

Institut für Biochemie und Biologie
Arbeitsgruppe Zoophysiology

**Biogene Aminrezeptoren der Schabe *Periplaneta americana*:
Identifizierung, Charakterisierung und Lokalisierung
von PeaTYR1 und PeaDOP2**

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
"doctor rerum naturalium"
(Dr. rer. nat.)
in der Wissenschaftsdisziplin "Zoophysiology"

eingereicht an der
**Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Potsdam**

von
Christian Krach

Potsdam, den 16.4.2007

This work is licensed under the Creative Commons Attribution-Noncommercial-No Derivative Works 2.0 Germany License. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/2.0/de/> or send a letter to Creative Commons, 171 Second Street, Suite 300, San Francisco, California, 94105, USA.

Elektronisch veröffentlicht auf dem
Publikationsserver der Universität Potsdam:
<http://opus.kobv.de/ubp/volltexte/2007/1556/>
urn:nbn:de:kobv:517-opus-15561
[<http://nbn-resolving.de/urn:nbn:de:kobv:517-opus-15561>]

Zusammenfassung

Biogene Amine sind eine Substanzklasse, die bei Vertebraten und Invertebraten eine wichtige Komponente des endokrinen Systems darstellen. Sie können ihre Wirkung als Neurotransmitter, Neuromodulator oder Neurohormone entfalten. Sie tun dies durch Bindung an spezifische Rezeptoren, die zur großen Gruppe der G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCRs) gehören. In der vorliegenden Arbeit wurden zwei zuvor unbekannte Rezeptoren aus der Schabe *Periplaneta americana* kloniert. Durch verschiedene Klonierungsstrategien konnten zwei vollständige cDNA-Sequenzen isoliert werden. Die Nukleotid-/Aminosäuresequenzen dieser cDNAs weisen die größte Ähnlichkeit zu bereits bekannten Tyraminrezeptoren aus *Locusta migratoria* und *Bombyx mori* bzw. zu Dopaminrezeptoren aus *Apis mellifera* und *Drosophila melanogaster* auf. Entsprechend wurden die neu identifizierten Rezeptoren Pea (*Periplaneta americana*) TYR1 und PeaDOP2 genannt. Das Hydropathieprofil des PeaTYR1- und des PeaDOP2-Rezeptors deutet auf

das Vorhandensein von sieben Transmembrandomänen hin, ein wichtiges Merkmal von GPCRs. Deutliche Hinweise auf eine Funktion von PeaTYR1 und PeaDOP2 als Aminrezeptor lassen sich an der abgeleiteten Aminosäuresequenzen ablesen. Aminosäuren, die von Bedeutung bei der Bildung der Amin-Bindungstasche, der Rezeptor-Aktivierung und der Kopplung eines G-Proteins an den Rezeptor sind, treten bei beiden Rezeptoren ebenfalls auf.

Phylogenetische Analysen der beiden Rezeptoren gliedern sie in die Gruppe anderer Tyraminrezeptoren bzw. der Invertebraten-Typ Dopaminrezeptoren (INDRs) ein.

Das Transkript der beiden Rezeptoren konnte durch RT-PCR-Experimente in verschiedenen Geweben aus *Periplaneta* nachgewiesen werden. PeaTYR1 konnte neben dem Gehirn noch in der Speicheldrüse, dem Mitteldarm, den Malpighischen Gefäßen und den Flugmuskeln nachgewiesen werden. PeaDOP2 hingegen scheint auf das Gehirn und die Speicheldrüse beschränkt zu sein.

Teilaufgabe dieser Arbeit war die Gewinnung eines polyklonalen Antikörpers gegen den PeaTYR1-Rezeptor (α PeaTYR1-CPL3). Dieser Antikörper detektiert im Homogenat von Schabengehirnen Banden verschiedener Masse, darunter auch eine Bande mit der kalkulierten Masse von PeaTYR1. Durch Präabsorption mit dem Peptid, welches zur Reinigung der Seren verwendet wurde, kann die Markierung der Proteinbanden unterdrückt werden. An Vibratomschnitten eines Schabengehirns markiert der Antikörper große Teile des Protocerebrums aber auch feinere Strukturen innerhalb der Antennalloben, der optischen Loben und des Zentralkomplexes.

Eine Inkubation von Gehirnschnitten mit einem Antikörper gegen Tyramin führte zu einer Markierung von mehreren deutlich abgegrenzten Neuronengruppen, welche sich in die optischen Loben und den Zentralkomplex verzweigen.

Ein erster Schritt zur physiologischen/ pharmakologischen Charakterisierung der Rezeptoren ist die heterologe Expression in Zellkultur. Der α PeaTYR1-CPL3 Antikörper markierte die Plasmamembran von transfizierten HEK293-Zellen. Ein α HA-Antikörper lieferte eine entsprechende Markierung der mit einem HA-Peptid gekoppelten Rezeptoren. Eine stabile Zelllinie stand zum Zeitpunkt der Fertigstellung der schriftlichen Arbeit für pharmakologische Experimente noch nicht zur Verfügung.

Die Lokalisierung von Rezeptor und Ligand deuten darauf hin, dass Tyramin eine Rolle bei Prozessen in den verschiedenen Regionen im zentralen Nervensystem spielen könnte. Hierzu könnten die optische und olfaktorische Wahrnehmung oder auch höhere integrative Prozesse gehören, die in den Pilzkörpern und dem Zentralkomplex stattfinden.

Die Klonierung und Lokalisierung der Rezeptoren stellt eine erste Grundlage für weitergehende Fragestellung zu den molekularen Mechanismen bei der tyraminergen Signaltransduktion da. Weitere Untersuchungen werden helfen, die Rolle des Tyramins in Insekten deutlicher zu beleuchten.

Abstract:

Biogenic amines form a group of substances which play an important role in the endocrine system of invertebrates and vertebrates. They bind to specific receptors of the G-protein coupled type. In this work two new receptors from *Periplaneta americana* were cloned. By several approaches two full-length cDNA sequences were obtained. The amino acid sequence is very similar to known tyramine receptors of *Locusta/Bombyx* or dopamine receptors from *Apis/Drosophila*, respectively. Therefore they were named PeaTYR1 and PeaDOP2. Residues which are important for forming the binding pocket, activation of the receptor or G-protein coupling could be identified in both receptors. Sequence alignments group them together with other tyramine receptors or insect-type dopamine receptors. The corresponding mRNA can be detected in different tissues by RT-PCR.

One aim of this work was the preparation of a polyclonal antiserum against PeaTYR1. This serum detects several bands in a brain homogenate; one has the calculated mass of PeaTYR1. Its specificity was proven by praeabsorption. On brain slices the serum labels large regions in the protocerebrum, but also fine structures in the antennal lobes, the optic lobes or the central complex. Another serum against tyramine labels several cell clusters, which ramify within the optic lobes and the central complex. On transfected HEK293 cells the receptor can be detected on the plasma membrane. The localization of receptor and ligand may indicate a role of tyramine in optical/olfactory perception.

Inhaltsverzeichnis:

Inhaltsverzeichnis	i
Abbildungsverzeichnis	iv
Abkürzungen	v
Kapitel 1. Einleitung:	1
1.1 G-Protein gekoppelte Rezeptoren	1
1.2 Klassifizierung nach Funktion	2
1.3 Struktur G-Protein gekoppelter Rezeptoren	3
1.4 Aktivierung eines GPCRs	4
1.5 Inaktivierung eines GPCRs	6
1.6 Biogene Amine	7
1.7 Tyraminrezeptoren	8
1.8 Wirkungen von Tyramin	9
1.9 Dopaminrezeptoren	11
1.10 Wirkungen von Dopamin	13
1.11 Das Gehirn der Insekten	14
1.12 Zielstellung	16
Kapitel 2. Material und Methode:	17
2.1 Chemikalien und Geräte:	17
2.2 Molekularbiologische Methoden	17
2.2.1 Agarose-Gelelektrophorese	17
2.2.2 DNA-Extraktion aus Agarosegelen	18
2.2.3 Restriktion der DNA	18
2.2.4 Ligation	18
2.2.5 Transformation chemisch kompetenter Zellen (nach Hanahan 1983)	19
2.2.6 Präparation von Plasmid-DNA im Mini- und Midi-Maßstab	19
2.2.7 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	20
2.2.8 RNA-Extraktion und cDNA-Synthese	21
2.2.9 Schritte der Sequenzbestimmung/ Genklonierung	21
i) Einsatz von degenerierten Primern.	21
ii) Herstellung radioaktiv markierter Sonden	22
iii) Durchmustern einer cDNA Bibliothek	22
iv) <i>In vivo excision</i>	23
v) Rapid amplification of cDNA ends (RACE-PCR) und Vollängenklonierung	23
2.3 Biochemische Methoden	24
2.3.1 Proteinbestimmung	24
2.3.2 SDS-PAGE	24
2.3.3 Western-Blotting	25
2.3.4 Immundetektion	25
2.3.5 Reinigung eines Antiserums	26
i) Prokaryotische Expression von Proteinen	26
ii) Reinigung von MBP-Fusionsproteinen	26
iii) Reinigung von His-markiertem Fusionsprotein	27
iv) Reinigung des Antiserums	27

v) Präabsorption	28
2.4 Heterologe Expression in HEK 293-Zellen	28
2.4.1 Expressionsvektorkonstruktion.	28
2.4.2 Herstellung stabiler Zelllinien	29
2.5 Immunhistologische Untersuchungen	29
2.5.1 an Schnitten	29
i) anti-PeaTyr Antiserum	29
ii) anti-Tyramin Antikörper (Chemicon)	30
2.5.2 an intakten Speicheldrüsen	30
2.6 Bioinformatische Methoden	31
 Kapitel 3. Ergebnisse:	 32
3.1 Isolierung der <i>Peatyr1</i> cDNA	32
3.2 Merkmale der abgeleiteten Aminosäuresequenz von PeaTYR1.	34
3.3 Isolierung der <i>Peadop2</i> cDNA	40
3.4 Merkmale der abgeleiteten Aminosäuresequenz von PeaDOP2.	41
3.5 Expressionsmuster der Gene von <i>Peatyr1</i> und <i>Peadop2</i> .	45
3.6 Erzeugung des Antiserums α PeaTYR1	46
3.7 Verteilung von Tyramin-ähnlicher Immunreaktivität	49
3.7.1 Spezifität/ Kreuzreaktivität des Antikörpers	49
3.7.2 Markierung von Gruppen von Zellkörpern	50
3.7.3 Verzweigungsmuster Tyramin-immunreaktiver Neurone innerhalb der Neuropile	52
i) Optische Loben	52
ii) Pilzkörper	52
iii) Zentralkomplex	53
3.8 Verteilung des PeaTYR1-Rezeptorproteins	58
3.8.1 Spezifität des gereinigten Antiserums	58
3.8.2 Verteilung von α PeaTYR1-Immunreaktivität in verschiedenen Neuropilen	59
i) Optische Loben	59
ii) Zentralkomplex	60
iii) Pilzkörper	60
iv) Laterales Protocerebrum, Deutocerebrum und Tritocerebrum	61
3.8.3 Verteilung von α PeaTYR1-Immunreaktivität in der Speicheldrüse der Schabe	62
3.9 Heterologe Expression des PeaTYR1-Rezeptors in HEK293-Zellen	68
 Kapitel 4. Diskussion	
4.1 GPCRs	70
4.2 Die Eigenschaften der Aminosäuresequenzen	71
4.3 Die ligandenspezifische Bindungstasche.	71
4.4 Das „DRY“-Motiv	72
4.5 Das „NPxxY“-Motiv	73
4.6 N-Glykosylierung	73
4.7 Inaktivierung durch Phosphorylierung	74
4.8 Phylogenetische Einteilung	75
4.9 Expressionsmuster der Rezeptoren PeaTYR1 und PeaDOP2	76
4.10 Nachweis des PeaTYR1-Rezeptorproteins	78
4.11 Tyramin-ähnliche und PeaTYR1-ähnliche Immunreaktivität im Gehirn und der Speicheldrüse der Schabe	79

4.12 Ausblick	83
Literaturverzeichnis	I
Anhang	XII

Abbildungsverzeichnis

1.1: Schematische Darstellung eines GPCRs	3
1.2: Schematische Abbildung der frühen Schritte bei der Signaltransduktion an GPCRs	4
1.3: Biosynthese des Tyramins bzw. des Oktopamins	7
1.4: Abbauege der Amine	8
1.5: Agonisten und Antagonisten für Tyramin- bzw. Oktopaminrezeptoren	9
1.6: Auflistung verschiedener Liganden von Dopaminrezeptoren, welche an Insekten zum Einsatz kommen	13
1.7: Schematischer Aufbau eines Insektengehirns	15
3.1: Der Einsatz von degenerierten Primern ermöglicht eine PCR ohne vorherige Kenntnis der genauen Nukleotidsequenz	32
3.2: Nukleotidsequenz von <i>Peatyr1</i> aus der Schabe <i>Periplaneta americana</i>	33
3.3: Hydropathie- (A) und TMHMM-Profil (B) von PeaTYR1	34
3.4: Aminosäuresequenz-Vergleich verschiedener Tyraminrezeptoren	36
3.5 Abgeleitete Aminosäuresequenz von PeaTYR1	37
3.6: Dendrogramm von Phenolamin-/Katecholaminrezeptoren verschiedener Insekten	38
3.7: Dendrogramm verschiedener Phenolamin-/Katecholaminrezeptoren des Menschen und der Schabe	39
3.8: Nukleotidsequenz von <i>Peadop2</i> aus der Schabe <i>Periplaneta americana</i>	40
3.9: Hydropathie- (A) und TMHMM-Profil (B) von PeaDOP2	41
3.10: Aminosäuresequenz-Vergleich verschiedener Dopaminrezeptoren	42
3.11: Abgeleitete Aminosäuresequenz von PeaDOP2	43
3.12: Expressionsanalyse der Gene <i>Peatyr1</i> und <i>Peadop2</i> in verschiedenen Geweben von <i>Periplaneta americana</i>	45
3.13: Expression des MBP-PeaTYR1-CPL3-Fusionsproteins	47
3.14: Expression des HIS-PeaTYR1-CPL3-Fusionsproteins	47
3.15: Test der Kaninchen-Seren vor bzw. 90 Tage nach der Immunisierung	48
3.16: Tests der gereinigten Antikörper	49
3.17: Präabsorption des α -Tyraminantikörpers	50
3.18: Tyramin-immunreaktive Zellgruppen 0 und 2	54
3.19: Tyramin-immunreaktive Zellgruppen 3-6	55
3.20: Tyramin-immunreaktive Strukturen in den optischen Loben	56
3.21: Tyramin-immunreaktive Markierung im Zentralkörper und dem lateralen Protocerebrum	57
3.22: Präabsorptionsexperimente mit dem α PeaTYR1-Antiserum	58
3.23: Übersichtsaufnahmen von α PeaTYR1-immunreaktiven Strukturen innerhalb des Schabengehirns	63
3.24: α PeaTYR1-immunreaktive Markierungen in den optischen Loben und dem zentralen Protocerebrum	65
3.25: α PeaTYR1-immunreaktive Strukturen innerhalb der Antennalloben	66
3.26: Doppelmarkierung der Speicheldrüsenacini mit Phalloidin und dem α PeaTYR1-Antikörper	67
3.27: <i>Peatyr1</i> -transfizierte HEK293-Zellen	69

Abkürzungen

5-HT	Serotonin
Ac	Acetat
APS	Ammoniumpersulfat
AS; aa	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
cDNA	komplementäre DNA
CPL	cytoplasmatischer <i>loop</i> / Schleife
DAG	Diacylglycerol
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamin-Tetraessigsäure
GABA	Gamma-Aminobuttersäure
GPCR	<i>G-Protein coupled receptor</i>
GRK	GPCRezeptor Kinase
GTP /GDP	Guanosintri-/ diphosphat
His6	Hexa-Histidin
HWM	<i>high weight marker</i>
IP ₃	Inositol-1,4,5-trisphosphat
IPTG	Isopropyl-Thio-D-Galaktopyranosid
LWM	<i>low weight marker</i>
MBP	Maltose-Bindeprotein
OA	Oktopamin
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDZ	PSD-95/Disc-large/Zonula occludens-1
PIP2	1-Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
RACE	<i>rapid amplification of cDNA ends</i>
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	reverse Transcriptase
SDS	Natrium-Dodecyl-Sulfat
TA	Tyramin
TBST	<i>tris buffered saline plus triton</i>
TDC	Tyrosindecaboxylase
TEMED	Tetramethylendiamin
TM	Transmembrandomäne
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-Aminomethan
TβH	Tyramin-β-Hydroxylase
U	Units
UTR	untranslatierter Bereich
v/v	Volumenprozent
Vol.	Volumen
w/v	Massenprozent
ZNS	Zentrales Nervensystem

Kapitel 1:

Einleitung

In einem vielzelligen Organismus ist es von fundamentaler Bedeutung, extrazelluläre Signale, die von spezialisierten Sinneszellen wahrgenommen werden, an andere Zellen weiterleiten zu können. Die Information wird in Form von Signalmolekülen von Zelle zu Zelle übertragen. Diese Moleküle binden an spezifische Rezeptoren der Zielzelle und lösen dort i. d. R. eine Signalkaskade aus. Die Distanz, über die ein Signalmolekül dabei wirken kann, reicht von einigen Nanometern in Synapsen bis zu mehreren Metern bei Hormonen. Allen Lebewesen ist trotz einer unüberschaubaren Menge an Signalmolekülen eines gemeinsam. Für die molekulare Signaltransduktion haben sich im Laufe der Evolution im Wesentlichen drei membranständige Rezeptortypen entwickelt. Die sind erstens die ionotropen Rezeptoren oder ligandengesteuerte Ionenkanäle. Zu dieser Gruppe von sehr schnell öffnenden und schließenden Kanälen, die besonders an der synaptischen Übertragung beteiligt sind, gehören z.B. der nikotinische Acetylcholinrezeptor, Rezeptoren für Glutamat und Glycin, sowie die GABA_A- bzw. die 5-HT₃-Rezeptoren (Ortells und Lunt, 1995).

Eine weitere Gruppe bilden membranständige Rezeptoren mit intrinsischer Enzymaktivität. Diese Proteine durchspannen die Membran einmal und besitzen eine intrazelluläre katalytische Domäne in Form einer Kinase, Phosphatase oder Guanylylcyclase. In diese Gruppe fallen Rezeptoren für verschiedene Wachstumsfaktoren.

Die größte Gruppe von membranständigen Rezeptoren bilden die metabotropen oder G-Protein gekoppelten Rezeptoren, auf die im Weiteren besonders eingegangen wird.

1.1 G-Protein gekoppelte Rezeptoren

Unter den Oberflächenrezeptoren einer Zelle, die für die Transduktion eines Signals in eine zelluläre Antwort zuständig sind, sind die G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCRs) die größte und zugleich am wenigsten homogene Gruppe. Wie für Rezeptoren üblich dienen sie der Transduktion eines Signals in eine intrazelluläre Antwort. Alleine beim Menschen wurden 948 GPCRs durch Genomanalysen identifiziert (Takeda *et al.*, 2002). Dies entspricht etwa 5% aller bekannten Gene des Menschen.

1.2 Klassifizierung nach Funktion

Funktionell lassen sich die Rezeptoren in sechs große Gruppen einteilen (siehe www.gpcr.org/7tm/; Horn *et al.*, 1998). Der Prototyp für die größte Gruppe A ist der Photorezeptor Rhodopsin. Auf die genaue Struktur dieser Rezeptoren wird später noch im Detail eingegangen werden. Diese Gruppe von Rezeptoren bindet so unterschiedliche Liganden wie Amine (z.B. Adrenalin), Peptide (z.B. Vasopressin), Hormone (z.B. Gonadotropin), Photonen (Rhodopsin), Geruchsstoffe (div. Odorantrezeptoren) oder auch Nucleotide/Nucleoside (z.B. Adenosinrezeptoren). Rezeptoren der Gruppe B binden vor allem Peptidhormone wie Calcitonin, Glucagon oder Parathormon, während in Gruppe C die metabotropen Glutamatrezeptoren fallen. Gruppe D und E enthalten Pheromonrezeptoren aus Hefen bzw. cAMP-Rezeptoren aus Nematoden. Diesen 5 Gruppen steht die Gruppe Z der archaebakteriellen Rhodopsine gegenüber, die zu keiner G-Proteinbindung in der Lage sind. Dieses ABCDEZ-System wurde in neuerer Zeit durch neu entdeckte GPCRs erweitert. Es gibt eigene Gruppen für die pflanzlichen MLO-Proteine, die eine Rolle bei der Resistenz gegenüber bestimmten Pilzen spielen, Geruchsrezeptoren aus Insekten, Chemorezeptoren aus Nematoden sowie das „Frizzled/Smoothed“-System höherer Tiere.

