



乙酰胆碱门控氯离子通道受体突变 影响秀丽线虫运动学和运动状态转换*

玛伊拜尔·普拉提¹⁾ 熊荣康²⁾ 霍菁^{1,3,4)**} 温泉^{1,2,3)**}

(¹⁾ 中国科学技术大学生命科学与医学部, 合肥 230026; (²⁾ 中国科学技术大学大数据学院, 合肥 230026;

(³⁾ 中国科学技术大学集成影像中心, 合肥微尺度物质科学国家研究中心, 合肥 230026; (⁴⁾ 潍坊医学院基础医学院, 潍坊 261054)

摘要 **目的** 乙酰胆碱作为一种高度保守的神经递质, 在动物的运动行为调控中起着至关重要的作用。乙酰胆碱信号转导异常可导致多种运动功能障碍。然而, 乙酰胆碱在运动行为中的抑制性调控机制尚未完全清楚。本文以秀丽隐杆线虫为研究对象, 探究乙酰胆碱门控氯离子通道受体亚基 (ACC-1、ACC-2、ACC-3、ACC-4) 在运动行为中的调控作用。**方法** 通过将运动追踪、分子遗传学和光遗传学技术相结合, 对乙酰胆碱门控氯离子通道受体亚基突变线虫的运动进行分析。**结果** 研究发现, 这些亚基突变会影响线虫前进、后退和转向运动的运动学特征, 并且前进过程中线虫身体弯曲幅度也发生了变化。在这些突变线虫的后退过程中光激活 RIB 中间神经元会导致后退运动延迟终止。**结论** 这些结果提示, 乙酰胆碱门控氯离子通道亚基的调控作用对于维持和调节秀丽隐杆线虫运动状态是必需的。同时, 这些亚基可能参与介导 RIB 中间神经元在秀丽隐杆线虫后退运动中的抑制性调控。本研究为理解乙酰胆碱门控抑制性受体在运动行为中的调控机制提供了新的思路。

关键词 秀丽隐杆线虫, 乙酰胆碱门控氯离子通道受体, 运动追踪, 运动状态调控

中图分类号 Q189

DOI: 10.16476/j.pibb.2023.0146

运动是动物在环境中移动位置、觅食和逃避掠食者等复杂行为产生的基础。乙酰胆碱作为一种重要的神经递质, 通过作用于不同类型的受体对动物行为起着广泛的调控作用^[1]。在脊椎动物中, 乙酰胆碱受体主要分为烟碱型受体 (nAChR) 和毒蕈碱型受体 (mAChR)。nAChR 是一种乙酰胆碱门控离子通道, 主要分布于骨骼肌和中枢神经系统中, 其亚基突变会导致神经肌肉接头障碍、癫痫等遗传疾病^[2-5]。mAChR 属于 G 蛋白偶联受体超家族的一员, 在中枢神经系统和外周组织中广泛分布, 被报道与阿尔茨海默病、帕金森病、抑郁症和精神分裂症等神经系统疾病密切相关^[6-11]。尽管乙酰胆碱参与很多重要的生理功能^[1, 12-15], 但是在许多情况下, 仍不清楚是哪些受体亚基参与介导了乙酰胆碱的具体功能。

秀丽隐杆线虫 (*Caenorhabditis elegans*) 因其运动行为简单, 基因组和神经连接组清楚, 且基因可操作性强, 成为研究神经递质运动调控机制的理想模式动物^[16-21]。秀丽线虫背腹侧肌肉交替收缩

舒张产生可沿纵向体轴传播的背腹侧身体弯曲, 由此驱动其正弦波运动^[22-23]。在受到外界危险刺激时, 秀丽线虫会产生后退运动躲避危险, 之后根据刺激的危险程度选择继续前进或者转换方向^[24]。

乙酰胆碱是秀丽线虫神经系统中运用最广泛的神经递质, 目前已知秀丽线虫体内至少表达乙酰胆碱的 30 种烟碱型受体、4 种毒蕈碱型受体和至少 4 种氯离子通道受体^[25]。已发现的 4 种乙酰胆碱门控氯离子通道亚基 (acetylcholine-gated chloride channel, ACC) 分别是 ACC-1、ACC-2、ACC-3 和 ACC-4。其中 ACC-1 和 ACC-2 会形成同型通道, 并且二者和 ACC-3、ACC-4 会相互作用^[26]。ACC 受体 4 种亚基在多种感觉神经元、运动神经元和中间神经元均有表达^[25], 但是由于对这些氯离子通

* 国家自然科学基金 (32020103007) 资助项目。

** 通讯联系人。

温泉 Tel: 0551-63607478, E-mail: qwen@ustc.edu.cn

霍菁 Tel: 18505657812, E-mail: huoji1126@wfmec.edu.cn

收稿日期: 2023-04-13, 接受日期: 2023-05-05

道受体的体内研究很少, 对它们的具体功能仍然不清楚。有一项研究发现, ACC-2能够介导中间神经元AIY对其下游中间神经元AIZ的抑制作用, 从而参与调控秀丽线虫运动方向的转换^[27]。ACC受体在运动和其他生理过程中的功能尚待更多研究。

本文通过综合运用行为追踪、分子遗传学和光遗传学手段, 分析了乙酰胆碱门控氯离子通道亚基(*acc-1*、*acc-2*、*acc-3*、*acc-4*)突变线虫的自由运动。研究发现, 这4种突变体的运动行为在不同时间尺度上的运动学特征都会发生变化, 并且ACC受体可能参与介导中间神经元RIB对后退运动的抑制性调控。通过本文的研究, 希望能够为乙酰胆碱门控抑制性受体对运动行为的调控提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 质粒制备

通过PCR法从野生型秀丽线虫品系N2中扩增

得到在RIB神经元中特异表达的启动子*Psto-3*和用于标记线虫尾部的启动子*Plin-44*, 通过DNA重组法得到质粒*Psto-3::Chrimson::wCherry*、*Plin-44::GFP*。

1.2 秀丽线虫的培养与品系制备

野生型、转基因、基因突变秀丽线虫品系均在16~22℃黑暗环境下用线虫生长培养基(nematode growth media, NGM)进行培养。乙酰胆碱门控氯离子通道亚基突变线虫品系*acc-1* (*tm3268*)、*acc-2* (*tm3219*)、*acc-3* (*tm3174*)和*acc-3* (*tm7453*)购自NBRP (National BioResource Project), *acc-2* (*ok2216*)和*acc-4* (*ok2371*)购自CGC (Caenorhabditis Genetics Center)。表达光敏感蛋白Chrimson的线虫品系均是通过在线虫性腺内显微注射相关质粒得到, 挑取第三代表达目标蛋白的线虫用于实验。制备的转基因线虫品系如表1所示。

