16e	SVDEHHGHQ
nlp-16f	NAEDHHEHQ
nlp-16g	SEHVEHQAEMHEHQ
nlp-16h	STQEVSGHPEHHLV
nlp-17a	GSLSNMMRI-NH <sub>2</sub>
nlp-17b	pQFYVQFPNEGVPCECNLGLMRI-NH <sub>2</sub>
nlp-18a	SPYRAFAFA

---

---

nlp-18b	ARYGFA
nlp-18c	SPYRTFAFA
nlp-18d	ASPYGFAFA
nlp-18e	SDEENLDFLE
nlp-19a	IAGLRLPNFL
nlp-19b	IGLRLPNML
nlp-19c	MGMRLPNIFL
nlp-20a	FAFAFA
nlp-20b	SGPQAHEGAGMRFAFA
nlp-20c	APKEFARFARASFA
nlp-21a	GGARAMLH
nlp-21b	GGARAFSADVGDDY
nlp-21c	GGARAFYDE
nlp-21d	GGARAFSTEM
nlp-21e	GGARVFQGFED
nlp-21f	GGARAFMMD
nlp-21g	GGGRAFGDMM
nlp-21h	GGARAFVENS
nlp-21i	GGGRSFPVKPGRLLD
nlp-21j	pYTSELEED
nlp-22	SIAIGRAGFRP-NH <sub>2</sub>
nlp-23a	LYISRQGFRPA
nlp-23b	SMAIGRAGMRP-NH <sub>2</sub>
nlp-23c	AFAAGWNR-NH <sub>2</sub>
nlp-24a	pWGGGPYGGYGP
nlp-24b	YGGGYGG-NH <sub>2</sub>
nlp-24c	YGGY-NH <sub>2</sub>
nlp-24d	FTGPYGGY-NH <sub>2</sub>
nlp-24e	GPYGY-NH <sub>2</sub>
nlp-24f	GPYGGGLVGALL-NH <sub>2</sub>
nlp-25a	pWGGGYGNPYGGY-NH <sub>2</sub>
nlp-25b	GGGYGGYGGGFGAQQAYNVQNA
nlp-26a	pFGFGGQQSFG-NH <sub>2</sub>
nlp-26b	GGQFGGMQ
nlp-26c	GGFNGN
nlp-26d	GGFGQQSQFG-NH <sub>2</sub>
nlp-26e	GGNQFG-NH <sub>2</sub>
nlp-26f	GGSQFN-NH <sub>2</sub>
nlp-26g	GGFGF-NH <sub>2</sub>
nlp-27a	pWGYGGMPYGGYGGMGGYGMGGYGMGY
nlp-27b	MWGSPYGGYGGYGGYGGW-NH <sub>2</sub>
nlp-28a	pWGYGGY-NH <sub>2</sub>
nlp-28b	YGGGYGGY-NH <sub>2</sub>
nlp-28c	GMYGGY-NH <sub>2</sub>
nlp-28d	GMYGGW-NH <sub>2</sub>
nlp-30c	YGGGY-NH <sub>2</sub>
nlp-30d	GMW-NH <sub>2</sub>