Der funktionellen Einteilung gegenüber steht eine Klassifikation aufgrund phylogenetischer Untersuchungen: das sog. GRAFS-System (Fredrikson *et al.*, 2003; Schiot und Fredrikson, 2005). Dies teilt die GPCRs in die **G**lutamat-, **R**hodopsin-, **A**dhäsions-, **F**rizzled/Taste2- und die **S**ecretingruppe ein.

Die Glutamatgruppe enthält neben den metabotropen Glutamatrezeptoren noch GABA_B-Rezeptoren, den „calciumsensitiven Rezeptor“ CASR und eine Gruppe von Geschmacksrezeptoren (TAS1). Allen gemein ist eine ausgeprägte, N-terminale Ligandenbindungsstelle. Die Rhodopsingruppe enthält die meisten Mitglieder (ca. 90% aller GPCRs) und setzt sich aus Geruchsrezeptoren und den meisten Hormon- und Neurotransmitterrezeptoren zusammen. Den Adhäsionsrezeptoren ist eine lange, N-terminal gelegene Adhäsionssequenz gemeinsam. Die Frizzled/Taste2-Gruppe enthält neben Geschmacksrezeptoren vor allem für Bitterstoffe noch Rezeptoren für verschiedene Glycoproteine. Secretinrezeptoren binden schließlich Peptidhormone des Verdauungstraktes und des Calciumstoffwechsels.

1.3 Struktur G-Protein gekoppelter Rezeptoren

Der Vielzahl der möglichen Liganden für die GPCRs bzw. der durch sie bewirkten Effekte steht ein immer wiederkehrender struktureller Aufbau des Rezeptors gegenüber. Jeder GPCR besteht aus einer Polypeptidkette, die die Zellmembran unter Ausbildung von sieben hydrophoben α -Helices durchspannt. Diese sieben Transmembrandomänen sind miteinander durch jeweils drei hydrophile Schleifen auf der extrazellulären bzw. intrazellulären Seite verbunden. Eine vierte intrazelluläre Schleife kann durch Insertion posttranslational palmitoylierter, carboxyterminal gelegener Cysteine in die Plasmamembran gebildet werden. Der extrazellulär gelegene Aminoterminus des Polypeptides kann glycosyliert vorliegen, die intrazellulär liegenden Schleifen können an bestimmten Serin- bzw. Threoninresten phosphoryliert werden.

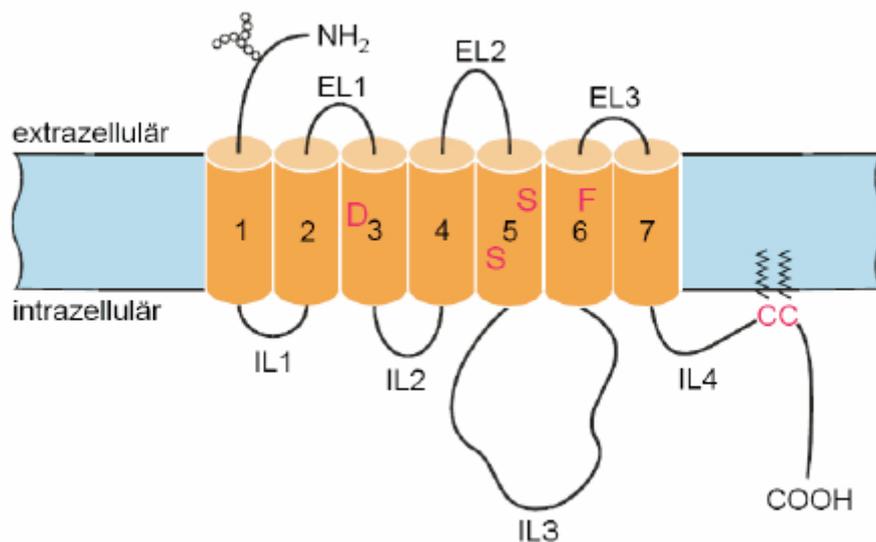


Abb. 1.1: Schematische Darstellung eines GPCRs. Dargestellt sind die sieben Transmembrandomänen, welche durch drei intra- und drei extrazelluläre Schleifen verbunden sind. Der N-Terminus kann glycosyliert vorliegen, durch eine posttranslationale Palmitoylierung kann eine 4. Schleife gebildet werden. Aminosäuren, die der Ligandenbindung dienen, sind hervorgehoben. Nach Blenau und Baumann, 2001.

Die Bindungsstelle des Liganden kann sich an unterschiedlichen Stellen am/ im Rezeptor befinden. So werden z.B. viele Glycoprotein hormone von einem ausgeprägten Aminoterminus gebunden, während Amine in einer Bindungstasche im Rezeptor selbst binden. Das Amin wird dabei über Salzbrücken zu einem Aspartatrest in TM3, durch Wasserstoffbrücken zu Serinresten in TM5 und über hydrophobe Wechselwirkungen zu einem Phenylalaninrest in TM6 an den Rezeptor gebunden (Strader *et al.*, 1995). Die exakte

3-dimensionale Struktur eines GPCRs ist allerdings bisher nur ein einziges Mal für das Rhodopsin röntgenkristallographisch aufgeklärt worden (Palczewski *et al.*, 2000).

1.4 Aktivierung eines GPCRs

Ungeachtet der vielen verschiedenen Liganden, die an GPCRs binden, ist der Ablauf der Aktivierung bei allen derselbe. Im inaktivierten Zustand bindet an die intrazellulären Schleifen ein aus drei Untereinheiten (α , β , γ) bestehendes G-Protein, von denen verschiedene Isoformen bekannt sind (z.B. $G\alpha_s$, $G\alpha_q$ oder $G\alpha_i$), wobei verschieden Rezeptoren unterschiedliche Selektivität gegenüber den Isoformen aufweisen (Nobles *et al.*, 2005). Bindet der zugehörige Ligand an den Rezeptor, wobei durchaus verschiedene Rezeptoren für jeweils denselben Liganden vorhanden sein können, kommt es zu intramolekularen Umlagerungen im Rezeptor (Wess, 1997). Durch die so gewonnene Flexibilität kann der Rezeptor nun als GTP-Austauschfaktor (GTP exchange factor GEF) wirken und am gebundenen G-Protein das enthaltene GDP gegen ein GTP austauschen und so das G-Protein aktivieren. Das aktivierte G-Protein zerfällt in die α -Untereinheit und den $\beta\gamma$ -Komplex, welche ihrerseits für die weitere intrazelluläre Signaltransduktion verantwortlich sind.

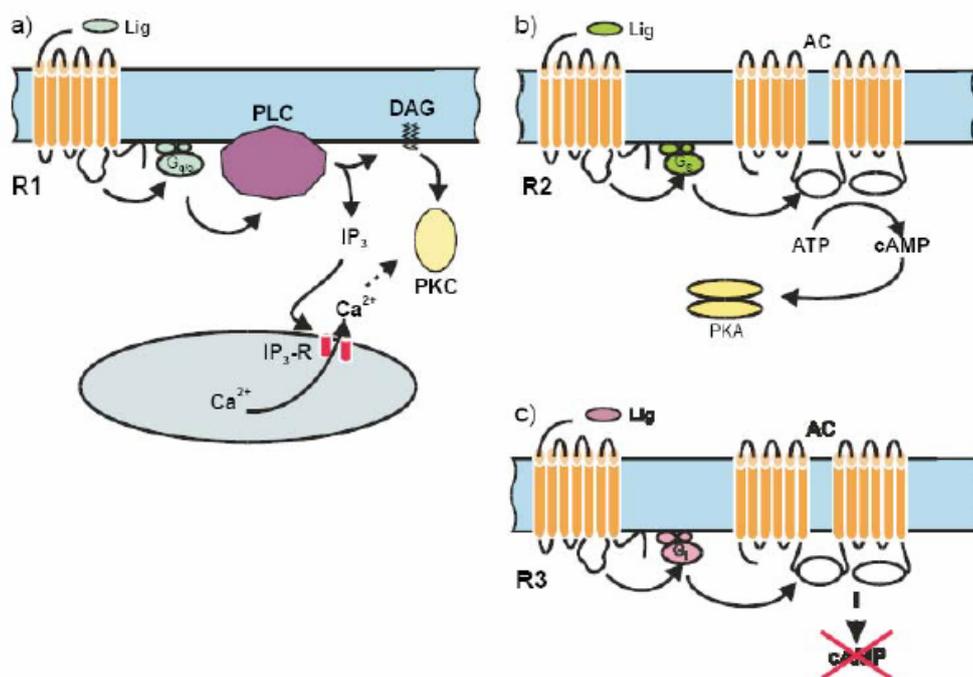


Abb. 1.2: Schematische Abbildung der frühen Schritte bei der Signaltransduktion an GPCRs. Nach Blenau und Baumann, 2001. Erläuterung im Text.

Die $G\alpha$ -Untereinheit aktiviert intrazelluläre Effektorproteine wie Adenylylcyclase, Phospholipase oder auch Ionenkanäle. $G\alpha_s$ stimuliert die Adenylylcyclase, $G\alpha_i$ hemmt diese, $G\alpha_{q/o}$ aktiviert die Phospholipase C. Während durch die Adenylylcyclaseaktivität die intrazelluläre Konzentration von cAMP als sekundärer Botenstoff reguliert wird, führt die Steigerung der Phospholipase C-Aktivität zur vermehrten Synthese von Diacylglycerol (DAG) und Inositol-1,4,5-Trisphosphat (IP_3). Das IP_3 bindet an spezifische Rezeptoren in der Membran des endoplasmatischen Retikulums, bewirkt eine Freisetzung von Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern und führt so zu einer Steigerung der intrazellulären Calciumkonzentration. In der nächsten Stufe modulieren die sekundären Botenstoffe (Ca^{2+} , cAMP,) die Aktivität verschiedener Proteine, die z.B. als Kinasen ihrerseits andere Proteine modifizieren und damit deren Aktivität modulieren. Dies kann zu kurzzeitigen Änderungen im Phosphorylierungsmuster einzelner Protein aber auch zu langfristigen Änderungen in der Genexpression der ganzen Zelle führen. Das Signal des Rezeptors wird durch eine intrinsische GTPase-Aktivität der $G\alpha$ -Untereinheit beendet. Das GTP wird nach einiger Zeit zu GDP und Phosphat gespalten. Die Untereinheiten des G-Proteins können reassoziieren und erneut an die intrazelluläre Seite des Rezeptors binden.

Neben dem „klassischen“ trimeren Modell aus Ligand/Rezeptor/G-Protein für einen aktivierten Rezeptor (Lean *et al.*, 1980) werden immer öfter Rezeptoren beschrieben, die in Abwesenheit eines Liganden nicht zwingend inaktiv sein müssen (Samama *et al.*, 1993). Für diese wird ein thermodynamisches Gleichgewicht der einzelnen Konformationen (aktiviert vs. inaktiv) diskutiert. Dieses Gleichgewicht kann durch Agonisten in Richtung Aktivierung verschoben werden, während sog. inverse Agonisten den inaktiven Zustand stabilisieren (Gether und Kobilka, 1998). Konstitutive Aktivität konnte *in vivo* bereits gezeigt werden (Bond *et al.*, 1995; Morisset *et al.*, 2000).

Weitere Proteine, die die Aktivität eines GPCRs unabhängig von Liganden beeinflussen, konnten z.B. durch Hefe-Doppelhybrid-Experimente und Fusionsprotein-Overlays identifiziert werden (Hall *et al.*, 1999). Durch Wechselwirkungen über SH3 bzw. SH2-Domänen („Src-Homologie“), PDZ-Domänen oder EVH-Domänen (Ena/VASP-Homologie) kann die Lokalisation, Spezifität, Selektivität und der zeitliche Ablauf der Transduktion beeinflusst werden (Bockaert *et al.*, 2003).

1.5 Inaktivierung eines GPCRs

Eine Schlüsselrolle bei der Inaktivierung des Rezeptors nehmen neben der GTPase-Aktivität der $G\alpha$ -Untereinheit Phosphorylierungen an Serinen bzw. Threoninen an der cytoplasmatischen Seite des Rezeptors durch intrazelluläre Kinasen ein. Diese Phosphorylierungen können durch sekundäre-Botenstoff-aktivierte Kinasen wie die cAMP-aktivierte Proteinkinase A (PKA) oder die Ca^{2+} -aktivierte Proteinkinase C (PKC) erfolgen. Diese Art der Rezeptorinaktivierung entspricht einer negativen Rückkopplung: Die durch den Rezeptor aktivierten Proteine hemmen den Rezeptor selbst. Eine andere Gruppe von Kinasen sind die G-Protein-gekoppelten Rezeptorkinasen (GRKs). Neben der Serin/Threoninkinase-Aktivität können diese Proteine direkt mit den $G\alpha$ - und $G\beta\gamma$ -Untereinheiten interagieren und diese so aus der Signaltransduktion entfernen. Des Weiteren können sie als GTPase aktivierendes Protein (GAP) den Austausch von GTP zu GDP im $G\alpha$ beschleunigen (Raymond, 1991; Freedman *et al.*, 1995) und somit die Signaltransduktion unterbrechen. Die Phosphorylierungen am Rezeptor können durch verschiedene Mechanismen auf die Signaltransduktion einwirken. Eine Phosphorylierung kann z.B. durch die zusätzliche negative Ladung am Protein die Konformation des Rezeptors dahingehend verändern, dass eine wirkungsvolle Wechselwirkung mit dem Liganden bzw. mit den G-Proteinen nicht mehr möglich ist. Das Signal würde abgeschwächt werden (Carman und Benovic, 1998). Diese Art der Inaktivierung erfolgt oft durch die PKA bzw. die PKC. Durch GRKs phosphorylierte Rezeptorproteine können zudem β -Arrestin binden. Durch sterische Behinderung der G-Proteine kommt es trotz Ligandenbindung nur zu einer abgeschwächten Signalübertragung, der Rezeptor ist desensibilisiert.

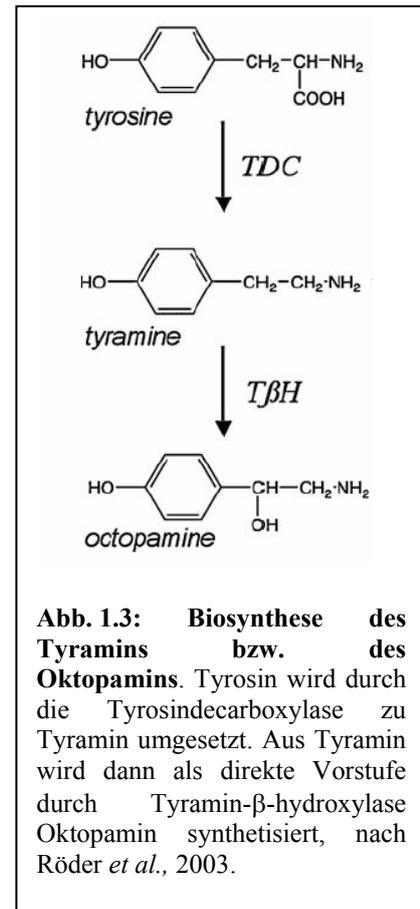
Das β -Arrestin dient ferner als Adapterprotein für verschiedene Proteine wie z.B. Clathrin. Eine Zusammenlagerung der angelagerten Clathrinmoleküle führt über die sog. *coated pits* zu einer Internalisierung des Rezeptor- β -Arrestin-Komplexes in Membranvesikeln. In diesen Vesikeln wird der Rezeptor dephosphoryliert und kann abschließend erneut zur Plasmamembran gebracht werden (*Recycling*) oder aber abgebaut werden (*Degradation*) (Oakley *et al.*, 2001).

1.6 Biogene Amine

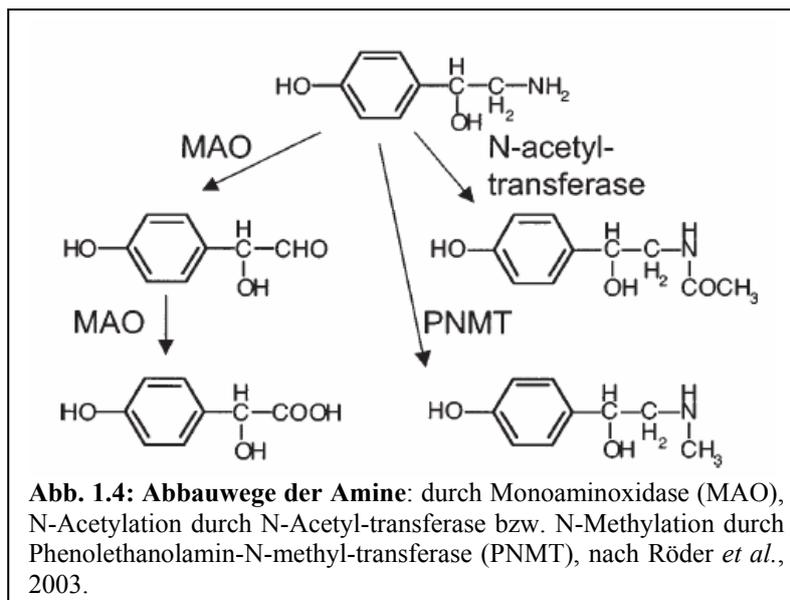
Biogene Amine entstehen durch die enzymatische Umsetzung von Aminosäuren. Durch Decarboxylasen wird die Aminosäure zu einem Amin umgesetzt, durch Hydroxylasen können weitere Hydroxygruppen eingeführt werden (siehe Beispiel der Tyramin-/ Oktopaminsynthese). Die Amine Dopamin, Serotonin und Histamin sind im Tierreich weit verbreitete Substanzen, die als Neurotransmitter direkt an synaptischen Übertragungen beteiligt sind, als Neuromodulator in der Nähe von Synapsen modulatorisch wirken oder als Neurohormone ihre Wirkung über das Blut/ die Hämelymphe auch auf weit entfernte Zielorgane ausüben können. Ihnen gegenüber stehen die Amine Adrenalin und Noradrenalin, bedeutende Neurotransmitter in Vertebraten, die, wenn überhaupt, nur in geringen Mengen in einigen Invertebraten nachgewiesen werden und denen bisher keine physiologische Funktion zugewiesen werden konnten. Ihre Aufgaben werden hier

vermutlich von den strukturell verwandten Amine Oktopamin und Tyramin übernommen, die ihrerseits in Vertebraten nur in geringen Mengen vorkommen (*trace amines*).

Um ihre Wirkung in den Zielzellen entfalten zu können, müssen sie an entsprechende Rezeptoren binden, wobei die Rezeptoren für biogene Amine i. d. R. zu der großen Gruppe der G-Protein gekoppelten Rezeptoren gehören (der 5-HT₃ Rezeptor z.B. gehört zu den ionotropen Rezeptoren).



Um die Wirkung der ausgeschütteten Amine zu beenden, stehen den Zellen verschiedene Reaktionswege zur Verfügung. Zum einen können die Amine direkt über spezifische Transporter wieder in die Zellen aufgenommen werden (Donly und Caveney, 2005). Eine weitere Möglichkeit der



Inaktivierung ist die enzymatische Modifizierung der Amine durch N-Acetylierung bzw. N-Methylierung durch spezifische Transferasen. In Vertebraten weit verbreitet ist der Abbau der Amine durch Monoaminoxidasen (MAO), der bei Invertebraten allerdings eine eher untergeordnete Rolle zu spielen scheint (Dewhirst *et al.*, 1972). Bei ihnen findet viel mehr eine Konjugation der Amine an β -Alanin durch die *ebony*-Proteine (Blenau und Baumann, 2005; Hovemann *et al.*, 1998) und anschließende Einlagerung in die Cuticula statt.