Table 1 Transgenic *C. elegans* strains used in this study

Strain name	Allele name	Genotype
WEN0417	wenEx0417; <i>acc-1</i> (<i>tm3268</i>)	wenEx0417 [<i>Psto-3::Chrimson::wCherry</i> ; <i>Plin-44::GFP</i>]; <i>acc-1</i> (<i>tm3268</i>)
WEN0418	wenEx0418; <i>acc-2</i> (<i>ok2216</i>)	wenEx0418 [<i>Psto-3::Chrimson::wCherry</i> ; <i>Plin-44::GFP</i>]; <i>acc-2</i> (<i>ok2216</i>)
WEN0415	wenEx0415; <i>acc-2</i> (<i>tm3219</i>)	wenEx0415 [<i>Psto-3::Chrimson::wCherry</i> ; <i>Plin-44::GFP</i>]; <i>acc-2</i> (<i>tm3219</i>)
WEN0414	wenEx0414; <i>acc-3</i> (<i>tm7453</i>)	wenEx0414 [<i>Psto-3::Chrimson::wCherry</i> ; <i>Plin-44::GFP</i>]; <i>acc-3</i> (<i>tm7453</i>)
WEN0416	wenEx0416; <i>acc-3</i> (<i>tm3174</i>)	wenEx0416 [<i>Psto-3::Chrimson::wCherry</i> ; <i>Plin-44::GFP</i>]; <i>acc-3</i> (<i>tm3174</i>)
WEN0419	wenEx0419; <i>acc-4</i> (<i>ok2371</i>)	wenEx0419 [<i>Psto-3::Chrimson::wCherry</i> ; <i>Plin-44::GFP</i>]; <i>acc-4</i> (<i>ok2371</i>)

1.3 秀丽线虫自由行为追踪记录与分析

本文在Leifer等^[28]研发的CoLBeRT (control locomotion and behavior in real time) 系统基础上搭建了运动行为自动追踪系统, 记录了秀丽线虫的自由运动行为。在暗场红外照明下, 红外相机(acA2000-165um NIR, 三宝兴业视觉技术有限公司, 中国北京)可识别双轴高速位移台(P-721.CDQ, 爱普纳米位移技术有限公司, 中国上海)上的线虫, CoLBeRT系统得到线虫位置信息, 同时通过控制位移台实时追踪线虫并使虫身保持在倒置显微镜(Ti-U, 尼康公司, 日本)视野中央。在实验开始前, 为了去除虫体上沾有的OP50 (尿嘧啶缺陷型大肠杆菌品系, 用于培养线虫), 将线虫放在空白的NGM平板上爬行约1 min。之后将其放在0.8%的琼脂糖平板上使其自由爬行, 每只线虫运动过程的记录时间约为5 min。

在对秀丽线虫自由运动分析时, 将线虫身体沿

纵轴中线等分为100段, 运动速度计算为某一段运动过程中线虫的平均质心速度。用Shen等^[29]使用的方法对线虫身体弯曲幅度进行了量化: 将某一段运动过程中线虫身体特定区段的曲率均一化为 $K \cdot L$, 其中 K 为线虫身体曲率, L 为线虫身体长度, 计算得到 $K \cdot L$ 的标准差即为线虫身体弯曲幅度。在计算头部弯曲幅度时选取了线虫身体前15%~24%区段, 计算躯体中部弯曲幅度时选取了线虫身体前45%~54%区段。

在计算秀丽线虫转向时间时, 将线虫停止后退并且头部开始出现弯曲的时刻定义为转向的开始; 将线虫运动方向转换完成, 不再改变运动方向, 身体展开, 准备向前做正弦波运动的时刻定义为转向的结束。

1.4 光遗传激活实验

本文通过CoLBeRT系统对秀丽线虫进行自由行为下的光遗传实验。实验前, 将线虫在含有视黄

醛的NGM固体培养基中培养过夜。待线虫发育至年轻成虫期 (young adult), 将其放在0.8%的琼脂糖平板上, 开始追踪记录线虫运动。实验中光照区域设置为线虫身体前30%的区域, 热刺激的时间为1 s, 光遗传刺激时间为7 s, 光强为1.00 mW/mm²。每只虫子的试验次数为6~7次, 每次刺激间隔时间在45 s以上。

1.5 统计分析

本文中的行为学数据均用 MATLAB (MathWorks, Natick, 美国) 软件进行处理和统计分析。用 Mann-Whitney U test 检验两组样本之间的差异, 用 Two-sample Kolmogorov-Smirnov test 比较两组样本的概率分布, 用 Bonferroni 法对多重比较

进行矫正。当 $P<0.05$ 时认为差异显著。

2 结 果

2.1 运用运动行为自动追踪系统记录秀丽线虫的三种运动模式

用 CoLBeRT 系统实时自动追踪并记录了秀丽线虫的自由运动行为过程, 成像结果显示了秀丽线虫的三种运动模式: 前进、后退以及转向。前进过程中, 线虫背腹侧身体弯曲沿纵向体轴从头端向尾部传播; 后退过程中, 背腹侧身体弯曲则从尾部向头部传播; 后退结束后线虫会选择继续前进, 或者头部向后弯曲贴向身体, 从而转换运动方向 (图1)。

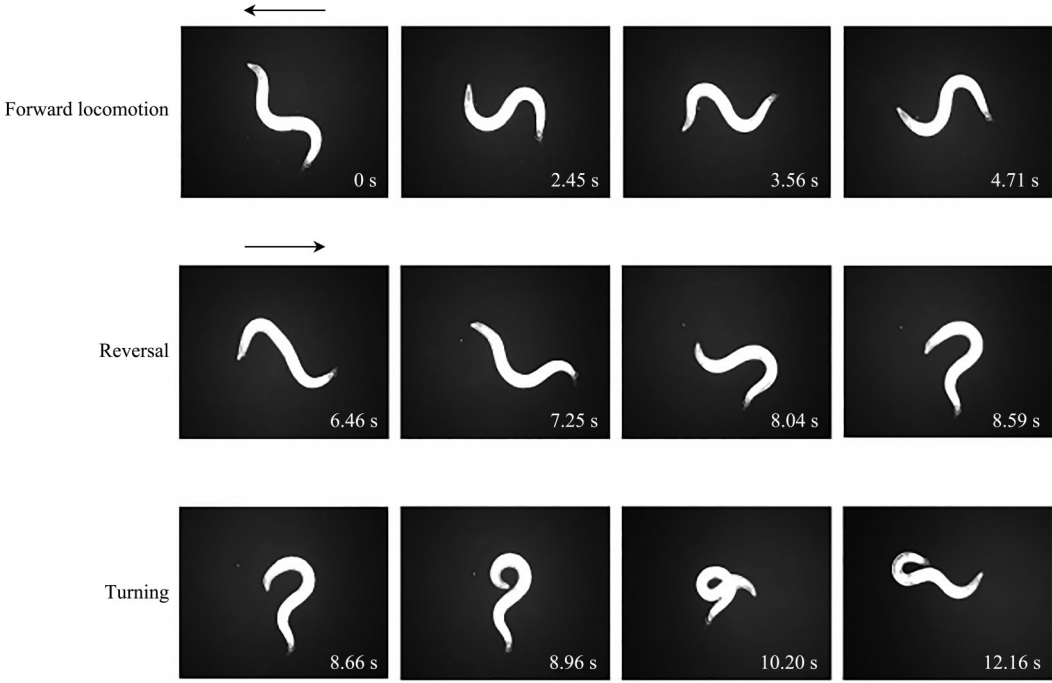


Fig. 1 Three locomotion patterns in *C. elegans*

Video frames show three different locomotion patterns of wild type *C. elegans* : forward locomotion, reversal and turning. The black arrows indicate the direction of the worm locomotion. The small and the big circle indicate the head and the tail of the nematode, respectively.