---

---

nlp-30e	PYGGYGW-NH <sub>2</sub>
nlp-32a	YGGWG-NH <sub>2</sub>
nlp-32b	GGW-NH <sub>2</sub>
nlp-32c	GG-NH <sub>2</sub>
nlp-32d	GYG-NH <sub>2</sub>
nlp-32e	GGGWG-NH <sub>2</sub>
nlp-32f	GGGW-NH <sub>2</sub>
nlp-32g	GGG-NH <sub>2</sub>
nlp-32h	FGYGG-NH <sub>2</sub>
nlp-32i	GW-NH <sub>2</sub>
nlp-33a	QWGYGGPYGGYGGGYGGGPWGYGGGW
nlp-33b	HWGGYGGGPWGGYGGGPWGGYY
nlp-33c	RHWGGYGGGPWGGYGGGPWGGYY
nlp-34a	PYGYGGYGGW
nlp-34b	PYGYGW-NH <sub>2</sub>
nlp-35	AVVSGYDNIYQVLAPRF
nlp-36a	DDDVTLERWGY
nlp-36b	NIDMKLGPH
nlp-36c	SMVARQIPQTVVADH
nlp-37	NNAEVVNHILKNFGALDRLGDV-NH <sub>2</sub>
nlp-38a	VLGWNKAHGLW-NH <sub>2</sub>
nlp-38b	TPQNWKNLNSLW-NH <sub>2</sub>
nlp-38c	SPAQWQRANGLW-NH <sub>2</sub>
nlp-38d	ASDDRVLGWNKAHGLW-NH <sub>2</sub>
nlp-39	EVPNFQADNVPEAGGRV
nlp-40a	APSAPAGLEEKL
nlp-40b	MVAWQPM
nlp-40c	pPAADTFLGFVPQ
nlp-40d	APSAPAGLEEKLR
nlp-41	APGLFELPSRSV
nlp-42a	SALLQPENNPEWNQLGWAW-NH <sub>2</sub>
nlp-42b	NPDWQDLGFAW-NH <sub>2</sub>
nlp-43	KQFYAWA-NH <sub>2</sub>
nlp-44a	APHPSSALLVPYPRV-NH <sub>2</sub>
nlp-44b	LYMARV-NH <sub>2</sub>
nlp-44c	AFFYTPRI-NH <sub>2</sub>
nlp-45	RNLLVGRYGFRI-NH <sub>2</sub>
nlp-46	NIAIGRGDGLRP-NH <sub>2</sub>
nlp-47	pMTFTDQWT
flp-1a	SADPNFLRF-NH <sub>2</sub>
flp-1b	SQPNFLRF-NH <sub>2</sub>
flp-1c	ASGDPNFLRF-NH <sub>2</sub>
flp-1d	SDPNFLRF-NH <sub>2</sub>
flp-1e	AAADPNFLRF-NH <sub>2</sub>
flp-1f	KPNFLRF-NH <sub>2</sub>
flp-1g	AGSDPNFLRF-NH <sub>2</sub>
flp-1h	PNFMRY-NH <sub>2</sub>

---

---

flp-1i	KPNFMRY-NH <sub>2</sub>
flp-1j	PNFLRF-NH <sub>2</sub>
flp-2a	SPREPIRF-NH <sub>2</sub>
flp-2b	LRGEPIRF-NH <sub>2</sub>
flp-3a	SPLGTMRF-NH <sub>2</sub>
flp-3b	TPLGTMRF-NH <sub>2</sub>
flp-3c	EAEELGTMRF-NH <sub>2</sub>
flp-3d	NPLGTMRF-NH <sub>2</sub>
flp-3e	ASEDALFGTMRF-NH <sub>2</sub>
flp-3f	EDGNAPFGTMRF-NH <sub>2</sub>
flp-3g	SAEPFGTMRF-NH <sub>2</sub>
flp-3h	SADDAPFGTMRF-NH <sub>2</sub>
flp-3i	NPENDTPFGTMRF-NH <sub>2</sub>
flp-4a	PTFIRF-NH <sub>2</sub>
flp-4b	ASPSFIRF-NH <sub>2</sub>
flp-5a	GAKFIRF-NH <sub>2</sub>
flp-5b	AGAKFIRF-NH <sub>2</sub>
flp-5c	APKPKFIRF-NH <sub>2</sub>
flp-6a	KSAYMRF-NH <sub>2</sub>
flp-6b	SAYMRF-NH <sub>2</sub>
flp-6c	pQDSEVEREMM
flp-7a	SPMQRSSMVRF-NH <sub>2</sub>
flp-7b	TPMQRSSMVRF-NH <sub>2</sub>
flp-7c	SPMERSAMVRF-NH <sub>2</sub>
flp-7d	SPMDRSKMVRF-NH <sub>2</sub>
flp-8	KNEFIRF-NH <sub>2</sub>
flp-9	KPSFVRF-NH <sub>2</sub>
flp-10a	QPKARSGYIRF-NH <sub>2</sub>
flp-10b	pPKARSGYIRF-NH <sub>2</sub>
flp-11a	AMRNALVRF-NH <sub>2</sub>
flp-11b	ASGGMRNALVRF-NH <sub>2</sub>
flp-11c	NGAPQPFVRF-NH <sub>2</sub>
flp-11d	SPLDEEDFAPESPLQ-NH <sub>2</sub>
flp-12	RNKFEFIRF-NH <sub>2</sub>
flp-13a	AMDSPLIRF-NH <sub>2</sub>
flp-13b	AADGAPLIRF-NH <sub>2</sub>
flp-13c	APEASPLIRF-NH <sub>2</sub>
flp-13d	ASPSAPLIRF-NH <sub>2</sub>
flp-13e	SPSAVPLIRF-NH <sub>2</sub>
flp-13f	ASSAPLIRF-NH <sub>2</sub>
flp-13g	SAAAPLIRF-NH <sub>2</sub>
flp-14	KHEYLRF-NH <sub>2</sub>
flp-15a	GGPQGPLRF-NH <sub>2</sub>
flp-15b	RGPSGPLRF-NH <sub>2</sub>
flp-16a	AQTFVRF-NH <sub>2</sub>
flp-16b	GQTFVRF-NH <sub>2</sub>
flp-17a	KSAFVRF-NH <sub>2</sub>