1.7 Tyraminrezeptoren

Tyramin wirkt über spezifische G-Protein gekoppelte Rezeptoren (s.o.). Interessanterweise ähneln diese strukturell aber viel mehr den α -adrenergen Rezeptoren der Vertebraten, als den dort kürzlich entdeckten *trace amine*-Rezeptoren (Borowsky *et al.*, 2001). Dies legt nahe, dass die Tyraminrezeptoren eher mit den α -adrenergen als mit den *trace amine*-Rezeptoren verwandt sein könnten. Das erste Indiz dafür, dass es eigene Tyraminrezeptoren gibt, war die Tatsache, dass ein zuvor als Oktopaminrezeptor bezeichneter Rezeptor aus *Drosophila* in einer *cos-7* Zellkultur eine 33x höhere Affinität zu Tyramin als zu Oktopamin aufwies (Arakawa *et al.*, 1990; Saudou *et al.*, 1990). In *Xenopus* Oocyten konnte allerdings für diesen Rezeptor eine agonistspezifisch Aktivierung verschiedener Signalkaskaden beobachtet werden: Tyramin hemmt die Adenylycyclase, während Oktopamin die Ca^{2+} -Freisetzung stimuliert (Robb *et al.*, 1994, Reale *et al.*, 1997). Viele der in den letzten Jahren aus verschiedenen Arthropoden wie *Apis mellifera*, *Bombyx mori*, *Boophilus microplus*, *Locusta migratoria* oder *Papilio xuthus* (Blenau *et al.*, 2000, Ohta *et al.*, 2003, Baxter und Barker, 1999, Vanden

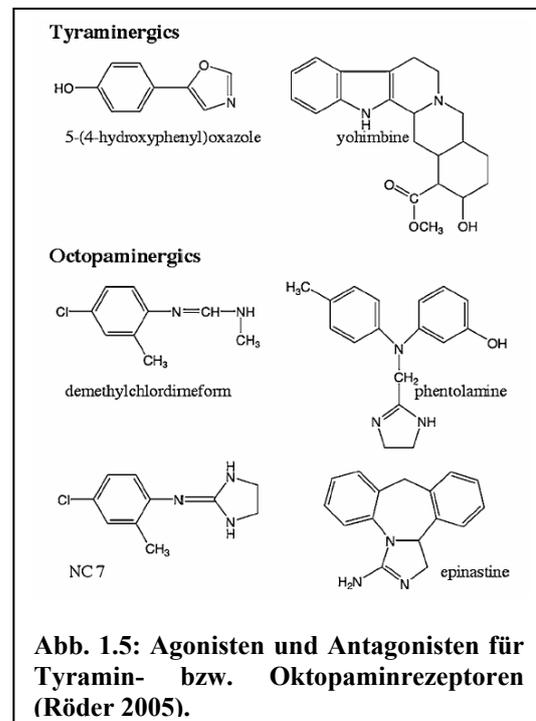
Broeck *et al.*, 1995, Ono und Yoshikawa, 2004) klonierten Rezeptoren sind Orthologe dieses ersten „Prototyps“ eines Tyraminrezeptors. Erst vor kurzem allerdings sind weitere Tyraminrezeptoren in *Caenorhabditis elegans* und *Drosophila* beschrieben worden, die sich deutlich von den bisherigen unterscheiden (Rex *et al.*, 2005, Cazzamali *et al.*, 2005).

Die Tatsache, dass Tyramin bzw. Oktopamin fast ausschließlich in Invertebraten vorkommen, machten sie von je her zu interessanten Kandidaten für pharmkologische Experimente. So könnten Rezeptorliganden insektizide Wirkungen aufweisen, die bei Vertebraten keine Wirkung haben. Im Gegensatz zu den Oktopaminrezeptoren, für die es eine große Zahl verschiedener Agonisten gibt (z.B. Demethylchlordimeform; Long und Murdock, 1983), gibt es für Tyraminrezeptoren nur eine begrenzte Auswahl an 5-Phenyloxazolen (Khan *et al.*, 2003), die agonistisch auf den Rezeptor wirken. Antagonisten, die spezifisch für

Oktopamin- oder Tyraminrezeptoren sind, gibt es ebenfalls nicht viele. Für die Oktopaminrezeptoren sind dies Phentolamin und Mianserin (Röder *et al.*, 1998). Yohimbin blockiert den Tyraminrezeptor und führt zu einem ähnlichen Phänotypen, wie er in einer Rezeptormutante (*honoka* Kutsukake *et al.*, 2000) in *Drosophila* beobachtet werden konnten.

1.8 Wirkungen von Tyramin

Auf zellulärer Ebene bewirkt eine Aktivierung eines Tyraminrezeptor in der Regel eine Verringerung der intrazellulären cAMP-Konzentration, vermittelt über inhibitorische G-Proteine G_{α_i} (Blenau *et al.*, 2000). Der von Cazzamali (2005) beschriebene Tyraminrezeptor aus *Drosophila* führt in CHO-Zellkultur zu einer Freisetzung von Ca^{2+} . Tyramin wird daher als das dem Oktopamin direkt entgegenwirkende Amin bezeichnet, welches über Aktivierung von G_{α_s} oder G_{α_q} zu einer Erhöhung des intrazellulären cAMP oder Ca^{2+} -Spiegels führt (Bischof und Ennan, 2004). Vereinfacht lässt sich Oktopamin als stimulatorisch und Tyramin



als inhibitorisch wirkendes Amin bezeichnen. Oktopamin wird manchmal auch in Anlehnung an das adrenerge System als das *fight and flight*-Hormon der Insekten bezeichnet. Die *fight and flight*-Antwort ist ein Synonym für eine schnelle Anpassung an energie-intensive Situationen, wie Begegnungen mit Fressfeinden oder Rivalen. Dies führt zu einer erhöhten Energieversorgung des Organismus, steigert die Muskelaktivität, verbessert die sensorische Wahrnehmung und passt somit insgesamt das Verhalten der Stresssituation an. Tyramin hingegen zeigt auch auf systemischer Ebene einen inhibitorische Effekt. Tyramin senkt z.B. den cAMP-Spiegel im gesamten Gehirn von *Drosophila* (Uzzan und Dudai, 1982) oder inhibiert die Mobilisierung von Glycogen aus den Fettkörpern (Downer, 1979). Saraswati *et al.* (2003) konnten an Synthesemutanten zeigen, dass eine normale Fortbewegung von *Drosophila*-Larven nicht nur von Tyramin und Oktopamin allein, sondern vom ausgeglichenen Verhältnis beider zueinander abhängt. Diese beiden Mutanten sind zum einen die *iav*-Mutante (*inactive*), in der durch eine Mutation in der Tyrosin-Decarboxylase kaum TA und OA gebildet wird (O'Dell, 1993). Zum anderen die T β H-Mutante, in der durch eine Mutation in der Tyramin- β -Hydroxylase kein OA gebildet wird und sich im Gegenzug dazu TA ansammelt (Monastirioti *et al.*, 1996). McClung und Hirsch (1999) nutzen die *iav* Mutante, um zu zeigen, dass Tyramin notwendig für eine Sensitivierung gegenüber Kokain ist. Scholz *et al.* (2000, 2005) konnten eine erhöhte Ethanol sensitivität bei der *iav*-Mutante nachweisen. Tyramin ist nötig, damit sich eine Ethanol toleranz einstellen kann.

Bisher wurde bei *Drosophila* eine Rezeptormutante beschrieben (*honoka* Kutsukake *et al.*, 2000), welche eine deutlich geringere Expression des Tyraminrezeptors aufweist. Die Mutante ist auf Grund der fehlenden hemmenden Wirkung des Tyramin leicht hyperaktiv und reagiert weniger stark auf Repellentien wie Ethylazetat. Dies lässt eine modulierende Funktion von Tyramin im olfaktorischen System bei *Drosophila* vermuten. Ferner ist der inhibitorische Effekt des Tyramin auf die Muskelkontraktionen gehemmt. Bei *Apis* ist es möglich, durch Injektion von Tyramin in den Thorax bzw. Verfütterung die Zuckerwasser-Empfindlichkeit des gustatorischen Systems zu erhöhen (Scheiner *et al.*, 2002). Allerdings konnte bisher nicht eindeutig geklärt werden, ob diese Wirkung auf Tyramin oder auf dessen Stoffwechselprodukt Oktopamin zurückzuführen ist, da für OA ein ähnlicher Effekt gezeigt werden konnte (Pankiw und Page, 2003; Long und Murdock, 1983).

Tyramin bewirkt in den Sternzellen der Malpighischen Gefäße bei *Drosophila* eine Erhöhung der Chloridleitfähigkeit und somit eine Steigerung der Exkretion (Blumenthal, 2003). Unüblicherweise wird dort das Tyramin direkt in den Hauptzellen, dem zweiten Zelltyp, aus dem die Malpighischen Gefäße aufgebaut sind, aus Tyrosin gebildet. Das neusynthetisierte

Tyramin entfaltet seine Wirkung parakrin auf die benachbarten Sternzellen. Das Tyramin ist in diesem Beispiel nicht neuronalen Ursprungs.

1.9 Dopaminrezeptoren

Die Dopaminrezeptoren der Vertebraten werden aufgrund ihrer Sequenz, ihrer funktionellen Eigenschaften und ihres pharmakologischen Profils in zwei Klassen eingeteilt: die D₁- und die D₂-ähnlichen Rezeptoren. In die D₁-Gruppe fallen Rezeptoren der Subtypen D₁ und D₅, die beide über ein G α_s -Protein den cAMP-Spiegel der Zellen erhöhen. Die Subtypen D₂, D₃ und D₄ bilden die D₂-Gruppe. Sie erniedrigen die intrazelluläre cAMP-Konzentration und können die Aktivität spannungsabhängiger Ca²⁺- bzw. K⁺-Kanäle modulieren. Auf diese Weise können Neurone postsynaptisch gehemmt werden (Callier *et al.*, 2003; Keabian und Calne, 1979; Neve *et al.*, 2004). Schon aufgrund struktureller Unterschiede lässt sich eine unterschiedliche Funktionsweise der beiden Gruppen vermuten. Die D₁-Rezeptoren haben eine kurze dritte zytoplasmatische Schleife und einen langen C-Terminus. Bei D₂-Rezeptoren dagegen ist der C-Terminus verkürzt, sie besitzen aber eine sehr lange dritte zytoplasmatische Schleife. Diese Bereiche sind für die Kopplung der G-Proteine zuständig. Kürzlich wurde eine weitere Unterteilung der Dopaminrezeptoren vorgeschlagen. Ausgehend von Sequenzvergleichen wurden Dopaminrezeptoren aus *Drosophila melanogaster* (DmDopR2, auch „DAMB“ genannt, Feng *et al.*, 1996; Han *et al.*, 1996) und *Apis mellifera* (AmDop2, Humphries *et al.*, 2003) zu einer eigenen Gruppe, den Invertebraten-Typ-Dopaminrezeptoren (INDR) zusammengefasst. Einem Sequenzalignment zufolge ähneln sie vielmehr den Oktopaminrezeptoren des α -Types als den D₁/D₂-Dopaminrezeptoren. Nach einem erst vor kurzem vorgeschlagenem Klassifikationssystem lassen sich Oktopaminrezeptoren aus Insekten in α -adrenerg- und β -adrenerg-ähnliche Oktopaminrezeptoren einteilen (Evans und Maqueira, 2005). Funktionell erhöhen sie wie die D₁-Rezeptoren die intrazelluläre cAMP-Konzentration (Mustard *et al.*, 2005). Neben den INDRs sind aus Insekten auch verschiedene Vertreter der D₁- bzw. D₂-Gruppe charakterisiert worden. Aus *Drosophila* sind DmDopR1 (D₁-ähnlich, Gotzes *et al.*, 1994) und verschiedene Isoformen von DmD2R (D₂-ähnlich, Hearn *et al.*, 2002) bekannt. Bei *Apis* wurden bereits AmDop1 (D₁-ähnlich, Blenau *et al.*, 1998) und AmDop3 (D₂-ähnlich, Beggs *et al.*, 2005) charakterisiert. Für einen weiteren Rezeptor aus *Drosophila* wurde neben Dopamin als Agonist Ectysteroide ermittelt (DmDopEcR, Srivastava *et al.*, 2005).

Fehlregulierungen des Dopaminhaushaltes führen zu einigen ernsten Erkrankungen beim Menschen. Hierzu gehören z.B. Morbus Parkinson, Drogenabhängigkeit, Schizophrenie, Prolactinome in der Hypophyse, Bluthochdruck und Herzinfarkt. Diese Krankheiten erforderten den Einsatz von spezifischen Dopaminagonisten bzw. -antagonisten. Inzwischen ist ein großes Sortiment von Liganden aus verschiedenen Gruppen (z.B. tricyclische Neuroleptika, Benzazepine oder Butyrophenone) verfügbar (Strange, 1993; Seeman und Van Tol, 1994). Es konnten für die verschiedenen Gruppen von Dopaminrezeptoren Sets von Wirkstoffen zusammengestellt werden, die spezifisch nur von einer Gruppe gebunden werden. So ist es möglich, anhand von pharmakologischen Profilen einzelne Rezeptoren genauer zu charakterisieren bzw. die Existenz solcher in Homogenaten oder an intakten Präparaten zu postulieren. Die Wirkstoffe lassen sich ebenfalls auf Insekten anwenden. So wurden z.B. zur Charakterisierung eines klonierten Dopaminrezeptors aus *Apis mellifera* verschiedene Psychopharmaka wie das von Mutterkornalkaloiden abgeleitete Lisurid, welches in der Parkinsontherapie zum Einsatz kommt, oder Chlorpromazin, ein klassisches Neuroleptikum aus der Schizophrenietherapie eingesetzt (Blenau *et al.*, 1998). Allerdings ist zu beachten, dass die bei Vertebraten ausführlich charakterisierten Substanzen bei Invertebraten u.U. nicht die gewünschte Wirkung haben. So binden die als D₁-Agonisten bzw. -Antagonist eingesetzten Substanzen SKF-38393 und SCH-23390 nur schwach an in HEK293-Zellen exprimierten AmDop1-Rezeptoren (Blenau *et al.*, 1998). Des Weiteren ist SCH-23390 nur bedingt in der Lage, die durch DA induzierte Erhöhung der cAMP-Konzentration zu hemmen (AmDop1 exprimiert in *Sf1*-Zellen; Mustard *et al.*, 2003) An der Speicheldrüse der Schabe *Periplaneta americana* konnte anhand des pharmakologischen Profils keine eindeutige Zuweisung zu den D₁/D₂ bzw. INDR-Gruppen gemacht werden. Eine Klonierung des in der Speicheldrüse vorkommenden Dopaminrezeptors und eine anschließende genauere Charakterisierung dieses Rezeptors könnten dabei weiterhelfen. Mit dem ersten Schritt, der Klonierung, befasst sich u.A. diese Arbeit.

Ligand	Spezifität in Vertebraten	AmDop1 in HEK293 [3H]LSD-Bindung
6,7-ADTN	DA-Rezeptor Agonist	+
R(+)-SKF 38393	D ₁ -Rezeptor Agonist	- -
R-(+)-Lisurid	D ₂ -Rezeptor Agonist D ₁ -Rezeptor Antagonist	+ +
Chlorpromazin	D ₂ -Rezeptor Antagonist	+
<i>Cis(Z)</i> -Flupentixol	DA-Rezeptor Antagonist	+
Siperon	Selektiver D ₂ -Rezeptor Antagonist	+
R(+)-SCH 23390	Selektiver D ₁ -Rezeptor Antagonist	-
S(+)-Butaclamol	DA-Rezeptor Antagonist	+
Haloperidol	D ₂ , D ₃ , D ₄ -Rezeptor Antagonist	-

Abb. 1.6: Auflistung verschiedener Liganden von Dopaminrezeptoren, welche an Insekten zum Einsatz kommen. Am Beispiel von AmDop1 wird deutlich, dass die bei Vertebraten gut charakterisierten Substanzen bei Insekten u.U. anders oder gar nicht binden und wirken können (nach Blenau *et al.*, 1998).

1.10 Wirkungen von Dopamin

Bei Vertebraten spielt Dopamin als Neurotransmitter eine wichtige Rolle bei der Modulation verschiedener Funktionen des zentralen Nervensystems. Durch Dopamin wird die visuelle und olfaktorische Reizwahrnehmung beeinflusst (Tillerson *et al.*, 2006, Tannock *et al.*, 2006). In der Hypophyse wird durch Dopamin die Ausschüttung von Prolactin gehemmt, Körpertemperatur, Futteraufnahme und Sexualverhalten werden durch Dopamin zumeist im Hypothalamus reguliert (Debeljuk und Lasaga, 2006, Hasegawa *et al.*, 2005, Hommel *et al.*, 2006, Hull *et al.*, 2004). Des Weiteren wird die extrapyramidale, d.h. nicht willkürliche Motorik über das nigrostriatale System durch Dopamin reguliert. Hier ist auch der Zusammenhang zur Parkinsonschen Krankheit zu erkennen, bei der die Dopaminkonzentration im Gehirn der Patienten deutlich verringert ist. Schließlich scheint das dopaminerge mesolimbische System eine wichtige Rolle im Belohnungssystem aber auch bei der Entwicklung von Suchtverhalten, psychotischen Symptomen oder schizophrenen

Störungen zu spielen. Ein Mangel an Dopamin kann zu Depressionen führen, da der belohnend wirkende Effekt des Dopamins fehlt.

Bei Insekten konnte unter anderem gezeigt werden, dass Dopamin für die Regulation der Schlaf/ Wach-Rhythmik verantwortlich ist. So konnte z.B. bei einer hyperaktiven Mutante von *Drosophila* der Phänotyp einem nicht funktionellen Dopamintransporter zugewiesen werden (*fumin*, japanisch für Schlaf, Kume *et al.*, 2005). Angeborenes wie erlerntes Paarungsverhalten unterliegt ebenfalls dem Einfluss von Dopamin (Neckameyer, 1998). Dopamin ist des Weiteren bei aversivem Verhalten gegenüber visuell oder olfaktorisch erlernten Reizen beteiligt (Unoki *et al.*, 2005, 2006). Dopamin ist auch ein wichtiger Neurotransmitter und –modulator bei Bienen: Wird Dopamin in die α -Loben der Pilzkörper injiziert, so kommt es zu veränderten elektrischen Signalen während der olfaktorischen Reizaufnahme (Mercer und Erber, 1983). Hat das Tier etwas gelernt, so beeinflusst Dopamin die Erinnerung bzw. Abrufbarkeit des Gelernten (Mercer und Menzel, 1982; MacMillan und Mercer, 1987). Alternativ lässt sich durch Dopamininjektion an Tieren, deren vesikulärer Vorrat an Transmitter durch Reserpin entleert wurde, die beeinträchtigte Motorik wieder aufheben (Menzel *et al.*, 1999).

Dopamin induziert die Speichelsekretion bei *Periplaneta* und *Locusta* (Lang und Walz, 1999; Keating und Orchard, 2004). Bei der Schabe konnte eine fein verzweigte dopaminerge Innervierung der Drüse ermittelt werden (Baumann *et al.*, 2004).

1.11 Das Gehirn der Insekten

Das Vorkommen von TA im Gehirn der Schabe wurde bislang noch nicht untersucht. Die genaue Verteilung einer neurotrophen Substanz in den Neuropilen könnte allerdings erste Hinweise auf deren Funktion geben und so Ansatzpunkt für weitere Experimente sein. Aus dem gleichen Grund ist es wichtig, die Verteilung des zugehörigen Rezeptors im Gehirn zu untersuchen, da diese Experimente dabei helfen könnten, die Zielzellen des Tyramin zu identifizieren.

Hierfür an dieser Stelle eine kurze Einführung in die Anatomie des Insektengehirns.

Das bilateralsymmetrisch organisierte Gehirn lässt sich in drei Teile untergliedern. Den vorderen und größten Teil bildet das Protocerebrum. Dieser Bereich beherbergt die sog. „höheren Zentren“ oder Assoziationszentren wie die paarig auftretenden Pilzkörper (Corpora pedunculata) oder den Zentralkomplex.