2.2 乙酰胆碱门控氯离子通道受体突变影响秀丽线虫前进运动状态

对不同品系秀丽线虫的前进运动进行量化分析发现, 4种乙酰胆碱门控氯离子通道亚基突变线虫前进运动时长的累积分布与N2相比均有显著差异, 比N2有更多短时长的前进 (图2a~d), 即这些突变线虫无法进行长时间的前进运动。统计平均前进频率发现, 只有 *acc-3 (tm7453)* 突变体的频率明显

增加, 其他的突变体则无显著变化 (图2e)。另外, *acc-2 (ok2216)*、*acc-3 (tm7453)*、*acc-4 (ok2371)* 这3种突变体的平均前进时长均显著减少 (图2f)。进一步分析运动速度发现, 与N2相比, 4种突变体的前进速度均显著降低 (图2g)。这些结果提示, 乙酰胆碱门控氯离子通道受体参与对秀丽线虫前进运动状态的调控。

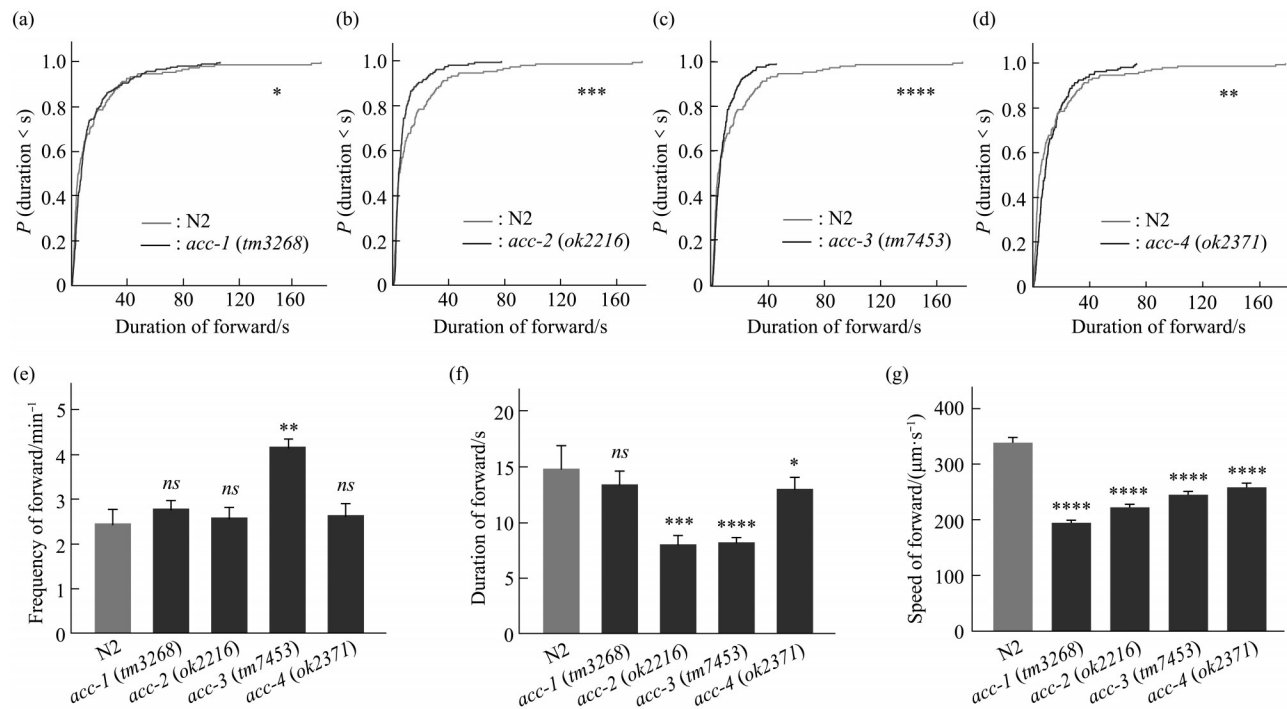


Fig. 2 Locomotion kinematics altered in acetylcholine-gated chloride channel receptor mutants during forward movements
(a-d) Cumulative distribution of forward movement duration in N2 and four acetylcholine-gated chloride channel subunit mutants: *acc-1 (tm3268)*, *acc-2 (ok2216)*, *acc-3 (tm7453)*, and *acc-4 (ok2371)*. N2: $n=149$, 12 animals; *acc-1 (tm3268)*: $n=211$, 12 animals; *acc-2 (ok2216)*: $n=157$, 12 animals; *acc-3 (tm7453)*: $n=253$, 12 animals; *acc-4 (ok2371)*: $n=161$, 12 animals. Two-sample Kolmogorov-Smirnov test. (e-f) Average frequency and duration of a forward movement in N2 and four mutants from (a-d), respectively. (g) Average centroid speed of different strains during a forward movement. Error bars indicate SEM. Mann-Whitney U test, adjusted with Bonferroni correction. ns, no significance, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, **** $P<0.0001$.

2.3 乙酰胆碱门控氯离子通道受体突变影响秀丽线虫前进时的身体弯曲幅度

为探究乙酰胆碱门控氯离子通道受体是否参与对秀丽线虫身体弯曲的调控,本文对线虫前进运动过程中身体弯曲幅度进行了量化(图3a)。结果发现,与N2相比,*acc-1 (tm3268)*和*acc-4 (ok2371)*两种通道受体亚基突变线虫的全身弯曲幅度显著降低,*acc-2 (ok2216)*和*acc-3 (tm7453)*则无明显差异(图3b)。进一步分别分析线虫头部和身体中部的弯曲幅度发现,*acc-3 (tm7453)*突变线虫的头部弯曲幅度显著降低(图3c),*acc-2 (ok2216)*和*acc-3 (tm7453)*的身体中部弯曲幅度显著降低,而*acc-1 (tm3268)*则显著增加(图3d)。这些结果提示,乙酰胆碱门控氯离子通道受体参与调控线虫前进运动过程中身体弯曲的幅度。

