

Institut für Biochemie & Biologie

AG Zoophysiology

---

**Charakterisierung der GABA<sub>B</sub>-Rezeptor Subtypen 1 und 2  
der Amerikanischen Großschabe *Periplaneta americana***

**- DISSERTATION -**

zur Erlangung des akademischen Grades

*„doctor rerum naturalium“*

(Dr. rer. nat.)

in der Wissenschaftsdisziplin

**„molekulare Zoophysiology“**

eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität Potsdam

von

**STEFANIE BLANKENBURG**

Potsdam, den 25.09.2013

Online veröffentlicht auf dem  
Publikationsserver der Universität Potsdam:  
URL <http://opus.kobv.de/ubp/volltexte/2014/6964/>  
URN <urn:nbn:de:kobv:517-opus-69648>  
<http://nbn-resolving.de/urn:nbn:de:kobv:517-opus-69648>



## Zusammenfassung

Die nichtproteinogene Aminosäure GABA ( $\gamma$ -Aminobuttersäure) gilt als der wichtigste inhibitorische Neurotransmitter im Zentralnervensystem von Vertebraten sowie Invertebraten und vermittelt ihre Wirkung u. a. über die metabotropen GABA<sub>B</sub>-Rezeptoren. Bisher sind diese Rezeptoren bei Insekten nur rudimentär untersucht. Für die Amerikanische Großschabe als etablierter Modellorganismus konnte pharmakologisch eine modulatorische Rolle der GABA<sub>B</sub>-Rezeptoren bei der Bildung von Primärspeichel nachgewiesen werden. Ziel dieser Arbeit war eine umfassende Charakterisierung der GABA<sub>B</sub>-Rezeptor-Subtypen 1 und 2 von *Periplaneta americana*.

Unter Verwendung verschiedenster Klonierungsstrategien sowie der Kooperationsmöglichkeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. T. Miura (Hokkaido, Japan) in Hinsicht auf eine dort etablierte *P. americana* EST-Datenbank gelang die Klonierung von zwei Rezeptor-cDNAs. Die Analyse der abgeleiteten Aminosäuresequenzen auf GB-spezifische Domänen und konservierte Aminosäure-Reste, sowie der Vergleich zu bekannten GB-Sequenzen anderer Arten legen nahe, dass es sich bei den isolierten Sequenzen um die GABA<sub>B</sub>-Rezeptor-Subtypen 1 und 2 (PeaGB1 und PeaGB2) handelt. Für die funktionelle und pharmakologische Charakterisierung des Heteromers aus PeaGB1 und PeaGB2 wurden Expressionskonstrukte für die Transfektion in HEK-flpTM-Zellen hergestellt. Das Heteromer aus PeaGB1 und PeaGB2 hemmt bei steigenden GABA-Konzentrationen die cAMP-Produktion. Die Substanzen SKF97541 und 3-APPA konnten als Agonisten identifiziert werden. CGP55845 und CGP54626 wirken als vollwertige Antagonisten. Das *in vitro* ermittelte pharmakologische Profil im Vergleich zur Pharmakologie an der isolierten Drüse bestätigt, dass die GABA-Wirkung in der Speicheldrüse tatsächlich von GBs vermittelt wird. Für die immunhistochemische Charakterisierung konnte ein spezifischer polyklonaler Antikörper gegen die extrazelluläre Schleife 2 des PeaGB1 generiert werden. Ein weiterer Antikörper, welcher gegen den PeaGB2 gerichtet ist, erwies sich hingegen nicht als ausreichend spezifisch. Western-Blot-Analysen bestätigen das Vorkommen beider Subtypen im Zentralnervensystem von *P. americana*. Zudem wird der PeaGB1 in der Speicheldrüse und in den Geschlechtsdrüsen der Schabenmännchen exprimiert. Immunhistochemische Analysen zeigen eine PeaGB1-ähnliche Markierung in den GABAergen Fasern der Speicheldrüse auf. Demnach fungiert der PeaGB1 hier als Autorezeptor. Weiterhin konnte eine PeaGB1-ähnliche Markierung in nahezu allen Gehirnneuropilen festgestellt werden. Auch die akzessorischen Drüsen der Männchen, Pilzdrüse und Phallusdrüse, sind PeaGB1-immunreaktiv.



## *Abstract*

The non-proteinogenic amino acid GABA ( $\gamma$ -aminobutyric acid) is the major inhibitory neurotransmitter in the central nervous system of vertebrates and invertebrates, and GABA mediates its action among others *via* metabotropic GABA<sub>B</sub> receptors (GBs). So far, these receptors are only rudimentarily characterized in insects. In the American Cockroach, which is an established model organism, pharmacological studies have pointed out a modulatory role of GBs in the production of primary saliva in the salivary gland. Therefore, the aim of this study is the profound characterization of the GABA<sub>B</sub> receptor subtypes 1 and 2 of *Periplaneta americana*.

Diverse cloning strategies and the access to a *Periplaneta* EST-database established by the group of Prof. Dr. T. Miura (Hokkaido, Japan) enabled the cloning of two receptor-cDNAs. The analysis of the deduced amino acid sequences for GB-specific domains and conserved amino acid-residues, and the comparison to known GB-sequences of other species revealed that the sequences correspond to GABA<sub>B</sub> receptor subtypes 1 and 2 (PeaGB1 and PeaGB2). Next, we functionally and pharmacologically characterized the receptor-heteromer of PeaGB1 and PeaGB2. Therefore, we established expression constructs for the transfection of HEK-flpTM-cells. The PeaGB1/PeaGB2 heteromer inhibits dose-dependently the production of cAMP. The substances SKF97541 and 3-APPA imitate the GABA effect. In contrast, CGP54626 and CGP55845 are considered to be proper antagonists. The comparison of the *in vitro* with the known pharmacology of isolated glands reveals that GBs indeed mediate the effect of GABA in the salivary gland. For immunohistochemical localization, a specific polyclonal antibody was raised against the extracellular loop 2 of PeaGB1. A second antibody, which was raised against the analogous region of the PeaGB2, must be considered to be non-specific. Western blot analyses demonstrate the localization of both subtypes in the central nervous system of *P. americana*. Additionally, PeaGB1 is expressed in the salivary gland and in male accessory glands. Immunohistochemical analyses reveal the expression of PeaGB1 in GABAergic nerve fibers of the salivary gland. As a consequence, PeaGB1 must act as an autoreceptor in this organ. A widespread distribution of PeaGB1 in almost all neuropiles was detected in the cockroach brain. In the male accessory glands mushroom gland and phallic (conglobate) gland, an intense PeaGB1-like immunoreactivity was measured in vesicular structures.

## INHALTSVERZEICHNIS

ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....	VII
TABELLENVERZEICHNIS.....	VIII
<b>1. EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Der Neurotransmitter GABA - Metabolismus &amp; Funktion .....</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Die Rezeptoren des Neurotransmitters GABA .....</b>	<b>3</b>
1.2.1 GABA <sub>A</sub> -Rezeptoren sind ligandengesteuerte Ionenkanäle.....	3
1.2.2 GABA <sub>B</sub> -Rezeptoren sind G-Protein gekoppelte Rezeptoren.....	4
1.2.2.1 G-Protein-gekoppelte Rezeptoren .....	4
1.2.2.2 Aktivierung und Inaktivierung von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren .....	6
1.2.2.3 GABA <sub>B</sub> -Rezeptoren.....	7
<b>1.3 Hinweise zur Expression von GABA<sub>B</sub>-Rezeptoren in <i>P. americana</i> .....</b>	<b>10</b>
<b>1.4 Zielsetzung dieser Arbeit .....</b>	<b>12</b>
<b>2. MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>13</b>
<b>2.1 Chemikalien &amp; Geräte.....</b>	<b>13</b>
<b>2.2 Versuchstiere und deren Präparation.....</b>	<b>13</b>
2.2.1 Haltung der Versuchstiere .....	13
2.2.2 Gewebepreparation.....	14
<b>2.3 Molekularbiologische Methoden.....</b>	<b>15</b>
2.3.1 DNA-Extraktion nach Gustincich <i>et al.</i> (1991).....	15
2.3.2 RNA-Extraktion.....	15
2.3.3 mRNA-Extraktion .....	16
2.3.4 cDNA-Synthese .....	17
2.3.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	18
2.3.6 RACE-PCR .....	19
2.3.7 <i>genome walking</i> - Amplifizierung von 5' und 3' genomischen Bereichen.....	23
2.3.8 Agarose-Gel-Elektrophorese.....	28
2.3.9 Präparative Agarose-Gel-Elektrophorese & Gelextraktion.....	28
2.3.10 Restriktionsverdau .....	29
2.3.11 Ligation.....	29
2.3.12 Transformation .....	30
2.3.13 Isolierung von Plasmid-DNA.....	31
<b>2.4 Biochemische Methoden.....</b>	<b>33</b>
2.4.1 Proteinbestimmung nach Bradford .....	33
2.4.2 Isolierung von Membranproteinen.....	33
2.4.3 Deglykosylierung von Membranproteinen durch PNGase F .....	34
2.4.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	34
2.4.5 Western-Blot.....	35
2.4.6 Immundetektion.....	36
2.4.7 Expression und Reinigung von Fusionsproteinen .....	37

2.4.8	Generierung polyklonaler Antikörper und deren Aufreinigung.....	38
2.4.9	Immunhistochemie & Immunzytochemie.....	40
<b>2.5</b>	<b>Heterologe Expression.....</b>	<b>42</b>
2.5.1	Anfertigung von Expressionsvektoren .....	43
2.5.2	Herstellung stabiler flp <sup>TM</sup> -Zelllinien .....	43
2.5.3	Calciumfluorometrie.....	44
<b>2.6</b>	<b>Bioinformatische Analysen.....</b>	<b>45</b>
<b>3.</b>	<b>ERGEBNISSE.....</b>	<b>47</b>
<b>3.1</b>	<b>Charakterisierung des GABA<sub>B</sub>-Rezeptors 1.....</b>	<b>47</b>
3.1.1	Isolierung der GABA <sub>B</sub> -Rezeptor 1 (PeaGB1) - cDNA .....	47
3.1.2	Aufbau der PeaGB1-cDNA .....	48
3.1.3	Charakteristika des Proteins PeaGB1 .....	48
<b>3.2</b>	<b>Charakterisierung des GABA<sub>B</sub>-Rezeptors 2.....</b>	<b>52</b>
3.2.1	Isolierung der GABA <sub>B</sub> -Rezeptor 2 (PeaGB2) - cDNA .....	52
3.2.2	Aufbau der PeaGB2-cDNA .....	53
3.2.3	Charakteristika des Proteins PeaGB2.....	53
<b>3.3</b>	<b>Vergleichende Analyse zwischen PeaGB1 und PeaGB2.....</b>	<b>57</b>
3.3.1	Ähnlichkeitsanalyse zwischen PeaGB1 und PeaGB2.....	57
3.3.2	Phylogenetische Analyse von PeaGB1 und PeaGB2.....	59
<b>3.4</b>	<b>Immunologische Untersuchung von PeaGB1 und PeaGB2.....</b>	<b>61</b>
3.4.1	Charakterisierung der polyklonalen Antikörper.....	61
3.4.2	Western-Blot-Analyse zur gewebs- und organspezifischen Verteilung von PeaGB1 und PeaGB2.....	64
3.4.3	Immunhistochemische Lokalisation von PeaGB1 in <i>P. americana</i> .....	65
3.4.4	Immunhistochemischer Nachweis der Expression von PeaGB1 in PeaGB1/DmGB2-transfizierten flp <sup>TM</sup> -Zellen .....	77
<b>3.5</b>	<b>Funktionelle und pharmakologische Charakterisierung von PeaGB1 &amp; PeaGB2.....</b>	<b>78</b>
3.5.1	Funktionelle Charakterisierung des GB1/GB2-Heterodimer.....	79
3.5.2	Pharmakologische Charakterisierung - Agonisten .....	80
3.5.3	Pharmakologische Charakterisierung - Antagonisten.....	81
<b>4.</b>	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>83</b>
<b>4.1</b>	<b>Strukturelle Eigenschaften der GABA<sub>B</sub>-Rezeptor Subtypen 1 &amp; 2 der Amerikanischen Großschabe.....</b>	<b>84</b>
4.1.1	Isolierung der PeaGB1- und PeaGB2-cDNA .....	84
4.1.2	Die heptahelikale Struktur der abgeleiteten Aminosäuresequenzen .....	85
4.1.3	Der N-Terminus als Ligandenbindungsdomäne.....	86
4.1.4	Rezeptoraktivierung .....	88
4.1.5	Zelloberflächenexpression .....	89
4.1.6	Posttranslationale Modifikationen.....	90
4.1.7	Phylogenetische Einordnung.....	92
<b>4.2</b>	<b>PeaGB1-Immunhistochemie .....</b>	<b>93</b>

---

4.2.1	Die Verteilung der PeaGBs in Organen und Geweben.....	94
4.2.2	Lokalisation des PeaGB1 in der Speicheldrüse .....	95
4.2.3	Lokalisation des PeaGB1 im Gehirn und Suboesophagealganglion.....	99
4.2.4	Lokalisation des PeaGB1 in den akzessorischen Drüsen der Männchen .....	105
<b>4.3</b>	<b>Funktionelle Charakterisierung des GB1/GB2-Heterodimers .....</b>	<b>107</b>
4.3.1	Das PeaGB1/PeaGB2-Heteromer ist ein funktioneller GABA <sub>B</sub> -Rezeptor.....	107
4.3.2	Pharmakologische Untersuchung des GB1/GB2-Heteromers .....	108
4.3.3	Vergleich des pharmakologischen Profils des PeaGB1/PeaGB2-Heteromers mit der <i>in vivo</i> -Pharmakologie.....	113
<b>4.4</b>	<b>Ausblick.....</b>	<b>116</b>
<b>5.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>118</b>
<b>6.</b>	<b>ANHANG.....</b>	<b>134</b>
	Verwendete Abkürzungen .....	134
	Lebenslauf .....	142
	Danksagung .....	144
	Eidesstattliche Erklärung .....	145

## ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1.1	Synthese und Abbau von GABA.	2
Abb. 1.2	Schematischer Aufbau und Signaltransduktion der GABA <sub>B</sub> -Rezeptor-Subtypen 1 und 2.	8
Abb.2.1	Mechanismus der Vektorette-PCR.	25
Abb. 3.1	Strukturelle Eigenschaften der abgeleiteten PeaGB1-Aminosäuresequenz.	48
Abb. 3.2	Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenz des PeaGB1 mit den Sequenzen der orthologen Rezeptoren von <i>Drosophila melanogaster</i> (AF318272), <i>Mus musculus</i> (Q9WV18.1) und <i>Homo sapiens</i> 1a (Q9UBS5.1), sowie die Lokalisation der Transmembrandomänen, der potentiellen posttranslationalen Modifikationsmotive und der konservierten Aminosäurereste.	50
Abb. 3.3	Schematische Darstellung der Positionen der cDNA-Fragmente, erhalten aus der <i>P. americana</i> EST-Datenbank, im Vergleich zur isolierten PeaGB2-cDNA.	53
Abb. 3.4	Strukturelle Eigenschaften der abgeleiteten PeaGB2-Aminosäuresequenz.	54
Abb. 3.5.	Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenz des PeaGB2 mit den Sequenzen der orthologen Rezeptoren von <i>Drosophila melanogaster</i> (AF318273), <i>Mus musculus</i> (Q80T41.2) und <i>Homo sapiens</i> (CAA09942), sowie die Lokalisation der Transmembrandomänen, der potentiellen posttranslationalen Modifikationsmotive und der konservierten Aminosäurereste.	55
Abb. 3.6	Vergleich der PeaGB1- und PeaGB2-Aminosäuresequenzen zueinander.	58
Abb. 3.7	Phylogenetische Analyse der GABA <sub>B</sub> -Rezeptoren verschiedenster Spezies.	60
Abb. 3.8	A Schematische Darstellung der ausgewählten Antigenregionen für die Generierung polyklonaler Antiseren gegen PeaGB1 bzw. PeaGB2. B Western-Blot-Experiment zur Analyse der Spezifität von anti-PeaGB2.	62
Abb. 3.9	Western-Blot-Experimente zur Analyse der Spezifität von anti-PeaGB1.	63
Abb. 3.10	Präadsorption von anti-PeaGB1 gegen PeaGB1-ECL2.	64
Abb. 3.11	Untersuchung der gewebs- und organspezifischen Verteilung von PeaGB1 und PeaGB2.	65
Abb. 3.12	Untersuchung der PeaGB1-ähnlichen Immunreaktivität an Speicheldrüsen-Gesamtpräparaten	66
Abb. 3.13	Untersuchung der PeaGB1- und GABA-ähnlichen Immunreaktivität an Speicheldrüsen-Gesamtpräparaten.	67
Abb. 3.14	Untersuchung der PeaGB1- und synapsin-ähnlichen Markierung an Speicheldrüsen-Gesamtpräparaten.	68
Abb. 3.15	PeaGB1-Immunreaktivität im Schabengehirn - Gesamtansicht Proto- und Deutocerebrum.	69
Abb. 3.16	PeaGB1-ähnliche Immunreaktivität im optischen Lobus von <i>P. americana</i> .	70
Abb. 3.17	PeaGB1-ähnliche Immunreaktivität im Antennallobus von <i>P. americana</i> .	72
Abb. 3.18	PeaGB1-ähnliche Immunreaktivität in den Pilzkörper-Calyces und im Zentralkörper.	72
Abb. 3.19	PeaGB1- und Synapsin-ähnliche Markierung im Gehirn - Gesamtansicht Proto- und Deutocerebrum.	73

Abb. 3.20	Schematischer Aufbau der inneren Geschlechtsorgane von <i>P. americana</i> , nach Storch & Welsch (2009).	74
Abb. 3.21	PeaGB1-ähnliche Immunreaktivität der Nebendrüse von Schabenmännchen - Querschnitt.	75
Abb. 3.22	PeaGB1-ähnliche Immunreaktivität der Phallusdrüse von Schabenmännchen - Querschnitt.	76
Abb. 3.23	Detailaufnahmen der akzessorischen männlichen Geschlechtsdrüsen.	76
Abb. 3.24	Nachweis der Expression von PeaGB1 und DmGB2 in PeaGB1/DmGB2-transfizierten und nicht-transfizierten flpTM-Zellen.	77
Abb. 3.25	Dosis-abhängige Wirkung von GABA auf die intrazelluläre cAMP-Konzentration bei unterschiedlich transfizierten flpTM-Zelllinien und Ca <sup>2+</sup> -Bedingungen.	79
Abb. 3.26	Dosis-abhängige Wirkung putativer Agonisten auf die [cAMP] <sub>i</sub> der PeaGB1/PeaGB2- und PeaGB1/DmGB2-transfizierten Zelllinien.	81
Abb. 3.27	Dosis-abhängige Wirkung putativer Antagonisten auf die [cAMP] <sub>i</sub> der PeaGB1/PeaGB2- und PeaGB1/DmGB2-transfizierten Zelllinien.	82
Abb. 6.1	Nukleinsäuresequenz des GABA <sub>B</sub> -Rezeptor-Subtyps 1.	139
Abb. 6.2	Nukleinsäuresequenz des GABA <sub>B</sub> -Rezeptor-Subtyps 2.	139
Abb. 6.3	Nukleinsäuresequenz des erhaltenen cDNA-Fragmentes EST 106697 aus der <i>P. americana</i> EST-Datenbank.	140
Abb. 6.4	Nukleinsäuresequenz des erhaltenen cDNA-Fragmentes EST 104580 aus der <i>P. americana</i> EST-Datenbank.	140
Abb. 6.5	Nukleinsäuresequenz des erhaltenen cDNA-Fragmentes EST 71100 aus der <i>P. americana</i> EST-Datenbank.	140
Abb. 6.6	Western-Blot-Experiment zur Kontrolle der heterologen Expression des DmGB2 in flpTM-Zellen.	141

## TABELLENVERZEICHNIS

Tab. 4.1	Pharmakologische Charakteristika der GB1/GB2-Heteromere von <i>P. americana</i> , PeaGB1/DmGB2, <i>D. melanogaster</i> und Mammalia.	110
Tab. 6.1	Verwendete Geräte	135
Tab. 6.2	Kommerzielle Kits	136
Tab. 6.3	Bakterienstämme	137
Tab. 6.4	Vektoren	137
Tab. 6.5	Rezeptorliganden	137
Tab. 6.6	primäre Antikörper	137
Tab. 6.7	sekundäre Antikörper & weitere farbstoffgekoppelte Konjugate	138
Tab. 6.8	selbsterstellte, Oligonukleotide	138

# 1. EINLEITUNG

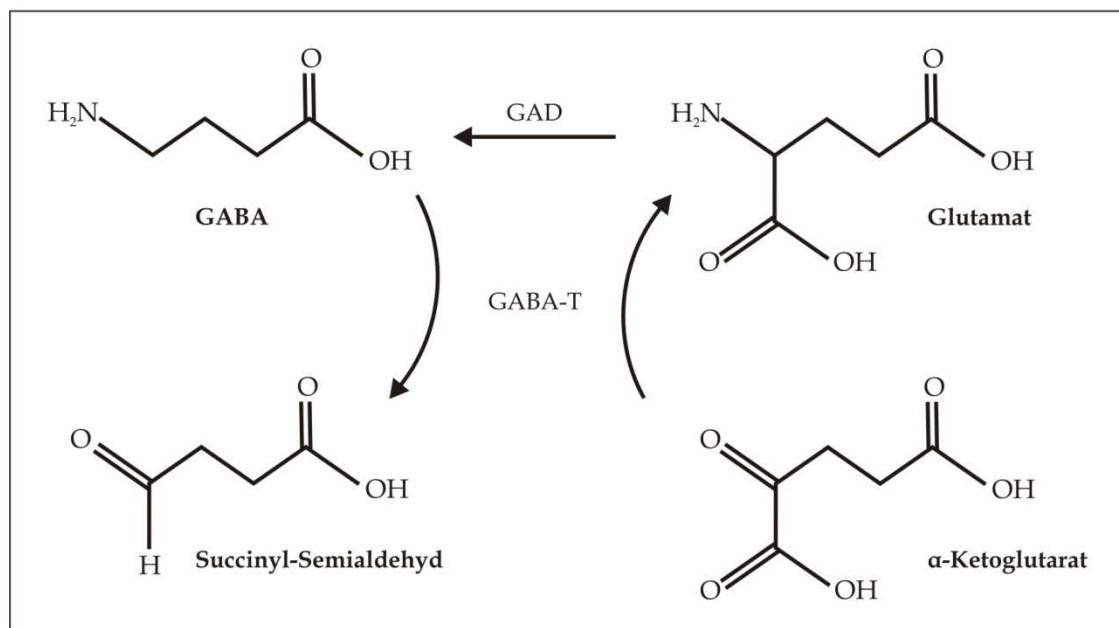
Die Aminosäure GABA ( $\gamma$ -Aminobuttersäure) gilt als der wichtigste inhibitorische Neurotransmitter im Zentralnervensystem von Wirbeltieren und Wirbellosen. Für die Neurotransmission sind daher in der Plasmamembran der Zielzelle GABA-Rezeptoren erforderlich, die abgestimmt auf die Eigenschaften des GABA-Signals eine spezifische Zellantwort auslösen. Insbesondere die metabotropen GABA<sub>B</sub>-Rezeptoren besitzen einen erheblichen Einfluss auf verschiedenste psychologische sowie neurologische Erkrankungen beim Menschen. Daher wird ihre Untersuchung in der Wirbeltierforschung stetig vorangetrieben. Dagegen ist es umso erstaunlicher, dass das Wissen über diese Rezeptoren speziell bei Insekten mehr als lückenhaft ist. Einige physiologische Experimente lieferten starke Indizien für das Vorhandensein von GABA<sub>B</sub>-Rezeptoren in der Amerikanischen Großschabe *Periplaneta americana* (Hue, 1991; Bai & Sattelle, 1995; Rotte *et al.*, 2009). Dieser mittlerweile epidemisch vorkommende Schädling und Krankheitsüberträger ist seit mehr als 100 Jahren ein etablierter Modellorganismus für verhaltensbiologische, morphologische und physiologische Fragestellungen.

In der vorliegenden Arbeit wurden erstmals die GABA<sub>B</sub>-Rezeptor-Subtypen 1 und 2 der Amerikanischen Großschabe molekularbiologisch charakterisiert. Die umfassende Analyse des pharmakologischen Profils dieses Rezeptor-Heteromers *in vitro* und der Verteilung des Subtyps 1 im nativen Gewebe erweitern den bisherigen Kenntnisstand über diese GABA-Rezeptoren in erheblichem Maße und bilden damit den Grundstein für zukünftige umfassende physiologische Untersuchungen zur GABA-Transmission.

## 1.1 Der Neurotransmitter GABA - Metabolismus & Funktion

GABA (*gamma-aminobutyric acid*) als natürlicher Neurotransmitter wurde 1959 durch Florey und McLennan entdeckt (Bowery & Smart, 2006). Als nichtproteinogene Aminosäure besitzt GABA die Aminogruppe am dritten Kohlenstoffatom nach der Carboxygruppe. Die Synthese erfolgt über verschiedene Stufen vorwiegend aus

Glucose. Das im Krebszyklus gebildete  $\alpha$ -Ketoglutarat wird durch die  $\alpha$ -Oxoglutarat-Transaminase (GABA-T) zu L-Glutamat umgewandelt. Die Glutamat-Decarboxylase (GAD) wiederum katalysiert die Decarboxylierung von L-Glutamat zu GABA. Sowohl bei Vertebraten als auch bei der Taufliege *Drosophila melanogaster* sind zwei GAD-Isoformen bekannt (Kaufman *et al.*, 1986; Jackson *et al.*, 1990). Sie gelten als limitierender Faktor bei der Bereitstellung der  $\gamma$ -Aminobuttersäure (Tappaz *et al.*, 1977). Das in den synaptischen Spalt freigesetzte GABA wird von der Präsynapse bzw. Astrozyten über GABA-Transporter aufgenommen und mithilfe der GABA-T zu Succinyl-Semialdehyd umgesetzt (Kugler, 1993). Die Aufnahme von GABA in die Zellen erfolgt elektrogen zusammen mit zwei  $\text{Na}^+$  und vermutlich einem  $\text{Cl}^-$  (Kanner, 2006). Anschließend kann das in den Astrozyten über weitere Stufen entstandene Glutamin in das GABAerge Neuron zurücktransportiert und dort recycelt werden.



**Abb. 1.1: Synthese und Abbau von GABA.**  $\alpha$ -Ketoglutarat aus dem Krebszyklus wird durch GABA-Transaminase (GABA-T) zu Glutamat umgewandelt. Glutamat wird durch die Glutamat-decarboxylase (GAD) zu  $\gamma$ -Aminobuttersäure (GABA) decarboxyliert. Nach der GABA-Freisetzung erfolgt der Abbau von GABA, ebenfalls durch die GABA-T. Succinyl-Semialdehyd geht wieder in den Krebszyklus ein.

GABA zeigt eine weite Verbreitung im Zentralnervensystem (ZNS) sowohl bei Vertebraten als auch bei Invertebraten (Robinson & Wells, 1973; Schäfer & Bicker, 1986; Homberg *et al.*, 1987) und gilt überdies als wichtigster inhibitorischer Neurotransmitter (Sivilotti & Nitri, 1991; Garduno *et al.*, 2002). Aber auch exzitatorische Wirkungen von GABA sind bekannt (Zhang *et al.*, 1998; Rotte *et al.*,



2009; Kobayashi *et al.*, 2012). Für die Amerikanische Großschabe ist die Verteilung dieses Neurotransmitters im ZNS beschrieben (Blechsmidt *et al.*, 1990; Malun, 1991; Distler *et al.*, 1998; Yamazaki *et al.*, 1998). Dabei kommt GABA insbesondere in lokalen Interneuronen vor. Zudem hemmt GABA in den ersten 17 Tagen nach der Häutung der Schabe die sekretorische Aktivität der Häutungsdrüse (Richter & Böhm, 1997). Weiterhin zeigen GABAerge Riesenneurone in den Pilzkörpern eine Spontanaktivität, welche die Aktivität der dort lokalisierten Kenyon-Zellen unterdrückt (Nishino & Mizunami, 1998). Auch ein Einfluss von GABA auf die Muskulatur ist bekannt. Die Applikation von GABA erhöht in Skelettmuskelzellen bei einem gleichzeitigen kurzen Druckimpuls kurzfristig die Membranleitfähigkeit (Schnee *et al.*, 1997). Die Lokalisation von GABA im Motorneuron  $D_f$  ist nachgewiesen (Sattelle *et al.*, 1988; Buckingham *et al.*, 2009; siehe auch 1.4).

## **1.2 Die Rezeptoren des Neurotransmitters GABA**

Die Wirkungen von GABA werden sowohl über ionotrope  $GABA_A$ -Rezeptoren als auch über metabotrope  $GABA_B$ -Rezeptoren vermittelt. Nachfolgend wird zunächst ein kurzer Überblick über die  $GABA_A$ -Rezeptoren gegeben. Es folgt eine eingehende Vorstellung der  $GABA_B$ -Rezeptoren, welche zur Superfamilie der G-Proteingekoppelten Rezeptoren gehören.

### **1.2.1 $GABA_A$ -Rezeptoren sind ligandengesteuerte Ionenkanäle**

$GABA_A$ -Rezeptoren fungieren als pentamere ligandengesteuerte  $Cl^-$ -Kanäle und gehören zur *cys-loop*-Rezeptor-Superfamilie (Nayeem *et al.*, 1994). Es gibt bei Vertebraten eine Vielzahl von  $GABA_A$ -Rezeptor-Untereinheiten und Spleißvarianten, die durch verschiedene Kombinationsmöglichkeiten zur Ausbildung von Rezeptorsubtypen mit unterschiedlichsten pharmakologischen Eigenschaften führen können (Simon *et al.*, 2004). Die frühere Unterteilung der ionotropen GABA-Rezeptoren in  $GABA_A$ -Rezeptoren und  $GABA_C$ -Rezeptoren ist derweil hinfällig, da eine Komplexbildung zwischen den Untereinheiten bekannt ist (Milligan *et al.*, 2004;

Olsen & Sieghart, 2008). Die Rezeptoren besitzen zwei Bindungsstellen für GABA. Die Bindung des Liganden führt zumeist durch den Cl-Influx zu einem schnellen inhibitorischen Antwortverhalten. Es sind aber auch exzitatorische Wirkungen der GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren bekannt (Übersichten bei: Ben-Ari, 2002). Bis heute konnten mehr als 100 GABA<sub>A</sub>-Rezeptor-Agonisten nachgewiesen werden (Johnston, 1996). In Deutschland verbotene Insektizide, wie Lindan und Dieldrin, aber auch das zugelassene Fipronil wirken ebenfalls über diese Rezeptoren. Lindan und Dieldrin unterdrücken zudem GABA-induzierte Ca<sup>2+</sup>-Ströme bei Vertebraten (Nagata & Narahashi, 1994).

Die bei Insekten bekannteste GABA<sub>A</sub>-Rezeptor-Untereinheit ist RDL (*Resistent to Dieldrin*; Ffrench-Constant *et al.*, 1991; Buckingham *et al.*, 2005). Weiterhin sind die Untereinheiten GRD und LCCH3 beschrieben, die miteinander Heteromere bilden (Gisselmann *et al.*, 2004). RDL zeigt eine weite Verbreitung im Gehirn sowie im Suboesophagealganglion (SOG) von *P. americana* und *D. melanogaster* (Sattelle *et al.*, 2000; Harrison *et al.*, 1996). Eine Beteiligung an der Verarbeitung visueller, olfaktorischer und mechanosensorischer Informationen ist daher wahrscheinlich. Zudem wird ein Einfluss auf die Muskelkontraktion vermutet (Sattelle *et al.*, 1988; Schnee *et al.*, 1997). Die GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren können in der Amerikanischen Großschabe durch die Proteinkinase C und CaMKinase II reguliert werden. Eine Hemmung der Proteinkinase C bewirkt eine verringerte Sensitivität des Rezeptors für das Insektizid Fipronil (Murillo *et al.*, 2011).

## 1.2.2 GABA<sub>B</sub>-Rezeptoren sind G-Protein-gekoppelte Rezeptoren

### 1.2.2.1 G-Protein-gekoppelte Rezeptoren

G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCRs) stellen die größte Gruppe an Zelloberflächen-Rezeptoren in einer Zelle dar. Darüberhinaus kodieren etwa 3-4% des Genoms von Säugetieren bzw. 1% des *Drosophila*-Genoms für diese Rezeptor-Superfamilie (Römpler *et al.*, 2007; Vanden Broeck, 2001). Der Mensch besitzt allein über 800 GPCR-Sequenzen im Genom (Frederiksson *et al.*, 2003). Etwa 50 GPCRs sind derzeit die molekulare Zielstruktur von mehr als der Hälfte aller erhältlichen

Pharmaka (Lagerstrom & Schioth, 2008). Sie übersetzen extrazelluläre Reize in intrazelluläre Signalkaskaden, die in der Zielzelle eine spezifische dem Reiz angepasste Antwort hervorrufen. Als Reize gelten dabei Photonen, Ionen, kleine organische Moleküle bis hin zu Peptiden und Proteinen (Bockaert & Pin, 1999). Diese können als sensorische Reize, wie z.B. Düfte, oder als interzelluläre Signalmoleküle, wie Hormone und Neurotransmitter, physiologische Funktionen erfüllen. Das gemeinsame funktionelle Merkmal von GPCRs ist die Kopplung an GTP-bindende Proteine (G-Proteine). Diese werden durch GPCRs aktiviert und führen durch die Regulation nachgeschalteter Proteine zu einer spezifischen Zellantwort (Lefkowitz, 2004).

G-Protein-gekoppelte Rezeptoren weisen trotz beachtlicher struktureller Diversität eine gemeinsame Architektur auf. Sie besitzen als integrale Membranproteine sieben membrandurchspannende  $\alpha$ -Helices (Probst *et al.*, 1992; Fraser, 1995). Der N-Terminus ist extrazellulär, der C-Terminus hingegen intrazellulär lokalisiert. Die Transmembrandomänen (TMs) sind durch alternierende intra- und extrazelluläre Schleifen separiert (siehe Abb. 1.2). Im Gegensatz zu einer einheitlichen Länge der TMs (20-28 Aminosäuren) ist die Länge der Termini und Schleifen außerordentlich variabel (Ji *et al.*, 1998). Die intra- und extrazellulären Schleifen können zudem posttranslational modifiziert werden. Dies kann die Stabilität und Aktivität des Rezeptors beeinflussen. Durch das Anfügen einer Palmitinsäure an einen C-terminal lokalisierten konservierten Cystein-Rest kann der Rezeptor zusätzlich in der Membran verankert werden. Infolgedessen entsteht eine vierte intrazelluläre Schleife (Ji *et al.*, 1998; Chini & Parenti, 2009).

GPCRs werden nach der **GRAFS**-Klassifizierung (Frederiksson *et al.*, 2003) in folgende fünf Familien unterteilt: **Glutamat** (Familie C), **Rhodopsin** (Familie A), **Adhäsion**, **Frizzled/Taste 2** und **Secretin** (Familie B). Trotz der gemeinsamen Gesamtarchitektur besitzen die Familien insgesamt nur eine sehr geringe Ähnlichkeit zueinander. Sie liegt bei weniger als 20% Identität im Bereich der TMs. Die Familie A, zu der u. a. die Rezeptoren für biogene Amine gehören, ist die weitaus größte Rezeptorfamilie und bislang am besten untersucht (Übersichten bei: Katritch *et al.*, 2013). Die Familie C umfasst die metabotropen Glutamat-Rezeptoren, Calciumsensitive Rezeptoren, Geschmacksrezeptoren für Süßstoffe und

Aminosäuren, Pheromon-Rezeptoren, Duft-Rezeptoren bei Fischen, sieben Waisen-Rezeptoren sowie die metabotropen GABA<sub>B</sub>-Rezeptoren (Chun *et al.*, 2012).

### 1.2.2.2 Aktivierung und Inaktivierung von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren

Die Bindung eines Agonisten an die orthosterische Bindungsstelle des GPCRs führt zur Aktivierung des G-Proteins, welches infolgedessen in der Lage ist bestimmte Effektoren in ihrer Aktivität zu modulieren. Die einzelnen GPCR-Familien unterscheiden sich u. a. anhand der Lokalisation dieser Bindungsstelle (Bockaerdts & Pin, 1999). So interagieren Liganden von aminergen Rezeptoren mit AS-Resten der Transmembrandomänen. Familie C-GPCRs binden ihre Liganden im N-Terminus (Wellendorph & Bräuner-Osborne, 2009). Der Mechanismus der Interaktion des Rezeptors mit dem Liganden wurde von Leff (1995) als *two-state model* beschrieben. Die Bindung des Agonisten führt zu einer Konformationsänderung des Rezeptors. Dadurch wird das G-Protein, welches aus den drei Untereinheiten (UE)  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$  besteht, aktiviert. Im inaktiven Zustand ist das G-Protein membranassoziiert und interagiert mit der intrazellulären Schleife 2 und 3 eines GPCRs (Wess, 1997). Nach der Aktivierung dissoziiert das G-Protein in die Untereinheiten  $\alpha$ -GTP und  $\beta\gamma$  (Wess, 1997). Die aus dem Komplex gelösten G-Protein-UE sind nun in der Lage Effektorproteine zu regulieren (Übersichten bei: McCudden *et al.*, 2005; Milligan & Kostenis, 2006; Kimple *et al.*, 2011). Für die UE gibt es verschiedene Isoformen, welche die Regulierung unterschiedlichster Effektoren ermöglichen. So können  $\alpha$ -UE in vier Familien eingeteilt werden. G<sub>s</sub>-Proteine aktivieren, G<sub>i</sub>-Proteine wiederum inhibieren Adenylzyklen. G<sub>12/13</sub>-Proteine regulieren RhoGEFs. G<sub>q/11</sub>-Proteine können mit Phosphoinositid-spezifischen Phospholipase C-Isozymen interagieren (McCudden *et al.*, 2004). Die in ihrer Konzentration veränderten sog. sekundären Botenstoffe (*second messenger*) können u. a. die Öffnungswahrscheinlichkeit von Ionenkanälen aber auch die Genexpression in einer Zelle modulieren.

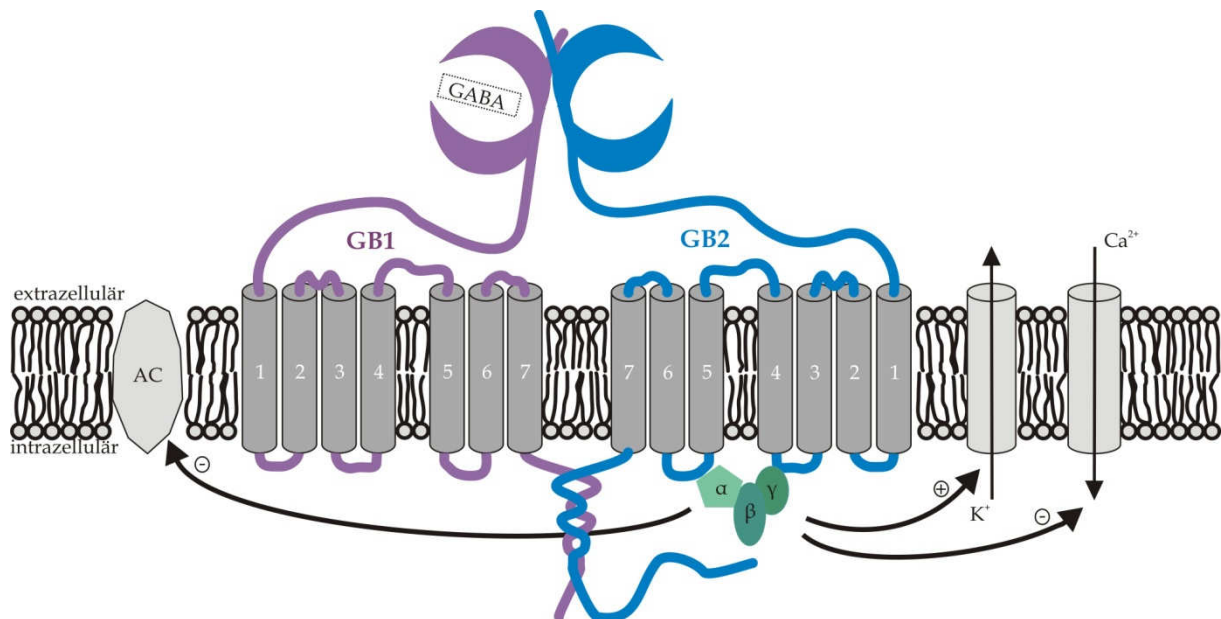
GPCRs können auch, unabhängig von G-Proteinen, an sog. GPCR-interagierende Proteine koppeln. So führt u. a. die Bindung von Arrestin an einem phosphorylierten GPCR zu dessen Desensitivierung durch die Störung der GPCR-G-Protein-

Interaktion (Bockaerdt & Pin, 1999). Infolgedessen kann der Rezeptor inaktiviert werden. Solche Rückkopplungsmechanismen können allgemein über die Phosphorylierung von Serin- und Threoninresten des Rezeptors initiiert werden. Die dadurch veränderte Rezeptorkonformation kann die Bindung des Liganden bzw. des G-Proteins an den Rezeptor negativ beeinflussen (Carman & Benovic, 1998).

### 1.2.2.3 GABA<sub>B</sub>-Rezeptoren

GABA<sub>B</sub>-Rezeptoren gehören zur Familie C der GPCRs und wurden erstmals 1981 durch Hill und Bowery beschrieben. Vertebraten exprimieren die GABA<sub>B</sub>-Rezeptor-Subtypen 1 und 2 (GB1 und GB2). Für einen vollständig funktionsfähigen Rezeptor müssen jedoch beide Subtypen miteinander interagieren (Kaupmann *et al.*, 1998; White *et al.*, 1998; Ng *et al.*, 1999; Filippov *et al.*, 2000). Es gibt eine klare Aufgabenverteilung: Der GB1 bindet den orthosterischen Liganden. Der GB2 wiederum ist an ein G-Protein gekoppelt (Galvez *et al.*, 2001). Neuere Arbeiten zeigen, dass sich Heterodimere zu höhermolekularen Proteinkomplexen zusammenlagern können (Maurel *et al.*, 2008; Comps-Agrar *et al.*, 2011; Comps-Agrar *et al.*, 2012). Diesem Umstand angepasst, wird in dieser Arbeit der Begriff GB-Heteromer verwendet. Für beide Subtypen sind verschiedene Spleißvarianten bekannt (Kaufmann *et al.*, 1997; Calver *et al.*, 2000; Übersichten bei: Bettler *et al.*, 2004). Die prominentesten jedoch sind GB1a und GB1b, die sich durch die Anwesenheit einer sog. Sushi-Domäne im N-Terminus des GB1a voneinander unterscheiden (Kaupmann *et al.*, 1997). Die GBs zeichnen sich durch eine im N-Terminus lokalisierte Venusfliegenfallendomäne aus. Diese bildet bei dem GB1 die orthosterische Bindungsstelle. Weiterhin besitzen die Rezeptoren C-terminal der sieben Transmembrandomänen eine *coiled-coil* Domäne. Beide Subtypen interagieren miteinander über die N-terminale extrazelluläre Domäne (Margeta-Mitrovic *et al.*, 2001), die Transmembrandomänen (Schwarz *et al.*, 2000; Monnier *et al.*, 2011) und die im C-Terminus lokalisierte *coiled-coil* Domäne (White *et al.*, 1998; Kuner *et al.*, 1999; siehe Abb. 1.2). Der Vollständigkeit halber soll die Existenz des GABA<sub>BL</sub>-Rezeptors bei Vertebraten erwähnt werden (Calver *et al.*, 2003). Die Funktion dieses Rezeptor-Subtyps ist bislang unbekannt. Das Heterodimer aus GB1 und GB2 vermittelt seine Wirkung über G<sub>i</sub> oder G<sub>o</sub>-Proteine (Bettler *et al.*, 2004). Die  $\alpha$ -UE dieser G-Proteine ist

bei Aktivierung in der Lage Adenylylzyklen zu hemmen. Dadurch sinkt die intrazelluläre cAMP-Konzentration. cAMP kann u. a. die Proteinkinase A (PKA) aktivieren. Diese ist dann in der Lage eine Vielzahl an Effektorproteinen, wie Ionenkanäle und Enzyme, zu phosphorylieren, um somit ihre Aktivität zu verändern. cAMP reguliert zudem den Transkriptionsfaktor CREB (*cAMP response element binding*; Mayr & Montminy, 2001).



**Abb. 1.2:** Schematischer Aufbau und Signaltransduktion der GABA<sub>B</sub>-Rezeptor-Subtypen 1 und 2. (verändert nach Padgett & Slesinger, 2010). Die GABA<sub>B</sub>-Rezeptor-Subtypen 1 (violett) und 2 (blau) interagieren miteinander über die Venusfliegenfallendomäne im N-Terminus, die sieben Transmembrandomänen und die im C-Terminus lokalisierte *coiled-coil*-Domäne zur Bildung eines vollständig funktionsfähigen Rezeptors. Der GB1 ist in der Lage den Liganden zu binden. Der GB2 ist an das G-Protein (grün) gekoppelt. Die aktivierte  $\alpha$ -Untereinheit des G-Proteins inhibiert die Adenylylzyklase (AC). Die  $\beta\gamma$ -Untereinheit kann GIRK-Kanäle aktivieren bzw. den Ca<sup>2+</sup>-Influx über spannungsabhängige Ca<sup>2+</sup>-Kanäle unterdrücken.

Die  $\beta\gamma$ -UE hemmt vorwiegend spannungsabhängige Ca<sup>2+</sup>-Kanäle des P/Q- und N-Typs in der Präsynapse (Chen & van den Pol, 1998; Vigot *et al.*, 2006). Infolgedessen wird die Freisetzung des in der Präsynapse lokalisierten Neurotransmitters reduziert bzw. unterdrückt. GBs können als Autorezeptoren die eigene Transmitterfreisetzung modulieren. Als Heterorezeptoren hingegen beeinflussen GBs präsynaptisch die Freisetzung eines anderen Neurotransmitters (Huston *et al.*, 1990; Vogt & Nicoll, 1999). Die  $\beta\gamma$ -UE ist zudem in der Lage G-Protein-aktivierte einwärtsgerichtete K<sup>+</sup> (GIRK) -Kanäle zu aktivieren. Die Öffnung der K<sup>+</sup>-Kanäle führt durch den K<sup>+</sup>-Efflux zu einer Hyperpolarisation der Zelle (White *et al.*, 1998; Schuler *et al.*, 2001). Die weite Verbreitung der GBs im ZNS von

Vertebraten und ihrer Beteiligung an der Ätiologie verschiedener physiologischer und psychologischer Erkrankungen haben diese Rezeptoren zu einem medizinisch äußerst bedeutenden Forschungsgebiet gemacht. Eine Beteiligung dieser Rezeptoren bei Erkrankungen wie Epilepsie, Hyperalgesie und Autismus ist nachgewiesen. Zudem unterdrückt der GB-Agonist Baclofen die durch die Einnahme von Drogen, wie Nikotin, Alkohol, Kokain und Heroin, verstärkte Belohnungsantwort und hilft daher eine Suchtentwicklung für diese Substanzen einzudämmen (Schuler *et al.*, 2001; Prosser *et al.*, 2001; Gassmann *et al.*, 2004; Fatemi *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2009; Addolorato *et al.*, 2007, 2011; Cousins *et al.*, 2002).

Insekten besitzen drei GABA<sub>B</sub>-Rezeptor-Subtypen. Es wurden für Insekten nur die cDNAs der drei GBs von *Drosophila melanogaster* vollständig kloniert (Mezler *et al.*, 2001). Für die Tabakknospeneule *Heliothis virescens* ist kürzlich eine partielle cDNA-Sequenz des GB1 beschrieben worden (Pregitzer *et al.*, 2013). GB1 und GB2 bilden ebenfalls ein funktionelles Heteromer (Mezler *et al.*, 2001). Für den GB3, der kein orthologer Rezeptor des GABA<sub>BL</sub>-Rezeptors der Vertebraten ist, konnte bisher keine Funktion zugewiesen werden (Mezler *et al.*, 2001). Über die Funktion der Rezeptoren bei Invertebraten ist generell nur sehr wenig bekannt. Es gibt einige umfassende Arbeiten zur Verteilung des GB2 im ZNS von *D. melanogaster* (Enell *et al.*, 2007; Root *et al.*, 2008; Okada *et al.*, 2009; Kahsai *et al.*, 2012). Eine Beteiligung der GBs bei der Verarbeitung olfaktorischer Informationen ist nachgewiesen (Wilson & Laurent, 2005; Olsen & Wilson, 2008; Lei *et al.*, 2013). Weiterhin verändert eine unterdrückte Expression von GBs in den Insulin-produzierenden Zellen des *Drosophila*-Gehirns den Kohlenhydrat- sowie Lipidstoffwechsel und verkürzt die Lebenserwartung (Enell *et al.*, 2010). GBs modulieren wahrscheinlich die circadiane Aktivität durch den Einfluss der Rezeptoren auf die Ca<sup>2+</sup>-Konzentration der *small ventral lateral neurons* (s-LNV; Hamasaka *et al.*, 2005), die eine Subpopulation der sog. Uhrzellen darstellen.

### **1.3 Hinweise zur Expression von GABA<sub>B</sub>-Rezeptoren in *P. americana***

Erste Hinweise auf das Vorhandensein von GABA<sub>B</sub>-Rezeptoren in der Amerikanischen Großschabe zeigten pharmakologische Untersuchungen am terminalen Abdominalganglion (A6) sowie am schnellen Motorneuron Df (Hue, 1991; Bai & Sattelle, 1995). Das Motorneuron Df ist aufgrund der Beteiligung an der neuronalen Kontrolle von Beinbewegungen ein etabliertes Forschungsobjekt. Es innerviert den bei Laufbewegungen aktivierten metathorakalen coxalen Senker (*coxal depressor muscle*; Iles, 1971). Im Motorneuron führt die Applikation der bei Vertebraten-GBs wirksamen Agonisten 3-APPA und SKF97541 zu einer Hyperpolarisation. Diese konnte nicht durch den GABA<sub>A</sub>-Rezeptor-Antagonisten Picrotoxin blockiert werden (Bai & Sattelle, 1995). Die verwendeten GB-Antagonisten zeigten allerdings auch keine antagonistische Wirkung. Inzwischen ist aber bekannt, dass diese Substanzen nur eine geringe Bindungsaffinität für GBs besitzen.

In der Speicheldrüse von *P. americana* konnten physiologische Untersuchungen einen GB-vermittelten Einfluss von GABA auf die Bildung des Primärspeichels aufzeigen (Rotte *et al.*, 2009). Die Speicheldrüsen von *P. americana* sind paarig und enden jeweils in vier traubenförmige Lobuli, die eine große Anzahl an sekretorischen Acini enthalten. Der in den Ausführungsgang sezernierte Primärspeichel wird anschließend durch Gangzellen modifiziert und über ein ausgedehntes Gangsystem transportiert. Der Speichel kann im Reservoir gespeichert werden. Über den Hauptspeichelgang gelangt der hypoosmotische Endspeichel bis zum Hypopharynx (Sutherland & Chillsey, 1968). Die sekretorischen Acini der Speicheldrüse von *P. americana* bestehen aus drei Zelltypen: zentrale (C-) Zellen, periphere (P-) Zellen sowie zentroazinäre Zellen (Just & Walz, 1994). Zwei P-Zellen bilden dabei die Basis in jedem Acinus. Sie weisen ausgeprägte apikale und basolaterale Einfaltungen auf (Just & Walz, 1994) und sind daher für den Wasser- und Ionentransport in das Drüsenlumen verantwortlich. Es folgen proteinsezernierende C-Zellen mit ausgeprägtem rauem endoplasmatischem Retikulum sowie einer Vielzahl an sekretorischen Vesikeln. Die flachen zentroazinären Zellen sind apikal der C-Zellen lokalisiert (Just & Walz, 1994). Die Innervation der Speicheldrüse erfolgt u. a. durch



den Speichelgangsnerv, welcher im Suboesophagealganglion (SOG) entspringt. Der Speichelgangsnerv enthält die Axone der Speichelneurone 1 (SN1) und 2 (SN2) sowie weitere kleinere Axone. Das SN1 besitzt als Neurotransmitter Dopamin (Elia *et al.*, 1994) und innerviert neben den P-Zellen die Gangzellen sowie das Reservoir und den -muskel. Die dünneren Axone sind serotonerg und innervieren die C- und P-Zellen, sowie ebenfalls das Reservoir und den Reservoirmuskel (Baumann *et al.*, 2002, 2004). Rotte und Kollegen (2009) konnten GABA als Neurotransmitter des SN2 identifizieren. Intrazelluläre Ableitungen an sekretorischen Acini von isolierten Drüsen zeigen, dass die Applikation von GABA zu keiner Änderung des Membranpotentials führt. Erst die Zugabe von GABA während der Stimulierung des Speichelgangsnervs führt zu einer Verstärkung der elektrischen Antwort der Acinuszellen, die in einer erhöhten Flüssigkeits- und Proteinsekretion resultiert (Rotte *et al.*, 2009). Daher wird gegenwärtig von einer präsynaptischen Wirkung von GABA, möglicherweise auf serotonerge (und dopaminerge) Fasern, ausgegangen (Rotte, 2009). Für die Untersuchung, welche GABA-Rezeptoren die Wirkung von GABA vermitteln, wurden etablierte Agonisten sowie Antagonisten von GABA<sub>A</sub>- und GABA<sub>B</sub>-Rezeptoren getestet. Die GABA<sub>B</sub>-Rezeptor-Agonisten SKF97541 und Baclofen führen ebenfalls zu einer verstärkenden elektrischen Antwort. Die GB-Antagonisten CGP54626 und CGP52432 unterdrücken diesen Effekt in Anwesenheit von GABA oder SKF97541 (Rotte, 2009).

## 1.4 Zielsetzung dieser Arbeit

Aufgrund der physiologischen Indizien für die Existenz von GABA<sub>B</sub>-Rezeptoren in *P. americana* ist für ein grundlegendes Verständnis die molekulare und pharmakologische Charakterisierung dieser Rezeptoren unabdingbar. Dies gilt insbesondere für die Aufklärung der modulatorischen Rolle der GBs bei der Bildung des Primärspeichels in der Speicheldrüse von *Periplaneta americana*. Diese Arbeit beinhaltet drei Teilprojekte, die partiell aufeinander aufbauen.

- ❖ Für die Charakterisierung der GABA<sub>B</sub>-Rezeptor-Subtypen 1 und 2 sollen zunächst die cDNA-Sequenzen dieser Rezeptoren aufgeklärt werden. Nachfolgend sollen diese bioinformatisch auf GABA<sub>B</sub>-Rezeptor-typische Domänen und konservierte AS-Reste untersucht werden. Die phylogenetische Einordnung dieser Rezeptoren soll erfolgen.
- ❖ Um die Lokalisation der Rezeptor-Proteine zu ermöglichen, sollen polyklonale Antikörper gegen spezifische Rezeptor-Bereiche generiert werden. Western-Blot-Analysen sollen die Expression der Rezeptoren in verschiedenen Organen und Geweben aufzeigen. Anschließend sollen immunhistochemische Analysen verschiedener Gewebe folgen. Insbesondere soll die Frage geklärt werden, in welchen Speicheldrüsen-innervierenden Neuronen die GBs lokalisiert sind und wie die modulatorische Wirkung von GABA zustande kommt.
- ❖ Im Anschluss an die Charakterisierung sollen die GABA<sub>B</sub>-Rezeptor-Subtypen in einem heterologen HEK-Zellsystem stabil exprimiert werden. Die Funktionalität des GB-Heteromers soll überprüft werden. Ist das Ergebnis dieser Untersuchung positiv, kann das pharmakologische Profil des Rezeptor-Heteromers analysiert werden. Der Einfluss des GB2 auf die pharmakologischen Eigenschaften soll durch den Vergleich dieser Daten mit dem pharmakologischen Profil eines chimären Rezeptor-Heteromers aus dem GB1 von *P. americana* und dem GB2 aus *D. melanogaster* untersucht werden. Das *in vitro* erhaltene pharmakologische Profil des Schaben-GB-Heteromers ist mit der *in vivo*-Pharmakologie zu vergleichen.

## 2. MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Chemikalien & Geräte

Verbrauchsmaterial und Chemikalien (*pro analysis* Qualität) wurden von den Firmen VWR (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) und Sigma (Taufkirchen) bezogen. Die Synthese von Oligonukleotid-Primern erfolgte durch die Firma TIB MOLBIOL Syntheselabor GmbH (Berlin). Die Sequenzierung von Plasmid-DNA wurde durch die Firma GATC (Konstanz) durchgeführt. Verbrauchsmaterial, Lösungen, Medien und Wasser wurden, soweit nicht anders vermerkt, vor Gebrauch unter Verwendung eines Varioklav Dampfsterilisators bei 121 °C 20 min sterilisiert. Verwendete Geräte, Chemikalienszusammenstellungen (Kits), Bakterienstämme und Vektoren werden im Anhang aufgeführt.

#### Standardlösungen:

Tris-EDTA(TE)-Puffer	10 mM Tris-HCl (pH 7,4) 1 mM EDTA
DEPC-H <sub>2</sub> O	0,1% Diethylpyrocarbonat (Sigma) über Nacht rühren, autoklavieren
Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS)	140 mM NaCl 2,6 mM KCl 8,1 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1,5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH 7,4

### 2.2 Versuchstiere und deren Präparation

#### 2.2.1 Haltung der Versuchstiere

Es wurden Schaben der Art *Periplaneta americana* LINNAEUS (Blattodea, Blattidae) aus der institutseigenen Zucht als Versuchstiere verwendet. Die Haltung erfolgte bei einem konstanten Licht-Dunkel-Rhythmus von 12 h : 12 h, sowie einer relativen Luftfeuchtigkeit von 60% und 27 °C. Es wurden *ad libitum* Wasser und Futter zur Verfügung gestellt. Nymphen erhielten Apfelstückchen und Trockenfutter-Mehl,

Imagines ausschließlich Trockenfutter-Pellets der Firma Ssniff, Soest. Als Versteckmöglichkeit wurden Eierkartons verwendet. Imagines beider Geschlechter wurden für die Experimente verwendet.

### 2.2.2 Gewebepräparation

Alle Gewebe wurden in eiskaltem Schabenringer (pH 7,4) unter Verwendung eines Binokulars präpariert. Für molekularbiologische Fragestellungen verwendete Gewebe wurden direkt im Anschluss an die Präparation weiterverwendet oder in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert.

Schaben-Ringer: 160 mM NaCl, 10 mM KCl, 2 mM  $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ , 2 mM  $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ , 10 mM Tris-Base, 10 mM Glucose; pH 7,4

#### Präparation von Gehirn, Corpora cardiaca/Corpora allata-Komplex und Suboesophagealganglion (SOG)

Nach der Entfernung beider Antennen wurde das Versuchstier durch Dekapitation getötet. Der Kopf wurde mithilfe von Stecknadeln in einer Präparierschale fixiert, die Kopfkapsel durch Schnitte an den Komplexaugen, der Frons und entlang der Kopfperipherie geöffnet. Das darunter befindliche Gehirn sowie der Corpora cardiaca/Corpora allata-Komplex wurden vorsichtig herauspräpariert und von Tracheen befreit. Letzterer befindet sich kaudal des Gehirns und ist mit diesem über mehrere Nervenfasern verbunden. Nach der Entnahme wurde der Kopf der Schabe so gedreht, dass die Kopfoberseite zum Boden der Petrischale zeigt. Die nun sichtbare Hinterseite des Kopfes wurde fixiert, das SOG vorsichtig frei präpariert und von den Konnektiven getrennt.

#### Präparation von Organen und Geweben

Nach der Dekapitation wurden Beine und Flügel vom Thorax der Schabe entfernt. Thorax und Abdomen wurden mit der ventralen Seite nach unten in einer mit Schabenringer gefüllten Petrischale fixiert und durch einen medianen Schnitt dorsal geöffnet. Nun konnten u. a. die freiliegenden paarigen Speicheldrüsen, das Bauchmark sowie die Geschlechtsorgane entnommen werden.

## 2.3 Molekularbiologische Methoden

### 2.3.1 DNA-Extraktion nach Gustincich *et al.* (1991)

Für die Extraktion der genomischen DNA wurden Köpfe von *P. americana* unter Zugabe von flüssigem Stickstoff mit Mörser und Pistill homogenisiert und anschließend in 500 µl 65 °C erwärmten DTAB-Puffer überführt. Nach der Inkubation für 30 min bei 65 °C und 300 UpM wurden 50 µl Proteinase K (10 mg/ml) hinzugegeben und weitere 4 h bei 55 °C geschüttelt. Nach erneuter Zugabe von 50 µl Proteinase K wurde das Homogenat über Nacht im Wasserbad bei 55 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden 50 µl RNase-Cocktail (500 U/ml, Ambion) zugegeben und 1 h bei 37 °C inkubiert. Für die Zwei-Phasen-Extraktion wurde 1 Vol. Chloroform/Isoamylalkohol (24 : 1) hinzugegeben, 20 s durch vorsichtiges Invertieren gemischt und anschließend 3 min bei 14.000 x g zentrifugiert. Der Überstand sowie die Interphase wurden in ein neues Reaktionsgefäß (RG) überführt und erneut der Zwei-Phasen-Extraktion mit 400 µl Chloroform/Isoamylalkohol unterzogen. Der Überstand wurde mit 0,2 Vol. 4 M LiCl und 0,66 Vol. Isopropanol versetzt und über Nacht bei -20 °C präzipitiert. Nach der Zentrifugation bei 12.000 x g für 20 min (4 °C) wurde das Pellet zweimal mit 400 µl 70% Ethanol gewaschen und erneut sedimentiert (15 min, 12.000 x g, 4 °C). Das vollständig getrocknete Präzipitat wurde in 50 µl TE-Puffer aufgenommen und über Nacht bei 4 °C gelöst. Die Bestimmung der DNA-Konzentration erfolgte unter Verwendung von TE-Puffer als Referenzlösung mit dem Spektralphotometer GeneQuant 1300.

DTAB-Puffer: 6% (w/v) Dodecyltrimethylammoniumbromid (DTAB), 1,125 M NaCl, 75 mM Tris-HCl, 37,5 mM EDTA (pH 8,0)

### 2.3.2 RNA-Extraktion

Die Extraktion der Gesamt-RNA erfolgte unter Verwendung von TRIzol® LS Reagent (Invitrogen, Karlsruhe). Es wurden 30 in flüssigem Stickstoff gelagerte Gehirne mit 750 µl TRIzol® versetzt. Die Gehirne wurden mittels eines Glas-Teflon-Homogenisators homogenisiert (ca. 10 Streiche, 1.000 UpM) und 5 min bei RT inkubiert. Zur Extraktion der RNA wurden 200 µl Chloroform zum Homogenisat hinzugegeben, 15 s geschüttelt und weitere 10 min bei RT inkubiert.