---

---

flp-17b	KSQYIRF-NH <sub>2</sub>
flp-18a	GAMPGVLRN-NH <sub>2</sub>
flp-18b	EMPGVLRN-NH <sub>2</sub>
flp-18c	SVPGVLRN-NH <sub>2</sub>
flp-18d	EIPGVLRN-NH <sub>2</sub>
flp-18e	SEVPGVLRN-NH <sub>2</sub>
flp-18f	DVPGVLRN-NH <sub>2</sub>
flp-18g	DFDGAMPGVLRN-NH <sub>2</sub>
flp-18h	SYFDEKKSVPGVLRN-NH <sub>2</sub>
flp-19a	WANQVRF-NH <sub>2</sub>
flp-19b	ASWASSVRF-NH <sub>2</sub>
flp-20	AMMRF-NH <sub>2</sub>
flp-21	GLGPRPLRN-NH <sub>2</sub>
flp-22	SPSAKWMRF-NH <sub>2</sub>
flp-23a	VVGQQDFLRN-NH <sub>2</sub>
flp-23b	TKFQDFLRN-NH <sub>2</sub>
flp-24	VPSAGDMMVRF-NH <sub>2</sub>
flp-25a	DYDFVRF-NH <sub>2</sub>
flp-25b	ASYDYIRF-NH <sub>2</sub>
flp-26a	FNADDLTLRN-NH <sub>2</sub>
flp-26b	GGAGEPLAFSPDMLSLRN-NH <sub>2</sub>
flp-26c	FRLPFQFFGANEDFNGLT
flp-26d	NYYESKPY
flp-26e	EFNADDLTLRN-NH <sub>2</sub>
flp-27a	GLGGRMRF-NH <sub>2</sub>
flp-27b	pPIDEERPIFME
flp-27c	EASAFGDIIGELKKGKGLGGRMRF-NH <sub>2</sub>
flp-28	APNRVLMRF-NH <sub>2</sub>
flp-32	AMRNSLVRF-NH <sub>2</sub>
flp-33	APLEGFEDMSGFLRTIDGIQKPRF-NH <sub>2</sub>
flp-34	ALNRDSLVASLNNAERLRN-NH <sub>2</sub>
pdf-1a	SNAELINGLIGMDLGKLSAV-NH <sub>2</sub>
pdf-1b	SNAELINGLLSMNLNKLSGA-NH <sub>2</sub>
Cae-1	APKQMVFGF-NH <sub>2</sub>
Cae-2	EIVFHQISPIFFRF-NH <sub>2</sub>
Cae-3	SLLDYRF-NH <sub>2</sub>
Cae-4	PALLSRY-NH <sub>2</sub>
Cae-5	AVLPRY-NH <sub>2</sub>
Cae-6	APGLFELPSRSVRLI
Cae-7	SLENFWRNIHLQMPS-NH <sub>2</sub>
Cae-8	TEGLSRASANAYYRL-NH <sub>2</sub>
Cae-9	GDVKSVEFFSPFRMV-NH <sub>2</sub>
Cae-10	WADGTEDSNIDQLMSRVYRTVLLKS
Cae-11	SPSMGLSLAEYMASPQGGDNFHFMPN-NH <sub>2</sub>
Cae-12	ADISTFASAINNAGRRLRY-NH <sub>2</sub>
Cae-13	ALNRDSLVASLNNAERLRN-NH <sub>2</sub>
Cae-14	GAAWFLRPNWKPPT