2.4 乙酰胆碱门控氯离子通道受体突变影响秀丽线虫后退运动状态

接着继续分析秀丽线虫自由运动中的后退情况。统计发现,4种乙酰胆碱门控氯离子通道亚基突变线虫后退运动时长的累积分布与N2相比均有显著差异,都比N2有更多长时间的后退,其中*acc-2 (ok2216)*最长的后退时间达到了74.3 s(图4a-d)。4种亚基突变体后退的平均发生频率与N2相比均无显著变化(图4e),而4种突变体的平均后退时长均显著增长(图4f)。进一步分析后退运动速度发现,与N2相比,4种突变体的后退速度均显著降低(图4g)。由以上结果可以看出,与对照组相比,这些氯离子通道亚基突变线虫不能够及时停止后退,但是可以正常起始后退。

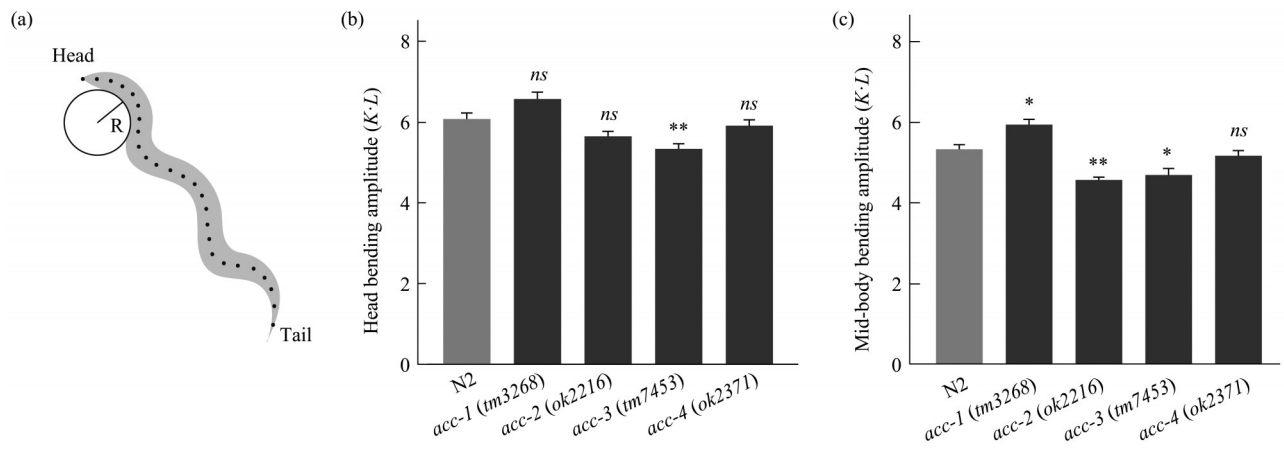


Fig. 3 Mutations in acetylcholine-gated chloride channel receptor genes affect the body bending amplitude of *C. elegans* during forward movements

(a) Schematics illustrate the method for quantifying the amplitude of head bending, which is defined as the standard deviation of normalized curvature along the 15%–24% of the worm body over the measurement period. (b–c) Compare the amplitude of head bending and mid-body bending in N2 and acetylcholine-gated chloride channel subunit mutants during forward movement, respectively. N2: $n=149$, 12 animals; *acc-1 (tm3268)*: $n=211$, 12 animals; *acc-2 (ok2216)*: $n=157$, 12 animals; *acc-3 (tm7453)*: $n=253$, 12 animals; *acc-4 (ok2371)*: $n=161$, 12 animals. Error bars indicate SEM. Mann-Whitney U test, adjusted with Bonferroni correction. ns, no significance, * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

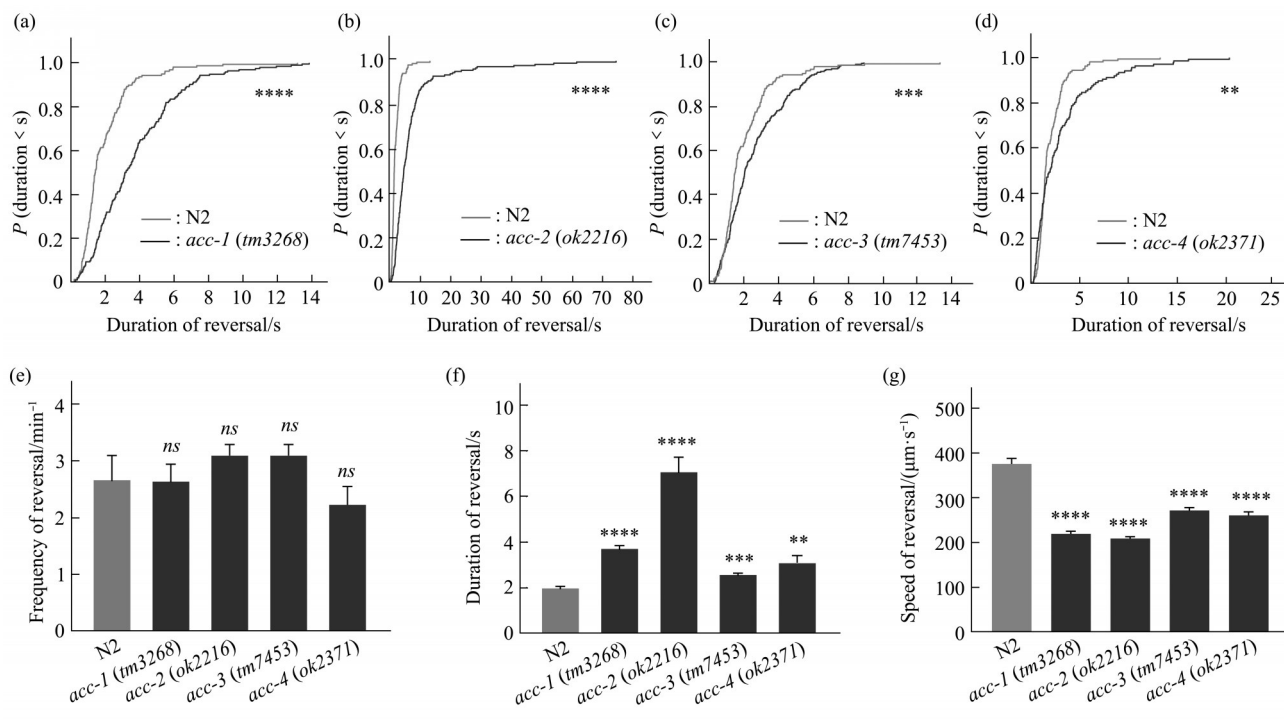


Fig. 4 Locomotion kinematics altered in acetylcholine-gated chloride channel receptor mutants during backward movement

(a–d) Cumulative distribution of reversal duration in N2 and four acetylcholine-gated chloride channel subunit mutants. N2: $n=161$, 12 animals; *acc-1 (tm3268)*: $n=199$, 12 animals; *acc-2 (ok2216)*: $n=189$, 12 animals; *acc-3 (tm7453)*: $n=248$, 12 animals; and *acc-4 (ok2371)*: $n=137$, 12 animals. Two-sample Kolmogorov-Smirnov test. (e–f) Average frequency and duration of a reversal in N2 and four mutants from (a–d), respectively. (g) Average centroid speed of different strains during a reversal. Error bars indicate SEM. Mann-Whitney U test, adjusted with Bonferroni correction. ns, no significance, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, **** $P<0.0001$.