Die Pilzkörper selbst bestehen aus den sog. Kenyon-Zellen,

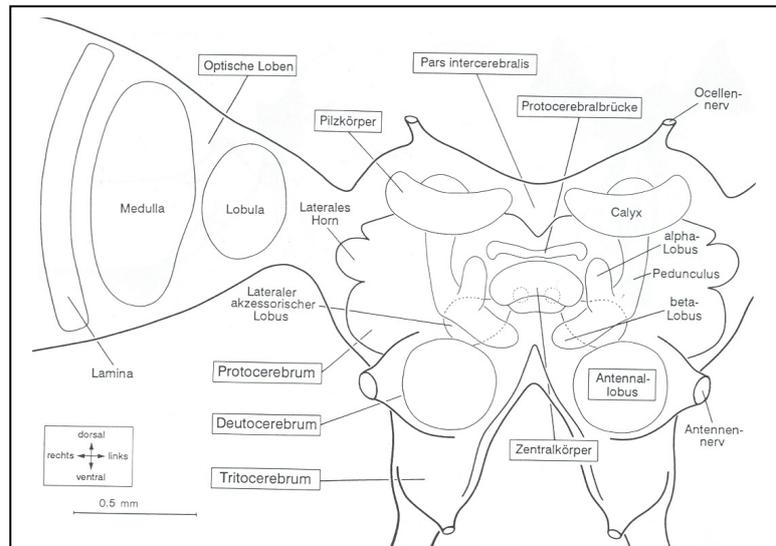


Abb. 1.7: Schematischer Aufbau eines Insektengehirns. Man beachte, dass eine Schabe pro Hemisphäre 2 Calices besitzt (nach Dettner und Peters Lehrbuch der Entomologie 2. Auflage 2003).

intrinsicen Neuronen, deren Somata im dorsal posterioren Gehirn peripher um die Calices (Kelche) gruppiert liegen. Die Gestalt des Pilzkörpers selbst ist eine Konsequenz aus der Form dieser Zellen. Von den Zellkörpern der Kenyon-Zellen ziehen die Neurite in den Calyxbereich und bauen dort mit ihren dendritischen Verzweigungen die typische Kelchform auf. Dies ist der Ort des synaptischen Einganges. Sensorischen Informationseingang erhält er aus den Komplexaugen über die optischen Loben und deren drei großen Neuropilen Lamina, Medulla und Lobula. Weiterhin erhält der Calyxbereich olfaktorischen Input aus den Antennalloben. Aus den Antennalloben werden die Signale über die Antennen-cerebralen Trakte auf die Calices übertragen. Der Pedunculus (Stiel) besteht aus dicht gepackten Axonen, die sich im Bereich der Loben aufspalten. In diesem Bereich findet die Verschaltung auf weitere extrinsische Neurone statt. Generell werden die Pilzkörper mit höheren integrativen Leistungen wie Lernen und Gedächtnis in Verbindung gebracht (Erber *et al.*, 1980; Heisenberg, 2003). Der zweigeteilte Zentralkörper ist ein zentrales motorisches Kontrollzentrum im Insektengehirn, welches sich durch eine hochgeordnete dreidimensionale Struktur von Kolumnen und Schichten auszeichnet. Zusammen mit den Noduli, posteroventral gelegenen symmetrischen glomerulären Strukturen, und der Protocerebrälbrücke bildet er den Zentralkomplex. Neueren Erkenntnissen nach ist der Zentralkomplex u.A. für die Verarbeitung der Wahrnehmung polarisierten Lichts zuständig (Vitzthum *et al.*, 2002).

Der zweite Teil des Gehirns ist das Deutocerebrum, welcher funktionell mit den Antennen assoziiert ist. Die Antennalloben sind die Orte der ersten Verschaltung der olfaktorischen

Sinneszellen. Die Antennalloben sind aus einer Gruppe knäulartiger Neuropile aufgebaut, den Glomeruli. Von Art zu Art unterschiedlich kann ein Lobus bis zu 200 Glomeruli enthalten. Die Axone der Rezeptorneurone einer Antenne ziehen über den Antennalnerv in den ipsilateralen Antennallobus. Die einzelnen Glomeruli sind untereinander über lokale Interneurone verbunden, während Projektionsneurone jeweils einzelne Glomeruli über die Antenno-cerebral-Trakte mit den höheren Zentren des Protocerebrums wie den Pilzkörpern verbinden (Homberg *et al.*, 1989).

Der kleinste Teil des Gehirns ist das Tritocerebrum. Dieser Teil dient der sensorischen und motorischen Kontrolle des Labrums und des Pharynx. Über das Frontalganglion ist das Tritocerebrum mit dem stomatogastrischen Nervensystem verbunden.

1.12 Zielstellung

Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Identifizierung und Klonierung von Aminrezeptorgenen aus der Schabe *Periplaneta americana*. Im Gegensatz zu Wirbeltieren, bei denen die biogenen Amine und deren Rezeptoren intensiv erforscht werden, ist die Forschung darüber bei Wirbellosen noch nicht so weit vorangeschritten. Die Kenntnis über die Rezeptoren soll eine tiefergehende Einsicht in die aminerge Signaltransduktion speziell in dieser Species vermitteln. Biogene Amine spielen eine wichtige Rolle bei verschiedenen physiologischen Prozessen. Die Speichelsekretion bei der Schabe wird z.B. durch Serotonin und Dopamin reguliert (Walz *et al.*, 2006). Für Tyramin konnten in anderen Species verschiedene physiologische Funktionen beschrieben werden. Einige Tyraminrezeptoren sind bereits kloniert worden. Bei *Periplaneta* ist dies nicht der Fall. Für ein tiefergehendes Verständnis der Signaltransduktionswege ist aber die Kenntnis über die Rezeptoren von fundamentaler Bedeutung. Diese Kenntnis stellt einen experimentellen Ansatzpunkt da, von wo die Signalwege z.B. durch an diesen Rezeptoren charakterisierten Pharmaka genauer untersucht werden können.

Ein in dieser Arbeit entwickelter α Tyraminrezeptor-Antikörper soll helfen, das Protein im Gewebe identifizieren zu können. Mit Hilfe immunhistologischer Untersuchungen soll das Vorkommen von Tyramin und dessen Rezeptor nachgewiesen und deren Verteilung analysiert werden. Aus der Verteilung von Ligand und Rezeptor im Gehirn und anderen Organen können sich vielleicht Rückschlüsse auf die Funktion von Tyramin bei *Periplaneta* ziehen lassen.

Kapitel 2:

Material und Methoden:

2.1 Chemikalien und Geräte:

Laborübliche Chemikalien/ Verbrauchsmaterialien wurden von den Firmen Roth (Karlsruhe), Sigma (Taufkirchen) und Merck (Darmstadt), die Restriktionsenzyme von Roche (Mannheim) und die Oligonukleotidprimer von TIB-Molbiol (Berlin) bezogen. Plasmidsequenzierungen wurden von AGOWA (Berlin) durchgeführt. Sofern nicht anders vermerkt, wurden alle Lösungen mit sterilem Reinstwasser (Millipore-Qualität) angesetzt und anschließend in einem Varioklav Dampfsterilisator bei 121 °C für 20 min sterilisiert. Eine Liste der verwendeten Vektoren, Bakterienstämme und Geräte ist im Anhang aufgeführt.

2.2 Molekularbiologische Methoden

Die Protokolle entsprechen im Wesentlichen denen aus Sambrook und Russel (2001).

2.2.1 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Größenauftrennung von DNA-Molekülen wurden Gele aus 0,8-1,2% Agarose in 1x TAE-Puffer verwandt. Den DNA-Proben wurde 1/5 Vol. Gelladepuffer beigemischt und i. d. R. 5 µl bei Testgelen, 20 µl bei Restriktionsansätzen bzw. 50 µl zur Fragmentelution aufgetragen. Als Größenmarker dienten Marker-DNAs bekannter Größe (1 kb DNA Ladder, 100 bp DNA Ladder, New England Biolabs, Frankfurt). Für die Auftrennung der DNA wurde eine Spannung von 10 V/cm Gellänge an das Gel angelegt.

50x TAE Puffer: 1,5 M Tris Base, 60 mM EDTA, 5,71% (v/v) Essigsäure, 1 µg/ml Ethidiumbromid
Gelladepuffer: 0,25% (w/v) Bromphenolblau, 0,25% (w/v) Xylencyanol, 30%(v/v) Glycerol

2.2.2 DNA-Extraktion aus Agarosegelen

Bei dem verwendeten Protokoll wird die DNA mechanisch aus dem zuvor ausgeschnittenen Gelstück durch Zentrifugation eluiert. Dafür wurde in ein zuvor halbiertes Eppendorfreaktionsgefäß (ER) mit einer Kanüle ein Loch gebohrt und dieses anschließend mit silanisierter Glaswolle (Serva) verstopft. Durch dieses so präparierte Gefäß wurde das Gelstück für 2 min bei 6000 rpm in der Tischzentrifuge (Biofuge pico) zentrifugiert, wobei das Eluat in einem weiteren ER aufgefangen wurde. Die im Eluat enthaltene DNA wurde mit 1/10 Vol. 3 M Natriumacetat pH 3,8 und 2,5 Vol. Ethanol (abs.) für mindestens 2 h bei -20°C präzipitiert. Nach Zentrifugation (5 min; 13.000 rpm; Biofuge pico) wurde das Pellet mit 70% Ethanol gewaschen und in Wasser (bidest.) oder alternativ in TE-Puffer gelöst.

TE-Puffer: 10 mM Tris-HCl, pH 7,4, 1 mM EDTA

2.2.3 Restriktion der DNA

Restriktionsendonucleasen hydrolysieren DNA sequenzspezifisch an bestimmten Stellen. Für einen analytischen Verdau wurden 200-500 ng DNA mit 5 U des gewünschten Enzyms in einem 20 μl -Ansatz zusammen mit dem vom Hersteller empfohlenen Puffer für 60 min geschnitten. Die Restriktion erfolgt i.d.R. bei 37°C (BstZ1: 50°C). Für die Präparation größerer Mengen von linearisierter Plasmid-DNA wurden 1-2 μg DNA eingesetzt, die Inkubationszeit auf 2 h verlängert. Die Restriktionsfragmente wurden aus dem Agarosegel eluiert und direkt weiter verwendet (z.B. für eine Ligation).

2.2.4 Ligation

Ligationen von zuvor mit Restriktionsenzymen behandelten DNA-Fragmenten bzw. Vektoren erfolgten in 20 μl -Ansätzen. Diese enthielten ca. 150 μg Plasmid-DNA, 450 μg *insert*-DNA, 1x Ligationspuffer und 5 U T4-DNA-Ligase (Fermentas). Die Inkubation erfolgt bei 4°C über Nacht, wahlweise auch für 4 h bei 16°C . Anschließend wurde der gesamte Ansatz zur Transformation von *E. coli*-Zellen verwendet. Alternativ konnten durch Taq-Polymerase

frisch synthetisierte PCR-Produkte aufgrund eines Adenosinüberhanges in den pGEM-T Vektor ligiert werden (T/A-Klonierung, pGEM-T Vector System, Promega). Die Ligation erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers.

10 x Ligase-Puffer: 400 mM Tris-HCl, 100 mM MgCl₂, 100 mM DTT, 5 mM ATP, pH 7.8

2.2.5 Transformation chemisch kompetenter Zellen (nach Hanahan 1983)

Zur Transformation mit Plasmid-DNA wurde ein Aliquot (200 µl) transformationskompetenter Zellen auf Eis aufgetaut. Zur Transformation wurden 20 µl Ligationsansatz hinzu gegeben und die Zellen für 30 min auf Eis inkubiert. Es folgte ein Hitzeschock für 45 s im Wasserbad bei 42°C, anschließend wurden die Zellen 2 min auf Eis abgekühlt. Der Ansatz wurde mit 800 µl LB-Medium (LB-Broth, LAB M, Lancashire) versetzt und 1 h bei 37°C im Schüttler inkubiert. Nach kurzer Sedimentation (2 min, 6.000 rpm, Biofuge pico) wurden 800 µl Medium abgenommen und die Zellen in den verbleibenden 200 µl resuspendiert. Anschließend wurden sie auf LB-Agar-Platten (LB-Agar, LAB M, Lancashire) mit entsprechenden Antibiotika-Zusätzen (je nach Plasmid: Carbenicillin 100 µg/ml; Chloramphenicol 34 µg/ml; Kanamycin 50 µg/ml) ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Für Blau-Weiß-Selektionen wurde den Platten zuvor zur Induktion 0,5 mM IPTG (Isopropyl-Thio-D-Galaktopyranosid) und als Färbesubstrat 80 µg/ml X-Gal zugesetzt.

2.2.6 Präparation von Plasmid-DNA im Mini- und Midi-Maßstab

Um Plasmid-DNA aus kleinen Ansätzen zu isolieren, wurden 5 ml antibiotikumhaltiges LB-Medium mit einer einzelnen Kolonie angeimpft und über Nacht bei 37°C im Schüttler inkubiert (je nach Plasmid: Carbenicillin 100 µg/ml; Chloramphenicol 34 µg/ml; Kanamycin 50 µg/ml). Die Präparation der Plasmid DNA erfolgte mit dem E.Z.N.A Miniprep Kit (Peqlab) nach Vorschrift des Herstellers. Die Plasmid-DNA wurde mit Wasser (bidest.) eluiert.

Für die Präparation größerer DNA-Mengen wurden 50 ml antibiotikumhaltiges LB-Medium mit einer Kolonie angeimpft und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden 10 min bei 5.500 rpm (Biofuge 15R) sedimentiert. Das Bakterienpellet wurde nach dem Resuspendieren in 4 ml Lösung I mit 8 ml Lösung II versetzt, vermischt und umgehend mit 8 ml Lösung III neutralisiert. Nach einer Zentrifugation für 5 min bei 5.500 rpm wurde der

Überstand durch einen Faltenfilter filtriert und zur Präzipitation der Plasmid-DNA mit 25 ml Isopropanol versetzt. Es erfolgte eine Zentrifugation für 10 min bei 5.500 rpm. Der Überstand wurde dekantiert und das Pellet in 1,45 ml H₂O (bidest.) gelöst. Nach Zugabe von 2,5 ml 4 M LiCl und 50 µl 1 M Tris-HCl (pH 7,5) erfolgte eine erneute Zentrifugation für 5 min bei 5.500 rpm. Der Überstand wurde mit 2,5 Vol. Ethanol (abs.) gemischt und für 10 min bei 5.500 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde in 200-300 µl TE-Puffer gelöst, mit 2-3 µl RNase Cocktail (Ambion) versetzt und mindestens 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgten eine Phenol/Chloroform-Extraktion und eine Präzipitation mit 1/10 Vol. 3 M LiCl und 3x Vol. Ethanol (abs.). Nach abschließendem Waschen (70% Ethanol) und Lösen des Pellets im gewünschten Volumen von Wasser (bidest.) bzw. TE-Puffer, wurde die Reinheit und Konzentration der DNA spektroskopisch durch Messung der Absorption bei 260 nm und 280 nm bestimmt. Durch Restriktionsverdau konnte bei Bedarf die erfolgreiche Ligation überprüft werden.

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

Lösung II: 0,2 M NaOH, 1% SDS

Lösung III: 60% (v/v) 5 M KAc, 11.5% (v/v) Essigsäure, pH 4,8

TE-Puffer: 10 mM Tris-HCl, pH 7,4; 1 mM EDTA

2.2.7 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR dient der exponentiellen Amplifikation ausgewählter DNA-Fragmente. Dazu wurden 100-200 ng der zu amplifizierenden DNA (wahlweise Plasmid-DNA, Schabengehirn-cDNA oder eine λ -Uni-ZAPTM XR-cDNA-Bibliothek von *Periplaneta americana*-Gehirnen, zur Verfügung gestellt von PD Dr. A. Baumann) in einem 50 µl-Ansatz mit 1x Reaktionspuffer, je 200 nmol sequenzspezifischen Oligonukleotiden („Primer“), 400 µM jeden dNTPs (Amersham Bioscience) und 2,5 U *Taq*-DNA-Polymerase (Peqlab) angesetzt. Dieser Ansatz wurde im Thermocycler (Biometra) folgendem Temperaturprogramm unterzogen: 1x Denaturierung 150 s bei 94°C; 35x Denaturierung 40 s bei 94°C, Primeranlagerung („annealing“) 40 s bei 55-65°C, Elongation 60 s pro kb bei 72°C; 1x abschließende Elongation 10 min bei 72°C; Kühlung 4°C. Die Produkte wurden elektrophoretisch aufgetrennt und bei Bedarf eluiert. Über die Primer können Restriktionsschnittstellen eingeführt werden. Die Fragmente konnten dann mit den entsprechenden Restriktionsendonukleasen geschnitten und in geeignete Plasmid-Vektoren ligiert werden. Eine Auflistung der verwendeten Oligonukleotide befindet sich im Anhang.

2.2.8 RNA-Extraktion und cDNA-Synthese

Für die Synthese von cDNA wurde zuerst aus präparierten Gehirnen von *P. americana* mit dem Trizol™ LS-Reagenz (Gibco) die Gesamt-RNA isoliert. Gesamt-RNA enthält zu 1-5% poly(A)⁺-mRNA. Diese wurde im Anschluss mit dem Mikro Fast Track 2.0 Kit (Invitrogen) entsprechend des Protokolls des Herstellers aufgereinigt. Die RNA-Konzentration wurde photometrisch bestimmt. Die reverse Transkription erfolgte mit dem „reverse transcription system“ von Promega. In einem ersten Schritt wurde die RNA für 10 min bei 70°C denaturiert und dann auf Eis abkühlt. Ein Reaktionsansatz enthielt: 4 µl 25 mM MgCl₂; 2 µl 10x RT-Puffer; 2 µl 10 mM dNTP-Mix; 0,5 µl RNasin® Ribonuclese inhibitor; 15 U AMV Reverse Transcriptase (High Conc.); 0,5 µg Oligo(dT)₁₅ Primer oder zufällig synthetisierte (*random*) Primer und 1 µg mRNA (H₂O bidest. ad 20 µl). Der Ansatz wurde 1 h bei 42°C inkubiert und die Reaktion anschließend 5 min bei 95°C und 5 min auf Eis gestoppt. Die cDNA wurde mit 1/10 Vol. 3 M Natriumacetat und 2,5 Vol. Ethanol (abs.) präzipitiert und in Wasser (bidest.) gelöst. Die cDNA wurde als *template* für die PCR verwendet.

2.2.9 Schritte der Sequenzbestimmung/ Genklonierung

i) Einsatz von degenerierten Primern

Für die Schabe *P. americana* ist das Genom noch nicht entschlüsselt worden, was eine Identifizierung der Genen *in silico* nicht zulässt. Da die Rezeptoren für biogene Amine z. T. sehr stark konservierte Sequenzbereiche aufweisen, bot sich der Einsatz von degenerierten Oligonukleotidprimern an. Degenerierte Primer stellen ein Gemisch unterschiedlicher Primer dar, die mit ihrer Sequenz mehrere mögliche Triplets abdecken. Die Primer wurden auf zuvor für 10 min bei 96°C denaturierten Eluat der λ-Uni-ZAP™ XR-cDNA-Bibliothek verwendet und deckten Sequenzbereiche Transmembrandomänen VI bzw. VII ab. Ein PCR-Ansatz (50 µl) enthielt neben 20 µl Eluat 1x PCR-Reaktionspuffer je 2 µM Primer, 400 µM jeden dNTPs, sowie 2,5 U *Taq*-DNA-Polymerase (Peqlab). Dieser Ansatz wurde im Thermocycler (Biometra) folgendem Temperaturprogramm unterzogen: 1x 150 s 94°C; 35x 40 s 94°C, 40 s bei 55-65°C, 30 s bei 72°C; 1x 10 min 72°C. Um eventuell unspezifisch amplifizierte Produkte von den gesuchten unterscheiden zu können, wurde eine „*nested* PCR“ mit eingerückten Primern durchgeführt. Die Produkte wurden elektrophoretisch aufgetrennt, bei Bedarf eluiert, ligiert und sequenziert (AGOWA, Berlin).

ii) Herstellung radioaktiv markierter Sonden

Die in den nächsten drei Abschnitten beschriebenen Arbeiten sind im Labor von PD Dr. A. Baumann in Jülich durchgeführt worden.