---

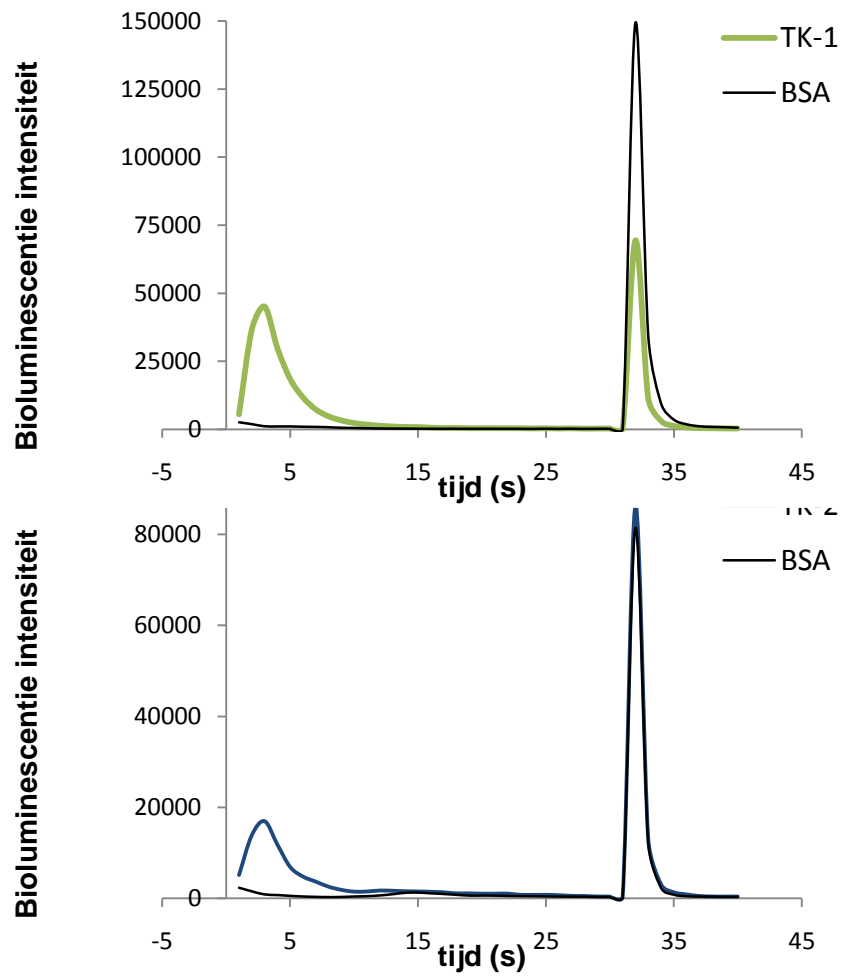


---

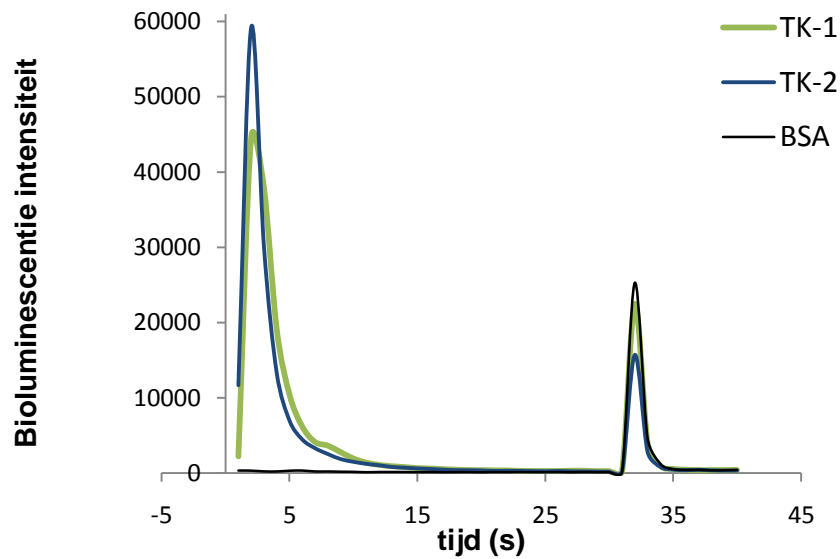
Cae-15	SQTQEANIQPFIRF
Cae-16	EASAFGDIIGELKGKGLGGRMRF-NH <sub>2</sub>
Cae-17	SPLLYRAPQMYDDVQFV
Cae-18	SPLLYRAPQYQMYDDVQFV

---

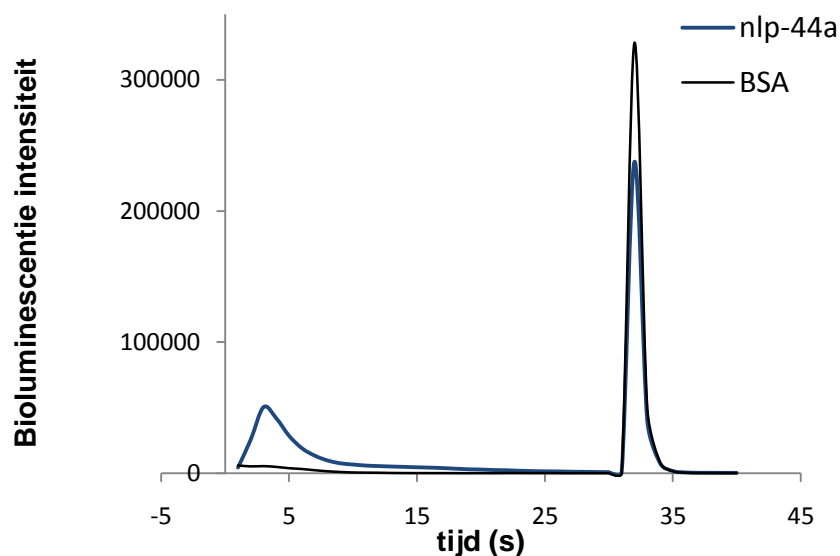
### 3. Figuren



**Figuur a** Bioluminescentie toename geïnduceerd door TK-1 en TK-2 in CE16937 CHO-WTA11 expresserende cellen bij 37°C in functie van de tijd (aequorine bioluminescentie screening). Na 30 seconden wordt Triton X-100 (0,1%) toegevoegd als positieve controle. BSA, de negatieve controle, geeft zoals verwacht geen luminescentie piek.



**Figuur b** Bioluminescentie toename geïnduceerd door TK-1 en TK-2 in CE16937 CHO-PAM28 expresserende cellen bij 37°C in functie van de tijd (aequorine bioluminescentie screening). Na 30 seconden wordt Triton X-100 (0,1%) toegevoegd als positieve controle. BSA, de negatieve controle, geeft zoals verwacht geen luminescentie piek.