Anschließend erfolgte durch Zentrifugation bei 12.000 x g (15 min bei 4 °C) die Phasentrennung. Die RNA-haltige wässrige Phase wurde abgenommen, und mit 500 µl Isopropanol versetzt. Nach einer zehnmütigen Inkubation wurde mittels Zentrifugation (12.000 x g, 10 min, 4 °C) die RNA präzipitiert. Der Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde mit 1 ml 75% Ethanol und anschließender Zentrifugation für 5 min gewaschen. Das getrocknete RNA-Präzipitat wurde dann in DEPC-H<sub>2</sub>O gelöst. Die Lagerung bis zur mRNA-Extraktion erfolgte bei -80 °C nach Zugabe von 1/10 Vol 4 M LiCl und 2,5 Vol 100% Ethanol.

### 2.3.3 mRNA-Extraktion

Die Extraktion der poly(A)<sup>+</sup>-RNA aus Gesamt-RNA erfolgte unter Verwendung des Micro-FastTrack™ 2.0 Kit von Invitrogen (Karlsruhe). Zunächst wurde die gefällte Gesamt-RNA 15 min bei 13.000 x g und 4 °C zentrifugiert. Nach einem Waschschrift mit 150 µl 75% Ethanol wurde das RNA-Pellet anschließend in 10 µl *Elution Buffer* gelöst. Es erfolgte die Zugabe von 1 ml *Lysis Buffer* (20 µl *Protein/RNase-Degrader* pro 1 ml *Stock Buffer*) sowie eine Inkubation bei 65 °C für 5 min. Nach dem Abkühlen auf Eis (~1 min) wurde vorsichtig 63 µl 5 M NaCl hinzugegeben. Die Gesamt-RNA wurde in ein Reaktionsgefäß mit Oligo-dT-Cellulose transferiert, 40 min langsam geschüttelt und anschließend bei 4.000 x g 5 min zentrifugiert. Die Oligo-dT-Cellulose wurde dreimal mit je 1,3 ml *Binding Buffer* gewaschen. Der Überstand wurde jeweils verworfen. Nach der Zugabe von 300 µl *Bindung Buffer* wurde das Pellet auf eine Filtersäule übertragen. Nach kurzer Zentrifugation (4.000 x g, 10 s) wurde die Oligo-dT-Cellulose zweimal mit 500 µl *Bindung Buffer* und anschließend zweimal mit 200 µl *Low Salt Wash Buffer* vorsichtig gewaschen. Die poly(A)<sup>+</sup>-RNA wurde abschließend in 200 µl *Elution Buffer* gelöst. Für die Bestimmung der mRNA-Konzentration mittels Spektralphotometrie wurde ein Aliquot abgenommen. Die restliche poly(A)<sup>+</sup>-RNA wurde in 30 µl 2 M Natriumacetat, 10 µl Glycogen-Carrier (2 mg/ml) und 600 µl 100% Ethanol präzipitiert und bei -80 °C gelagert.

<i>Stock Buffer:</i>	200 mM NaCl, 200 mM Tris-HCl (pH 7,5), 1,5 mM MgCl <sub>2</sub> , 2% SDS
<i>Binding Buffer:</i>	500 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH 7,5)
<i>Low Salt Wash Buffer:</i>	250 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH 7,5)
<i>Elution Buffer:</i>	10 mM Tris-HCl (pH 7,5)

### 2.3.4 cDNA-Synthese

Unter Verwendung des *AccuScript High Fidelity 1<sup>st</sup> Strand cDNA Synthesis Kits* (Agilent Technologies, Waldbronn) erfolgte die Synthese der cDNA. Es enthält eine derivative Reverse Transkriptase des Moloney Murines Leukämievirus (MMLV-RT) und ist mit einer korrekturlesenden 3'-5'Exonuklease kombiniert. Mit Hilfe dieser Polymerase erfolgt das Umschreiben der aufgereinigten poly(A)<sup>+</sup>-RNA in cDNA. Dafür wurde ein Doppelansatz gewählt, bei dem entweder *random 9mers-Primer* (0,1 µg/µl) oder *Oligo(dT)-Primer* (0,5 µg/µl) eingesetzt wurden. Es wurden folgende Reaktionsansätze verwendet:

	Oligo(dT)	Random
mRNA (0,5 µg/µl)	2-4 µl	2-4 µl
Primer	1 µl	3 µl
dNTPs (25 mM je dNTP)	0,8 µl	0,8 µl
10 x <i>AccuScript RT Buffer</i>	2 µl	2 µl
RNAse freies H <sub>2</sub> O	ad 16,5 µl	ad 16,5 µl

Nach einer fünfminütigen Inkubation bei 65 °C für die Anlagerung der Primer wurden die Ansätze langsam auf Raumtemperatur herab gekühlt. Es wurden beiden Ansätzen jeweils folgende Substanzen hinzugefügt:

DTT (100 mM)	2 µl
MMLV-RT	1 µl
RNAse Block (40 U/µl)	0,5 µl

Der *Random*-Ansatz wurde 10 min bei 25 °C inkubiert. Anschließend erfolgte die cDNA-Synthese für beide Ansätze 60 min bei 42 °C mit anschließender Inaktivierung der MMLV-RT (72 °C, 15 min). Die Degradation der RNA-Matrize erfolgte unter Verwendung von RNase H für 20 min bei 37 °C. Nach der Reinigung durch Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1)-Extraktion wurde die erhaltene cDNA mit 1/10 Vol. LiCl (4 M) und 2,5 Vol. 100% Ethanol mindestens über Nacht bei -20 °C gefällt. Die cDNA wurde abschließend in 20 µl DEPC-H<sub>2</sub>O gelöst.

10 x *AccuScript RT Buffer*: 0,5 M Tris-HCl (pH 8,3), 0,75 M KCl, 0,03 M MgCl<sub>2</sub>

### 2.3.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) wird als enzymabhängiges Verfahren verwendet, um *in vitro* einen definierten DNA-Abschnitt hocheffizient zu vervielfältigen. Als Matrize wurde cDNA von *Periplaneta americana* genutzt. Die verwendeten Primer sind im Anhang (siehe Tab. 6.8) aufgelistet. Für die Amplifikation der DNA wurde neben der Taq-Polymerase (Roboklon, Berlin) die Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase (New England Biolabs, Frankfurt am Main) verwendet. Letztere besitzt zur Reduzierung von fehlerhaft eingebauten Basen eine 3'→5' Exonuklease-Aktivität und wurde gezielt für die Vervielfältigung größerer DNA-Fragmente eingesetzt. Die Zusammensetzung der Reagenzien in ein entsprechendes PCR-Reaktionsgefäß (PCR-RG) erfolgte auf Eis.

	Taq	Phusion®
cDNA	2 - 4 µl	2 - 4 µl
10 x Amplibuffer B	5 µl	-
5 x Phusion HF Buffer	-	10 µl
dNTP-Mix (20 mM je dNTP)	0,5 µl	0,5 µl
forward-Primer	1 µl	1 µl
reverse-Primer	1 µl	1 µl
DMSO	-	1,5 µl
Taq-Polymerase (5 U/µl)	0,5 µl	-
Phusion®-Polymerase (2 U/µl)	-	0,5 µl
ddH <sub>2</sub> O	ad 50 µl	ad 50 µl

Die Reaktionen wurden unter den nachfolgend angeführten Bedingungen durchgeführt:

	Taq	Phusion®
Denaturierung	94 °C 150 s	98 °C 30 s
Denaturierung	94 °C 40 s	98 °C 10 s
Hybridisierung	47 - 70 °C 40 s	55 - 70 °C 30 s
Elongation	72 °C 60 s/kb	72 °C 30 s/kb
Finale Elongation	72 °C 600 s	72 °C 600 s



5 µl PCR-Produkt wurden im Anschluss an die PCR mittels Agarose-Gel-Elektrophorese analytisch untersucht (siehe 2.3.8).

### 2.3.6 RACE-PCR

Ausgehend von einem bekannten Sequenzfragment empfiehlt sich für die Vervielfältigung unbekannter RNA-Transkript-Sequenzbereiche in 5'- und 3'-Richtung die Verwendung einer speziellen PCR-Technik, der *Rapid amplification of cDNA ends* (RACE)-PCR. Hierbei wird zuerst eine terminal modifizierte cDNA synthetisiert. Diese wird anschließend verwendet, um mithilfe eines genspezifischen Primers und eines an die hergestellte Modifikation bindenden Primers das gesuchte cDNA-Fragment zu amplifizieren.

Es wurde neben dem *SMARTer™ RACE cDNA Amplification Kit* (Clontech, Saint-Germain-en-Laye, Frankreich) und dem dazugehörigen *Advantage GC 2 PCR Kit* überwiegend das *5'/3' RACE Kit, 2nd Generation* (Roche, Mannheim) verwendet.

#### 5' RACE (5'/3' RACE Kit, 2nd Generation)

##### Erststrang-cDNA-Synthese & poly(A) tailing

Für die Synthese der cDNA wurde extrahierte *P. americana* mRNA (siehe 2.3.3) verwendet. Nachfolgend aufgelistete Substanzen wurden auf Eis in ein PCR-RG vereinigt und anschließend 60 min bei 55 °C inkubiert. Die Inaktivierung der Reversen Transkriptase erfolgte bei 85 °C für 5 min.

<i>cDNA synthesis buffer</i> (vial 1)	4 µl
dNTPs (vial 3)	2 µl
genspezifischer Primer SP1 (10 µM)	1,25 µl
poly(A) <sup>+</sup> -RNA (0,5 µg/µl)	2 µl
Transcriptor Reverse Transcriptase (vial 2)	1 µl
DEPC-H <sub>2</sub> O	ad 20 µl

Die synthetisierte cDNA wurde anschließend unter Verwendung des High Pure PCR Product Purification Kits (Roche, Mannheim) aufgereinigt. Nach der Zugabe von 100 µl *Binding Buffer* wurde die cDNA auf eine Säule überführt und 30 s bei 8.000 × g

zentrifugiert. Es folgte ein Waschschriff mit 500  $\mu\text{l}$  *Washing Buffer*. Nach der Zentrifugation (8.000  $\times$  g, 30 s) wurden 200  $\mu\text{l}$  *Washing Buffer* auf die Säule gegeben und erneut zentrifugiert (13.000  $\times$  g, 2 min). Die Säule wurde in neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Elution der cDNA erfolgte mit 50  $\mu\text{l}$  10 mM Tris/HCl pH 8,0 und nachfolgender Zentrifugation bei 8.000  $\times$  g für 30 s.

Für das *poly(A) tailing* wurden 19  $\mu\text{l}$  gereinigte Erststrang-cDNA, 2,5  $\mu\text{l}$  Reaktionspuffer (*vial 5*) und 2 mM dATP (*vial 4*) vereinigt und 3 min bei 94 °C inkubiert. Nach einer kurzen Abkühlphase auf Eis erfolgte die Zugabe von 1  $\mu\text{l}$  Terminale Transferase, rec (80 U/ $\mu\text{l}$ , *vial 6*). Für 25 min bei 37 °C wurde der poly(A)-Schwanz angefügt. Nach einer sich sofort anschließenden Inkubation für 10 min bei 70 °C wurde die Transferase inaktiviert. Die für die PCR fertig synthetisierte cDNA wurde sofort weiterverwendet bzw. bei -20 °C gelagert.

*Binding Buffer*: 3 M Guanidin-Thiocyanat, 10 mM Tris-HCl, 5% Ethanol (v/v), pH 6,6

*Washing Buffer*: 20 mM NaCl, 2 mM Tris-HCl, pH 7,5

*Elution Buffer*: 10 mM Tris-HCl, pH 8,5

## RACE-PCR

Folgende Reagenzien wurden in ein PCR-Reaktionsgefäß zusammengefügt:

„geteilte“ Erststrang-cDNA	5 $\mu\text{l}$
10 x <i>Amplibuffer B</i> (Roboklon)	5 $\mu\text{l}$
dNTPs ( <i>vial 3</i> )	1 $\mu\text{l}$
<i>Oligo dT-anchor-primer (vial 8)</i>	1 $\mu\text{l}$
<i>reverse Primer</i> (10 $\mu\text{M}$ )	1,25 $\mu\text{l}$
Taq-Polymerase (5 U/ $\mu\text{l}$ )	0,5 $\mu\text{l}$
DEPC-H <sub>2</sub> O	add 50 $\mu\text{l}$

Die PCR wurde im T3 Thermocycler unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

Denaturierung		94 °C	120 s
Denaturierung	} 10 Zyklen	94 °C	15 s
Hybridisierung		68 °C	30 s
Elongation		72 °C	40 s
Denaturierung	} 25 Zyklen	94 °C	15 s
Hybridisierung		68 °C	30 s
Elongation		72 °C	40 s + 20 s/Zyklus
Finale Elongation		72 °C	420 s

Aufgrund der meist geringen Menge der amplifizierten cDNA waren bei der Untersuchung der PCR-Produkte unter Verwendung der analytischen Agarose-Gel-Elektrophorese (siehe 2.3.8) gewöhnlich keine konkreten Banden sichtbar. Daher folgte der RACE-PCR gewöhnlich eine *nested* PCR. Die PCR-Produkte wurden dafür gefällt und anschließend in 20 µl DEPC-H<sub>2</sub>O gelöst.

PCR-Produkt	1 µl
10 x Amplibuffer B (Roboklon)	5 µl
dNTPs (vial 3)	1 µl
PCR anchor-primer (vial 9)	1 µl
<i>nested reverse</i> Primer (10 µM)	1,25 µl
Taq-Polymerase (Roboklon)	0,5 µl
DEPC-H <sub>2</sub> O	add 50 µl

Die *nested* PCR erfolgte unter den für die RACE-PCR beschriebenen Bedingungen.

### 3' RACE (5'/3' RACE Kit, 2nd Generation)

#### Erststrang-cDNA-Synthese

Die cDNA-Synthese für die 3' RACE erfolgte entsprechend dem angegebenen Protokoll für die 5' RACE Erststrang-cDNA-Synthese. Anstelle des SP1 wurde der *Oligo dT-anchor-primer* (vial 8, 1 µl) eingesetzt. Die cDNA wurde ohne Aufreinigung direkt für die RACE-PCR verwendet.

## RACE-PCR

Das PCR-Protokoll entsprach dem für die 5' RACE *nested* PCR beschriebenen Protokoll einschließlich der Reagenzien und PCR-Bedingungen. Mangels entsprechender Primer für das modifizierte 3'-Ende war eine *nested* PCR hier nicht möglich.

### 5'RACE (SMARTer™ RACE cDNA Amplification Kit)

#### Erststrang-cDNA-Synthese

Für die Synthese der cDNA wurden als erstes der Mastermix und der Reaktionsansatz hergestellt:

Mastermix		Reaktionsansatz	
5 x <i>first-strand buffer</i>	2 µl	poly(A) <sup>+</sup> -RNA (0,5 µg/µl)	2 µl
DTT (20 mM)	1 µl	5'-CDS-Primer A	1 µl
dNTP Mix (10 mM)	1 µl	DEPC-H <sub>2</sub> O	0,75 µl

Der Reaktionsansatz wurde 3 min bei 72 °C und dann weitere 2 min bei 42 °C inkubiert. Nach dem Abkühlen auf Eis wurde dem RG 1 µl SMARTer II A Oligo hinzugegeben. Der auf Eis gestellte Mastermix wurde mit 0,25 µl RNase Inhibitor (40 U/µl) und 1 µl *SmartScribe Reverse Transcriptase* (100 U/µl) vervollständigt und zu dem Reaktionsansatz gegeben. Es folgte die cDNA-Synthese für 90 min bei 42 °C, sowie die Inaktivierung der Transkriptase bei 70 °C für 10 min. Die cDNA wurde mit 250 µl Tricin-EDTA-Puffer verdünnt und für maximal drei Monate bei -20 °C gelagert.

## RACE-PCR

Folgender Reaktionsansatz wurde verwendet:

5'-RACE cDNA	2,5 µl
5 x GC 2 PCR Buffer	10 µl
GC Melt (5 M)	5 µl
dNTP Mix (10 mM)	1 µl
10 x Universalprimer-Mix (UPM)	5 µl
genspezifischer <i>reverse</i> -Primer (10 µM)	1 µl
50 x Advantage-GC 2 Polymerase Mix	1 µl
DEPC-H <sub>2</sub> O	ad 50 µl

Die RACE-PCR wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

- 5 Zyklen: 94 °C 30 s; 72 °C 3 min  
 5 Zyklen: 94 °C 30 s; 70 °C 30 s; 72 °C 3 min  
 30 Zyklen: 94 °C 30 s; 68-69 °C 30 s; 72 °C 3min

Das PCR-Produkt wurde mit 1/10 Vol. 3 M Natriumacetat und 2,5 Vol. 100% Ethanol bei -20 °C gefällt. Für die *nested* PCR wurden die PCR-Produkte in 20 µl TE-Puffer gelöst. Dem Reaktionsansatz wurden neben 0,5 µl PCR-Produkt und dem *nested Universal Primer* die unter RACE-PCR aufgeführten Reagenzien hinzugefügt. Die PCR-Bedingungen waren wie folgt:

- 94 °C 150 s  
 35 Zyklen: 94 °C 30 s; 68 °C 30 s ; 72 °C 120 s  
 72 °C 10 min

### 2.3.7 *genome walking* - Amplifizierung von 5' und 3' genomischen Bereichen

Das *genome walking* ist eine auf genomischer DNA basierte Methode zur Isolierung unbekannter Sequenzbereiche, welche einen bereits bekannten Sequenzabschnitt flankieren. Es wurden drei verschiedene Methoden angewandt: die Inverse PCR, *randomly primed PCR* und die Vektorette-PCR.

### Inverse PCR

Bei der Inversen PCR (Ochman *et al.*, 1988) wird zuerst verdaute genomische DNA wieder ligiert, wodurch vorzugsweise ringförmige DNA-Moleküle entstehen. Diese werden als Matrize für die eigentliche Inverse PCR verwendet. Die verwendeten genspezifischen Primer, die dabei an den bekannten Sequenzbereich binden, sind voneinander weg orientiert und führen somit zur Amplifizierung unbekannter Sequenzbereiche.

Die genomische DNA (100 ng) wurde für 4 h bei 37 °C mit 5 µl FastDigest®-Restriktionsendonukleasen (REs, Thermo Scientific, Bonn) und 10 x FastDigest® Puffer verdaut. Nach der Fällung mit 1/10 Vol. 3 M Natriumacetat und 2,5 Vol. 100% Ethanol über Nacht bei -20 °C wurde die verdaute DNA in 20 µl DEPC-H<sub>2</sub>O gelöst und anschließend für 4 h bei Raumtemperatur (RT) unter Verwendung der T4 DNA Ligase von Fermentas (St. Leon-Rot) zirkularisiert:

DNA (5 ng/µl)	10 µl
10 x T4 DNA Ligation Buffer	5 µl
T4 DNA Ligase (1 Weiss U/µl)	0,5 µl
DEPC-H <sub>2</sub> O	add 50 µl

Die religierte DNA wurde erneut über Nacht präzipitiert und anschließend in 20 µl DEPC-H<sub>2</sub>O resuspendiert. Die PCR erfolgte wie unter 2.3.5 beschrieben unter Verwendung der Taq- oder der Phusion® High-Fidelity DNA-Polymerase. Die Elongationszeit variierte zwischen 3 min und 5 min.

randomly primed PCR

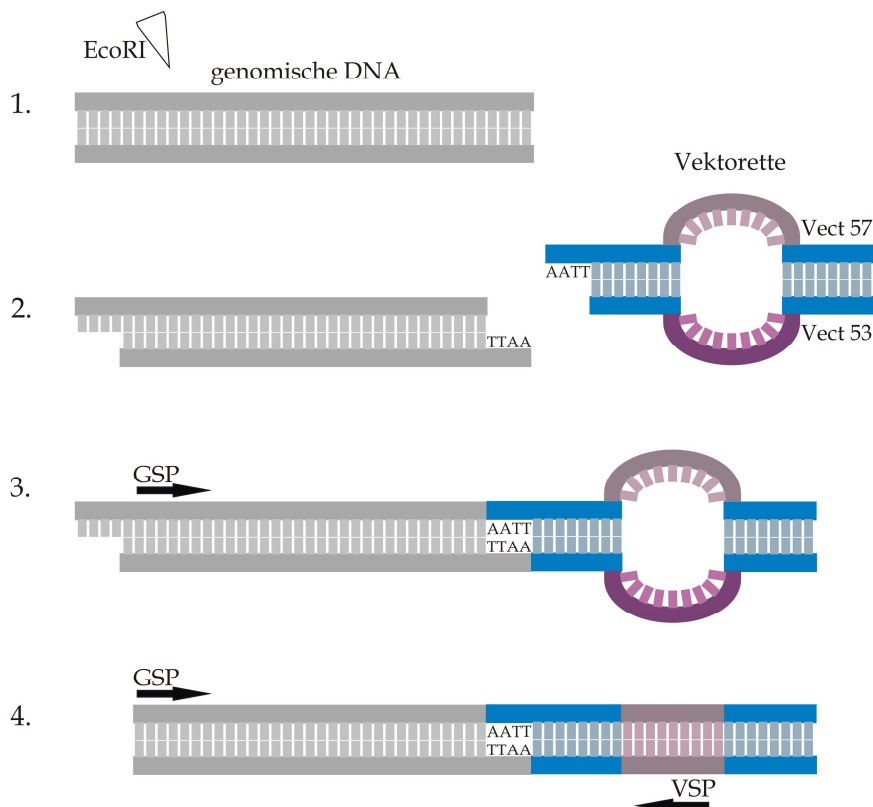
Für diese PCR-Variante wurde folgender Reaktionsansatz auf Eis hergestellt:

genomische DNA	1 $\mu$ l
5 x Phusion HF Buffer	10 $\mu$ l
dNTP-Mix (20 mM je dNTP)	0,5 $\mu$ l
forward-Primer	1 $\mu$ l
random 9mers-Primer (0,1 $\mu$ g/ $\mu$ l)	1-3 $\mu$ l
DMSO	0-1,5 $\mu$ l
Phusion®-Polymerase (2 U/ $\mu$ l)	0,5 $\mu$ l
ddH <sub>2</sub> O	ad 50 $\mu$ l

Die PCR-Bedingungen wurden wie unter 2.3.5 für die Phusion®-Polymerase beschrieben.

Vektorette-PCR

Die Vektorette-PCR wurde nach der in Ko *et al.* (2003) erläuterten Methode durchgeführt. Das Funktionsprinzip ist in Abb. 2.1 dargestellt.



**Abb. 2.1: Mechanismus der Vektorette-PCR.** 1. Die extrahierte genomische DNA wird unter Verwendung von Restriktionsendonukleasen (hier: EcoRI) in DNA-Fragmente mit Überhang geschnitten. Die teilweise doppelsträngige Vektorette, bestehend aus den Oligonucleotiden Vect 53 und Vect 57, besitzt aufgrund nicht-komplementärer Basen eine zentral gelegene einzelsträngige Region. 2. Aufgrund eines zur geschnittenen genomischen DNA komplementären Überhangs wird die Vektorette an das 3'-Ende der DNA-Fragmente ligiert. 3. Mittels eines genspezifischen Primers (GSP) wird im ersten PCR-Zyklus der revers komplementäre Strang gebildet, an den sich dann der Vektorette-spezifische Primer (VSP) anlagern kann (4). Die Amplifizierung des unbekanntes 3'-Bereichs kann erfolgen.

Die in T.E-Puffer gelöste genomische DNA wurde auf eine Konzentration von 0,1 µg/µl verdünnt. Genomische DNA (20 µg) wurden sowohl mit 25 µl 10 x FastDigest® Puffer als auch mit dem entsprechenden FastDigest® RE versetzt und anschließend mit DEPC-H<sub>2</sub>O auf 250 µl aufgefüllt. Jeder Ansatz wurde 16 h bei 37 °C verdaut und je nach RE unterschiedlich inaktiviert:

<u>Enzym</u>	<u>Menge</u>	<u>Inaktivierung</u>
NheI	4 µl	65 °C 5 min
XbaI	4 µl	65 °C 20 min
EcoRI	4 µl	80 °C 5 min
BamHI	4 µl	80 °C 5 min
BglII	8 µl	Zwei-Phasen-Extraktion
BclI	4 µl	80 °C 20 min

Der BglII-Ansatz wurde nach der Zwei-Phasen-Extraktion (siehe 2.3.1) mit 1/10 Vol. 4 M LiCl und 2,5 Vol. 100% Ethanol bei -20 °C über Nacht präzipitiert und am nächsten Tag in 250 µl T.E-Puffer wieder aufgenommen.

Für die Herstellung der teilweise doppelsträngigen Vektorette wurden die einzelsträngigen Oligonucleotide Vect 53 (6,25 µM) und Vect 57 (6,25 µM) verwendet. Aufgrund der durch die Restriktion erzeugten unterschiedlichen Überhänge wurden Vect 57-Oligonucleotide mit komplementären Überhängen genutzt. Ferner waren die Vect 57-Oligonucleotide identisch. 3,2 µl Vect 53, 3,2 µl Vect 57 und 2,8 µl T.E-Puffer wurden 5 min bei 65 °C im Thermocycler inkubiert. Für die Herstellung der Vektorette wurden vorsichtig 0,8 µl MgCl<sub>2</sub> (25 mM) hinzugegeben, erneut 5 min bei 65 °C inkubiert und im Thermocycler langsam auf



RT herabgekühlt (~35 min). Abschließend wurde jeder Ansatz mit 10 µl T.E-Puffer aufgefüllt.

Für die Ligation wurden zuerst für jeden Ansatz die frisch hergestellte Vektorette sowie die verdaute genomische DNA (250 µl) zusammengeführt und 5 min bei 65 °C im Thermocycler inkubiert. Nach dem vollständigen Abkühlen (~35 min) erfolgte die Zugabe von 1,5 µl ATP (100 mM), 30 µl *10 x T4 DNA Ligation Buffer* und 4 µl T4 DNA Ligase. Im Anschluss an die Inkubationszeit von 16 h bei 16 °C wurde die T4 DNA Ligase 10 min bei 65 °C inaktiviert. Die sechs Ansätze wurden der Zwei-Phasen-DNA-Extraktion unterzogen (siehe 2.3.1) und anschließend mit 1/10 Vol. 4 M LiCl und 2,5 Vol. 100% Ethanol präzipitiert. Für die Vektorette-PCR wurden folgende Reagenzien in ein PCR-RG zusammengeführt:

Vektorette-DNA (20 ng)	1 µl
<i>10 x Amplibuffer B</i>	5 µl
dNTP-Mix (20 mM je dNTP)	0,5 µl
<i>forward-Primer</i> (10 µM)	1 µl
Vektorette-Primer (6,25 µM)	1,6 µl
Taq-Polymerase (5 U/µl)	0,5 µl
ddH <sub>2</sub> O	ad 50 µl

Es wurde eine *step-down* PCR unter Verwendung unterschiedlicher Hybridisierungstemperaturen durchgeführt:

	94 °C 180 s
5 Zyklen:	94 °C 60 s; 68-72 °C 60 s; 72 °C 2 min
5 Zyklen:	94 °C 60 s; 64-68 °C 60 s; 72 °C 2 min
15 Zyklen:	94 °C 45 s; 60-64 °C 30 s; 72 °C 2 min
15 Zyklen:	94 °C 45 s; 56-60 °C 30 s; 72 °C 2 min
	72 °C 600 s

Nach der Fällung bei -20 °C für mindestens 2 h wurde eine *nested step-down* PCR durchgeführt.

### 2.3.8 Agarose-Gel-Elektrophorese

Für die Auftrennung von DNA-Fragmenten nach ihrer Größe wurde die Agarose-Gel-Elektrophorese verwendet. Es wurden 0,8 - 1,6%ige Agarose-Gele unter Verwendung von 1 x TAE-Puffer hergestellt. Zum optischen Nachweis der DNA wurden sowohl dem Gel als auch dem 1 x TAE-Laufpuffer 0,1 µg/ml Ethidiumbromid hinzugefügt. Nach der Zugabe von 1/5 Vol. Gelladungspuffer wurden die Proben zusammen mit entsprechenden Größenstandards aufgetragen. Die elektrophoretische Trennung erfolgte bei 60-80 V unter Verwendung der Kammer Hoefer HE 33 (Amersham Bioscience, Freiburg). Durch die Anregung mit UV-Licht (312 nm) wurden die aufgetrennten DNA-Abschnitte visualisiert.

Für die allgemeine Identifizierung von DNA-Fragmenten wurden analytische Agarose-Gel-Elektrophoresen durchgeführt. Sollten definierte Fragmente isoliert werden, wurden präparative Agarose-Gel-Elektrophoresen ausgeführt (siehe 2.3.9).

50 x TAE-Puffer: 1,5 M Tris-Base, 60 mM EDTA, 5,71% Essigsäure

Größenstandard: 100 bp- und 1 kb-DNA Ladder von New England BioLabs, Frankfurt am Main

DNA-Ladepuffer (5x): 0,002% (v/w) Orange G, 15% Glycerin

### 2.3.9 Präparative Agarose-Gel-Elektrophorese & Gelextraktion

Für die Isolierung von DNA-Fragmenten aus einem Agarose-Gel wurden unter langwelliger UV-Belichtung (365 nm) die entsprechenden Banden identifiziert und mit einem Skalpell sauber herausgeschnitten. Dieser Vorgang erfolgte zügig um DNA-Schädigungen zu vermeiden.

Für die Aufreinigung wurde zum Einen das High Pure PCR Product Purification Kit (Roche, Mannheim) genutzt. Es wurde vorrangig verwendet, wenn das Gelstück nur wenig DNA enthielt und DNA-Verluste minimiert werden sollten. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben. Zum Anderen wurde die DNA durch Zentrifugation aufgereinigt. Dafür wurde ein 1,5 ml RG vom oberen Gefäßteil getrennt. Der Boden des unteren RG wurde mit einer heißen Nadel durchstoßen und anschließend mit silanisierter Glaswolle (Serva, Heidelberg) ausgekleidet. Das fertig präparierte RG wurde auf ein intaktes 1,5 ml RG gesetzt, mit dem Gelstück versehen und 2 min bei 6.000 x g zentrifugiert. Das Eluat wurde mit 1/10 Vol. 3 M Natriumacetat und 2,5 Vol. 100% Ethanol für mindestens 2 h bei -20 °C gefällt.

Die DNA wurde ferner pelletiert, mit 75% Ethanol gewaschen und abschließend in DEPC-H<sub>2</sub>O gelöst.

### 2.3.10 Restriktionsverdau

Sollten die isolierten DNA-Fragmente in einen anderen Vektor als den pGEM-T Vektor ligiert werden, wurden sowohl Vektor als auch DNA-Fragment durch spezielle Restriktionsendonukleasen (REs) geschnitten. Dafür wurde die DNA mit dem/den entsprechenden FastDigest® RE(en) (Thermo Scientific, Bonn) und 10 x FastDigest® Puffer versetzt und 15 – 60 min bei 37 °C verdaut. Diese Methode wurde auch eingesetzt, um die hergestellten rekombinanten Plasmide zu überprüfen. Wurde der pGEM-T Vektor verwendet, erfolgte der Verdau der rekombinanten DNA mit BstZ I (Promega, Mannheim) bei 50 °C für 2 h.

### 2.3.11 Ligation

Die Ligation in den pGEM®-T Vektor erfolgte unter Verwendung des pGEM®-T-Vector Systems (Promega, Mannheim) über TA-Klonierung. Das aufgereinigte DNA-Fragment, das sog. Insert, wurde in 7 µl DEPC-H<sub>2</sub>O gelöst. Es wurden 3,5 µl Insert, 0,5 µl pGEM®-T Vektor, 5 µl 2 x *Rapid Ligation Buffer* und 1 µl T4 DNA Ligase (3 Weiss U/µl) zu einem Reaktionsansatz zusammengefügt und 2 h bei RT oder über Nacht bei 4 °C im Eiswasser inkubiert. Wurde das PCR-Produkt durch die Phusion®-Polymerase generiert und besaß daher keinen A-Überhang, wurde vor der Ligation nachträglich ein A-Überhang angefügt. Dafür wurde das in 7 µl DEPC-H<sub>2</sub>O gelöste DNA-Fragment mit 1 µl 10 x *Amplibuffer B*, 1 µl dATP (2 mM) und 1 µl Taq-Polymerase für 30 min bei 70 °C inkubiert. 3,5 µl wurden entnommen und direkt dem Ligationsansatz hinzugefügt.

Durch Restriktionsverdau erhaltene DNA-Fragmente und Vektoren wurden durch die T4 DNA Ligase von Fermentas (St. Leon-Rot) im Verhältnis 3:1, 1:1 bzw. 1:3 ligiert. Die Berechnung der einzusetzenden Menge erfolgte nach Cranenburgh (2004):

$$\text{Menge Vektor } (\mu\text{l}) = \frac{\text{Gesamtvolumen Ligationsansatz } (\mu\text{l})}{\left( \frac{\text{Konzentration Vektor } (\mu\text{g} / \mu\text{l}) \cdot \text{Länge Insert } (\text{kb}) \cdot \text{Insert/VektorRatio}}{\text{Konzentration Insert } (\mu\text{g} / \mu\text{l}) \cdot \text{Länge Vektor } (\text{kb})} \right) + 1}$$

$$\text{Menge Insert } (\mu\text{l}) = \text{Gesamtvolumen Ligationsansatz } (\mu\text{l}) - \text{Menge Vektor } (\mu\text{l})$$

Neben Insert und Vektor wurden dem Ligationsansatz (10  $\mu\text{l}$ ) 1  $\mu\text{l}$  10x *Ligation Buffer*, 1  $\mu\text{l}$  T4 DNA Ligase (1 Weiss U/ $\mu\text{l}$ ) und die entsprechende Menge an DEPC-H<sub>2</sub>O hinzugefügt. Die Ligation fand für 2 h bei RT oder über Nacht bei 4 °C im Eiswasser statt.

2x *Rapid Ligation Buffer* : 300 mM, 100 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM DTT, 10 mM ATP (pH 7,8 bei 25 °C)

10x *Ligation Buffer*: 400 mM Tris-HCl, 100 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM DTT, 5 mM ATP (pH 7,8 bei 25 °C)

### 2.3.12 Transformation

Dem Ligationsansatz wurden 100  $\mu\text{l}$  chemisch-kompetente *E. coli* Bakterien (JM109/BL21) hinzugegeben. Nach der 30-minütigen Inkubation auf Eis wurden die Zellen 45 s bei 42 °C einem Hitzeschock ausgesetzt und sofort auf Eis abgekühlt (~ 2 min). Die Zellen wurde dann in 900  $\mu\text{l}$  LB-Medium (Roth, Karlsruhe) überführt und 45 min bei 37 °C geschüttelt. Nach der zweiminütigen Zentrifugation bei 6.500 x g wurden die sedimentierten Zellen in 100  $\mu\text{l}$  LB-Medium aufgenommen, auf einer LB-Agarplatte mit Antibiotikum ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Art des Antibiotikums richtete sich nach der Antibiotika-Resistenz des zu transformierenden Plasmids.

#### Blau-Weiß-Selektion

Enthielt der Ligationsansatz pGEM®-T Vektor, wurden vor der Transformation 37,5  $\mu\text{l}$  X-Gal (75  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) und 2,5  $\mu\text{l}$  1 M IPTG auf den LB-Agarplatten ausgestrichen.

Antibiotika: Carbencillin 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ; Kanamycin 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$

### 2.3.13 Isolierung von Plasmid-DNA

Je nach Fragestellung erfolgte die Präparation der Plasmid-DNA durch Mini- bzw. Midi-Präparation.

#### Mini-Präparation

Eine durch Transformation erzeugte Bakterienkolonie wurde in 5 ml LB-Medium, versetzt mit dem entsprechenden Antibiotikum, über Nacht bei 37 °C und 230 UpM vermehrt. Die Präparation erfolgte unter Verwendung des *peqGOLD Plasmid Miniprep Kit I* von peqlab (Erlangen). Die Bakterien wurden durch eine einminütige Zentrifugation bei 10.000 x g sedimentiert und anschließend in 250 µl *Solution I*/RNase A vollständig resuspendiert (Vortex). Nach der Zugabe von 250 µl *Solution II* und dem vorsichtigen Invertieren wurde das Lysat 2 min inkubiert. Es folgte die Zugabe von 350 µl *Solution III*, sowie eine zehnminütige Zentrifugation bei 13.000 UpM. Der Überstand wurde auf eine *PerfectBind DNA Column* überführt und 1 min bei 10.000 UpM zentrifugiert. Nach dem Entfernen des Durchlaufs wurde die an die Säule haftende DNA mit 500 µl PW Plasmid Buffer und zweimal mit 750 µl *DNA Wash Buffer* gewaschen (10.000 UpM, 1 min). Die Säule wurde auf ein sauberes 1,5 ml RG übertragen. Die Elution der Plasmid-DNA erfolgte durch die Zugabe von 70 µl DEPC-H<sub>2</sub>O und anschließender Zentrifugation bei 10.000 UpM für 1 min. Die Lagerung der Plasmid-DNA erfolgte bei 4 °C.

#### Midi-Präparation

Die Midi-Präparation erfolgte nach der Lithiumchlorid-Methode. Das LB-Medium (50 ml) wurde mit der entsprechenden Menge an Antibiotikum versetzt und mit einer Bakterienkolonie beimpft. Nach der Inkubation bei 37 °C und 185 UpM über Nacht wurden die Bakterien in ein 50 ml Falconröhrchen überführt und 10 min bei 5.500 UpM und 4 °C sedimentiert. Das Pellet wurde in 4 ml Lösung I resuspendiert und anschließend mit 8 ml Lösung II versetzt. War das Lysat klar und leicht viskos, wurden 8 ml Lösung III hinzugegeben. Nach dem erneuten Invertieren wurde das ausgefallene Präzipitat bei 5.500 UpM (5 min, 4 °C) sedimentiert. Der Überstand wurde durch einen Faltenfilter in ein neues 50 ml Falconröhrchen gefiltert, mit 25 ml

Isopropanol versetzt und 10 min bei ebenfalls 5.500 UpM und 4 °C zentrifugiert. Nach dem Lösen des entstandenen Pellets in 1,45 ml DEPC-H<sub>2</sub>O wurden 2,5 ml 4 M LiCl und 50 µl 1 M Tris-HCl, pH 7,5 hinzugegeben. Nach einer fünfminütigen Zentrifugation bei 5.500 UpM und 4 °C wurde der Überstand (~4 ml) auf zwei mit 5 ml 100% Ethanol befüllten 15 ml Falconröhrchen aufgeteilt und mindestens 90 min bei -20 °C gefällt.

Nach der Zentrifugation bei 4 °C und 5.500 UpM (10 min) wurde das Präzipitat getrocknet und in 250 µl TE-Puffer aufgenommen. Es folgte die Zugabe von 2,5 µl RNase-Cocktail (Ambion) sowie die Vereinigung beider Ansätze in ein 1,5 ml RG. Der Ansatz wurde für 30 min bei 37 °C inkubiert. Für die Zwei-Phasen DNA-Extraktion wurde anschließend 1 Vol. Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) hinzugegeben, kräftig gemischt (Vortex) und 2 min bei 13.000 UpM zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde abgenommen und erneut einer DNA-Extraktion unterzogen. Die entstandene wässrige Phase wurde dann zweimal mit 1 Vol. Chloroform versetzt, gut gemischt (Vortex) und eine Minute bei 13.000 UpM zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde auf zwei RG aufgeteilt und jeweils mit 1/10 Vol. 4 M LiCl und 3 M 100% Ethanol versetzt. Die präzipitierte DNA wurde anschließend durch Zentrifugation bei 13.000 UpM für 5 min sedimentiert. Das Pellet wurde mit 200 µl 70% Ethanol gewaschen und im Anschluss vollständig getrocknet. Abschließend wurde das Pellet in 100 µl TE-Puffer aufgenommen und die Konzentration der Plasmid-DNA spektralphotometrisch bestimmt.

Lösung I: 50 mM Glucose, 25 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, pH 8,0

Lösung II: 0,2 M Natriumhydroxid, 1% SDS

Lösung III: 5 M Kaliumacetat, 11,5% (v/v) Essigsäure, pH 4,8

## **2.4 Biochemische Methoden**

### **2.4.1 Proteinbestimmung nach Bradford**

Der Proteingehalt einer Lösung wurde mittels eines modifizierten Bradford-Assays gemessen (Bradford, 1976). Dabei führt die Bindung von Coomassie-Brilliantblau G-250 an Aminosäuren mit kationischen und unpolaren Seitenketten zu einer Verschiebung des Absorptionsmaximums in Richtung des längerwelligen Bereiches (590 nm). Diese Korrelation von Absorption und Proteinkonzentration ermöglicht die Bestimmung einer unbekanntes Proteinkonzentration anhand einer Eichreihe mit Rinderserumalbumin (BSA, 0-10 µg/ml). Es wurden 200 µl 5 x Roti®-Nanoquant mit der Proteinlösung versetzt und mit MQ-H<sub>2</sub>O auf ein Endvolumen von 1 ml aufgefüllt. Die Absorption wurde bei 595 nm gemessen (Spektralphotometer).

### **2.4.2 Isolierung von Membranproteinen**

Für die Präparation von Membranproteinen wurden drei entnommene Schabengehirne in 150 µl Puffer A bzw. Flip<sup>TM</sup>-Zellen, welche von einer konfluent bewachsenen 9 cm-Kulturschale stammen, in 500 µl Puffer A homogenisiert. Nach der Inkubation von 10 min auf Eis wurde das Homogenat für 30 min und 40.000 x g bei 4 °C in der Ultrazentrifuge pelletiert. Der Überstand, welcher das Cytosol enthält, wurde abgenommen. Das Pellet wurde für den Aufschluss der Membranproteine in 45 µl Puffer B (Flip<sup>TM</sup>-Zellen: 100 µl Puffer B) aufgenommen und mit 1 Vol. 2% (w/w) Chaps-Lösung versetzt. Nach 15-minütiger Inkubation auf Eis wurde bei 8.000 x g für 10 min (4 °C) zentrifugiert. Der membranproteinhaltige Überstand wurde abgenommen. Direkt im Anschluss wurde die Proteinkonzentration für die Cytosol- und Membranproteinfraktion mittels der Bradford-Methode (siehe 2.4.1) bestimmt. Beide Fraktionen wurden bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert.

Puffer A: 10 mM NaCl; 25 mM HEPES (pH 7,5); 2 mM EDTA; 1% (v/v) Protease-Inhibitor-Cocktail (Sigma)

Puffer B: 200 mM NaCl; 50 mM HEPES (pH 7,5); 1% (v/v) Protease-Inhibitor-Cocktail (Sigma)

### 2.4.3 Deglykosylierung von Membranproteinen durch PNGase F

Die Peptid-N4-(N-acetyl- $\beta$ -glucosaminyl-) Asparagin-amidase F (PNGase F, New England Biolabs) führt bei Glykoproteinen zur Abspaltung nahezu aller N-Glykane. Eine solche Deglykosylierung ist für die Analyse des Proteins sinnvoll, da Glykane nicht nur die Größe des Membranproteins beeinflussen, sondern auch das Laufverhalten des Proteins in der SDS-PAGE verändern. Für zwei Ansätze wurden jeweils 40  $\mu$ g isolierte Membranproteine (siehe 2.4.2) mit DEPC-H<sub>2</sub>O auf 45  $\mu$ l aufgefüllt und im Anschluss mit 5  $\mu$ l Denaturierungspuffer versetzt. Nach einer Inkubationszeit von 10 min erfolgte nacheinander die Zugabe von 6  $\mu$ l G7-Puffer und 6  $\mu$ l NP-40 (10%). Nach dem Vermischen wurden dem einen Ansatz 2  $\mu$ l PNGase F, dem anderen Ansatz (Kontrolle) hingegen 2  $\mu$ l DEPC-H<sub>2</sub>O hinzugegeben. Beide Ansätze wurden 2 h bei 37 °C inkubiert, mit 1 Vol. LöA-Puffer denaturiert und bei -20 °C bis zur Verwendung gelagert.

LöA-Puffer: 9 M Harnstoff, 10% (w/v) SDS, 5% (v/v)  $\beta$ -Mercaptoethanol, 0,2% (w/v) Bromphenolblau

### 2.4.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung von Proteinen nach ihrer Größe erfolgte mittels SDS-PAGE unter Verwendung von diskontinuierlichen Gelen nach Laemmli (1970) oder von Gradientengelen (3-14%).

#### diskontinuierliches Gel

Ein 6-12%iges Trenngel wird bei dem Laemmli-System mit einem Sammelgel überschichtet.

<u>Trenngel</u>	<u>6%</u>	<u>8%</u>	<u>12%</u>	<u>Sammelgel</u>	<u>4,5%</u>
Acrylamid-Lösung	2,4 ml	3,2 ml	4,8 ml	Acrylamid-Lösung	0,6 ml
Trenngel-Puffer	3,0 ml	3,0 ml	3,0 ml	Sammelgel-Puffer	1,0 ml
MQ-H <sub>2</sub> O	6,6 ml	5,8 ml	4,2 ml	MQ-H <sub>2</sub> O	2,4 ml
TEMED	12 $\mu$ l	12 $\mu$ l	12 $\mu$ l	TEMED	4 $\mu$ l
APS	70 $\mu$ l	70 $\mu$ l	70 $\mu$ l	APS	30 $\mu$ l



### Gradientengel

Es wurden eine 3%ige und eine 14%ige Polyacrylamid-Lösung hergestellt, die anschließend unter Zuhilfenahme eines Gradientengelmischers für die Erstellung eines linearen Gradientengels verwendet wurden. Die Polymerisation bedurfte 1 h.

<u>Polyacrylamid-Lösung</u>	<u>3%</u>	<u>14%</u>
Acrylamid-Lösung	0,36 ml	1,7 ml
Gradientengel-Puffer	0,45 ml	0,45 ml
MQ-H <sub>2</sub> O	2,73 ml	-
60% Glycerin	-	1,41 ml
10% SDS	80 µl	80 µl
TEMED	4 µl	2 µl
APS	32 µl	10 µl

Für die SDS-PAGE wurden die proteinhaltigen Proben mit 1 Vol. LöA-Puffer versetzt, 5 min bei 50 °C denaturiert und gut durchmischt auf das Gel aufgetragen. Als Standard wurde der *Precision Plus Protein™ Dual Color Standard* von Bio-Rad (München) verwendet. Die Auftrennung in 1 x Kammerpuffer erfolgte zu Beginn bei 80 V 20 min, dann bei 120 V bis zum Ende der Auftrennung. Die Gele wurden danach entweder mit Coomassie®-Lösung 30 min gefärbt sowie mit Entfärber-Lösung kontrastiert oder die aufgetrennten Proteine wurden auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran übertragen (siehe 2.4.5).

Acrylamid-Lösung: Rotiphorese® Gel 30

TEMED: N,N,N',N'-Tetramethylethan-1,2-diamin (Serva, Heidelberg)

APS: 10% (w/v) Ammoniumpersulfat

Trenngelpuffer: 375 mM Tris/HCl, 0,2% (w/v) SDS, pH 8,8

Sammelgelpuffer: 125 mM Tris/HCl, 0,2% (w/v) SDS, pH 6,8

Gradientengelpuffer: 3 M TRIS Ultra, pH 8,8

Kammerpuffer: 25 mM Tris; 250 mM Glycin, 0,1% (w/v) SDS, pH 8,8

Coomassie®-Lösung: 0,1% (w/v) Coomassie® G250, 50% (v/v) Methanol, 20% (v/v) Essigsäure

Entfärber-Lösung: 10% (v/v) Methanol, 7% (v/v) Essigsäure

### **2.4.5 Western-Blot**

Die in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine (siehe 2.4.4) können elektrophoretisch von einem SDS-Gel auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran übertragen

werden. Dadurch sind Proteine zugänglich für die Immundetektion (siehe 2.4.6). Es wurde das *semi-dry*-Verfahren unter Verwendung der *Trans-Blot® SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell* von Bio-Rad (München) genutzt. Der Aufbau sah wie folgt aus:

#### **Kathode**

9 Filterpapiere in Kathodenpuffer

SDS-Gel

PVDF-Membran (5 min in Methanol äquilibriert)

3 Filterpapiere in Anodenpuffer II

6 Filterpapiere in Anodenpuffer I

#### **Anode**

Nach dem Transfer der Proteine für 90 min bei 54 mA/Gel wurde die PVDF-Membran 10 min in Ponceau S-Lösung (Serva, Heidelberg) geschwenkt und mit MQ-H<sub>2</sub>O gewaschen. Die Membran mit den nun exponierten Proteinbanden wurde bei ~50 °C vollständig getrocknet und bis zur Immundetektion bei 4 °C gelagert.

Kathodenpuffer: 40 mM 6-Amino-hexansäure, 20% (v/v) Methanol, pH 7,6

Anodenpuffer II: 25 mM TRIS-Ultra, 20% (v/v) Methanol, pH 10,4

Anodenpuffer I: 300 mM TRIS-Ultra, 20% (v/v) Methanol, pH 10,4

### **2.4.6 Immundetektion**

Unspezifische Proteinbindungsstellen der beladenen PVDF-Membran (siehe 2.4.5) wurden mit 5% (w/v) Trockenmilch in TBS-T abgesättigt (~30 min). Der in TBS-T entsprechend verdünnte primäre Antikörper (siehe Tab. 6.6) wurde für 3 h bei RT oder über Nacht bei 4 °C inkubiert. Die Membran wurde daraufhin 3 x 5 min in TBS-T gewaschen. Nach der dreiminütigen Behandlung mit Harnstofflösung wurde erneut 5 min gewaschen. Es folgte die Inkubation in Meerrettichperoxidase (HRP)-gekoppeltem sekundären Antikörper für 1 h bei RT sowie die Entfernung überschüssiger Sekundärantikörper durch Waschung mit TBS-T (3 x 5 min). Die Membran wurde kurz in MQ-H<sub>2</sub>O geschwenkt und anschließend 5 - 10 min in *Super Signal® West Pico Chemiluminescent Substrate* (Thermo Scientific, Bonn) inkubiert. Dieses *enhanced Chemiluminescence* (ECL)-System enthält ein HRP-Substrat, welches

unter Emission von Lumineszenz umgesetzt wird. Die Entwicklung erfolgte unter Verwendung von Kodak-Fotofilmen (CL-XPosure™, Thermo Scientific).

TBS-T (*Tris-buffered saline plus Tween 20*): 0,1% (w/v) Tween 20, 10 mM Tris-Base, 150 mM NaCl, pH 7,5

Harnstofflösung: 2 M Harnstoff, 0,1 M Glycin, 1% (v/v) Triton-X-100

### 2.4.7 Expression und Reinigung von Fusionsproteinen

Für die Generierung polyklonaler Antikörper wurden Fusionsproteine unter Verwendung des pMAL-c2X Vektors in kompetenten *E. coli*-Zellen (BL21) exprimiert. Das Fusionsprotein besteht aus dem rezeptorspezifischen Proteinbereich und dem C-terminalen Maltose-Binde-Protein (MBP). Letzteres ermöglicht sowohl die Reinigung des Fusionsproteins als auch die Aufreinigung der polyklonalen Antikörper aus dem Serum.

#### Expression

Eine transformierte BL21-Kolonie wurde über Nacht bei 37 °C in 6 ml LB-Medium, versetzt mit Carbenicillin (100 µg/ml), geschüttelt (230 UpM). Von der Kultur wurde 1 ml abgenommen und in 250 ml frisches LB-Medium, versetzt mit Chloramphenicol (50 µg/ml) und Carbenicillin (100 µg/ml), überführt. Die Kultur wurde erneut bei 37 °C und 185 UpM geschüttelt, bis diese eine optische Dichte  $OD_{600} = 0,6 - 0,9$  erreicht hatte. Die Induktion der Proteinexpression erfolgte durch Zugabe von IPTG (1 mM) für 4 h bei 37 °C. Danach wurde die Kultur für 10 min bei 4 °C und 5.500 UpM pelletiert und über Nacht bei -20 °C eingefroren.

#### Reinigung

Das aufgetaute Kulturpellet wurde in 5 ml TE-Puffer resuspendiert und 6 x 30 s unter Verwendung eines Stabsonifizierers auf Eis aufgeschlossen. Es folgte die Zentrifugation für 10 min bei 4 °C *full speed*. Der lösliche Überstand mit 20 ml Säulenpuffer versetzt und auf eine präparierte Affinitätssäule übertragen (4 °C). Die Säule, bestehend aus einer *Poly-Prep® Chromatography Column* (Bio-Rad, München) und 6 ml 50%igem *Amylose Resin* (New England Biolabs, Frankfurt am Main), wurde vorher mit 15 ml Säulenpuffer äquilibriert. Die Affinitätssäule mit dem gebundenen

Fusionsprotein wurde mit 30 ml Säulenpuffer gewaschen. Die Elution erfolgte mit 5 ml Elutionspuffer. Die aufgefangenen 1 ml-Fractionen wurden sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Affinitätsäule wurde mit 20% Ethanol versetzt und bei 4 °C gelagert. Die Untersuchung der Eluate erfolgte mittels SDS-PAGE und Coomassie®-Färbung (siehe 2.4.4).

Säulenpuffer: 200 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH 7,4), 10 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol, 1 mM EDTA

Elutionspuffer: 200 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH 7,4), 10 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol, 1 mM EDTA, 20 mM Maltose

## 2.4.8 Generierung polyklonaler Antikörper und deren Aufreinigung

### Generierung polyklonaler Antiseren

Es wurden für beide GABA<sub>B</sub>-Rezeptor Subtypen jeweils zwei MBP-Fusionsproteine exprimiert, die entweder den N-terminalen Bereich des N-Terminus oder die extrazelluläre Schleife 2 (ECL2) beinhalten. Kaninchen wurden mit den MBP-Fusionsproteinen des GABA<sub>B</sub>-Rezeptors 1, Meerschweinchen mit den Fusionsproteinen des GABA<sub>B</sub>-Rezeptors 2 immunisiert. Die Immunisierung und Versorgung der Tiere erfolgte durch die Firma Pineda Antikörper Service (Berlin). Vor der Immunisierung wurden für jedes Fusionsprotein das Serum von 4 Tieren auf Gehirn-Homogenaten von *P. americana* via Immundetektion (siehe 2.4.6) getestet. Es wurden die zwei Tiere mit einer geringen, aber vorhandenen Hintergrundaktivität verwendet. Folglich wurden insgesamt acht Kaninchen und acht Meerschweinchen ausgewählt und immunisiert. Das Serum der Meerschweinchen wurde nach 90 Tagen, die Kaninchenserum nach 100 Tagen entnommen.

### Aufreinigung polyklonaler Antiseren

Die Aufreinigung erfolgte mittels Affinitätschromatographie unter Verwendung der *HiTrap-NHS-activated-HP*-Säule von GE Healthcare (Freiburg). Die erste Säule wurde lediglich mit MBP als Antigen beladen. Nach dem Entfernen aller Antikörper gegen das MBP wurde das Serum über eine zweite Säule geschickt. An diese war das MBP-Fusionsprotein gekoppelt, welches für die Immunisierung verwendet wurde.

Für die Kopplung des Liganden (MBP bzw. MBP-Fusionsprotein) an die Säule wurde zunächst die Ventilkappe geöffnet und 1 Tropfen eiskalte HCl (1 mM) auf die Säule gegeben. Das abbrechbare Ende der Säule wurde entfernt und die Säule wurde

mit 6 ml HCl (1 mM) gewaschen. Danach erfolgte die Injektion von 1,5 ml in Kopplungspuffer dialysiertem MBP (2,7 mg/ml). Für die Bindung des Antigens an das Säulenmaterial wurde 30 min bei RT inkubiert. Übrige Bindungsstellen wurden durch abwechselnde Injektion (dreimal) von 6 ml Puffer A und 6 ml Puffer B ausgewaschen. Nach der zweiten Zugabe von Puffer A wurde 30 min inkubiert. Anschließend wurde die Säule mit 5 ml Bindungspuffer sowie 3 ml Elutionspuffer gespült und mit 10 ml Bindungspuffer äquilibriert.

Ein Teil des Serums (5 ml) wurde mit Bindungspuffer auf ein Gesamtvolumen von 50 ml aufgefüllt und im Anschluss filtriert. Unter Verwendung der Peristaltikpumpe P-1 von Pharmacia Biotech (Düßeldorf) wurde das Antiserum mit einer Fließgeschwindigkeit von 1 Tropfen/s über die MBP-Säule geschickt. Danach wurde die Säule mit 10 ml Bindungspuffer gewaschen und die gebundenen MBP-Antikörper mit 3 ml Elutionspuffer eluiert. 500 µl Fraktionen wurden in 1,5 ml RG aufgefangen und zur Einstellung eines neutralen pH-Werts mit Neutralisationspuffer versetzt. Die Proteinkonzentrationsbestimmung erfolgte nach Bradford. Je nach Proteinkonzentration der MBP-Eluate wurde das Serum insgesamt 4-7 x über die MBP-Säule geschickt.

Nach der Entfernung der gegen das MBP gerichteten Antikörper wurde das Antiserum über Nacht über die Fusionsprotein-Säule gepumpt. Dafür wurde ein geschlossener Kreislauf geschaffen. Die Säule wurde am nächsten Tag mit 10 ml Bindungspuffer gewaschen. Die Antikörper wurden mit 3 ml Elutionspuffer eluiert und in 500 µl Fraktionen aufgefangen. Es wurde Neutralisationspuffer zugesetzt und die Antikörperkonzentration nach Bradford bestimmt. Die Säulen wurden im Anschluss mit 10 ml Bindungspuffer äquilibriert und in Lagerpuffer bei 4 °C aufbewahrt.

Kopplungspuffer:	0,2 M NaHCO <sub>3</sub> , 0,5 M NaCl, pH 8,3
Puffer A:	0,5 M Monoethanolamin, 0,5 M NaCl, pH 8,3
Puffer B:	0,1 M Acetat; 0,5 M NaCl, pH 4,0
Bindungspuffer:	10 mM Tris-HCl, pH 4,5
Elutionspuffer:	100 mM Glycin-HCl, 0,5 M NaCl, pH 2,7
Neutralisationspuffer:	1 M Tris-HCl, pH 9,0
Lagerpuffer:	0,05 M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 0,1 % (w/v) NaN <sub>3</sub> , pH 7

## 2.4.9 Immunhistochemie & Immunzytochemie

### Immunhistochemie an Gewebeschnitten und Gesamtpräparaten

Nach der Präparation wurde das zu untersuchende Gewebe fixiert. Es wurden alternativ zwei verschiedene Fixierlösungen verwendet:

Fixierlösung I     3% Paraformaldehyd, 0,075 M Lysin-HCl, 0,01 M Natriumperjodat, 0,2 M Sucrose in 0,1 M Na-Phosphatpuffer, pH 7,0

Fixierlösung II    0,1% Glutaraldehyd (GA), 3% Paraformaldehyd, 0,2% Picrinsäure, 0,2 M Sucrose in 0,1 M Na-Phosphatpuffer, pH 7,0

Die Fixierlösung II wurde nur verwendet, wenn GABA nachgewiesen werden sollte. Nach der Fixierung von 2 h bei RT wurde das Gewebe dreimal 15 min mit PBS gewaschen.

Sollten für ein GA-fixiertes Gewebe Kryostatschnitte angefertigt werden, wurde das Präparat zusätzlich 30 min mit 0,1% NaBH<sub>4</sub> behandelt und im Anschluss erneut 2 x 10 min gewaschen. Alle für Kryostatschnitte vorgesehenen Gewebe wurden der Kryoprotektion unterzogen. Dazu wurden diese mit 1 h in 10% (w/v) Saccharose-Lösung (gelöst in 0,1 M Na-Phosphatpuffer) und über Nacht in 25% (w/v) Saccharose-Lösung (gelöst in 0,1 M Na-Phosphatpuffer) inkubiert. Die Präparate wurden am nächsten Tag mittels Tissue-Tek® auf Leberblöckchen positioniert und unter Verwendung von Isopentan (ohne GA: ca. -150 °C; mit GA: -100 °C) kryofixiert. Die Gewebe wurden anschließend am Gefriermikrotom geschnitten (Schnittdicke = 14 µm). Die Temperatur des Gerätes betrug bei Geweben ohne GA -31 °C, bei Geweben mit GA-Fixierung -21 °C. Die Schnitte wurden auf Poly-L-Lysin doppelt-beschichtete Deckgläschen (0,01% (w/v) POLY-L-LYSINE SOLUTION, Sigma) aufgenommen und bis zur Weiterbehandlung bei 4 °C gelagert. Bei der Erstellung von Gesamtpräparaten (*whole mounts*) entfielen alle im oberen Abschnitt genannten Teilschritte. Nachfolgend ist die Abfolge der weiteren immunhistochemischen Behandlungsschritte sowohl für Gewebeschnitte als auch für Gesamtpräparate aufgelistet.

	<u>Kryostatschnitte</u>	<u>Gesamtpräparate</u>
0,01% Tween 20 (Permeabilisierung)	5 min	15 min
50 mM NH <sub>4</sub> Cl (Aldehydquenching)	5 min	15 min
PBS	5 min	15 min
Blockierlösung	15 min	30 min
primärer Antikörper	4 °C über Nacht	4 °C über Nacht
PBS	3 x 5 min	3 x 15 min
sekundärer Antikörper	1 h	3 h
PBS	3 x 5 min	3 x 15 min

Die Präparate wurden abschließend auf Objektträger in erwärmtem Mowiol eingebettet. Für Gesamtpräparate wurden als Abstandhalter Klebebandstreifen zwischen Objektträger und Deckgläschen positioniert.

Blockierlösung: 1% (w/v) *normal goat serum*, 0,8% (v/v) Rinderserumalbumin, 0,5% (w/v) Triton X-100 in PBS

Mowiol: 33,3% (v/v) Glycerol, 16,7% (v/v) Mowiol 4-88, 2% (v/v) n-Propyl-Galat in PBS

### Immunzytochemie an der Zelllinie HEK-flp<sup>TM</sup>

Für den Nachweis der heterolog exprimierten Rezeptor-Subtypen in eukaryotischen Wirtszellen sowie für die Charakterisierung der generierten polyklonalen Antikörper wurden Immunfluoreszenzmarkierungen an HEK-flp<sup>TM</sup>-Zellen durchgeführt. Zellen, die in einer 24-Loch-Mikrotiterplatte angezogen worden waren, wurden 2 x 10 min in PBS gewaschen und für 15 min in 4% (w/v) Paraformaldehyd fixiert. Nach erneutem Waschen (3 x 10 min) mit PBS erfolgte die Inkubation der Zellen für 30 min in 200 µl Präinkubationslösung. Der in Inkubationslösung entsprechend verdünnte primäre Antikörper (200 µl) wurde für 1 h bei RT auf die Zellen gegeben. Nachdem die Zellen dreimal 15 min mit PBS gewaschen worden waren, erfolgte die einstündige Inkubation mit dem sekundären Antikörper, ebenfalls entsprechend verdünnt mit Inkubationslösung. Nach dem Waschen mit PBS (3 x 15 min) wurden die Zellen in Mowiol eingedeckelt.