2.5 乙酰胆碱门控氯离子通道受体突变影响秀丽线虫转向运动状态

本文对线虫自由运动中的转向过程也进行了量化分析。结果发现,与N2相比,*acc-1 (tm3268)*和*acc-4 (ok2371)*突变体转向时长的累积分布与N2相比有显著差异,二者比N2有更多长时间的转向发

生,*acc-2 (ok2216)*和*acc-3 (tm7453)*则无显著变化(图5a~d)。与N2相比,4种受体基因突变线虫的转向平均频率均无显著变化(图5e),*acc-1 (tm3268)*和*acc-4 (ok2371)*突变体的平均转向时长显著增加(图5f)。这些结果提示,*acc-1*和*acc-4*参与对转向运动状态的调控。

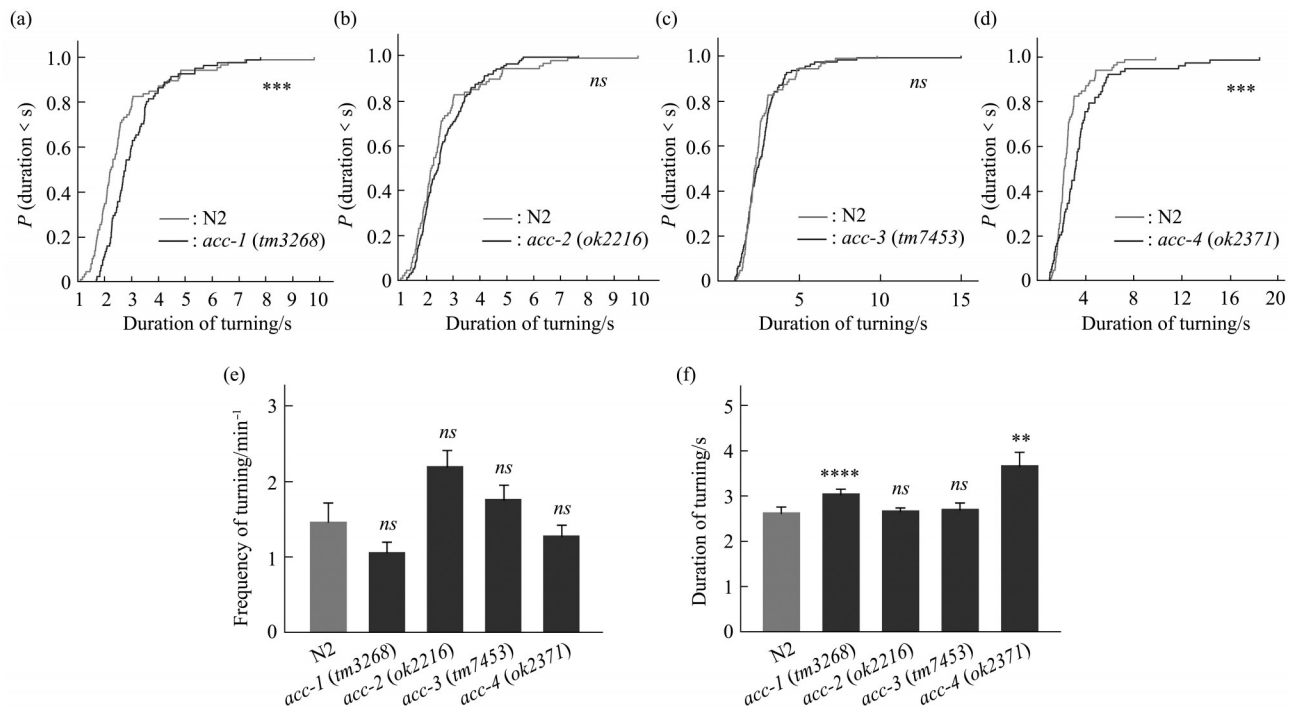


Fig. 5 Locomotion kinematics altered in acetylcholine-gated chloride channel receptor mutants during turning behavior

(a-d) Cumulative distribution of turning duration in N2 and four acetylcholine-gated chloride channel subunit mutants. N2: $n=88$, 12 animals; *acc-1 (tm3268)*: $n=82$, 12 animals; *acc-2 (ok2216)*: $n=134$, 12 animals; *acc-3 (tm7453)*: $n=108$, 12 animals; and *acc-4 (ok2371)*: $n=79$, 12 animals. Two-sample Kolmogorov-Smirnov test. (e-f) Average frequency and duration of a turning behavior in N2 and four mutants from (a-d), respectively. Error bars indicate SEM. Mann-Whitney U test, adjusted with Bonferroni correction. ns, no significance, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$.

2.6 乙酰胆碱门控氯离子通道受体突变影响RIB中间神经元对后退运动的抑制性调控

RIB神经元被认为是在促进秀丽线虫的前进和转向运动过程中起了重要作用的中间神经元^[30],在后退过程中RIB的神经元活性会显著下降^[27],推测RIB神经元对后退运动可能有抑制作用。由于RIB是乙酰胆碱能神经元,本文试图探究乙酰胆碱门控氯离子通道受体是否参与RIB中间神经元对后退运动的调控。

在秀丽线虫逃避热刺激的后退过程中光激活

RIB神经元(图6a),统计光刺激开始至线虫后退结束的时长。结果显示,与野生型秀丽线虫N2相比,所有的乙酰胆碱门控氯离子通道亚基突变体的后退运动均不能及时终止(图6b)。另外,*acc-1 (tm3268)*、*acc-2 (tm3219)*、*acc-3 (tm3174)*、*acc-3 (tm7453)*突变体后退结束后的转向发生概率显著增加(图6c)。这些结果提示,乙酰胆碱门控氯离子通道受体可能参与了RIB中间神经元对后退运动的抑制调控,并且可能也参与了RIB对线虫后退结束之后前进和转向两种选择的调控。