Für das Durchmustern einer cDNA-Bibliothek von *Periplaneta americana* wurden DNA-Fragmente mit der *random priming*-Methode radioaktiv markiert. Von einem Plasmid, das Fragmente enthielt, die zuvor mit degenerierten Primern aus cDNA gewonnen wurden, wurden 100 ng in Gegenwart von Zufallsdecameren („*random primers*“, Invitrogen) 10 min bei 95°C denaturiert. Die nachfolgenden Markierungsreaktion (Endvolumen 25 µl) erfolgte mit dem DECAprime Kit (Ambion) nach dem Protokoll des Herstellers. Dabei benutzt die DNA-Polymerase (Klenow-Fragment) die Oligonukleotide als Startpunkte für die DNA-Neusynthese und baut gleichzeitig radioaktiv markiertes 5'-[α-³²P]- Desoxycytidin in die DNA ein. Zur Abtrennung nicht eingebauter Nukleotide wurde der Markierungsansatz über eine Sephadex-G-75-Säule (Amersham Bioscience) gereinigt.

iii) Durchmustern einer cDNA Bibliothek

Die radioaktiv markierte Sonde wurde für das Durchmustern einer cDNA-Bibliothek in λ-ZAPII-Vektoren verwendet. Von dieser Bibliothek wurden Filterabzüge hergestellt. Die Hybridisierung der Filter erfolgte unter mäßig reduzierter Stringenz in 5x SET, 5x Denhardts-Lösung, 100 µg/ml autoklavierter Heringssperma-DNA, 0,1% SDS, 10⁶ cpm/ml radioaktiv markierter Sonden-DNA über Nacht bei 59°C im Rotorofen (Biometra). Die Filter wurden zweimal für 30 min in 2x SET, 0,1% SDS bei 65°C gewaschen. Die Röntgenfilme wurden über Nacht zusammen mit Verstärkerfolien belichtet. Positive Rekombinanten konnten an Hand des Filmes Plaqueregionen auf den Agarplatten zugeordnet und isoliert werden. Die Phagen wurden in SM⁺-Puffer eluiert und verschiedene Verdünnungen zur Vereinzelung ausplattiert. Dafür wurden 50 µl Bakterienzellen für 15 min bei 37°C mit der Phagenverdünnung inkubiert. Nach Zugabe von Top-Agarose (6 ml) wurde der Ansatz ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Filterabzüge dieser Phagen-Platten wurden für einen Feinscreen (unter den gleichen Bedingungen wie oben) verwendet. Nach der Verifizierung positiver vereinzelter Klone durch Autoradiografie wurde die Plasmid-DNA durch „*in vivo excision*“ isoliert.

20x SET: 3 M NaCl, 0,4 M Tris-HCl, pH 7,5, 0,02 M EDTA

100x Denhardts-Lösung: 2% (w/v) BSA, 2% (w/v) Ficoll 400, 2% (w/v) Polyvinylpyrrolidon

SM⁺-Puffer: 100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 7,4, 10 mM MgCl₂, 10 mM CaCl₂,

0,05% (w/v) Gelatine

Top-Agarose: LB-Medium mit 10 µM MgSO₄ und 6 g/l Agarose

iv) *In vivo excision*

Vom Eluat eines vereinzelt λ -Zap II-Phagen-Klons wurden 100 μ l mit 200 μ l kompetenten Mg^{2+} XL1-Blue-Zellen ($OD_{600}/ml = 10$) und 1 μ l des Helferphagen R 408 (Stratagene) versetzt und 15 min bei 37°C inkubiert. Die Ansätze wurden für 3 h bei 37°C in YT-Medium inkubiert. Anschließend erfolgte eine 20minütige Inkubation bei 70°C. Nach einer Zentrifugation von 15 min bei 1.000x g war das Phagemid (Bluescript SK-/gesuchte cDNA) isoliert. Durch erneute Inkubation mit Mg^{2+} XL1-Blue Zellen wurde das Phagemid in die Zellen aufgenommen. Nach 15 min Inkubation bei 37°C wurde die Suspension auf LB/Carbenicillin-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Plasmid-DNA wurde aus einzelnen Kolonien isoliert.

2x YT-Medium: 16 g/l Bacto Trypton, 10 g/l Bacto Yeast Extract, 10 g/l NaCl, pH 7,0
 Mg^{2+} XL1-Blue Zellen: Aufzucht in LB-Medium, 0,2% Maltose, 10 μ M $MgSO_4$

v) Rapid amplification of cDNA ends (RACE-PCR) und Vollängenklonierung

Für die Aufklärung der cDNA-Sequenzen am 5'- und 3'-Ende wurden RACE-Kits zweier Anbieter verwendet. Um die fehlenden Sequenzen am 3'-Ende zu erhalten, wurde das „5'/3' RACE Kit, 2nd Generation“ von Roche verwendet. Im ersten Schritt wurde cDNA in einem 20 μ l großen Reaktionsansatz synthetisiert (4 μ l 5x cDNA *synthesis buffer*, 2 μ l *deoxynucleotide mixture*, 1 μ l *oligo dT-anchor primer*, ca. 1 μ g mRNA, 1 μ l Transcriptor reverse transcriptase; 55°C 60 min, 85°C 5 min). In der anschließenden PCR-Reaktion wurde ein genspezifischer Primer zusammen mit einem *PCR-anchor primer* eingesetzt, um aus der noch unspezifisch retranskribierten cDNA genspezifische Fragmente zu erhalten. Die Fragmente wurden bei Bedarf durch eine sog. „nested PCR“, d.h. eine PCR mit weiter in den schon bekannten Sequenzbereich eingerückten Primern, bestätigt, anschließend TA-kloniert und sequenziert.

Das ausstehende 5'-Ende ließ sich mit dem „SMARTTM RACE cDNA amplification Kit“ (Clontech) vervollständigen. Eine besondere Reverse Transkriptase (Powerscript RT) mit integrierter Terminaltransferase-Aktivität ermöglicht eine hohe Ausbeute von vollständiger cDNA, die neben der Klonierung des 5'-Bereiches mit einem nahe gelegenen genspezifischen Primer (GSP), auch die Vollängenklonierung ermöglicht. Dazu wurden 2 GSPs, der eine 5'-

vom Start gelegen, der andere 3'- vom Stopkodon gelegen, eingesetzt (genauere Ausführung in der Anleitung des Herstellers). Für die RT-Reaktion wurden 1 µg mRNA (ca. 1-3 µl) mit je 1 µl 5'CDS Primer und BD SMART II A Oligo gemischt. Der Ansatz wurde 2 min auf 70°C erwärmt, danach kurz auf Eis abgekühlt. Anschließend wurden 2 µl 5x First-Strand Buffer, 1 µl 20 mM DTT, 1 µl 10 mM dNTP Mix und 1 µl PowerScript RT dazugegeben und der Ansatz abschließend für 90 min bei 42°C inkubiert. Die so gewonnene cDNA wurde in 250 µl Tricine-EDTA-Puffer verdünnt und dann direkt für die nachfolgende PCR verwendet. Dazu wurden folgende Lösungen zusammengegeben: 34,5 µl Wasser (bidest.), 5 µl 10x BD Advantage 2 PCR Puffer, 1 µl 10 mM dNTP Mix, 1 µl 50x BD Advantage 2 Polymerase Mix, 2,5 µl cDNA, 5 µl Universal Primer Mix (UPM) und 1 µl GSP. Das vom Hersteller vorgeschlagene „TouchDown PCR“ Programm wurde übernommen. Die amplifizierten Fragmente konnten durch „nested PCR“ mit eingerückten GSPs oder dem Nested Universal Primer (UPM) überprüft werden. Zuletzt wurden sie TA-kloniert und sequenziert.

2.3 Biochemische Methoden

2.3.1 Proteinbestimmung

Proteinmengen wurden mit dem Roti-Nanoquant-Reagenz (Roth) nach Angaben des Herstellers bestimmt. Mittels einer Eichgerade mit BSA (1-10 µg in Wasser (bidest.)) wurden die Konzentrationen der Proben durch Messung der Absorption bei 590 bzw. 450 nm ermittelt.

2.3.2 SDS-PAGE

Proteine lassen sich unter denaturierenden Bedingungen mittels eines SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese-Systems (SDS-PAGE) nach Laemmli (1970) der Größe nach auftrennen. In der Regel wurden diskontinuierliche Gele (Trenngel 10–14% Acrylamidlösung (Roth), Sammelgel 3% Acrylamidlösung) verwendet. Für die Präparation der Proteine aus dem Gehirn der Schabe wurden 2 Gehirne in 200 µl 1x SDS-Probenpuffer (Roth) homogenisiert, unlösliche Bestandteile wurden im Anschluss abzentrifugiert (10 min 13000 rpm, Biofuge pico). Die aufzutrennenden Proben wurden vor dem Auftragen (5-10 µl) abschließend 10 min

bei 95°C denaturiert. Die Auftrennung erfolgte in SDS-Laufpuffer bei 60 mV im Sammelgel und 130 mV im Trenngel. Je nach weiterer Verwendung wurden die Gele danach mit Coomassie G250 (Serva) gefärbt oder die Proteine auf Nitrozellulosemembranen transferiert. Als Molekulargewichtsstandard dienten LMW (Low Molecular Weight, Dalton Mark VII - L Sigma) und HMW (High Molecular Weight Standard Mixture, Sigma).

Acrylamid-Lösung: 30% Acrylamid/ 0,8% Bis-Acrylamid im Verhältnis 37,5:1 (Roth)
Trenngel-Puffer: 375 mM Tris/HCl, 0,2% (w/v) SDS, pH 8,8
Sammelgel-Puffer: 125 mM Tris/HCl, 0,2% (w/v) SDS, pH 6,8
SDS-Laufpuffer: 25 mM Tris/HCl, 250 mM Glycin, 0,1% (w/v) SDS, pH 8,8
Coomassie-Färbelösung: 0,1% (w/v) Coomassie G250, 50% (v/v) Methanol, 20% (v/v) Essigsäure
Entfärbelösung: 10% (v/v) Methanol, 7% (v/v) Essigsäure

2.3.3 Western-Blotting

Proteine können in einem elektrischen Feld aus einem Acrylamid-Gel heraus auf eine Nitrozellulose-Membran (Protran nitrocellulose transfer membrane, Schleicher & Schuell BioScience, Dassel) übertragen werden („Blotting“). Hierfür wurde das *Semidry*-Verfahren in einem diskontinuierlichen Puffersystem angewendet. Auf der Anode der Blotkammer wurden Filterpapiere (Amersham Bioscience), Membran und Gel wie folgt aufeinander geschichtet: befeuchtete Filter, 6x in Anodenpuffer I; 3x in Anodenpuffer II; Nitrozellulosemembran; SDS-Gel; befeuchtete Filter 9x in Kathodenpuffer. Der Proteintransfer erfolgte für 90 min bei 54 mA pro Gel. Der Erfolg des Transfers wurde durch Färbung mit Ponceau-Rot (Serva) überprüft.

Anodenpuffer I: 300 mM Tris-Base, 20% (v/v) Methanol, pH 10,4
Anodenpuffer II: 25 mM Tris-Base, 2% (v/v) Methanol, pH 10,4
Kathodenpuffer: 40 mM 6-Amino-n-Hexansäure, 20% (v/v) Methanol, pH 7,6

2.3.4 Immundetektion

Proteine können auf den Nitrozellulose-Membranen mittels Antikörpern spezifisch detektiert werden. Dazu wurden als erstes unspezifische Bindungsstellen auf der Membran mit 5% (w/w) Milchpulver/Wasser für 30 min abgesättigt, anschließend wurde der Blot für 3 h bei Raumtemperatur mit dem entsprechend in TBST verdünnten Antikörper inkubiert. Ungebundene Antikörper wurden mit TBST 3x 5 min ausgewaschen. Die Blots wurden mit dem sekundären, Peroxidase-markiertem Antikörper in entsprechender Verdünnung bei Raumtemperatur für 1 h inkubiert, erneut 3x gewaschen und kurz mit Wasser (bidest.)

gespült. Die durch eine ECL-Entwicklerlösung (Pierce) hervorgerufene Chemilumineszenz wurde auf X-OMAT-AR-Filmen (Kodak) detektiert.

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

2.3.5 Reinigung eines Antiserums

i) Prokaryotische Expression von Proteinen

BL21-Zellen wurden zunächst mit den gewünschten Expressionsvektoren transformiert. Von dieser Transformation wurden 5 ml-Vorkulturen (LB-Medium + Antibiotikum) angesetzt. Hieraus wurden 250 ml große Hauptkulturen angeimpft und bis zu einer OD_{600} von 0,4–0,8 im Warmluftschüttler bei 37 °C wachsen gelassen. Durch Zugabe von 1 mM IPTG wurde die Proteinynthese induziert. Nach weiteren 3 h bei 37°C wurden die Zellen für 10 min bei 5500 rpm pelletiert. Das Pellet wurde je nach Reinigungsprotokoll in 2-5 ml TE-Puffer (für MBP-Fusionsproteine) bzw. Binde-Puffer (für HisTag Fusionsproteine) resuspendiert und mit einem Stabsonifizier 3x 30 s sonifiziert. Das Lysat wurde zentrifugiert (10 min; 15000 rpm, 4°C), um die unlöslichen Bestandteile des Aufschlusses abzutrennen. Aliquots der löslichen und unlöslichen Fraktion (das gesuchte Peptid kann auch im Pellet in unlöslicher Form auftauchen), die vor bzw. nach der Induktion abgenommen wurden, wurden im Anschluss durch SDS-PAGE analysiert.

TE-Puffer: 10 mM Tris-HCl, pH 7,4, 1 mM EDTA

Binde-Puffer: 10 mM Imidazol, 50 mM $NaPO_4$, 300 mM NaCl, 1 mg/ml Lysozym

ii) Reinigung von MBP-Fusionsproteinen

Der Expressionsvektor pMal-c2X versieht bei der Proteinexpression das synthetisierte Peptid mit einem N-terminal gelegenen Maltose-Bindeprotein (MBP, kodiert durch das *maltE*-Gen). Dies ermöglicht eine affinitätschromatographische Reinigung des Peptides mittels einer Amylose-Matrix (NEB). Hierfür wurde eine leere Plastiksäule (Biorad) mit 50% Säulenmatrix bis zu einem Säulenvolumen von etwa 3 ml befüllt und diese mit 5x Säulenvolumen TE-Puffer äquilibriert. Das zuvor mit TE-Puffer 1:5 verdünnte Lysat wurde auf die Säule gegeben, die Säule im Anschluss mit 10x Säulenvolumen Säulenpuffer gewaschen und zuletzt das Peptid mit 5 ml maltosehaltigem Elutionspuffer zu je 1 ml-Aliquots eluiert. Der Erfolg

der Reinigung wurde mittels SDS-PAGE überprüft. Von dem so gewonnenen Protein wurden 200–500 µg zur Immunisierung von zwei zuvor auf Kreuzreaktivität gegen das MBP-Fusionsprotein getestete Kaninchen verwandt (Fa. PINEDA, <http://www.pineda-abservice.de>, Berlin).

Säulenpuffer: 200 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH7,4, 10 mM β-Mercaptoethanol, 1 mM EDTA
Elutionspuffer: 200 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH7,4, 10 mM β-Mercaptoethanol, 1 mM EDTA,
20 mM Maltose

iii) Reinigung von His-markiertem Fusionsprotein

Der Expressionsvektor pET - 30a versieht bei der Proteinexpression das synthetisierte Peptid mit einem N-terminal gelegenen polyHis-haltigem Peptid. Dies ermöglicht ein affinitätschromatographische Reinigung des Peptides mittels einer Ni²⁺-Matrix (His-Select HF-Nickel Affinity gel system, SIGMA). Hierfür wurden 2 ml zuvor mit Wasser (bidest.) gewaschene und mit 5 ml Binde-Puffer voräquilibrierte Säulenmatrix 1 h mit 5 ml Zelllysat bei 4°C leicht geschüttelt. Der Überstand wurde verworfen, die Matrix mit 2x 10 ml Waschpuffer gewaschen. Die Matrix wurde in 5 ml Waschpuffer aufgenommen und in eine Plastiksäule (Biorad) gegeben. Das Protein wurde dann in 2 ml Elutionspuffer eluiert. Der Erfolg der Reinigung wurde mit SDS-PAGE überprüft, das Protein selbst im Anschluss gegen Kopplungspuffer dialysiert.

Binde-Puffer: 10 mM Imidazol, 50 mM NaPO₄, 300 mM NaCl, 1 mg/ml Lysozym
Waschpuffer: 20 mM Imidazol, 50 mM NaPO₄, 300 mM NaCl
Elutionspuffer: 250 mM Imidazol, 50 mM NaPO₄, 300 mM NaCl

iv) Reinigung des Antiserums

Zur Reinigung der polyklonale Antikörper wird das His-markierte Peptid kovalent auf einer HiTrap Säule (HiTrap NHS-activated HP, Amersham) über enthaltene Aminogruppen gebunden. Hierzu wurde die Säule zunächst mit 1 mM HCl gewaschen und im Anschluss das Peptid im Kopplungspuffer für ca. 30 min langsam mit einer Spritze wiederholt über die Säule gegeben. Freie reaktive Gruppen wurden mit Etanolamin abgesättigt (3x 2 ml Puffer A; 3x 2 ml Puffer B; 3x 2 ml Puffer A; 30 min Raumtemperatur, 3x 2 ml Puffer B; 3x 2 ml Puffer A; 3x 2 ml Puffer B; 2 ml Startpuffer; 2 ml Lagerungspuffer).

Vor Beginn der eigentlichen Reinigung wurde die Säule zunächst mit 10 ml Startpuffer äquilibriert, bevor das 1:5 mit Startpuffer verdünnte Serum (50 ml) mit einer Peristaltikpumpe in einem Kreislauf (1 ml/min) über Nacht bei Raumtemperatur über die Säule gepumpt wurde. Am nächsten Tag wurde unspezifisch gebundenes Protein mit weiteren 10 ml

Startpuffer aus der Säule ausgewaschen, die Elution erfolgte zuletzt mit 3 ml stark saurem Elutionspuffer. Die jeweils 500 µl großen Aliquots wurde dabei sofort durch vorgelegte 60 µl 1 M Tris pH 9 neutralisiert, um die Antikörper zu renaturieren. Der Erfolg der Elution wurde mit einem Tropftest und anschließender Ponceaufärbung überprüft. Abschließend wurde die Säule für die Lagerung mit 10 ml Startpuffer reäquilibriert, dann unter Lagerungspuffer im Kühlschrank aufbewahrt.

Kopplungspuffer: 0,2 M NaHCO₃, 0,5 M NaCl pH 8,3
Puffer A: 0,5 M Ethanolamin, 0,5 M NaCl pH 8,3
Puffer B: 0,1 M NaAc, 0,5 M NaCl pH 4
Lagerungspuffer: 0,05 M Na₂HPO₄, 0,1% NaN₃ pH 7
Startpuffer: 75 mM Tris-HCl pH 8
Elutionspuffer: 0,1 M Glycin HCl, 0,5 M NaCl pH 2,7

v) Präabsorption

Um die Spezifität des affinitätsgereinigten Antikörpers zu testen, wurde der primäre Antikörper vor der Inkubation mit dem Western Blot mit einem spezifischen Antigen (das für die Immunisierung verwendete Fusionsprotein) inkubiert. Das Fusionsprotein wurde in Konzentrationen von 5-15 µg/ml eingesetzt, die Antikörper damit über Nacht bei 4 °C präabsorbiert.

In einem weiteren Ansatz wurde 1 ml des mit Startpuffer (s.o.) vorverdünnten Antikörpers auf die Säule mit dem immobilisierten Antigen gegeben und über Nacht präabsorbiert. Am nächsten Tag wurden mit 1 ml Startpuffer nichtgebundene Antikörper eluiert und in den Western Blots eingesetzt.

2.4 Heterologe Expression in HEK 293-Zellen

2.4.1 Expressionsvektorkonstruktion

Für die Expression des Rezeptors in einer eukaryotischen Zellkultur wurden der kodierenden cDNA zuerst am 5'-Ende und am 3'-Ende durch PCR mit spezifischen Primern weitere Sequenzen angefügt. Direkt vor dem Startkodon wurde eine Kozak-Sequenz (Kozak, 1984) angefügt, um eine eukaryotische Expression zu ermöglichen. Das 3'-Ende wurde mit einer zusätzlichen Hämagglutinin-A-kodierenden Sequenz (YPYDVPDYA) versehen, was eine Detektion des Rezeptors mit einem kommerziell erhältlichen α-HA-Antikörper ermöglicht. Abschließend wurde die so vorbereitete cDNA in den eukaryotischen Expressionsvektor

pcDNA3.1(+) über die durch die Primer angefügten Schnittstellen ligiert und nach einer anschließenden Plasmidpräparation im Midi-Maßstab zur Transfektion der Zellkulturzellen verwandt.

2.4.2 Herstellung stabiler Zelllinien

Die hier beschriebenen Arbeiten sind im Labor von PD Dr. A. Baumann in Jülich durchgeführt worden.