Präinkubationslösung: 10% (w/v) *normal goat serum*, 0,125% (w/v) Triton-X-100, gelöst in PBS

Inkubationslösung: 5% (w/v) *normal goat serum*, 0,125% (w/v) Triton-X-100, gelöst in PBS

### Mikroskopie & Bildbearbeitung

Für die Hellfeld- und Immunfluoreszenz-Aufnahmen wurden die konfokalen Laser Scanning Mikroskope LSM 510 und das LSM 710 von Zeiss (Jena) verwendet. Bei Mehrfachmarkierungen wurden die Aufnahmen sequentiell aufgenommen. Zuerst erfolgte die Anregung bei 488 nm bzw. 488 nm und 633 nm, anschließend bei 543 nm. In der Regel wurden Bildstapel aufgenommen, die nachfolgend zu einem zweidimensionalen Bild zusammengerechnet wurden. Dabei wird immer der Datenpunkt mit der höchsten Intensität ausgewählt. Dieses Verfahren wird als Maximumsintensitätsprojektion bezeichnet. Weitere Bildbearbeitungen erfolgten mittels ZEN Light Edition 2009 und ImageJ 1.42l (Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA). Für die Anordnung der Bilder wurde das Programm CorelDRAW® X4 (Corel Cooperation, Unterschleißheim) verwendet.

## **2.5 Heterologe Expression**

Für die funktionelle und pharmakologische Charakterisierung wurden die GABA<sub>B</sub>-Rezeptor-Subtypen stabil in das Genom von HEK-flpTM-Zellen (bereitgestellt durch *Sibion biosciences* GmbH, Bonn) integriert. flpTM-Zellen exprimieren konstitutiv eine Variante der A2 Untereinheit des olfaktorischen zyklisch Nukleotid-gesteuerten (CNG)-Kanals (Ludwig *et al.*, 1990). Dieser nicht selektive Kationenkanal besitzt eine ausgeprägte Ca<sup>2+</sup>-Leitfähigkeit und wird durch die Bindung von cAMP geöffnet. Der CNG-Kanal vermittelte Ca<sup>2+</sup>-Einstrom eröffnet somit die Möglichkeit indirekt Änderungen der intrazellulären cAMP Konzentration zu verfolgen. Der Ca<sup>2+</sup>-Influx lässt sich durch den Ca<sup>2+</sup>-sensitiven Fluoreszenzfarbstoff Fluo-4 (Invitrogen, Karlsruhe) messen.

Die Experimente, insbesondere die Herstellung der Zelllinien und die Durchführung der Messungen, erfolgten in Kooperation mit Prof. Dr. Arnd Baumann (*Institute of Complex Systems, Zelluläre Biophysik (ICS-4), Forschungszentrum Jülich*).



### 2.5.1 Anfertigung von Expressionsvektoren

Für die heterologe Expression mussten die Rezeptor-cDNAs modifiziert werden. Unter Verwendung spezifischer Primer (siehe Tab. 6.8) wurde in einer PCR-Reaktion 5'-wärts des Start-Codons eine KOZAK-Konsensus-Sequenz (Kozak, 1984) eingefügt. Zusätzlich wurden sowohl an das 5'- als auch an das 3'-Ende der cDNA eine RE-Schnittstelle eingefügt. Dem Expressionskonstrukt des GABA<sub>B</sub>-Rezeptors 2 (pcDNA-*PeaGB1*) wurde am 3'-Ende der Rezeptor-Sequenz ein Hämagglutinin A (HA)-Tag (abgeleitete Aminosäuresequenz: YPYDVPDYA) sowie ein Stopp-Codon angefügt. Das Konstrukt wurde anschließend in den Vektor pcDNA3.1(+) ligiert. Die veränderte GABA<sub>B</sub>-Rezeptor 1-cDNA von *P. americana* (pcDNA-*PeaGB2*) wurde in den Vektor pcDNA<sup>TM</sup>6/*myc*-His A ligiert. Das von Dr. Klaus Raming (*Bayer CropScience*, Monheim) erhaltene DmGB2-Plasmid wurde ebenfalls, wie oben beschrieben, modifiziert und in den Vektor pcDNA<sup>TM</sup>6/*myc*-His A ligiert (pcDNA-*DmGB2*).

### 2.5.2 Herstellung stabiler flp<sup>TM</sup>-Zelllinien

Es wurden insgesamt drei Zelllinien hergestellt, die neben dem CNG-Kanal folgende Gene konstitutiv exprimieren:

- i. *PeaGB1* und *PeaGB2*
- ii. *PeaGB1* und *DmGB2*
- iii. *PeaGB1*

Die Transfektion der flp<sup>TM</sup>-Zellen erfolgte durch Calciumphosphatpräzipitation (Chen & Okayama, 1987). Je 7,5 µg der Expressionsvektoren wurden mit 124 µl ddH<sub>2</sub>O auf 124 µl aufgefüllt und mit 41 µl CaCl<sub>2</sub> und 165 µl 2 x Borat-gepufferter Salzlösung (BBS) versetzt. Nach einer 20-minütigen Inkubation bei RT wurde der Transfektionsansatz auf die flp<sup>TM</sup>-Zellen gegeben (~4 × 10<sup>5</sup> Zellen/ Ø 5 cm-Schale). Es wurde 20 h bei 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> und 95% Luftfeuchtigkeit inkubiert. Durch Waschen mit 1 x PBS/EDTA-Lösung wurde das Präzipitat entfernt. Die Zellen wurden mit 300 µl Trypsin/EDTA-Lösung vom Schalenboden gelöst (~5 min, 37 °C). Nach der Aufnahme der Zellen in 4,7 ml M10-Medium wurden diese auf sechs 9 cm Schalen verteilt. An den beiden darauffolgenden Tagen wurde jeweils das alte

Medium gegen neues ausgetauscht. Dabei wurde zur Selektion positiver Klone das Medium der Zelllinie iii. mit G418 (Geneticin: 1 mg/ml und Hygromycin 100 µg/ml zur Aufrechterhaltung der CNG-Kanalexpression) versetzt und die Zelllinien i. und ii. mit G418 und Blasticidin (10 µg/ml). Danach erfolgte der Wechsel des Mediums jeweils im Abstand von drei Tagen. Nach 14 Tagen wurden einzelne Klone mit einer Pipettenspitze vorsichtig abgelöst und in 24er Multiwellschalen vermehrt. Mittels Western-Blot-Analysen (siehe 2.4.6) und Immunzytochemie (siehe 2.4.9) wurde die Expression der Rezeptoren überprüft. Bei stabil transfizierten Zellklonen wurde die G418-Konzentration auf 0,8 mg/ml reduziert.

BBS:	50 mM N,N-Bis-(2-hydroxyethyl)-2-aminoethansulfonsäure, 280 mM NaCl, 1,5 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , pH 6,95
PBS/EDTA-Lösung:	PBS, 2g/l EDTA
Trypsin/EDTA-Lösung:	0,05% Trypsin, 0,2 g/l EDTA
DH10-Medium:	DMEM GlutaMAX I ( <i>high glucose</i> 4,5 g/l, Invitrogen, Karlsruhe), 1% (v/v) Antibiotika/Antimykotika, 10% FBS

### 2.5.3 Calciumfluorometrie

In jede Vertiefung einer 96er Multiwellplatte wurden 5 - 7 x 10<sup>3</sup> Zellen ausgesät und über Nacht vermehrt. Nach dem Entfernen des Mediums wurden die Zellen 90 min im Dunkeln in 50 µl Beladelösung inkubiert. In der Zwischenzeit wurden Konzentrationsreihen der Rezeptorliganden im Bereich von 1 nM bis 100 µM in Messlösung erstellt (11 Proben). Die Beladelösung wurde von den Zellen abgesaugt und 90 µl ES-Lösung wurden hinzugegeben. Die fluorometrische Messung erfolgte mit dem Fluoreszenzlesegerät FluoStar Galaxy von BMG Labtech (Ortenberg). Die Anregung von Fluo-4 erfolgte bei 485 nm, das emittierte Licht (520 nm) wurde gemessen. Zuerst wurde unter Verwendung der Omega Software (BMG Labtech, Ortenberg) über fünf Zyklen die basale Fluo-4-Fluoreszenz bestimmt. Dann wurde die 96er Multiwellplatte aus dem Fluoreszenzlesegerät herausgenommen und mit 10 µl der Testlösungen versetzt. Dabei erfolgte für die Kontrollen ES/IBMX/NKH und ES/IBMX/NKH/GABA sowie für die 10<sup>-4</sup> M Lösung jeweils eine 4fach-Bestimmung. Alle anderen Lösungen der Konzentrationsreihe wurden in 8fach-Bestimmungen gemessen. Die Multiwellplatte wurde wieder in den FluoStar Galaxy gestellt und die Fluo-4-Fluoreszenz über weitere 10 Zyklen aufgenommen. Im Anschluss wurde die Messungen mit der *MARS Data Analysis Software*

(BMG Labtech, Ortenberg) bearbeitet. Dabei wurde für die basale Fluo-4-Fluoreszenz der Mittelwert aus den ersten fünf Zyklen bestimmt. Dieser Wert wurde vom Maximalwert der nachfolgenden 10 Zyklen subtrahiert. Für GABA und die Rezeptoragonisten wurden die Werte auf den Kontrollmesswert mit NKH477 (= 100% relative Fluoreszenz) normiert. Für Rezeptorantagonisten wurden die Werte auf den Kontrollmesswert mit 1  $\mu$ M GABA (=100% relative Fluoreszenz) normiert. Die erhaltenen Daten wurden anschließend statistisch und graphisch ausgewertet (Graph Pad Prism 5.0). Die Proteinkonzentration wurde in vier Vertiefungen mit der Bradford-Methode (siehe 2.4.1) bestimmt.

ES-Lösung:	120 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM MgCl <sub>2</sub> , 2 mM CaCl <sub>2</sub> , 10 mM HEPES, 10 mM Glucose, pH 7,4
ES-Lösung ohne Ca <sup>2+</sup> :	120 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM MgCl <sub>2</sub> , 10 mM HEPES, 10 mM Glucose, pH 7,4
Beladelösung:	3 mM Probenecid, 2 mM Fluo-4 AM, 0,02% (w/v) Pluronic® F127 in ES-Lösung
ES/IBMX/NKH:	100 $\mu$ M IBMX (3-Isobutyl-1-methylxanthin), 10 $\mu$ M NKH477 in ES-Lösung
ES/IBMX/NKH/GABA:	1 $\mu$ M GABA in ES/IBMX/NKH
Messlösung Agonist:	unterschiedliche Agonistenkonzentrationen (1 nM - 1 mM) in ES/IBMX/NKH
Messlösung Antagonist:	unterschiedliche Antagonistenkonzentrationen (1 nM - 1 mM) in ES/IBMX/NKH/GABA

## 2.6 Bioinformatische Analysen

Die Datenbanken des *National Center of Biotechnology Information* NCBI wurden neben den gängigen Rechercharbeiten (z.B. Literatur, Sequenzeninformationen) auch für die Suche und den Vergleich von homologen Nukleotid- und Aminosäuresequenzen verwendet (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Die erhaltenen Sequenzdaten wurden mit BioEdit Version 7.0.9.0 (Hall *et al.*, 1999) analysiert und bearbeitet. Sequenzvergleiche wurden in diesem Programm mit ClustalW (Thompson *et al.*, 1994) durchgeführt. Die Berechnung der hypothetischen Transmembrandomänen erfolgte mit den frei verfügbaren Programmen protscale (<http://www.expasy.ch/tools/protscale.html>) und dem TMHMM Server v. 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>). Das Vorhandensein von *coiled-coil* Domänen wurde mit Paircoil (<http://groups.csail.mit.edu/cb/paircoil/cgi-bin/paircoil.cgi>, Berger *et al.*, 1995) bestimmt. Das Programm MEGA 5 (*Molecular*

---

*Evolutionary Genetics Analysis*, Tamura *et al.*, 2011) wurde für die phylogenetische Analyse verwendet. PRISM (Version 4.01; GraphPad, San Diego, USA) wurde sowohl für die Auswertung und Darstellung von Daten und Graphen als auch für statistische Analysen genutzt.

## 3. ERGEBNISSE

Erste Einblicke in den molekularen Aufbau der GABA<sub>B</sub>-Rezeptor Subtypen 1 und 2 der Amerikanischen Großschabe konnten im Rahmen meiner Diplomarbeit (Blankenburg, 2010) gewonnen werden. Mit Hilfe von PCR-Experimenten mit degenerierten Primern und RACE-PCR-Experimenten mit dem *SMART(er)<sup>TM</sup> RACE cDNA Amplification Kits* konnte eine partielle cDNA des putativen GABA<sub>B</sub>-Rezeptors 1 (PeaGB1) isoliert werden. Unbekannt blieb der 5'-Bereich. Für den putativen GABA<sub>B</sub>-Rezeptor 2 (PeaGB2) wurde ein 1426 bp cDNA-Fragment amplifiziert, welches u. a. für die Transmembrandomänen TM 1 - TM 4 kodiert. Dagegen konnte das 5'-Ende, der für die TM 5 - TM 7 kodierende Bereich und der aller Voraussicht nach relativ lange 3'-Bereich der PeaGB2-cDNA nicht isoliert werden.

Umfassend untersucht wurde in der Arbeit Blankenburg (2010) das Verteilungsmuster der GABA<sub>B</sub>-Rezeptor-Transkripte im Gehirn von *P. americana*.

### 3.1 Charakterisierung des GABA<sub>B</sub>-Rezeptors 1

#### 3.1.1 Isolierung der GABA<sub>B</sub>-Rezeptor 1 (PeaGB1) - cDNA

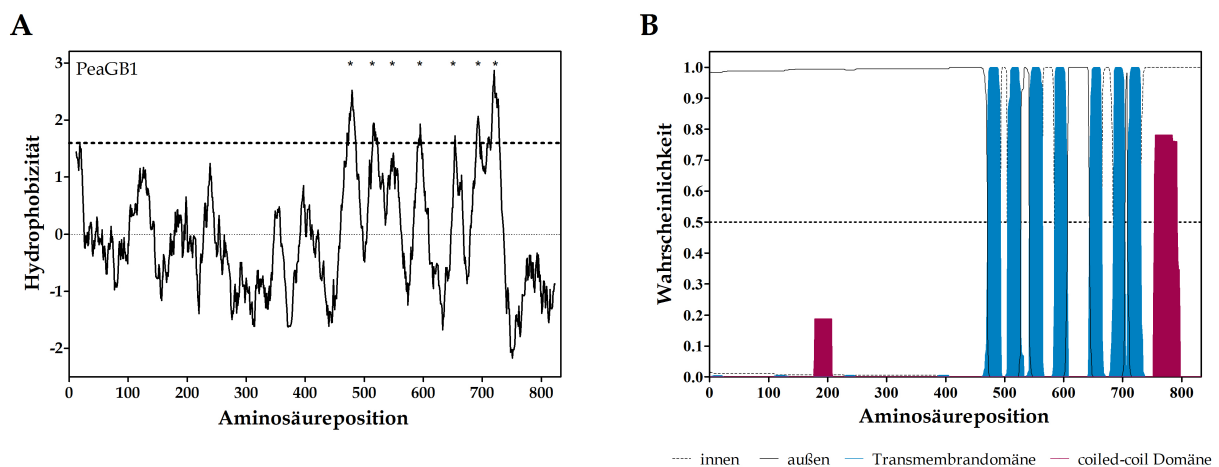
Für die Identifizierung des unbekanntes 5'-Bereichs der PeaGB1-cDNA wurde zunächst das *SMARTer<sup>TM</sup> RACE cDNA Amplification Kit*, kombiniert mit dem *Advantage GC 2 PCR Kit*, verwendet. Da dieses aber zu keiner Amplifikation von cDNA-Fragmenten führte, wurde das *5' / 3' RACE Kit, 2nd Generation* (Roche) genutzt. Durch die Verwendung des im Kit enthaltenen *Oligo dT-anchor-primer* und des spezifischen *reverse*-Primers PeaGB1-R6 (siehe Tab. 6.8) konnte während einer RACE-PCR ein 630 bp langes Fragment amplifiziert werden. Dieses enthält neben dem Start-Codon ATG in 3'-Richtung mehrere Stopp-Codons im Leserahmen und kodiert demnach für das aminoternale Ende des putativen PeaGB1. Schließlich konnte die vollständige Rezeptor-cDNA mit den Primern PeaGB1fl-F und PeaGB1fl-R (siehe Tab. 6.8) amplifiziert und kloniert werden.

### 3.1.2 Aufbau der PeaGB1-cDNA

Die Sequenz der isolierten PeaGB1-cDNA umfasst insgesamt 2.878 bp und besitzt einen offenen Leserahmen (*open reading frame*, ORF) vom Start- bis einschließlich dem Stopp-Codon mit einer Länge von 2.502 bp. Dieser Bereich wird flankiert von 5'- und 3'-untranslatierten Bereichen, welche jeweils mindestens fünf Stopp-Codons innerhalb des ORF aufweisen.

### 3.1.3 Charakteristika des Proteins PeaGB1

Die PeaGB1-cDNA kodiert für ein 833 Aminosäure (AS) langes Protein mit einem kalkulierten Molekulargewicht von ~94,7 kDa und einem isoelektrischen Punkt von pH 7,15. Für PeaGB1 können unter Verwendung des Hydrophathie-Profiles nach Kyte & Doolittle sieben Transmembrandomänen vorhergesagt werden (siehe Abb. 3.1 A). Dies wird durch die TMHMM-Analyse, welche die Wahrscheinlichkeit von TMs berechnet, bestätigt (siehe Abb. 3.1 B).



**Abb. 3.1: Strukturelle Eigenschaften der abgeleiteten PeaGB1-Aminosäuresequenz.** **A** Mittels des Hydrophathieprofils nach Kyte und Doolittle (1982) wurde die Hydrophobizität der Aminosäuren mit einer Fensterbreite von 21 Aminosäuren berechnet. Eine Hydrophobizität >1,6 deutet auf eine Transmembrandomäne hin. **B** Die putativen Transmembrandomänen, berechnet durch den TMHMM Server v. 2.0, sind blau hinterlegt. Extrazelluläre Bereiche sind als durchgängige Linien, intrazellulär gelegene AS als gestrichelte Linien dargestellt. Die Berechnung von *coiled-coil* Domänen (rot) erfolgte mittels *Paircoil*. Wahrscheinlichkeiten über 0.5 deuten auf eine entsprechende Domäne hin.

<i>P. americana</i>	-----	1
<i>D. melanogaster</i>	-----	1
<i>M. musculus</i>	-MLLLLLVPLFLRPLGAGGAQTPNVTSEGCQI IHPPWEGGIRYRGLTRDQVKAINFLPVDYEIEYVCRGE	69
<i>H. sapiens</i>	MLLLLLLAPLFLRPPGAGGAQTPNATSEGCQI IHPPWEGGIRYRGLTRDQVKAINFLPVDYEIEYVCRGE	70
<i>P. americana</i>	-----MYSLCNTIKLGICLLIT-----TLOITLES	24
<i>D. melanogaster</i>	-----MRKDMTSDGAVTFWIF-----LLCLTAS	23
<i>M. musculus</i>	REVVGPKVRKCLANGSWTDMTPSRCVIRICSKSYLTLENGKVFITGGDLPALD GARVDFRCDFHVLVGS	139
<i>H. sapiens</i>	REVVGPKVRKCLANGSWTDMTPSRCVIRICSKSYLTLENGKVFITGGDLPALD GARVDFRCDFHVLVGS	140
<i>P. americana</i>	-----CSAVADDTDDNVLHIGGIFPTGGKGGWGGQACEPAASLALDDVNNRKKDLITG	78
<i>D. melanogaster</i>	-----PHLQGGVAGRPDELHIGGIFPIAGKGGWGGQACMPATRLALDDVNKQPNI LFG	77
<i>M. musculus</i>	SRSICSQGWSTPKPHQOVNRTPHSERRAVYIGALFPMSG--GWPGGQACOPAVEMAL EDVNSRRDILFD	207
<i>H. sapiens</i>	SRSICSQGWSTPKPHQOVNRTPHSERRAVYIGALFPMSG--GWPGGQACOPAVEMAL EDVNSRRDILFD	208
<i>P. americana</i>	FTLKLHWNDSCEPGLGASVMYNLLYNKPKLMLLAGCSTVCTTVAEAAKMWNLVVLOYGASSPALSDRN	148
<i>D. melanogaster</i>	FKLILHSNDSCEPGLGASVMYNLLYNKPKLMLLAGCSTVCTTVAEAAKMWNLVVLOYGASSPALSDRK	147
<i>M. musculus</i>	YELKLIHSDSKCDPGQATKYLYELLYNDPIKILIMP GCSSVSTLVAEAAKMWNLVVLSYSSSPALSNRQ	277
<i>H. sapiens</i>	YELKLIHSDSKCDPGQATKYLYELLYNDPIKILIMP GCSSVSTLVAEAAKMWNLVVLSYSSSPALSNRQ	278
<i>P. americana</i>	RFPTLFRTHPSATVHNPTRIKLMKKEGWSRVAILOQAEVFTSTVDELEARCKEIGIEIVTRQSF LSDPT	218
<i>D. melanogaster</i>	RFPTLFRTHPSATVHNPTRIKLMKKEGWSRVAILOQAEVFTSTVDELENRCMEAGVETIVTRQSF LSDPT	217
<i>M. musculus</i>	RFPTLFRTHPSATLHNPTRVKLF EKKGWKKIATIQQTTEVFTSTLDDLEERVKEAGIEITFRQSF FSDPA	347
<i>H. sapiens</i>	RFPTLFRTHPSATLHNPTRVKLF EKKGWKKIATIQQTTEVFTSTLDDLEERVKEAGIEITFRQSF FSDPA	348
<i>P. americana</i>	DAVRNLRQDARIIVGLFYVVAARRVLCEMYKQHIYKSYVWFFIGWYEDNWF EVNLEKEETECTKEQMR	288
<i>D. melanogaster</i>	DAVRNLRQDARIIVGLFYVVAARRVLCEMYKQHIYKSYVWFFIGWYEDNWF EVNLEKEETECTKEQMR	287
<i>M. musculus</i>	VPVKNLKRQDARIIVGLFYETBARKVFCVEVYKERLFGKKYVWFLIGWYADNWF KTYDPS--INCTVEBMT	415
<i>H. sapiens</i>	VPVKNLKRQDARIIVGLFYETBARKVFCVEVYKERLFGKKYVWFLIGWYADNWF KTYDPS--INCTVDEMT	416
<i>P. americana</i>	TAAEGHITTEALMWNQNNQRTISGKTSSEDFRLRLNEVLRQAGYDIDNMRYPEGYOEAPLAYDAVWAVALA	358
<i>D. melanogaster</i>	TAAEGHITTEALMWNQNNQRTISGKTSSEDFRLRLNEVLRQAGYDIDNMRYPEGYOEAPLAYDAVWVSVALA	357
<i>M. musculus</i>	EAVEGHITTEIVMLNPANTRISNMTSQEFVEKLTKRKRHPPEETG-----GFOEAPLAYDAI WALALA	479
<i>H. sapiens</i>	EAVEGHITTEIVMLNPANTRISNMTSQEFVEKLTKRKRHPPEETG-----GFOEAPLAYDAI WALALA	480
<i>P. americana</i>	FNKTMERLNKHGRSLKNFTYTDKETAENIYAAINSTQFLGVSQVVAFFSSQGDRIALTOIEQMINGTYVKL	428
<i>D. melanogaster</i>	FNKTMERLTTGKSLRDFTYTDKETAENIYAAINSTQFLGVSQVVAFFSSQGDRIALTOIEQMIDGKYKFL	427
<i>M. musculus</i>	LNKTSGGGGRSQRVLEDFNYNQTTITDQIYRAMNSSSFEVSGHVVF DASGSRMAWTLIEQLQGGSYKKI	549
<i>H. sapiens</i>	LNKTSGGGGRSQRVLEDFNYNQTTITDQIYRAMNSSSFEVSGHVVF DASGSRMAWTLIEQLQGGSYKKI	550
<i>P. americana</i>	GYDYDQSDNLTWLNREKWSGGKVPQDRITVIRQVLRVSLPLFCMWTSCIGITMAAIALIVFNWYRHR	498
<i>D. melanogaster</i>	GYDYDQDNLNLSWLNTEQWVIGKVPQDRITVIRVHLRVVSLPLFCMCTTSSCGIFVAFALIIFFNWNKHR	497
<i>M. musculus</i>	GYDYDQDNLNLSWLNTEQWVIGKVPQDRITVIRVHLRVVSLPLFCMCTTSSCGIFVAFALIIFFNWNKHR	619
<i>H. sapiens</i>	GYDYDQDNLNLSWLNTEQWVIGKVPQDRITVIRVHLRVVSLPLFCMCTTSSCGIFVAFALIIFFNWNKHR	620
<i>P. americana</i>	VIQSSHEVCNTIMLLGVCTCLWSVFLGLDGFVSPRVYPIVCOARAWLLCIGFTLAYGAMF SKVWRVHR	568
<i>D. melanogaster</i>	VIQSSHEVCNTIMLLGVCTCLWSVFLGLDGFVSPRVYPIVCOARAWLLCIGFTLAYGAMF SKVWRVHR	567
<i>M. musculus</i>	YIQNSQFNLNLTAVGCSLALAAVFFLGLDGYHIGRSQFPFVCOARLWLLGLGFSLGYGSMFTKIWWVHT	689
<i>H. sapiens</i>	YIQNSQFNLNLTAVGCSLALAAVFFLGLDGYHIGRSQFPFVCOARLWLLGLGFSLGYGSMFTKIWWVHT	690
<i>P. americana</i>	LITTK--AKSEVKK--VEPWKLYLMVTGFLLVLDVLLLTWQLYDPLQRRIEVEFPLEDPVSTEDD IKIRPELE	635
<i>D. melanogaster</i>	FTTK--AKTDPKPKKVEPWKLYTMVSGLLSIDLVILLSWQIFDPLQRYLETFFLEDPVSTDD IKIRPELE	635
<i>M. musculus</i>	VFTKKEEKKEWRKTLPEWKLYATVGLLVGMDILTLAIWQIVDPLHRTIETFAKEEPK-EDIDVSLPQLE	758
<i>H. sapiens</i>	VFTKKEEKKEWRKTLPEWKLYATVGLLVGMDVLTTLAIWQIVDPLHRTIETFAKEEPK-EDIDVSLPQLE	759
<i>P. americana</i>	HCESENNVLGVMYGYKGLVLFVFLAYETRSIKVKQINDSRVYAGMSIYNVAVLCLITAPVTMVIASQ	705
<i>D. melanogaster</i>	HCESQRNSMVLGLVYGLKGLVLFVFLAYETRSIKVKQINDSRVYAGMSIYNVAVLCLITAPVTMVIASQ	705
<i>M. musculus</i>	HCSSKKMNTWLGIFYGYKGLVLLGLFLAYETKSVSTEKINDHRAVGMAL IYNVAVLCLITAPVTMILSSQ	828
<i>H. sapiens</i>	HCSSRKMNTWLGIFYGYKGLVLLGLFLAYETKSVSTEKINDHRAVGMAL IYNVAVLCLITAPVTMILSSQ	829
<i>P. americana</i>	QDASFVAVLAVIFCCFLSMALIFVPKVIEVIR--HPRDKAESKYNPDVGMTKEDEERYQKLV AENELEQ	773
<i>D. melanogaster</i>	QDASFVAVLAVIFCCFLSMALLIFVPKVIEVIR--HPKDKAESKYNPDSAI SKEDEERYQKLV TENELEQ	773
<i>M. musculus</i>	QDAAFVAVLAVIFSSYITLVVLFVPKMRRLLTRGEWQSEAQDTMKTGSSSTNNNEEEKSRLLEKENRELE	898
<i>H. sapiens</i>	QDAAFVAVLAVIFSSYITLVVLFVPKMRRLLTRGEWQSEAQDTMKTGSSSTNNNEEEKSRLLEKENRELE	899





Neben den besagten posttranslationalen Modifikationsmotiven besitzt die translatierte Rezeptorsequenz für GABA<sub>B</sub>-Rezeptoren im N-Terminus charakteristische konservierte Aminosäurereste. So sind vier Cystein-Reste (C<sub>90</sub>, C<sub>116</sub>, C<sub>246</sub>, C<sub>282</sub>) vorhanden, welche Disulfidbrücken ausbilden können. Diese sind während der Synthese des Rezeptors maßgeblich an dessen korrekter Faltung beteiligt. Weiterhin sorgen sie nach dem Transport des Rezeptors zur Plasmamembran für eine höhere Stabilität der Ligandenbindungsdomäne (Galvez *et al.*, 1999). Der Abstand zwischen den ersten zwei Cystein-Resten ist bei Vertebraten konserviert und beträgt 26 AS. Der Abstand zwischen C<sub>246</sub> und C<sub>282</sub> ist wie bei *D. melanogaster* 36 AS lang, aber zwei Aminosäuren kürzer als bei orthologen Vertebraten-Rezeptoren. Die hochkonservierten AS-Reste G<sub>54</sub>, C<sub>58</sub>, G<sub>115</sub>, T<sub>118</sub>, A<sub>139</sub>, S<sub>141</sub>, A<sub>160</sub>, H<sub>163</sub>, V<sub>188</sub>, F<sub>236</sub>, G<sub>264</sub>, W<sub>265</sub>, Y<sub>266</sub>, D<sub>350</sub> und L<sub>347</sub> bilden die orthosterische Bindungsstelle des Liganden und beeinflussen dessen mittlere effektive Dosis (Galvez *et al.*, 1999; Wellendorph & Bräuner-Osborne, 2009). S<sub>117</sub>, G<sub>138</sub>, S<sub>140</sub> und Y<sub>237</sub> sind verantwortlich für die Bindung des Liganden GABA (Geng *et al.*, 2012). S<sub>117</sub> ist zudem in der Lage Ca<sup>2+</sup>-Ionen zu binden, und erhöht die Bindungswahrscheinlichkeit des Liganden durch die Stabilisierung der aktiven geschlossenen Konformation des Venusfliegenfallenmotivs (Galvez *et al.*, 2000a). Ein weiteres wichtiges Motiv ist das R-x-R-Retentionssignal, welches demaskiert zum Verbleib des Rezeptors im Endoplasmatisches Retikulum führt (Margeta-Mitrovic *et al.*, 2000; Pagano *et al.*, 2001). R<sub>820</sub>SRK befindet sich carboxyterminal der *coiled-coil* Domäne. Das bei Vertebraten bekannte Sequenzmotiv (F/Y/L/I)-N-(E/D)-X-(K/R) für die Bindung des G-Proteins an den GABA<sub>B</sub>-Rezeptor 2 (Duthey *et al.*, 2002) findet sich in der ICL3 des PeaGB1 an Position I<sub>675</sub>NDSR. Sushi-Domänen, wie sie für die GB1a der Vertebraten beschrieben worden sind, kommen nicht vor. Gleiches gilt für Cystein-reiche Sequenzabschnitte, welche als grundlegendes Motiv einiger Familie C GPCRs gelten.

Der Vergleich zwischen PeaGB1 und den orthologen Rezeptoren aus *Drosophila melanogaster* (NP 523569.2), *Mus musculus* (NP 062312.3) und *Homo sapiens* 1a (NP 001461.1) zeigt eine große Ähnlichkeit zwischen den Vertebraten- und Invertebraten-Rezeptoren auf (siehe Abb. 3.2). Dies gilt insbesondere für den N-Terminus und die sieben Transmembrandomänen. Die Identität sowie die

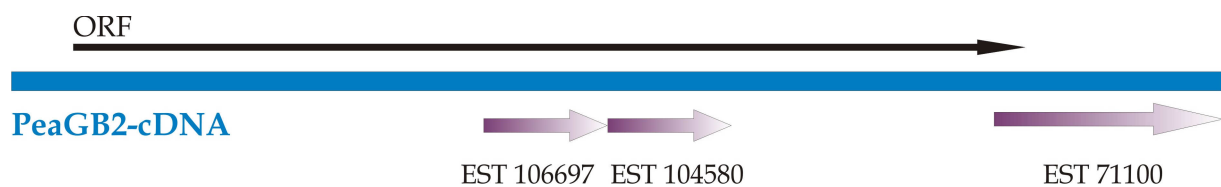
Ähnlichkeit von PeaGB1 zu dem orthologen Rezeptor der Taufliede liegt bei 80%/88%. Zu den Vertebraten-Rezeptoren ist die Sequenzähnlichkeit etwas geringer: So beträgt die Identität sowohl zur Hausmaus als auch zum Mensch 50%, die Ähnlichkeit sogar 68%.

## **3.2 Charakterisierung des GABA<sub>B</sub>-Rezeptors 2**

### **3.2.1 Isolierung der GABA<sub>B</sub>-Rezeptor 2 (PeaGB2) - cDNA**

Das 5'-Ende der PeaGB2-cDNA wurde mittels des *5' / 3' RACE Kit, 2nd Generation* von Roche amplifiziert. Unter Verwendung des *Oligo dT-anchor-primers* und des *reverse-Primers* PeaGB2-R1 (siehe Tab. 6.8) konnte ein 620 bp langes cDNA-Fragment gewonnen werden, welches 5'-wärts des Start-Codons im Leserahmen mehrere Stopp-Codons enthält. In Richtung des 3'-Endes wurden durch eine PCR mit dem spezifischen *forward-Primer* PeaGB2-F2 (siehe Tab. 6.8) und dem degenerierten *reverse-Primer* PeaGB2-R2 (siehe Tab. 6.8) ein 350 bp langes DNA-Fragment isoliert, welches u. a. für die Transmembrandomänen TM5 und TM6 kodiert. Für die Isolierung des verbleibenden unbekanntem 3'-Bereichs wurden neben dem *5' / 3' RACE Kit, 2nd Generation* auch das *SMARTer™ RACE cDNA Amplification Kit* in Kombination mit dem *Advantage GC 2 PCR Kit* eingesetzt. Da beide Methoden nicht zum Erfolg führten, wurden PCR-basierte *genome walking*-Strategien etabliert und durchgeführt. Hierbei wurde anstelle von cDNA aufgereinigte genomische DNA verwendet. Die Anwendung von Inverser PCR, *randomly primed-PCR* und Vektorette-PCR führten jedoch ebenfalls nicht zu einer Identifizierung neuer PeaGB2-Genbereiche. Die Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Toru Miura (Universität Hokkaido, Japan) ermöglichte den Zugriff auf die von Ihnen erstellte *P. americana* EST-Datenbank. Für den Sequenzvergleich wurden die bisher isolierten PeaGB1- und PeaGB2-cDNA-Fragmente und die vorhergesagten DNA-Sequenzen der orthologen Rezeptoren von *Pediculus humanis corporis* genutzt. Es konnten in der Datenbank drei cDNA-Fragmente EST 71100 (914 bp), EST 106697 (657 bp) und EST 104580 (526 bp) identifiziert werden (siehe Abb. 3.3; Abb. 6.3-6.5). Diese weisen eine große Ähnlichkeit zu 3'-gelegenen Bereichen orthologer Invertebraten-

Rezeptoren auf. EST 71100 kodiert im ORF für einen 45 AS langen Proteinabschnitt, welcher den C-Terminus des PeaGB2 darstellt (siehe Abb. 3.3; Abb. 6.5). In der Nucleotidsequenz folgt im Leserahmen ein Stopp-Codon, sowie ein 777 bp langer nichttranslatierter Bereich mit 14 weiteren Stopp-Codons. Auf der Grundlage dieses Fragments wurde nun für eine spezifische PCR der *reverse*-Primer PeaGB2-R3 (siehe Tab. 6.8) konstruiert, welcher im nicht-translatierten Bereich bindet. So konnte zusammen mit dem *forward*-Primer PeaGB2-F3 (siehe Tab. 6.8) ein 1671 bp langes DNA-Fragment isoliert werden. Dieses kodiert für den fehlenden PeaGB1 C-Terminus von *P. americana*. Die Isolierung der *full-length* PeaGB2-cDNA erfolgte mit den Primern PeaGB2fl-F und PeaGB2fl-R (siehe Tab. 6.8).



**Ab. 3.3:** Schematische Darstellung der Positionen der cDNA-Fragmente, erhalten aus der *P. americana* EST-Datenbank, im Vergleich zur isolierten PeaGB2-cDNA. Die drei cDNA-Fragmente befinden sich im 3'-Bereich der PeaGB2-cDNA. EST 71100 beinhaltet neben einem kurzen Bereich des ORF (*open reading frame*, Leserahmen) einen Abschnitt des 3'-nicht-translatierten Bereiches und wurde für die Konstruktion spezifischer PCR-Primer genutzt.

### 3.2.2 Aufbau der PeaGB2-cDNA

Die isolierte cDNA-Sequenz des PeaGB2 besitzt eine Länge von 4.102 bp. Der ORF von Start- bis einschließlich Stopp-Codon ist 3.801 bp lang und wird von 5'- und 3'-nicht-translatierten Bereichen flankiert.

### 3.2.3 Charakteristika des Proteins PeaGB2

Die PeaGB2-cDNA kodiert für ein 1.267 AS langes Protein mit einem kalkulierten Molekulargewicht von ~141,1 kDa und einem isoelektrischen Punkt von pH 8,53. Die Analyse des Hydropathieprofils nach Kyte und Doolittle (1982) ergab sieben mögliche Transmembrandomänen (Abb. 3.4 A). Die TM 3 besitzt, ebenso wie die TM 3 des PeaGB1 (siehe Abb. 3.1), einen Hydropathiewert, der etwas geringer als 1,6 ist. Die TMHMM Vorhersage ergibt ebenfalls sieben Transmembrandomänen (siehe

Abb. 3.4 B). Jedoch passiert nach dieser Vorhersage die TM 4 nicht vollständig die Membran und bildet eine intrazellulär gelegene Schleife. Folglich sind alle weiteren C-terminal gelegenen Schleifen als seitenverkehrt exponiert angegeben. Der C-Terminus liegt extrazellulär. Die Analyse des GB2 von *D. melanogaster* (AF318273) ergab ein analoges Profil. Die Funktionalität des GB2 von *D. melanogaster* wurde bereits in Expressionsexperimenten nachgewiesen (Mezler *et al.*, 2001), so dass in der nachfolgenden Angabe weiterer Charakteristika des PeaGB2 von sieben Transmembrandomänen ausgegangen wird.

Der N-Terminus des putativen PeaGB2 hat eine Länge von 452 AS. Es folgen sieben 23 AS lange Transmembrandomänen mit wechselseitig gelegenen Schleifen. Der C-Terminus ist 553 AS lang und weist eine *coiled-coil* Domäne an AS-Position 747-779 auf.

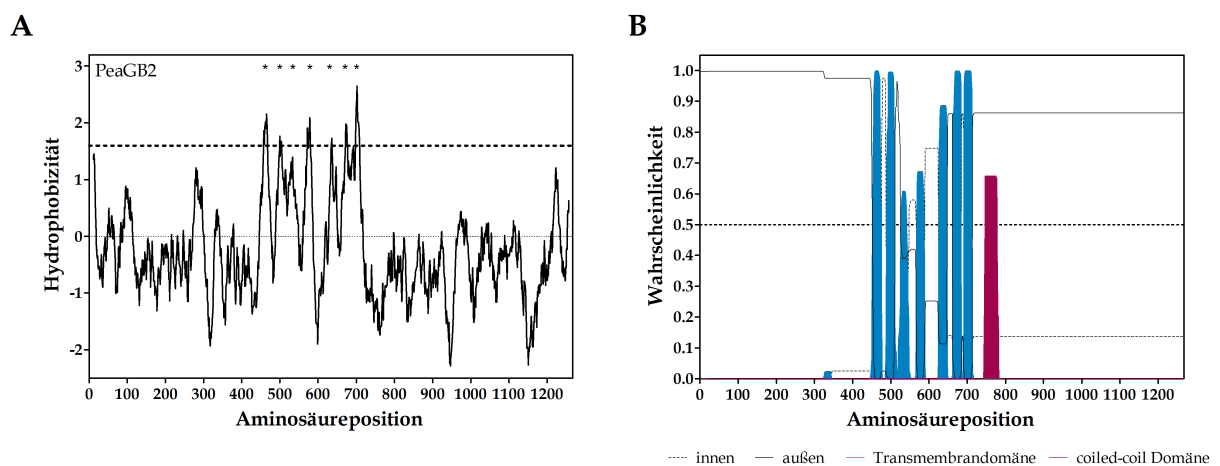


Abb. 3.4: **Strukturelle Eigenschaften der abgeleiteten PeaGB2-Aminosäuresequenz.** **A** Die Hydrophobizität der Aminosäuren wurde mittels des Hydropathieprofils nach Kyte und Doolittle (1982) mit einer Fensterbreite von 21 Aminosäuren berechnet. Hydrophobizitätswerte >1,6 deuten auf eine Transmembrandomäne hin. **B** Die putativen Transmembrandomänen, berechnet durch den TMHMM Server v. 2.0, sind blau hinterlegt. Extrazelluläre Bereiche sind als durchgezogene Linien, intrazellulär gelegene Aminosäuren als gestrichelte Linien dargestellt. Die Ermittlung möglicher *coiled-coil* Domänen (rot) erfolgte mittels Paircoil. Wahrscheinlichkeiten >0.5 deuten auf eine *coiled-coil* Domäne hin.

<i>P. americana</i>	-----MALLGACLLALLCFASCQKPNLAGNKRSD-----VYIAGFFPYGRHIPE	44
<i>D. melanogaster</i>	-----MFRPSWPFASLLFLLLWSTACGRITAKRSD-----VYIAGFFPYGDGVEN	45
<i>M. musculus</i>	MASPPSSGQFRPPPPPPPP-ARLLPLLLSLLLSLAPGAWGARGAPRPPSSPPLSIMGLMPLTKVAVK	69
<i>H. sapiens</i>	MASPRSSGQFGPPPPPPPPARLLPLLLPLLLPLAPGAWGARGAPRPPSSPPLSIMGLMPLTKVAVK	70
<i>P. americana</i>	SRVGRGVMP <sup>◇</sup> SVMLAVDHTINENPSVLRNYMHHMYWNDTECNAAVGVKAFEDMMHIGPHKVMIFGAACTQVT	114
<i>D. melanogaster</i>	SYTGRGVMP <sup>●</sup> SVKKLALGHVNEHGKILANRYLRHMWWDTCNAAVGVKSFEDMMHSGPNKVMIFGAACTHVT	115
<i>M. musculus</i>	GSI <sup>■</sup> GRGVLP <sup>■</sup> AVELALTEQIR-NESSLRPFYFDLRLYDTECDNAKGLKAFYDAIKYGNHLMVFGGVCP <sup>■</sup> SVT	138
<i>H. sapiens</i>	GSI <sup>■</sup> GRGVLP <sup>■</sup> AVELALTEQIR-NESSLRPFYFDLRLYDTECDNAKGLKAFYDAIKYGNHLMVFGGVCP <sup>■</sup> SVT	139
<i>P. americana</i>	DPIAKASRRWHLTQLSYADTHPMFT-KQHFENFFRVVPS <sup>◇</sup> ENAFNAPRLKLLQEFNWTRVGTIYQNEPRYS	183
<i>D. melanogaster</i>	DPIAKASKHWHLTQLSYADTHPMFT-KDAFENFFRVVPS <sup>◇</sup> ENAFNAPRLALLKEFNWTRVGTIYQNEPRYS	184
<i>M. musculus</i>	SIIAESLQGNLVLQLSFAATTPVLADKKKMYFFRTPVPSDNVAVNPAILKLLKHFRWRVGTITQDVFQFS	208
<i>H. sapiens</i>	SIIAESLQGNLVLQLSFAATTPVLADKKKMYFFRTPVPSDNVAVNPAILKLLKHFRWRVGTITQDVFQFS	209
<i>P. americana</i>	LAHNRLVADLD <sup>◇</sup> TMGFQVEITQSFANEVASAMNKLK <sup>●</sup> EKDVRIILGNFNEHWARRVFC <sup>■</sup> EHRAGMFG <sup>■</sup> KRYQW	253
<i>D. melanogaster</i>	LPHNHMVADLD <sup>◇</sup> AMEVEVVEITQSFVNDVAESIKKLR <sup>●</sup> EKDVRIILGNFNEHFARKAFCEAYKLD <sup>■</sup> MYGRAYQW	254
<i>M. musculus</i>	EVRNDLTGVLYGEDIEISDTESFSNDPCTSVK <sup>◇</sup> KLKGN <sup>●</sup> DVRIILGQFDQNM <sup>■</sup> AAKVFC <sup>■</sup> CAFEESMFGSKYQW	278
<i>H. sapiens</i>	EVRNDLTGVLYGEDIEISDTESFSNDPCTSVK <sup>◇</sup> KLKGN <sup>●</sup> DVRIILGQFDQNM <sup>■</sup> AAKVFC <sup>■</sup> CAFEENMYGSKYQW	279
<i>P. americana</i>	IIMGT <sup>■</sup> YTEB <sup>■</sup> WMM---NEEGIVPCSLTELASALEG <sup>●</sup> ITLTDLLPLSTNGEITVSGITAE <sup>■</sup> EYRI <sup>■</sup> EYDSRR--GS	319
<i>D. melanogaster</i>	LIMATYSTDWNN---VTQDSE-OSVEE <sup>●</sup> IATALEGAILVDLLPLSTSGDITVAGITADEYLV <sup>■</sup> EYDRIR--GT	319
<i>M. musculus</i>	IIPGWYEP <sup>■</sup> AWNEQVHVEANS <sup>■</sup> SRCLR <sup>■</sup> RSLL <sup>■</sup> AA <sup>■</sup> MEGYIGVD <sup>■</sup> FEPLSSKQIKITISGKTP <sup>■</sup> QOYEREYNSK <sup>■</sup> RS <sup>■</sup> SGV	348
<i>H. sapiens</i>	IIPGWYEP <sup>■</sup> SWNEQVHTEANS <sup>■</sup> SRCLR <sup>■</sup> RKNLL <sup>■</sup> AA <sup>■</sup> MEGYIGVD <sup>■</sup> FEPLSSKQIKITISGKTP <sup>■</sup> QOYEREYNNK <sup>■</sup> RS <sup>■</sup> SGV	349
<i>P. americana</i>	EYSRFHGYTYDGIWAAALATQ <sup>◇</sup> CHVAHRIRHFRK <sup>◇</sup> NTVVD <sup>◇</sup> FRV <sup>◇</sup> RDPLWEDL <sup>◇</sup> FEALRNTS <sup>◇</sup> FE <sup>◇</sup> GV <sup>◇</sup> TGP <sup>◇</sup> VRFYD	389
<i>D. melanogaster</i>	EYSRFHGYTYDGIWAAALATQ <sup>◇</sup> YVAE-----KREDLL <sup>◇</sup> TH <sup>◇</sup> F <sup>◇</sup> YRVKDWESV <sup>◇</sup> FEALRNTS <sup>◇</sup> FE <sup>◇</sup> GV <sup>◇</sup> TGP <sup>◇</sup> VRFYN	384
<i>M. musculus</i>	GPSK <sup>◇</sup> FHGYAYDGIWVIAKTLQ <sup>◇</sup> RAMETL <sup>◇</sup> HASSR <sup>◇</sup> HQR <sup>◇</sup> IQDFNY <sup>◇</sup> TDHTLGR <sup>◇</sup> ITL <sup>◇</sup> NAMNET <sup>◇</sup> NFF <sup>◇</sup> GV <sup>◇</sup> TGQ <sup>◇</sup> VVFRN	418
<i>H. sapiens</i>	GPSK <sup>◇</sup> FHGYAYDGIWVIAKTLQ <sup>◇</sup> RAMETL <sup>◇</sup> HASSR <sup>◇</sup> HQR <sup>◇</sup> IQDFNY <sup>◇</sup> TDHTLGR <sup>◇</sup> ITL <sup>◇</sup> NAMNET <sup>◇</sup> NFF <sup>◇</sup> GV <sup>◇</sup> TGQ <sup>◇</sup> VVFRN	419
<i>P. americana</i>	NERKASILLKQFONGSEMKE <sup>◇</sup> GEFNGVTEQ <sup>◇</sup> LDLTRGHAIR <sup>◇</sup> WHGRAPPKDR <sup>◇</sup> ITLQ <sup>◇</sup> IFEHSHVNIT <sup>◇</sup> IYSL <sup>◇</sup> LAAT	459
<i>D. melanogaster</i>	NERKANILINOFQLGOMEKIGEYHSOKSHE <sup>◇</sup> DLSLGKPKV <sup>◇</sup> WVGKTPPKDR <sup>◇</sup> ITL <sup>◇</sup> IYIEHSQVNP <sup>◇</sup> TIYIVSASA	454
<i>M. musculus</i>	GERMGTIK <sup>◇</sup> FTQFQDSRE <sup>◇</sup> VK <sup>◇</sup> VGEYNA <sup>◇</sup> VADTLEI <sup>◇</sup> IN-DT <sup>◇</sup> IRE <sup>◇</sup> FQ <sup>◇</sup> SEPPKDK <sup>◇</sup> ITL <sup>◇</sup> LEQLRKISL <sup>◇</sup> PLYS <sup>◇</sup> ILSAL	487
<i>H. sapiens</i>	GERMGTIK <sup>◇</sup> FTQFQDSRE <sup>◇</sup> VK <sup>◇</sup> VGEYNA <sup>◇</sup> VADTLEI <sup>◇</sup> IN-DT <sup>◇</sup> IRE <sup>◇</sup> FQ <sup>◇</sup> SEPPKDK <sup>◇</sup> ITL <sup>◇</sup> LEQLRKISL <sup>◇</sup> PLYS <sup>◇</sup> ILSAL	488
<i>P. americana</i>	ASVGI <sup>◇</sup> VMAISFLAINITYRNQRYIKMSSPY <sup>◇</sup> LNLIIT <sup>◇</sup> GCMLTYSSVIFLGLDSTLTSVEA <sup>◇</sup> FPYICTARAW	529
<i>D. melanogaster</i>	SVIGVITAVVFLAFNIKYNQRYIKMSSP <sup>◇</sup> LNLIIT <sup>◇</sup> GCMMTYLSIFLGLDSTLTSVAA <sup>◇</sup> FPYICTARAW	524
<i>M. musculus</i>	TILGMIMASAF <sup>◇</sup> LFN <sup>◇</sup> IKNR <sup>◇</sup> NKLI <sup>◇</sup> KMSSPY <sup>◇</sup> MNLIIT <sup>◇</sup> LGMLSYASIFLGLDGSFSEK <sup>◇</sup> FTETLCV <sup>◇</sup> VRTW	557
<i>H. sapiens</i>	TILGMIMASAF <sup>◇</sup> LFN <sup>◇</sup> IKNR <sup>◇</sup> NKLI <sup>◇</sup> KMSSPY <sup>◇</sup> MNLIIT <sup>◇</sup> LGMLSYASIFLGLDGSFSEK <sup>◇</sup> FTETLCV <sup>◇</sup> VRTW	558
<i>P. americana</i>	LLMAG <sup>◇</sup> FSLAF <sup>◇</sup> SGMFS <sup>◇</sup> SKTWRVHSIF <sup>◇</sup> TDV <sup>◇</sup> KL <sup>◇</sup> NK <sup>◇</sup> KVI <sup>◇</sup> KDYQL <sup>◇</sup> FMVGV <sup>◇</sup> LV <sup>◇</sup> LDLAIMT <sup>◇</sup> TWQ <sup>◇</sup> VD <sup>◇</sup> PFYRET <sup>◇</sup> KQM	599
<i>D. melanogaster</i>	LLMAG <sup>◇</sup> FSLAF <sup>◇</sup> SGMFS <sup>◇</sup> SKTWRVHSIF <sup>◇</sup> TDI <sup>◇</sup> KL <sup>◇</sup> NK <sup>◇</sup> KVI <sup>◇</sup> KDYQL <sup>◇</sup> FMVGV <sup>◇</sup> LV <sup>◇</sup> LDLAIMT <sup>◇</sup> TWQ <sup>◇</sup> IA <sup>◇</sup> DPFYRET <sup>◇</sup> KQL	594
<i>M. musculus</i>	ILTVGYTTAF <sup>◇</sup> GAMFA <sup>◇</sup> KTWRV <sup>◇</sup> HAI <sup>◇</sup> FN <sup>◇</sup> V <sup>◇</sup> K <sup>◇</sup> M <sup>◇</sup> R <sup>◇</sup> KKI <sup>◇</sup> IKD <sup>◇</sup> Q <sup>◇</sup> KL <sup>◇</sup> LV <sup>◇</sup> IV <sup>◇</sup> GGML <sup>◇</sup> L <sup>◇</sup> IDL <sup>◇</sup> CIL <sup>◇</sup> ICWQ <sup>◇</sup> AV <sup>◇</sup> DL <sup>◇</sup> RR <sup>◇</sup> TR <sup>◇</sup> VEKY	627
<i>H. sapiens</i>	ILTVGYTTAF <sup>◇</sup> GAMFA <sup>◇</sup> KTWRV <sup>◇</sup> HAI <sup>◇</sup> FN <sup>◇</sup> V <sup>◇</sup> K <sup>◇</sup> M <sup>◇</sup> R <sup>◇</sup> KKI <sup>◇</sup> IKD <sup>◇</sup> Q <sup>◇</sup> KL <sup>◇</sup> LV <sup>◇</sup> IV <sup>◇</sup> GGML <sup>◇</sup> L <sup>◇</sup> IDL <sup>◇</sup> CIL <sup>◇</sup> ICWQ <sup>◇</sup> AV <sup>◇</sup> DL <sup>◇</sup> RR <sup>◇</sup> TR <sup>◇</sup> VEKY	628
<i>P. americana</i>	EPY <sup>◇</sup> PH <sup>◇</sup> SSD <sup>◇</sup> IL <sup>◇</sup> IV <sup>◇</sup> ENE <sup>◇</sup> Y <sup>◇</sup> QSER <sup>◇</sup> MT <sup>◇</sup> IFV <sup>◇</sup> CSI <sup>◇</sup> IYAKGLLM <sup>◇</sup> FGAF <sup>◇</sup> LAWETR <sup>◇</sup> HVS <sup>◇</sup> IPAL <sup>◇</sup> ND <sup>◇</sup> SKY <sup>◇</sup> IGMS <sup>◇</sup> VYN	669
<i>D. melanogaster</i>	EPLH <sup>◇</sup> HN <sup>◇</sup> ID <sup>◇</sup> VL <sup>◇</sup> IV <sup>◇</sup> ENE <sup>◇</sup> Y <sup>◇</sup> QSE <sup>◇</sup> HMT <sup>◇</sup> IFV <sup>◇</sup> ST <sup>◇</sup> IYAKGLL <sup>◇</sup> V <sup>◇</sup> FGAF <sup>◇</sup> LAWETR <sup>◇</sup> HVS <sup>◇</sup> IPAL <sup>◇</sup> ND <sup>◇</sup> SK <sup>◇</sup> H <sup>◇</sup> IG <sup>◇</sup> SVYN	664
<i>M. musculus</i>	SME <sup>◇</sup> PD <sup>◇</sup> AGR <sup>◇</sup> DIS <sup>◇</sup> IR <sup>◇</sup> ELLE <sup>◇</sup> HC <sup>◇</sup> ENT <sup>◇</sup> HMT <sup>◇</sup> IWL <sup>◇</sup> GIV <sup>◇</sup> YAKGLLM <sup>◇</sup> FGCF <sup>◇</sup> LAWETR <sup>◇</sup> NVS <sup>◇</sup> IPAL <sup>◇</sup> ND <sup>◇</sup> SKY <sup>◇</sup> IGMS <sup>◇</sup> VYN	697
<i>H. sapiens</i>	SME <sup>◇</sup> PD <sup>◇</sup> AGR <sup>◇</sup> DIS <sup>◇</sup> IR <sup>◇</sup> ELLE <sup>◇</sup> HC <sup>◇</sup> ENT <sup>◇</sup> HMT <sup>◇</sup> IWL <sup>◇</sup> GIV <sup>◇</sup> YAKGLLM <sup>◇</sup> FGCF <sup>◇</sup> LAWETR <sup>◇</sup> NVS <sup>◇</sup> IPAL <sup>◇</sup> ND <sup>◇</sup> SKY <sup>◇</sup> IGMS <sup>◇</sup> VYN	698
<i>P. americana</i>	VVIMCVMGAAIS <sup>◇</sup> FLV <sup>◇</sup> SD <sup>◇</sup> KQ <sup>◇</sup> DA <sup>◇</sup> SFI <sup>◇</sup> IT <sup>◇</sup> SV <sup>◇</sup> FI <sup>◇</sup> IFCT <sup>◇</sup> TG <sup>◇</sup> TL <sup>◇</sup> CL <sup>◇</sup> V <sup>◇</sup> FV <sup>◇</sup> PK <sup>◇</sup> LIE <sup>◇</sup> L <sup>◇</sup> K <sup>◇</sup> NP <sup>◇</sup> QGS <sup>◇</sup> ID <sup>◇</sup> K <sup>◇</sup> MIR <sup>◇</sup> AT <sup>◇</sup> LRPMS	739
<i>D. melanogaster</i>	VFI <sup>◇</sup> IT <sup>◇</sup> CLAGAAIS <sup>◇</sup> FLV <sup>◇</sup> SD <sup>◇</sup> RK <sup>◇</sup> DL <sup>◇</sup> V <sup>◇</sup> FL <sup>◇</sup> LS <sup>◇</sup> FFI <sup>◇</sup> IFCT <sup>◇</sup> TAT <sup>◇</sup> LC <sup>◇</sup> V <sup>◇</sup> FV <sup>◇</sup> PK <sup>◇</sup> LIE <sup>◇</sup> L <sup>◇</sup> K <sup>◇</sup> NP <sup>◇</sup> QGV <sup>◇</sup> DK <sup>◇</sup> -VRAT <sup>◇</sup> LRPMS	733
<i>M. musculus</i>	VGIMCII <sup>◇</sup> GA <sup>◇</sup> AV <sup>◇</sup> SFL <sup>◇</sup> TRD <sup>◇</sup> Q <sup>◇</sup> PNV <sup>◇</sup> Q <sup>◇</sup> FC <sup>◇</sup> I <sup>◇</sup> VAL <sup>◇</sup> VI <sup>◇</sup> IFCS <sup>◇</sup> IT <sup>◇</sup> TL <sup>◇</sup> CL <sup>◇</sup> V <sup>◇</sup> FV <sup>◇</sup> PK <sup>◇</sup> LIT <sup>◇</sup> LR <sup>◇</sup> IN <sup>◇</sup> PD <sup>◇</sup> AA <sup>◇</sup> TQ <sup>◇</sup> NR <sup>◇</sup> RF <sup>◇</sup> Q <sup>◇</sup> TQ----	762
<i>H. sapiens</i>	VGIMCII <sup>◇</sup> GA <sup>◇</sup> AV <sup>◇</sup> SFL <sup>◇</sup> TRD <sup>◇</sup> Q <sup>◇</sup> PNV <sup>◇</sup> Q <sup>◇</sup> FC <sup>◇</sup> I <sup>◇</sup> VAL <sup>◇</sup> VI <sup>◇</sup> IFCS <sup>◇</sup> IT <sup>◇</sup> TL <sup>◇</sup> CL <sup>◇</sup> V <sup>◇</sup> FV <sup>◇</sup> PK <sup>◇</sup> LIT <sup>◇</sup> LR <sup>◇</sup> IN <sup>◇</sup> PD <sup>◇</sup> AA <sup>◇</sup> TQ <sup>◇</sup> NR <sup>◇</sup> RF <sup>◇</sup> Q <sup>◇</sup> TQ----	763
<i>P. americana</i>	KT-RRDSVASELE <sup>◇</sup> KK <sup>◇</sup> LK <sup>◇</sup> DA <sup>◇</sup> AFN <sup>◇</sup> QY <sup>◇</sup> RK <sup>◇</sup> QL <sup>◇</sup> LERE <sup>◇</sup> TELQ <sup>◇</sup> MLV <sup>◇</sup> RR <sup>◇</sup> LG <sup>◇</sup> DEGR <sup>◇</sup> DILES <sup>◇</sup> DIG <sup>◇</sup> M <sup>◇</sup> DR <sup>◇</sup> LAV <sup>◇</sup> PR <sup>◇</sup> HD <sup>◇</sup> ALI	808
<i>D. melanogaster</i>	KNGRRDSSVCELE <sup>◇</sup> QR <sup>◇</sup> LR <sup>◇</sup> V <sup>◇</sup> KN <sup>◇</sup> TN <sup>◇</sup> CR <sup>◇</sup> FR <sup>◇</sup> KAL <sup>◇</sup> ME <sup>◇</sup> KEN <sup>◇</sup> ELQ <sup>◇</sup> AL <sup>◇</sup> IR <sup>◇</sup> KL <sup>◇</sup> GP <sup>◇</sup> E <sup>◇</sup> ARK <sup>◇</sup> WID <sup>◇</sup> GV <sup>◇</sup> TCT <sup>◇</sup> GG <sup>◇</sup> SN <sup>◇</sup> VG <sup>◇</sup> SE <sup>◇</sup> LE <sup>◇</sup> PI	803
<i>M. musculus</i>	-----NOKKEDSKTS-----TSVTSV	779
<i>H. sapiens</i>	-----NOKKEDSKTS-----TSVTSV	780
<i>P. americana</i>	KRE <sup>◇</sup> TE <sup>◇</sup> ISS-LCSL <sup>◇</sup> NSSQ <sup>◇</sup> GEY <sup>◇</sup> VNLT-VET <sup>◇</sup> PS <sup>◇</sup> QR <sup>◇</sup> KK <sup>◇</sup> TS <sup>◇</sup> FS <sup>◇</sup> TK <sup>◇</sup> PP <sup>◇</sup> SI <sup>◇</sup> AV <sup>◇</sup> M <sup>◇</sup> GT <sup>◇</sup> RE <sup>◇</sup> PP <sup>◇</sup> Q <sup>◇</sup> GL <sup>◇</sup> TG <sup>◇</sup> APA <sup>◇</sup> ASC	876
<i>D. melanogaster</i>	LNDDIV <sup>◇</sup> RLSAPPV <sup>◇</sup> REMP <sup>◇</sup> ST <sup>◇</sup> TEV <sup>◇</sup> TE <sup>◇</sup> MT <sup>◇</sup> SV <sup>◇</sup> DS <sup>◇</sup> VT <sup>◇</sup> ST <sup>◇</sup> H <sup>◇</sup> VE <sup>◇</sup> MD <sup>◇</sup> NS <sup>◇</sup> FS <sup>◇</sup> V <sup>◇</sup> Q <sup>◇</sup> ST <sup>◇</sup> V <sup>◇</sup> MAP <sup>◇</sup> SL <sup>◇</sup> PP-----	859
<i>M. musculus</i>	NQASTSR-----	785
<i>H. sapiens</i>	NQASTSR-----	786