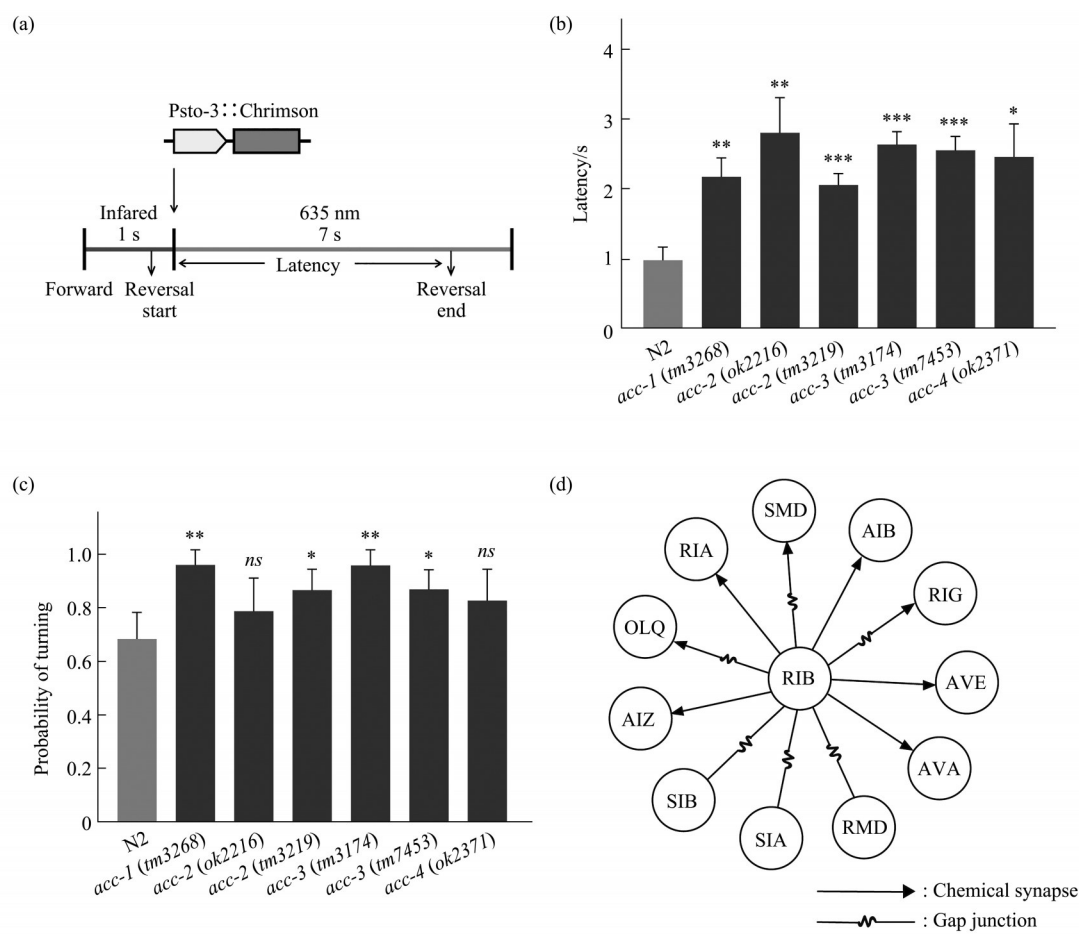


Fig. 6 Activation of RIB interneurons increases the duration of reversal and the probability of turning in acetylcholine-gated chloride channel receptor mutants

(a) Schematic illustration of the experimental paradigm for optogenetic activation of RIB interneurons under thermal stimulation. Thermal stimulus (1 480 nm, 1 s) induces a reversal followed by optogenetic activation of RIB interneurons (635 nm, 1.00 mW/mm², 7 s). (b) Mean latency from the onset of red light stimulation to the end of reversal in N2 and four acetylcholine-gated chloride channel subunit mutants. (c) The probability for inducing a turning behavior after the thermal-triggered reversal and optogenetic stimulation of RIB. N2: *n*=85, 18 animals; *acc-1 (tm3268)*: *n*=48, 10 animals; *acc-2 (ok2216)*: *n*=42, 15 animals; *acc-2 (tm3219)*: *n*=74, 10 animals; *acc-3 (tm3174)*: *n*=46, 10 animals; *acc-3 (tm7453)*: *n*=83, 12 animals; and *acc-4 (ok2371)*: *n*=40, 11 animals. Error bars indicate SEM. Mann-Whitney U test, adjusted with Bonferroni correction. ns, no significance, **P*<0.05, ***P*<0.01, ****P*<0.001. (d) Neurons that express ACC channel subunits and postsynaptic neurons to RIB^[19-20].

3 讨 论

乙酰胆碱作为第一个被鉴定出来的神经递质, 对它参与的生理功能已经有很多认识^[1]。然而由于受体类型的复杂性和遗传模型种类的不足, 对乙酰胆碱在许多生理过程中具体调控机制的理解仍然有限。2005年, 乙酰胆碱门控氯离子通道受体第一次在秀丽线虫中被鉴定出来^[26], 然而对其参与的功能及其调控机制目前了解甚少。本文发现, 乙酰胆碱门控氯离子通道亚基 (*acc-1*、*acc-2*、*acc-3*、*acc-4*) 突变秀丽线虫在自由运动行为过程中, 不同时间尺度的运动学特征都会发生改变。本文首

次发现这些受体亚基突变会影响线虫运动速度和身体弯曲幅度, 这两种运动输出对线虫维持和转换运动状态至关重要。另外, 光遗传实验结果提示 ACC 受体很可能参与介导 RIB 中间神经元对秀丽线虫后退运动的抑制性调控。

秀丽线虫的体壁肌肉类似于哺乳动物平滑肌, 通过 nAChR 接收乙酰胆碱的兴奋性输入, 导致肌肉收缩; 同时秀丽线虫体壁肌肉也接收 GABA 能的抑制性输入, 这两种兴奋性和抑制性输入之间的良好平衡保证了线虫正弦波运动的正常进行^[31]。乙酰胆碱在此过程中也存在抑制效应, 比如离子型受体 ACR-12 在 GABA 能运动神经元中表达并介导

对肌肉细胞的抑制性输入，由此协调线虫身体背腹侧肌肉细胞的兴奋和抑制^[32]。而本文观察到乙酰胆碱门控氯离子通道受体亚基突变线虫在自由运动中的后退延迟终止。在光遗传实验中，后退开始后激活 RIB 中间神经元也依旧不能使线虫及时结束后退，即 ACC 受体很可能参与介导了对秀丽线虫运动状态的抑制性调控。尚不清楚介导抑制性输入的 nAChR 和这些氯离子通道受体的功能区别，待进一步研究。

先前有研究表明，*acc-2* 基因突变会导致 AIY 不能引起后退运动，AIY 通过 ACC-2 抑制下游神经元 AIZ 来抑制后退运动^[27]。本文发现，ACC 受体不仅介导对后退运动的抑制，在前进和转向过程中也都参与了对运动状态的调控。并且这种调控不只是在长时间尺度，在短时间尺度上，发现受体亚基突变线虫仍然能够弯曲身体，进行前进运动，这表明 ACC 受体对于运动的产生不是必需的。但是身体弯曲幅度有小幅度的降低或上升，提示 ACC 受体参与调节线虫身体弯曲的幅度。