**Figuur c** Bioluminescentie toename geïnduceerd door nlp-44a in NMUR-1 CHO-WTA11 expresserende cellen bij 37°C in functie van de tijd (aequorine bioluminescentie screening). Na 30 seconden wordt Triton X-100 (0,1%) toegevoegd als positieve controle. BSA, de negatieve controle, geeft zoals verwacht geen luminescentie piek.

ATGACAACGTGTCCCCTACCACCCAGTTTAGACGAAATGGATCTGCGATTAGCTGCCGATAAAgtgagttttaaggaag  
 gctgttaatgaacagcaaaagcagaattagttttacgagaaaatgaaacagtgaaaatttgagaaaaatattcgagttt  
 ttaagttaattagaaattttaaaaaaccatactcaaaatcctctagagtattgtgtggacatgtgacaatttcatgc  
 caatagaggaaaccgatattattttttactagttgggtactagttgggtattttaagggaggttaacttaattgtaaaaaa  
 aaagtttctcaaaaacttttagattttctacctttatacctataagaatctagacttttcagttttaagaaaat  
 aattttgaaatccactataataatccattttgttggcttccacatagatttttgctatcttttgtaattccaaaaactt  
 caaatgtactcaatttcccaatttccggttcttttggcttactcaccacaaattcaaaaataaacgttttgtagtaaat  
 ttgtgaattatcaggagcactggaatattcagggattagattcaggatgatcaatttataattataagtgttttgaaa  
 cagaaaatataatgtcactgtagttttatgatggaacagctaaataatgagaactaacacattaaataaactctg  
 caacagacgaatataaattgttttaaaattaatattgcctaggacttccaaggtatacctacctaccttatgctgtcta  
 ggtgcatacgttttgctttttatggcgaaatgtgggtgcttgagccctcacagccgatttcagtaaaactgtaaaaaa  
 ttaacaattacttttagtaagccgcttgaagaatcatgagtaagccgcttgaaggcaggcattttatattgagagcagc  
 ttataagcttcattagaaatctgaaactaatcaatatttcagGTTCTAAACGGTTCACTGATCAACTGTACATTTCCAATCG  
 TTTTACGATCAAAATGTATCAAACACACGGAGTATACTTTCATATTTGAACCAACTCCGTTTCGTTTCATCCAATGTTTACA  
 GATTTTCTATGGAATCCTGTTCACACTAACAAATATTTCTGGCGTTAATGGGCAATTTTACAGTGATGTGgtaagtgaat  
 aaagtgaaaaaatgacaaagtctgtttcaacatgttaataagtccacgattacttgtgatgacactggatacctaaactt  
 aggaaatattcgcttttttggctcaaaaaattttaaaagatttaaaattaattctcagGATAATCCTGTACCACCGTCAA  
 ATGCGAAGCGTCACAAATTAATCTGTTCAACTTGGCAGTGGCGGATGCCTCGATTTCAGTGTTCACACGGGATTCTC  
 ATGGTCTTATAATTATTATTATGTTTGGAAgtgagttgttttaatgtagaagagaataacgaaacgaaattggcttcgtg  
 ctaaaagttgaaactgaagttgtagcgttgaacatacttttttggttgaggagtttctaaaaaagttgttctattaa  
 aagtgattaatcaatttttatggctcagtttctaataagaatttctaataacgtatgaagaaagtttgagaatatttatgtg  
 tgatttctctgacatgccacactcctacagtaatcctgcccagattgttttaatttttgagcattattttcggaataattgt  
 gacgtggaattaaggttcataacttttgaataaaaaacgaaattggaacaaatgagctatgtaggcttctcgttgggagc  
 tcattgattttagaacaaaaggttttgatttaatgctaactgtaagaaacgaaataaaaacaggagcatttaaaaaatctc  