<i>P. americana</i>	LRKKSSSLENQDRLPASAMRTSLLGEEAEDS <b>EP</b> LI <b>ES</b> STASKLTVSGGESNVHFV <b>PE</b> GP <b>EEEE</b> DGH 946
<i>D. melanogaster</i>	-----K <b>KKK</b> Q <b>S</b> IV <b>EH</b> SHAP <b>APT</b> MM <b>Q</b> P-----I <b>QQ</b> Q <b>L</b> Q <b>Q</b> H <b>L</b> Q <b>Q</b> M <b>Q</b> Q <b>H</b> L <b>Q</b> Q <b>Q</b> H <b>Q</b> Q <b>Q</b> M <b>Q</b> Q <b>Q</b> Q <b>Q</b> Q <b>Q</b> H <b>HR</b> H 923
<i>M. musculus</i>	-----L <b>EG</b> L <b>Q</b> SE <b>NH</b> RL <b>RM</b> K <b>IT</b> EL <b>DK</b> D <b>LE</b> V <b>IT</b> M <b>L</b> Q <b>LD</b> T <b>P</b> <b>E</b> K <b>TT</b> 823
<i>H. sapiens</i>	-----L <b>EG</b> L <b>Q</b> SE <b>NH</b> RL <b>RM</b> K <b>IT</b> EL <b>DK</b> D <b>LE</b> V <b>IT</b> M <b>L</b> Q <b>LD</b> T <b>P</b> <b>E</b> K <b>TT</b> 824
▲	
<i>P. americana</i>	VDE <b>E</b> K <b>S</b> LDR <b>RL</b> P <b>TP</b> PP <b>A</b> L <b>AK</b> V <b>V</b> S <b>F</b> C <b>D</b> V <b>T</b> N <b>I</b> PASAPMPAPAP <b>VT</b> VED <b>T</b> IL <b>PP</b> <b>E</b> K <b>Q</b> F <b>HP</b> K <b>Q</b> Q <b>VR</b> PP <b>LS</b> AL <b>R</b> 1016
<i>D. melanogaster</i>	LE <b>K</b> R <b>N</b> SV <b>S</b> ---A <b>Q</b> T <b>DD</b> N <b>I</b> G <b>S</b> I <b>T</b> S <b>T</b> A <b>G</b> K <b>R</b> S <b>G</b> G <b>D</b> C <b>SS</b> M <b>R</b> ER <b>R</b> O <b>ST</b> A <b>S</b> R <b>H</b> <b>Y</b> D <b>SG</b> S <b>Q</b> ---T <b>P</b> T <b>A</b> R <b>PK</b> Y <b>SS</b> S <b>H</b> 985
<i>M. musculus</i>	Y <b>I</b> K <b>Q</b> N <b>H</b> Y <b>Q</b> -----E <b>L</b> N <b>D</b> I <b>L</b> S <b>L</b> C <b>N</b> F <b>E</b> S <b>T</b> D <b>G</b> G-----K <b>A</b> I <b>L</b> K <b>N</b> H <b>L</b> D <b>Q</b> N <b>P</b> O----- 861
<i>H. sapiens</i>	Y <b>I</b> K <b>Q</b> N <b>H</b> Y <b>Q</b> -----E <b>L</b> N <b>D</b> I <b>L</b> L <b>N</b> L <b>C</b> N <b>F</b> <b>E</b> S <b>T</b> D <b>G</b> G-----K <b>A</b> I <b>L</b> K <b>N</b> H <b>L</b> D <b>Q</b> N <b>P</b> O----- 862
▲▲	
<i>P. americana</i>	RR <b>S</b> SV <b>K</b> SV <b>S</b> SG <b>N</b> SS <b>A</b> AG <b>M</b> Q <b>V</b> L <b>G</b> SR <b>R</b> T <b>S</b> V <b>P</b> V <b>M</b> P <b>Y</b> S <b>A</b> G <b>H</b> MA <b>A</b> T <b>R</b> SH <b>Q</b> SA <b>V</b> ER <b>L</b> R <b>L</b> Q <b>T</b> R <b>G</b> T <b>G</b> EM <b>S</b> V <b>S</b> S <b>D</b> V <b>L</b> NA 1086
<i>D. melanogaster</i>	R <b>N</b> SS <b>T</b> N- <b>I</b> ST <b>S</b> Q <b>S</b> EL <b>S</b> N <b>M</b> CP <b>H</b> SK <b>P</b> ST <b>PA</b> V <b>I</b> K <b>T</b> PT <b>A</b> S <b>D</b> HR <b>R</b> T <b>S</b> M <b>G</b> S <b>A</b> L <b>K</b> S <b>N</b> F <b>V</b> V <b>S</b> Q <b>S</b> D <b>L</b> W <b>D</b> T <b>H</b> T <b>L</b> SH <b>A</b> K <b>Q</b> R 1054
<i>M. musculus</i>	----- 861
<i>H. sapiens</i>	----- 862
^	
<i>P. americana</i>	GGG <b>G</b> K <b>G</b> S <b>P</b> PP <b>Y</b> LL <b>N</b> GG <b>G</b> T <b>DL</b> L <b>T</b> SG <b>N</b> ASS <b>P</b> N <b>V</b> A <b>M</b> V <b>K</b> T <b>S</b> P <b>CD</b> Q <b>G</b> P <b>DM</b> T <b>I</b> I <b>Q</b> R <b>S</b> V <b>S</b> <b>E</b> K <b>S</b> R <b>R</b> S <b>A</b> L <b>S</b> H <b>H</b> H <b>H</b> H 1156
<i>D. melanogaster</i>	Q <b>S</b> PR <b>N</b> Y <b>A</b> SP <b>Q</b> R <b>CA</b> E <b>H</b> H <b>G</b> H <b>G</b> M <b>T</b> Y <b>D</b> P <b>NT</b> T <b>S</b> P-----I <b>Q</b> R <b>S</b> V <b>S</b> <b>E</b> K <b>N</b> R <b>N</b> K <b>H</b> R <b>PK</b> Q <b>K</b> G <b>T</b> 1105
<i>M. musculus</i>	-----I <b>Q</b> W <b>N</b> T <b>I</b> E <b>P</b> S <b>R</b> ----- 872
<i>H. sapiens</i>	-----I <b>Q</b> W <b>N</b> T <b>I</b> E <b>P</b> S <b>R</b> ----- 873
^	
<i>P. americana</i>	H <b>R</b> R <b>P</b> <b>E</b> V <b>Q</b> PP---P <b>P</b> A <b>G</b> Y <b>Q</b> <b>P</b> H <b>H</b> T <b>P</b> Q <b>L</b> K <b>Q</b> K <b>S</b> --V <b>L</b> H <b>A</b> H <b>V</b> Q <b>S</b> T <b>P</b> N <b>V</b> A <b>S</b> T <b>Q</b> R <b>S</b> V <b>A</b> R <b>H</b> <b>E</b> <b>A</b> T <b>A</b> P <b>H</b> A <b>P</b> M <b>C</b> S <b>A</b> V <b>S</b> 1220
<i>D. melanogaster</i>	V <b>C</b> Q <b>S</b> E <b>T</b> D <b>S</b> E <b>R</b> E <b>R</b> D <b>PP</b> P <b>N</b> S <b>Q</b> <b>P</b> C <b>V</b> Q <b>P</b> R <b>K</b> V <b>S</b> R <b>SS</b> N <b>I</b> Q <b>H</b> A <b>A</b> H <b>H</b> S <b>S</b> P <b>N</b> V <b>A</b> P <b>D</b> K <b>Q</b> ---R <b>S</b> R <b>Q</b> R <b>G</b> K <b>Q</b> D <b>S</b> S <b>I</b> Y <b>G</b> A <b>S</b> S 1172
<i>M. musculus</i>	T <b>C</b> K <b>D</b> E <b>I</b> E <b>D</b> I <b>N</b> -----S <b>P</b> E <b>H</b> I <b>Q</b> R <b>R</b> L <b>S</b> L <b>Q</b> L <b>P</b> I <b>L</b> H <b>H</b> A <b>Y</b> L <b>P</b> S <b>I</b> G <b>G</b> V <b>D</b> A <b>S</b> C <b>V</b> S <b>P</b> C <b>V</b> S <b>P</b> T <b>A</b> S <b>P</b> R <b>H</b> R----- 926
<i>H. sapiens</i>	T <b>C</b> K <b>D</b> E <b>I</b> E <b>D</b> I <b>N</b> -----S <b>P</b> E <b>H</b> I <b>Q</b> R <b>R</b> L <b>S</b> L <b>Q</b> L <b>P</b> I <b>L</b> H <b>H</b> A <b>Y</b> L <b>P</b> S <b>I</b> G <b>G</b> V <b>D</b> A <b>S</b> C <b>V</b> S <b>P</b> C <b>V</b> S <b>P</b> T <b>A</b> S <b>P</b> R <b>H</b> R----- 927
^	
<i>P. americana</i>	EG <b>E</b> L <b>L</b> D--L <b>A</b> I <b>L</b> P <b>I</b> F <b>Q</b> K <b>L</b> L <b>S</b> ER <b>H</b> K <b>S</b> R <b>S</b> G <b>Y</b> G <b>A</b> S <b>I</b> A <b>S</b> C <b>P</b> N <b>I</b> S <b>I</b> K <b>C</b> D <b>I</b> V <b>E</b> Y <b>L</b> 1267
<i>D. melanogaster</i>	E <b>T</b> E <b>L</b> L <b>E</b> G <b>E</b> T <b>A</b> I <b>L</b> P <b>I</b> F <b>R</b> K <b>L</b> L <b>T</b> E <b>K</b> S <b>P</b> N <b>Y</b> R <b>G</b> R <b>S</b> A <b>V</b> G <b>Q</b> S <b>C</b> P <b>N</b> I <b>S</b> I <b>K</b> C <b>D</b> I <b>V</b> E <b>Y</b> L 1221
<i>M. musculus</i>	-----H <b>V</b> P <b>P</b> S <b>F</b> R <b>V</b> M <b>V</b> S <b>G</b> L----- 939
<i>H. sapiens</i>	-----H <b>V</b> P <b>P</b> S <b>F</b> R <b>V</b> M <b>V</b> S <b>G</b> L----- 940

Abb. 3.5 Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenz des PeaGB2 mit den Sequenzen der orthologen Rezeptoren von *Drosophila melanogaster* (AF318273), *Mus musculus* (Q80T41.2) und *Homo sapiens* (CAA09942), sowie die Lokalisation der Transmembrandomänen, der potentiellen posttranslationalen Modifikationsmotive und der konservierten Aminosäurereste. Aminosäuren, welche bei drei der vier Spezies identisch sind, sind schwarz hinterlegt. Konservativ substituierte Aminosäuren sind grau hinterlegt. Die Lage der putativen Transmembrandomänen ist durch graue Balken gekennzeichnet. Posttranslationale Modifikationsmotive und hoch konservierte Aminosäurereste sind wie folgt markiert: ◊ N-Glykosylierungen, ^ Proteinkinase C, ▲ Proteinkinase A, ○ C-Palmitoylierung, ● Cystein-Reste, ■ orthosterische Ligandenbindungsstelle und □ GABA-Bindungsstellen.

Für den PeaGB2 wird am aminoterminalen Ende des N-Terminus eine 17 AS lange Signalpeptidsequenz vorhergesagt (SignalP 4.1 Server). Desweiteren finden sich auch für diesen Rezeptor Konsensussequenzen für posttranslationale Modifikationen (siehe 3.1.3). Im N-Terminus kommen folgende potentielle N-Glykosylierungsstellen vor: N<sub>79</sub>DTE, N<sub>168</sub>WTR, N<sub>230</sub>ESW, N<sub>352</sub>QTV, N<sub>375</sub>TSF, N<sub>403</sub>GSE und N<sub>449</sub>ITI. Desweiteren existieren acht mögliche Phosphorylierungsstellen für die Proteinkinase C. T<sub>546</sub>WR befindet sich direkt im Übergang von der TM3 zur ICL2. Im C-Terminus lokalisiert sind T<sub>734</sub>LR, T<sub>741</sub>RR, S<sub>848</sub>TK, S<sub>1039</sub>RR, S<sub>1141</sub>EK, T<sub>1198</sub>QR und S<sub>1238</sub>ER. Weiterhin vorhanden sind Konsensussequenzen für die Phosphorylierung durch die Proteinkinase A, welche C-terminal lokalisiert sind (R<sub>742</sub>RDS, R<sub>1016</sub>RRS und R<sub>1040</sub>RTS). Es gibt zwei potentielle C-Palmitoylierungsstellen: C<sub>876</sub> und C<sub>1254</sub>. Einige

wenige konservierte AS-Reste, welche für die Bindung des Liganden essentiell sind, kommen ebenfalls vor. Für die Bildung der orthosterischen Bindungsstelle existieren der konservativ substituierte AS-Rest T<sub>111</sub>, sowie F<sub>229</sub>, G<sub>257</sub>, Y<sub>259</sub> und D<sub>330</sub>. Für die GABA-Bindung relevante AS-Reste kommen nicht vor. Vollständig vorhanden sind aber die vier Cystein-Reste C<sub>83</sub>, C<sub>110</sub>, C<sub>239</sub> und C<sub>273</sub>, welche u. a. für eine korrekte Faltung des Proteins im ER verantwortlich sind (Galvez *et al.*, 1999). Der Abstand zwischen den ersten beiden Cystein-Resten beträgt 27 AS. Der Abstand der letzten beiden hingegen 34 AS. An Position R<sub>1066</sub>LRL findet sich eine Konsensusstelle für das ER-Retentionsmotiv. In Vertebraten befindet sich in der ICL3 das für die Bindung des G-Proteins entscheidende Motiv (F/Y/L/I)-N-(E/D)-X-(K/R) (Duthey *et al.*, 2002). PeaGB2 besitzt ebenfalls dieses Motiv: L<sub>657</sub>NDSK.

Der Vergleich der Aminosäuresequenz von PeaGB2 mit den Aminosäuresequenzen der orthologen Rezeptoren von *Drosophila melanogaster* (AF318273), *Mus musculus* (Q80T41.2) und *Homo sapiens* (CAA09942) zeigt eine hohe Ähnlichkeit zwischen diesen auf (siehe Abb. 3.5). Zur Sequenz des GB2 der Taufliege bestehen eine Identität von 56% sowie eine Ähnlichkeit von 77% zu PeaGB2. Die Identität des untersuchten Rezeptors zu den Vertebraten-Rezeptoren ist erwartungsgemäß geringer. Die Identität liegt für Hausmaus/Mensch bei 43%/44%, die Ähnlichkeit bei 62%/63%. Hochkonservierte Bereiche befinden sich im N-Terminus und im Bereich der Transmembrandomänen. Der C-Terminus ist weit weniger konserviert. Hier gibt es eine hohe Divergenz, insbesondere in der Länge des C-Terminus. Dieser ist bei den beiden Invertebraten-Rezeptoren mehr als 2½-fach länger als bei den GB2 der Vertebraten.

### **3.3 Vergleichende Analyse zwischen PeaGB1 und PeaGB2**

#### **3.3.1 Ähnlichkeitsanalyse zwischen PeaGB1 und PeaGB2**

Der Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenzen der isolierten GABA<sub>B</sub>-Rezeptor-Subtypen 1 und 2 von *P. americana* ist in Abb. 3.6 dargestellt. Es lässt sich eine hohe Konservierung in einzelnen Sequenzabschnitten, aber über die gesamte Länge des PeaGB1 feststellen. Die Identität zwischen den beiden Rezeptoren liegt bei

33%, die Ähnlichkeit bei 56%. Die geringen Werte sind insbesondere auf den überaus langen C-Terminus des PeaGB2, der kein PeaGB1-Korrelat besitzt, zurückzuführen. Laut Vorhersage sind die Transmembrandomänen zueinander teilweise um eine Aminosäure versetzt. Die verkürzte TM6 des PeaGB1 würde zur Bildung einer längeren intrazellulären Schleife 3 führen. Relevante AS-Reste für die Interaktion der extrazellulären Domänen von GB1 und GB2 konnten durch Kristallstrukturanalysen aufgeklärt werden (Geng *et al.*, 2012). Die zwei bei *Homo sapiens* entdeckten AS-Reste finden sich auch bei PeaGB1: Y<sub>100</sub> und Y<sub>104</sub>. Der bei GB2 des Menschen vorkommende AS-Rest Y<sub>118</sub> ist bei *Periplaneta* konservativ substituiert (F<sub>93</sub>).

PeaGB1	M Y S L C N T I K L G I C L L I T T L Q I L E S C S A V A D D T D D D N V L H I G C I F P I G K G - G W O G G Q A C E P A A S L A L D D V N N R K D L L T G F	79
PeaGB2	-----M A L L G A C L L A ---L L C F A S C Q K P N L A G N K R R D V Y I A G F F P Y G R H I P E S R V G R G V M P S V M L A W D H I N E N P S V L R N Y	90
	Δ          Δ	
PeaGB1	T I K L H W N D S E C E P G L C A S V M Y N L L Y N K P Q K L M L L - A C G S T V C T T V A E A A K M N L V V L C Y G A S S P A L S D R N R F P T L F R T H P	158
PeaGB2	M I H M Y W N D T E C N A A V G V K A F D M M H I G P H K V M L F G A A C T O V T D P I A K A S R R R W H L T O L S Y A D T H P M F T - K Q H F P N F F R V V P	151
PeaGB1	S A T V H N P T R I K L M E K F G W S R V A I L Q C A E E V F I S T V E D L E A R C K E I G I E I V T R O S F L S D P T D A V R N L R R Q D A R I I V G L F Y V	238
PeaGB2	S E N A F N A P R L K L L Q E F N W T R V G T I Y Q N E P R Y S L A H N R I V A D L D T M G F Q V E E T Q S F A N E V A S A M N K L K E K D V R I L L G N F E	231
PeaGB1	V A A R R V L C E M Y K Q H I Y G K S Y V W F F I G W Y E D N W F E V N L E K E E T E C T K E Q M R T A A E G H L T T E A L M W N Q N N O R T I S G K T S E D F	318
PeaGB2	S W A R R V F C E A H R A G M F G R K Y Q W I I M G T Y T E E W M N -- E E G I V F C S L T E L A S A L E G C I L T D L L P L S T N G E I T V S G I T A E E Y	309
PeaGB1	R I R L N E V L R Q A G Y D I D N M R Y P E G Y Q E A P L A Y D A V W A V A L A F N K T M E R L N K H G -- R S L K N F T Y T D K E T A D N I Y A A I N S T O F	396
PeaGB2	R L E Y -----D S R R G S E Y S R F H G Y T Y D G I W A V A L A I Q H V A H R I R H F R K N O T V V D F R Y R D P L W E D L F L E A L R N T S F	378
PeaGB1	L G V S G Y V A F S S Q G D R I A L T Q I E Q M I N G T Y V K L G Y Y D -- T Q S D N L T W L N R E K W S G G K V P O D R T I V R Q V L R T V S I P L F I C M W	474
PeaGB2	E G V T G P V R E Y D N - E R K A S I L L K Q F O N G S E M K I G E F N G V T E Q L D L T R G H A I R W H G R A P P K D R T L Q I F E H S H V N I T I Y S L L A	457
	<span style="color: green;">TM1</span> <span style="color: purple;">ICL1</span> <span style="color: green;">TM2</span> <span style="color: purple;">ECL1</span> <span style="color: green;">TM3</span>	
PeaGB1	T I S C I G T M A A I A L I V F N I W Y R H R R V I Q S S H P V C N T I M L L G V C T C L W S V F I L G L D G Q F V S P R V Y P I V C Q A R A W L L C I G F T L	554
PeaGB2	A T A S V G I V M A I S F L A I N I T Y R N Q R Y I K M S S P Y L N L N L I I I G C M L T Y S S V I F L G L D S T L T S V E A F P Y I C T A R A W L L M A G F S L	537
	<span style="color: purple;">ICL2</span> <span style="color: green;">TM4</span> <span style="color: purple;">ECL2</span>	
PeaGB1	A Y C A M F S K V W R V H R L T T K A K S E V K K V E P W K L Y L M V T G F L V D L V L L L T W O L Y D P L O R R I E V F P L E D F V S T E D D I K I R P E L	634
PeaGB2	A E G S M F S K T W R V S I F T D V K L N K K V I K D Y Q L F M V V G V L L V I D L A I M T T W Q V T D P F Y R E T K Q M E P Y - P H P S S D D I L I V P E N	616
	<span style="color: green;">TM5</span> <span style="color: purple;">ICL3</span> <span style="color: green;">TM6</span> <span style="color: purple;">ECL3</span>	
PeaGB1	E H C E S E N N N V W L G V M Y C Y K G L V L V F G L F L A Y E T R S T K V K Q I N D S R Y A G M S I Y N V V L C L I T A P V T M V I A S Q O D A S F A F V A	714
PeaGB2	E Y C O S E R M T I F V G S I Y A Y K G L L M I F G A F L A W E T R H V S I P A L N D S K Y V G M S V Y N V V I M C V M G A A I S F V L S D K Q D A S F T I I S	696
	<span style="color: green;">TM7</span>	
PeaGB1	L A V I F C C F L S M A L I F V P K V I E V I R H P R D K A E S K Y N P D V G -----M T R E D E E R Y Q K L V A E N E E L Q K L I S A K E E K I R	784
PeaGB2	V F I I F C T T G T L C L F V P K L I E L K R N P Q G S I D K R M I R A T L R P M S K T R R D S V A S E L E E K L K D A K A F N Q Y R K Q L L E R E T E L Q	776
PeaGB1	L I K I R L Q E --R D A L R G G V T D G R L S T P H Q D S T A N T D S L R S R K I F H S S W C N S S -	833
PeaGB2	M L V R R L G D E G R D I L E S D I G M D R L A V R H D A L L K R E T T E I S S L C S L N S S Q D G E Y V N L T V E T P S Q R K K T S F S T K P P S I A V	856
PeaGB2	M G T R E P P Q P G G L T G A P A A S C L R K K S S S S L E N Q D R L P T A S A M R T S L L G R E E A E D S E P L I E S S T A S K L T V S G G E S N V H F V P E	936
PeaGB2	G P E E E E D G H V D E E K S L D R P R L P T P P P A L A K V V S F G D V T N T P A S A M P A P A P V T V E D T I L P P P K Q F H P K Q Q V R P P L S A L R	1016
PeaGB2	R R S S V K S V S S G N S S A A G M Q V L G S R R T S V P V M P Y S A G H M A A T R S H Q S A V E R L R L Q T R G T G E M S V S S D V L N A G G G K G S P P P	1096
PeaGB2	Y L L N G G T D L L T S G G N A S S P N V A M V K T S P C D Q G P D M T I I Q R S V S E K S R E R S A L S H H H H H H R P P V Q P P P P A G Y Q P H H I P	1176
PeaGB2	Q L K Q Q K S V L H A H V Q S T P N V A S T Q R S V A R H P A T A P H A P M C S A V S E G E L L D L A I L P I F Q K L L S E R H K S R S G Y G A S I A S C P N	1256
PeaGB2	I S I K C D I V E Y L	1267

Abb. 3.6: Vergleich der PeaGB1- und PeaGB2-Aminosäuresequenzen zueinander. Grün gerahmt sind die vorhergesagten Transmembrandomänen der GABA<sub>B</sub>-Rezeptor-Subtypen 1 und 2 von *P. americana*. Die für die Interaktion der extrazellulären Domänen bekannten AS-Reste sind durch Δ markiert. TM - Transmembrandomäne, ICL -intracellular loop, ECL - extracellular loop

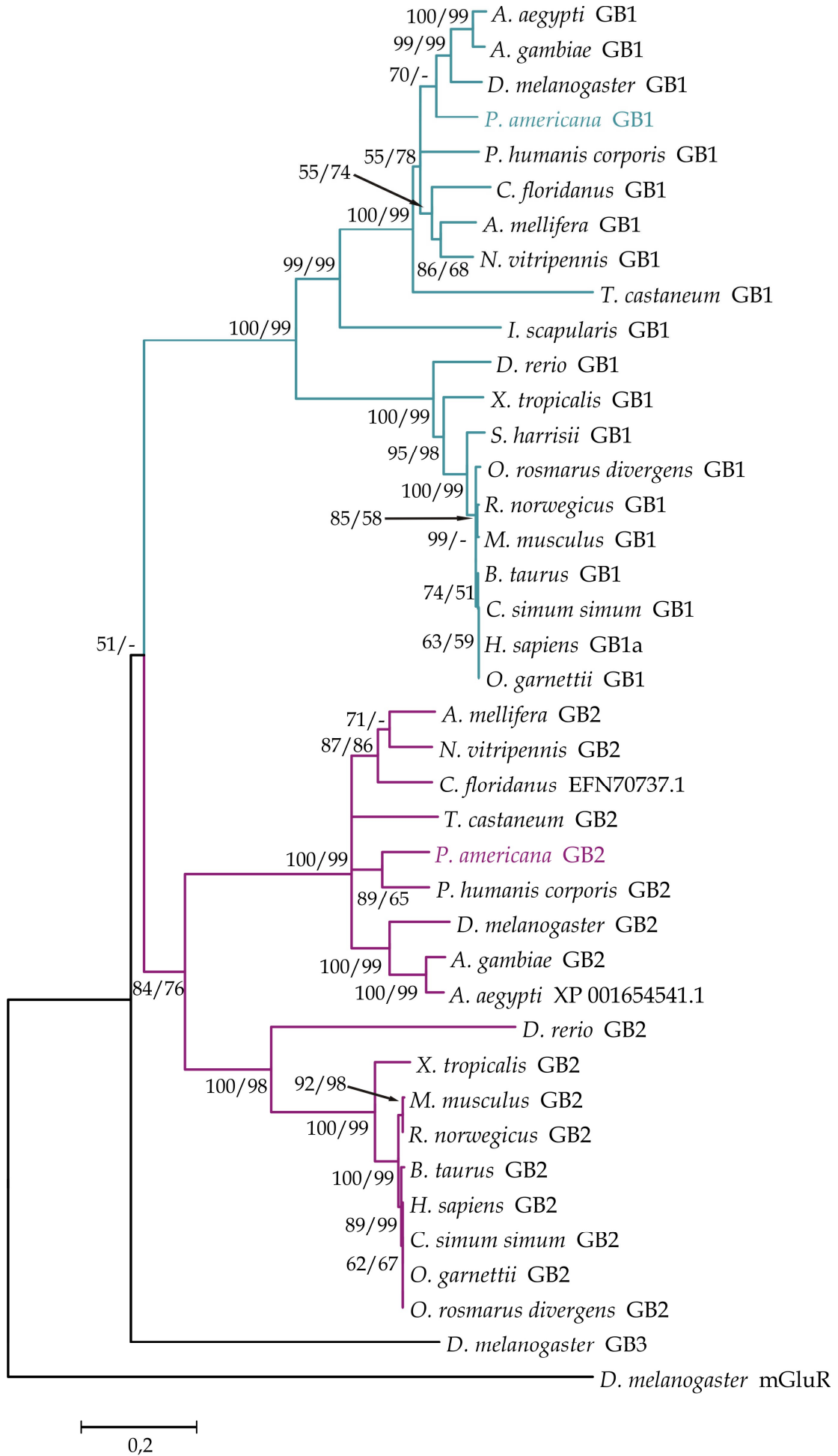


### 3.3.2 Phylogenetische Analyse von PeaGB1 und PeaGB2

Für die phylogenetische Analyse wurden die *Neighbor-Joining*- und *Maximum-Parsimony*-Methode verwendet. Zunächst wurden die Aminosäuresequenzen aller zu untersuchenden Rezeptor-Subtypen verschiedener Arten miteinander verglichen. Die Kernaminosäuresequenz, welche nicht das divergente aminoterminalen Ende des N-Terminus und den ebenso sehr variablen C-Terminus enthielt, wurde mit der Software *Mega5.2* analysiert (siehe Abb. 3.7). PeaGB1 bildet nicht nur zusammen mit GABA<sub>B</sub>-Rezeptor-Subtypen 1 anderer Arten eine Gruppe. Er ordnet sich klar in die Gruppe der Invertebraten-Rezeptoren ein. Das gilt ebenfalls für den PeaGB2. Auch dieser Rezeptor bildet zusammen mit den GABA<sub>B</sub>-Rezeptor-Subtypen 2 der Arthropoden eine Schwestergruppe zu den GB2 der Vertebraten.

---

**Abb. 3.7: Phylogenetische Analyse der GABA<sub>B</sub>-Rezeptoren verschiedenster Spezies.** Die Rekonstruktion des Stammbaums erfolgte durch die distanzbasierte *Neighbor-Joining*-Methode. Der Skalenstrich ermöglicht die Umrechnung der Astlänge in genetische Distanz. Der erste Wert der Abzweigungen gibt den Bootstrap-Wert in % aus 10.000 Bootstrap-Replikationen an. Der zweite Wert wurde durch *Maximum-Parsimony*-Methode berechnet (2.000 Bootstrap-Replikationen). Die Kernaminosäuresequenz folgender Rezeptoren wurden neben den Rezeptor-Subtypen von *P. americana* für die Analyse verwendet: *Aedes aegypti* GB1 (XM 001652657), *Anopheles gambiae* GB1 (XM 319474), *Drosophila melanogaster* GB1 (AF318272), *Pediculus humanis corporis* GB1 (XP 002430445.1), *Camponotus floridans* GB1 (EFN74210.1), *Apis mellifera* GB1 (XP 392294.3), *Nasonia vitripennis* GB1 (XP 001605283.2), *Tribolium castaneum* GB1 (XM 964268), *Ixodes scapularis* GB1 (XP 002406087.1), *Danio rerio* GB1 (XP 694497.2), *Xenopus tropicalis* GB1 (NP 001107291.1), *Sarcophilus harrisii* GB1 (XP\_003768928.1), *Odobenus rosmarus divergens* GB1 (XP 004412262.1), *Rattus norvegicus* GB1 (Q9ZOU4.1), *Mus musculus* GB1 (Q9WV18.1), *Bos taurus* GB1 (NP 001092433.1), *Ceratotherium simum simum* GB1 (XP 004441762.1), *Homo sapiens* GB1a (Q9UBS5.1), *Otolemur garnettii* GB1 (XP 003789006.1), *Apis mellifera* GB2 (XP 393623.4), *Nasonia vitripennis* GB2 (XP 003426573.1), *Camponotus floridans* (EFN70737.1), *Tribolium castaneum* GB2 (XM 964691), *Pediculus humanis corporis* GB2 (EEB12100.1), *Drosophila melanogaster* GB2 (AF318273), *Anopheles gambiae* GB2 (XM 557488), *Aedes aegypti* (XP 001654541.1), *Danio rerio* GB2 (NP 001137515.1), *Xenopus tropicalis* GB2 (NP 001016007.2), *Mus musculus* GB2 (Q80T41.2), *Rattus norvegicus* GB2 (O88871.2), *Bos taurus* GB2 (XP 595204.4), *Homo sapiens* GB2 (NP 005449.5), *Ceratotherium simum simum* GB2 (XP 004423301.1), *Otolemur garnettii* GB2 (XP 003785411.1), *Odobenus rosmarus divergens* GB2 (XP 004392390.1), *Drosophila melanogaster* GB3 (AF318274). Der metabotrope Glutamat-Rezeptor mGluR von *Drosophila melanogaster* (P91685.2) fungiert als Außengruppe.



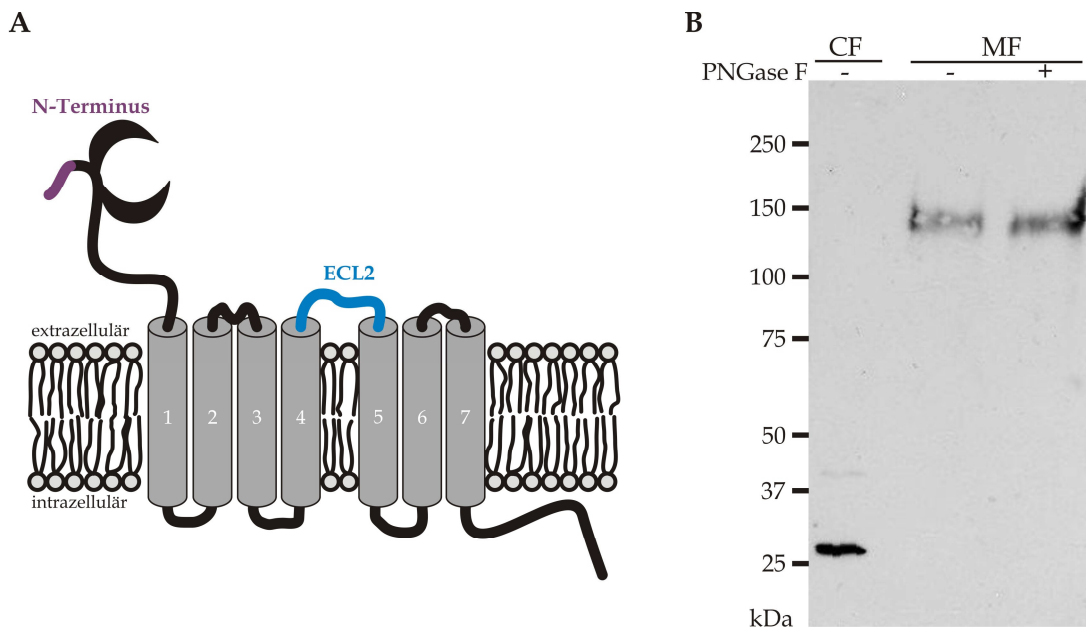
## **3.4 Immunologische Untersuchung von PeaGB1 und PeaGB2**

### **3.4.1 Charakterisierung der polyklonalen Antikörper**

Für den immunologischen Nachweis der Proteine PeaGB1 und PeaGB2 wurden polyklonale Antikörper generiert und affinitätsgereinigt (siehe 2.4.8). Es wurden für beide Rezeptor-Subtypen der aminoterminalen N-Terminus und die extrazelluläre Schleife 2 (ECL2) als Antigenregionen ausgewählt (siehe Abb. 3.8 A). Jeweils zwei Tiere pro Antigen wurden immunisiert.

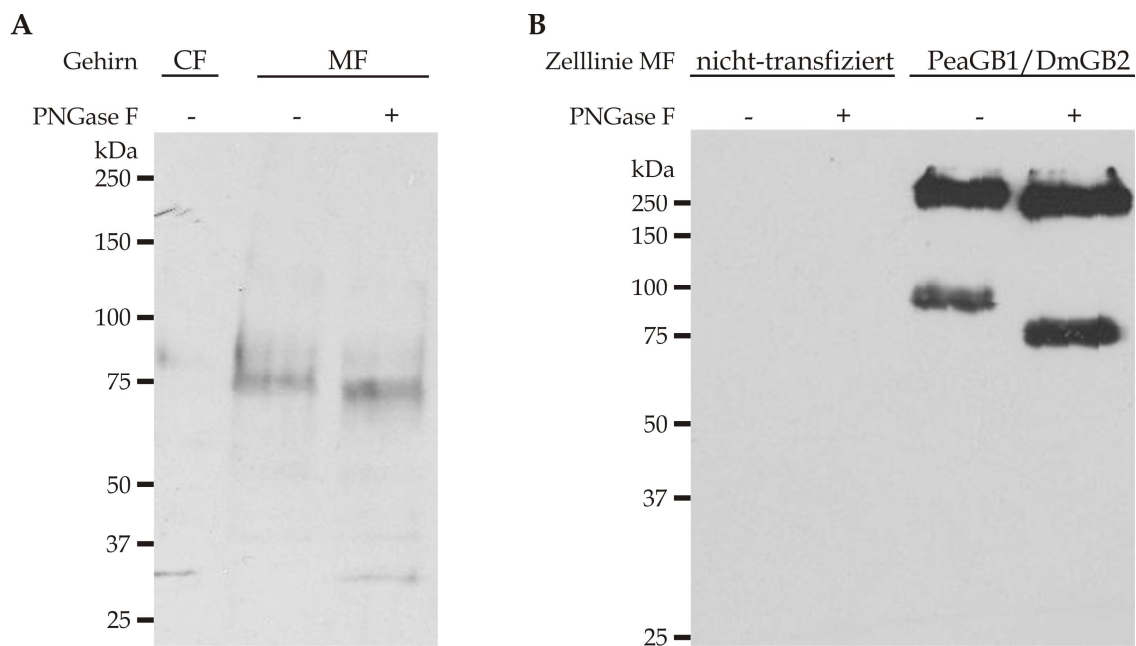
Die Western-Blot-Analyse der aufgereinigten polyklonalen Antikörper, welche gegen den N-Terminus gerichtet sind, zeigte auf Gehirn-Homogenaten von *P. americana* eine unspezifische Markierung diverser Proteine unterschiedlicher Größe (nicht gezeigt). Sie erwiesen sich daher als ungeeignet und wurden nicht weiter verwendet. Der gegen die ECL2 von PeaGB2 gerichtete polyklonale Antikörper **anti-PeaGB2** (Meerschweinchen I) detektiert hingegen in der Membranfraktion ein Protein mit der molekularen Masse von ~140 kDa (siehe Abb. 3.8 B). Das entspricht der kalkulierten relativen Molekülmasse des PeaGB2 (141,1 kDa). Dieser Antikörper erkennt jedoch zusätzlich ein cytosolisches, circa 27 kDa schweres Protein. Western-Blot-Analysen auf weiteren Geweben zeigten, dass dieses Protein auch in Geweben detektiert wird, in denen das ~140 kDa schwere Protein nicht vorkommt (nicht gezeigt). Daher muss davon ausgegangen werden, dass das cytosolische Protein kein Abbauprodukt von PeaGB2 ist. Der anti-PeaGB2-Antikörper ist demnach vermutlich nicht spezifisch. Zudem zeigen immunhistochemische Testexperimente eine unspezifische Markierung im nativen Gewebe (nicht gezeigt) und bestätigen somit die Ergebnisse der Western-Blot-Experimente. Nichtsdestotrotz kann dieser Antikörper für einen gewebs- und organspezifischen Nachweis von PeaGB2 mittels Western-Blot-Analyse verwendet werden (siehe 3.4.2).

Der affinitätsgereinigte Antikörper gegen die ECL2 von PeaGB1 aus dem Kaninchen II (**anti-PeaGB1**) detektiert spezifisch ein ~80 kDa schweres Protein in der Membranfraktion des Schabengehirns (siehe Abb. 3.9). Es ist kleiner als das kalkulierte Molekulargewicht des PeaGB1 (94,7 kDa). Membranproteine sind häufig glykosyliert. Die Deglykosylierung der Membranfraktion mittels PNGase F-Verdau



**Abb. 3.8:** **A** Schematische Darstellung der ausgewählten Antigenregionen für die Generierung polyklonaler Antisera gegen PeaGB1 bzw. PeaGB2. **B** Western-Blot-Experiment zur Analyse der Spezifität von anti-PeaGB2. Jeweils 12,5 µg Protein der cytosolischen Fraktion (CF), der Membranfraktion (MF -) und der durch PNGase F deglykosylierten Membranfraktion (MF +) von Schabengehirnen wurden auf ein Gradientengel aufgetragen. Es wurden anti-PeaGB2 (1:1000) als primärer und *goat-anti-guinea pig*-HRP (1:10.000) als sekundärer Antikörper eingesetzt.

führt zu einer Markierung eines geringfügig kleineren Proteins. Das ist ein gutes Indiz dafür, dass es sich bei der markierten Bande um ein plasmamembranständiges Protein handelt. Der zweite gegen die ECL2 von PeaGB1 gerichtete Antikörper (Kaninchen I) markiert ebenfalls ein Protein in der genannten Größe (nicht gezeigt). Die Spezifität von anti-PeaGB1 konnte weiterhin durch Western-Blot-Experimente an mit PeaGB1-transfizierten flpTM-Zellen getestet werden (siehe Abb. 3.9). Es wird ein circa 90 kDa schweres Protein markiert, welches nach der Abspaltung der meisten N-Glykosylierungen nur noch ein Molekulargewicht von ~75 kDa besitzt. Es kann von einer stärkeren Glykosylierung des Rezeptor-Subtyps in den flpTM-Zellen im Vergleich zum Schabengehirn ausgegangen werden. Der anti-PeaGB1-Antikörper markiert weiterhin eine zweite Bande bei ~250 kDa. Die Verwendung von PNGase F führt zur Markierung eines geringfügig kleineren Proteins. Aufgrund des kalkulierten Molekulargewichts von PeaGB1 (94,7 kDa) und DmGB2 (138 kDa) handelt es sich hierbei sehr wahrscheinlich um das Heterodimer aus PeaGB1 und DmGB2 (~230 kDa). In den nicht-transfizierten flpTM-Zellen detektiert anti-PeaGB1 auch nach längerer Expositionszeit keine Proteine.

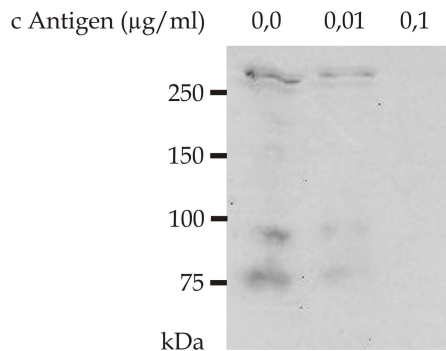


**Abb. 3.9: Western-Blot-Experimente zur Analyse der Spezifität von anti-PeaGB1.** Es wurden anti-PeaGB1 (1:1000) als primärer sowie *goat-anti-rabbit*-HRP (1:20.000) als sekundärer Antikörper eingesetzt. **A** Jeweils 12,5 µg Protein der cytosolischen Fraktion (CF), der Membranfraktion (MF -) und der durch PNGase F deglykosylierten Membranfraktion (MF +) von Schabengehirnen wurden auf ein Gradientengel aufgetragen. **B** Jeweils 7,5 µg Protein wurden aufgetragen. Es wurden die Membranfraktionen (MF) von nicht-transfizierten und PeaGB1/DmGB2-transfizierten Zelllinien nebeneinander aufgetragen. Dabei wurde jeweils ein Ansatz mit PNGase F deglykosyliert (+).

Als weiterer Spezifitätsnachweis wurde in einer Präadsorptionsstudie anti-PeaGB1 gegen das Antigen PeaGB1-ECL2 präadsorbiert. Dafür wurde das Maltose-Binde-Protein vom Fusionsprotein mit der Faktor Xa-Protease (New England Biolabs, Frankfurt am Main) abgespalten und anschließend über einen Amicon® Ultra 4 ml Filter mit einer maximalen Durchflussgröße von 10 kDa entfernt. Über Nacht erfolgte die Inkubation des Antikörpers jeweils mit 0 µg/ml (Kontrolle), 0,01 µg/ml und 0,1 µg/ml PeaGB2-ECL2. Der präadsorbierte anti-PeaGB1 wurde daraufhin als Primärantikörper auf Western-Blot-Membranen mit Gehirn-Homogenaten eingesetzt. In der gezeigten Western-Blot-Analyse werden in der Kontrolle drei Proteine detektiert (siehe Abb. 3.10). Diese Markierung tritt vereinzelt auf und wird daher hier exemplarisch gezeigt. Die zwei leichteren Proteine (~90 kDa und 75 kDa) entsprechen mit ihrem Molekulargewicht dem glykosylierten und wenig- bzw. nicht-glykosylierten Rezeptor-Subtyp 1. Weiterhin detektiert anti-PeaGB1 hier möglicherweise das PeaGB1/PeaGB2-Heterodimer (~250 kDa). Die Präinkubation von anti-PeaGB1 mit 0,01 µg/ml Antigen führt zu einer schwächeren Markierung der

drei Proteine im Vergleich zur Kontrolle. Die Präadsorption von anti-PeaGB1 mit 0,1 µg/ml PeaGB1-ECL2 hingegen zeigt einen klaren Detektionsverlust der Proteine in Western-Blot-Analysen auf (Abb. 3.10).

Die Ergebnisse aus den verschiedenen durchgeführten Western-Blot-Experimenten bestärken die Annahme, dass anti-PeaGB1 ein spezifischer Antikörper ist.



**Abb. 3.10:**

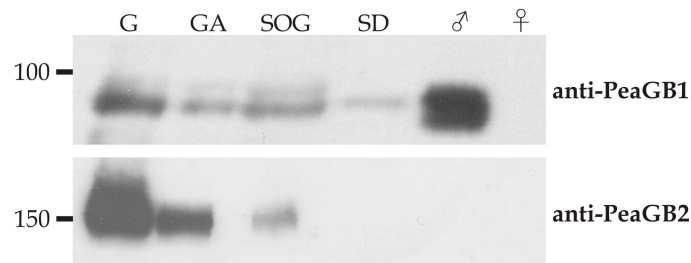
**Präadsorption von anti-PeaGB1 gegen PeaGB1-ECL2.** In jeder Bahn ist 1/6 Gehirn-Homogenat aufgetragen. Drei Ansätze anti-PeaGB1 (1:1.000), über Nacht präadsorbiert mit 0 µg/ml, 0,01 µg/ml und 0,1 µg/ml, wurden als primärer Antikörper eingesetzt. Als sekundärer Antikörper wurde für die Western-Blot-Analyse *goat-anti-rabbit-HRP* (1:20.000) verwendet.

### 3.4.2 Western-Blot-Analyse zur gewebs- und organspezifischen Verteilung von PeaGB1 und PeaGB2

Folgende Gewebe bzw. Organe von *P. americana* wurden in Western-Blot-Experimenten auf ihre Expression von PeaGB1 und PeaGB2 hin untersucht: Gehirn, Suboesophagealganglion (SOG), Bauchmark (ohne SOG), Speicheldrüsen, Thorakalmuskulatur, Kropf, Mitteldarm, Malpighische Gefäße, Fettkörper, akzessorische Geschlechtsdrüsen der Männchen, sowie Ovarien der Weibchen. Die Gesamtproteinmengen/Gewebe wurde durch Coomassie-gefärbte Polyacrylamid-Gele aneinander annähernd angeglichen. Für die Untersuchung wurden die polyklonalen Antikörper anti-PeaGB1 und anti-PeaGB2 (siehe 3.4.1) verwendet.

Die Western-Blot-Analysen konnten keinen Nachweis einer Expression von PeaGB1 und PeaGB2 im Kropf, im Mitteldarm, in den Malpighischen Gefäßen, im Fettkörper (nicht gezeigt) und in den Ovarien (siehe Abb. 3.11 B) erbringen. In der Thorakalmuskulatur wird ein kleineres Protein als erwartet erkannt (nicht gezeigt). Sowohl anti-PeaGB1 als auch anti-PeaGB2 detektieren jeweils ein Protein in der erwarteten Größe im Zentralnervensystem der Amerikanischen Großschabe (siehe Abb. 3.11 B). Erstaunlich prominent im Vergleich zu den Ganglien ist die durch anti-

PeaGB2 markierte Bande im Gehirn. Zudem detektiert der gegen den PeaGB1 gerichtete Antikörper schwach ein Protein in der Speicheldrüse und sehr prominent ein Protein in den akzessorischen Drüsen der Männchen.



**Abb. 3.11: Untersuchung der gewebs- und organspezifischen Verteilung von PeaGB1 und PeaGB2.** Zwei mit nahezu einheitlichen Mengen an Gesamtprotein/Gewebe beladene Blot-Membranen wurden mit anti-PeaGB1 (1:1.000, oben) bzw. anti-PeaGB2 (1:1.000, unten) inkubiert. Als sekundärer Antikörper wurde *goat-anti-rabbit*-HRP (1:20.000) bzw. *goat-anti-guinea pig*-HRP (1:10.000) verwendet. G - Gehirn, GA - Ganglien ohne SOG, SOG - Suboesophagealganglion, SD - Speicheldrüse, ♂ - akzessorische Drüsen Männchen, ♀ - Ovarien Weibchen

### 3.4.3 Immunhistochemische Lokalisation von PeaGB1 in *P. americana*

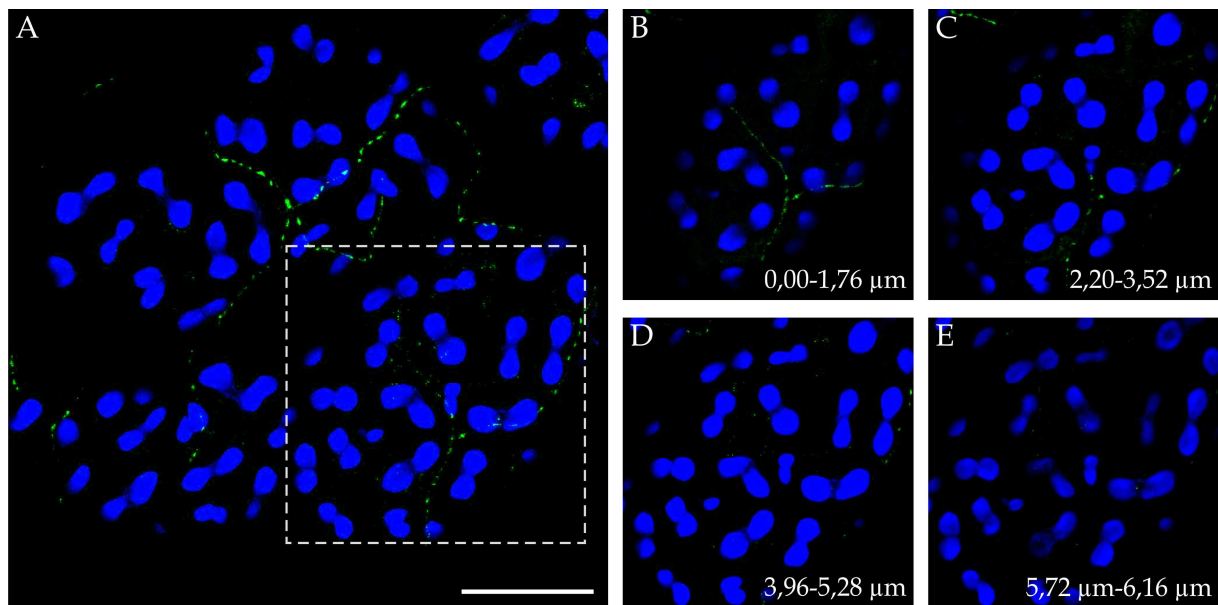
Die Lokalisation des GABA<sub>B</sub>-Rezeptor-Subtyps 1 der Amerikanischen Großschabe wurde unter Verwendung des anti-PeaGB1-Antikörpers (1:1.000) in allen Geweben bzw. Organen untersucht, die in Western-Blot-Analysen eine PeaGB1-ähnliche Expression zeigten (siehe 3.4.2). Die verwendeten primären und sekundären Antikörper sind in den Tab. 6.6 und Tab. 6.7 aufgelistet. Es wurden Speicheldrüsen-Gesamtpräparate sowie Kryostatschnitte von Gehirn und akzessorischen Drüsen der Männchen immunhistochemisch analysiert.

#### Immunhistochemische Lokalisation von PeaGB1 in der Speicheldrüse

Zur leichteren Orientierung im Drüsenepithel wurden Aktinfilamente durch Fluorochrom-gekoppeltes Phalloidin markiert und in den nachfolgenden Abbildungen durchgehend in blau dargestellt. Die in der apikal eingefalteten Plasmamembran der peripheren Zellen lokalisierten Mikrovilli (Just & Walz, 1994) erscheinen dadurch schmetterlingsförmig. Die Inkubation der Drüsen mit anti-PeaGB1 führt zur Detektion von zumeist globulären Strukturen, welche faserartig angeordnet sind (siehe Abb. 3.12 A). Durch die Aufnahme von Bildstapeln lässt sich der Verlauf der markierten faserartigen Strukturen verfolgen. Diese befinden sich



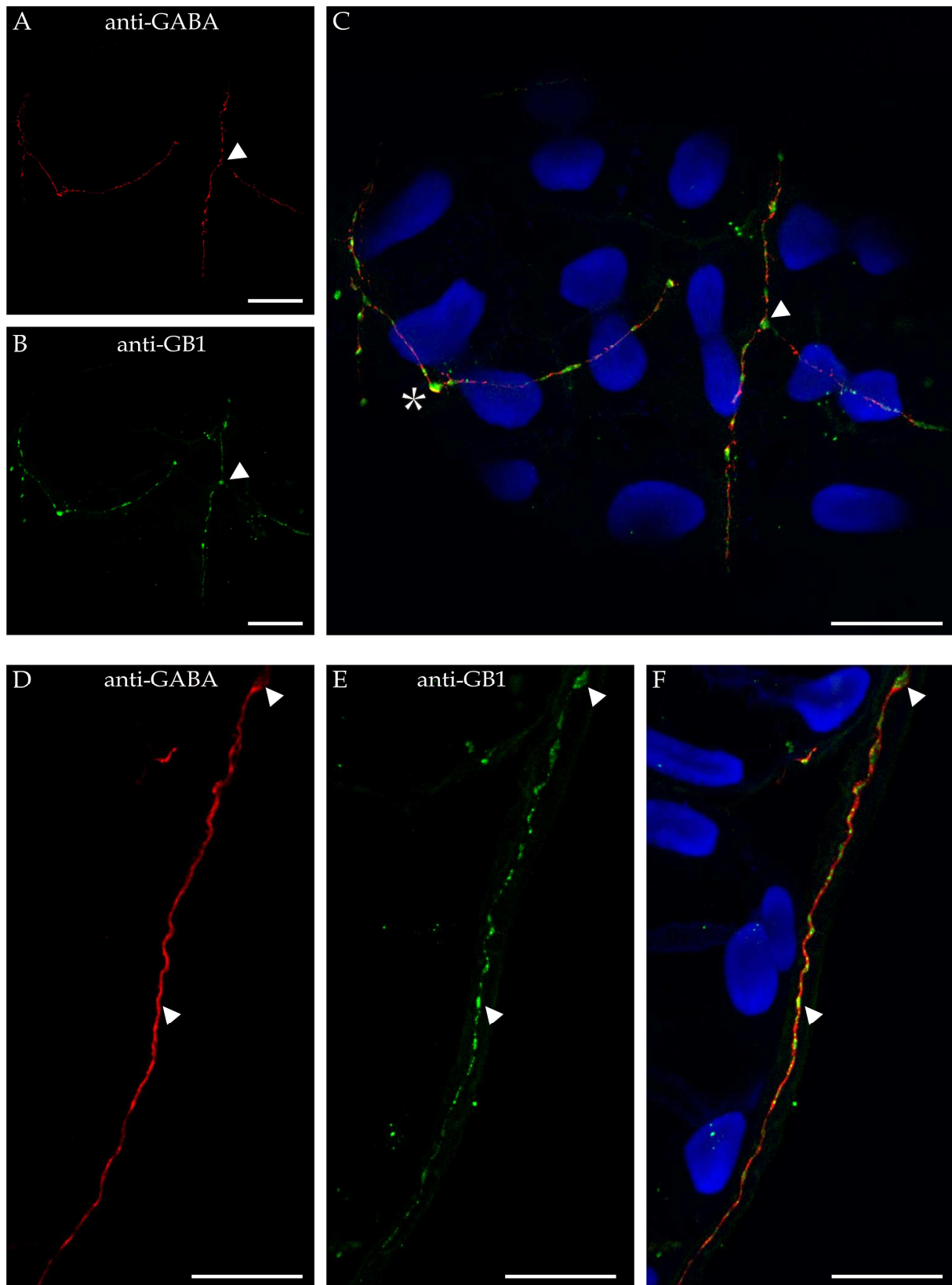
gewöhnlich an der Peripherie der sekretorischen Acini (siehe Abb. 3.12 B, C) und dringen nicht in das Epithel hinein (siehe Abb. 3.12 D, E). Durch die Maximumintensitätsprojektion erfolgt die Generierung des zweidimensionalen Gesamtbildes (Abb. 3.12 A).



**Abb. 3.12: Untersuchung der PeaGB1-ähnlichen Immunreaktivität an Speicheldrüsen-Gesamtpräparaten.** Die Doppelmarkierung erfolgte mit anti-PeaGB1 (grün) und Phalloidin (blau). Dargestellt ist die Projektion eines Bildstapels mit einer Gesamtdicke von  $\sim 6 \mu\text{m}$  (A). B-E zeigen unterschiedliche Tiefen eines Ausschnitts von A (gestrichelt), ausgehend von der Peripherie. Eine PeaGB1-ähnliche Markierung ist in annähernd globulären Strukturen erkennbar, welche ein faserartiges Netzwerk bilden (A). Diese faserartigen Strukturen verbleiben an der Peripherie der Acini (B, C) und ziehen nicht in die Tiefe (D, E). Der Maßstabsbalken beträgt  $20 \mu\text{m}$ .

Die Lokalisation von PeaGB1 sollte im Vergleich zur Verteilung des Liganden GABA, welcher dem Speichelneuron 2 als Neurotransmitter dient, untersucht werden (Witte, 2006; Rotte *et al.*, 2009). Die Spezifität des anti-GABA-Antikörpers wurde hinreichend in der Diplomarbeit von J. Witte (2006) untersucht. Die Immunfluoreszenzmarkierung durch Inkubation mit anti-GABA und anti-PeaGB1 zeigt eine PeaGB1-ähnliche Verteilung in großer räumlicher Nähe zur GABA-ähnlichen Markierung. Dabei ist diese Lokalisation nicht auf die potentiellen Faserendigungen an den Acini beschränkt. Vielmehr ist eine GB1-ähnliche Markierung über die gesamte GABAerge Nervenfasern zu beobachten. Detailaufnahmen zeigen, dass die GABA- und PeaGB1 Immunreaktivität vermutlich in ein und derselben Nervenfasern auftritt, diese in aller Regel aber nicht koloalisieren. Abb. 3.13 zeigt eine meist

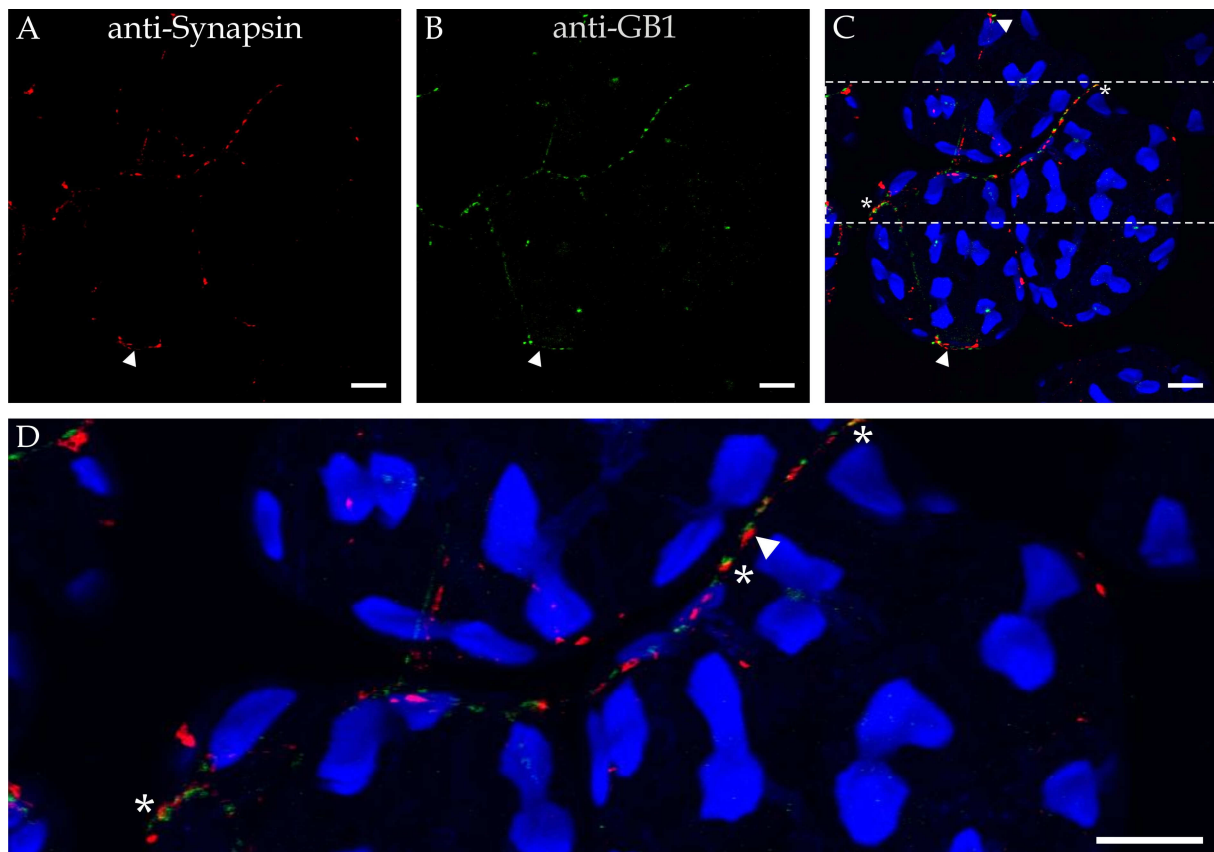




**Abb. 3.13: Untersuchung der PeaGB1- und GABA-ähnlichen Immunreaktivität an Speicheldrüsen-Gesamtpräparaten.** Für die Dreifachmarkierung wurden anti-PeaGB1 (grün), anti-GABA (rot) und Phalloidin (blau) verwendet. GABA- und GB1-ähnliche Markierungen kommen in derselben Faser vor und zeigen überwiegend keine Kolo-kalisation (▲). Überlagerungen werden gelb dargestellt (\*). Die Abbildungen A-C präsentieren Projektionen von Bildstapeln von Acini, D-F Lobuli-verbundene Fasern. Der Maßstabsbalken beträgt 20  $\mu\text{m}$ .

durchgehende GABA-ähnliche Markierung über die Nervenfasern. Die durch anti-PeaGB1 detektierten globulären Strukturen können sowohl an der Peripherie der Plasmamembran als auch zentral, sichtbar umschlossen von Cytoplasma, vorkommen. Im Falle des letztgenannten Typus ist in dem PeaGB1-markierten Areal keine GABAerge Markierung zu beobachten (siehe Abb. 3.13 F).

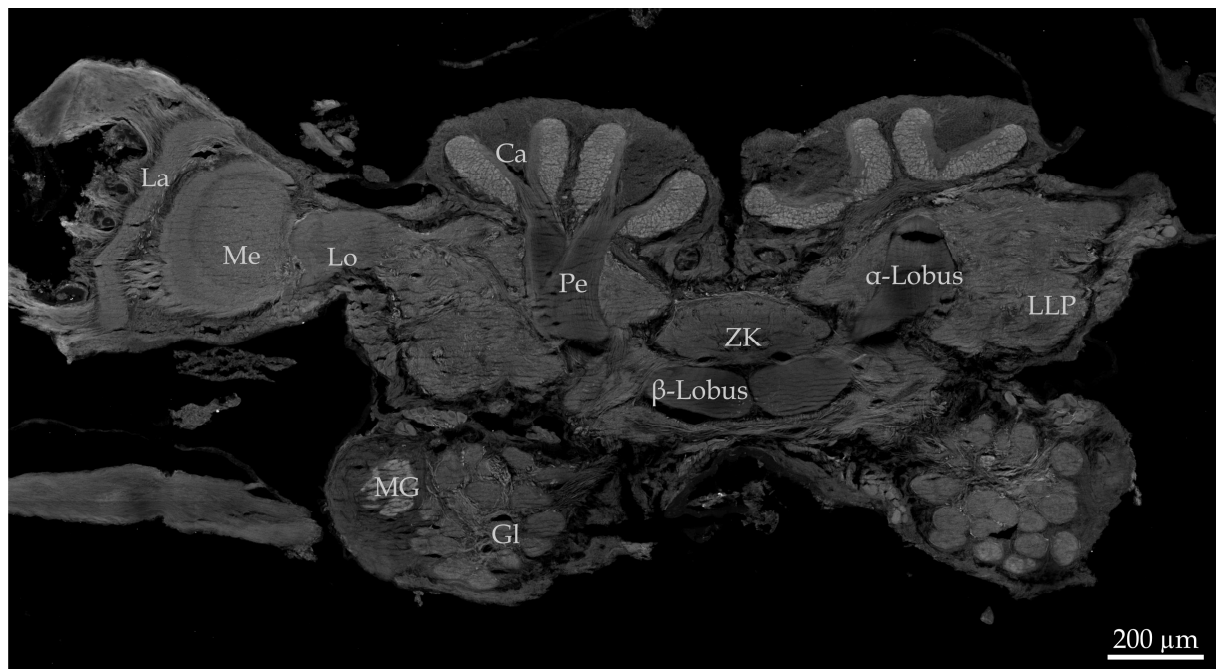
Die Untersuchung einer möglichen Lokalisation von PeaGB1 in den Neurotransmitter-Freisetzungstellen erfolgte durch die Immunfluoreszenzmarkierung mit anti-Synapsin (SYNORF1). Die Spezifität des gegen *Drosophila* Synapsin-gerichteten Antikörpers wurde bereits hinreichend untersucht (Baumann *et al.*, 2004). Synapsin moduliert u. a. die Neurotransmitter-Freigabe an der präsynaptischen Terminale durch die Bindung von synaptischen Vesikeln an das Aktin-Cytoskelett (Rosahl *et al.*, 1995). Kolokalisationen von PeaGB1- und Synapsin-ähnlicher Markierung sind im Bereich der Acini erkennbar (Abb. 3.14). Diese können in kurzen Abständen hintereinander folgen. Vermehrte Kolokalisationen sind in Fasern, die zwischen Acini verlaufen, erkennbar (siehe Abb. 3.14 C).