在分析的所有运动学特征中，受影响最大的可能是线虫的运动速度，本文发现 4 种乙酰胆碱门控氯离子通道亚基突变体在不同运动过程的速度都大

幅度降低。而基于受体本身的离子通道特性，ACC 受体介导的是乙酰胆碱的抑制性输入，因此它对特定运动过程的速度很可能并不是直接的促进作用。

RIB 中间神经元在运动状态转换中起着关键的作用，先前的研究发现，RIB 同时对前进和转向行为有促进作用^[30]。作为中间神经元，RIB 不直接与肌肉细胞形成突触连接^[18-19]，因此其作用的下游氯离子通道受体很可能是表达在中间神经元和运动神经元。根据秀丽线虫神经连接图谱（图 6d）和先前 ACC 受体表达相关的研究^[18-19, 33-34]，推测 RIB 有可能通过 ACC 受体作用于 AVE、AVA、AIB 中间神经元来对后退运动进行抑制性调控。这 3 个神经元均表达 ACC 受体（表 2），并且它们是在后退运动中起重要作用的中间神经元，在线虫前进过程中分别激活三者均能够促发后退^[35]。另外，DA、DB 等运动神经元也表达了 ACC 受体^[33]，RIB 可能也通过对这些运动神经元的抑制性输入来调控线虫运动的协调性。后续实验中可运用基因编辑技术操纵 RIB 特定下游神经元的活动来确定 RIB 通过 ACC 受体调控后退运动的具体环路机制。

Table 2 Acetylcholine-gated chloride channel subunits expression in *C. elegans*

Gene name	Interneuron	Motor neuron	Sensory neuron
<i>acc-1</i>	AIB, SAA, MC, I6, SIB, RIM, I3, AVK, AVA, SAB, RIP, PVW, RIS, PVQ, AVH	SMD, M3, RMD, MI, DB, DA, AS, VB, SMB, M1	PLM, ASH, AQR
<i>acc-2</i>	RIG, AIZ, RIA, AIM, RIH, AIB, PVQ, RIM*	HSN	IL2, URY, CEP, OLQ, URX, URB
<i>acc-3</i>	ALA, DVC, RIM, ADA	RME, DB	IL1, URY, ADF, ASE, CEP, AWA, PQR, ASK
<i>acc-4</i>	SAB, LUA, SIB, RIH, AIA, PVC, RIF, AVD, SIA, AVE, RIP, SAA, AVA, SDQ, RIM*	DA, DB, VA, AS, M3, VB, RMF, HSN, RMD, M4, SMD	IL2, URB, URA, PLN

We listed the top thirty neurons with the highest ACC subunits expression levels which were referenced from CeNGEN database^[33]. RIM was reported to express all four ACC receptors in another study^[34], so we also listed it here. *Represents the expression of the receptor gene in RIM was not in the list of top thirty neurons.

4 结 论

本文通过运动行为追踪、分子遗传学和光遗传学手段，发现乙酰胆碱门控氯离子通道受体亚基突变线虫自由运动行为中，不同时间尺度上的运动学特征均会发生变化，并且 ACC 受体可能参与介导了 RIB 中间神经元对后退运动的抑制性调控。本文结果提示，ACC 受体在抑制性调控秀丽线虫运动

状态中起着重要的作用。本研究对 ACC 受体的体内功能研究奠定基础，对乙酰胆碱门控抑制性受体调控运动行为的机制提供了新的思路。

参 考 文 献

- [1] Picciotto M R, Higley M J, Mineur Y S. Acetylcholine as a neuromodulator: cholinergic signaling shapes nervous system function and behavior. *Neuron*, 2012, **76**(1): 116-129
- [2] Picciotto M R, Caldarone B J, Brunzell D H, *et al.* Neuronal

- nicotinic acetylcholine receptor subunit knockout mice: physiological and behavioral phenotypes and possible clinical implications. *Pharmacol Ther*, 2001, **92**(2-3): 89-108
- [3] Fusco M D, Becchetti A, Patrignani A, *et al*. The nicotinic receptor $\beta 2$ subunit is mutant in nocturnal frontal lobe epilepsy. *Nat Genet*, 2000, **26**(3): 275-276
- [4] Engel A G, Shen X M, Selcen D, *et al*. Congenital myasthenic syndromes: pathogenesis, diagnosis, and treatment. *Lancet Neurol*, 2015, **14**(4): 420-434
- [5] Matta J A, Gu S, Davini W B, *et al*. Nicotinic acetylcholine receptor redux: discovery of accessories opens therapeutic vistas. *Science*, 2021, **373**(6556): eabg6539
- [6] Felder C C, Bymaster F P, Ward J, *et al*. Therapeutic opportunities for muscarinic receptors in the central nervous system. *J Med Chem*, 2000, **43**(23): 4333-4353
- [7] Wess J. Muscarinic acetylcholine receptor knockout mice: novel phenotypes and clinical implications. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2004, **44**: 423-450
- [8] Wess J, Eglen R M, Gautam D. Muscarinic acetylcholine receptors: mutant mice provide new insights for drug development. *Nat Rev Drug Disco*, 2007, **6**(9): 721-733
- [9] Eglen R M, Choppin A, Watson N. Therapeutic opportunities from muscarinic receptor research. *Trends Pharmacol Sci*, 2001, **22**(8): 409-414
- [10] Eglen R M. Muscarinic receptor subtype pharmacology and physiology. *Prog Med Chem*, 2005, **43**: 105-136
- [11] Moran S P, Maksymetz J, Conn P J. Targeting muscarinic acetylcholine receptors for the treatment of psychiatric and neurological disorders. *Trends Pharmacol Sci*, 2019, **40**(12): 1006-1020
- [12] Miyakawa T, Yamada M, Duttaroy A, *et al*. Hyperactivity and intact hippocampus-dependent learning in mice lacking the M1 muscarinic acetylcholine receptor. *J Neurosci*, 2001, **21**(14): 5239-5250
- [13] Gomeza J, Zhang L, Kostenis E, *et al*. Enhancement of D1 dopamine receptor-mediated locomotor stimulation in M4 muscarinic acetylcholine receptor knockout mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, **96**(18): 10483-10488
- [14] Labarca C, Schwarz J, Deshpande P, *et al*. Point mutant mice with hypersensitive $\alpha 4$ nicotinic receptors show dopaminergic deficits and increased anxiety. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, **98**(5): 2786-2791
- [15] Changeux J P. Nicotine addiction and nicotinic receptors: lessons from genetically modified mice. *Nat Rev Neurosci*, 2010, **11**(6): 389-401
- [16] Zhen M, Samuel A D T. *C. elegans* locomotion: small circuits, complex functions. *Curr Opin Neurobiol*, 2015, **33**(1): 117-126
- [17] The *C. elegans* Sequencing Consortium. Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology. *Science*, 1998, **282**(5396): 2012-2018
- [18] White J G, Southgate E, Thomson J N, *et al*. The structure of the nervous system of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 1986, **314**(1165): 1-340
- [19] Cook S J, Jarrell T A, Brittin C A, *et al*. Whole-animal connectomes of both *Caenorhabditis elegans* sexes. *Nature*, 2019, **571**(7763): 63-71
- [20] Hall D H, Russell R L. The posterior nervous system of the nematode *Caenorhabditis elegans*: serial reconstruction of identified neurons and complete pattern of synaptic interactions. *J Neurosci*, 1991, **11**(1): 1-22
- [21] 陈迪. 秀丽线虫胰岛素类生长因子和雷帕霉素受体信号通路对衰老的调节作用. *生物化学与生物物理进展*, 2014, **41**(3): 305-312
Chen D. *Prog Biochem Biophys*, 2014, **41**(3): 305-312
- [22] Croll N A. Behavioural analysis of nematode movement. *Adv Parasitol*, 1975, **13**: 71-122
- [23] Wen Q, Po M D, Hulme E, *et al*. Proprioceptive coupling within motor neurons drives *C. elegans* forward locomotion. *Neuron*, 2012, **76**(4): 750-761
- [24] Gray J M, Hill J J, Bargmann C I. A circuit for navigation in *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, **102**(9): 3184-3191
- [25] Treinin M, Jin Y. Cholinergic transmission in *C. elegans*: functions, diversity, and maturation of ACh - activated ion channels. *J Neurochem*, 2021, **158**(6): 1274-1291
- [26] Putrenko I, Zakikhani M, Dent J A. A family of acetylcholine-gated chloride channel subunits in *Caenorhabditis elegans*. *J Biol Chem*, 2005, **280**(8): 6392-6398
- [27] Li Z, Liu J, Zheng M, *et al*. Encoding of both analog-and digital-like behavioral outputs by one *C. elegans* interneuron. *Cell*, 2014, **159**(4): 751-765
- [28] Leifer A M, Fang-Yen C, Gershow M, *et al*. Optogenetic manipulation of neural activity in freely moving *Caenorhabditis elegans*. *Nat Methods*, 2011, **8**(2): 147-152
- [29] Shen Y, Wen Q, Liu H, *et al*. An extrasynaptic GABAergic signal modulates a pattern of forward movement in *Caenorhabditis elegans*. *Elife*, 2016, **5**: e14197
- [30] Wang Y, Zhang X, Xin Q, *et al*. Flexible motor sequence generation during stereotyped escape responses. *Elife*, 2020, **9**: e56942
- [31] Dittman J S, Kaplan J M. Behavioral impact of neurotransmitter-activated G-protein-coupled receptors: muscarinic and GABAB receptors regulate *Caenorhabditis elegans* locomotion. *J Neurosci*, 2008, **28**(28): 7104-7112
- [32] Petrash H A, Philbrook A, Haburcak M, *et al*. ACR-12 ionotropic acetylcholine receptor complexes regulate inhibitory motor neuron activity in *Caenorhabditis elegans*. *J Neurosci*, 2013, **33**(13): 5524-5532
- [33] Taylor S R, Santpere G, Weinreb A, *et al*. Molecular topography of an entire nervous system. *Cell*, 2021, **184**(16): 4329-4347
- [34] Huo J, Xu T, Polat M, *et al*. Hierarchical behavior control by a single class of interneurons. *bioRxiv*, 2023. doi: 10.1101/2023.03.13.532397
- [35] Piggott B J, Liu J, Feng Z, *et al*. The neural circuits and synaptic mechanisms underlying motor initiation in *C. elegans*. *Cell*, 2011, **147**(4): 922-933