Zur Transfektion exponentiell wachsender HEK (human embryonic kidney cells) 293-Zellen (2×10^5 Zellen in 5 cm Petrischalen) wurden $\sim 8-10 \mu\text{g}$ Plasmid-DNA eingesetzt. Sie erfolgte durch die Methode der Calciumphosphatpräzipitation (Chen und Okayama, 1987). Die Zellen wurden über Nacht bei 37°C inkubiert, am nächsten Tag die Präzipitate entfernt und 2×10^4 Zellen erneut ausgesät. Am nächsten Tag wurden die Zellen in antibiotikumhaltiges Medium (MU2 + 1 mg/ml Gentamycinsulfat G418) überführt. Einen Tag später wurde die Antibiotikumkonzentration auf 1,2 mg/ml erhöht, einen weiteren Tag später wieder auf 1 mg/ml reduziert, um so erfolgreich transfizierte Zellen zu selektieren. Über etwa 14 Tage wurden nun positive Klone selektiert und in Multiwellschalen vermehrt, das Medium wurde jeweils alle drei Tage gewechselt. Zuletzt wurde die Antibiotikumkonzentration bei eindeutig positiven Klonen auf 0,8 mg/ml reduziert.

MU2-Medium: MEM + GlutaMAXTMI (Invitrogen), 2% (w/v) Ultrosor G (Ciphergen, Cergy-Saint-Christophe, Frankreich), 1% nicht essentielle AS, 1x Penicillin/Streptomycin

2.5 Immunhistologische Untersuchungen

2.5.1 an Schnitten

i) anti-PeaTyr Antiserum

Das gereinigte Antiserum wurde auf Vibratomschnitten für die Detektion des Tyraminrezeptors eingesetzt. Das Gehirn einer Schabe wurde unter kalter Tris-Puffer (Lösung A 50 mM, pH 7,5) präpariert und über Nacht mit 4% Paraformaldehyd in PBS bei 4°C fixiert. Am nächsten Tag wurde das Gehirn mit Lösung A 3×15 min gewaschen und anschließend in 18% Gelatine eingebettet. Nachdem der Gelatineblock ausgehärtet war, wurde er mit einem Skalpell getrimmt. Anschließend wurden unter Lösung A mit einem Vibratom $50 \mu\text{m}$ dicke Schnitte angefertigt. Die Schnitte wurden in einer kleinen Petrischale im Wasserbad (50-

60°C) 2x 10 min lang aus der Gelatine herausgelöst und danach 2x 10 min mit Lösung A gewaschen. Noch unvernetzte Aldehydgruppen des Fixativs wurden mit 50 mM NH₄Cl 10 min lang umgesetzt, die Schnitte im Anschluss erneut 3x 10 min mit Lösung A gewaschen. Unspezifische Bindungsstellen wurden durch Inkubation für 90 min mit Blockierlösung (Lösung A + 3% NGS, 0,5% Triton X 100) abgesättigt. Abschließend wurden die Schnitte über Nacht mit 1/40 verdünntem Antiserum inkubiert. Die Schnitte werden 3x 15 min mit Lösung B gewaschen und mit in Lösung B verdünntem sekundären Antikörper (*goat anti rabbit* CY3 1:200) für 3 h inkubiert. Abschließend wurden die Schnitte erneut 3x 15 min mit Lösung B gewaschen und unter 50 % Glycerol eingedeckelt.

Lösung A: 50 mM Tris HCl pH 7,5
Lösung B: 50 mM Tris-HCl pH 7,5; 8,5 g/l NaCl

ii) anti-Tyramin Antikörper (Chemicon)

Für den immunhistologischen Nachweis von Tyramin wurde eine andere Fixierung des Gewebes durchgeführt. Die Gehirne wurden zunächst unter Fixativ (5% Glutaraldehyd; 0,1 M Phosphatpuffer pH 7; 10 mM Ascorbat) freipräpariert und 45 min vorfixiert. Danach wurden die Gehirne aus der Kopfkapsel herauspräpariert und über Nacht bei 4 °C fixiert. Das weitere Protokoll entspricht dem für das α -PeaTyr Serum, Statt NH₄Cl wurde 0,1% NaBH₃ verwendet, der primäre Antikörper wurde 1/2000 verdünnt.

2.5.2 an intakten Speicheldrüsen

Intakte Speicheldrüsen wurden unter kaltem PBS präpariert und anschließend 2 h fixiert (Rezeptormarkierung: 2,5% Paraformaldehyd, 75 mM Lysin-HCl, 10 mM Natriumperiodat, 200 mM Saccharose in 100 mM Phosphatpuffer pH 7; Tyraminmarkierung: 2% Glutaraldehyd, 0,2% Pikrinsäure, 3% Paraformaldehyd, 200 mM Saccharose, 10 mM Ascorbat in 100 mM Phosphatpuffer pH 7). Anschließend wurden sie 3x 10 min in PBS gewaschen. Glutaraldehyd fixierte Präparate wurden 10 min mit 0,1% NaBH₃ behandelt und erneut 3x 10 min mit PBS gewaschen. Bei beiden Fixierungen wurden die Speicheldrüsen 15 min mit 0,01% Tween 20/PBS, 15 min mit 50 mM NH₄Cl/PBS, 15 min mit PBS und 90 min mit Blockierlösung (1% NGS; 0,8% BSA und 0,5% Triton X100) inkubiert. Die Präparate wurden über Nacht mit dem primären Antikörper (1/40 für den α Rezeptor-Antikörper) in Blockierlösung inkubiert Die Speicheldrüsen wurden 3x 10 min mit PBS

gewaschen und 2 h mit dem sekundären Antikörper (*goat anti rabbit*-Cy3 1/200) inkubiert. Für eine Doppelmarkierung wurde an dieser Stelle 1/1000 Phalloidin AlexaFluor® 488 mit zum sekundären Antikörper gegeben. Zuletzt wurden die Drüsen erneut 3x 10 min gewaschen und unter Moviol und zwei Abstandshaltern aus Glas eingedeckelt.

2.6 Bioinformatische Methoden

Für Sequenzrecherchen und BLAST-Analysen standen die online-Datenbanken des *National Center of Biotechnology Information* (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/index.html>) zur Verfügung, weitere Werkzeuge (z.B. DNA-Translation, Restriktionsuntersuchungen, Motifidentifikationen, Hydropathieprofile) befinden sich auf der Seite www.expasy.org. Cluster-Analysen wurden mit dem Programm ClustalX (Version 1.81; Thompson *et al.*, 1997) durchgeführt und die Ergebnisse mit TreeView (Version 1.6.6; Page, 1996) dargestellt. Allgemeine Anwendung (z.B. Archivierung, Verwaltung und Darstellung der Sequenzierungsdaten, Sequenzalignments) fand das Programm BioEdit (Version 5.0.9.; Hall, 1999).

Kapitel 3:

Ergebnisse

3.1 Isolierung der *Peatyr1* cDNA

Um erste Sequenzinformationen putativer Aminrezeptoren aus der Schabe *Periplaneta americana* zu erhalten, wurden PCRs mit degenerierten Primern durchgeführt. Ein Sequenzvergleich verschiedener bereits bekannter Aminrezeptoren von Invertebraten zeigt große Bereiche konservierter Sequenz, besonders in den Transmembrandomänen. Es wurden degenerierte Primer erstellt, die in die Bereiche der TM VI und TM VII anlagern konnten. Mit diesen gelang es, aus einer *P. americana* cDNA Bibliothek Fragmente von etwa 100 bis 150 bp zu amplifizieren. Die PCR-Fragmente wurden kloniert und sequenziert. Eine anschließende BLAST-Analyse dieser Fragmente zeigten hohe Ähnlichkeit unter anderem zu bekannten Dopamin - und Tyraminrezeptoren (Feng *et al.*, 1996; Blenau *et al.*, 2000).

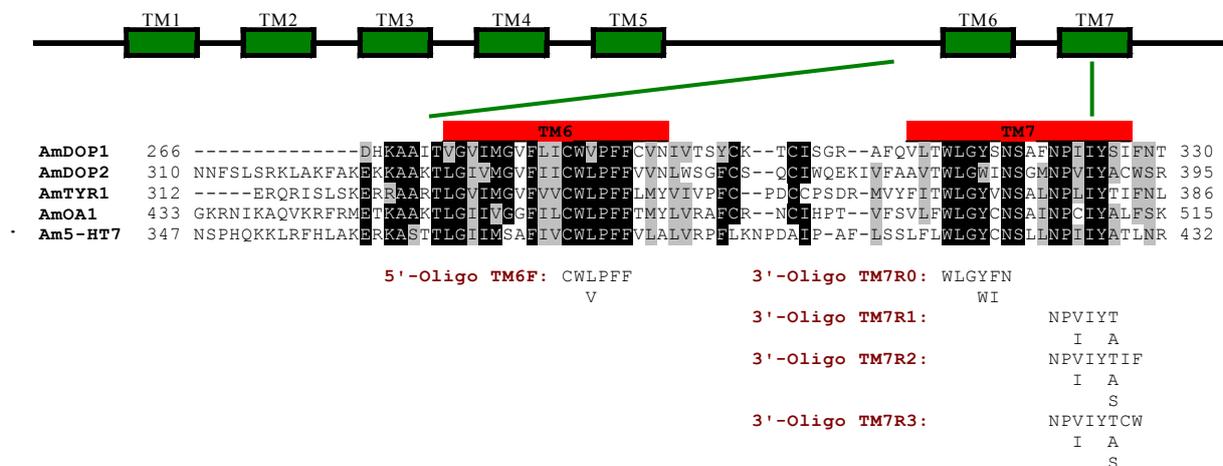
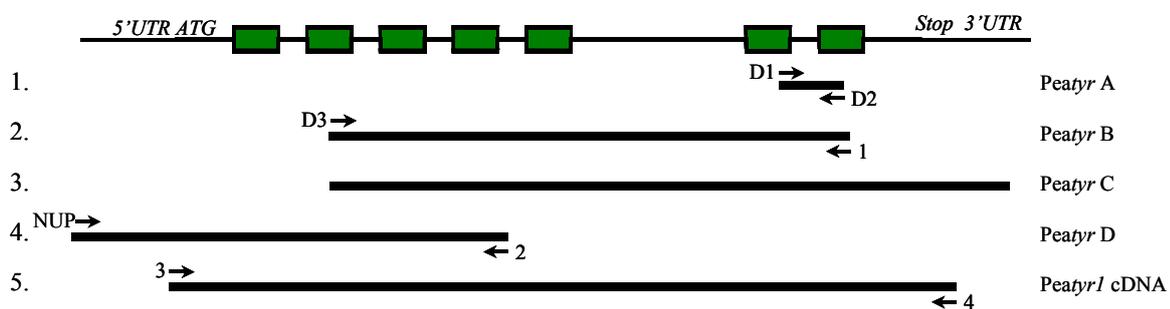


Abb. 3.1: Der Einsatz von degenerierten Primern ermöglicht eine PCR ohne vorherige Kenntnis der genauen Nukleotidsequenz. Dargestellt ist ein beispielhafter Sequenzvergleich verschiedener Aminrezeptoren der Biene *Apis mellifera*: AmDOP1 = DA-Rezeptor 1 (Blenau *et al.*, 1998), AmDOP2 = DA-Rezeptor 2 (Humphries *et al.*, 2003), AmTYR1 = Tyraminrezeptor 1 (Blenau *et al.*, 2000), AmOA1 = Oktopaminrezeptor 1 (Grohmann *et al.*, 2003), Am5-HT7 = 5-HT7 - Rezeptor (Schlenstedt *et al.*, 2006). Ausgehend von den konservierten Bereichen lassen sich Primergemische synthetisieren, die alle möglichen Triplets der unterschiedlichen Sequenzen enthalten. Modifizierte Abbildung nach Walz *et al.* (2006).

Im Falle des putativen Tyraminrezeptors war es möglich, mit Hilfe von weiteren degenerierten Vorwärts - Primern, die sich an Bereiche innerhalb der TM II anlagern, und sequenzspezifischen Rückwärts - Primern, die sich an Bereich innerhalb der TM VII anlagern,

etwa 1000 bp große Fragmente zu amplifizieren. Diese Fragmente wurden als Sonde für das Durchmustern einer *P. americana* cDNA Bibliothek genutzt. Positive Klone wurden durch „*in vivo excision*“ isoliert und anschließend sequenziert. Ein vollständiger Klon konnte nicht isoliert werden. Ein Klon enthielt den vollständigen 3'- Bereich und einen Teil des 3' untranslatierten Bereiches (UTR). Das noch unvollständige 5'- Ende der kodierenden cDNA inklusive des Startkodons konnte mit Hilfe von einer 5' SMART RACE PCR amplifiziert werden. Auch dieses Fragment wurde kloniert und sequenziert. Mit Primern, die innerhalb der 5'- und 3' UTRs kurz vor dem Start- bzw. hinter dem Stopkodon anlagern, konnte ein Fragment, das den gesamten codierenden Bereich umfasst, isoliert werden.



```

GAAGTTCCTGAAATCTAATAGTAGACTATACTATTGTTGATAAGTAGTTCAAATTAATTTCTTATAAACATATGCTGTTGTTGCAGTAGT -97
CATAAATATTTATTGTTTTATCTCTAAAACGATCTTAGACATTGATTTCATAGTGAAGAGTAAGATTTGAATAGGATATTTAAAAGCT -6
ACAAAATGCGCAGGCGGTAAGACAGAAAACCTCCATCAAAAACCTGCTCACTAAGCAACATTACATATGACAGTATCTAGGCATTCAGATG +84
CTATACCAGAAATGGGAAGCAACCATCGCGGCCATAATTCTGTCCTTGATTATTGTGTCAACACTGGTTGGGAATATTTCTCGTCATCCTGA +174
GCATATTTACTCACAAACCTCTACGGACAGTGCAGAAATTACTTCTTAGTGTCACTGGCTGTGGCCGATCTGACTGTCCGAGTCTTAGTGA +264
TGCCCTTAAATATAGCTAATTTGATTATAGGGCATTGGGATTTGGCATCTTCTCTGTAATAATGTGGCTGACATGTGACATACTCTGCT +354
GTACAGCATCGATTTTAAATTTGTGTGCAATAGCTTTGGATCGGTACTGGGCAATAACGGATCCTCTCAACTACGCACAGAAAAGAACTC +444
TGGGACGTGTACTTTGGATGATTGGAGGAGTGTGGGTTTTGTGTCAGCAATAATCAGTTCACCCACCGCTAGTGGGATGGAATGATTGGTCTG +534
CGACTTTCGACTCAAACGCTCAATGTGAGCTAACCAAGGAGCAGGGATATGTTGTATACTCTCTCTAGGATCTTTTTATATACCAGTGT +624
TCATCATGACAATGTTTACGTCGAGATATTCATTGCAACAAAAGAAAGACTCAAAGAAAGGGCAGCAGCATCAAACCTGAGCATCGTAA +714
AGTATAATCGCCCTCAAACATACAACCTAGAACTTGAGTCTGGAAATAGCGACGTCATTCAAGAAAACCTGTATGGTGAAAACGCCGGTA +804
ATGGCAAGAGACGTAATTCAAAAAGGGCATCTTCAGCAGTTTAGGATCATTCAGAGAAAAATATTTCAAAGAGCGTTCTATATCCATCG +894
AAGAATCTATCACTGATGTAGAAAATCCCTCCCTGAATCAGACACCGACTGGAATGTAGCTACTACTCCATAGAAATCGTCTTCGCCAA +984
AAAGTCCAACCGGTACAGAGAAAGGTGGGAACCTCCAGCTTGAAGAGACGGCCGCGGAACAAGCCTCCAGTTCGATATGGGCAAAAGGATAT +1074
CGCTGTCGAAGGAGAGACGTGCTGCCAGGACACTTGGCATCATCATGGGCGTGTTTATGGTGTGCTGGCTGCCATTCCTTCTGCATTACG +1164
TGATTGAGCCTTTTTGGCATCTTGTGCTTCTACTCAAGATTGGTATATTTTATAACATGGCTGGGCTATGTCAACTCGGCTCTAAATC +1254
CTGTCAATTTACACCATATTTAACTTTGACTTCAGGCGAGCCTTCAAGAACTCTGCGAATCTCATCTCAAACCTCGTATAAAAATTTATTGG +1344
TGTCAACAAACCATTGTCGTTGAGAAGACTTTCATCAGGAATATTAAGTGTATTTTGGTGATTTCTGCTGAAAGTCTTAAACCGTAGTGAA +1434
AGTGAATATATTTACTATGCATCAAACATTTACTTCGTAGATAATTTATTAGTGTTCATAACTACATTCAAACAAAAGAATATTTGAAC +1524
AATCTCTTTTGGATATGTTGTGAGAAGAACTTTCTGGAATCTATTTATTGTTATTAAGATTTTGTACATACTATTTCTAAATAGGT +1614
GCATAAAATAATTTAAACTATGTAATGCTAACAGCAAATTAAGGACCTATAATTTGTTGTAAGTTTGAAGAGAAATTTACGAAAGTGTTC +1704
GTGTTTGTGACATTTTAAACAGTGTGAAGATGACATTTCACTTACTTTAATTTGGCTTTCATAGTGTCTACGAAAGTGTACTCAAAAT +1794
ATTAACATGCAGTTTTTTTAAATCTAGTATTGTGGCATAATTTGATGACTGAATGTGATAAAGATTGTGAAATTAACACTCTGAAAGGA +1884
TTTAAACAAGTGTGTCCTATTATGTGGATTTAAAATACCGAGTAGTTTATTTTCATGAACGATTCCTTCGGAATATTTCCAGTGTGTGTC +1974
CAGTGAATTTTGAATATTTGTCATTATGACGCATATACTAAATAACATTAATTTGCTGAAAACATAAAAACCTGCATATACGAAACTTTGT +2064
TTCCTGGTGCATATATGTTACAATATTTAATTTTAAAGGTAACAATATCTCTACCCTAGTCAATGAAATGATTGTGTAATACAGTTGAT +2154
TCTCTGTAGTGTGTTGGTCTAATATTTGAAGTTGAATTAATTTGATTATATATTTATCTTTAA
    
```

Abb. 3.2: Nukleotidsequenz von *Peatyr1* aus der Schabe *Periplaneta americana*. Dargestellt sind die einzelnen Teilerperimente, mit denen die cDNA-Sequenz für *Peatyr1* bestimmt wurde. 1: PCR mit deg. Primern; 2: PCR mit einem deg. und einem spez. Primer; 3: Durchmustern einer Schabengehirn-cDNA-Bibliothek mit *Peatyr B* als Sonde; 4: 5'-RACE-PCR; PCR mit spez. Primern. Unten ist die kombinierte Sequenz mehrerer überlappender cDNA-Fragmente in 5' → 3' Richtung aufgeführt. Das Start- bzw. Stopkodon des größten *open reading frame* (ORF) sind schwarz hinterlegt. In **bold** dargestellt sind die untranslatierten Bereiche (UTR). Die Zahl gibt die Position der jeweils letzten Base in der Zeile an.

3.2 Merkmale der abgeleiteten Aminosäuresequenz von PeaTYR1

Der längste in der cDNA enthaltene offene Leserahmen kodiert für ein 441 Aminosäurereste langes Protein. Dieses Protein hat eine berechnete Molekularmasse von 49,3 kDa. An seinem Hydropathieprofil (Abb. 3.3A, nach Kyte und Doolittle, 1982) wird deutlich, dass das Protein sieben stark hydrophobe Bereiche enthält, welche lang genug sind, um die Zellmembran zu durchspannen. Von diesen Bereichen wird angenommen, dass die Peptidkette dort in Form von α -Helices die Membran durchdringt, indem sie hydrophobe Seitenketten zum hydrophoben Inneren der Membran hin exponiert. Berechnungen mit dem TMHMM-Algorithmus zufolge, besitzt der Rezeptor zudem einen extrazellulären N-Terminus und einen intrazellulären C-Terminus (Abb. 3.3B, Krogh *et al.*, 2001).