**Abb. 3.14: Untersuchung der PeaGB1- und synapsin-ähnlichen Markierung an Speicheldrüsen-Gesamtpräparaten.** Für die Dreifachmarkierung wurden anti-PeaGB1 (grün), anti-Synapsin (rot) und Phalloidin (blau) verwendet. Die Abbildungen präsentieren Projektionen von Bildstapeln. **D** zeigt einen vergrößerten Ausschnitt von **C**. Überlagerungen werden gelb dargestellt. GB1-immunreaktive Strukturen kolokalisieren mit der synapsin-ähnlichen Markierung (\*), insbesondere im Bereich zwischen den Acini (C). Bisweilen sind GB1- und Synapsin-positive Markierungen in unmittelbarer Nähe zueinander lokalisiert (**▲**). Der Maßstabsbalken beträgt 20  $\mu\text{m}$ .

### Immunhistochemische Lokalisation von PeaGB1 im Schabengehirn

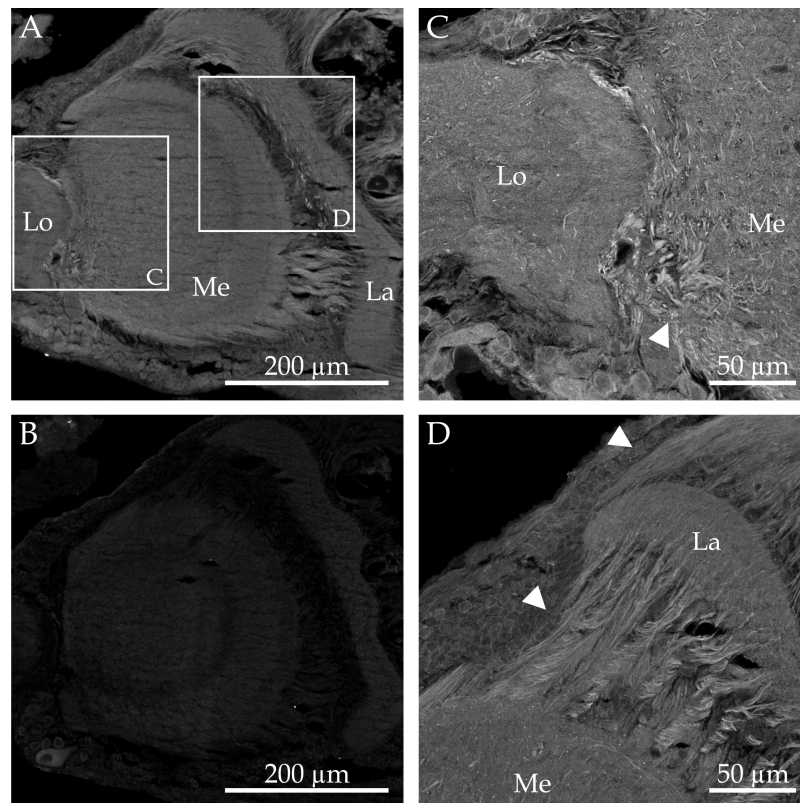
Die Untersuchung der PeaGB1-Immunreaktivität im Gehirn erfolgte anhand von Kryostatschnitten (14  $\mu\text{m}$ ). GB1-ähnliche Markierungen finden sich in nahezu allen Neuropilen des Schabengehirns. Eine besonders hohe Immunreaktivität ist im optischen Lobus, den Calyces der Pilzkörper und im Antennallobus erkennbar (siehe Abb. 3.15). Immunhistochemische Analysen ohne anti-PeaGB1 weisen keine Markierung auf (nicht gezeigt). Jedoch tritt eine partielle Autofluoreszenz des Gewebes auf.



**Abb. 3.15: PeaGB1-Immunreaktivität im Schabengehirn - Gesamtansicht Proto- und Deutocerebrum.** Nahezu alle Neuropile zeigen eine GB1-ähnliche Immunreaktivität. Besonders prominent ist diese im optischen Lobus (La, Me & Lo), sowie in den Calyces und im Antennallobus. La-Lamina, Me-Medulla, Lo-Lobula, Ca-Calyx, Pe-Pedunculus, MG-Makroglomerulus, Gl-Glomeruli, ZK-Zentralkörper, LLP-lateraler Lobus des Protocerebrums

Detailaufnahmen einzelner Neuropile ermöglichen eine präzisere Beschreibung GB1-immunreaktiver Strukturen. Alle optischen Neuropile (Lamina, Medulla und Lobula) sind GB1-immunreaktiv (siehe Abb. 3.16). Insbesondere die zwischen den

Neuropilen verlaufenden Fasern zeigen eine prominente PeaGB1-ähnliche Markierung. Im Bereich des zweiten optischen Chiasma (im Übergang von Lobula zur Medulla) befindet sich eine hohe Dichte GB1-immunreaktiver Fasern (siehe Abb. 3.16 C). Weiterhin besitzen Fasern des ersten optischen Chiasma sowie Fasern der Lamina-bildenden Zellen eine ausgeprägte GB1-Immunreaktivität (Abb. 3.16 D). Die Kontrolle ohne anti-PeaGB1 zeigt eine geringe Autofluoreszenz (Abb. 3.16 B).



**Abb. 3.16: PeaGB1-ähnliche Immunreaktivität im optischen Lobus von *P. americana*.** Die Neuropile Lobula (Lo), Medulla (Me) und Lamina (La) zeigen eine prominente PeaGB1-ähnliche Markierung (A), die in der Kontrolle ohne anti-PeaGB1 nicht vorhanden ist (B). Detailaufnahmen der optischen Chiasmen 1 und 2 (C und D), zur Orientierung exemplarisch in A gekennzeichnet, zeigen eine PeaGB1-ähnliche Markierung der Neuropil-verbindenden Fasern (▲). Jede Aufnahme ist eine Projektion eines Bildstapels. Lo-Lobula, Me-Medulla, La-Lamina

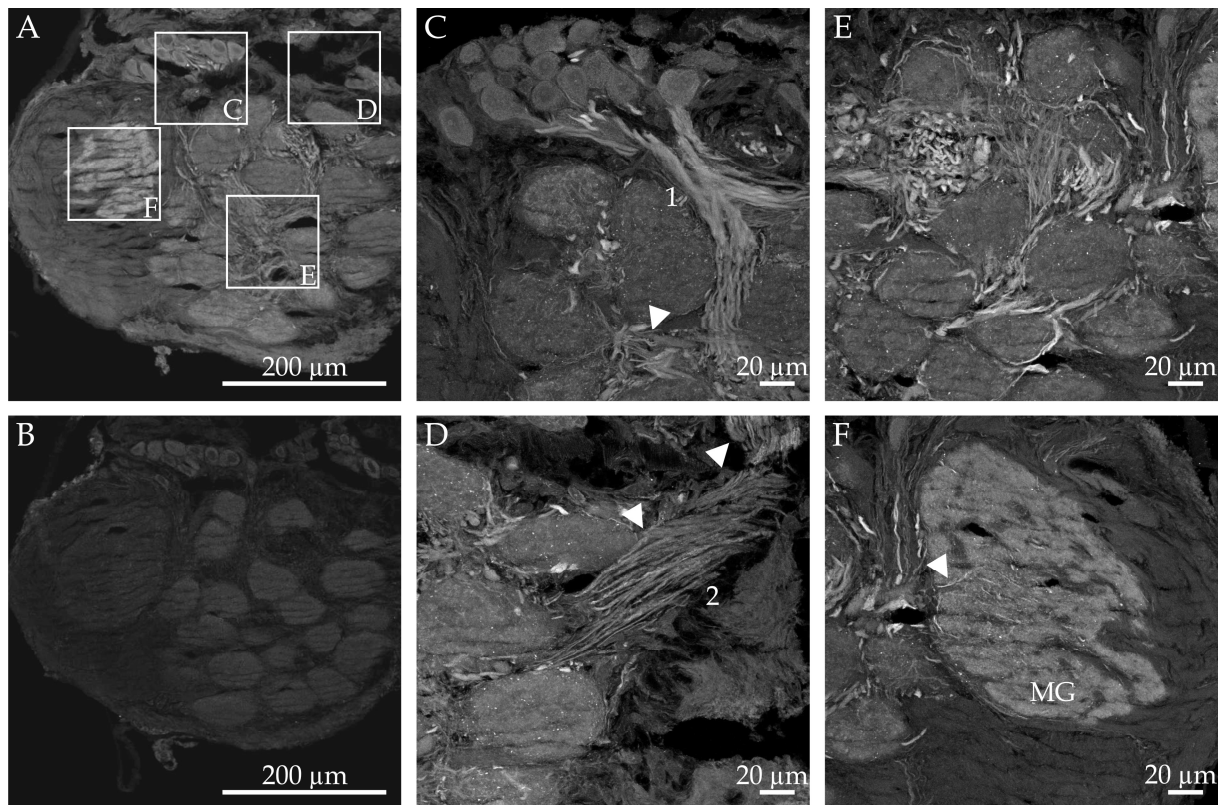
Eine besonders ausgeprägte PeaGB1-ähnliche Immunreaktivität zeigt der Antennallobus (siehe Abb. 3.17). Die olfaktorischen Glomeruli, welche als knäuelartige Neuropile erkennbar sind, weisen eine deutliche Immunfluoreszenz auf. Insbesondere ist der männchenspezifische Makroglomerulus zu erwähnen, welcher Eingänge der Pheromon-detektierenden Riechsinneszellen erhält (Abb. 3.17 E, F). Zudem weisen besonders Neurone, deren Zellkörper dorsal im Antennallobus orientiert sind, eine GB1-ähnliche Immunreaktivität auf. Ein Teil der GB1-immunreaktiven Fasern zieht in den Antennallobus hin zu den Glomeruli (Abb.

3.17 A, C), ein anderer Teil hingegen aus dem Lobus heraus in Richtung der Pilzkörper (siehe Abb. 3.17 D, Abb. 3.19 A).

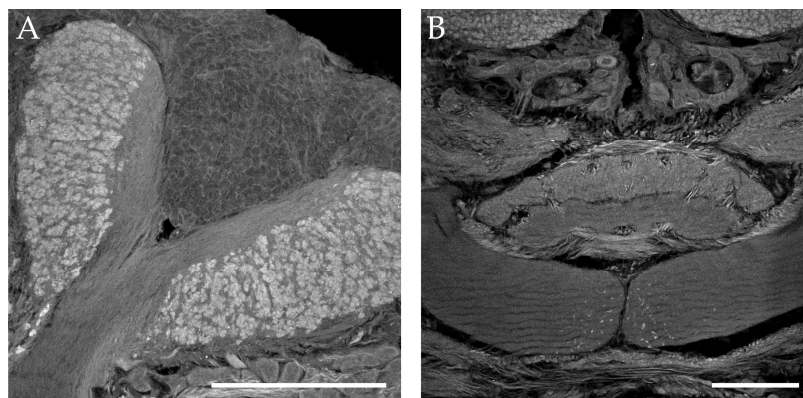
Die Calyces der Pilzkörper, welche aus den Dendriten der Kenyon-Zellen bestehen, zeigen eine auffällige PeaGB1-ähnliche Immunreaktivität (Abb. 3.18 A). Diskrete Bereiche des Pedunculus und  $\alpha$ -Lobus zeigen eine schwache Immunreaktivität. Der  $\beta$ -Lobus weist eine teilweise punktuelle Fluoreszenzmarkierung auf (siehe Abb. 3.15). Der Zentralkomplex zeigt ebenfalls eine GB1-ähnliche Markierung und ist umgeben von einer großen Anzahl GB1-immunreaktiver Fasern (Abb. 3.18 B, Abb. 3.19 A, C).

Eine GB1-ähnliche Immunreaktivität konnte auch in der *Corpora cardiaca* und im Suboesophagealganglion nachgewiesen werden (nicht gezeigt).

Die Doppelmarkierung des Gehirnschnittes mit anti-PeaGB1 und anti-Synapsin zeigt eindeutig, dass GB1-immunreaktive Fasern in Arealen mit Neurotransmitter-Freisetzungstellen ziehen (siehe Abb. 3.19). Überlagerungen sind in Abb. 3.19 C gelb dargestellt. Aus zeitlichen Gründen konnte keine Doppelmarkierung von anti-PeaGB1 und anti-GABA an Gehirnschnitten erfolgen.

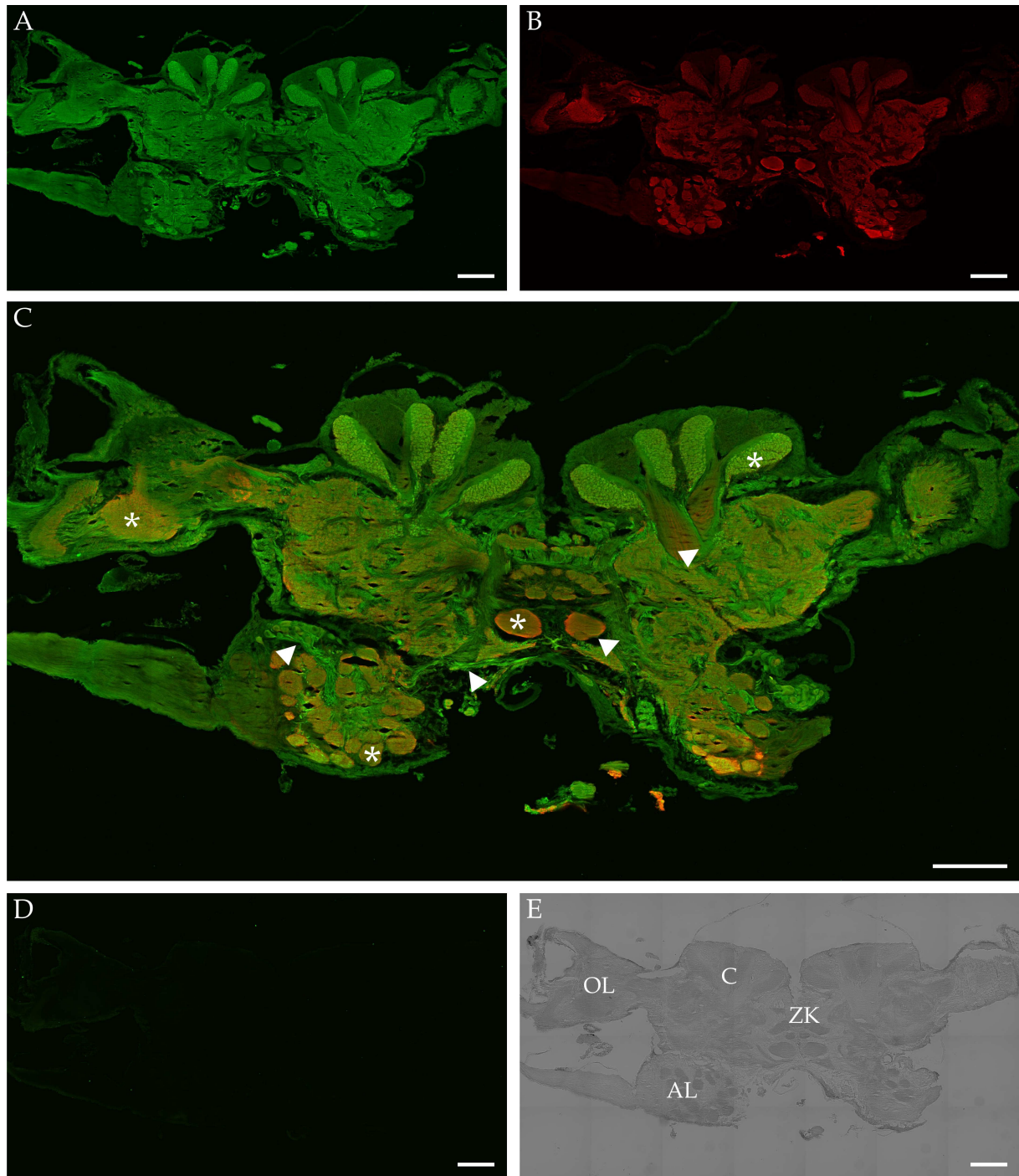


**Abb. 3.17: PeaGB1-ähnliche Immunreaktivität im Antennallobus von *P. americana*.** Der Antennallobus zeigt im Gegensatz zur Kontrolle ohne anti-PeaGB1 (B) eine deutliche PeaGB1-ähnliche Markierung (A). anti-PeaGB1 bindet an Fasern, welche von den Zellkörpern in den Antennallobus ziehen (C, 1) bzw. aus diesem heraus (D, 2). Die in C markierten Fasern ziehen zu den ebenfalls PeaGB1-markierten Glomeruli und bilden ein dichtes Netzwerk (E). Prominent ist die PeaGB1-ähnliche Immunreaktivität des Makroglomerulus (MG), sowie der abgehenden Fasern (F). Die Abbildungen sind Projektionen von Bildstapeln.



**Abb. 3.18: PeaGB1-ähnliche Immunreaktivität in den Pilzkörper-Calyces und im Zentralkörper.** Die Fasern der Kenyon-Zellen weisen eine prominente GB1-ähnliche Markierung auf (A). Weiterhin sind im oberen und unteren Zentralkörper, sowie im  $\beta$ -Lobus der Pilzkörper GB1-immunreaktive Fasern erkennbar (B). Die Abbildungen sind Projektionen von Bildstapeln. Der Maßstabsbalken beträgt 100  $\mu\text{m}$ .

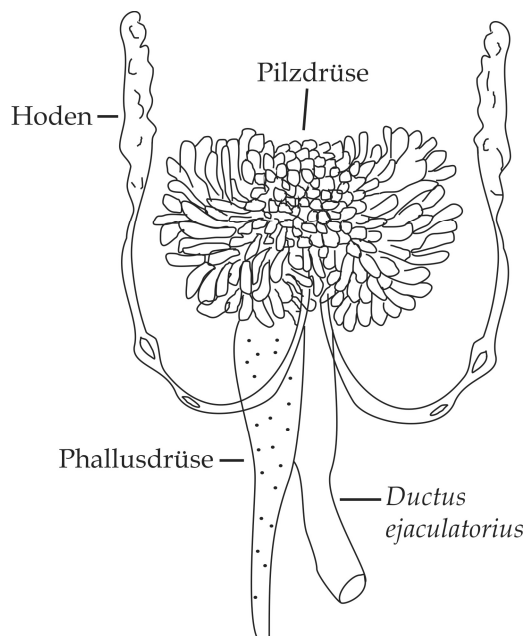




**Abb. 3.19: PeaGB1- und Synapsin-ähnliche Markierung im Gehirn - Gesamtansicht Proto- und Deutocerebrum.** Dargestellt sind die Markierungen mit anti-PeaGB1 (A), anti-Synapsin (B), sowie die Überlagerung (C) auf Frontalschnitten. Koloalitionen erscheinen in der Überlagerung gelb (\*). Areale ohne Synapsin-ähnliche Markierung sind durch ► gekennzeichnet. Die Kontrolle ohne Primärantikörper, ferner im differentiellen Interferenzkontrast dargestellt (E), zeigt keine Markierung (D). Der Maßstabsbalken beträgt 200  $\mu\text{m}$ . OL-optischer Lobus, AL-Antennallobus, C-Calyx, ZK-Zentralkörper

### Immunhistochemische Lokalisation von PeaGB1 in den männlichen akzessorischen Geschlechtsdrüsen

Die Lokalisation von PeaGB1 in den akzessorischen Drüsen adulter männlicher Schaben wurde aufgrund der nachgewiesenen Expression (siehe Abb. 3.11) ebenfalls immunhistochemisch untersucht. Die akzessorische Drüse besteht aus der Pilzdrüse (*utricular gland*) und der großen Phallusdrüse (*conglobate gland*; siehe Abb. 3.20). Für eine bessere Orientierung im Gewebe wurden die Kryostatschnitte der Drüsen zusätzlich mit Phalloidin und DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol) inkubiert. DAPI bindet u. a. an AT-reiche Regionen der DNA und führt infolgedessen zur Markierung des Zellkerns (Kubista *et al.*, 1987).



**Abb. 3.20:**

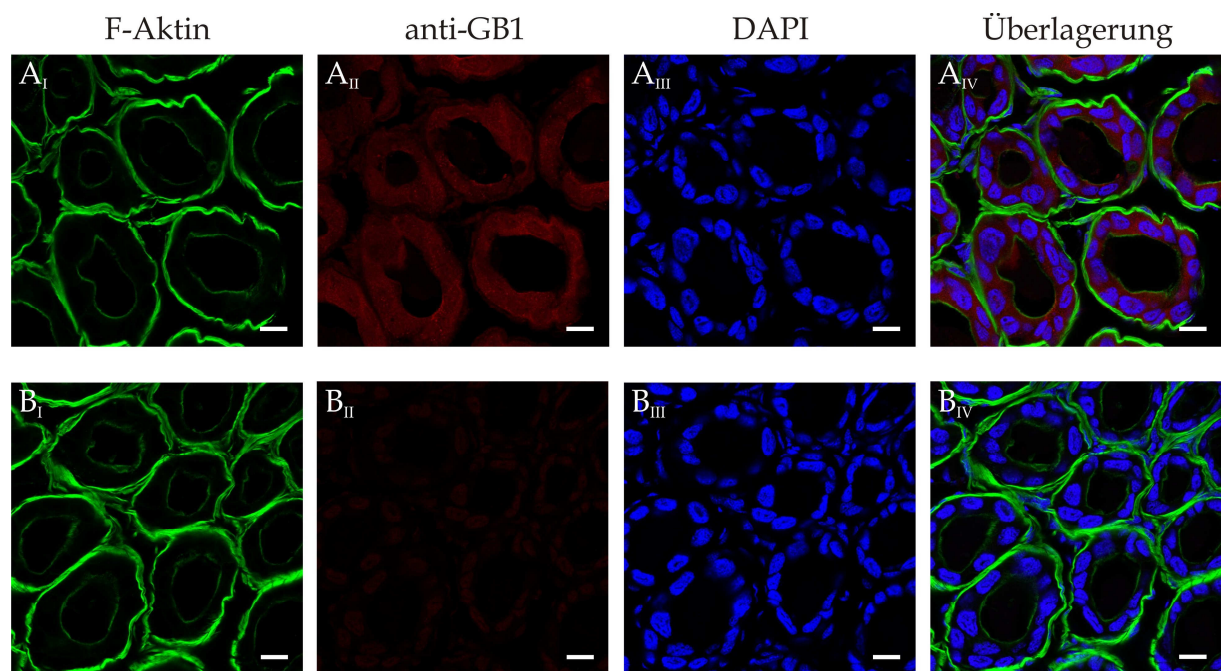
**Schematischer Aufbau der inneren Geschlechtsorgane von *P. americana*, nach Storch & Welsch (2009).** Die Pilzdrüse besteht aus 350-450 reinweißen schlauchartigen Nebendrüsen, welche in den *Ductus ejaculatorius* münden. Das Sekret der ebenfalls gut erkennbaren Phallusdrüse wird hingegen nach außen abgegeben.

Die Pilzdrüse (Nebendrüse), welche in den *Ductus ejaculatorius* mündet und u. a. Sekrete für den Aufbau der Spermatophoren produziert, besteht aus etwa 350-450 schlauchförmigen Nebendrüsen (Adiyodi & Adiyodi, 1974). Drüsenquerschnitte zeigen, dass die einzelnen Drüsen aus einem einschichtigen Epithel bestehen, welches das Lumen der Drüsen umgibt (siehe Abb. 3.21). Eine Abgrenzung einzelner Zellen ist aufgrund nicht vorhandener Aktinfilamente nicht erkennbar (Abb. 3.21 I). Die Epithelzellen weisen eine prominente PeaGB1-ähnliche Immunreaktivität auf (Abb. 3.21 A). Neben GB1-ähnlichen Markierungen an der Zellperipherie (\*) bindet anti-PeaGB1 insbesondere an vesikuläre Strukturen des Cytoplasmas (▲, siehe Abb. 3.23 A). Die einzelnen Nebendrüsen sind von einer Muskelschicht umgeben. Die

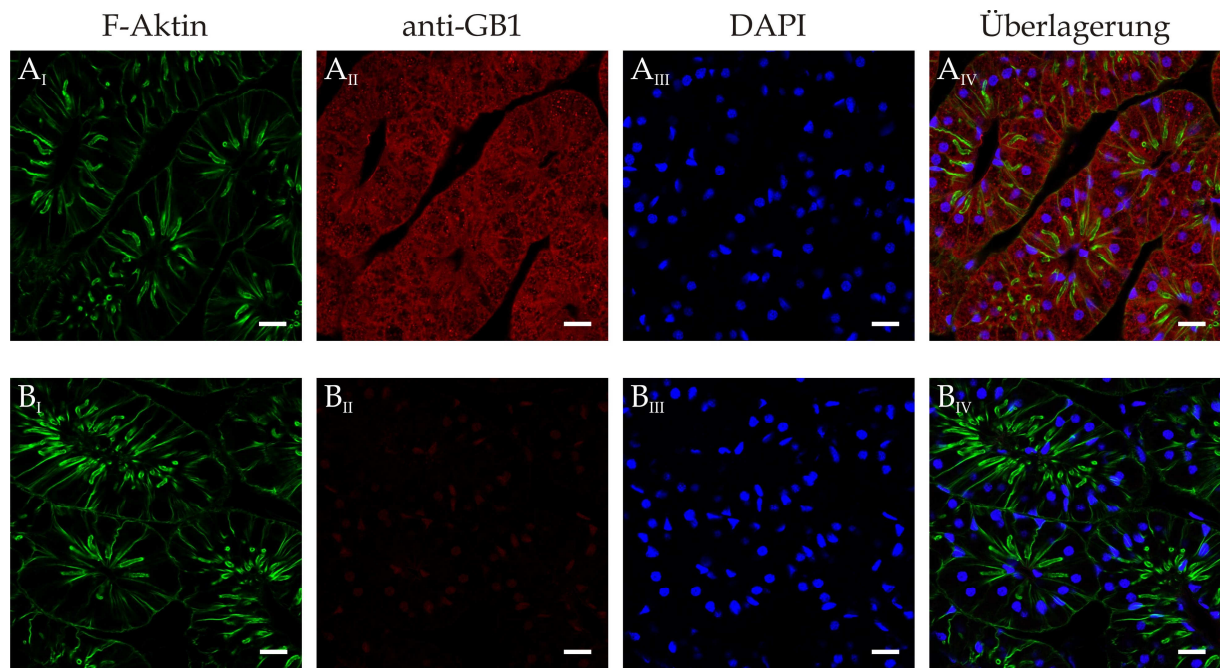


Kontrolle ohne den primären Antikörper zeigt ein geringeres Hintergrundsignal in den Zellkernen (Abb. 3.20 B).

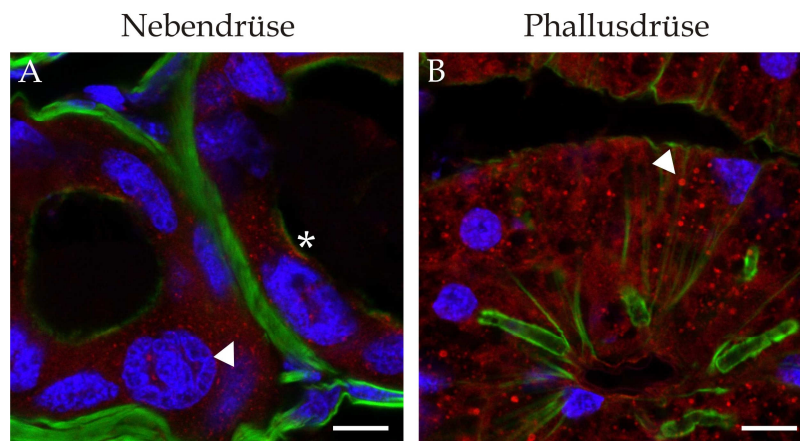
Die Phallusdrüse bildet ein Sekret, welches u. a. die Bindung der Spermienenthaltenden Spermatophore im Genitalbereich des Weibchens ermöglicht (Adiyodi & Adiyodi, 1974). Die Epithelzellen bilden ein mehrreihiges Epithel (siehe Abb. 3.22), bestehend aus pyramidenförmigen Zellen und basal gelegenen Zellen. Die einzelnen Zellen sind durch das Aktin-Cytoskelett sichtbar voneinander abgegrenzt. Auffällig ist der in der apikalen Membran der pyramidenförmigen Zellen hineinragende Gang (Abb. 3.22 I). Dieser ist Teil des Gangsystems und im Zellinnern von Mikrovilli umgeben (Beams *et al.*, 1962). Die pyramidenförmigen Zellen der Phallusdrüse besitzen eine ausgeprägte GB1-ähnliche Markierung. Insbesondere die vesikulären Strukturen im Zellinnern sind GB1-immunreaktiv (▲, siehe Abb. 3.22 A, 3.23 B).



**Abb. 3.21: PeaGB1-ähnliche Immunreaktivität der Nebendrüse von Schabenmännchen - Querschnitt.** Dreifachmarkierung (IV) mit Phalloidin (grün, I), anti-GB1 (rot, II) und DAPI (blau, III). Das einschichtige Drüsenepithel, welches von Muskelzellen umgeben ist, weist eine prominente GB1-ähnliche Markierung auf (A). Die Kontrolle zeigt ein schwaches Hintergrundsignal der Zellkerne (B). Der Maßstabsbalken beträgt 20  $\mu\text{m}$ .



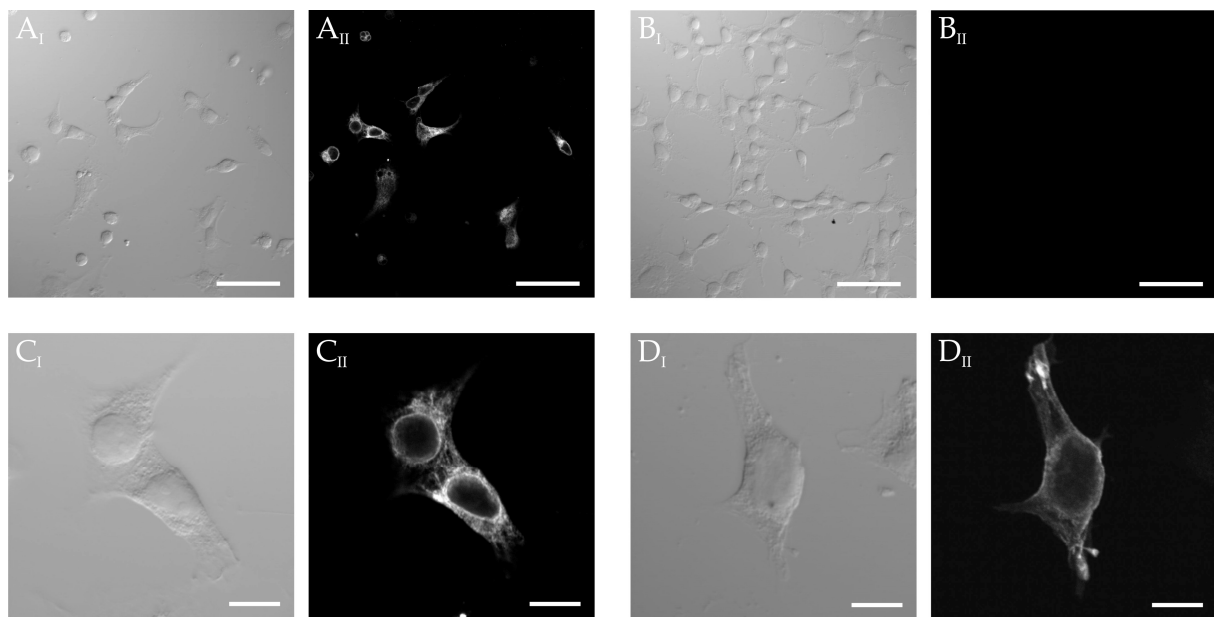
**Abb. 3.22: PeaGB1-ähnliche Immunreaktivität der Phallusdrüse von Schabenmännchen - Querschnitt.** Dreifachmarkierung (IV) mit Phalloidin (grün, I), anti-GB1 (rot, II) und DAPI (blau, III). Die pyramidenförmigen Epithelzellen weisen eine ausgeprägte GB1-ähnliche Markierung auf (A). Die Kontrolle zeigt ein schwaches Hintergrundsignal der Zellkerne (B). Der Maßstabsbalken beträgt 20  $\mu\text{m}$ .



**Abb. 3.23: Detailaufnahmen der akzessorischen männlichen Geschlechtsdrüsen.** Dreifachmarkierung mit Phalloidin (grün), anti-GB1 (rot) und DAPI (blau). Vesikuläre Strukturen im Cytoplasma (▲) sowie in der Peripherie der apikalen Membran (\*) weisen eine GB1-ähnliche Markierung in der Neben- (A) und Phallusdrüse (B) auf. Der Maßstabsbalken beträgt 10  $\mu\text{m}$ .

### 3.4.4 Immunhistochemischer Nachweis der Expression von PeaGB1 in PeaGB1/DmGB2-transfizierten flpTM-Zellen

Für diese Untersuchung wurden sowohl PeaGB1/DmGB2-transfizierte als auch nicht-transfizierte flpTM-Zellen mit anti-PeaGB1 inkubiert. Die Mehrheit der PeaGB1/DmGB2-transfizierten Zellen weist eine prominente PeaGB1-ähnliche Immunreaktivität auf (siehe Abb 3.24 A). Bei diesen Zellen ist eine Detektion sowohl cytosolischer als auch in der Zellperipherie lokalisierter Proteine erkennbar (siehe Abb. 3.24 C). Nicht-transfizierte flpTM-Zellen hingegen weisen keine Markierung auf (Abb. 3.24 B). Die Inkubation des anti-HA-Antikörpers auf den transfizierten Zellen dient dem Nachweis der DmGB2-Expression. Es werden vor allem Proteine in der Zellperipherie detektiert (Abb. 3.24 D). Nicht-transfizierte Zellen sind ebenfalls nicht immunreaktiv (nicht gezeigt).



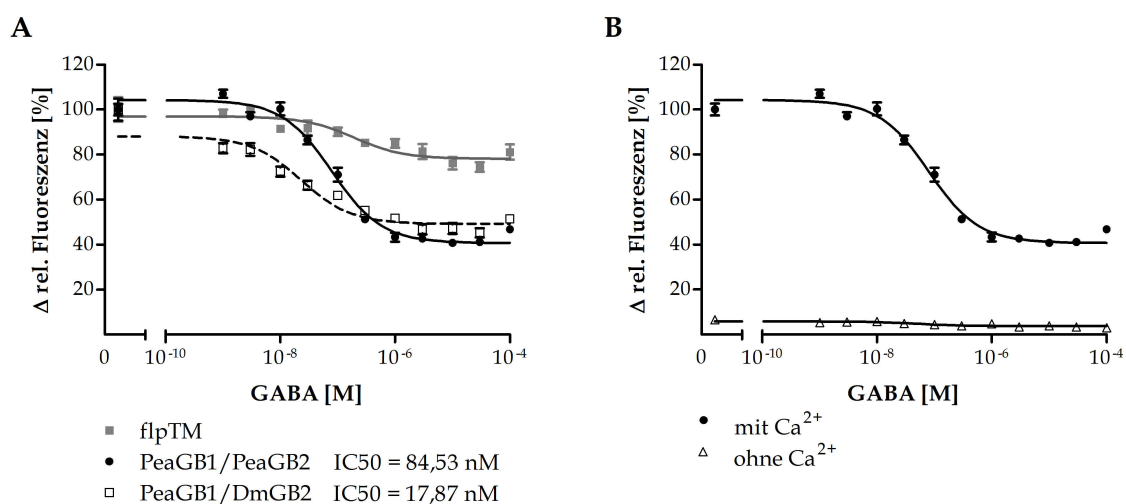
**Abb. 3.24:** Nachweis der Expression von PeaGB1 und DmGB2 in PeaGB1/DmGB2-transfizierten und nicht-transfizierten flpTM-Zellen. Dargestellt sind jeweils die Aufnahme im differentiellen Interferenzkontrast (I) sowie das konfokale Fluoreszenzbild (II). PeaGB1/DmGB2-transfizierte (A) und nicht-transfizierte Zellen (B) wurden mit anti-PeaGB1 (1:1.000) als primären Antikörper sowie goat-anti-rabbit-Alexa488 (1:50) als sekundärer Antikörper inkubiert. C zeigt einen vergrößerten Ausschnitt aus A. PeaGB1/DmGB2-transfizierte Zellen wurden für die Untersuchung der DmGB2-ähnlichen Verteilung mit anti-HA (1:100) sowie goat-anti-rat-Cy3 (1:200) inkubiert (D). Der angegebene Maßstabsbalken entspricht 50  $\mu\text{m}$  (A & B) bzw. 10  $\mu\text{m}$  (C & D).

### **3.5 Funktionelle und pharmakologische Charakterisierung von PeaGB1 & PeaGB2**

Wie alle G-Protein-gekoppelten Rezeptoren können auch die metabotropen GABA-Rezeptoren intrazelluläre Signalkaskaden durch die Aktivierung bestimmter G-Proteine beeinflussen (Übersichten bei: Couve *et al.*, 2000; Bettler *et al.*, 2004). Dabei besitzen neben der  $G\beta\gamma$ -Untereinheit die  $G_o\alpha$ - und  $G_i\alpha$ -Untereinheiten eine vermittelnde Rolle. Letztere inhibieren spezifische Adenylylzyklasen und führen somit zu einer Verminderung der intrazellulären cAMP-Konzentration  $[cAMP]_i$ . Für die funktionelle und pharmakologische Untersuchung des Schaben GABA<sub>B</sub>-Rezeptor-Heteromers PeaGB1/DmGB2, sowie der vergleichenden Analyse zum PeaGB1/DmGB2-Heteromer wurden flpTM-Zellen mit entsprechenden Expressionsvektoren stabil transfiziert. Die Expression von PeaGB1, PeaGB2 und DmGB2 konnte durch Western-Blot-Experimente nachgewiesen werden. Exemplarisch dargestellt ist die Expression von PeaGB1 (siehe Abb. 2.9 B) und DmGB2 (siehe Abb. 6.6). Der immunzytochemische Nachweis von PeaGB1 erfolgte außerdem an fixierten PeaGB1/DmGB2-transfizierten flpTM-Zellen unter Verwendung des anti-PeaGB1-Antikörpers (siehe Abb. 3.24). Aufgrund der großen Ähnlichkeit der PeaGBs zu orthologen Rezeptoren wurde angenommen, dass diese ebenfalls an die bekannten Signalwege koppeln. Daher erfolgte die pharmakologische Charakterisierung der Heteromere durch die indirekte Bestimmung der  $\Delta[cAMP]_i$  über Calciumfluorometrie. Um eine Abnahme der intrazellulären cAMP-Konzentration zu messen, wurde der Messlösung das lipophile Forskolin-Analogon NKH477 (10  $\mu$ M) hinzugefügt. Der sofortige Abbau des cAMPs durch Phosphodiesterasen wurde durch die Applikation von 100  $\mu$ M IBMX blockiert. Für die Untersuchung der pharmakologischen Eigenschaften der GB-Heteromere wurden zum einen Substanzen getestet, welche als GB-Agonisten und -Antagonisten bei physiologischen Experimenten an isolierten Speicheldrüsen von *P. americana* (Rotte, 2009) eingesetzt wurden. Zum anderen wurden Substanzen verwendet, welche einen Einfluss auf die *second messenger*-Systeme von Vertebraten GB-Heteromeren zeigten (Bowery *et al.*, 2002; Froestl, 2010).

### 3.5.1 Funktionelle Charakterisierung des GB1/GB2-Heterodimer

Für den Funktionalitätsnachweis der Heteromere PeaGB1/PeaGB2 und PeaGB1/DmGB2 wurden beide Zelllinien jeweils mit unterschiedlichen GABA-Konzentrationen inkubiert und die Änderung der Fluoreszenz als Maß für die Änderung der  $[cAMP]_i$  fluorometrisch bestimmt. Mit ansteigender GABA-Konzentration erniedrigt sich die relative Fluoreszenz, d.h. die  $[cAMP]_i$  wird geringer. Die Dosis-Wirkungskurven für PeaGB1/PeaGB2 und PeaGB1/DmGB2 zeigen einen sigmoidalen Verlauf (siehe Abb. 3.25 A). Die cAMP-Synthese kann durch Applikation von GABA bei dem Schaben-Heteromer auf ~40%, bei PeaGB1/DmGB2 auf ~45% reduziert werden. Die halbmaximale relative Fluoreszenzänderung entspricht der relativen effektiven Konzentration  $EC_{50}$ . Diese liegt für PeaGB1/PeaGB2 bei 84,53 nM GABA ( $\log EC_{50} = -7,10 \pm 0,05$ ; Mittelwert  $\pm$  Standardfehler). Für den PeaGB1/DmGB2-Rezeptor liegt der  $EC_{50}$ -Wert bei 17,86 nM GABA ( $\log EC_{50} = -7,63 \pm 0,10$ ; Mittelwert  $\pm$  Standardfehler). Bei den nicht-transfizierten flpTM-Zellen ist eine Reduktion der Fluoreszenz um circa 15% zu beobachten (siehe Abb. 3.25 A).



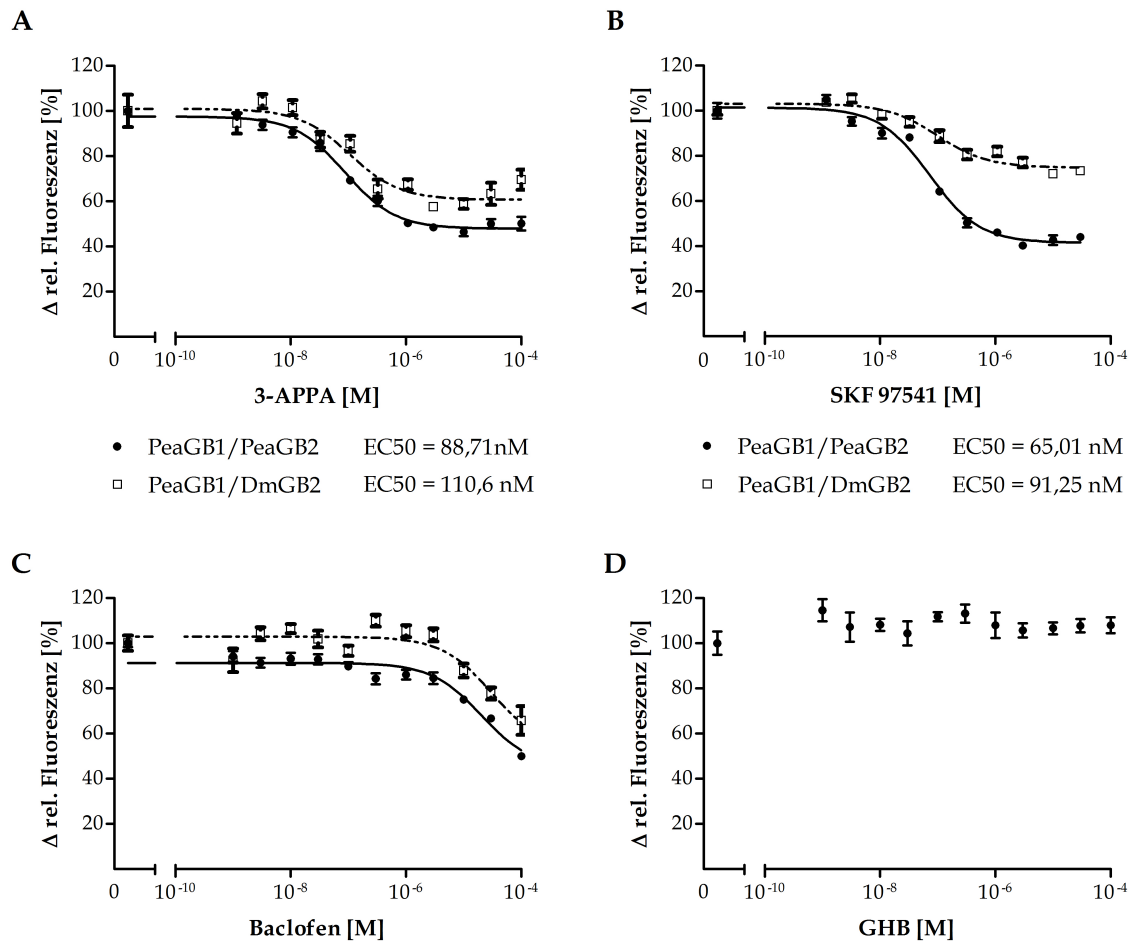
**Abb. 3.25: Dosis-abhängige Wirkung von GABA auf die intrazelluläre cAMP-Konzentration bei unterschiedlich transfizierten flpTM-Zelllinien und  $Ca^{2+}$ -Bedingungen.** Dargestellt sind die Mittelwerte und mittleren Standardfehler einer Achtfachbestimmung, normiert auf die relative Fluoreszenzintensität ohne GABA-Zugabe. **A** Dosis-abhängige Effekte von GABA auf die relative Fluoreszenz von nicht-transfizierten flpTM-Zellen, PeaGB1/PeaGB2-transfizierten und PeaGB1/DmGB2-transfizierten Zellen. Die Messungen erfolgten auf einem Hintergrund von 10  $\mu$ M NKH477 und 100  $\mu$ M IBMX und wurden zweimal unabhängig durchgeführt. **B** Dosis-abhängige Wirkung von GABA bei  $Ca^{2+}$ -haltigen und  $Ca^{2+}$ -freien Bedingungen. Die Fluoreszenzwerte der  $Ca^{2+}$ -freien Messung wurden auf den Kontrollwert der  $Ca^{2+}$ -haltigen Messung normiert. Die Messung wurde einmal durchgeführt.

Durch die Verwendung  $\text{Ca}^{2+}$ -freier Lösungen kann untersucht werden, ob durch Applikation von GABA auch intrazelluläres  $\text{Ca}^{2+}$  freigesetzt wird. Im Vergleich zur Messung mit extrazellulärem  $\text{Ca}^{2+}$  ist die Fluoreszenz nach der Aktivierung der Adenylzyklen bei  $\text{Ca}^{2+}$ -freien Bedingungen um circa Faktor 100 reduziert (siehe Abb. 3.25 B). Ansteigende GABA-Konzentrationen führen nicht zu einer Erhöhung der Fluoreszenzintensität (Abb. 3.25 B). Zur Veranschaulichung ist die Änderung der Fluoreszenzintensität auf den Kontrollmesswert unter  $\text{Ca}^{2+}$ -haltigen Bedingungen normiert.

### 3.5.2 Pharmakologische Charakterisierung - Agonisten

Für die pharmakologische Charakterisierung der Heteromere PeaGB1/PeaGB2 und PeaGB1/DmGB2 erfolgte die Untersuchung der potentieller Agonisten (siehe Tab. 6.5) ebenfalls auf einem Hintergrund von  $10 \mu\text{M}$  NKH477 und  $100 \mu\text{M}$  IBMX. Die Substanzen 3-APPA, SKF 97541 (3-APMPA) und Baclofen führen bei ansteigenden Substanzkonzentrationen zur einer Verringerung der  $[\text{cAMP}]_i$  in den GB1/GB2-exprimierenden Zelllinien und imitieren daher den GABA-Effekt (siehe Abb. 3.26). Der  $\text{EC}_{50}$ -Wert für 3-APPA liegt für das Schaben-Heteromer bei  $88,71 \text{ nM}$  ( $\log\text{EC}_{50} = -7,05 \pm 0,06$ ; Mittelwert  $\pm$  Standardfehler), für PeaGB1/DmGB2 bei  $110 \text{ nM}$  ( $\log\text{EC}_{50} = -6,97 \pm 0,15$ ). Die effektive Dosis von SKF 97541 ist bei PeaGB1/PeaGB2  $65,01 \text{ nM}$  ( $\log\text{EC}_{50} = -7,13 \pm 0,05$ ) bzw. bei PeaGB1/DmGB2  $91,25 \text{ nM}$  ( $\log\text{EC}_{50} = -7,00 \pm 0,11$ ). Die Dosis-Wirkungskurven zeigen für beide Substanzen einen sigmoidalen Verlauf. Die NKH477-induzierte  $[\text{cAMP}]_i$  kann durch 3-APPA bei PeaGB1/PeaGB2 bzw. PeaGB1/DmGB2 auf  $\sim 50\%$  bzw.  $\sim 70\%$  reduziert werden (siehe Abb. 3.26 A). SKF97541 reduziert die NKH477-induzierte  $[\text{cAMP}]_i$  um  $40\%$  bzw.  $70\%$  (siehe Abb. 3.26 B). Für Baclofen kann kein  $\text{EC}_{50}$ -Wert bestimmt werden, da keine Sättigung erreicht worden ist (siehe Abb. 3.26 C). Aufgrund der schlechten Löslichkeit der Substanz waren Messungen bei  $10^{-3} \text{ M}$  Baclofen nicht durchführbar. Die Ergebnisse für Baclofen sprechen jedoch für einen höheren  $\text{EC}_{50}$ -Wert als bei den vorher genannten Agonisten. Unterschiedliche Konzentrationen von  $\gamma$ -Hydroxybuttersäure haben keinen Effekt auf die relative Fluoreszenz der PeaGB1/PeaGB2-transfizierten (siehe Abb. 3.26 D) und PeaGB1/DmGB2-transfizierten Zelllinie (nicht gezeigt).



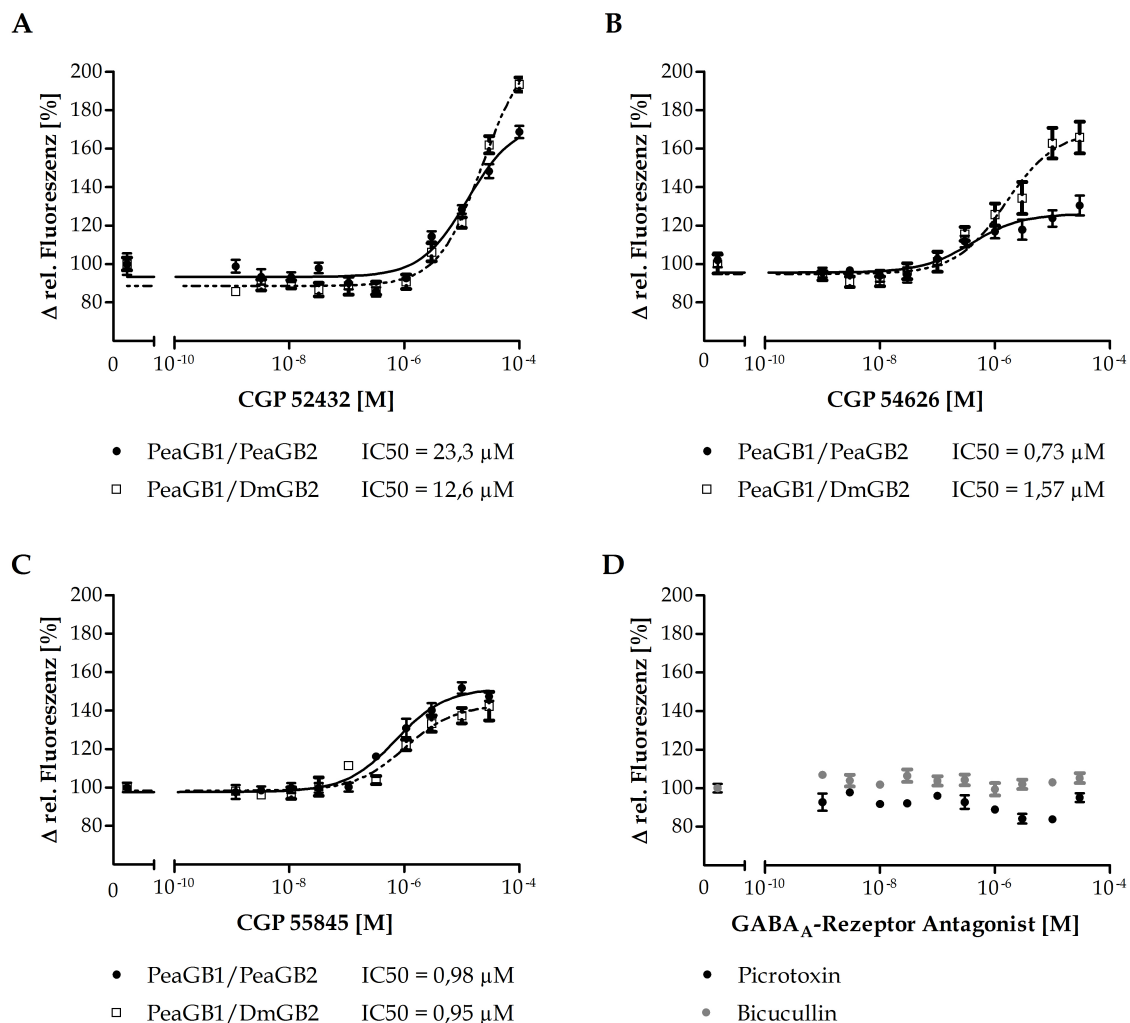


**Abb. 3.26:** Dosis-abhängige Wirkung putativer Agonisten auf die  $[cAMP]_i$  der PeaGB1/PeaGB2- und PeaGB1/DmGB2-transfizierten Zelllinien. Dargestellt sind die Mittelwerte und mittleren Standardfehler einer Achtfachbestimmung, normiert auf die relative Fluoreszenzintensität auf dem Hintergrund von 10  $\mu$ M NKH477 und 100  $\mu$ M IBMX für die Substanzen 3-APPA (A), SKF97541 (B), Baclofen (C) und  $\gamma$ -Hydroxybuttersäure (D). Die Messungen A, B und C wurden zweimal unabhängig durchgeführt. D wurde nur einmal pro Zelllinie gemessen. Exemplarisch ist hier nur die Messung der PeaGB1/PeaGB2-transfizierten Zelllinie gezeigt. GHB -  $\gamma$ -Hydroxybuttersäure, • PeaGB1/PeaGB2-transfizierte Zellen, □ PeaGB1/DmGB2-transfizierte Zelllinien

### 3.5.3 Pharmakologische Charakterisierung - Antagonisten

Der Einfluss verschiedener potentieller Antagonisten wurde auf einem Hintergrund von 10  $\mu$ M NKH477, 100  $\mu$ M IBMX und 1  $\mu$ M GABA getestet. Die Antagonisten CGP52432, CGP54626 und CGP55845 (siehe Abb. 3.27 A, B und C; siehe Tab. 6.5) führen bei ansteigenden Substanzkonzentrationen zu einem Anstieg der relativen Fluoreszenz in beiden Zelllinien. Aufgrund des sigmoidalen Verlaufs der dosis-abhängigen Wirkung kann die mittlere inhibitorische Konzentration  $IC_{50}$  ermittelt werden. Der  $IC_{50}$ -Wert von CGP52432 liegt für PeaGB1/PeaGB2 bei 23,3  $\mu$ M ( $\log IC_{50} = -4,90 \pm 0,12$ ; Mittelwert  $\pm$  Standardfehler) und für PeaGB1/DmGB2 bei

12,6  $\mu\text{M}$  ( $\log\text{IC}_{50} = -4,63 \pm 0,11$ ). Etwas niedriger sind die  $\text{IC}_{50}$ -Werte von CGP54626 und CGP55845. Für CGP54626 liegen diese bei PeaGB1/PeaGB2 bzw. PeaGB1/DmGB2 bei 0,73  $\mu\text{M}$  ( $\log\text{IC}_{50} = -6,40 \pm 0,19$ ) bzw. 157  $\mu\text{M}$  ( $\log\text{IC}_{50} = -5,80 \pm 0,13$ ), für CGP55845 bei 0,98  $\mu\text{M}$  ( $\log\text{IC}_{50} = -6,15 \pm 0,09$ ) bzw. 0,95  $\mu\text{M}$  ( $\log\text{IC}_{50} = -5,99 \pm 0,14$ ). Die als  $\text{GABA}_A$ -Rezeptor-Antagonisten bekannten Substanzen Picrotoxin und Bicucullin zeigen dagegen keine antagonistische Wirkung (siehe Abb. 3.27 D).



**Abb. 3.27: Dosis-abhängige Wirkung putativer Antagonisten auf die  $[\text{cAMP}]_i$  der PeaGB1/PeaGB2- und PeaGB1/DmGB2-transfizierten Zelllinien.** Dargestellt sind die Mittelwerte und mittleren Standardfehler einer Achtfachbestimmung, normiert auf die relative Fluoreszenzintensität auf dem Hintergrund von 10  $\mu\text{M}$  NKH477, 100  $\mu\text{M}$  IBMX und 1  $\mu\text{M}$  GABA für die Substanzen CGP55432 (A), CGP54626 (B), CGP55845 (C) und die  $\text{GABA}_A$ -Rezeptor-Antagonisten Picrotoxin & Bicucullin (D). Die Messungen A, B und C wurden zweimal unabhängig durchgeführt. D wurde nur einmal pro Zelllinie gemessen. Exemplarisch ist hier nur die Messung der PeaGB1/PeaGB2-transfizierten Zelllinie gezeigt. • PeaGB1/PeaGB2-transfizierte Zellen, □ PeaGB1/DmGB2-transfizierte Zelllinien.



## 4. DISKUSSION

Die Existenz multizellulärer Organismen beruht auf der Fähigkeit jeder Zelle mit einer anderen Zelle zu kommunizieren, um als kleinste Einheit dem Organismus als Ganzes zu nutzen. Die Untersuchung der Zellkommunikation sowie ihrer Signale und Signalwege sind daher ein wesentlicher Schlüssel für das Erlangen eines Grundverständnisses für die Funktionsweise mehrzelliger Lebewesen. Eine Vielzahl an unterschiedlichen Signalen muss von der Zielzelle adäquat durch einen bzw. mehrere entsprechende Rezeptoren erkannt und übersetzt werden. Die nicht-proteinogene Aminosäure  $\gamma$ -Aminobuttersäure (GABA) tut dies über ionotrope und metabotrope GABA-Rezeptoren. Obwohl schon 1981 die Existenz der metabotropen Rezeptoren nachgewiesen wurde (Hill & Bowery, 1981), konnte erst mehr als 15 Jahre später der erste GABA<sub>B</sub>-Rezeptor (GB) isoliert werden (Kaupmann *et al.*, 1997). Mittlerweile sind insbesondere die Vertebraten-Rezeptoren gut charakterisiert. Ihr Einfluss bei diversen psychologischen Störungen als auch ihre hemmende Wirkung auf das bei Drogenmissbrauch aktivierte Belohnungssystem sind bekannt (Übersicht bei: Vlachou & Markou, 2010). Bei Insekten wurden bisher nur die cDNAs der GBs 1, 2 und 3 der Taufliege *Drosophila melanogaster* (Mezler *et al.*, 2001) sowie partiell der GB1 der Amerikanischen Tabakknospeneule *Heliothis virescens* (Pregitzer *et al.*, 2013) isoliert. Daten zur Pharmakologie, Verteilung und Physiologie wurden für *Drosophila* erhoben und zeigen eine wesentliche Beteiligung der GBs an der Verarbeitung sensorischer Reize sowie deren Einfluss auf das Belohnungssystem auf (Übersicht bei: Manev & Dzitoyeva, 2010). Die angefertigte Arbeit gibt einen Einblick in die molekularen und pharmakologischen Eigenschaften sowie der Verteilung der GBs von *P. americana* und erweitert damit im erheblichen Maße den Kenntnisstand über die GABA<sub>B</sub>-Rezeptoren bei Invertebraten.

Die sich anschließende Diskussion gliedert sich in drei Abschnitte. Im ersten Abschnitt wird auf die strukturellen Eigenschaften des GB1 und GB2 der Amerikanischen Großschabe eingegangen. Es werden die Eigenschaften der abgeleiteten Aminosäuresequenzen sowie die phylogenetische Einordnung dieser Rezeptoren erörtert. Im zweiten Abschnitt wird die Verteilung des GABA<sub>B</sub>-Rezeptor-

Subtyps 1 sowie mögliche damit verbundene Funktionen diskutiert. Im letzten Abschnitt erfolgt der Vergleich des pharmakologischen Profils des PeaGB1/PeaGB2-Heteromers zu den bisher bekannten pharmakologischen Profilen anderer Spezies (Mezler *et al.*, 2001). Es wird der Einfluss des GB2 auf die Ligandenbindung diskutiert. Abschließend wird das pharmakologische Profil der heterolog exprimierten PeaGBs mit den in physiologischen Experimenten ermittelten Eigenschaften nativer GBs in den Speicheldrüsen von *P. americana* (Rotte *et al.*, 2009) verglichen.

#### **4.1 Strukturelle Eigenschaften der GABA<sub>B</sub>-Rezeptor Subtypen 1 & 2 der Amerikanischen Großschabe**

G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCRs) zeichnen sich auf Proteinebene nicht nur durch eine einheitliche Struktur aus. Vor allem innerhalb der einzelnen Familien gibt es eine Reihe von konservierten Aminosäurereste, Sekundärstrukturen und Proteinmodifikationen.

##### **4.1.1 Isolierung der PeaGB1- und PeaGB2-cDNA**

Die Existenz einer EST-Datenbank bzw. das sequenzierte Genom eines Modellorganismus ist für die Klonierung unbekannter cDNAs äußerst hilfreich. Jedoch fehlte zunächst eine derartige Quelle für *P. americana*, so dass alternative Verfahren wie PCR-Experimente mit degenerierten Primern und RACE-PCR-Experimente angewendet wurden. Die Kombination dieser Methoden führte zur Isolierung der cDNA des GABA<sub>B</sub>-Rezeptor Subtyps 1 (PeaGB1). Für den GABA<sub>B</sub>-Rezeptor Subtyp 2 (PeaGB2) führten RACE-PCR-Experimente jedoch zu keiner Amplifizierung weiterer DNA-Fragmente. Eine mögliche Ursache hierfür können 3'-gelegene Sekundärstrukturen auf mRNA-Ebene sein. Diese könnten die cDNA-Synthese in diesem Bereich behindern. Die Analyse des in 3'-Richtung gelegenen Bereichs durch das RNA-Sekundärstruktur-Vorhersage Programm [rna.urmc.rochester.edu/RNAstructureWeb/Servers/Predict1/Predict1.html](http://rna.urmc.rochester.edu/RNAstructureWeb/Servers/Predict1/Predict1.html) bestätigt diese Vermutung. Um dieses Problem zu umgehen wurden *genome walking-*

Strategien etabliert, welche genomische DNA als Matrize nutzen. Jedoch konnten mit den drei verwendeten Verfahren (*randomly primed*-PCR, Inverse PCR und Vektorette-PCR) ebenfalls keine weiteren 3'-gelegenen genomischen Bereiche amplifiziert werden. Die Ursachen können vielfältig sein und sind daher schwer zu identifizieren. Bei der *randomly-primed* PCR ist die Wahrscheinlichkeit hoch unspezifische DNA-Bereiche zu amplifizieren, da nur ein spezifischer Primer verwendet wird. Bei den anderen Techniken sind das Vorhandensein und die Lage der Restriktionsendonukleasen (RE)-Schnittstellen im unbekanntem 3'-Bereich von entscheidender Bedeutung. Tatsächlich findet sich im 3'-Bereich der PeaGB2-cDNA keine Schnittstelle für die im Vektorette-Verfahren verwendeten REs. Bei der Inversen PCR stellt die Zirkularisierung des DNA-Moleküls die größte Schwierigkeit dar. Diese ist u. a. von der DNA-Konzentration, der Menge an T4 DNA Ligase sowie der Größe des DNA-Moleküls abhängig. Nicht zu vernachlässigen ist außerdem das mögliche Vorhandensein von Introns, welche unter Umständen mehr als 50 kb lang sein können (Shepard *et al.*, 2009).