Mutations in Acetylcholine-gated Chloride Channel Receptors Affect Locomotion Kinematics and Motor State Transitions in *C. elegans**

Polat Mahiber¹⁾, XIONG Rong-Kang²⁾, HUO Jing^{1,3,4)**}, WEN Quan^{1,2,3)**}

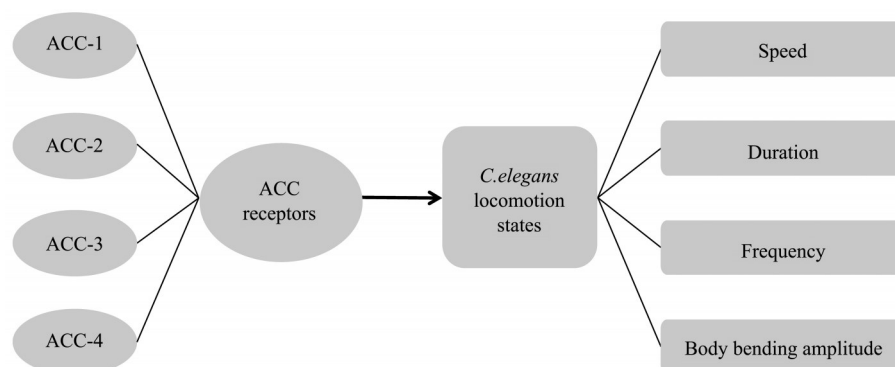
¹⁾Division of Life Sciences and Medicine, University of Science and Technology of China, Hefei 230026, China;

²⁾School of Data Science, University of Science and Technology of China, Hefei 230026, China;

³⁾Hefei National Laboratory for Physical Sciences at the Microscale, Center for Integrative Imaging, University of Science and Technology of China, Hefei 230026, China;

⁴⁾School of Basic Medical Sciences, Weifang Medical University, Weifang 261054, China)

Graphical abstract



Abstract Objective Acetylcholine is a highly conserved neurotransmitter that plays a crucial role in the regulation of animal motor behavior. Abnormalities in acetylcholine signaling can lead to various motor dysfunctions. However, the inhibitory regulatory mechanisms of acetylcholine in motor behavior are not fully understood. In this study, we used *Caenorhabditis elegans* as a model organism to investigate the regulatory effects of acetylcholine-gated chloride channel receptor subunits (ACC-1, ACC-2, ACC-3, ACC-4) on motor behavior. **Methods** We used a combination of locomotion tracking, molecular genetics, and optogenetics to analyze *C. elegans* locomotion in acetylcholine-gated chloride channel subunit deficient mutants. **Results** We found that mutations in these subunits affected the kinematics of forward, backward, and turning movements of nematodes. The body bending amplitude during forward movement was also modified. Optogenetic activation of RIB interneurons led to delayed termination of the reversal in these mutant strains. **Conclusion** These results suggest that the regulation of acetylcholine-gated chloride channel subunits is required for maintaining and modulating *C. elegans* motor states. They also suggest that these subunits may be involved in mediating the inhibitory regulation of RIB interneurons on backward movement in *C. elegans*. This study provides new insights into the regulatory mechanisms of acetylcholine-gated inhibitory receptors in motor behavior.

Key words *Caenorhabditis elegans*, acetylcholine-gated chloride channel receptors, locomotion tracking, regulation of motor state

DOI: 10.16476/j.pibb.2023.0146

* This work was supported by a grant from The National Natural Science Foundation of China (32020103007).

** Corresponding author.

WEN Quan. Tel: 86-551-63607478, E-mail: qwen@ustc.edu.cn

HUO Jing. Tel: 86-18505657812, E-mail: huoji1126@wfmc.edu.cn

Received: April 13, 2023 Accepted: May 5, 2023