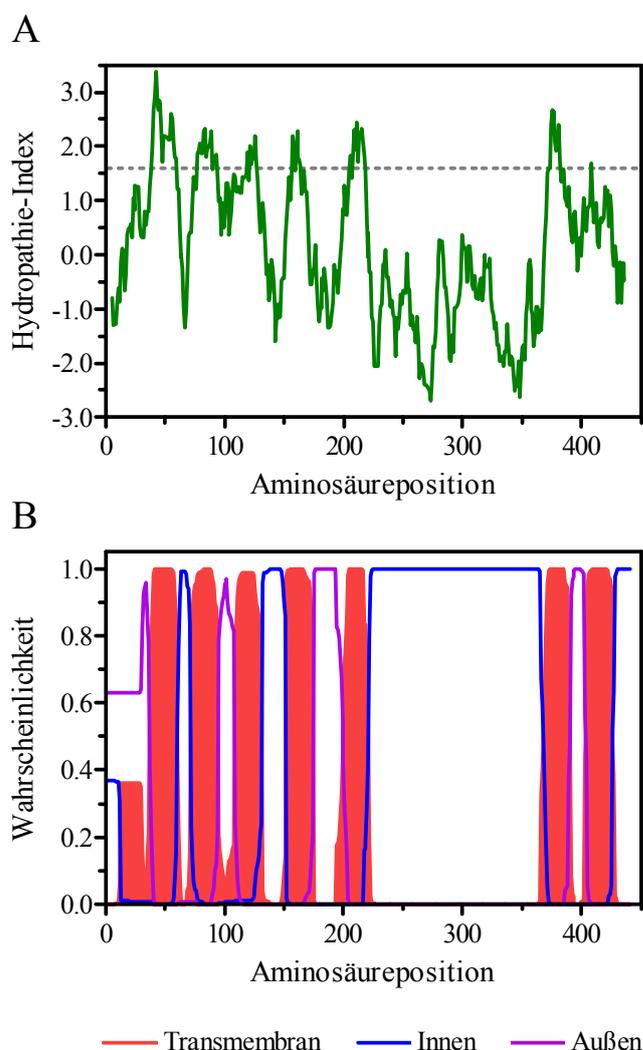


Abb. 3.3: Hydropathie- (A) und TMHMM-Profil (B) von PeaTYR1. Jeder Aminosäure wird ein bestimmter Wert für ihre Hydrophobie zugewiesen und dieser Wert über einen Bereich von fünf Aminosäuren vorwärts und fünf Aminosäuren rückwärts gemittelt. Ergibt sich so ein Wert von $> 1,6$ ist davon auszugehen, dass sich die jeweilige Aminosäure innerhalb einer Transmembrandomäne befindet. Eingezeichnet sind Bereiche der sieben TMs des Rezeptors. Das TMHMM-Profil sagt einen extrazellulären N-Terminus und einen intrazellulären C-Terminus voraus.

Mit entsprechenden Algorithmen (www.expasy.org) können in der abgeleiteten Aminosäuresequenz Konsensussequenzen für wahrscheinliche posttranslationale Modifikationen identifiziert werden (Abb. 5). So befinden sich in dem 38 Aminosäuren langen extrazellulär gelegenen N-Terminus zwei Asparaginreste (N₁₂ und N₁₇), die *in vivo* möglicherweise N-glycosyliert vorliegen (Motiv: N - {P} - [ST] - {P}, N wird glykosyliert, P darf nicht an Position 2 und 4 stehen). In der 1. und 3. cytoplasmatischen Schleife befinden sich Konsensussequenzen für eine Phosphorylierung durch die Proteinkinase C am T₆₂, T₁₂₂, S₂₇₅, S₂₈₅, S₂₉₆, T₃₃₄ und S₃₄₁ ([ST] - x - [RK], S/T wird phosphoryliert).

Sequenzvergleiche verschiedener Rezeptoren der Rhodopsingruppe zeigen stark konservierte Bereiche auf. Diese Bereiche lassen sich auch im Tyraminrezeptor der Schabe wiederfinden. Stark konserviert sind die Bereiche der Transmembrandomänen I-III, VI und VII. Die Transmembrandomänen IV und V sind weniger stark zwischen den verschiedenen Rezeptoren konserviert. Einige dieser Sequenzmotive sind spezifisch für Aminrezeptoren, während andere Motive allgemeiner in der Gruppe der rhodopsinähnlichen Rezeptoren zu finden sind. GN₅₂xLVIS z.B. in der TM I ist ein typisches Rhodopsingruppenmotiv. Das D₁₃₂RY-Motiv ist sehr stark konserviert und ist an der G-Proteinaktivierung beteiligt. Ein einzelner Prolinrest P₁₆₉ innerhalb der TM IV ist bei vielen rhodopsinähnlichen Rezeptoren zu finden.

Ein für Aminrezeptoren charakteristisches Motiv sind C₃₈₀WLPFF aus TM VI, W₄₀₉XGY aus TM VII und F₂₀₃xxP aus TM V. Ersteres ist sowohl an der Ligandenbindung als auch der G-Proteinaktivierung beteiligt. Einzelne Aminosäuren können speziell bei Aminrezeptoren ebenfalls stark konserviert sein z.B. ein Tryptophanrest der ersten extrazellulären Schleife W₁₁₁ oder ein Serinrest der TM III S₁₂₂.

Einzelne Aminosäurereste, die der Ligandenbindung dienen, sind ebenfalls konserviert. Ein Aspartatrest D₁₁₅ in der TM III bindet dabei mit der deprotonierten Seitenkette über eine Salzbrücke die protonierte Aminogruppe des Liganden. Ein konservierter Phenylalaninrest F₃₇₇ in TM VI ermöglicht eine Bindung des Liganden über hydrophobe Wechselwirkungen der beiden hydroxylierten Benzolringe. In der TM V gelegene Serinreste S₁₉₉, S₂₀₀ und S₂₀₃ können mit ihren Hydroxylgruppe Wasserstoffbrückenbindungen zu der in para-Stellung gelegenen Hydroxylgruppe des Tyramin ausbilden (TM V-Motiv: SSxxS; Strader *et al.*, 1987, 1989, 1995). Weitere Bestandteile der Bindungstasche sind ein Threoninrest T₁₂₀. Ein identifiziertes Motiv befindet sich direkt im Anschluss an das DRY-Motiv. Für die Sequenz D₁₃₂RYxxV/IxxPL konnte bei muskarinischen Acetylcholinrezeptoren gezeigt werden, dass sie der Interaktion mit hydrophoben Aminosäuren im C-terminalen Bereich von G_s-Proteinen dient (Moro *et al.*, 1993, Masters *et al.*, 1988). Innerhalb der TM VII befindet sich ein

N₄₁₈PxxY-Motiv, welches bei β -2 adrenergen Rezeptoren unter anderem der Rezeptorsequestrierung dient (Barak *et al.*, 1994, 1995). Eine extrazellulär gelegene Disulfidbrücke zwischen zwei Cysteinen C₁₀₈ und C₁₈₆ der extrazellulären Schleifen eins und zwei ist denkbar (Reviews: Bockert und Pin, 1999; Shi und Javitch, 2002).

Wird die Sequenz von PeaTYR1 in eine BLAST-Analyse mit einbezogen, wird eine große Ähnlichkeit zu bereits charakterisierten Tyraminrezeptoren aus *Locusta migratoria* (LocTYR1; Vanden Broeck *et al.*, 1995) und aus *Bombyx mori* (BomTYRR; Ohta *et al.*, 2003) deutlich. Diese Rezeptoren ähneln dem der Schabe zu 69 bzw. 70% und haben an 56 bzw. 53% der Positionen identische Aminosäuren (Abb. 4). Die größten Übereinstimmungen bestehen innerhalb der Transmembrandomänen. Innerhalb der dritten zytoplasmatischen Schleife und am N-Terminus unterscheiden sich die Sequenzen am stärksten, wobei die Übergänge der Transmembrandomänen V und VI zur Zytoplasmaseite ebenfalls stark konserviert sind. In diesen Regionen findet die Interaktion des Rezeptors mit dem G-Protein statt.

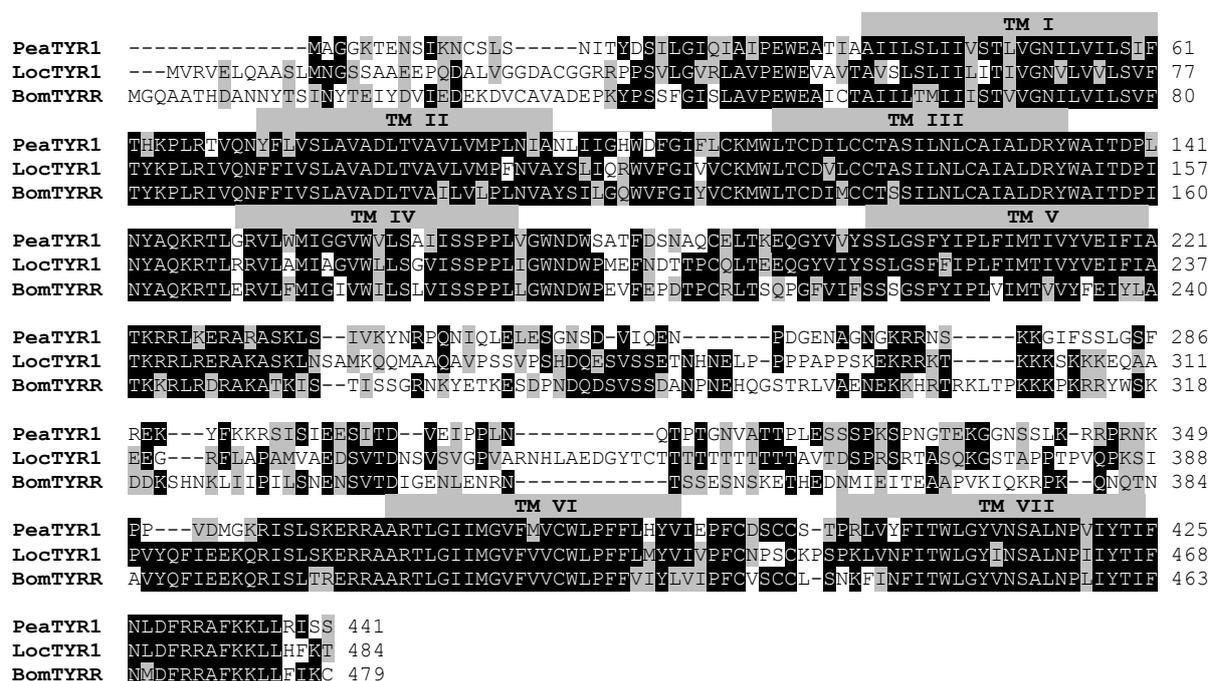


Abb. 3.4: Aminosäuresequenz-Vergleich verschiedener Tyraminrezeptoren. Der Sequenzvergleich enthält die Sequenz des PeaTYR1 und orthologer Rezeptoren aus *Locusta* und *Bombyx*. Identische Aminosäurereste sind schwarz hinterlegt, ausgetauschte, konservativ ausgetauschte Reste sind grau unterlegt. Die Position der Transmembrandomänen ist durch graue Balken markiert. Die Zahl gibt die Position der letzten Aminosäure in der jeweiligen Zeile an.

* * *

ATGGCAGGCGGTAAGACAGAAAACCTCCATCAAAAACCTGCTACTAAGCAACATTACATATGACAGTATTCTAGGCATTGAGATTGCTATA 90
M A G G K T E N S I K N C S L S N I T Y D S I L G I Q I A I

CCAGAATGGGAAGCAACCATCGCGGCCATAATTCTGTCCTTGATTATTGTGTCAACACTGGTTGGGAATATCTCGTCATCTGAGCATA 180
P E W E A T I A A I I L S L I I V S T L V G N I L V I L S I

• **TM I**

TTTACTCACAAACCTCTACGGACAGTGCAGAATTACTTCTTAGTGTCACTGGCTGTGGCCGATCTGACTGTGCGAGTCTTAGTTATGCC 270
F T H K P L R T V Q N Y F L V S L A V A D L T V A V L V M P

TM II

TTAAATATAGCTAATTTGATTATAGGGCATTGGGATTTTGGCATCTTCTCTGTAAAATGTGGCTGACATGTGACATACTCTGCTGTACA 360
L N I A N L I I G H W D F G I F L C K M W L T C D I L C C T

GCATCGATTTTAAATTTGTGTGCAATAGCTTTGGATCGGTACTGGGCAATAACGGATCCTCTCAACTACGCACAGAAAAGAACTCTGGGA 450
A S I L N L C A I A L D R Y W A I T D P L N Y A Q K R T L G

TM III

CGTGTACTTTGGATGATGGAGGAGTGTGGGTTTTGTGTCAGCAATAATCAGTTCCCCACCCTAGTGGGATGGAATGATTGGTCTGCGACT 540
R V L W M I G G V W V L S A I I S S P P L V G W N D W S A T

TM IV

TTCGACTCAAACGCTCAATGTGAGCTAACCAAGGAGCAGGATATGTTGTATACTCTTCTCTAGGATCTTTTTATATACCACTGTTTCATC 630
F D S N A Q C E L T K E Q G Y V V Y S S L G S F Y I P L F I

• **TM V**

ATGACAATTGTTTACGTCGAGATATTCATTGCAACAAAAAGAAGACTCAAAGAAAGGGCAGGAGCATCAAACTGAGCATCGTAAAGTAT 720
M T I V Y V E I F I A T K R R L K E R A R A S K L S I V K Y

AATCGCCCTCAAACATACAACCTAGAACTTGAGTCTGGAAATAGCGACGTCATTCAAGAAAACCTGATGGTGAAAACGCCGTAATGGC 810
N R P Q N I Q L E L E S G N S D V I Q E N P D G E N A G N G

• •

AAGAGACGTAATTTCAAAAAGGGCATCTTCAGCAGTTTAGGATCATTTCAGAGAAAAATATTTCAAAAAGCGTTCTATATCCATCGAAGAA 900
K R R N S K K G I F S S L G S F R E K Y F K K R S I S I E E

•

TCTATCACTGATGTAGAAATCCCTCCCCTGAATCAGACACCGACTGGAAATGTAGCTACTACTCCATTAGAATCGTCTTCGCCAAAAAGT 990
S I T D V E I P P L N Q T P T G N V A T T P L E S S S P K S

• •

CCAAACGGTACAGAGAAAGTTGGAACTCCAGCTTGAAGAGACGGCCGCGGAACAAGCCTCCAGTCGATATGGGCAAAGGATATCGCTG 1080
P N G T E K G G N S S L K R R P R N K P P V D M G K R I S L

TCGAAGGAGAGACGTGCTGCCAGGACACTTGGCATCATCATGGGCGTGTATGGTGTGCTGGCTGCCATTCTTTCTGCATTACGTGATT 1170
S K E R R A A R T L G I I M G V E M V C W L P F F L H Y V I

TM VI

GAGCCTTTTTGCGATTCTTGCTGTTCTACTCCAAGATTGGTATATTTTATAACATGGCTGGGCTATGTCAACTCGGCTCTAAATCCTGTC 1260
E P F C D S C C S T P R L V Y F I T W L G Y V N S A L N P V

TM VII

ATTTACCCATATTTAACTTGGACTTCAGGCGAGCCTTCAAGAACTTCTGCGAATCTCATCCTACCCATACGACGTCCAGACTACGCT 1350
I Y T I F N L D F R R A F K K L L R I S S Y P Y D V P D Y A

TAA 1353
*

Abb. 3.5 Abgeleitete Aminosäuresequenz von PeaTYR1: grau unterlegt sind die vorhergesagten Transmembrandomänen I-VII. Ein Stern markiert Konsensusstellen für Glykosylierungen der Art N - {P} - [ST] - {P}, ein Punkt markiert Konsensusstellen für Phosphorylierungen durch die PKC der Art [ST] - x - [RK]. Rot unterlegt sind konservierte Aminosäuren, die der Ligandenbindung dienen. Die Zahl gibt die Position der letzten Base in der jeweiligen Zeile an.

Mit Hilfe von Dendrogrammen ist es möglich, Aussagen über stammesgeschichtliche Verwandtschaften zu machen, bzw. Rezeptoren zu zusammengehörigen Gruppen zusammenzufassen. So bildet PeaTYR1 in Abbildung 6 zusammen mit anderen Tyraminrezeptoren verschiedener Insekten einen deutlich von anderen Rezeptoren wie z.B. Oktopaminrezeptoren abgesetzten Zweig (AmTYR1, Blenau *et al.*, 2000; LocTYR1, Vanden Broeck *et al.*, 1995; DmTYRR, Saudou *et al.*, 1990; BomTYRR, Ohta *et al.*, 2003 und PaxTYRR, Ono *et al.*, 2004). In einem weiteren Dendrogramm (Abb. 7) zusammen mit menschlichen Aminrezeptoren liegt PeaTYR1 in Nachbarschaft zu den β -adrenergen Rezeptoren.

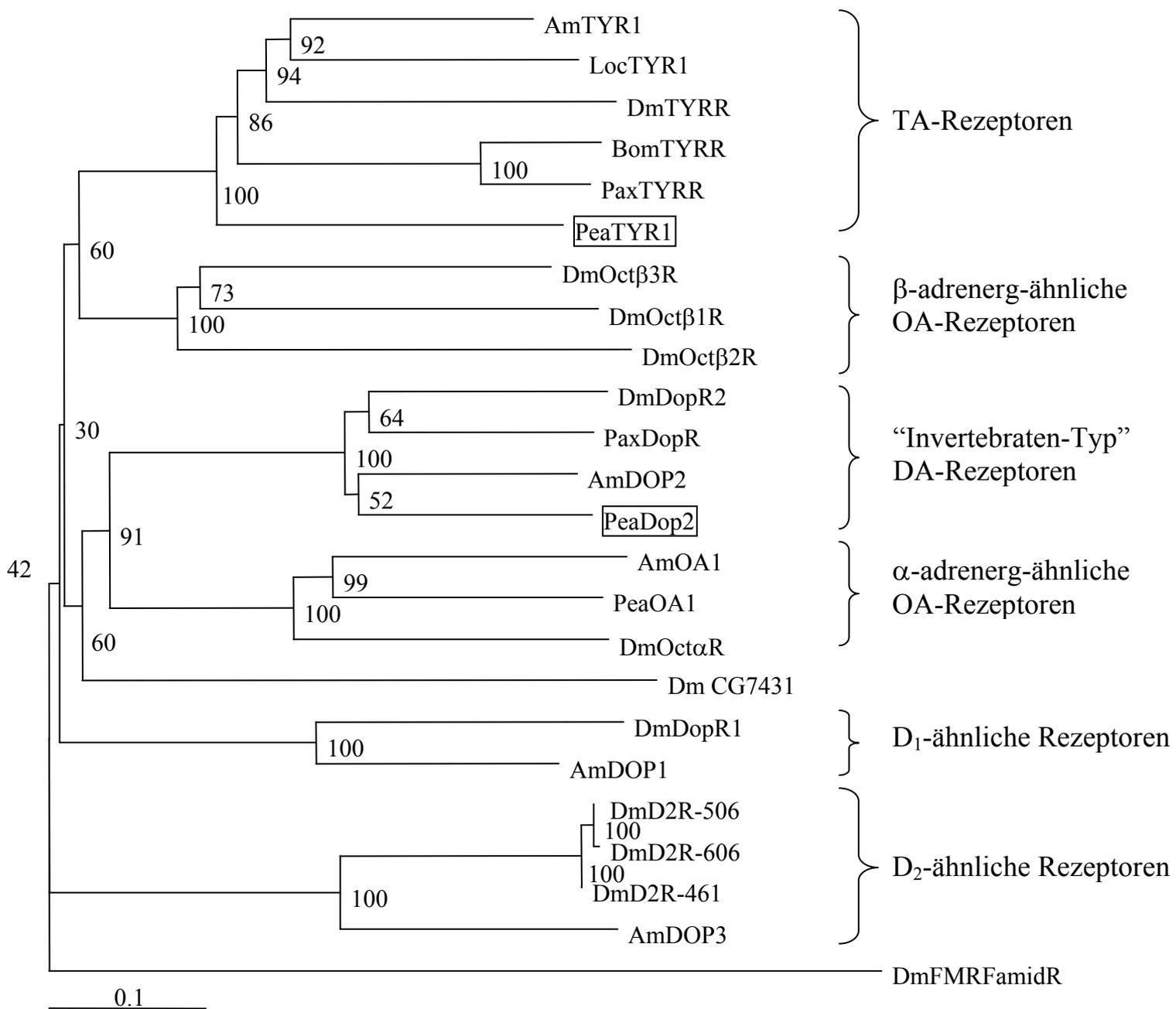


Abb. 3.6

Abb. 3.6: Dendrogramm von Phenolamin-/Katecholaminrezeptoren verschiedener Insekten. Die von ClustalX (v 1.81) berechnete genetische Distanz wird vom Programm TreeView (v 1.6.6) durch unterschiedlich lange Linien dargestellt (*bootstrap* = 1000). Nachfolgend werden die Rezeptoren in der Reihenfolge der Abbildung mit den zugehörigen Accessionnummern aufgeführt: *A. mellifera* TYR1 AmTYR1 (#CAB76374); *L. migratoria* TYR1 LocTYR1 (#Q25321); *D. melanogaster* TYRR DmTYRR (#CG7485); *B. mori* TYRR BomTYRR (#BAD11157); *P. xuthus* TYRR PaxTYRR (#BAD72869); *P. americana* TYR1 PeaTYR1 (diese Arbeit); *D. melanogaster* Octβ3R DmOctβ3R (#CG7078); *D. melanogaster* Octβ1R DmOctβ1R (#CG6919); *D. melanogaster* Octβ2R DmOctβ2R (#CG6989); *D. melanogaster* DmDopR2 (#AAC47161); *P. xuthus* DopR PaxDopR (#AB182634); *A. mellifera* Dop2 AmDOP2 (#NP_001011567); *P. americana* Dop2 PeaDop2 (diese Arbeit); *A. mellifera* OA1 AmOA1 (CAD67999); *P. americana* OA1 PeaOA1 (#AAP93817); *D. melanogaster* OctαR DmOctαR (#AAC17442); *D. melanogaster* CG7431; *D. melanogaster* DmDopR1 (#CAA54451); *A. mellifera* Dop1 AmDOP1 (#NP_001011595); *D. melanogaster* D2R isoforms 506, 606, 461 (#AY150862); *A. mellifera* Dop3 AmDOP3 (#NP_001014983); *D. melanogaster* FMRFamid Rezeptor (#DAA00378).