Die Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Toru Miura (Hokkaido Universität, Japan) ermöglichte den Zugriff auf eine bisher unveröffentlichte *P. americana* EST-Datenbank. Die erhaltenen EST-Fragmente trugen maßgeblich zur Isolierung der vollständigen PeaGB2-cDNA bei. Die EST-Datenbank soll im Zuge der Veröffentlichung dieser Arbeit ebenfalls zugänglich gemacht werden (persönliche Mitteilung T. Miura).

Die komplizierte Isolierung von GABA<sub>B</sub>-Rezeptor-cDNAs ist bei *P. americana* kein Einzelfall. Auch die Isolierung des GBs des Menschen mit erheblichem Aufwand verbunden (Kaupmann *et al.*, 1998b, Clark *et al.*, 2000). Die Isolierung der *Heliothis virescens* GB1-cDNA stellte sich ebenfalls als äußerst schwierig heraus und ist bis dato nicht abgeschlossen (persönliche Mitteilung: P. Pregitzer und PD Dr. J. Krieger, Universität Hohenheim, Pregitzer *et al.*, 2013).

#### 4.1.2 Die heptahelikale Struktur der abgeleiteten Aminosäuresequenzen

Alle Mitglieder der GPCR-Familie weisen als gemeinsames Merkmal sieben membrandurchspannende  $\alpha$ -Helices mit alternierenden intra- und extrazellulären

Schleifen auf (Baldwin, 1993; Bockaert & Pin, 1999). Der N-Terminus ist extrazellulär, der C-Terminus hingegen intrazellulär gelegen. Die Analyse der Membrantopologie sowie das Hydropathieprofil des PeaGB1 (siehe Abb. 3.1) bekräftigen die Zugehörigkeit dieses Proteins zur Superfamilie der GPCRs. Die Membrantopologie und das Hydropathieprofil des PeaGB2 zeigen ebenfalls sieben hydrophobe Domänen. Laut Vorhersage durchspannt jedoch die vierte Domäne nicht die Membran und führt somit zu seitenverkehrt exponierten Schleifen in C-terminaler Richtung (siehe Abb. 3.4 B). Untersucht man die Membrantopologie einiger orthologer Rezeptoren, erhält man eine nahezu analoge Strukturvorhersage mit sechs TMs für die Invertebraten-Rezeptoren von *D. melanogaster*, *A. mellifera* und *P. humanis corporis*. Aufgrund der Vorhersage von sieben TMs bei den orthologen Vertebraten-Rezeptoren von *H. sapiens* und *M. musculus* kann man von einer größeren Strukturähnlichkeit des PeaGB2 zu anderen Invertebraten-GB2 ausgehen. Welche Sequenzbereiche bzw. AS-Reste für die Vorhersage von nur sechs TMs verantwortlich sind, kann nicht genau festgestellt werden. Bei der komplexen Berechnung durch den TMHMM Server v. 2.0 spielen u. a. neben der Hydrophobizität zur Feststellung von TMs auch die Lage der positiv geladenen AS-Reste Arginin und Lysin eine Rolle. Diese befinden sich vorwiegend in cytoplasmatischen Schleifen (Sonnhammer *et al.*, 1998). Die Funktionalität des *Drosophila*-GB2 konnte zweifelsfrei durch Expressionsstudien in HEK293 Zellen bestätigt werden (Mezler *et al.*, 2001). Interessant ist außerdem, dass die Hydropathie der TM3 beider Schaben-GBs relativ gering ist (siehe Abb. 3.1, 3.4). Dies ist für den metabotropen Glutamat-Rezeptor 5 von *R. norvegicus* bekannt und womöglich ein Merkmal der Familie C-GPCRs (Bhave *et al.*, 2003).

#### 4.1.3 Der N-Terminus als Ligandenbindungsdomäne

Bis auf fünf Waisen-Rezeptoren besitzen alle GPCRs der Familie C einen außerordentlich langen N-Terminus. Dieser weist eine relativ große Sequenz-Ähnlichkeit zu bakteriellen periplasmatischen Aminosäure-Bindeproteinen auf (O'Hara *et al.*, 1993) und bildet die orthosterische Bindungsstelle für den Liganden (Kunishima *et al.*, 2000). Die auch als Venusfliegenfallen-Domäne bezeichnete

Bindungsdomäne ist strukturell aus zwei globulären Loben mit drei Gelenkregionen aufgebaut. Jeder Lobus besteht aus alternierenden  $\alpha$ -Helices und  $\beta$ -Faltblatt-Strukturen mit einem zentral positionierten  $\beta$ -Faltblatt (Kunishima *et al.*, 2000; Geng *et al.*, 2012). Besonders relevant für die korrekte Faltung sowie die Stabilität der Bindungsdomäne (Galvez *et al.*, 1999) sind die vier Cystein-Reste, welche auch bei beiden Schaben-Rezeptoren vorhanden sind. Diese AS-Reste führen zur Ausbildung von Disulfidbrücken. Zwei weitere Cystein-Reste, welche bei dem Vertebraten-GB2 zur Ausbildung einer dritten Disulfidbrücke führen, wurden bei *Periplaneta* nicht gefunden. Das deutet auf eine geringe Relevanz dieser Struktur bei der generellen Funktionalität des Rezeptors bzw. Rezeptor-Heterodimers hin.

Mittels Mutationsstudien konnten vor allem bei Vertebraten weitere AS-Reste identifiziert werden, die für die Ligandenbindung wesentlich sind (Galvez *et al.*, 1999, 2000a & 2000b; Übersicht bei: Wellendorph & Bräuner-Osborne, 2009). Der GB1 von *P. americana* besitzt 13 von 17 konservierten AS-Resten (siehe 3.1.3). Weiterhin findet man die konstitutiv substituierten AS-Reste A<sub>139</sub> und T<sub>118</sub>. Die bei Vertebraten konservierten AS-Reste Glutaminsäure und Glycin sind bei *P. americana* durch V<sub>238</sub> und D<sub>334</sub> ersetzt. Ihnen wird eine weniger wichtige Rolle für die Bildung der orthosterischen Bindungsdomäne zugesprochen (Galvez *et al.*, 2000a). Dies bestätigt das Fehlen dieser AS-Reste bei Insekten. Die bei Vertebraten direkt an der GABA-Bindung beteiligten AS-Reste (S<sub>117</sub>, G<sub>138</sub>, S<sub>140</sub> und Y<sub>237</sub>; Geng *et al.*, 2012) liegen auch bei PeaGB1 vollständig vor. Aufgrund der insgesamt großen Übereinstimmung dieser konservierten AS-Reste kann davon ausgegangen werden, dass diese bei *P. americana* ebenfalls an der Bildung der orthosterischen Bindungsdomäne entscheidend beteiligt sind. Für eine abschließende Beurteilung ist jedoch die Durchführung von Mutationsstudien unabdingbar. Die beachtliche Übereinstimmung der für die Rezeptor-Funktion wesentlichen AS-Reste zeigt deutlich die hohe Konservierung innerhalb dieser Rezeptor-Subtypen auf.

PeaGB2 besitzt hingegen nur 4 der 17 konservierten AS-Reste. Darunter befindet sich kein für die GABA-Bindung wesentlicher AS-Rest. Ein fünfter AS-Rest (T<sub>111</sub>) ist konstitutiv substituiert. PeaGB2 ist daher sehr wahrscheinlich nicht in der Lage, GABA zu binden. Diese Annahme deckt sich mit dem Kenntnisstand über orthologe Vertebraten-Rezeptoren, welche ebenfalls keine Ligandenbindungsdomäne besitzen

(Kniazeff *et al.*, 2002; Geng *et al.*, 2012). Dennoch ist die extrazelluläre N-terminale Domäne des GB2 aufgrund der Interaktion mit dem GB1 wesentlich an der Bindung des Liganden beteiligt (Margeta-Mitrovic *et al.*, 2001; Robbins *et al.*, 2001).

#### 4.1.4 Rezeptoraktivierung

Die Dimerisierung der GABA<sub>B</sub>-Rezeptor-Subtypen 1 und 2 ist essentiell für die Bildung eines vollständig funktionsfähigen Rezeptors sowohl bei Vertebraten als auch bei Invertebraten (Kaupmann *et al.*, 1998; White *et al.*, 1998; Kuner *et al.*, 1999; Ng *et al.*, 1999; Mezler *et al.*, 2001). Über den präzisen Ablauf der Aktivierung dieses Heterodimers ist bisher nur wenig bekannt. Die Röntgenstrukturanalysen der Homodimer-bildenden metabotropen Glutamat-Rezeptor-Subtypen 1, 3 und 7 im aktiven Zustand (Kunishima *et al.*, 2000; Tsuchiya *et al.*, 2002; Muto *et al.*, 2007) sowie die Kristallstrukturanalyse der Venusfliegenfallendomänen (VFD) des GB1 und GB2 von *Homo sapiens* (Geng *et al.*, 2012) geben jedoch einen ersten Einblick in den Aktivierungsmechanismus des Rezeptors nach Ligandenbindung.

Für die Aktivierung des G-Proteins interagieren beide Rezeptor-Subtypen über die extrazelluläre Domäne (EZD; Margeta-Mitrovic *et al.*, 2001; Galvez *et al.*, 2001) und die Transmembrandomänen (TMs) miteinander (Schwarz *et al.*, 2000; Monnier *et al.*, 2011). Dies konnte durch Geng *et al.* (2012) für die EZD verifiziert werden. Die in der EZD befindliche VFD des GB1 ist für die Bindung des orthosterischen Liganden zuständig (Maltischek *et al.*, 1999; Galvez *et al.*, 2001). Für die Liganden-Bindung relevante AS-Reste konnten für den GB1 von *Periplaneta* nachgewiesen werden (siehe 4.1.3). Die EZD des GB2 hingegen bindet keinen der bisher bekannten natürlichen Agonisten. Jedoch erhöht allein die Interaktion mit der EZD des GB1, möglicherweise durch die Stabilisierung der offenen Konformation der VFD (Tsuchiya *et al.*, 2002), die Affinität für Agonisten um das Zehnfache (Kaupmann *et al.*, 1998; siehe 4.1.5). Die Affinität des GB1 für bestimmte Antagonisten kann die EZD des GB2 nicht beeinflussen (Geng *et al.*, 2012). Die Bindung von Glutamat führt bei metabotropen Glutamat-Rezeptoren zur Konformationsänderung von einem offenen zu einem geschlossenen Zustand der VFD. Dies konnte jedoch für den GB1

nicht untersucht werden, da die VFD dieses Rezeptors in Abwesenheit des Liganden zur Bildung von Aggregaten neigt.

Durch Mutationsstudien konnten für die Bindung des G-Proteins bedeutende AS-Reste in der intrazellulären Schleife (ICL) 2 und 3 ermittelt werden. Beide Schleifen sind verantwortlich für die Bildung einer Bindungstasche für die  $\alpha$ -Untereinheit des G-Proteins (Wess, 1997). Dies konnte auch für die GB2 von Vertebraten nachgewiesen werden (Robbins *et al.*, 2001; Duthey *et al.*, 2002). Das in der ICL 3 des GB2 lokalisierte Motiv (F/Y/L/I)-N-(E/D)-X-(K/R) ist notwendig für die G-Protein-Aktivierung (Duthey *et al.*, 2002). Es ist erstaunlicherweise sowohl bei dem GB2 als auch dem GB1 der Amerikanischen Großschabe vorhanden. Bei näherer Betrachtung der GB1-AS-Sequenzen von Mensch, Hausmaus und Taufliege findet man auch bei diesen Subtypen das besagte Motiv. Mutationsstudien am GB1 von *Rattus norvegicus* führten jedoch bei gleichzeitiger heterologen Expression mit GB2 zu keiner Änderung der G-Protein-Kopplungseffizienz (Duthey *et al.*, 2002). Möglich ist, dass das Motiv bei GB1/GB2-Heterodimeren maskiert ist, jedoch bei der alleinigen Expression des GB1 exponiert ist. Außerdem könnte der GB1 an weitere  $G_\alpha$ -Untereinheiten bzw.  $G_{\beta\gamma}$ -Untereinheiten binden. Zudem können GPCR-interagierende-Proteine G-Protein-unabhängig Transduktionskaskaden anschalten (Übersicht bei: Luttrell, 2008). So interagiert der GABA<sub>B</sub>-Rezeptor Subtyp 1 auch mit den Transkriptionsfaktoren ATF4 (Creb2) und ATF $\times$  (Nehring *et al.*, 2000; White *et al.*, 2000).

#### 4.1.5 Zelloberflächenexpression

Die Charakterisierung des ersten GABA<sub>B</sub>-Rezeptors durch Kaupmann *et al.* (1997) offenbarte schnell, dass der GABA<sub>B</sub>-Rezeptor 1 im heterologen System alleine nicht in der Lage ist die Plasmamembran zu erreichen und im Endoplasmatischen Retikulum (ER) verbleibt (Couve *et al.*, 1998). Im C-Terminus von Vertebraten-GB1 ist das ER-Retentionssignal RSRR des RxR-Typs lokalisiert (Margeta-Mitrovic *et al.*, 2000; Pagano *et al.*, 2001). Die AS-Reste Serin und das dritte Arginin sind dabei austauschbar. In der abgeleiteten AS-Sequenz des PeaGB1 befindet sich an Position 820 das Motiv RSRK. Ob es sich tatsächlich um ein ER-Retentionssignal handelt,

muss in Mutationsanalysen untersucht werden. Interessanterweise ist bei den GB1 von *D. melanogaster* und *H. virescens* keines der bekannten ER-Retentionsmotive im C-Terminus vorhanden. Möglich ist, dass Invertebraten-GB1 kein solches Motiv besitzen und daher in der Lage sind alleine zur Plasmamembran zu gelangen. Sie könnten jedoch auch ein bisher nicht beschriebenes Motiv besitzen, welches den Verbleib des Rezeptors im ER bewirkt. Das Vorhandensein eines ER-Retentionsmotivs bei PeaGB1 wird u. a. durch die bei dieser Arbeit erhaltenen immunzytochemischen Analysen der PeaGB1/DmGB2-exprimierten flp<sup>TM</sup>-Zelllinie gestützt (siehe 3.4.4). Eine PeaGB1-ähnliche Markierung ist insbesondere im cytoplasmatischen Bereich zu finden. Dagegen ist eine DmGB2-ähnliche Immunreaktivität im Bereich der Plasmamembran sichtbar. Gassmann *et al.* (2005) zeigten, dass die flankierenden AS-Reste sowie die dadurch entstehende Sekundärstruktur entscheidend sind. So führt der AS-Rest Leucin N-terminal des Konsensusmotivs zu einem stärkeren Verbleib des GB1 im ER. Das Vorhandensein eines bei PeaGB1 N-terminal lokalisierten Leucins bestärkt daher die Vermutung, dass es sich bei dem Motiv L<sub>819</sub>RSRK tatsächlich um ein ER-Retentionsmotiv handelt.

Weiterhin muss auch das im C-Terminus des PeaGB2 befindliche Konsensusmotiv R<sub>1066</sub>LRL genannt werden, welches für den möglichen Verbleib des Rezeptors im ER verantwortlich sein kann. Auch hier sind aufklärende Mutationsstudien entscheidend.

Durch die Bildung des GB1/GB2-Heterodimers im ER kommt es bei Vertebraten zur Demaskierung des ER-Retentionsmotivs (Margeta-Mitrovic *et al.*, 2000). Das maskierende Coatamer-Protein COPI wird entfernt und das Heterodimer wird zur Plasmamembran transportiert (Gassmann *et al.*, 2005; Michelsen *et al.*, 2005).

#### 4.1.6 Posttranslationale Modifikationen

Posttranslationale Modifikation von Proteinen haben einen erheblichen Einfluss auf die Aktivität, Stabilität sowie Bindungsaffinität des Proteins. Insbesondere N-Glykosylierungen, Phosphorylierungen und C-Palmitoylierungen sind gut charakterisiert.



N-Glykosylierungen führen zur Anheftung einer Zuckerkette an den AS-Rest Asparagin (Übersicht bei Roth, 2002). PeaGB1 weist sechs, PeaGB2 sogar sieben Konsensussequenzen für N-Glykosylierungen im N-Terminus auf (siehe 3.1.3, 3.2.3). An welches dieser Motive tatsächlich ein Zuckerrest gebunden wird, kann nicht vorhergesagt werden. Jedoch zeigen Western-Blot-Analysen der Membranproteine von *P. americana*-Gehirnen (Abb. 3.9 A) und PeaGB1/DmGB2-transfizierten flpTM-Zellen (Abb. 3.9 B) ein deutlich geringeres Molekulargewicht für PeaGB1 nach der Entfernung von N-Glykosylierungen durch PNGase F-Verdau. Der PeaGB2 ist wahrscheinlich nicht oder nur kaum N-glykosyliert, da kein Unterschied zwischen der unverdauten und verdauten Membranfraktion erkennbar ist (siehe Abb. 3.8). Bei *R. norvegicus* konnte durch Zugabe von PNGase F das Vorhandensein von N-Glykosylierungen bei beiden GABA<sub>B</sub>-Rezeptoren festgestellt werden (Kaupmann *et al.*, 1997; White *et al.*, 1998). N-gebundene Zuckerketten nehmen allgemein Einfluss auf Struktur, Stabilität und Funktion des Proteins (Yan *et al.*, 1999). Kristallstrukturanalysen zeigen, dass N-Glykosylierungen in der VFD des GB2 die Funktion des GB1 nicht beeinflussen (Geng *et al.*, 2012, siehe 4.1.4).

Die Phosphorylierung intrazellulär lokalisierter Serin- und Threonin-Reste ist insbesondere bei der Aktivierung bzw. Inaktivierung der GABA<sub>B</sub>-Rezeptoren von Bedeutung (Übersicht bei: Terunuma *et al.*, 2010). Drei potentielle Phosphorylierungsstellen für die cAMP-abhängige Proteinkinase A (PKA) befinden sich im C-Terminus des PeaGB2. Erstaunlicherweise führen bei den Vertebraten-GB2 PKA-abhängige Phosphorylierungen zu einer höheren Stabilität des GB-Heteromers in der Plasmamembran (Couve *et al.*, 2002). Die GABA<sub>B</sub>-Rezeptor-Phosphorylierung durch die Ca<sup>2+</sup>-abhängige Proteinkinase C (PKC) führt nach der Agonist-Bindung zur Abdissoziation des an den GB1 und GB2 gebundenen *NEM-sensitive factor* (NSF), wodurch der Rezeptor desensibilisiert wird (Pontier *et al.*, 2006). Der PeaGB1 besitzt fünf, der PeaGB2 acht solcher Konsensussequenzen.

Das Anfügen einer Palmitinsäure an einen Cystein-Rest über eine Thioester-Bindung kann zur Verankerung des C-Terminus in der Plasmamembran führen (Qanbar & Bouvier, 2003), wodurch eine weitere intrazelluläre Schleife entsteht. Es sind bis zu drei C-Palmitoylierungen pro Protein möglich. PeaGB1 besitzt eine, PeaGB2 sogar zwei potentielle C-Palmitoylierungsstellen. Auf diese Weise kann bei GPCRs u. a. die

Kopplungseffizienz zwischen GPCR und G-Protein (O'Dowd *et al.*, 1989), der Transport zur Plasmamembran (Ng *et al.*, 1994) sowie die Desensibilisierung und Internalisierung des Rezeptors beeinflusst werden (Ponimaskin *et al.*, 2005).

#### 4.1.7 Phylogenetische Einordnung

Die phylogenetische Analyse der putativen AS-Sequenzen sequenzierter bzw. annotierter Rezeptor-cDNAs zeigt eine eindeutige Gruppierung in die drei GABA<sub>B</sub>-Rezeptor-Subtypen 1, 2 und 3 (Abb. 3.7). Innerhalb der Subtypen 1 und 2 wiederum kommt es zur Separierung von Vertebraten und Arthropoden-GBs. PeaGB1 und PeaGB2 ordnen sich dabei einwandfrei in den jeweiligen Arthropoden-Zweig ein. Der nächste Verwandte ist nicht eindeutig auszumachen. PeaGB1 bildet zusammen mit den GB1 aus Dipteren (u. a. *D. melanogaster*) eine Gruppe. PeaGB2 hingegen ist anscheinend näher verwandt mit dem GB2 der Körperlaus *P. humanis corporis*. Diese Unstimmigkeiten sind wahrscheinlich auf die geringe Probenzahl zurückzuführen, da nur wenige Insekten-GBs charakterisiert bzw. annotiert sind. Die GBs der Hymenopteren *Apis*, *Camponotus* und *Nasonia* bilden ebenso einheitliche Gruppen innerhalb der Subtypen wie die GBs der Dipteren *Aedes*, *Anopheles* und *Drosophila*. Diese phylogenetische Einordnung stimmt mit dem derzeitigen systematischen Kenntnisstand überein (Trautwein *et al.*, 2012). Dafür sprechen auch die zum großen Teil übereinstimmenden Ergebnisse aus den beiden Verfahren *Neighbor-Joining* und *Maximum-Parsimony*.

Phylogenetische Analysen in anderen Arbeiten zeigen, dass die GABA<sub>B</sub>-Rezeptoren eindeutig zur Familie C der GPCRs zugeordnet werden können (Mezler *et al.*, 2001; Mitri *et al.*, 2004; Ahier *et al.*, 2009). Die Entstehung der Familie C erfolgte wahrscheinlich durch drei Genduplikationen (Cao *et al.*, 2009). Vor ~899 Millionen Jahren kam es zur Abspaltung der GB-ähnlichen Rezeptoren (Cao *et al.*, 2009). Der metabotrope Glutamat-Rezeptor entstand durch die zweite Genduplikation vor 638 Mio. Jahren. Vor 573-565 Mio. Jahren kam es zur Aufspaltung der „sensing“-Rezeptoren sowie zur Aufspaltung des GABA<sub>B</sub>-Rezeptors in die Subtypen. Diese durch die Untersuchung der VFD erhaltenen Ergebnisse werden durch die Analyse der Transmembrandomänen durch Pin *et al.* (2004) untermauert und weisen auf eine

frühe Entstehung dieser Rezeptor-Klasse hin. Tatsächlich bestätigen immunzytochemische Untersuchungen das Vorhandensein GB-ähnlicher Rezeptoren bei dem zum Stamm der Porifera gehörenden Kalkschwamm *Leucandra aspera* (Ramoino *et al.*, 2011). Bekannte GB-Agonisten und Antagonisten modulieren die Nahrungsaufnahme beim Kalkschwamm. Für *Trichoplax adhaerens*, die einzige Art des Stamms Placozoa, konnten durch Genomanalysen 85 GPCRs der Familie C identifiziert werden. Darunter befindet sich ein putativer metabotroper Glutamat-Rezeptor (Srivastava *et al.*, 2008). An den Rezeptor Gr1E des Schleimpilzes *Dictyostelium discoideum* kann sowohl GABA als Glutamat binden. Jedoch ist die Affinität für GABA 100-fach höher. Interessanterweise führen die beiden Aminosäuren zu unterschiedlichen Antworten durch die Aktivierung verschiedener G<sub>α</sub>-Proteine. Glutamat wirkt dabei als kompetitiver Inhibitor zu GABA (Anjard & Loomis, 2006). Gr1E ist möglicherweise ein Vertreter der ursprünglichen Familie C-Rezeptoren vor der ersten Genduplikation. Das bekräftigt die Theorie für die früh in der Evolution entstandene Rezeptor-Familie.

## 4.2 PeaGB1-Immunhistochemie

Die Isolierung der GABA<sub>B</sub>-Rezeptor-Subtypen 1 und 2 der Amerikanischen Großschabe machte die Generierung polyklonaler Antikörper gegen den jeweiligen Rezeptor-Subtyp möglich. Der gegen die extrazelluläre Schleife 2 (ECL2) des PeaGB1 gerichtete Antikörper (anti-PeaGB1) kann, durch diverse Analysen bestätigt, als spezifischer Antikörper angesehen werden. Dieser detektiert in der deglykosylierten Membranfraktion des Schabengehirns sowie der PeaGB1/DmGB2-exprimierenden flpTM-Zellen ein circa 75 kDa schweres Protein. Damit liegt es unter dem kalkulierten Molekulargewicht von 94,7 kDa. Für den PeaGB1 wird N-terminal ein Signalpeptid vorhergesagt. Signalpeptide geben den Bestimmungsort des Proteins an und werden nach dem Transport abgespalten (Kaiser *et al.*, 1987). Die Abspaltung würde jedoch nur zu einem geringfügig leichteren Protein führen (91,8 kDa). Möglicherweise ist das Signalpeptid größer als erwartet. Es ist jedoch zu beachten, dass die Größe durch die Ligandenbindungsdomäne im N-Terminus limitiert ist (Galvez *et al.*, 1999; Geng *et al.*, 2012). Zusätzlich können Sekundärstrukturen, welche

teilweise nicht durch die Applikation denaturierender Substanzen aufzulösen sind, das Laufverhalten des Proteins im Polyacrylamid-Gel stark beeinflussen. Dies gilt insbesondere für Interaktionen zwischen Proteinen. Das in Abb. 3.9 B detektierte Protein mit einer Masse von ~250 kDa entspricht ungefähr der Summe von PeaGB1 (94,7 kDa) und DmGB2 (138 kDa). Es kann daher sein, dass der nicht aggregierte PeaGB1 eine andere Konformation besitzt und diese zu einer höheren Laufgeschwindigkeit im Polyacrylamid-Gel führt. In Gewebeproben treten sporadisch drei Proteinbanden unterschiedlicher Größe auf. Diese entsprechen in ihrer Größe dem GB1/GB2-Heterodimer, dem glykosylierten und dem nicht-glykosylierten PeaGB1-Monomer. Diese Annahme wird gestützt durch einen klaren Verlust der Proteindetektion durch die Präadsorption von anti-PeaGB1 durch das Antigen PeaGB1-ECL2. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass es sich bei dem circa 90 kDa und 75 kDa schweren Proteinen um den PeaGB1 und dessen Abbauprodukt handelt.

Der anti-PeaGB2-Antikörper ist sehr wahrscheinlich nicht spezifisch, da er neben einem ~140 kDa schweren Protein ein weiteres kleineres cytosolisches Protein erkennt. Auch hier kann es sich um ein Abbauprodukt des PeaGB2 handeln. Jedoch zeigen u.a. immunhistochemische Experimente mit diesem Antikörper eine diffuse Markierung im nativen Gewebe. Das ~140 kDa schwere Protein ist vermutlich nur gering glykosyliert. Das ist erstaunlich, da insbesondere der lange C-Terminus ausgesprochen geeignet für posttranslationale Modifikationen ist. Es ist allerdings zu berücksichtigen, dass durch PNGase F nur N-Glykosylierungen entfernt werden und daher keine Aussage über weitere mögliche Glykosylierungen des PeaGB2 getroffen werden können.

#### **4.2.1 Die Verteilung der PeaGBs in Organen und Geweben**

Die gewebes- und organspezifische Verteilung beider GABA<sub>B</sub>-Rezeptor-Subtypen der Amerikanischen Großschabe wurden mittels Western-Blot-Analysen untersucht. PeaGB1 wird im Zentralnervensystem (ZNS) der Schabe, sowie in der Speicheldrüse und in den männlichen Geschlechtsdrüsen exprimiert. Dagegen gibt es keine Hinweise auf eine Expression des PeaGB2 in den peripheren Geweben. Dies gilt

ebenfalls für den orthologen *Drosophila*-Rezeptor (Enell *et al.*, 2007). Auch für den GB2 des Menschen ist die mRNA-Expression außerhalb des ZNS sehr gering (Calver *et al.*, 2000). Diese Ungleichverteilung ist unter der Annahme, dass beide Rezeptoren für einen funktionellen Rezeptor essentiell sind (Kaupmann *et al.*, 1998; White *et al.*, 1998; Ng *et al.*, 1999; Mezler *et al.*, 2001), sehr überraschend. Bisher gibt es dafür keine Erklärung (Calver *et al.*, 2000; Bettler *et al.*, 2004). Es ist möglich, dass PeaGB2 unter dem Detektionslimit für Western-Blot-Analysen exprimiert wird. Hierfür spricht die große Ähnlichkeit zwischen dem physiologischen (Rotte, 2009) und dem *in vitro* ermittelten pharmakologischen Profil der GBs (siehe 4.3.3). Bedauerlicherweise kann auch der gegen einen C-terminalen Bereich des *Drosophila*-GB2 gerichtete Antikörper (Hamasaka *et al.*, 2005) aufgrund der fehlenden Ähnlichkeit zum PeaGB2 nicht immunhistochemisch zur Überprüfung dieser Hypothese eingesetzt werden. Möglich wäre die Untersuchung der Transkription des PeaGB2 in den peripheren Geweben mittels quantitativer Echtzeit-PCR (qPCR). In jedem Fall existiert eine Ungleichverteilung der GABA<sub>B</sub>-Rezeptor-Subtypen 1 und 2 in *Periplaneta*. Diese kann u. a. die Oberflächenexpression des Heteromers maßgeblich beeinflussen.

Nachfolgend soll die zelluläre Lokalisation und daraus abgeleitete mögliche Funktion des PeaGB1 in der Speicheldrüse, im Gehirn und in den Geschlechtsdrüsen der Schaben-Männchen diskutiert werden.

#### 4.2.2 Lokalisation des PeaGB1 in der Speicheldrüse

Elektrophysiologische Untersuchungen an Speicheldrüsen von *Periplaneta* zeigten, dass GABA<sub>B</sub>-Rezeptoren mutmaßlich an der Vermittlung der GABAergen Wirkung auf die Speichelsekretion beteiligt sind (Rotte, 2009). Anhand von Speicheldrüsen-Gesamtpräparaten konnte eine ausgeprägte PeaGB1-ähnliche Immunreaktivität in Nervenfasern nachgewiesen werden. Doppelmarkierungen mit anti-GABA zeigen, dass diese Fasern zudem GABAerg sind (siehe Abb. 3.12, 3.13). Die Kolo-kalisation von PeaGB1 und Synapsin bestätigen zudem das Vorkommen des Rezeptors an der Präsynapse. PeaGB1 ist dabei nicht über die gesamte Länge der Faser gleichmäßig verteilt. Vielmehr sind globuläre Strukturen sichtbar, die auf eine Lokalisation des PeaGB1 in Transportvesikeln hindeuten. Die meisten für die Neurotransmission

benötigten Proteine, Lipide und Organellen werden über den anterograden axonalen Transport vom Soma der Nervenzelle in die synaptischen Terminalen befördert.

Aufgrund der Lokalisation von PeaGB1 und GABA in derselben Faser muss es sich bei diesem Neuron um das Speichelneuron 2 (SN2) handeln. Daher kann von einer Autorezeptorfunktion des PeaGB1 ausgegangen werden. Autorezeptoren sind präsynaptisch lokalisiert und beeinflussen u. a. die Ausschüttung des eigenen Neurotransmitters. Diese Funktion von GABA<sub>B</sub>-Rezeptoren ist bei Vertebraten weit verbreitet. Hierbei wird ihnen die Hemmung der Transmitterausschüttung an der Präsynapse als Hauptaufgabe zugeschrieben (Übersichten bei: Raiteri, 2008). So unterdrücken GBs die Ausschüttung von GABA im *Nucleus suprachiasmaticus* und beeinflussen vermutlich so die innere Uhr der Wanderratte (Chen & van den Pol, 1998). Einen weiteren prominenten Einfluss besitzen GB-Autorezeptoren im Hippocampus bei der Langzeit-Potenzierung (LTP). Durch die Hemmung der GABA-Ausschüttung bei hoch-frequenten Stimulierungen kann durch die nun ausbleibende synaptische Inhibition die LTP, vermittelt durch NMDA-Rezeptoren, induziert werden (Davies *et al.*, 1991). Diese inhibierende Wirkung erfolgt vorwiegend durch die Hemmung von Ca<sup>2+</sup>-Kanälen des P/Q- und N-Typs (Doze *et al.*, 1995; Chen & van den Pol, 1998; Sakaba & Neher, 2003). Weiterhin beeinflussen GBs die Vesikel-Rekrutierung zur präsynaptischen Membran (Sakaba & Neher, 2003). Auch die Interaktion von GBs mit G-Protein-aktivierten einwärts-gerichteten K<sup>+</sup>-Kanälen (GIRK-Kanälen) in der Präsynapse ist bekannt und führt zur Unterdrückung der Glutamat-Ausschüttung (Ladera *et al.*, 2008).

In isolierten Speicheldrüsen von *Periplaneta* führt die Badapplikation von GABA sowie potentieller GABA<sub>B</sub>-Rezeptor-Agonisten während der Stimulierung des Speichelgangnervs (SDN) zu einem verstärkten Antwortverhalten der Acinuszellen (Rotte, 2009). Dies führt schließlich zu einer erhöhten Flüssigkeits- sowie Proteinsekretion. Die Zugabe potentieller GABA<sub>B</sub>-Rezeptor-Antagonisten auf einem Hintergrund von GABA bzw. SKF97541 unterdrücken diesen Effekt (Rotte, 2009). Letztlich hat also die SDN-Stimulierung in Kombination mit der GABA-Applikation einen erregenden Effekt auf die Speichelbildung, welcher durch die GABA<sub>B</sub>-Rezeptoren vermittelt wird.

### Doch wie wird dieser postsynaptisch vermittelt?

- ❖ Es wäre zum einen denkbar, dass postsynaptisch zusätzliche GABA-Rezeptoren lokalisiert sind. Die meisten GABA<sub>A</sub>-Rezeptor-Agonisten und -Antagonisten haben auf das Antwortverhalten der Acinuszellen bei SDN-Stimulierung keinen Effekt. Nur der Antagonist Bicucullin (5 µM) verstärkt sowohl bei Ab- als auch bei Anwesenheit von GABA die Zellantwort (Rotte, 2009). Dies ist erstaunlich, da die Antwort gegensätzlich zum Effekt der GB-Antagonisten ist. Daraus ergibt sich, dass dieser Rezeptor nicht den verstärkenden Effekt von GABA vermitteln kann. Möglicherweise werden weitere GABA<sub>A</sub>-Rezeptor-Untereinheiten bzw. andere GABA-Rezeptoren in *Periplaneta* exprimiert, welche eine bisher unbekannte Pharmakologie aufweisen. Im Gegensatz zu der Vielzahl an beschriebenen Untereinheiten und Isoformen bei Vertebraten sind bei Insekten bisher nur drei Isoformen bekannt (Buckingham *et al.*, 2005). Zudem zeigen Arbeiten am Motoneuron und dem Rieseninterneuron 2 von *P. americana*, dass keine Sensitivität der GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren für Bicucullin vorliegt (Sattelle *et al.*, 1988; Buckingham *et al.*, 1994). Elektrophysiologische Untersuchungen an den L-Neuronen der Ocellen von *P. americana* sprechen durch zum Teil gegensätzliche Antworten bei den eingesetzten GABA<sub>A</sub>-Rezeptor-Agonisten ebenfalls für eine von Vertebraten abweichende GABA-Rezeptor-Pharmakologie (Lee *et al.*, 2007). GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren wirken aufgrund eines überwiegenden Cl<sup>-</sup>-Influges nach Aktivierung inhibierend. Es ist also denkbar, dass diese Rezeptoren in der Präsynapse des dopaminergen SN1 lokalisiert sind. Eine Ausschüttung von GABA würde dann, vermittelt über diese Rezeptoren, die Ausschüttung von Dopamin unterdrücken.
- ❖ Eine zweite Möglichkeit ist, dass das SN2 neben GABA weitere Neurotransmitter besitzt. Dadurch könnte der PeaGB neben GABA auch die Ausschüttung eines oder mehrerer weiterer Transmitter beeinflussen. Für das SN2 von *Schistocerca gregaria* ist bekannt, dass es neben GABA auch Serotonin enthält (Watkins & Burrows, 1989). Immunhistochemische Untersuchungen an *Periplaneta*-Speicheldrüsen schließen jedoch die Transmitter Dopamin, Serotonin, Octopamin und Tyramin aus (Baumann *et al.*, 2002; Rotte, 2009). Ein wahrscheinlicher Kandidat ist Glutamat. GABA kann, vermittelt durch Heterorezeptoren, die

Freisetzung des exzitatorischen Neurotransmitters Glutamat unterdrücken (Huston *et al.*, 1990; Vogt & Nicoll, 1999; Vigot *et al.*, 2006). Es ist aber auch die Kolokalisation von Glutamat und GABA innerhalb eines Neurons bekannt (Walker *et al.*, 2001; Kasyanov *et al.*, 2004; Safiulina *et al.*, 2006). Zudem konnten vesikuläre Transporter für beide Neurotransmitter im selben Neuron identifiziert werden (Zander *et al.*, 2010). Bisher ist in unserer Arbeitsgruppe Glutamat in physiologischen Experimenten nicht untersucht worden (persönliche Mitteilung Prof. Dr. O. Baumann).

Es ist auch denkbar, dass das SN2 neben GABA ein Neuropeptid freisetzt. Peptide gelten als die größte Klasse neuroaktiver Moleküle und sind im zentralen Nervensystem von Insekten weit verbreitet (Übersicht bei: Nässel, 2000). Die in der AG von Prof. Dr. Reinhard Predel (Universität zu Köln) durchgeführte massenspektroskopische Analyse der Speicheldrüse auf Neuropeptide führte zu Identifizierung eines Peptids, welches große Ähnlichkeit zum Ionen-Transport-Co-Peptid von *Drosophila* besitzt. Die von mir getesteten Antikörper zeigten sich in ersten Experimenten als wenig geeignet für *P. americana*. Dieses Projekt wurde daher bisher nicht weiterverfolgt. Die Beteiligung eines Neuropeptids an der Speichelbildung ist jedoch denkbar. In der Speicheldrüse könnte die Stimulierung des SDNs zur Freisetzung von GABA und dem exzitatorischen Transmitters führen. Letzterer könnte dann positiv auf serotonerge und evtl. dopaminerge Terminalen wirken.

- ❖ Eine dritte höchstspekulative Variante ist, dass GABA ein bisher unbekanntes Neuron beeinflusst. Dieses müsste jedoch einen inhibierend wirkenden Neurotransmitter synthetisieren. Die Freisetzung von GABA würde dann durch die Aktivierung von GABA-Rezeptoren die Transmitterausschüttung inhibieren. Demzufolge kann dieser seine hemmende Funktion auf die vermutlich serotonergen Fasern nicht ausüben. Es wird mehr Speichelflüssigkeit mit hohem Proteinanteil sezerniert.

Weiterführende Experimente zur Aufklärung des Einflusses von GABA auf die Quantität und Qualität des Speichels von *P. americana* sollten zunächst die Verteilung der ionotropen GABA-Rezeptoren aufzeigen. Bisher gibt es einen polyklonalen Antikörper, welcher gegen die RDL-Untereinheit des GABA<sub>A</sub>-Rezeptors von



*Periplaneta* gerichtet ist (Sattelle *et al.*, 2000). Zudem wären immunhistochemische bzw. elektrophysiologische Untersuchungen zu Vorkommen sowie Wirkung weiterer Neurotransmitter (z.B. Glutamat) in der Speicheldrüse wünschenswert.

### 4.2.3 Lokalisation des PeaGB1 im Gehirn und Suboesophagealganglion

Die zelluläre Verteilung des PeaGB1 im Gehirn von *P. americana* wurde immunhistochemisch an Kryostatschnitten untersucht. Es konnte eine ausgeprägte Expression des Rezeptors in nahezu allen Gehirnneuropilen und im Unterschlundganglion nachgewiesen werden. Demnach kann von einer wesentlichen Beteiligung des PeaGB1 bei der Weitergabe GABAerger Informationen ausgegangen werden. Nachfolgend wird auf die PeaGB1-Lokalisation in den einzelnen Gehirnregionen eingegangen und damit einhergehende mögliche Funktionen diskutiert.

#### Optischer Lobus

Der optische Lobus ist für die Verarbeitung visueller Reize verantwortlich und stark mit dem Protocerebrum verschaltet. Die in der Sehbahn nacheinander geschalteten Neuropile Lamina, Medulla und Lobula weisen eine umfassende PeaGB1-ähnliche Immunreaktivität auf (siehe Abb. 3.16). Besonders zeigen Fasern, welche zwischen den Neuropilen verlaufen, eine starke Rezeptor-ähnliche Markierung auf. GABAerge Fasern befinden sich bei *Periplaneta* im proximalen Bereich der Lamina (Füller *et al.*, 1989) und somit in räumlicher Nähe zu PeaGB1. Die distal der Lamina lokalisierten Fasern exprimieren ebenfalls den PeaGB1. Sie gehören vermutlich zu den Lamina-Monopolarzellen. In der Medulla kommen GABAerge Fasern in den Medulla-Schichten 1, 3, 5, 7 und 9, sowie insbesondere in der zur Medulla orientierten Schicht der Lobula vor (Füller *et al.*, 1989). Für Fasern mit PeaGB1-ähnlicher Markierung ist keine Begrenzung auf Medulla-Schichten zu erkennen. Eine starke PeaGB1-ähnliche Markierung besitzen Fasern im zweiten optischen Chiasma im Bereich der akzessorischen Medulla. Mittels *in situ*-Hybridisierung konnte zudem eine starke Expression des PeaGB2-Transkriptes in der Somarinde des optischen Lobus

festgestellt werden (Blankenburg, 2010). In dieser sind die Zellkörper der Medulla- und Lobulaneurone lokalisiert.

Aufgrund der doch unterschiedlichen Verteilung zwischen GABA und dem GABA<sub>B</sub>-Rezeptor-Subtyp 1 ist vorwiegend von einer postsynaptischen Lokalisation der PeaGBs auszugehen. Eine vergleichbare Lokalisation zu PeaGB1 ist für den *Drosophila*-GB2 beschrieben (Enell *et al.*, 2007). Für die Zentrifugalneurone C2 und C3 konnte eine präsynaptische Lokalisation der GBs nachgewiesen werden (Enell *et al.*, 2007, Kolodziejczyk *et al.*, 2008). Es ist denkbar, dass auch bei *Periplaneta* diese Neurone ebenfalls GBs exprimieren. Insgesamt besitzen 26 Zelltypen in der Lamina der Taufliege den Neurotransmitter GABA (Raghu *et al.*, 2013). Welche Rezeptoren die GABAerge Wirkung vermitteln, ist jedoch bis auf die C2- und C3-Neurone unbekannt. Desweiteren sind u. a. die Lamina-Monopolarzellen L3 und L4 von *Drosophila* GABAerg (Raghu *et al.*, 2013). Diese als Interneurone geltenden Neurone sind mit Photorezeptorzellen verschaltet und ziehen in die Medulla. Es ist möglich, dass der PeaGB1 präsynaptisch in Lamina-Monopolarzellen lokalisiert ist und als Autorezeptor fungiert. Weiterhin lässt die besonders hohe Dichte an PeaGB1 im Übergang zwischen Lamina und Medulla auf eine mögliche Lokalisation des Rezeptors in der akzessorischen Medulla schließen. Dieses Neuropil beinhaltet u. a. die PDF-Neurone (PDF - *pigment dispersing factor*), welche z.B. bei Schaben als circadiane Schrittmacher-Neurone gelten (Stengl & Homberg, 1994). Etwa 25 GABAerge Neurone innervieren die akzessorische Medulla (Petri *et al.*, 2002). Davon senden circa 20 Neurone ihre Axone über den distalen Trakt zur Lamina und sind wahrscheinlich für die Aufnahme des Lichtreizes von Bedeutung (Petri *et al.*, 2002). PeaGB1 könnte die GABAerge Wirkung in diesem Neuropil vermitteln. Das muss jedoch durch weiterführende immunhistochemische Experimente belegt werden.

#### Antennallobus

Im Antennallobus, welcher für die Verarbeitung olfaktorischer Reize zuständig ist, zeigt sich eine weit verbreitete PeaGB1-Expression in den Glomeruli und den umgebenden Fasern. Einige dieser Fasern ziehen zu den Glomeruli, andere

wiederum aus dem Antennallobus heraus. Auch die Expression der PeaGB2-mRNA konnte im Antennallobus nachgewiesen werden (Blankenburg, 2010).

Es ist wahrscheinlich, dass der PeaGB1 in den Projektionsneuronen exprimiert wird, welche die Glomeruli und die Kenyon-Zellen der Pilzkörper miteinander verschalten (Davis, 1993). Die Vielzahl an PeaGB1-markierten Fasern sowie die hohe PeaGB1-ähnliche Immunreaktivität in den Glomeruli deuten zudem auf eine Lokalisation des Rezeptors in den lokalen Interneuronen hin. Für lokale Interneurone von *Periplaneta* und anderen Insektenpezies konnte gezeigt werden, dass sie GABAerg sind (Distler, 1989; Bicker, 1999; Ng *et al.*, 2002; Enell *et al.*, 2007). Die lokalen Interneurone des Typs LNI der Amerikanischen Großschabe enthalten GABA. Einige Projektionsneurone sind ebenfalls GABAerg (Husch *et al.*, 2009). Folglich könnte der PeaGB1 als Autorezeptor die Freisetzung von GABA und weiterer Neurotransmitter an der Präsynapse modulieren (Fusca *et al.*, 2013). Bei *D. melanogaster* wird der GB2 in den GABAergen lokalen Interneuronen und den nachgeschalteten Projektionsneuronen exprimiert (Okada *et al.*, 2009). Die Projektionsneurone der Taufliege können inhibitorische Informationen von lokalen Interneuronen und olfaktorischen Rezeptorneuronen erhalten (ORNs; Wilson & Laurent, 2005). Die GB-vermittelte Inhibition ist dabei Glomeruli- und Duft-abhängig und führt bei der Verarbeitung zu unterschiedlichen raum-zeitlichen Mustern im Antennallobus (Wilson & Laurent, 2005). Diese Daten unterstützen somit die in *Periplaneta* ermittelten Expressionsergebnisse und ihre mögliche Funktion. Die starke PeaGB1-ähnliche Markierung in den Glomeruli lässt auch die PeaGB1-Expression in olfaktorischen Rezeptorneuronen (ORNs) vermuten. Sowohl in den ORNs von *D. melanogaster* als auch *H. virescens* konnte die Expression von GBs nachgewiesen werden (Root *et al.*, 2009; Pregitzer *et al.*, 2013). Bei der Taufliege wirken sie präsynaptisch und unterdrücken die Transmitterausschüttung (Root *et al.*, 2009). In Pheromon-detectierende ORNs konnte eine hohe GB-Expression nachgewiesen werden (Root *et al.*, 2009; Pregitzer *et al.*, 2013). Hier erhöht die präsynaptische Inhibition bei den Fliegenmännchen das Finden geeigneter Partnerinnen (Root *et al.*, 2009). Im Makroglomerulus von Schabenmännchen, welcher Eingänge von Pheromon-detectierenden ORNs erhält (Ernst & Boeckh, 1983), konnte eine starke PeaGB1-ähnliche Immunreaktivität festgestellt werden. Nicht auszuschließen ist auch eine

Lokalisation des PeaGB1 in Gliazellen, wie sie für orthologe Rezeptoren von Vertebraten bekannt ist (Magnaghi *et al.*, 2004; Oka *et al.*, 2006). In umfangreichen immunhistochemische Studien sollte die Lokalisation des PeaGB1 detailliert aufgeklärt werden. Dadurch könnte sich der Einfluss des Rezeptors bei der Verarbeitung olfaktorischer Reize prognostizieren und anschließend physiologisch überprüfen lassen.

### Pilzkörper

Die paarigen Pilzkörper bestehen bei *P. americana* aus ~175.000 intrinsische Kenyon-Zellen und gelten aufgrund einer Vielzahl von Eingängen aus den verschiedenen Gehirnregionen als ein „höheres Verarbeitungszentrum“ von Insekten. Die Beteiligung an Lernvorgängen und der Gedächtnisbildung konnte für dieses Neuropil nachgewiesen werden (Heisenberg, 1998). Die Kenyon-Zellkörper sind peripher um die Kelche lokalisiert. Die Dendriten dieser Neurone bilden die typische Kelchstruktur aus, wohingegen die Axone über den Pedunculus in den  $\alpha$ - bzw.  $\beta$ -Lobus ziehen und sich dort verzweigen (Bicker *et al.*, 1985). Die synaptische Schicht der Kelche zeigt eine ausgesprochen starke PeaGB1-ähnliche Immunreaktivität. Zudem weisen die äußeren Fasern des Pedunculus, welche zu den ersten in der Entwicklung der Pilzkörper gebildeten Kenyon-Zellen gehören (Farris & Strausfeld, 2001), eine PeaGB1-Immunreaktivität auf. Dagegen sind die axonale Schicht des Kelches sowie der  $\beta$ -Lobus fast frei von Markierungen. Es konnte ebenfalls eine hohe Expression des PeaGB2-Transkriptes in den Somata der Kenyon-Zellen nachgewiesen werden (Blankenburg, 2010). In den Kenyon-Zellen der Taufliege konnten ebenfalls GBs lokalisiert werden (Enell *et al.*, 2007).

PeaGB1 könnte in der synaptischen Schicht als postsynaptischer Rezeptor agieren. Die GABAerge Innervierung durch extrinsische Interneurone sind für *Periplaneta* und auch für andere Insektenpezies beschrieben (Bicker *et al.*, 1985; Homberg *et al.*, 1987; Yamazaki *et al.*, 1998). Demnach wären metabotrope Rezeptoren wesentlich an der Verarbeitung GABAerger Eingänge beteiligt. Auch eine präsynaptische Wirkung ist aufgrund der Lokalisation des PeaGB1 in Pedunculus und  $\alpha$ -Lobus denkbar. Jedoch müsste der PeaGB1 dann als Heterorezeptor fungieren, da Kenyon-Zellen nicht GABAerg sind. Die Verteilung des PeaGB1 in den Kenyon-Zellen deutet auf eine

subzelluläre Kompartimentierung des PeaGB1 hin. Diese ist für Vertebraten-GBs bekannt (Vigot *et al.*, 2006; Waldmeier *et al.*, 2008; Biermann *et al.*, 2010), beruht jedoch auf der Existenz von mindestens zwei PeaGB1-Subtypen. Der GB1a besitzt als axonale Signalsequenz die sog. Sushi-Domäne (Biermann *et al.*, 2010). Eine vergleichbare Sequenz sowie Spleißvarianten konnten für die orthologen Rezeptoren von *Periplaneta* und *Drosophila* (Mezler *et al.*, 2001) nicht identifiziert werden. Wie eine unterschiedliche subzelluläre Verteilung bei Invertebraten zustande kommen könnte, bleibt daher ungelöst.

### Zentralkomplex

Der Zentralkomplex ist bei *Periplaneta* an der orientierten Fortbewegung beteiligt (Guo & Ritzmann, 2013). Auch bei anderen Arten, wie der Taufliege oder der Feldgrille, ist ein Einfluss auf die Lokomotion bekannt (Kahsai *et al.*, 2010; Kai & Okada; 2013) Zudem konnte bei anderen Insekten die Integration visueller Informationen, insbesondere die Wahrnehmung von polarisiertem Licht (Heinze & Homberg, 2007), im Zentralkomplex nachgewiesen werden (Barth & Heisenberg, 1997; Joiner & Griffith, 2000).

Der untere und obere Zentralkörper des Zentralkomplexes von *P. americana* besteht aus acht Säulen und ist von einer Vielzahl von PeaGB1-positiv markierten Fasern umgeben bzw. durchzogen. Bei *Drosophila* wurde ebenfalls eine GB2-Lokalisation im oberen und unteren Zentralkörper, sowie in der Protocerebralbrücke festgestellt. Die Noduli hingegen sind GB-frei (Kahsai *et al.*, 2012). GABA konnte ebenfalls vorrangig in dem oberen und unteren Zentralkörper der Taufliege nachgewiesen werden (Kahsai *et al.*, 2012). Bei *Schistocerca gregaria* sind Tangentialneurone, welche die lateralen akzessorischen Loben mit dem Zentralkomplex verbinden, GABAerg (Homberg *et al.*, 1999).

### Suboesophagealganglion (SOG) & Corpora cardiaca

PeaGB1-ähnliche Markierungen konnten in einigen Neuronen des SOG sowie in hoher Dichte in der *Corpora cardiaca* lokalisiert werden. Das SOG ist neben der Steuerung von Bewegungsabläufen an der sensorischen und motorischen Kontrolle der Mundwerkzeuge beteiligt (Rast & Bräunig, 2001; Schaefer & Ritzmann, 2001;

Matsuura *et al.*, 2002). Dazu gehört u. a. die Innervierung der Speicheldrüse. Die immunhistochemische Untersuchung von Speicheldrüsen-Gesamtpräparaten zeigt klar eine PeaGB1-ähnliche Markierungen im Speichelneuron 2 (siehe 4.2.1). Aufgrund der Lokalisation mehrerer PeaGB1-immunreaktiver Neurone im SOG liegt die Vermutung nah, dass GBs bei der Umsetzung der Motorik beteiligt sind. Möglicherweise fungieren sie in diesen Neuronen ebenfalls präsynaptisch, da eine weite Verbreitung des Neurotransmitters GABA im SOG bekannt ist (Blechsmidt *et al.*, 1990).

Die *Corpora cardiaca* gehört zusammen mit der *Corpora allata* zum retrocerebralen Komplex, welche als Hormondrüse fungiert. Die *Corpora cardiaca* werden über die *Nervi corporis cardiaci* von neurosekretorischen Zellen innerviert, deren Zellkörper sich in der *Pars intercerebralis* befinden (Pipa, 1978). Eine geringe GABA-ähnliche Immunreaktivität konnte im retrocerebralen Komplex festgestellt werden (Blechsmidt *et al.*, 1990). Möglicherweise ist der PeaGB1 an der Ausschüttung von Hormonen beteiligt.

#### PeaGB1 und RDL zeigen eine kongruente Verteilung im Nervensystem der Schabe

Die Verteilung der GABA<sub>A</sub>-Rezeptor-Untereinheit RDL ist umfangreich im Gehirn von *P. americana* durch Sattelle und Kollegen (2000) untersucht worden. Der Vergleich der Lokalisation von RDL und PeaGB1 weist auf eine gemeinsame Lokalisation beider Rezeptors in einigen Gehirnneuropilen hin. So kommt RDL in großer Dichte in den Kenyon-Zellen und in den Glomeruli der Antennalloben vor. Weiterhin konnte das Vorkommen von RDL sowohl in der Medulla und der Lobula des optischen Lobus als auch im oberen und unteren Zentralkörper, im SOG und in der *Corpora cardiaca* gezeigt werden (Sattelle *et al.*, 2000). Es konnte hingegen keine Lokalisation von RDL in der Lamina, im Makroglomerulus sowie im Pedunculus und im  $\alpha$ -Lobus nachgewiesen werden. Jedoch kann aufgrund der überwiegend kongruenten Lokalisation von einer gemeinsamen Ausübung der GABA-Wirkung durch GABA<sub>A</sub>- und GABA<sub>B</sub>-Rezeptoren ausgegangen werden. Zweifelfrei ist die postsynaptische Funktion beider Rezeptoren in den Kenyon-Zellen. GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren sind als ionotrope Rezeptoren in der Lage, eine schnelle synaptische Antwort auszulösen, wohingegen GBs erst indirekt über G-Proteine zu einem

spezifischen Antwortverhalten führen. Dieser Umstand in Kombination mit einer möglichen unterschiedlichen Liganden-Sensitivität der Rezeptoren ermöglichen nicht nur eine ausgezeichnete dem Signal angepasste Informationsweitergabe. Es ergibt sich auch eine hohe Variabilität durch die Regulation der Oberflächenexpression. Dieser Umstand kann insbesondere bei einer angepassten Antwort bei Langzeitstimulierungen von Bedeutung sein. Eine Interaktion der Vertebraten-GABA<sub>A</sub>-Rezeptor-Untereinheit  $\gamma 2S$  mit dem GB1 konnte *in vitro* nachgewiesen werden. Diese erhöht die Internalisierungsrate der GBs und ist in der Lage, den GB1 zur Plasmamembran zu transportieren (Balasubramanian *et al.*, 2004). Ein nächstes Ziel sollte daher die Untersuchung der Lokalisation beider GABA-Rezeptoren zueinander sein. Insbesondere ist zu klären, ob sie in denselben Neuronen oder jeweils spezifisch in der Prä- und Postsynapse vorkommen. Letzteres würde auf eine Aufgabenteilung hindeuten. In jedem Fall würde eine gemeinsame Ausübung der Signalweitergabe die Analyse der Funktion einzelner GABA-Rezeptoren erschweren. Dementsprechend muss in diesem Fall eine spezifische Reaktion nach GABA-Ausschüttung immer als kombiniertes Antwortverhalten beider Rezeptoren betrachtet werden.

#### 4.2.4 Lokalisation des PeaGB1 in den akzessorischen Drüsen der Männchen

Die sekretorisch aktiven Zellen der Pilzdrüse und der Phallusdrüse zeigen eine prominente PeaGB1-ähnliche Immunreaktivität. Besonders ausgeprägt ist die Markierung vesikulärer Strukturen im Zellinnern.

Die Pilzdrüse besteht aus den vier Schlauchtypen *Utriculus minores*, *U. intermedia*, *U. majores* und *U. translucentes*. Die Abgrenzung ist jedoch nicht ganz eindeutig, da die Schlauchtypen zum Teil ineinander übergehen (Adiyodi & Adiyodi, 1974). Besonders gut morphologisch untersucht ist der *U. majores*. Dieser zeichnet sich durch einen hohen Anteil an rauem ER und einem prominenten Golgi-Apparat aus, was auf eine hohe Proteinsyntheserate und -exocytose hindeutet (Adiyodi & Adiyodi, 1974). Darüberhinaus besitzt der *U. majores* ein relativ dünnes Epithel und ist von mono-myofibrillärer Muskulatur umgeben (Abb. 3.20; 3.22 A). Letztere ist wahrscheinlich für einen aktiven Export des Sekrets aus dem Drüsenlumen

verantwortlich. Das von den Drüsenzellen basolateral sezernierte sehr proteinhaltige Sekret (Bell & Adiyodi, 1981) wird über den Drüsengang zum *Ductus ejaculatorius* transportiert und bildet dort die innere Schicht der Spermatophore. Spermatophoren dienen als Spermienbehälter und sind insgesamt von drei Schichten umgeben (Gupta, 1946). Ob es sich bei dem Drüsentyp um ein Synzytium handelt, ist nicht bekannt.

Die Phallusdrüse lässt sich anhand der sphärischen Zellkerne in den sekretorisch aktiven Zellen, sowie den schmalen epidermalen Zellen identifizieren (Abb.3.21; 3.22 B). Das Sekret der Phallusdrüse, welches nur wenig Protein enthält, wird über einen eigenen Gang nach außen transportiert und bildet während der Kopulation die äußere dritte Schicht der Spermatophore (Bell & Adiyodi, 1981). Sie dient wahrscheinlich u. a. der richtigen Positionierung der Spermatophore in der Genitalkammer des Weibchens (Adiyodi & Adiyodi, 1974). Über die neuronale Kontrolle der akzessorischen Drüsen von männlichen Schaben ist nur wenig bekannt. Sie werden durch die im Terminalganglion entspringenden Nerven 5C und 6 innerviert (Pipa, 1988). Der Nerv 5C1, welcher den *D. ejaculatorius* und die Pilzdrüse innerviert, besitzt octopaminerge Fasern (Sinakevitch *et al.*, 1994). Die Funktion ist bisher unbekannt. Gäde *et al.* (2008) identifizierten die Expression eines Allatostatin-Rezeptors in den akzessorischen Drüsen von *P. americana*. Weitere mögliche Kandidaten für die neuronale Kontrolle sind das Juvenilhormon sowie Ecdyson (Bell & Adiyodi, 1981; Hentze *et al.*, 2013). Aufgrund PeaGB1-ähnlicher Markierungen wäre es möglich, dass die akzessorischen Drüsen GABAerg innerviert werden. Dafür spricht auch das Vorkommen dorsomedial lokalisierter Neurone im Terminalganglion, welche eine GABA-ähnliche Immunreaktivität aufweisen (Sinakevitch *et al.*, 1996). Die Neurone lassen sich durch verhältnismäßig kleine Somata von einem Durchmesser von 10-20 µm identifizieren. Jedoch spricht die Lokalisation des PeaGB1 in der Phallusdrüse nicht für eine GABAerge Innervierung. Neben den vesikulären Strukturen ist im *U. majores* auch im Bereich der basolateralen Membran eine Markierung erkennbar. Zudem ist partiell das Drüsenlumen GB1-immunreaktiv (vgl. Abb 3.20). Möglicherweise wird der PeaGB1 in das Lumen der Drüse sezerniert, was auf eine völlig unbekannte Funktion des PeaGB1 in den akzessorischen Drüsen der Schabemännchen hindeutet. Um die



Funktion aufzuklären, sollten durch immunhistochemische Experimente an Drüsen-Gesamtpräparaten sowie durch physiologische Experimente eine mögliche GABAerge Innervation der akzessorischen Drüsen untersucht werden. Weiterhin ist eine biochemische Untersuchung der Drüsensekrete sinnvoll.

### **4.3 Funktionelle Charakterisierung des GB1/GB2-Heterodimers**

Das HEK293-Expressionssystem stellt eine etablierte Methode für die Untersuchung der Funktionalität von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren und ihrer pharmakologischen Eigenschaften dar (Blenau *et al.*, 1998; 2000; Grohmann *et al.*, 2003; Rotte *et al.*, 2009; Troppmann *et al.*, 2010; Thamm *et al.*, 2010; Hoff *et al.*, 2011; Röser *et al.*, 2012). In Kooperation mit Prof. Dr. Arnd Baumann (Forschungszentrum Jülich) wurden die Expressionskonstrukte pcDNA-*PeaGB1* und pcDNA-*PeaGB2* sowie pcDNA-*PeaGB1* und pcDNA-*DmGB2* stabil in das Genom von HEK-flpTM-Zellen integriert. Die Expression konnte durch Western-Blot-Analysen sowie durch immunzytochemische Untersuchungen nachgewiesen werden.