 ctaaaaaacttataatctgcaattataatttagATTCCGGAAGCTTTTACTGTGCAATAAACAAATTTGATGGGAATAACTC  
 CGATTTGTGCAAGTGTATTCAAAATGATTGTTCATGAGCATTGAAAGgtataactttgatatttttaaggctcaaaatcata  
 catataaaaaattccagATATTATGCCATAATCCATCCATTGAAAAAGCGTCCAGGACGACGATCAACTGTTACCATCATC  
 ATAATGATTTGGTTTCATGGCATTTTTGTTCGGGGTTCCAGCATTCTTGCGTCAAAGgtatgagcttttctccgagcata  
 taacttcaaaaattgaaatatttttagGTTGATGTCTATTACTTCTACGATGGTTACACATTATACGAGAATCCACTGTGCC  
 TTGCAGACAATTATCCCGTGGAAATGAATCACTACTTGGACAGGTgtaagttcagatgacctcacaaaattaatttttt  
 tggcaatctggcattttgaaagttaaattaatattataatttccagATACAACAACGGACTGATAACTGTTCAATACATT  
 CTTCCACTATGCATTTTATCAGCTGCTTATTATCGAGTTGGTGTGAGCTGAGAAAAGgttagtaattttctaatacaaaaa  
 atcaacaacctaataatattcagGATAAAACCGTCCGTGACGTGAGACATGCAAAAATCAGTGGCCGCAAAGAAGAAGCG  
 TCAATCATGTTGGCAGTGGTGTGTTTTCATTTTCATGATTGTCTGGTTCCCATACAATGCCTACTATCTCACATTGCATTT  
 AGTTGAGCCAATTGGGAATAAAAATGTTGAGTCTGTACATTTATATCAACATCTATTGGTTGGGAATGTCGTCAACTGTCT  
 TCAATCCTGTCTATCTATTATTTATGAACAAACGgtacgttctattcggttttcagtttaatttttaaagggagttgctt  
 ttttttgagaactaaaaaatacgaattttacttttcaaaaaattttctattgtaaatgtggaattttttcggaaa  
 ttttgcgattttttgccccaaaaatcgggtacctggtctcggcagcagcaaatgtgttttaatatgtgggtgtgcgccttta  
 aagagtactgtagtttcagacttttggctctaaaaacaattttcatcgatttttgcatttatcgataaaaaaagcattt  
 atttacttaaaaaaacttagaaagctataatttttaaataatcgcgcgaaaacccaagaaaaaccggtaaaaaattccgaa  
 aattcaaaagtttgaaactacgtacccctaaaggtgcaccttcttattgcatthaacactaacttgtcgtgtcgagac  
 cgggcaccgtaattttggcgcaaaaactcgcaagattctgctgcttggtaataattctcagcggcactaaatttcatgatcg  
 gagagagattttgcggaactcgtacataattttgatgaaaaccagctgaaaatgacttttctaagcatgggggaaatgt  
 taaaaaatcttaattttatttccaagcgaactccaattttttccagATTCCGTGTCGGATTCCATCACGCATTCGGTT  
 GGCTTCCATTCGTTTCGTTCCGATAAAGATGAATATCAAACAATTTCTTTACAGACACGTCCATCTCTGATGCCACCACA  
 ACGATGGCGCATACGGATTTCTGA

**Figuur d** De sequentie van het C49A9.7 gen dat codeert voor een tachykinine-achtige receptor (CE16937). De introns worden aangeduid met kleine letters, de exons met hoofdletters. Het ok1620 allel bevat een gedeeltelijke deletie van exons drie en vijf en een volledige deletie van exon 4. De regio van de deletie wordt in het rood weergegeven.

**AFDELING DIERENFYSIOLOGIE EN NEUROBIOLOGIE**

Naamsestraat 59 bus 2465  
3000 LEUVEN, BELGIË  
tel. + 32 16 32 42 60  
fax + 32 16 32 39 02