#### **4.3.1 Das PeaGB1/PeaGB2-Heteromer ist ein funktioneller GABA<sub>B</sub>-Rezeptor**

Die bioinformatische Analyse von PeaGB1 und PeaGB2 zeigt eine eindeutige Zugehörigkeit dieser Rezeptoren zu den GABA<sub>B</sub>-Rezeptoren auf. Vertebraten- und Invertebraten-GBs sind durch die Interaktion mit G<sub>i</sub>-Proteinen u. a. negativ an Adenylzyklasen (ACs) gekoppelt (Übersicht bei: Padgett & Slesinger, 2010). In flpTM-Zellen kann die  $\Delta[\text{cAMP}]_i$  indirekt über die  $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$  mittels Ca<sup>2+</sup>-Fluorometrie gemessen werden. Die Applikation ansteigender GABA-Konzentrationen führt bei den PeaGB1/PeaGB2-exprimierenden flpTM-Zellen zur Erniedrigung der NKH477-induzierten cAMP-Produktion auf bis zu 40% (siehe 3.24). Vergleichbare Ergebnisse sind sowohl für GBs von *Drosophila* als auch für Vertebraten-GBs bekannt (Mezler *et al.*, 2001; Ng *et al.*, 1999). Die nicht-vollständige Inhibierung ist auf die Expression diverser ACs zurückzuführen, die sich jedoch nicht alle durch G<sub>i</sub>-Proteine inhibieren

lassen. Die relative effektive Konzentration  $EC_{50}$  liegt für GABA bei 84,53 nM. Ein vergleichbarer  $EC_{50}$ -Wert von 20 nM GABA ist für das GB1/GB2-Heteromere von Vertebraten bekannt (Bettler *et al.*, 2002). Dagegen liegt der  $EC_{50}$ -Wert des Drosophila-GB1/GB2-Heteromers im mikromolaren Bereich (20  $\mu$ M; Mezler *et al.*, 2001). Entfernt man extrazellulär  $Ca^{2+}$ , so führt die Zugabe unterschiedlicher GABA-Konzentrationen zu keiner Änderung der  $[cAMP]_i$ . Daher ist davon auszugehen, dass GB1/GB2-Heteromere von *P. americana* nicht an den  $IP_3/Ca^{2+}$ -Signalweg gekoppelt sind.

Sowohl nicht-transfizierte als auch nur mit PeaGB1-transfizierte flpTM-Zelllinien zeigen bei steigenden GABA-Konzentrationen eine 15%ige Abnahme der  $[cAMP]_i$ . Diese geringe Abnahme in den Kontroll-Zelllinien ist im Vergleich zu der 60%igen Abnahme der  $[cAMP]_i$  der doppelt-transfizierten flpTM-Zelllinie vernachlässigbar. Es kann daher angenommen werden, dass das PeaGB1/PeaGB2-Heteromer ein funktioneller Rezeptor ist. Eine umfangreiche pharmakologische Charakterisierung dieses Rezeptor-Heteromers ist nun möglich.

### 4.3.2 Pharmakologische Untersuchung des GB1/GB2-Heteromers

Für die Untersuchung des pharmakologischen Profils des PeaGB-Heteromers wurden zum einen Substanzen verwendet, welche bei *Drosophila*- bzw. Vertebraten-GBs die Wirkung von GABA imitieren, d. h. das Rezeptor-Heteromer in seiner aktiven Form stabilisiert (Agonisten). Zum Anderen wurden Stoffe genutzt, die die GABA-Wirkung aufheben (Antagonisten). Für die vergleichende Analyse wurden insbesondere die Arbeiten von Mezler *et al.* (2001), Bettler *et al.* (2002) und Froestl (2010) herangezogen.

#### Agonisten

**SKF97541** (3-APMPA) führt wie GABA zu einer 60%igen Reduktion der NKH477-induzierten  $[cAMP]_i$  und kann daher als vollwertiger Agonist der GB1/GB2-Heteromere von *P. americana* betrachtet werden. Weiterhin besitzt SKF97541 im Vergleich zu GABA eine geringfügig höhere Wirksamkeit. Die GB-Heteromere von Vertebraten zeigen eine vergleichbare Wirksamkeit für SKF97541 (Froestl *et al.*, 2010;

siehe Tab. 4.1). Interessanterweise ist das GB1/GB2-Heteromer der Taufliege ~620-fach weniger wirksam für SKF97541 (Mezler *et al.*, 2001). **3-APPA** ist ein partieller Agonist und ist nur geringfügig weniger wirksam als SKF97541. Für *D. melanogaster* sind bisher keine EC<sub>50</sub>-Werte bekannt. Bei Säugetieren ist 3-APPA hingegen der affinste Agonist (Froestl, 2010). Für **Baclofen** lassen sich keine EC<sub>50</sub>-Werte berechnen, da keine Sättigung der Baclofen-Wirkung erreicht werden konnte. Vermutlich ist Baclofen wesentlich weniger wirksam für das GB-Heteromer als SKF97541. Bei *Drosophila* zeigt Baclofen keine Wirkung (Mezler *et al.*, 2001). Für Vertebraten wiederum ist ein EC<sub>50</sub>-Wert von 35 nM für racemisches Baclofen beschrieben (Froestl, 2010). Baclofen wurde bereits 1962 als GABA-Analogon synthetisiert und ist der derzeit bedeutendste Agonist der Vertebraten-GB-Heteromere mit hoher klinischer Relevanz: Baclofen wird u. a. bei Tetanus, bei der Reduktion des Verlangens nach Alkohol, Nikotin und Kokain sowie als Muskelrelaxanz bei Spastizität durch Multiple Sklerose eingesetzt (Santos *et al.*, 2004; Brar *et al.*, 1991; Addolorato *et al.*, 2007, 2011; Cousins *et al.*, 2002; Haney *et al.*, 2006; Franklin *et al.*, 2009). Die  $\gamma$ -Hydroxybuttersäure (**GHB**), welche eine hohe strukturelle Ähnlichkeit für GABA aufweist, besitzt keinerlei Effekt auf das Schaben-GB-Heteromer bei Konzentrationen bis 1 mM. Die  $\Delta$ [cAMP]<sub>i</sub> wurde für Konzentrationen >10<sup>-4</sup> M nicht gemessen. GHB ist bei Vertebraten nur ein partieller Agonist und besitzt bei *R. norvegicus* einen EC<sub>50</sub>-Wert von 5 mM GHB (Lingenhoehl *et al.*, 1999). Erstaunlicherweise unterscheidet sich das pharmakologische Profil der Agonisten des PeaGB1/PeaGB2-Heteromers weniger von dem Profil der Säugetier-GBs, jedoch erheblich von den bisher erhobenen Werten für die GBs der Taufliege. Das spricht für grundlegende Unterschiede in der Struktur der Ligandenbindungsdomäne der GBs von *Periplaneta* und *Drosophila*.

### Antagonisten

**CGP52432** zeigt aufgrund des IC<sub>50</sub>-Wertes im mikromolaren Bereich im Vergleich zu allen untersuchten Antagonisten die geringste Wirksamkeit für das GB1/GB2-Heteromer von *P. americana*. Das GB1/GB2-Heteromer von Säugetieren ist CGP52432 um das ~420-fache wirksamer (Tab. 4.1; Froestl, 2010). Für das *D. melanogaster* hat CGP52432 hingegen keine Wirkung (Mezler *et al.*, 2001).

Substanz	EC <sub>50</sub> /IC <sub>50</sub> -Wert			
	<i>P. americana</i>	PeaGB1/DmGB2	<i>D. melanogaster</i>	Mammalia
GABA	84,53 nM	17,87 nM	20 µM	20 nM
<u>Agonisten</u>				
3-APPA	88,71 nM	110 nM	?	5 nM
SKF97541	65,01 nM	91,25 nM	40 µM	16 nM
(±)-Baclofen	nicht bestimmbar	nicht bestimmbar	-	35 nM
GHB	-	-	?	5 mM
<u>Antagonisten</u>				
CGP52432	23,3 µM	12,6 µM	-	0,055 µM
CGP54626	730 nM	1570 nM	500 nM	4 nM
CGP55845	980 nM	950 nM	500 nM	6 nM
Picrotoxin	-	-	-	-
Bicucillin	-	-	-	-

Tab. 4.1: Pharmakologische Charakteristika der GB1/GB2-Heteromere von *P. americana*, PeaGB1/DmGB2, *D. melanogaster* und Mammalia. Angegeben sind die EC<sub>50</sub>-Werte der Agonisten und IC<sub>50</sub>-Werte der Antagonisten der in dieser Arbeit getesteten Substanzen sowie die bekannten mittleren effektiven/inhibierenden Konzentrationen für GB-Heteromere von *D. melanogaster* und Mammalia (Mezler *et al.*, 2001; Froestl, 2010). - keine Wirkung; ? nicht untersucht

Die ebenfalls bei Wirbeltieren hoch-wirksamen Substanzen **CGP54626** und **CGP55845** zeigen eine 160-180-fach höhere Wirksamkeit für das GB-Heteromer der Amerikanischen Großschabe. Auch bei *Drosophila* sind höhere IC<sub>50</sub>-Werte ermittelt worden (Mezler *et al.*, 2001). CGP52432 und CGP54626 sind vollwertige Antagonisten, da sie die GABA-induzierte Inhibierung der AC vollständig aufheben. CGP54626 zeigt im Vergleich zu den anderen getesteten Substanzen die beste antagonistische Wirkung auf das PeaGB1/PeaGB2-Heteromer *in vitro*. Daher ist dieser Antagonist am ehesten für die Untersuchung physiologischer Fragestellungen einsetzbar. Die ermittelten IC<sub>50</sub>-Werte zeigen jedoch, dass es für Insekten bisher keine hoch-affine Antagonisten gibt. Andere bisher im Säugetiersystem hochwirksame Antagonisten, wie CGP56999A und CGP62349 (IC<sub>50</sub>-Wert 2 nM) standen für diese Untersuchung nicht zur Verfügung. Die bei Vertebraten bekannten GABA<sub>A</sub>-

Rezeptor-Antagonisten zeigen keine antagonistische Wirkung auf die GB1/GB2-exprimierenden flpTM-Zellen.

Die pharmakologische Wirkung der Antagonisten ist für die *Periplaneta*- und *Drosophila*-GB-Heteromere *in vitro* sehr ähnlich. Dieser Umstand ist durchaus überraschend, da die pharmakologischen Profile der Amerikanischen Großschabe und der Säugetiere für die jeweiligen Agonisten eine höhere Ähnlichkeit zueinander aufweisen. Die unterschiedliche Sensitivität von GABA<sub>B</sub>-Rezeptoren für verschiedene Substanzen der bisher untersuchten Arten zeigt, dass die pharmakologischen Profile von GBs sehr verschiedenartig und daher nicht innerhalb der Insektenordnung übertragbar sind. Dieser Umstand macht die GBs als potentielle Zielproteine für die Herstellung Arten-spezifischer Insektizide sehr attraktiv. Für die bessere Beurteilung der Eignung dieser Rezeptoren ist jedoch die pharmakologische Charakterisierung von GABA<sub>B</sub>-Rezeptoren weiterer Insekten sowie anderer Tierstämme von Nöten.

#### Der GB2 beeinflusst das pharmakologische Profil des GB1/GB2-Heteromers

Für die Untersuchung des Einflusses des GABA<sub>B</sub>-Rezeptor-Subtyps 2 auf die Wirksamkeit von GB-Liganden wurde das pharmakologische Profil einer zweiten flpTM-Zelllinie untersucht, welche neben PeaGB1 den GB2 von *D. melanogaster* (DmGB2) heterolog exprimiert. Das chimäre Rezeptor-Heteromer zeigt bei ansteigenden GABA-Konzentrationen eine Abnahme der [cAMP]<sub>i</sub> und kann daher als funktionell angesehen werden. Der Vergleich der ermittelten EC<sub>50</sub>-Werte zwischen der PeaGB1/GB2- und der PeaGB1/DmGB2-exprimierenden Zelllinie zeigt eine vierfach höhere Wirksamkeit von **GABA** für das PeaGB1/DmGB2-Heteromer auf (siehe Tab. 4.1). Die Effizienz in Bezug auf die Hemmung der AC ist bei dieser Zelllinie um 5% geringer. Die untersuchten **Agonisten** haben eine ähnliche Wirkung auf beide doppelt-transfizierten Zelllinien. Allerdings fällt die Hemmung der AC bei den PeaGB1/DmGB2-transfizierten flpTM-Zellen geringer aus. So reduziert SKF97541 bei dieser Zelllinie die [cAMP]<sub>i</sub> nur um circa 30%. Bei den PeaGB1/GB2-exprimierenden Zellen erfolgt eine Reduktion der [cAMP]<sub>i</sub> um ~60%. Die **Antagonisten** CGP52432 und CGP54626 besitzen in Bezug auf die GABA-induzierte AC-Hemmung eine höhere antagonistische Wirkung auf das chimäre GB-Heteromer.

Dagegen unterscheidet sich die Potenz der Antagonisten bei den beiden Zelllinien (Vgl. Tab. 4.1). Der DmGB2 in Kombination mit dem PeaGB1 *in vitro* besitzt eine höhere Sensitivität für CGP52432, jedoch eine zweifach geringere Sensitivität für CGP54626 im Vergleich zu dem heterolog exprimierten PeaGB1/PeaGB2. Die Ergebnisse der pharmakologischen Untersuchung zeigen, dass der GB2 die Ligandenbindung beeinflussen kann. Die in dieser Arbeit ermittelten  $EC_{50}/IC_{50}$ -Werte im Vergleich zu den in *Xenopus*-Oozyten ermittelten mittleren effektiven bzw. inhibierenden Konzentrationen für das GB1/GB2-Heteromer der Taufliege zeigen aber, dass die Substanzwirkung im Wesentlichen durch den GB1 bestimmt wird.

Wie lassen sich aber Unterschiede in der Wirksamkeit der Liganden durch den Austausch des PeaGB2 erklären?

Beide Subtypen müssen für die Rezeptoraktivierung über die EZD und die sieben TMs miteinander interagieren (siehe 4.1.4). Daher sind unterschiedliche AS-Reste in diesem Bereich verantwortlich für die modulierende Funktion des GB2. Die Identität/Ähnlichkeit für die EZD und die TMs sind zwischen dem PeaGB2 und DmGB2 sehr hoch und liegen bei 70%/82%. Am stärksten unterscheiden sich beide Rezeptorproteine in ihrem N-terminalen Bereich (siehe Abb. 3.6). Unterschiede in der AS-Abfolge können u. a. auch die Sekundärstruktur des Rezeptor-Subtyps beeinflussen. Im Bereich der EZD kann durch die veränderte Sekundärstruktur und die damit einhergehende modulierte GB1/GB2-Interaktion die Sensitivität des GB1 für den Liganden verändert werden. Auch die Interaktion zwischen den Subtypen nach der Bindung kann verändert sein. So zeigten Geng *et al.* (2012), dass die EZDs je nach Ligand unterschiedlich stark miteinander interagieren. Auch eine Modulation der Kopplungseffizienz an das G-Protein ist denkbar. Ähnliches gilt für die direkte Interaktion beider GBs miteinander über AS-Reste. Bei Vertebraten ist der AS-Rest Y<sub>118</sub> maßgeblich an der Interaktion der EZDs beteiligt (Geng *et al.*, 2012). Dieser AS-Rest ist sowohl bei *P. americana* als auch bei *D. melanogaster* konservativ zu Phenylalanin substituiert und ist daher vermutlich nicht an der modulierenden Wirkung des GB2 beteiligt sein. Weiterhin können andere AS-Reste an der Interaktion der EZDs miteinander beteiligt sein. Dies lässt sich durch Mutationsstudien klären. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass der GB2

maßgeblich an der Rezeptoraktivierung beteiligt ist und diese modulieren kann. Jedoch kann er durch einen orthologen Rezeptor ohne den Verlust der Rezeptoraktivierung ausgetauscht werden. So ist auch ein chimäres GB-Heteromer, bestehend aus dem GB1 der Wanderratte und dem GB2 der Taufliege, funktional (Dupuis *et al.*, 2006). Es ist davon auszugehen, dass entweder weitere AS-Reste für die Interaktion konserviert sind und/oder nur die Sekundärstruktur für die Aktivierung notwendig ist.

### 4.3.3 Vergleich des pharmakologischen Profils des PeaGB1/PeaGB2-Heteromers mit der *in vivo*-Pharmakologie

Bereits 1991 wurde die Existenz von GABA<sub>B</sub>-Rezeptoren in der Amerikanischen Großschabe vermutet (Hue, 1991). Es gibt jedoch bis dato nur vereinzelte physiologische Arbeiten zu diesen Rezeptoren. Cathleen Rotte untersuchte in ihrer Doktorarbeit (Rotte, 2009) den Einfluss einiger bei Mammalia und *Drosophila* bekannter GABA-Rezeptor-Agonisten bzw. -Antagonisten, um den Einfluss von GABA auf die Speichelsekretion aufzuklären. Die Applikation der GB-Agonisten SKF97541 (5 µM) und Baclofen (1 mM) verstärken die ausgelöste elektrische Antwort der Acinuszellen durch gleichzeitige Stimulierung des Speichelgangnervs (SDN) (Rotte *et al.*, 2009). Die verwendete Konzentration von SKF97541 ist etwa 60-fach höher als der ermittelte EC<sub>50</sub>-Werte bei der PeaGB1/PeaGB2-transfizierten Zelllinie. In der vorliegenden Arbeit konnte die mittlere effektive Konzentration von Baclofen aufgrund von Löslichkeitsproblemen nicht ermittelt werden (siehe 4.3.2 Agonisten). Es ist aber davon auszugehen, dass der EC<sub>50</sub>-Wert *in vitro* ebenfalls niedriger ist als 1 mM Baclofen (Rotte *et al.*, 2009). Sattelle *et al.* (1988) konnte hingegen mittels Voltage-Clamp-Messungen am Zellkörper eines Motorneurons von *P. americana* keine Wirkung von Baclofen feststellen. Der *in vivo* ermittelte EC<sub>50</sub>-Wert von 22 µM 3-APPA (Bai & Sattelle, 1995) ist 250-fach höher als der *in vitro* ermittelte Wert. Somit zeigen die GBs von *P. americana* im nativen Gewebe eine geringere Sensitivität für die hier getesteten Agonisten. Die Antagonisten CGP52432 und CGP54626 unterdrücken bei einer Konzentration von jeweils 5 µM die GABA-induzierte Amplitudenverstärkung in der Speicheldrüse (Rotte *et al.*, 2009). Demnach ist die Konzentration

von CGP54626 geringfügig höher als der in der pharmakologischen Charakterisierung ermittelte  $IC_{50}$ -Wert ( $0,73 \mu M$ ). Die verwendete Konzentration von CGP52432 ist nur etwa 5-fach niedriger als der im heterologen Zellsystem ermittelte  $IC_{50}$ -Wert. Demzufolge sind die *in vitro* gemessenen Werte der Antagonisten gut auf die GBs *in vivo* übertragbar. Der GB-Antagonist CGP55845 ist bisher für physiologische Messungen nicht verwendet worden. Die  $GABA_A$ -Rezeptor-Antagonisten Bicucullin und Picrotoxin haben im heterologen Zellsystem keinerlei Wirkung auf die PeaGBs. Daher wird der Amplituden-verstärkende Effekt des Antagonisten Bicucullin (Rotte *et al.*, 2009) in der Speicheldrüse von *Periplaneta* höchstwahrscheinlich durch  $GABA_A$ -Rezeptoren vermittelt.

Unterschiede in der Wirksamkeit von Liganden für den entsprechenden Rezeptor können durch diverse posttranslationale Modifikationen hervorgehen (siehe 4.1.6). Desweiteren können unterschiedliche Expressionslevel sowie Kopplungseffizienzen für unterschiedliche  $EC_{50}/IC_{50}$ -Werte verantwortlich sein. Neuere Arbeiten zeigen sowohl im heterologen System als auch *in vivo*, dass sich die GB-Heterodimere an der Zelloberfläche zu höhermolekularen Proteinkomplexen zusammenlagern können (Maurel *et al.*, 2008; Comps-Agrar *et al.*, 2011; Comps-Agrar *et al.*, 2012). Aufgrund der nachgewiesenen Interaktion über die VFD der  $GABA_B$ -Rezeptor Subtypen 1 vermutet man derzeit die Bildung von Tetrameren aus zwei GB-Heterodimeren. Die im heterologen Zellsystem relativ stabilen Oligomere besitzen im Gegensatz zum einfachen GB-Heterodimer eine verminderte Kopplungseffizienz zum G-Protein. Somit ist es möglich, dass die Affinität gleich ist, jedoch nicht die Kopplungseffizienz. Die Assoziation bzw. Dissoziation von GB-Heterodimeren ist folglich eine weitere effektive Möglichkeit der Signalmodulation.

Zudem ist bekannt, dass die Wirkung eines Liganden für einen Rezeptor innerhalb eines Organismus in Abhängigkeit von seiner Lokalisation unterschiedlich sein kann. So wurden bei Vertebraten abhängig von der prä- und postsynaptischen Lokalisation des GB-Heteromers unterschiedliche  $EC_{50}/IC_{50}$ -Werte ermittelt (Bowery 1993). Baclofen besitzt z. B. eine höhere Affinität für präsynaptische GB-Heteromere (Cruz *et al.*, 2004). Präsynaptisch lokalisierte GB-Heteromere können sowohl als Auto- oder als Heterorezeptor fungieren. Auch hier gibt es abhängig von der Zelloberflächenexpression Unterschiede im pharmakologischen Profil des GB1/GB2-



Heteromers (Yu *et al.*, 1999). Der Agonist CGP44533 besitzt im dorsolateralen septalen Nukleus der Ratte eine ~25-fach höhere Affinität für GBs, die in der glutamatergen Synapse lokalisiert sind, als für GBs in der GABAergen Synapse. Im Gegensatz dazu konnten Waldmeier und Kollegen (1994) in der Wirksamkeit von Agonisten und Antagonisten keine Unterschiede zwischen prä- und postsynaptisch lokalisierten GB-Heteromeren im Cortex der Ratte feststellen. Eine mögliche Ursache für die unterschiedliche Ligandenspezifität ist eine bei Säugetieren unterschiedliche Verteilung der GABA<sub>B</sub>-Rezeptor Subtypen 1a und 1b (Vigot *et al.*, 2006; Waldmeier *et al.*, 2008; Biermann *et al.*, 2010). So befindet sich GB1a im Gegensatz zu GB1b in glutamatergen Synapsen und an der Basis von dendritischen Fortsätzen (Waldmeier *et al.*, 2008). Weiterhin fungieren die Sushi-Domänen des GB1a als Signaldomäne für den axonalen Transport (Biermann *et al.*, 2010). Somit kann der GB2 nur in Kombination mit dem GB1a axonal transportiert werden. GB1b hingegen findet man bevorzugt an der Spitze dendritischer Fortsätze (Waldmeier *et al.*, 2008). Die Expression weiterer GB1-Spleißvarianten ist bei Vertebraten bekannt (Isomoto *et al.*, 1998; Martin *et al.*, 2001). Für den PeaGB1 konnten keine Spleißvarianten identifiziert werden. Das gilt analog auch für den *Drosophila*-GB1 (Mezler *et al.*, 2001). Jedoch ist ein weiterer GABA<sub>B</sub>-Rezeptor Subtyp bei der Taufliege identifiziert worden (DmGB3; Mezler *et al.*, 2001). Die Funktion des GB3 ist bisher unbekannt. Der Versuch zur Identifizierung eines putativen GB3 bei *P. americana* wurde nicht unternommen. Vertebraten-GBs können *in vitro* mit der  $\gamma$ 2S-UE von GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren interagieren (Balasubramanian *et al.*, 2004). Diese Interaktion hat zwar keinerlei Wirkung auf die Affinität des Liganden, erhöht aber die Internalisierungsrate (Balasubramanian *et al.*, 2004).

Welche der diskutierten Modulierungsmöglichkeiten bei *Periplaneta* tatsächlich eine Rolle spielen kann nur gemutmaßt werden. Neben den posttranslationalen Modifikationen ist auch die Bindung weiterer Proteine an GBs, welche über Konformationsänderung zu einer veränderten Ligandenbindung bzw. Kopplungseffizienz führen kann, sehr wahrscheinlich. Als molekulares Ziel solcher Interaktionen könnte sich der extrem lange C-Terminus des PeaGB2 eignen, dessen Funktion bislang unbekannt ist.

Zusammenfassend lässt sich bestätigen, dass bisher physiologisch als GB-Liganden verwendete Substanzen tatsächlich Agonisten bzw. Antagonisten des GB-Heteromers der Amerikanischen Großschabe sind. Die in dieser Arbeit erhaltenen pharmakologischen Eigenschaften des Rezeptors ermöglichen nun die Anwendung geeigneter Substanzkonzentrationen für zukünftige physiologische Untersuchungen. Der verstärkende Einfluss von GABA auf das Antwortverhalten von Acinuszellen nach SDN-Stimulierung (Rotte, 2009) kann somit tatsächlich auf die Anwesenheit und Beteiligung der GABA<sub>B</sub>-Rezeptor-Subtypen 1 und 2 zurückgeführt werden.

#### **4.4 Ausblick**

In der vorliegenden Arbeit ist es gelungen zwei GABA<sub>B</sub>-Rezeptor-Subtypen (GBs) der Amerikanischen Großschabe zu charakterisieren. Da bislang nur die vollständigen cDNAs der GBs von *D. melanogaster* kloniert worden sind (Mezler *et al.*, 2001), erweitert diese Arbeit erheblich den Kenntnisstand über den molekularen Aufbau und die Eigenschaften von metabotropen GABA-Rezeptoren bei Insekten. Zudem können das pharmakologische Profil des GB-Heteromers und die Lokalisation des PeaGB1 in verschiedenen nativen Geweben für zukünftige umfassende pharmakologische, physiologische und immunhistochemische Untersuchungen zur GABA-Transmission in Insekten dienen.

Zukünftig sollte untersucht werden, ob weitere GABA<sub>B</sub>-Rezeptor-Subtypen in *P. americana* exprimiert werden und welche Funktionen diese besitzen. Nach der Veröffentlichung der *Periplaneta* EST-Datenbank wäre es möglich, diese nach DmGB3-ähnlichen Fragmenten zu durchsuchen. Auch die Suche nach GABA<sub>A</sub>-Rezeptor-Untereinheiten erscheint sinnvoll.

Zudem sollte geklärt werden, wie die beiden Subtypen in Insekten miteinander interagieren. Trotz der hohen Ähnlichkeit dieser Rezeptoren zu orthologen GBs bei Vertebraten ist z.B. ungeklärt, ob der PeaGB1 ein ER-Retentionsmotiv besitzt. Hier bieten sich Mutationsstudien im heterologen Zellsystem an. Diese wurden z.B. erfolgreich bei der Aufklärung konservierter AS-Reste in den GBs bei Mammalia durchgeführt (Galvez *et al.*, 1999; Galvez *et al.*, 2000).

Für die Aufklärung der Verteilung von PeaGB1 und PeaGB2 im nativen Gewebe ist die Generierung eines neuen Antikörpers, welcher gegen den PeaGB2 gerichtet ist, unabdingbar. Alternativ könnten zunächst zur Testung der Hypothese, dass sich die beiden Subtypen PeaGB1 und PeaGB2 in ihrer Gewebeverteilung unterscheiden, quantitative Echtzeit-PCRs durchgeführt werden.

Weiterhin muss untersucht werden, wie die modulatorische Rolle von GABA in den Speicheldrüsen von *P. americana* zustande kommt. Da PeaGB1 präsynaptisch im SN2 lokalisiert ist, sollte untersucht werden, ob weitere Neurotransmitter oder -peptide in diesem Neuron lokalisiert sind. Dafür sollten während der Stimulierung des Speichelgangnervs mögliche Transmitterkandidaten (u. a. Glutamat) appliziert und eine Änderung des Antwortverhaltens beobachtet werden. Zudem sollte die Lokalisation des ionotropen GABA-Rezeptors in der Speicheldrüse immunhistochemisch untersucht werden. Dafür bietet sich die Verwendung des anti-RDL-Antikörpers an (Sattelle *et al.*, 2000).

Die Verteilung des PeaGB1 in verschiedenen Organen und Geweben muss in immunhistochemischen Experimenten mit dem anti-PeaGB1-Antikörper detaillierter untersucht werden. So ist insbesondere im Gehirn eine Kolokalisation mit dem Liganden GABA zu untersuchen, um zu klären, ob PeaGB1 vorwiegend prä- oder postsynaptisch vorkommt. Auch die Aufklärung einer möglichen Kolokalisation des GB1 mit RDL und einer damit einhergehenden gemeinsamen Vermittlung der GABAergen Wirkung ist für die zukünftige Beurteilung pharmakologischer Ergebnisse notwendig. Weiterhin sollte in Gesamtpräparaten eine mögliche GABAerge Innervierung der akzessorischen Geschlechtsdrüsen männlicher Schaben immunhistochemisch untersucht werden.

Durch das Wissen über die pharmakologischen Eigenschaften des GB-Heteromers in *P. americana* kann nun gezielt die Funktion dieser Rezeptoren in verschiedenen Neuropilen und einzelnen Neuronen untersucht werden. Es eignen sich hierfür insbesondere der Agonist SKF97541 sowie der Antagonist CGP54626. Unterschiede in den pharmakologischen Eigenschaften der GB-Heteromere verschiedener Arten machen diese GPCRs als Zielproteine für Insektizide interessant. Daher sollten GBs weiterer Insekten pharmakologisch untersucht werden.

## 5. LITERATURVERZEICHNIS

- Addolorato G., Leggio L., Ferrulli A., Cardone S., Vonghia L., Mirijello A., Abenavoli L., D'Angelo C., Caputo F., Zambon A., Haber PS., Gasbarrini G.** (2007) Effectiveness and safety of baclofen for maintenance of alcohol abstinence in alcohol-dependent patients with liver cirrhosis: A randomized, double-blind study. *Lancet* 370:1915-1922.
- Adiyodi RG., Adiyodi KG.** (1974) Ultrastructure of the utriculi majores in the mushroom-shaped male accessory gland of *Periplaneta americana* (L.). *Z Zellforsch Mikrosk Anat.* 147(3):433-40.
- Ahier A., Rondard P., Gouignard N., Khayath N., Huang S., Trolet J., Donoghue DJ., Gauthier M., Pin JP., Dissous C.** (2009) A new family of receptor tyrosine kinases with a venus flytrap domain in insects and other invertebrates activated by aminoacids. *PLoS ONE* 4(5): e5651.
- Anjard C., Loomis WF.** (2006) GABA induces terminal differentiation of *Dictyostelium* through a GABA<sub>B</sub> receptor. *Development.* 133(11):2253-61.
- Bai D., Sattelle D.B.** (1995) A GABA<sub>B</sub> receptor on an identified insect motor neurone. *The Journal of Experimental Biology* 198:889-894.
- Balasubramanian S., Teissère J.A., Raju D.V., Hall R.A.** (2004) Hetero-oligomerization between GABA<sub>A</sub> and GABA<sub>B</sub> receptors regulates GABA<sub>B</sub> receptor trafficking. *J Biol Chem.* 279(18):18840-18850.
- Baldwin JM.** (1993) The probable arrangement of the helices in G protein-coupled receptors. *EMBO J.* 12(4):1693-703.
- Barth M., Heisenberg M.** (1997) Vision affects mushroom bodies and central complex in *Drosophila melanogaster*. *Learn Mem.* 4(2):219-29.
- Baumann O., Dames P., Kühnel D., Walz B.** (2002) Distribution of serotonergic and dopaminergic nerve fibers in the salivary gland complex of the cockroach *Periplaneta americana*. *BMC Physiology* 2:9.
- Baumann O., Kühnel D., Dames P., Walz B.** (2004) Dopaminergic and serotonergic innervation of cockroach salivary glands: distribution and morphology of synapses and release sites. *J Exp Biol.* 207:2565-2575.
- Beams HW., Anderson E., Kessel R** (1962) Electron microscope observations on the phallic (conglobate) gland of the cockroach, *Periplaneta americana*. *Journal of the Royal Microscopical Society* 81(2):85-90.
- Bell WJ., Adiyodi KG.** (1981) The American Cockroach. *Chapman and Hall Ltd* ISBN-10:0412161400.
- Ben-Ari Y.** (2002) Excitatory actions of gaba during development: the nature of the nurture. *Nat Rev Neurosci.* 3(9):728-39.
- Berger B., Wilson DB., Wolf E., Tonchev T., Milla M., Kim PS.** (1995) Predicting coiled coils by use of pairwise residue correlations. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92(18):8259-8263.
- Berstein G., Blank JL., Jhon DY., Exton JH., Rhee SG., Ross EM.** (1992) Phospholipase C-beta 1 is a GTPase-activating protein for G<sub>q/11</sub>, its physiologic regulator. *Cell.* 70(3):411-8.

- Bettler B., Kaupmann K., Mosbacher J., Gassmann M.** (2004) Molecular Structure and Physiological Functions of GABA<sub>B</sub> Receptors. *Physiol Rev* 84:835-867.
- Bhave G., Nadin BM., Brasier DJ., Glauner KS., Shah RD., Heinemann SF., Karim F., Gereau IV RW.** (2003) Membrane topology of a metabotropic glutamate receptor. *J Biol Chem.* 278(32):30294-30301.
- Bicker G., Schäfer S., Kingan T.G.** (1985) Mushroom body feedback interneurons in the honeybee show GABA-like immunoreactivity. *Brain Research* 360:394-397.
- Bicker G.** (1999) Histochemistry of classical neurotransmitters in antennal lobes and mushroom bodies of the honeybee. *Microsc Res Tech.* 45(3):174-83.
- Biermann B., Ivankova-Susankova K., Bradaia A., Abdel Aziz S., Besseyrias V., Kapfhammer JP., Missler M., Gassmann M., Bettler B.** (2010) The Sushi domains of GABA<sub>B</sub> receptors function as axonal targeting signals. *J Neurosci.* 30(4):1385-94.
- Blankenburg S.** (2010) Molekulare Charakterisierung von GABA<sub>B</sub>-Rezeptoren der Insekten. *Diplomarbeit, eingereicht an der Universität Potsdam.*
- Blechs Schmidt K., Eckert M., Penzlin H.** (1990) Distribution of GABA-like immunoreactivity in the central nervous system of the cockroach, *Periplaneta americana* (L.). *J Chem Neuroanat.* 3(5):323-36.
- Blenau W., Erber J., Baumann A.** (1998) Characterization of a dopamine D1 receptor from *Apis mellifera*: cloning, functional expression, pharmacology, and mRNA localization in the brain. *J Neurochem.* 70(1):15-23.
- Blenau W., Balfanz S., Baumann A.** (2000) *Amtyr1*: characterization of a gene from honeybee (*Apis mellifera*) brain encoding a functional tyramine receptor. *J Neurochem.* 74(3):900-8.
- Bockaert J, Pin JP.** (1999) Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success. *The EMBO Journal* 18(7):1723-1729.
- Bowery NG.** (1993) GABA<sub>B</sub> receptor pharmacology. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 33:109-47.
- Bowery NG., Bettler B., Froestl W., Gallagher JP., Marshall F., Raiteri M., Bonner TI., Enna SJ.** (2002) International Union of Pharmacology. XXXIII. Mammalian gamma-aminobutyric acid<sub>B</sub> receptors: structure and function. *Pharmacol Rev.* 54(2):247-64.
- Bowery NG. & Smart TG.** (2006) GABA and glycine as neurotransmitters: a brief history. *Br J Pharmacol.* 147 Suppl 1:109-119.
- Bradford MM.** (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72:248-54.
- Brar SP., Smith MB., Nelson LM., Franklin GM., Cobble ND.** (1991) Evaluation of treatment protocols on minimal to moderate spasticity in multiple sclerosis. *Archives of Physical Medicine and Rehabilitation* 72:186-189.
- Buckingham SD., Hue B., Sattelle DB.** (1994) Actions of bicuculline on cell body and neuropilar membranes of identified insect neurones. *J Exp Biol.* 186:235-44.
- Buckingham S.D., Biggin P.C., Sattelle B.M., Brown L.A., Sattelle D.B.** (2005) Insect GABA receptors: splicing, editing, and targeting by antiparasitics and insecticides. *Mol Pharmacol* 68:942-951.

- Buckingham SD., Higashino Y., Sattelle DB.** (2009) Allosteric modulation by benzodiazepines of GABA-gated chloride channels of an identified insect motor neurone. *Invert Neurosci.* 9(2):85-9.
- Calver AR., Medhurst AD., Robbins MJ., Charles KJ., Evans ML., Harrison DC., Stammers M., Hughes SA., Hervieu G., Couve A., Moss SJ., Middlemiss DN., Pangalos MN.** (2000) The expression of GABA<sub>(B1)</sub> and GABA<sub>(B2)</sub> receptor subunits in the CNS differs from that in peripheral tissues. *Neuroscience.* 100(1):155-70.
- Calver AR., Michalovich D., Testa TT., Robbins MJ., Jaillard C., Hill J., Szekeres PG., Charles KJ., Jourdain S., Holbrook JD., Boyfield I., Patel N., Medhurst AD., Pangalos MN.** (2003) Molecular cloning and characterisation of a novel GABA<sub>B</sub>-related G-protein coupled receptor. *Brain Res Mol Brain Res.* 110(2):305-17.
- Cao J., Huang S., Qian J., Huang J., Jin L., Su Z., Yang J., Liu J.** (2009) Evolution of the class C GPCR Venus flytrap modules involved positive selected functional divergence. *BMC Evolutionary Biology* 9:67.
- Carman CV., Benovic JL.** (1998) G-protein-coupled receptors: turn-ons and turn-offs. *Curr Opin Neurobiol.* 8(3):335-44.
- Chen C, Okayama H.** (1987) High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA. *Mol Cell Biol.* 7(8):2745-52.
- Chen G., van den Pol AN.** (1998) Presynaptic GABA<sub>B</sub> autoreceptor modulation of P/Q-Type calcium channels and GABA release in rat suprachiasmatic nucleus neurons. *The Journal of Neuroscience* 18(5):1913-1922.
- Chini B., Parenti M.** (2009) G-protein-coupled receptors, cholesterol and palmitoylation: facts about fats. *Journal of Molecular Endocrinology* 42:371-379.
- Chun L., Zhang WH., Liu JF.** (2012) Structure and ligand recognition of class C GPCRs. *Acta Pharmacol Sin.* 33(3):312-23.
- Clark JA., Mezey É., Lam AS., Bonner TI.** (2000) Distribution of the GABA<sub>B</sub> receptor subunit gb2 in rat CNS. *Brain Research* 860:41-52.
- Comps-Agrar L., Kniazeff J., Nørskov-Lauritsen L., Maurel D., Gassmann M., Gregor N., Prézeau L., Bettler B., Durroux T., Trinquet E., Pin JP.** (2011) The oligomeric state sets GABA<sub>B</sub> receptor signalling efficacy. *EMBO J.* 30(12):2336-49.
- Comps-Agrar L., Kniazeff J., Brock C., Trinquet E., Pin JP.** (2012) Stability of GABA<sub>B</sub> receptor oligomers revealed by dual TR-FRET and drug-induced cell surface targeting. *FASEB J.* 26(8):3430-9.
- Cousins MS., Roberts D C., de Wit H.** (2002). GABA<sub>B</sub> receptor agonists for the treatment of drug addiction: A review of recent findings. *Drug and Alcohol Dependence,* 65:209-220.
- Couve A., Filippov AK., Connolly CN., Bettler B, Brown DA., Moss SJ.** (1998) Intracellular retention of recombinant GABA<sub>B</sub> receptors. *J Biol Chem.* 273(41):26361-7.
- Couve A., Moss SJ., Pangalos MN.** (2000) GABA<sub>B</sub> receptors: a new paradigm in G protein signaling. *Mol Cell Neurosci.* 16(4):296-312.

- Couve A., Thomas P., Calver AR., Hirst WD., Pangalos MN., Walsh FS., Smart TG., Moss SJ.** (2002) Cyclic AMP-dependent protein kinase phosphorylation facilitates GABA<sub>B</sub> receptor-effector coupling. *Nat Neurosci.* 5(5):415-24.
- Cruz HG., Ivanova T., Lunn ML., Stoffel M., Slesinger PA., Lüscher C.** (2004) Bi-directional effects of GABA<sub>B</sub> receptor agonists on the mesolimbic dopamine system. *Nat Neurosci.* 7(2):153-9.
- Davies CH., Starkey SJ., Pozza MF., Collingridge GL.** (1991) GABA autoreceptors regulate the induction of LTP. *Nature.* 349(6310):609-11.
- Davis R.L.** (1993) Mushroom bodies and *Drosophila* learning. *Neuron* 11(1):1-14.
- Distler P.** (1989) Histochemical demonstration of GABA-like immunoreactivity in cobalt labeled neuron individuals in the insect olfactory pathway. *Histochemistry.* 91(3):245-9.
- Distler PG., Gruber C., Boeckh J.** (1998) Synaptic connections between GABA-immunoreactive neurons and uniglomerular projection neurons within the antennal lobe of the cockroach, *Periplaneta americana*. *Synapse.* 29(1):1-13.
- Doze VA., Cohen GA., Madison DV.** (1995) Calcium channel involvement in GABA<sub>B</sub> receptor-mediated inhibition of GABA release in area CA1 of the rat hippocampus. *J Neurophysiol.* 74(1):43-53.
- Dupuis DS., Relkovic D., Lhuillier L., Mosbacher J., Kaupmann K.** (2006) Point mutations in the transmembrane region of GABA<sub>B2</sub> facilitate activation by the positive modulator N,N'-dicyclopentyl-2-methylsulfanyl-5-nitro-pyrimidine-4,6-diamine (GS39783) in the absence of the GABA<sub>B1</sub> subunit. *Mol Pharmacol.* 70(6):2027-36.
- Duthey B., Caudron S., Perroy J., Bettler B., Fagni L., Pin J-P., Prézeau L.** (2002) A single subunit (GB2) is required for G-Protein activation by the heterodimeric GABA<sub>B</sub> receptor. *J Biol Chem.* 277(5):3236-3241.
- Elia A.J., Ali D.W., Orchard I.** (1994) Immunochemical staining of tyrosine hydroxylase (TH)-like material in the salivary glands and ventral nerve cord of the cockroach, *Periplaneta americana* (L.). *J Insect Physiol.* 40:671-683.
- Enell L., Hamasaka Y., Kolodziejczyk A., Nässel D.R.** (2007)  $\gamma$ -Aminobutyric acid (GABA) signaling components in *Drosophila*: Immunocytochemical localization of GABA<sub>B</sub> receptors in relation to the GABA<sub>A</sub> receptor subunit RDL and a vesicular GABA transporter. *J Comp Neurol.* 505:18-31.
- Enell LE., Kapan N., Söderberg JA., Kahsai L., Nässel DR.** (2010) Insulin signaling, lifespan and stress resistance are modulated by metabotropic GABA receptors on insulin producing cells in the brain of *Drosophila*. *PLoS One.* 5(12):e15780.
- Ernst KD., Boeckh J.** (1983) A neuroanatomical study on the organization of the central antennal pathways in insects. III. Neuroanatomical characterization of physiologically defined response types of deutocerebral neurons in *Periplaneta americana*. *Cell Tissue Res.* 229(1):1-22.
- Farris SM., Strausfeld NJ.** (2001) Development of laminar organization in the mushroom bodies of the cockroach: Kenyon cell proliferation, outgrowth, and maturation. *J Comp Neurol.* 439(3):331-51.
- Fatemi S.H., Folsom T.D., Reutiman T.J., Thuras P.D.** (2009) Expression of GABA<sub>B</sub> receptors is altered in brains of subjects with autism. *Cerebellum* 8(1):64-69.

- Filippov A.K., Couve A., Pangalos M.N., Walsh F.S., Brown D.A., Moss S.J.** (2000) Heteromeric assembly of GABA<sub>B</sub>R1 and GABA<sub>B</sub>R2 receptor subunits inhibits Ca<sup>2+</sup> current in sympathetic neurons. *The Journal of Neuroscience* 20(8):2867-2874.
- Florey E., Mc Lennan H.** (1959) The effects of factor I and of gamma-aminobutyric acid on smooth muscle preparations. *J Physiol.* 145(1):66-76.
- Franklin TR., Harper D., Kampman K., Kildea-McCrea S., Jens W., Lynch KG., O'Brien CP., Childress AR.** (2009) The GABA<sub>B</sub> agonist baclofen reduces cigarette consumption in a preliminary double-blind placebo-controlled smoking reduction study. *Drug and Alcohol Dependence* 103(1-2):30-36.
- Fraser C.M.** (1995) Structure and functional analysis of G protein-coupled receptors and potential diagnostic ligands. *J Nucl Med.* 36(6 Suppl):17S-21S.
- Fredriksson R., Lagerström MC., Lundin L-G., Schiöth HB.** (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.
- Ffrench-Constant RH., Mortlock DP., Shaffer CD., MacIntyre RJ., Roush RT.** (1991) Molecular cloning and transformation of cyclodiene resistance in *Drosophila*: an invertebrate gamma-aminobutyric acid subtype A receptor locus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 88(16):7209-13.
- Froestl W.** (2010) Chemistry and pharmacology of GABA<sub>B</sub> receptor ligands. *Adv Pharmacol.* 58:19-62.
- Füller H., Eckert M., Blechschmidt K.** (1989) Distribution of GABA-like immunoreactive neurons in the optic lobes of *Periplaneta americana*. *Cell Tissue Res* 255:225-233.
- Fusca D., Husch A., Baumann A., Kloppenburg P.** (2013) Choline acetyltransferase-like Immunoreactivity in a physiologically distinct sub-type of olfactory non-spiking local interneurons in the cockroach (*Periplaneta americana*). *J Comp Neurol.* 521(15):3556-3569.
- Gäde G., Marco HG., Richter D., Weaver RJ.** (2008) Structure-activity studies with endogenous allatostatins from *Periplaneta americana*: expressed receptor compared with functional bioassay. *J Insect Physiol.* 54(6):988-96.
- Galvez T., Parmentier M-L., Joly C., Malitschek B., Kaupmann K., Kuhn R., Bittiger H., Froestl W., Bettler B., Pin J-P.** (1999) Mutagenesis and modeling of the GABA<sub>B</sub> receptor extracellular domain support a venus flytrap mechanism for ligand binding. *J Biol Chem.* 274(19):13362-13369.
- Galvez T., Urwyler S., Prézeau L., Mosbacher J., Joly C., Malitschek B., Heid J., Brabet I., Froestl W., Bettler B., Kaupmann K., Pin J-P.** (2000a) Ca<sup>2+</sup> requirement for high-affinity  $\gamma$ -Aminobutyric Acid (GABA) binding at GABA<sub>B</sub> receptors: Involvement of Serine 269 of the GABA<sub>B</sub>R1 subunit. *Molecular Pharmacology* 57:419-426.
- Galvez T., Prézeau L., Milioti G., Franek M., Joly C., Froestl W., Bettler B., Bertrand H-O., Blahos J., Pin J-P.** (2000b) Mapping the Agonist-binding Site of GABA<sub>B</sub> Type 1 Subunit Sheds Light on the Activation Process of GABA<sub>B</sub> Receptors. *J Biol Chem.* 275(52):41166-41174.
- Galvez T., Duthey B., Kniazeff J., Blahos J., Rovelli G., Bettler B., Prézeau L., Pin J-P.** (2001) Allosteric interactions between GB1 and GB2 subunits are required for optimal GABA<sub>B</sub> receptor function. *The EMBO Journal* 20(9):2152-2159.



- Garduno J., Elenes S., Cebada J., Becerra E., Garcia U.** (2002) Expression and Functional Characterization of GABA Transporters in Crayfish Neurosecretory Cells. *The Journal of Neuroscience* 22(21):9176-9184.
- Gassmann M., Haller C., Stoll Y., Aziz SA., Biermann B., Mosbacher J., Kaupmann K., Bettler B.** (2005) The RXR-Type Endoplasmic Reticulum-Retention/Retrieval Signal of GABA<sub>B1</sub> Requires Distant Spacing from the Membrane to Function. *Mol Pharmacol* 86:137-144.
- Geng Y., Xiong D., Mosyak L., Malito DL., Kniazeff J., Chen Y., Burmakina S., Quick M., Bush M., Javitch JA., Pin JP., Fan QR.** (2012) Structure and functional interaction of the extracellular domain of human GABA(B) receptor GBR2. *Nat Neurosci.* 15(7):970-8.
- Gisselmann G., Plonka J., Pusch H., Hatt H.** (2004) *Drosophila melanogaster* GRD and LCCH3 subunits form heteromultimeric GABA-gated cation channels. *Br J Pharmacol.* 142(3):409-13.
- Grampp T., Sauter K., Markovic B., Benke D.** (2007)  $\gamma$ -aminobutyric acid type B receptors are constitutively internalized via the Clathrin-dependent pathway and targeted to lysosomes for degradation. *J Biol Chem.*282(33):24157-24165.
- Grohmann L., Blenau W., Erber J., Ebert PR., Strünker T., Baumann A.** (2003) Molecular and functional characterization of an octopamine receptor from honeybee (*Apis mellifera*) brain. *J Neurochem.* 86(3):725-35.
- Gustincich S., Manfioletti G., Del Sal G., Schneider C., Carninci P.** (1991) A fast method for high-quality genomic DNA extraction from whole human blood. *Biotechniques* 11(3):298-300, 302.
- Guo P., Ritzmann RE.** (2013) Neural activity in the central complex of the cockroach brain is linked to turning behaviors. *J Exp Biol.* 216(6):992-1002.
- Gupta PD.** (1946) On copulation and insemination in the cockroach *Periplaneta americana* (LINN.). 8(2):65-71.
- Hall TA.** (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41:95-98.
- Hamasaka Y., Wegener C., Nässel D.R.** (2005) GABA modulates *Drosophila* circadian clock neurons via GABA<sub>B</sub> receptors and decreases in calcium. *J Neurobiol* 65(3):225-240.
- Haney M., Hart CL., Foltin RW.** (2006) Effects of baclofen on cocaine self-administration: Opioid- and nonopioid- dependent volunteers. *Neuropsychopharmacology* 31:1814-1821.
- Harrison JB., Chen HH., Sattelle E., Barker PJ., Huskisson NS., Rauh JJ., Bai D., Sattelle DB.** (1996) Immunocytochemical mapping of a C-terminus anti-peptide antibody to the GABA receptor subunit RDL, in the nervous system in *Drosophila melanogaster*. *Cell Tissue Res.* 284(2):269-78.
- Heinze S., Homberg U.** (2007) Maplike representation of celestial E-vector orientations in the brain of an insect. *Science.* 315(5814):995-7.
- Heisenberg M.** (1998) What do the mushroom bodies do for the insect brain? An introduction. *Learn Mem.* 5(1-2):1-10.
- Hentze JL., Moeller ME., Jørgensen AF., Bengtsson MS., Bordoy AM., Warren JT., Gilbert LI., Andersen O., Rewitz KF.** (2013) Accessory gland as a site for prothoracicotropic hormone controlled ecdysone synthesis in adult male insects. *PLOS One.* 8(2):e55131.

- Hill DR., Bowery NG.** (1981)  $^3\text{H}$ -baclofen and  $^3\text{H}$ -GABA bind to bicuculline-insensitive GABA<sub>B</sub> sites in rat brain. *Nature* 290:149-152.
- Hoff M., Balfanz S., Ehling P., Gensch T., Baumann A.** (2011) A single amino acid residue controls Ca<sup>2+</sup> signaling by an octopamine receptor from *Drosophila melanogaster*. *FASEB J.* 25(7):2484-91.
- Homberg U., Kingan T.G., Hildebrand J.G.** (1987) Immunocytochemistry of GABA in the brain and suboesophageal ganglion of *Manduca sexta*. *Cell Tissue Res.* 248(1):1-24.
- Homberg U., Vitzthum H., Müller M., Binkle U.** (1999) Immunocytochemistry of GABA in the central complex of the locust *Schistocerca gregaria*: identification of immunoreactive neurons and colocalization with neuropeptides. *J Comp Neurol.* 409(3):495-507.
- Hu JH., He XB., Wu Q., Yan YC., Koide SS.** (2002) Biphasic effect of GABA on rat sperm acrosome reaction: involvement of GABA<sub>A</sub> and GABA<sub>B</sub> receptors. *Arch Androl.* 48(5):369-78.
- Hue B.** (1991) Functional assay for GABA receptor subtypes of a cockroach giant interneuron. *Arch Insect Biochem Physiol.* 18:147-157.
- Husch A., Paehler M., Fusca D., Paeger L., Kloppenburg P.** (2009) Distinct electrophysiological properties in subtypes of nonspiking olfactory local interneurons correlate with their cell type-specific Ca<sup>2+</sup> current profiles. *J Neurophysiol.* 102(5):2834-45.
- Huston E., Scott RH., Dolphin AC.** (1990) A comparison of the effect of calcium channel ligands and GABA<sub>B</sub> agonists and antagonists on transmitter release and somatic calcium channel currents in cultured neurons. *Neuroscience.* 38(3):721-729.
- Iles JF.** (1971) Structure and synaptic activation of the fast coxal depressor motoneurone of the cockroach *Periplaneta americana*. *J Exp Biol.* 56:647-656.
- Isomoto S., Kaibara M., Sakurai-Yamashita Y., Nagayama Y., Uezono Y., Yano K., Taniyama K.** (1998) Cloning and tissue distribution of novel splice variants of the rat GABA<sub>B</sub> receptor. *Biochem Biophys Res Commun.* 253(1):10-15.
- Jackson FR., Newby LM., Kulkarni SJ.** (1990) *Drosophila* GABAergic Systems: Sequence and Expression of Glutamic Acid Decarboxylase. *J Neurochem.* 54(3):1068-78.
- Ji T.H., Grossmann M., Ji I.** (1998) G Protein-coupled Receptors: I. DIVERSITY OF RECEPTOR-LIGAND INTERACTIONS. *J Biol Chem.* 273(28):17299-17302.
- Johnston GAR.** (1996) GABA<sub>A</sub> Receptor Pharmacology. *Pharmacol. Ther.* 69(3):173-198.
- Joiner MA., Griffith LC.** (2000) Visual input regulates circuit configuration in courtship conditioning of *Drosophila melanogaster*. *Learn Mem.* 7(1):32-42.
- Just F, Walz B.** (1994) Salivary glands of the cockroach, *Periplaneta americana*: new data from light and electron microscopy. *J Morphol.* 220(1):35-46.
- Kahsai L., Carlsson MA., Winther AM., Nässel DR.** (2012) Distribution of metabotropic receptors of serotonin, dopamine, GABA, glutamate, and short neuropeptide F in the central complex of *Drosophila*. *Neuroscience.* 208:11-26.
- Kai K., Okada J.** (2013) Characterization of locomotor-related spike activity in protocerebrum of freely walking cricket. *Zoolog Sci.* 30(7):591-601.

- Kaiser CA., Preuss D., Grisafi P., Botstein D.** (1987) Many random sequences functionally replace the secretion signal sequence of yeast invertase. *Science*. 235(4786):312-7.
- Katritch V., Cherezov V., Stevens RC.** (2013) Structure-function of the G protein-coupled receptor superfamily. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 53:531-56.
- Kaufman DL., McGinnis JF., Krieger NR., Tobin AJ.** (1986) Brain glutamate decarboxylase cloned in lambda gt-11: fusion protein produces gamma-aminobutyric acid. *Science*. 232(4754):1138-40.
- Kanner BI.** (2006) Structure and function of sodium-coupled GABA and Glutamate Transporters. *J. Membrane Biol*. 213(2):89-100.
- Kasyanov AM., Safiulina VF., Voronin LL., Cherubini E.** (2004) GABA-mediated giant depolarizing potentials as coincidence detectors for enhancing synaptic efficacy in the developing hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 101(11):3967-72.
- Kaupmann K., Huggel K., Heid J., Flor PJ., Bischoff S., Mickel SJ., McMaster G., Angst C., Bittiger H., Froestl W., Bettler B.** (1997) Expression cloning of GABA<sub>B</sub> receptors uncovers similarity to metabotropic glutamate receptors. *Nature* Vol. 386:239-246.
- Kaupmann K., Malitschek B., Schuler V., Heid J., Froestl W., Beck P., Mosbacher J., Bischoff S., Kulik A., Shigemoto R., Karschin A., Bettler B.** (1998) GABA<sub>B</sub>-receptor subtypes assemble into functional heteromeric complexes. *Nature* 396:683-687.
- Kaupmann K., Schuler V., Mosbacher J., Bischoff S., Bittiger H., Heid J., Froestl W., Leonhard S., Pfaff T., Karschin A., Bettler B.** (1998b) Human  $\gamma$ -aminobutyric acid type B receptors are differentially expressed and regulate inwardly rectifying K<sup>+</sup> channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:14991-14996.
- Kimple AJ., Bosch DE., Giguère PM., Siderovski DP.** (2011) Regulators of G-protein signaling and their G<sub>α</sub> substrates: promises and challenges in their use as drug discovery targets. *Pharmacol Rev*. 63(3):728-49.
- Kniazeff J., Galvez T., Labesse G., Pin J-P.** (2002) No ligand binding in the GB2 subunit of the GABA<sub>B</sub> receptor is required for activation and allosteric interaction between the subunits. *The Journal of Neuroscience* 22(17):7352-7361.
- Ko WY., David RM., Akashi H.** (2003) Molecular phylogeny of the *Drosophila melanogaster* species subgroup. *J Mol Evol*. 57(5):562-73.
- Kobayashi S., Matsuo R., Sadamoto H., Watanabe S., Ito E.** (2012) Excitatory effects of GABA on procererebrum neurons in a slug. *J Neurophysiol*. 108(4):989-98.
- Kolodziejczyk A., Sun X., Meinertzhagen I.A., Nässel D.R.** (2008) Glutamate, GABA and acetylcholine signaling components in the lamina of the *Drosophila* visual system. *PLoS ONE* 3(5):e2110.
- Kozak M.** (1984) Compilation and analysis of sequences upstream from the translational start site in eukaryotic mRNAs. *Nucleic Acids Res*. 12(2):857-72.
- Kubista M., Akerman B., Nordén B.** (1987) Characterization of interaction between DNA and 4',6-diamidino-2-phenylindole by optical spectroscopy. *Biochemistry*. 26(14):4545-53.
- Kugler P.** (1993) In situ measurements of enzyme activities in the brain. *Histochem J*. 25(5):329-38.

- Kuner R., Köhr G., Grünwald S., Eisenhardt G., Bach A., Kornau HC.** (1999) Role of heteromer formation in GABA<sub>B</sub> receptor function. *Science*. 283(5398):74-7.
- Kunishima N., Shimada Y., Tsuji Y., Sato T., Yamamoto M., Kumasaka T., Nakanishi S., Jingami H., Morikawa K.** (2000) Structural basis of glutamate recognition by a dimeric metabotropic glutamate receptor. *Nature* 407:971-977.
- Kuramoto N, Wilkins ME, Fairfax BP, Revilla-Sanchez R, Terunuma M, Tamaki K, Iemata M, Warren N, Couve A, Calver A, Horvath Z, Freeman K, Carling D, Huang L, Gonzales C, Cooper E, Smart TG, Pangalos MN, Moss SJ.** (2007) Phospho-dependent functional modulation of GABA<sub>B</sub> receptors by the metabolic sensor AMP-dependent protein kinase. *Neuron*. 53(2):233-47.
- Kyte J., Doolittle R.F.** (1982) A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein. *J Mol Biol*. 157(1):105-132.
- Ladera C., del Carmen Godino M., José Cabañero M., Torres M., Watanabe M., Luján R., Sánchez-Prieto J.** (2008) Pre-synaptic GABA receptors inhibit glutamate release through GIRK channels in rat cerebral cortex. *J Neurochem*. 107(6):1506-17.
- Laemmli UK.** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(5259):680-5.
- Lagerström MC., Schiöth HB.** (2008) Structural diversity of G protein-coupled receptors and significance for drug discovery. *Nat Rev Drug Discov*. 7(4):339-57.
- Lee MC., Hwang JC., Lin JT., Tung LC.** (2007) Characteristics of GABA receptors on the ocellar L neurons of American cockroach *Periplaneta americana*. *Chin J Physiol*. 50(5):269.
- Leff P.** (1995) The two-state model of receptor activation. *Trends Pharmacol Sci*. 16(3):89-97.
- Lefkowitz RJ.** (2004) Historical review: a brief history and personal retrospective of seven-transmembrane receptors. *Trends Pharmacol Sci*. 25(8):413-22.
- Lei Z., Chen K., Li H., Liu H., Guo A.** (2013) The GABA system regulates the sparse coding of odors in the mushroom bodies of *Drosophila*. *Biochem Biophys Res Commun*. 436(1):35-40.
- Li MD., Mangold JE., Seneviratne C., Chen G-B., Ma JZ., Lou X-Y., Payne TJ.** (2009) Association and Interaction Analyses of *GABBR1* and *GABBR2* with Nicotine Dependence in European- and African-American Populations. *PLoS ONE* 4(9):e7055.
- Lingenhoehl K., Brom R., Heid J., Beck P., Froestl W., Kaupmann K., Bettler B., Mosbacher J.** (1999) Gamma-hydroxybutyrate is a weak agonist at recombinant GABA<sub>B</sub> receptors. *Neuropharmacology*. 38(11):1667-73.
- Ludwig J., Margalit T., Eismann E., Lancet D., Kaupp UB.** (1990) Primary structure of cAMP-gated channel from bovine olfactory epithelium. *FEBS Lett*. 270(1-2):24-9.
- Luttrell LM.** (2008) Reviews in molecular biology and biotechnology: transmembrane signaling by G protein-coupled receptors. *Mol Biotechnol*. 39(3):239-64.
- Magnaghi V., Ballabio M., Cavarretta IT., Froestl W., Lambert JJ., Zucchi I., Melcangi RC.** (2004) GABA<sub>B</sub> receptors in Schwann cells influence proliferation and myelin protein expression. *Eur J Neurosci*. 19(10):2641-9.

- Malitschek B., Schweizer C., Keir M., Heid J., Froestl W., Mosbacher J., Kuhn R., Henley J., Joly C., Pin JP., Kaupmann K., Bettler B.** (1999) The N-terminal domain of gamma-aminobutyric Acid(B) receptors is sufficient to specify agonist and antagonist binding. *Mol Pharmacol.* 56(2):448-54.
- Malun D.** (1991) Synaptic relationships between GABA-immunoreactive neurons and an identified uniglomerular projection neuron in the antennal lobe of *Periplaneta americana*: a double-labeling electron microscopic study. *Histochemistry.* 96(3):197-207.
- Manev H., Dzitoyeva S.** (2010) GABA-B receptors in *Drosophila*. *Adv Pharmacol.* 58:453-64.
- Margeta-Mitrovic M., Jan YN., Jan LY.** (2000) A trafficking checkpoint controls GABA<sub>B</sub> receptor heterodimerization. *Neuron* 27:97-106.
- Margeta-Mitrovic M., Jan YN., Jan LY.** (2001) Ligand-induced signal transduction within heterodimeric GABA<sub>B</sub> receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98(25):14643-8.
- Martin SC., Russek SJ., Farb DH.** (2001) Human GABA<sub>B</sub>R genomic structure: evidence for splice variants in GABA<sub>B</sub>R1 but not GABA<sub>B</sub>R2. *Gene.* 31;278(1-2):63-79.
- Matsuura T., Kanou M., Yamaguchi T.** (2002) Motor program initiation and selection in crickets, with special reference to swimming and flying behavior. *J Comp Physiol A.* 187:987-995.
- Maurel D., Comps-Agrar L., Brock C., Rives ML., Bourrier E., Ayoub MA., Bazin H., Tinel N., Durroux T., Prézeau L., Trinquet E., Pin JP.** (2008) Cell-surface protein-protein interaction analysis with time-resolved FRET and snap-tag technologies: application to GPCR oligomerization. *Nat Methods.* 5(6):561-7.
- Mayr B., Montminy M.** (2001) Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor CREB. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2(8):599-609.
- McCudden C.R., Hains M.D., Kimple R.J., Siderovski D.P., Willard F.S.** (2005) G-protein signaling: back to the future. *Cell. Mol. Life Sci.* 62, 551-577.
- Mezler M., Müller T., Raming K.** (2001) Cloning and functional expression of GABA<sub>B</sub> receptors from *Drosophila*. *Eur J Neurosci.* 13(3):477-486.
- Michelson K., Yuan H., Schwappach B.** (2005) Hide and run, Arginine-based endoplasmic-reticulum-sorting motifs in the assembly of heteromultimeric membrane proteins. *EMBO reports* 6(8):717-722.
- Milligan G., Kostenis E.** (2006) Heterotrimeric G-proteins: a short story. *Br J Pharmacol.* 147:46-55.
- Mitri C., Parmentier M-L., Pin J-P., Bockaert J., Grau Y.** (2004) Divergent Evolution in Metabotropic Glutamate Receptors. *J Biol Chem.* 279(10):9313-9320.
- Monnier C., Tu H., Bourrier E., Vol C., Lamarque L., Trinquet E., Pin JP., Rondard P.** (2011) Trans-activation between 7TM domains: implication in heterodimeric GABA<sub>B</sub> receptor activation. *EMBO J.* 30(1):32-42.
- Murillo L., Hamon A., Es-Salah-Lamoureux Z., Itier V., Quinchard S., Lapied B.** (2011) Inhibition of protein kinase C decreases sensitivity of GABA receptor subtype to fipronil insecticide in insect neurosecretory cells. *Neurotoxicology.* 32(6):828-35.
- Muto T., Tsuchiya D., Morikawa K., Jingami H.** (2007) Structures of the extracellular regions of the group II/III metabotropic glutamate receptors. *PNAS* 104(10):3759-3764.

- Nagata K., Narahashi T.** (1994) Dual action of the cyclodiene insecticide dieldrin on the gamma-aminobutyric acid receptor-chloride channel complex of rat dorsal root ganglion neurons. *J Pharmacol Exp Ther.* 269(1):164-71.
- Nässel DR.** (2000) Functional roles of neuropeptides in the insect central nervous system. *Naturwissenschaften.* 87(10):439-49.
- Nayeem N, Green TP, Martin IL, Barnard EA.** (1994) Quaternary structure of the native GABA<sub>A</sub> receptor determined by electron microscopic image analysis. *J Neurochem.* 62(2):815-8.
- Nehring RB., Horikawa HP., El Far O., Kneussel M., Brandstätter JH., Stamm S., Wischmeyer E., Betz H., Karschin A.** (2000) The metabotropic GABA<sub>B</sub> receptor directly interacts with the activating transcription factor 4. *J Biol Chem.* 275(45):35185-35191.
- Ng G.Y., Mauillac B., George S.R., Caron M., Dennis M., Bouvier M., O'Dowd B.F.** (1994) Desensitization, phosphorylation and palmitoylation of the human dopamine D1 receptor. *Eur J Pharmacol.* 267(1):7-19.
- Ng GYK., Clark J., Coulombe N., Ethier N., Hebert TE., Sullivan R., Kargman S., Chateaneuf A., Tsukamoto N., McDonald T., Whiting P., Mezey É., Johnson MP., Liu Q., Kolakowski Jr. LF., Evans JF., Bonner TL., O'Neill GP.** (1999) Identification of a GABA<sub>B</sub> receptor subunit, gb2, required for functional GABA<sub>B</sub> receptor activity. *J Biol Chem.* 274(12):7607-7610.
- Nishino H., Mizunami M.** (1998) Giant input neurons of the mushroom body: intracellular recording and staining in the cockroach. *Neurosci Lett.* 246(1):57-60.
- O'Dowd B.F., Hnatowich M., Caron M.G., Lefkowitz R.J., Bouvier M.** (1989) Palmitoylation of the human  $\beta_2$ -adrenergic receptor. Mutation of Cys<sup>341</sup> in the carboxyl tail leads to an uncoupled nonpalmitoylated form of the receptor. *J Biol Chem* 264:7564-7569.
- Ochman H., Gerber AS., Hartl DL.** (1988) Genetic applications of an inverse polymerase chain reaction. *Genetics* 120(3):621-3.
- Oka M., Wada M., Wu Q., Yamamoto A., Fujita T.** (2006) Functional expression of metabotropic GABA<sub>B</sub> receptors in primary cultures of astrocytes from rat cerebral cortex. *Biochem Biophys Res Commun.* 341(3):874-81.
- Okada R., Awasaki T., Ito K.** (2009) Gamma-Aminobutyric Acid (GABA)-Mediated Neural Connections in the *Drosophila* Antennal Lobe. *The Journal of Comparative Neurology* 514:74-91.
- Olsen RW., Sieghart W.** (2008) International Union of Pharmacology. LXX. Subtypes of gamma-aminobutyric acid<sub>A</sub> receptors: classification on the basis of subunit composition, pharmacology, and function. Update. *Pharmacol Rev.* 60(3):243-60.
- Olsen SR., Wilson RI.** (2008) Lateral presynaptic inhibition mediates gain control in an olfactory circuit. *Nature* 452:956-962.
- Padgett CL., Slesinger PA.** (2010) GABA<sub>B</sub> receptor coupling to G-proteins and ion channels. *Adv Pharmacol.* 58:123-47.
- Pagano A., Rovelli G., Mosbacher J., Lohmann T., Duthey B., Stauffer D., Ristig D., Schuler V., Meigel I., Lampert C., Stein T., Prézaeu L., Blahos J., Pin J-P., Froestl W., Kuhn R., Heid J., Kaupmann K., Bettler B.** (2001) C-Terminal Interaction Is Essential for Surface Trafficking But Not for Heteromeric Assembly of GABA<sub>B</sub> Receptors. *J Neurosci.* 21(4):1189-1202.

- Perroy J, Adam L, Qanbar R, Chénier S, Bouvier M.** (2003) Phosphorylation-independent desensitization of GABA(B) receptor by GRK4. *EMBO J.* 22(15):3816-24.
- Petri B, Homberg U, Loesel R, Stengl M.** (2002) Evidence for a role of GABA and Mas-allatotropin in photic entrainment of the circadian clock of the cockroach *Leucophaea maderae*. *J Exp Biol.* 205(10):1459-69.
- Pin J-P., Kniazeff J., Binet V., Liu J., Maurel D., Galvez T., Duthey B., Havlickova M., Blahos J., Prezeau L., Rondard P.** (2004) Activation mechanism of the heterodimeric GABA<sub>B</sub> receptor. *Biochemical Pharmacology* 68:1565-1572.
- Pipa RL.** (1978) Locations and central projections of neurons associated with the retrocerebral neuroendocrine complex of the cockroach *Periplaneta americana* (L.). *Cell Tissue Res.* 193(3):443-55.
- Pipa RL.** (1988) Muscles and nerves of the posterior abdomen and genitalia of male *Periplaneta americana* (L.) (Dictyoptera : Blattidae) *Int. J. Insect Morphol. & Embryol.* 17(6):455-471.
- Ponimaskin E, Dumuis A, Gaven F, Barthet G, Heine M, Glebov K, Richter DW, Oppermann M.** (2005) Palmitoylation of the 5-hydroxytryptamine<sub>4a</sub> receptor regulates receptor phosphorylation, desensitization, and beta-arrestin-mediated endocytosis. *Mol Pharmacol* 67(5):1434-43.
- Pontier S.M., Lahaie N., Ginham R., St-Gelais F., Bonin H., Bell D.J., Flynn H., Trudeau L-E., McIlhinney J., White J.H., Bouvier M.** (2006) Coordinated action of NSF and PKC regulates GABA<sub>B</sub> receptor signaling efficacy. *The EMBO Journal* 25:2698-2709.
- Pregitzer P., Schultze A., Raming K., Breer H., Krieger J.** (2013) Expression of a GABA<sub>B</sub> - Receptor in Olfactory Sensory Neurons of Sensilla trichodea on the Male Antenna of the Moth *Heliothis virescens*. *Int J Biol Sci.* 9(7):707-15.
- Probst WC., Snyder LA., Schuster DI., Brosius J., Sealfon SC.** (1992) Sequence alignment of the G-Protein coupled receptor superfamily. *DNA Cell Biol.* 11(1):1-20.
- Prosser HM., Gill CH., Hirst WD., Grau E., Robbins M., Calver A., Soffin EM., Farmer CE., Lanneau C., Gray J., Schenck E., Warmerdam BS., Clapham C., Reavill C., Rogers DC., Stean T., Upton N., Humphreys K., Randall A., Geppert M., Davies CH., Pangalos MN.** (2001) Epileptogenesis and Enhanced Prepulse Inhibition in GABA<sub>B1</sub>-Deficient Mice. *Molecular and Cellular Neuroscience* 17:1059-1070.
- Puckerin A., Liu L., Permaul N., Carman P., Lee J., Diversé-Pierluissi MA.** (2006) Arrestin is required for agonist-induced trafficking of voltage-dependent calcium channels. *J Biol Chem.* 281(41):31131-41.
- Qanbar R., Bouvier M.** (2003) Role of palmitoylation/depalmitoylation reactions in G-protein-coupled receptor function. *Pharmacology & Therapeutics* 97:1-33.
- Raghu SV., Claussen J., Borst A.** (2013) Neurons with GABAergic phenotype in the visual system of *Drosophila*. *J Comp Neurol.* 521(1):252-65.
- Raiteri M.** (2008) Presynaptic metabotropic glutamate and GABA<sub>B</sub> receptors. *Handb Exp Pharmacol.* (184):373-407.
- Ramoino P., Ledda FD., Ferrando S., Gallus L., Bianchini P., Diaspro A., Fato M., Tagliafierro G., Manconi R.** (2011) Metabotropic  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA<sub>B</sub>) receptors modulate feeding behavior in the calcsponge *Leucandra aspera*. *J Exp Zool A Ecol Genet Physiol.* 315(3):132-40.

- Rast G.F., Bräunig P.** (2001) Insect mouthparts motor patterns: central circuits modified for highly derived appendages? *Neuroscience* 108(1):167-176.
- Richter K, Böhm GA.** (1997) The molting gland of the cockroach *Periplaneta americana*: secretory activity and its regulation. *Gen Pharmacol.* 29(1):17-21.
- Robbins MJ., Calver AR., Filippov AK., Hirst WD., Russell RB., Wood MD., Nasir S., Couve A., Brown DA., Moss SJ., Pangalos MN.** (2001) GABA<sub>B2</sub> is essential for g-protein coupling of the GABA<sub>B</sub> receptor heterodimer. *J Neurosci.* 21(20):8043-52.
- Robinson N., Wells F.** (1973) Distribution and localization of sites of gamma aminobutyric acid metabolism in the adult rat brain. *J Anat.* 114(3):365-78.
- Römppler H., Stäubert C., Thor D., Schulz A., Hofreiter M., Schöneberg T.** (2007) G Protein-Coupled Time Travel *Evolutionary Aspects of GPCR Research. molecular interventions* 7(1):17-25.
- Root CM., Masuyama K., Green DS., Enell LE., Nässel DR., Lee C-H., Wang JW.** (2008) A Presynaptic Gain Control Mechanism Fine-Tunes Olfactory Behavior. *Neuron* 59(2):311-321.
- Rosahl TW., Spillane D., Missler M., Herz J., Selig DK., Wolff JR., Hammer RE., Malenka RC., Südhof TC.** (1995) Essential functions of synapsins I and II in synaptic vesicle regulation. *Nature.* 375(6531):488-93.
- Röser C., Jordan N., Balfanz S., Baumann A., Walz B., Baumann O., Blenau W.** (2012) Molecular and pharmacological characterization of serotonin 5-HT<sub>2α</sub> and 5-HT<sub>7</sub> receptors in the salivary glands of the blowfly *Calliphora vicina*. *PLoS One.* (11): e49459.
- Roth J.** (2002) Protein N-Glycosylation along the Secretory Pathway: Relationship to Organelle Topography and Function, Protein Quality Control, and Cell Interactions. *Chem. Rev.* 102:285-303.
- Rotte C.** (2009) Die neuronale Kontrolle der Speicheldrüsen der Schabe *Periplaneta americana*. Dissertation, <http://opus.kobv.de/ubp/volltexte/2009/3945/>.
- Rotte C., Witte J., Blenau W., Baumann O., Walz B.** (2009) Source, topography and excitatory effects of GABAergic innervations in cockroach salivary glands. *J Exp Biol.* 212:126-136.
- Safiulina VF., Fattorini G., Conti F., Cherubini E.** (2006) GABAergic signaling at mossy fiber synapses in neonatal rat hippocampus. *J Neurosci.* 26(2):597-608.
- Santos ML., Mota-Miranda A., Alves-Pereira A., Gomes A., Correia J., Marçal N.** (2004). Intrathecal baclofen for the treatment of tetanus. *Clinical Infectious Diseases*, 38(3), 321-328.
- Sakaba T., Neher E.** (2003) Direct modulation of synaptic vesicle priming by GABA<sub>(B)</sub> receptor activation at a glutamatergic synapse. *Nature.* 424(6950):775-8.
- Sattelle DB., Pinnock RD., Wafford KA., David JA.** (1988) GABA receptors on the cell-body membrane of an identified insect motor neuron. *Proc R Soc Lond B Biol Sci.* 232(1269):443-56.
- Sattelle DB., Harrison JB., Chen HH., Bai D., Takeda M.** (2000) Immunocytochemical localisation of putative γ-aminobutyric acid receptor subunits in the head ganglia of *Periplaneta americana* using an anti-RDL C-terminal antibody. *Neuroscience Letters* 289:197-200.
- Schäfer S., Bicker G.** (1986) Distribution of GABA-like immunoreactivity in the brain of the honeybee. *J Comp Neurol.* 246(3):287-300.



- Schäfer P.L., Ritzmann R.E.** (2001) Descending Influences on Escape Behaviour and Motor Pattern in the cockroach. *J Neurobiol.* 49:9-28.
- Schnee M., Rauh J., Buckingham SD., Sattelle DB.** (1997) Pharmacology of skeletal muscle GABA-gated chloride channels in the cockroach *Periplaneta americana*. *J Exp Biol.* 200(23):2947-55.
- Schuler V., Lüscher C., Blanchet C., Klix N., Sansig G., Klebs K., Schmutz M., Heid J., Gentry C., Urban L., Fox A., Spooren W., Jatou A-L., Vigouret J-M., Pozza M., Kelly PH., Mosbacher J., Froestl W., Käslin E., Korn R., Bischoff S., Kaupmann K., van der Putten H., Bettler B.** (2001) Epilepsy, Hyperalgesia, Impaired Memory and Loss of Pre- and Postsynaptic GABA<sub>B</sub> Responses in Mice Lacking GABA<sub>B</sub>(1). *Neuron* 31:47-58.
- Schwarz DA., Barry G., Eliasof SD., Petroski RE., Conlon PJ., Maki RA.** (2000) Characterization of gamma-aminobutyric acid receptor GABA<sub>B</sub>(1e), a GABA<sub>B</sub>(1) splice variant encoding a truncated receptor. *J Biol Chem* 276(12):9582.
- Shepard S., McCreary M., Fedorov A.** (2009) The peculiarities of large intron splicing in animals. *PLoS One.* 4(11):e7853.
- Simon J., Wakimoto H., Fujita N., Lalande M., Barnard EA.** (2004) Analysis of the set of GABA<sub>A</sub> receptor genes in the human genome. *J Biol Chem.* 279(40):41422-35.
- Sinakevitch IG., Geffard M., Pelhate M., Lapied B.** (1994) Octopamine-like immunoreactivity in the dorsal unpaired median (DUM) neurons innervating the accessory gland of the male cockroach *Periplaneta americana*. *Cell & Tissue Research* 276(1):15-21.
- Sinakevitch IG., Geffard M., Pelhate M., Lapied B.** (1996) Anatomy and targets of Dorsal Unpaired Median neurones in the Terminal Abdominal Ganglion of the male cockroach *Periplaneta americana* L. *J Comp Neurol.* 367(1):147-63.
- Sivilotti L., Nistri A.** (1991) GABA Receptor Mechanisms in the Central Nervous System. *Progress in Neurobiology* 36:35-92.
- Sonnhammer EL., von Heijne G., Krogh A.** (1998) A hidden Markov model for predicting transmembrane helices in protein sequences. *Proc Int Conf Intell Syst Mol Biol.* 6:175-82.
- Stengl M., Homberg U.** (1994) Pigment-dispersing hormone-immunoreactive neurons in the cockroach *Leucophaea maderae* share properties with circadian pacemaker neurons. *J Comp Physiol A.* 175(2):203-13.
- Storch V., Welsch U.** (2009) Kükenthal - Zoologisches Praktikum. Elektronische Ressource, 26. Auflage, Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag, S. 259.
- Sutherland DJ., Chillseyzn JM.** (1968) Function and operation of the cockroach salivary reservoir. *J Insect Physiol.* 14(1):21-31.
- Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., Kumar S.** (2011) MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods.. *Mol Biol Evol.* 28(10):2731-9.
- Tappaz ML., Brownstein MJ., Kopin IJ.** (1977) Glutamate decarboxylase (GAD) and gamma-aminobutyric acid (GABA) in discrete nuclei of hypothalamus and substantia nigra. *Brain Res.* 125(1):109-21.

- Terunuma M, Pangalos MN, Moss SJ.** (2010) Functional modulation of GABA<sub>B</sub> receptors by protein kinases and receptor trafficking. *Adv Pharmacol.* 58:113-22.
- Thamm M., Balfanz S., Scheiner R., Baumann A., Blenau W.** (2010) Characterization of the 5-HT<sub>1A</sub> receptor of the honeybee (*Apis mellifera*) and involvement of serotonin in phototactic behavior. *Cell Mol Life Sci.* 67(14):2467-79.
- Thompson JD., Higgins DG., Gibson TJ.** (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22(22):4673-4680.
- Trautwein MD., Wiegmann BM., Beutel R., Kjer KM., Yeates DK.** (2012) Advances in insect phylogeny at the dawn of the postgenomic era. *Annu Rev Entomol.* 57:449-68.
- Troppmann B., Balfanz S., Baumann A., Blenau W.** (2010) Inverse agonist and neutral antagonist actions of synthetic compounds at an insect 5-HT<sub>1</sub> receptor. *Br J Pharmacol.* 159(7):1450-62.
- Srivastava M., Begovic E., Chapman J., Putnam NH., Hellsten U., Kawashima T., Kuo A., Mitros T., Salamov A., Carpenter ML., Signorovitch AY., Moreno MA., Kamm K., Grimwood J., Schmutz J., Shapiro H., Grigoriev IV., Buss LW., Schierwater B., Dellaporta SL., Rokhsar DS.** (2008) The *Trichoplax* genome and the nature of placozoans. *Nature.* 454(7207):955-60.
- Tsuchiya D., Kunishima N., Kamiya N., Jingami H., Morikawa K.** (2002) Structural views of the ligand-binding cores of a metabotropic glutamate receptor complexed with an antagonist and both glutamate and Gd<sup>3+</sup>. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99(5):2660-2665.
- Vanden Broeck J** (2001) Insect G protein-coupled receptors and signal transduction. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 48:1-12.
- Vargas AJ., Terunuma M., Tello JA., Pangalos MN., Moss SJ., Couve A.** (2008) The Availability of Surface GABA<sub>B</sub> Receptors Is Independent of  $\gamma$ -Aminobutyric Acid but Controlled by Glutamate in Central Neurons. *J Biol Chem.* 283(36):24641-24648.
- Vigot R., Barbieri S., Bräuner-Osborne H., Turecek R., Shigemoto R., Zhang YP., Luján R., Jacobson LH., Biermann B., Fritschy JM., Vacher CM., Müller M., Sansig G., Guetg N., Cryan JF., Kaupmann K., Gassmann M., Oertner TG., Bettler B.** (2006) Differential compartmentalization and distinct functions of GABA<sub>B</sub> receptor variants. *Neuron.* 50(4):589-601.
- Vlachou S., Markou A.** (2010) GABA<sub>B</sub> receptors in reward processes. *Adv Pharmacol.* 58:315-71.
- Vogt KE., Nicoll RA.** (1999) Glutamate and gamma-aminobutyric acid mediate a heterosynaptic depression at mossy fiber synapses in the hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96(3):1118-22.
- Waldmeier PC., Wicki P., Feldtrauer JJ., Mickel SJ., Bittiger H., Baumann PA.** (1994) GABA and glutamate release affected by GABA<sub>B</sub> receptor antagonists with similar potency: no evidence for pharmacologically different presynaptic receptors. *Br J Pharmacol.* 113(4):1515-1521.
- Waldmeier PC., Kaupmann K., Urwyler S.** (2008) Roles of GABA<sub>B</sub> receptor subtypes in presynaptic auto- and heteroreceptor function regulating GABA and glutamate release. *J Neural Transm.* 115(10):1401-11.
- Walker MC., Ruiz A., Kullmann DM.** (2001) Monosynaptic GABAergic signaling from dentate to CA3 with a pharmacological and physiological profile typical of mossy fiber synapses. *Neuron.* 29(3):703-15.

- Watkins BL., Burrows M.** (1989) GABA-like immunoreactivity in the suboesophageal ganglion of the locust *Schistocerca gregaria*. *Cell and Tissue Research* 258(1):53-63.
- Wellendorph P., Bräuner-Osborne H.** (2009) Molecular basis for amino acid sensing by family C G-protein-coupled receptors. *Br J Pharmacol.*156: 869-884.
- Wess J.** (1997) G-protein-coupled receptors: molecular mechanism involved in receptor activation and selectivity of G-protein recognition. *The FASEB Journal* 11:346-354.
- White JA., Wise A., Main MJ., Green A., Fraser NJ., Disney GH., Barnes AA., Emson P., Foord SM., Marshall FH.** (1998) Heterodimerization is required for the formation of a functional GABA<sub>B</sub> receptor. *Nature* 396:679-682.
- White JH., McIlhinney RA., Wise A., Ciruela F., Chan WY., Emson PC., Billinton A., Marshall FH.** (2000) The GABA<sub>B</sub> receptor interacts directly with the related transcription factors CREB2 and ATFx. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97(25):13967-72.
- Wilkins ME, Li X, Smart TG.** (2008) Tracking cell surface GABA<sub>B</sub> receptors using an alpha-bungarotoxin tag. *J Biol Chem.* 283(50):34745-52.
- Wilson RI, Laurent G.** (2005) Role of GABAergic Inhibition in Shaping Odor-evoked Spatiotemporal Patterns in the *Drosophila* Antennal Lobe. *J Neurosci.* 25(40):9069-9079.
- Witte J.** (2006) GABAerge Innervierung der Speicheldrüse von *Periplaneta americana*. *Diplomarbeit, eingereicht an der Universität Potsdam.*
- Yamazaki Y, Nishikawa M, Mizunami M.** (1998) Three classes of GABA-like immunoreactive neurons in the mushroom body of the cockroach. *Brain Res.* 788(1-2):80-6.
- Yan B., Zhang W., Ding J., Gao P.** (1999) Sequence Pattern for the Occurrence of N-Glycosylation in Proteins. *J Biol Chem.* 18(5):511-521.
- Yu B., Yamada K., Gallagher JP.** (1999) GABA<sub>B</sub> auto- versus hetero-receptor sensitivity: implications for novel pharmacotherapy. *Neuropharmacology.* 38(11):1805-1809.
- Zander JF., Münster-Wandowski A., Brunk I., Pahner I., Gómez-Lira G., Heinemann U., Gutiérrez R., Laube G., Ahnert-Hilger G.** (2010) Synaptic and vesicular coexistence of VGLUT and VGAT in selected excitatory and inhibitory synapses. *J Neurosci.* 30(22):7634-45.
- Zhang J., Tian N., Slaughter M.M.** (1998) Neuronal Discriminator Formed by Metabotropic  $\gamma$ -Aminobutyric Acid Receptors. *J Neurophysiol* 80:3365-3368.

## 6. ANHANG

### Verwendete Abkürzungen

---

Abb.	Abbildung
AC	<i>Adenylylcyclase</i> (Adenylylzyklase)
AS	Aminosäure
bp	Basenpaare
ca.	circa
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CREB	<i>cAMP response element binding</i>
Dm	<i>Drosophila melanogaster</i>
cDNA	komplementäre DNA (doppelsträngige DNA-Kopie einer mRNA)
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
ECL2	<i>extra cellular loop 2</i> (extrazelluläre Schleife 2)
ER	Endoplasmatisches Retikulum
EST	<i>expressed sequence tag</i>
EZD	extrazelluläre Domäne
GA	Glutaraldehyd
GABA	$\gamma$ -Aminobutyric acid ( $\gamma$ -Aminobuttersäure)
GABA-T	$\alpha$ -Oxoglutarat-Transaminase
GAD	Glutamat-Decarboxylase
GB1	GABA <sub>B</sub> -Rezeptor-Subtyp 1
GB2	GABA <sub>B</sub> -Rezeptor-Subtyp 2
GB3	GABA <sub>B</sub> -Rezeptor-Subtyp 3
GDP	Guanosindiphosphat
GHB	$\gamma$ -Hydroxybuttersäure
GPCR	<i>g protein-coupled receptor</i> (G-Protein-gekoppelter Rezeptor)
GSP	Gen-spezifischer Primer
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HA-Tag	Hämagglutinin A-Tag
ICL2	<i>intracellular loop 2</i> (intrazelluläre Schleife 2)
MBP	Maltose-Bindeprotein
min	Minute
mRNA	<i>messenger RNA</i>
ORF	<i>open reading frame</i> (offener Leserahmen)
ORN	olfaktorische Rezeptorneurone
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion)
Pea	<i>Periplaneta americana</i> (Amerikanische Großschabe)
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
RACE	<i>Rapid Amplification of cDNA Ends</i>
RDL	<i>resistant to dieldrin</i> (Invertebraten GABA <sub>A</sub> -Rezeptor-Untereinheit)
RE	Restriktions-Endonuklease
RG	Reaktionsgefäß

RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SDN	<i>salivary duct nerve</i> (Speichelgangnerv)
SN	Speichelneuron
SOG	Suboesophagealganglion, Unterschlundganglion
Tab.	Tabelle
TM	Transmembrandomäne
U.	<i>Utriculus</i>
u. a.	unter anderem
UE	Untereinheit
UP	Universalprimer
UpM	Umdrehungen pro Minute
VFD	Venusfliegenfallendomäne
Vgl.	Vergleiche
VSP	Vectorette-spezifischer Primer
ZNS	zentrales Nervensystem

Tab. 6.1 Verwendete Geräte

<b>Gerät</b>	<b>Hersteller</b>
Agarose-Horizontalgelelektrophorese Hoefer <sup>TM</sup> HE33	Amersham Bioscience (Freiburg)
Binokular Stemi 2000	Zeiss (Jena)
Dry Bath Incubator	Kisker (Steinfurt)
Electrophoresis Power Supply EPS 600	Pharmacia Biotech (Dübendorf)
Feinwaage BP 210 D	Sartorius (Göttingen)
Fluoreszenz-Lesegerät FluoStar Galaxy	BMG Labtech (Ortenberg)
Gefriermikrotom Microm HM 550	Thermo Scientific (Bonn)
Gel-Dokumentationssystem (GelSystem 8 Entry)	Biostep (Jahnsdorf)
Gradientenmischer	Bio-Rad (München)
Konfokalmikroskope LSM 510, LSM 710	Zeiss (Jena)
Kühlzentrifuge Heraeus Biofuge Primo R	Thermo Scientific (Bonn)
Labor-pH-Meter 766 Calimatic <sup>®</sup>	Knick (Berlin)
Laborwaage BP 310 S	Sartorius (Göttingen)
Magnetrührer IKAMAG <sup>®</sup> RCT basic	IKA Labortechnik (Staufen)
Microwave 800	Severin (Sundern)

Milli-Q Reference Ultrapure Water Purification System	Millipore (Schwalbach)
Mini Protean IITM System	Bio-Rad (München)
Mixer UZUSIO VTX-3000L	LMS (Brigachtal)
Peristaltikpumpe Pump P-1	Pharmacia Biotech (Dübendorf)
Spektralphotometer GeneQuant 1300	GE Healthcare (München)
Stabsonifizierer/Ultraschallprozessor UP 50H	Hielscher Ultrasonics GmbH (Teltow)
T3 Thermocycler	Biometra (Göttingen)
Thermomixer comfort	Eppendorf (Hamburg)
Tischzentrifuge, Biofuge pico	Heraeus (Hanau)
Trans-Blot® SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell	Bio-Rad (München)
Trockenschrank T6	Heraeus (Hanau)
UV-Illuminator	Vilber Lourmat (Marne La Vallee, Frankreich)
Vakuumpzentrifuge	Bachofer (Reutlingen)
Varioklav Dampfsterilisator	Thermo Scientific (Bonn)
Warmluftschüttler (Shaker ES-20)	Peqlab (Erlangen)

Tab. 6.2 Kommerzielle Kits

<b>Kit</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Verwendungszweck</b>
5'/3' RACE Kit, 2nd Generation	Roche (Mannheim)	RACE-PCR
AccuScript™ High Fidelity 1st Strand cDNA Synthesis	Stratagene (Amsterdam, Niederlande)	cDNA-Synthese
High Pure PCR Product Purification Kit	Roche (Mannheim)	DNA-Reinigung, Fragmentisolierung
Micro-FastTrack™ 2.0 Kit	Invitrogen (Karlsruhe)	mRNA Extraktion
peqGOLD Plasmid Miniprep Kit I	Peqlab (Erlangen)	Isolation von Plasmid-DNA
pGEM®-T Vector Systems	Promega (Mannheim)	Ligation
SMARTer™ RACE cDNA Amplification Kit	Clontech (Heidelberg)	RACE-PCR
Superscript III™ First-Strand Synthesis System for RT-PCR	Invitrogen (Karlsruhe)	cDNA-Synthese
Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate	Thermo Scientific (Bonn)	Western-Blot-Analyse

Tab. 6.3 Bakterienstämme

<b>Bakterienstämme</b>		
E. coli JM109		Promega (Mannheim)
E. coli T7 Express lys Y	BL21-Derivat	NEB (Frankfurt am Main)

Tab. 6.4 Vektoren

<b>Vektoren</b>	
pGEM-T	Promega (Mannheim)
pBluescript II SK (-)	Stratagene (Amsterdam)
pcDNA3.1 (+)	Invitrogen (Karlsruhe)
pcDNA myc His A	Invitrogen (Karlsruhe)

Tab. 6.5 Rezeptorliganden

<b>Verwendete Rezeptorliganden</b>		
GABA	100 mM in H <sub>2</sub> O	Sigma (Taufkirchen)
Baclofen	50 mg/ml 1 M HCl	Sigma (Taufkirchen)
3-APPA	100 mM in H <sub>2</sub> O	Activate Scientific
SKF97541	100 mM in H <sub>2</sub> O	Tocris (Wiesbaden-Nordenstadt)
GHB ( $\gamma$ -Hydroxybuttersäure)	100 mM in H <sub>2</sub> O	Dr. M. Holschbach, INM 5, Forschungszentrum Jülich
CGP54626 Hydrochlorid	100 mM in DMSO	Tocris (Wiesbaden-Nordenstadt)
CGP52432	10 mM in H <sub>2</sub> O	Tocris (Wiesbaden-Nordenstadt)
CGP55845 Hydrochlorid	100 mM in DMSO	Tocris (Wiesbaden-Nordenstadt)
Bicucullin	100 mM in DMSO	Tocris (Wiesbaden-Nordenstadt)
Picrotoxin	100 mM in DMSO	Sigma (Taufkirchen)

Tab. 6.6 primäre Antikörper

<b>primäre Antikörper</b>	<b>Antigen</b>	<b>Spezies (Typ)</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Bezugsquelle</b>
anti-PeaGB1	<i>P. americana</i> GB1	Kaninchen (polyklonal)	1:1.000 WB 1:1.000 IHC	
anti-PeaGB2	<i>P. americana</i> GB2	Meerschweinchen (polyklonal)	1:1.000 WB -	
anti-HA	HA-Tag	Ratte (monoklonal)	1:5.000 WB -	Roche
anti-GABA	GABA-KLH-Konjugat	Meerschweinchen (polyklonal)	- 1:1.000 IHC	Biotrend (Köln)
SYNORF 1 (anti-Synapsin)	<i>Drosophila</i> Synapsin	Maus (monoklonal) IgG2b	1:25 WB 1:25 IHC	E. Buchner (Klagges <i>et al.</i> , 1996)

Tab. 6.7 sekundäre Antikörper &amp; weitere farbstoffgekoppelte Konjugate

sekundäre Antikörper & weitere farbstoffgekoppelte Konjugate	Verdünnung	Bezugsquelle
Ziege-anti-Kaninchen-HRP IgG	1:20.000	Jackson Immuno Research Laboratories
Ziege-anti-Meerschweinchen-HRP IgG	1:10.000	American Qualex (San Clemente)
Ziege-anti-Ratte-HRP IgG	1:10.000	Jackson Immuno Research Laboratories
Ziege-anti-Kaninchen-Alexa 488	1:100	Molecular Probes (Darmstadt)
Ziege-anti-Kaninchen-Cy3	1:200	Jackson Immuno Research Laboratories
Ziege-anti-Meerschweinchen-Cy3	1:200	Jackson Immuno Research Laboratories
Ziege-anti-Maus-Cy3	1:400	Jackson Immuno Research Laboratories
AlexaFluor® CF633 Phalloidin	1:200	Molecular Probes (Darmstadt)
DAPI	1:25.000	Jackson Immuno Research Laboratories

Tab. 6.8 verwendete Oligonukleotide

Primer	Sequenz	Position Nukleotid
PeaGB1-R6	5'-CTGTGGCAGATGGATGCGTTCGG-3'	575-598
PeaGB1fl-F	5'-CTGAATTCGGCACTGGTTAACGCTTAGTC-3'	86-106
PeaGB1fl-R	5'-GAGGATCCTGTAAAGGTACACAAACCACTTCC-3'	2785-2807
PeaGB2-R1	5'-CGTAAGGTGCCAGCGTCGGGACG-3'	560-582
PeaGB2-F2	5'-GACCAAACAAATGGAGC-3'	1986-2002
PeaGB2-R2	5'-TAYTCIACDATRTRCAYTT-3'	
PeaGB2-F3	5'-GGCGGGGTTTTTCGCTCGCTTTCGG-3'	1796-1820
PeaGB2-R3	5'-GAGACGAATGGAGGTGGTGTAC-3'	4080-4102
<b>Spezifische Primer (Expressionsvektoren)</b>		
PeaGB1fl-pcDNA-F	5'-CTGGATCCGCCACCATGTATTTCGCTATGTAATAC-3'	
PeaGB1fl-pcDNA-R	5'-GTCTAGCGGCCGCCAGGAATATTGCACCACGATG-3'	
PeaGB2fl-pcDNA-F	5'-TGGATGCTAGCGCCACCATGGCGCTGCTCGGCGCGTG-3'	
PeaGB2fl-pcDNA-R	5'-GATCAGCGGCCGCCCTAAAGCGTAATCTGGAACATCGTATGGGTACAAGTATTCCACGATGTCGC-3'	
DmGB2fl-pcDNA-F	5'-CAGGATCCGCCACCATGTTCCGGCCAAG-3'	
DmGB2fl-pcDNA-R	5'-GATCAGCGGCCGCCCTAAAGCGTAATCTGGAACATCGTATGGGTACAAGTACTCGACGATATCGC-3'	

(Y = C oder T; D = A,G oder T; R = A oder G; Inosin (I) = A,G,C, oder T)

ATG = Startcodon; TAA = Stoppcodon

Schnittstellen für Restriktionsenzyme: GGATCC (BamHI), GCTAGC (NheI), GCGGCCGC (NotI)

HA-Tag: TACCCATACGATGTTCCAGATTACGCT  
AGCGTAATCTGGAACATCGTATGGGTACA



## PeaGB1

```

AGACGGGTATGACGGGGGTAGGTGGTGTAAATTTAGCTGAGTTGAATTCGTNATGGTATTTAAATTTGTCAAATTTAAAAGTAACTGGCAC 90
TGGTTAACCGTTAGTCGCGTTTGGCTATTTCGCTATGTAATACTATCAAATTTGGAAATATGCCCTTCTGATAAACCACCCCTCAGATACTC 180
GAGAGTTGCAGTGCAGTTGCGGATGATACTGATGACGACAATGTACTTCCATAGGAGGTATATTTCCCATAGGAGGCAAAGGCCGATGG 270
CAGGGCGGACAGGCTTGTGAGCCAGCTGCTTCCCTTGGCCCTGGATGACGTTAACCAACAGGAAAGACTTGTGACAGGCTTACCGCTGAAG 360
TTACATTGGAATGATAGCGAGTGTGAACCCGGTCTTGGAGCATCAGTCATGTACAATTTGTTGTACAACAAAGCCACAGAAGCTCATGCTG 450
TTGGTGGGTGCAGCACTGTGTGTACCCAGTTGCCAAGCTGCCAAGATGTGGAATTTAGTTGTGCTGTGTTACGGTGCAGTTCTCCA 540
GCACCTTTCAGATCGCAATCGTTCCCTACACTTTCCGAACGCATCCATCTGCCACGTGCATAATCCAACACGCATCAAAGCTATGGAG 630
AAGTTTGGTTGGTCCAGTGTGTGCTATTTTGCAGCAAGCAGAGGAAGTCTTTATATCTACAGTTGAAGATCTTGAAGCCCGATGTAAGAG 720
ATCGGCATTTGAAATAGTGACACGACAGAGTTTCTGAGCGATCCGACTGACGCTGTGCGCAACTTCCGGCGTCAAGATGCTCGGATAATT 810
GTGGGTTTGTTCAGTCTGTGGCCGCTGTAGAGTCTTTGTGAAATGTATAAGCAGCACATCTATGGAAGTCAACGTTGTTGTTCTT 900
ATAGGTTGGTATGAAGATAACTGGTTTGAAGTGAATTTAGAAAAGGAAGAAATTTGAATGCACAAAAGAAACAAATGAGGCAGCTGCCGAA 990
GGCCATCTCACGACTGAAGCCCTGATGTGGAACCAGAACAATCAACGCACAATATCTGGCAAGACGCTCTGAGGATTTCCGCTGCGCTT 1080
AACGAGGTGCTACGTACAGCGGGCTATGACATAGACAACATGCCCTATCCTGAGGGCTACCAAGAGGCTCCGCTGGCGTATGATGCCGTT 1170
TGGGCCCTTCCCTGGCATTCAACAAGCAATGGAAGGTTAAACAACATGGGAGAAGTCTGAAAAATTTTACATATACAGATAAAGAA 1260
ACACCTGACAACATATATGCTGGCCATCAACAGCACGCAATTTCCCTGGCCCTTCTGTTATGTTGGCTTACAGCTCAGGGCGACAGATA 1350
GCGCTGACACAGATCGAACAGATGATTAATGGAACATACGTTAAAGCTAGGATATTTACGACACCCAGAGTGACAACTGACATGGCTGAAC 1440
AGGGAGAAATGGAGCGGAGGCAAAGTTCCACAGGACCCGACCATCGTGCGCCAGGTGCTGCGCACAGTTTCCCTTCCCTCTCTCACTG 1530
ATGTGGACGATCTTGTATAGGAATTTAGGCTGCCATAGCCCTTATTGTGTTCAATTTTGGTACCCCCACAGGAGGTCATCCAGTCC 1620
TCCCACCCCGTGTGCAACACCCATCATGTTGCTGGGGGTGTGCCAGTGTGTTGCTGCTGTTTCTGCTAGGACTGGACGGTCAAGTTGTG 1710
AGTCCGCGGTGTACCCGATAGTGTGCCAGGCTCGGGCTGGCTGCTGTGCATCGGCTTCACTTGGCGTATGGAGCCATGTTTCAGCAA 1800
GTGTGGAGAGTGCACCGCTAACCCACGAAAGCAAAATCAGAGGTTAAGAAAGTGAACCTTGGAGCTGTACCTGATGGTGAAGTGGATT 1890
CTATTAGTAGACCTTGTGCTTCTGCTGACATGGCAGTTGACGATCTCTGACGCGGCGGATAGAAGTGTTCCTTGGAAAGTCCAGT 1980
TCAACCTGAATCAAAATACAAACCCCGACCTGGGGATGACCAAGGAAGACGAAAGCGGTTATCAAAAATCTGGTGGCTGAGAATGAAGAACT 2070
AAGGGTCTTGTACTGGTGTTCGGCTTGTCTGGCGTATGAAACAAGAAGCATCAAGTGAAGCAGATCAATGACTCACGCTACGCGGG 2160
ATGTCTATTTACACGTTGGTGGTGTGCTGTCCCTCATCACGGCCCGGTCACCATGGTCAATGCTCCACAACAAGATGCCAGCTTCGGGTT 2250
GTTGCGCTTGTGCTATCTTCTGCTGTTTCCCTCAGTATGGCACATTTTTTGTTCCTAAGGTGATAGAAGTGAACGCCATCCAAGAGAC 2340
AAGGCTGAATCAAAATACAAACCCCGACCTGGGGATGACCAAGGAAGACGAAAGCGGTTATCAAAAATCTGGTGGCTGAGAATGAAGAACT 2430
CAGAAACTCATATCAGCTAAAGAAGAGAAGATACGATTGATCAAGATTCGACTGCAGGAGCGAGATGCCGTTGCGGGGAGGCGTGACGGAC 2520
GGACGTTTGAACACCCCGCACCCAGGACTCCACTGCCAACACAGATTTCTTAAAGATCAAGGAAGATATTTCAATTCATCGTGGTGCATAGT 2610
TCCGATATGCTAGTAGTAATGTAAGGTTAAAGGTAATGTTTGAAGACTTTTGTGATGCTGATGCTTGGCTGTGATGGGTGAATGGAAC 2700
CAAAGGAGCATTCAACTTTAAGACAAATATGTGTTAATTTTCACTATTTTCAACCTGAGTTCAATAGCACTTAATTTATTGGAAAGT 2790
GGTTTGTGTAACCTTACCTTCCCTTGTCAAAAGACAGCAATACAGGTTATTTTGGATGAAACAAAAAAGT 2878

```

**Abb. 6.1:** Nukleinsäuresequenz des GABA<sub>B</sub>-Rezeptor-Subtyps 1. Die Nukleotidabfolge ist in 5'-3'-Richtung dargestellt. Die Position des letzten Nukleotids jeder Zeile ist rechts neben der Sequenz angegeben. Das Start-Codon (ATG) sowie die im Leserahmen vorhandenen Stopp-Codons (TAA, TGA) sind grau unterlegt.

## PeaGB2

```

AGTGTCTGAGCAGCCTCCCGGAGCTCGCTCGCCCTCTCCACCCGTTGTTGTGTTCTGTTTGTGCCGGGTTCTTCGCTCTGTGGACAT 90
GCTCAAGTGAGCGGGAGAGGGCCCGAACGCCCGCGTGTGCTGACGACGGCGGACTTGGCCATGGTGTGGACGGACTACTACGAGCTC 180
AAGAGTTAGTGGCACAGCAAGAGCGGCTGCTCGGCGGTGCTGCTACGCTGCTGTGCTTCGCGTCTGTCCAGAAAGCCCAACCTGGCC 270
GGCAACAAGCGTTCGCGAGTGTACATCGCGGGCTTCTTCCCGTACGGAGTGCATCCCGAGTTCGCGGTGGGAGTGGCGTTATGCC 360
TCCGTGATGCTGGCCGTGGACCACATCAACGAGAACCCTCGGTGCTCCGCAACTACATGCTGCACATGTAATGGAACGACCCGAGTGC 450
AACCCCGCTGGCGGTGAAGGCTTCTTCGACATGATGCACATCGGACATCAAGGTTGATGCTGTTCCGGGCGGCTGACCGAGTGC 540
ACCGATCCCATCGCTAAAGCTTCCCGACCTGCGCACCTTACGCAGCTGTCTGACGCGGACGACCCCATGTTTACGAAAGCAACTTC 630
CCCAATTTCTTCCGCGTGGTGGCCAGTGTAGAAGCCTTCAACGCGCCCGCCTCAAGCTGTTGCAAGGATTCACCTGGAGCGCGTCCG 720
ACCATCTACCAGAACGAAACCCCGTACTCGCTGGCCGCAACACCTTGTGTTGCTGATCTGGACATGTTGGGTTCCCAAGTGGAGGAGAC 810
CAAAGCTTTGCTAACCGAGTGGCGTACGCCATGAACAACATGAAGGAGAGGAGTGAATCATCCTGGGCACTTCAACGAGCTGCGT 900
GCACGAAGAGTCTTCTGCGAAGCGCACAGGGCTGCGATGTTTGGCGGAAGTACCAGTGGATCAATAATGGGTACTATATCCGAGGAATG 990
TGGATGAACGAGGAAGGAATTTGACCGTGTGCTGTTGACCGAGTGGCGTCAAGGCTGGAAGGTTGCATCTCACGGATCTGCTGCCCTTA 1080
TCCACTAACGGAGAAATCACCCTTCTGGGATACCGCGGAGGATACCGCTGGAGTACGACTCGAGGCTGGCTCCGAGTATTCGCGC 1170
TTCACCGGCTACAGCTACGACGGCATCTGGGCGTGGCCATCCGACGCTGGCGCATCGCATCCGCCACTTTCGAAAAAACCG 1260
ACAGCTGTGGACTTCCGGTACCAGGACCCGCTGTGGGAGACCTGTTCTGAGGCTCTCCGCAACACCCAGCTTCGAGGAGTCCGAG 1350
CCAGTGAAGTTCACGACACGAGAGGAAGGCCAGCATTCTGCTGAAGCAGTTTCAAGACGGTTCCGAAATGAAGATAGGAGAATTCAC 1440
GGCGTAACGGAGCAGTTAGACCTGACGAGGGGGCACGCCATTCCTGGCACGGTCTGTTCCCTCCCAAGGACCCGACGCTCAGATCTTC 1530
GAGCACTCCACGCTCAACATAACGATTTACTCTTGTGGCGCCACGGCTTCTGTGGCATAGTGTATGGCCATCTGCTTTCGGCAATA 1620
AACATCACTTATCGCAACAGAGGTACATCAAGATGTGACGCACTACCTGATCAACCTGATCAATATCGGCTGCATGCTTACCTACAG 1710
AGCGTCACTTCTTCCGCGTGGACTCGACGCTGACGAGCTGGAGGCTTCCCTTACATCTGCACAGCTCGCGCTGGCTGCTCATGGCG 1800
GGGTTTTGCTGCTTTCGGCTCCATGTTTTCCAAGACTTGGCGTGTGCACTCCATCTTACGGACGTTGAAGCTCAACAAGAAAGTGTAT 1890
AAGGATTTACAGTGTTCATGTTGTTGGGCTCCTGCTGCTAGACCTGCCATCTGACTACGTTGGCAGGTCACGGATCCATTCTAC 1980
AGGGAGACCAAACTAAGAGGCTTCCCTTCCATCGGACGATCCTGATTTCCGATGTTCCGGAGAACGATCTCCGAGGACGAGCGG 2070
ATGACGATTTTCTGCTGGTTCGATATACGCTTACAAAGGATTTGCTCATGATTTTGGCGCTTCTGGCATGGGAGACGGCCACGTGAGC 2160
ATCCCGCCCTCAACGACTCCAAGTACGTCGGCATGAGCGTCAACAGCTGTTGCTCATGTTGCTGATGGGGGCCCTCAGCTTCGTTG 2250
CTGTGGCAAGCAGGATGCATCTTCTCATCATCTCGTGTTCATCATCTTCTGACCCACTGGCCTCTGCTCTGATTCGTTCTGTTCC 2340
AAGCTCATAGAACTGAAGAAATCCTCAAGGTCGATCGACAGCGGATGATTGCGACCACTTGCAGCCATTCGCAACCCGAGCGG 2430
GACTCTGTGGCGTCCGAATTTGGAAGAAAAGCTGAAAGACCGGAAGGCCTTCAATCAAAAATATCGCAAGCAGTTGCTGGAAGGGAGAC 2520
GAGCTGCAGATGTTGGTACGAAGGTTAGGGGATGAAGGTAGAGATATTTCTGATGATGATTTGGTATGGATCGACTTGCAGTCCACCG 2610
CATGATGCTTGTCTCAAGAGGGAAGAGACAAACCGAGATCAGCTCGCTCTGTTCCCTTAACTCATCCGAGGAGGGCGAGTACGTTCACT 2700
ACCGTAGAGACCCCTCCAGCAGAGGAAAAAGACCTCTTCTCAACTAAACCCGCTTCCATAGCGGTGATGGGTACAGCAACCTCCA 2790
CAACCTGGTGGATTGACGGGCGCTCCGCTGCGTATGCTTTCGCAAGAAGTCTGCTCTTCCGTTGAGAACAGGACCGCTTACCGACT 2880

```

```

GCGTCTGCGATGAGGACATCGCTGCTGGGCCGGAAGAGGCAGAGGACTCGGAACCTCTCATCGAGAGCAGCACAGCCTCCAAGCTCACT 2970
GTGTGGGGCGGTGAGAGTAATGTGCACCTTTGTGCCGAGGGCCCGGAAGAGGAGGAGGAAAGACGGCCACGTTCGATGAGGAGAAGTCGCTG 3060
GATCGGGCGCGTCTGCCACGCCACCGCCCGCCCTCGCGAAGGTGGTGAGCTTCGGCGACGTGACCAACACTCCCGCGTCTGCACCCATG 3150
CCAGCTCCTGCACCCGTGACAGTGGAGGACACGATTCTGCCGCCCGCGAAGCAGTTTACCCCGAAGCAGCAAGTCAGACCGCCGTGTTCG 3240
GCTCTCCGGCGACGCTCAAGCGTCAAGAGCGTGTCTAGCGGGAACAGCTCGGGCGCCGGCATGCAGGTCCTGGGTTCGAGAAGGACGAGC 3330
GTGCCAGTGTATGCCGTACAGCCCGGCACATGGTTCGCAGCAGAGAAGCCCAATCCCGCGTGGAAAGACTGCGTCTGCAGACGAGGGGT 3420
ACGGGGGAGATGTCTGTTTCCAGCGACGTGCTCAATGCCGGTGGCGGGGGTAAGGGATCGCCGCCCCCTATTTGCTCAATGGAGGAGGC 3510
ACTGACCTCCTGACATCTGGGGGCAACGCCCTCGTCAACCAGCTGGCTGCTATGGTGAAGACTTCTCCCTGCGATCAAGGGCCCTGACATG 3600
ACGATAATCCAGCGTTCGGTGTCCGAGAAGAGCAGGGAGCGGTCCGCCCTGTGCACCATCACCACCACCATCACCGGCCCGCGTGCAG 3690
CCGCCACCACCGGCCGGTTACCAGCCGACCCACATCCCGCAGCTGAAGCAGCAGAAGTCCGTGCTGCACGCGCACGTTAGAGCACGCCG 3780
AACGTGGCGTCCGACCAGCGCAGCGTCGCGCCACCCCGCCACCGCGCCCAACCGCCGCGCATGTGCTCGGGCGTTCGGAGGCGAG 3870
CTGCTGGACCTGGCCATCCTGCCATCTTCCAGAACTTCTGAGTGAGCGACACAAAAGTCGCTCTGGCTACGGCGCCTCCATCGCGTCC 3960
TGCCCCAACATCTCCATCAAGTGCAGCATCTGTGGAATACCTTAGGAAAGCGCGCACGTTTCCCTTAGTGTTCCTTTGCTGTCTTATGT 4050
CCAGACGTTCACTTCTGCTGTCAGGTAAGTGCACCCACTCCATTCTGCTC 4102

```

**Abb. 6.2:** Nukleinsäuresequenz des GABA<sub>B</sub>-Rezeptor-Subtyps 2. Die Nukleotidabfolge ist in 5'-3'-Richtung dargestellt. Die Position des letzten Nukleotids jeder Zeile ist rechts neben der Sequenz angegeben. Das Start-Codon (ATG) sowie die im Leserahmen vorhandenen Stopp-Codons (TAG, TGA) sind grau unterlegt.

```

CTTCGGCTCCATGTTTTCCAAGACGTGGCGTGTGCACCTCCATCTTACGGACGTGAAGCTCAACAAGAAGTGATCAAGGATTATCAGCT 90
GTTTCATGGTGGTGGGCGTCTGTCTCATAGACCTCGCCATCATGACTACGTGGCAGGTCACGGATCCATTCTACAGGGAGACCAAAACA 180
AATGGAGCCCTATCCCATCCATCGAGCGACGATATCCTGATTGTCCGGAGAAGCAGTACTGCCAGAGCGAGCGGATGACGATTTTCGT 270
CGGTTCCGATATACGCCCTACAAAGGATTGCTCATGATCTTTGGCCGTTCTGGCATGGGAGACGCCACCGTGCAGCATCCCGCCCTCAA 360
CGACTCCAAGTACGTCGGCATGAGCGTCTCAACCGTGGTTCATCATGTGCGTGTGGGGGCCCATCAGCTTCGTGTGTGGCACAAGCA 450
GGATGCATCTTTTCATCATCTCCTCGGTGTTTCATCATCTTCTGCACCACCGGCAGCTCTCTGCCTCGTATTCTGTCGCC 526

```

**Abb. 6.3:** Nukleinsäuresequenz des erhaltenen cDNA-Fragmentes EST 106697 aus der *P. americana* EST-Datenbank. Die Nukleotidabfolge ist in 5'-3'-Richtung dargestellt. Die Position des letzten Nukleotids jeder Zeile ist rechts neben der Sequenz angegeben.

```

CCCCCGGCCCTCTGCTCTTATTCTGCCCCAAGCTCATAGAACTGAAGAGAAACCTCAAGGGTCGATCGAAAAGCGGATGATTCGA 90
GCCACATTCGCACCCATGTCAAAACGAGGCGGGACTCTGTGGCGTCCGAAATGGAAAGAAAAGCTGAAAGACGCGAAGGCCTTCAATCAA 180
AAATTCGCAAGCAGTTGCTGGAAGGGAGACGGAGCTGCAGATGTTGGTACGAAGGTTAGGGGATGAAGGTAGAGATATTCGAGTCA 270
GATATTGGTATGGATCGACTTGCAGTGCACCGCATGATGCCCTTCTCAAGAGGGAAAGATTGGGAGTCGAGAAAACCAAAGTGCACAGCG 360
CAGTGGATCTTTGAAGACATCCGTCCCGACAGGATCCTGAGTTTCTGCCCGCTAATACAGAGACAACCAGATCAGCTCGCTCTGTTCC 450
CTTAACCTCATCGCAGGACGGCGAGTACGTCACCCCTACCGTAGAGACGCCCTCCGAGCAGAGGAAAAAGACCTCGTTCTCAACTAAACCG 540
CCTTCCATAGCGGTGATGGGTACACGAGAACTCCACAACCCGGTGGATTGACGGGCGCTCCCGCTGCGTTCATGCTTCCGAAGAAGTCG 630
TCGTTCTCGCTTGAAATCAGGACCCG 657

```

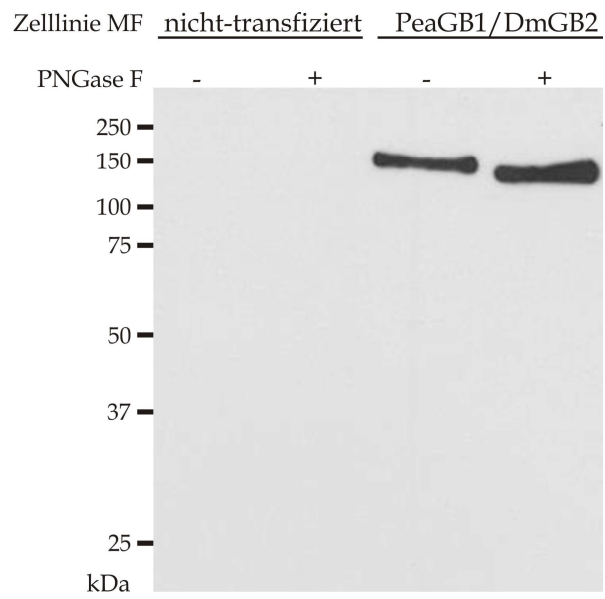
**Abb. 6.4:** Nukleinsäuresequenz des erhaltenen cDNA-Fragmentes EST 104580 aus der *P. americana* EST-Datenbank. Die Nukleotidabfolge ist in 5'-3'-Richtung dargestellt. Die Position des letzten Nukleotids jeder Zeile ist rechts neben der Sequenz angegeben.

```

GCGAGCTGCTGGACCTGGCCATCCTGCCATCTTCCAGAAGCTTCTGAGCGAGCGACACAAAAGTCGCTCTGGCTACGGCGCCTCCATCG 90
CGTCTGCCCCAACATCTCCATCAAGTGCAGCATCTGTGGAATACCTTGTAGGAATAGCCGCGACGTTTCCCTTAGTGTTCCTTTGCTGTCT 180
TATGTCCAGACGTTCACTTCTGCTGTCAGGTAAGTGACACCACCTCCATTCTCTTTTTGAAATGGAATAGAAATAGACTTTTCGTTT 270
CCCTGTGCTCGAACCTTTCGGAGGCCGAAAATCTTCGTAACGGATAATGGGCGCATCATGTCAGAGAAATGCTTAGAGCAGTATGCA 360
CTTGAAAATTAACAACCTTCTTATTCATAATTTCTGATCGTGTATGTTGGCGTGTGCATATTTTTATGGCTAATTCAGTAGAGTAACAG 450
AAAGTTTCATGGGAAGTAGGTATAAATTAAGATTTAAAAATTAATAGTCTAAGTCTACATTCGGAAACAACAATGTGGGCAAGAAATTAACAG 540
TAGTGTGTTTTATGGTGCAGAAAAGATAAACCCACTTCCAGGTTGTTGTTTTTTTTGTTGGTTTTTGAATTTCTAAGAAAATATATGAGA 630
AGCGTTTCAATATAGGAAAGTCGACGAAATGTCAGACCCGTTTATTTACGTTGATAAGCAGGAAAATCTTTGTGAGCTCCCGGAAATAAG 720
TGGACTACTCCTCCATGAAACGCTCTTGAATAGGAATCTGTAACCTGCTGCAAGTCAAAAATTTGTTTTGTTTTAAATGGGATTTGACTCT 810
GTTATCCGTAAGTGAAGAAGTAAAGATGAGTATGATTGTTACCGTGTAGAATTTAGGAATAAACAAAGAATAGACACATAAATGCGTCAATGCC 900
CGAGACATTTTTTCG 914

```

**Abb. 6.5:** Nukleinsäuresequenz des erhaltenen cDNA-Fragmentes EST 71100 aus der *P. americana* EST-Datenbank. Die Nukleotidabfolge ist in 5'-3'-Richtung dargestellt. Die Position des letzten Nukleotids jeder Zeile ist rechts neben der Sequenz angegeben.

**Abb. 6.6:**

**Western-Blot-Experiment zur Kontrolle der heterologen Expression des DmGB2 in flp<sup>TM</sup>-Zellen.** Es wurde anti-HA als primärer sowie *goat-anti-rat*-HRP als sekundärer Antikörper eingesetzt. Jeweils 7,5 µg Protein wurden aufgetragen. Es wurden die Membranfraktionen (MF) von nicht-transfizierten und PeaGB1/DmGB2-transfizierten Zelllinien nebeneinander aufgetragen. Dabei wurde jeweils ein Ansatz mit PNGase F deglykosyliert (+).

---

Die Seiten 142-143 (Lebenslauf) enthalten persönliche Daten. Sie sind deshalb nicht Bestandteil der Online-Veröffentlichung.

---

Die Seiten 142-143 (Lebenslauf) enthalten persönliche Daten. Sie sind deshalb nicht Bestandteil der Online-Veröffentlichung.

## DANKE...

Zuallererst möchte ich mich bei **PD Dr. Wolfgang Blenau** für die Möglichkeit bedanken, dieses (trotz aller Schwierigkeiten) großartige Projekt bearbeiten zu dürfen. Ich danke dir insbesondere für dein Vertrauen in mich und meine Fähigkeiten über die letzten Jahre, sowie für deine stete Diskussionsbereitschaft.

Ich danke weiterhin Herrn **Prof. Dr. Bernd Walz** für die Möglichkeit meine Dissertation in der Arbeitsgruppe Zoophysiology durchführen zu können.

Des Weiteren möchte ich mich bei Herrn **Prof. Dr. Gerd Bicker**, Herrn **Prof. Dr. Ralph Gräf**, Frau **Prof. Dr. Monika Stengl** und Herrn **Prof. Dr. Christian Wegener** für die Bereitschaft zur Begutachtung dieser Arbeit herzlich bedanken.

Mein besonderer Dank gilt **Dr. Markus Thamm** und **Prof. Dr. Otto Baumann** für die stete Hilfs- und Diskussionsbereitschaft im Bereich Molekularbiologie und Immunhistochemie. Markus danke ich für seine unerschütterliche positive Grundeinstellung!

Sehr dankbar bin ich **Prof. Dr. Arnd Baumann** und **Sabine Balfanz** für die Kooperation auf dem Gebiet der Zellkultur. Ich danke Arnd für die Diskussionsbereitschaft, wann immer „der Schuh gedrückt“ hat.

Ich möchte mich weiterhin bei **Prof. Dr. Toru Miura**, **Dr. Yoshinobu Hayashi** und **Dr. Shuji Shigenobu** bedanken. Diese Kooperation hat mich und das Projekt unglaublich weiter gebracht. Vielen Dank!

Ich danke **Dr. Klaus Raming** für die Bereitstellung der *Drosophila*-GB-Plasmide.

Ich möchte mich ebenso bei **Daniel Stöppler**, **Saskia Bethke**, **Christin Zietz** und natürlich **Bärbel Wuntke** für die Unterstützung in der Schabenzucht bzw. im Labor bedanken.

Weiterhin danke ich der restlichen AG Zoophysiology für die tolle Zeit und das herzliche Arbeitsklima! Ich möchte mich insbesondere bei Dr. **Claudia** Röser bedanken, die mir sowohl beruflich als auch privat eine große Stütze war. Ich danke weiterhin Dr. **Anne-Katrin Rohlfig**, Dr. **Markus Thamm**, Dr. **Kristoffer Heindorff**, **Tina Reim**, **Daniel Rolke** und **Lennart Fechner** für die vielen Unternehmungen auch außerhalb des Labors.

Ich danke meiner **Familie** sowie meinen **Freunden** für ihre Unterstützung und ihr stetig offenes Ohr sowie ihre weit geöffneten Arme.

Mein allergrößter Dank gilt **Martin!** Für den nötigen Halt, die Unterstützung und seinen Glauben an mich, insbesondere während meiner Krankheitsphase! Er hat es stets, trotz gelegentlich widrigster Umstände, geschafft mir ein Lächeln zu entlocken.



## **Eidesstattliche Erklärung**

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig, ohne Hilfe Dritter und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt habe. Diese Arbeit hat in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner anderen Hochschule vorgelegen.

Potsdam, den 25.09.2013

.....

Stefanie Blankenburg