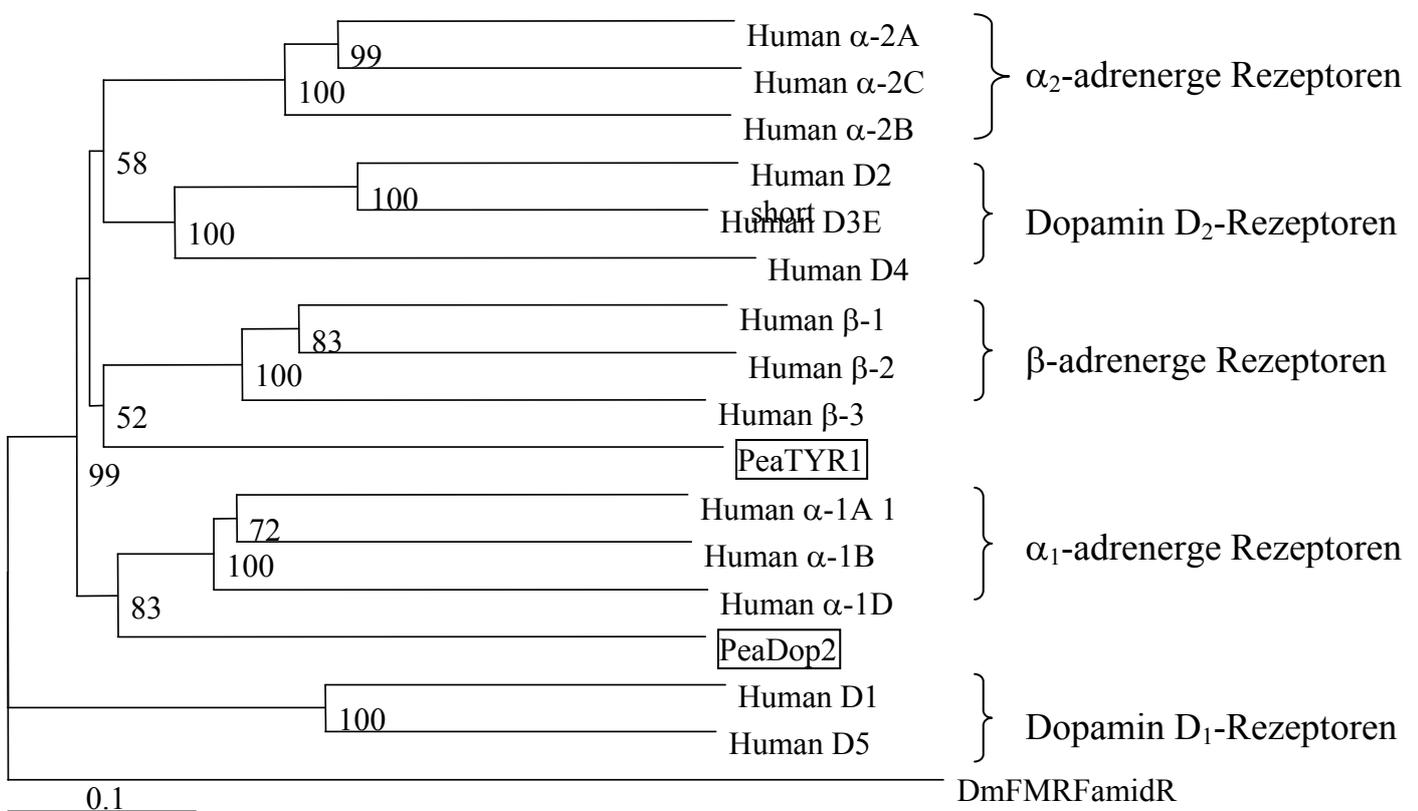


Abb. 3.7

Abb. 3.7: Dendrogramm verschiedener Phenolamin-/Katecholaminrezeptoren des Menschen und der Schabe. Die von ClustalX (v 1.81) berechnete genetische Distanz wird vom Programm TreeView (v 1.6.6) durch unterschiedlich lange Linien dargestellt (*bootstrap* = 1000). Nachfolgend werden die Rezeptoren in der Reihenfolge der Abbildung mit den zugehörigen Accessionnummern aufgeführt: *H. sapiens* α-2A Human α-2A (AAK51162); *H. sapiens* α-2C Human α-2C (AAR18071); *H. sapiens* α-2B Human α-2B (AAS55646); *H. sapiens* D2 short isoform (#NP_057658); *H. sapiens* D3 isoform e (#NP_387512); *H. sapiens* D4 (#NP_000788); *H. sapiens* β-1 Human β-1 (AAG40474); *H. sapiens* β-2 Human β-2 (AAN01267); *H. sapiens* β-3 Human β-3 (AAR37414); *P. americana* Tyr1 PeaTyr1 (diese Arbeit); *H. sapiens* α-1A Human α-1A (AAK77197); *H. sapiens* α-1B Human α-1B (AAS21324); *H. sapiens* α-1D Human α-1D (P25100); *P. americana* Dop2 PeaDop2 (diese Arbeit); *H. sapiens* D1 (#NP_000785); *H. sapiens* D5 (NP_000789); *D. melanogaster* FMRFamid Rezeptor (#DAA00378).

3.3 Isolierung der Peadop2 cDNA

Wie bereits oben erwähnt, konnte mit Hilfe degenerierter Primern ein kurzes Fragment eines putativen Dopaminrezeptors isoliert werden. Mit weiteren degenerierten Vorwärts-Primern, die sich an Bereiche innerhalb der TM II anlagern, und sequenzspezifischen Rückwärts-Primern, die sich an Bereiche innerhalb der TM VII anlagern, gelang es, ein etwa 1000 bp großes Fragment zu amplifizieren. Die noch unvollständigen 5'- bzw. 3'-Enden der kodierenden cDNA inklusive des Startkodons und Stopkodons konnten mit Hilfe des SMART RACE PCR Kits (BD Biosciences) amplifiziert werden. Anschließend erfolgte die Klonierung und Sequenzierung der Fragmente. Mit Primern, die innerhalb der 5'- und 3' UTRs kurz vor dem Start- bzw. hinter dem Stopkodon anlagern, konnte der kodierende Bereich des putativen Dopaminrezeptors zusammenhängend amplifiziert werden.

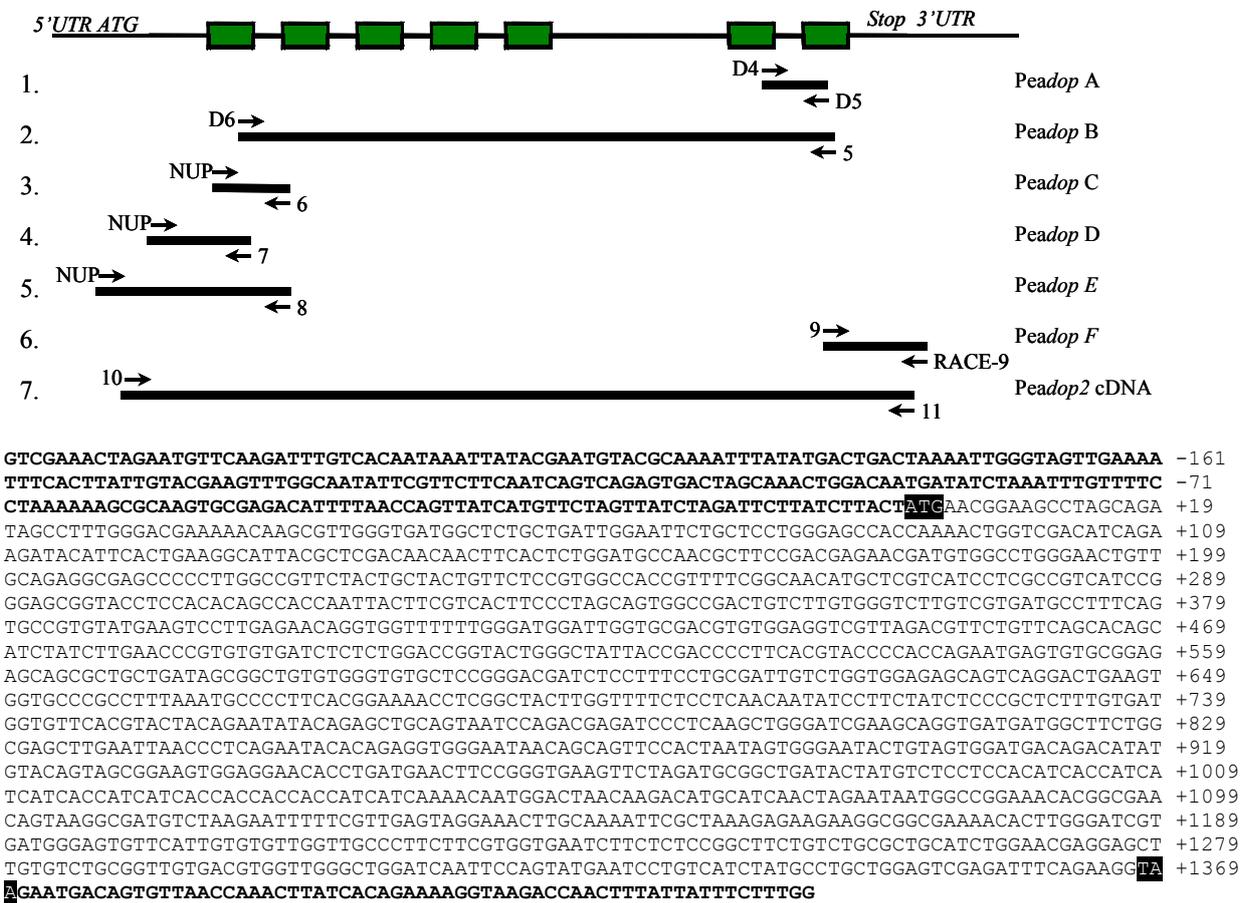


Abb. 3.8: Nukleotidsequenz von *Peadop2* aus der Schabe *Periplaneta americana*. Dargestellt sind die einzelnen Teilerperimente, mit denen die cDNA-Sequenz für *Peadop2* bestimmt wurde. 1: PCR mit deg. Primern; 2: PCR mit einem deg. und einem spez. Primer; 3-5: 5'-RACE-PCR; 6: 3'-RACE-PCR; 7: PCR mit spez. Primern. Unten ist die kombinierte Sequenz mehrerer überlappender cDNA-Fragmente in 5' → 3' Richtung aufgeführt. Das Start- bzw. Stopkodon des größten *open reading frame* (ORF) sind schwarz hinterlegt. In **bold** dargestellt sind die untranslatierten Bereiche (UTR). Die Zahl gibt die Position der jeweils letzten Base in der Zeile an.

3.4 Merkmale der abgeleiteten Aminosäuresequenz von PeaDOP2

Der längste in der cDNA enthaltene offene Leserahmen kodiert für ein 456 Aminosäurereste langes Protein (Abb. 10). Dieses Protein hat eine berechnete Molekularmasse von 51,2 kDa. Das Hydropathieprofil (Abb. 3.9A, nach Kyte und Doolittle, 1982) zeigt analog zu dem Tyraminrezeptor die markanten sieben Bereiche von hoher Hydropathie, die für die putativen Transmembrandomänen stehen. Berechnungen mit dem TMHMM-Algorithmus zufolge, besitzt der Rezeptor zudem einen extrazellulären N-Terminus und einen intrazellulären C-Terminus (Abb. 3.9B Krogh *et al.*, 2001).

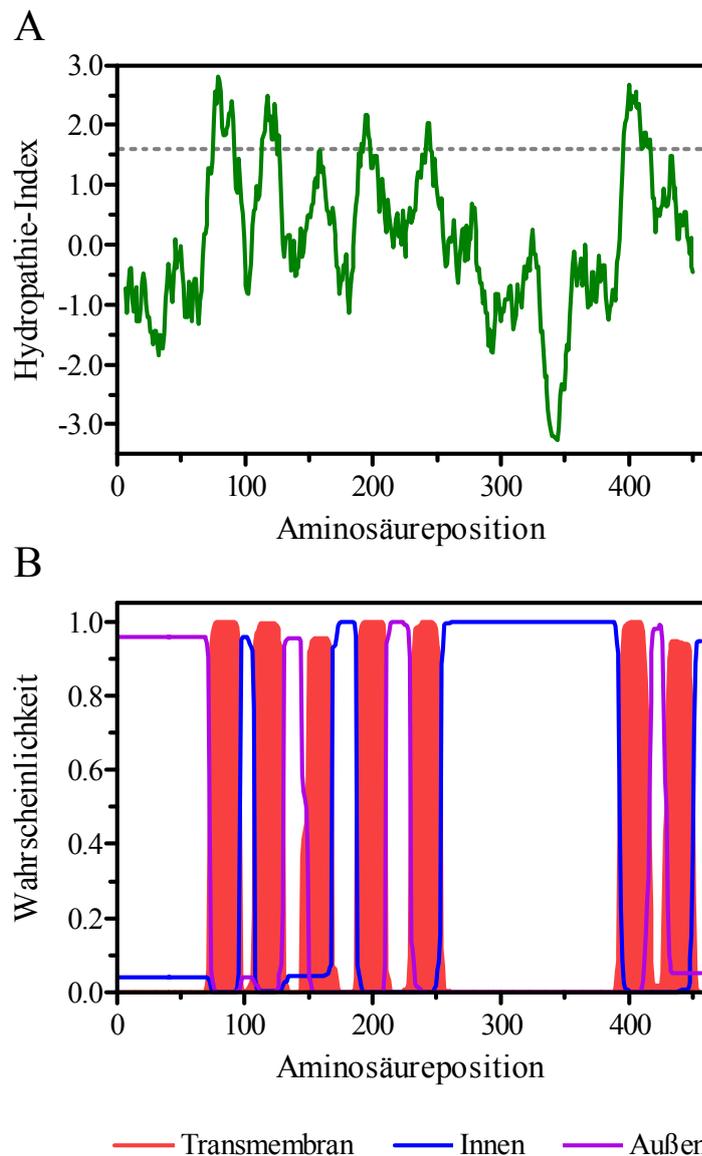


Abb. 3.9: Hydropathie- (A) und TMHMM-Profil (B) von PeaDOP2. Jeder Aminosäure wird ein bestimmter Wert für ihre Hydrophobie zugewiesen und dieser Wert über einen Bereich von sechs Aminosäuren vorwärts und sechs Aminosäuren rückwärts gemittelt. Ergibt sich so ein Wert von $> 1,6$ ist davon auszugehen, dass die jeweilige Aminosäure sich innerhalb einer Transmembrandomäne befindet. Eingezeichnet sind Bereiche der sieben TMs des Rezeptors. Das TMHMM-Profil sagt einen extrazellulären N-Terminus und einen intrazellulären C-Terminus vorher.

Im Internet verfügbare (www.expasy.org) Algorithmen ermöglichen eine Vorhersage posttranslationaler Modifikationsstellen. Der 74 Aminosäurereste lange, extrazellulär gelegene N-Terminus enthält demnach vier Asparaginreste N₂, N₃₂, N₄₉ und N₅₅, die *in vivo* möglicherweise N-glycosyliert vorliegen (Motiv: N - {P} - [ST] - {P}), N wird glykosyliert, P darf nicht an Position 2 und 4 stehen). In der 3. cytoplasmatischen Schleife befinden sich vier Konsensussequenzen für eine Phosphorylierung durch die Proteinkinase C am S₂₆₄, T₂₈₂, S₃₅₇ und S₃₇₈ ([ST] - x - [RK], S/T wird phosphoryliert).

PeaDOP2	---MNGSLADSLWDEKQALG---DGSADWNSAPG---SHQN-----WSTS---EDTFTE	42
AmDOP2	---MNE SAVYLLGSEEECN-----QLNR-----SFY-----S-----ASYPP	29
DmDopR2	MVDDNGSSPEVEGAEGACAPLLALLRVDGLNQTQTRSPSPSFGSYNI SEDVYFYFNGLPSTELVLNATTSATSATLSP	80
	TM I	TM II
PeaDOP2	GITLDNNFTLDANASDEN DVAVELLQRRAPLAVLLLFVSVATVFGNMLVILAVIRERYLHTATNYFVTSLAVADCLVGLV	122
AmDOP2	-----QNRSQEEDLWN-----LATDRAGLAILLFLFSVATVFGNTLVILAVIRERYLHTATNYFVTSLAVADCLVGLV	97
DmDopR2	AMVATGGGGTTTFEPDLSEFLEALPNDRVGLLAFLLFSFATVFGNSLVILAVIRERYLHTATNYFVTSLAVADCLVGLV	160
	TM III	TM IV
PeaDOP2	VMPFSAIYEVLENRWFFGDWCDVWRSLDVLVSTASILNLCVISLDRYWAITDPFTYPRMSVRRALIAAVWCSGAI	202
AmDOP2	VMPFSAIYEVLENRWFFGDWCDVWRSLDVLVSTASILNLCVISLDRYWAITDPFTYPSKMSRRRAAVLIAVVICSSAI	177
DmDopR2	VMPFSAIYEVLENTWFFGTDWCDVWRSLDVLVSTASILNLCVISLDRYWAITDPFSYPMRMTVVKRAAGLIAAVVICSSAI	240
	TM V	
PeaDOP2	SFPAIVWRAVRTEVVPAPKCPFTENLGVLVFSSTISFYLPFVVMVFTYYRIYRAAVIQTRSLKLGSKOVMMASGELELT	282
AmDOP2	SFPAIVWRAVRTEVPEKCPFTEHLGYLIFSSSTISFYLPFVVMVFTYYRIYRAAVIQTRSLKLGTKQVLMASGELELT	257
DmDopR2	SFPAIVWRAVRTEVPEKCPFTEHLGYLVFSSTISFYLPFVVMVFTYYRIYRAAVIQTRSLKLGTKQVLMASGELQLT	320
	TM VI	TM VII
PeaDOP2	LRTHRGGNSSSTNSGNTVVDDRHMYS SSGGCTPDELPC EVLDAADTMSPPHHHHHHHHHHHHHONNGLTRHASTRIMA	362
AmDOP2	LRTHRGGCT-NTDAR-----HIFRTASSTPEDLQDLEELTTOHNN----CLTRIPS	305
DmDopR2	LRTHRGCTTRDQONQV-----SCGGGGGGGGGGGGSSLSHSHSHSHHHHHHNGGGTTSSTPEEPDDEPLSALHN	389
	TM VI	TM VII
PeaDOP2	GNTANSKAMSKNFSLSRKLAKFAKEKKAAKTLGIVMGVFIICWLPFFVNVNLLSGFCLRCIWNELVSAVVTWLGWINS SM	442
AmDOP2	TRINKQHTRCNNFSLSRKLAKFAKEKKAAKTLGIVMGVFIICWLPFFVNVNLLSGFCSQCICWQEKIVFAAVTWLGWINS GM	385
DmDopR2	NGLARHRHMGKNFSLSRKLAKFAKEKKAAKTLGIVMGVFIICWLPFFVNVNLLSGFCIECIEHEEIVSAVVTWLGWINS CM	469
	TM VI	TM VII
PeaDOP2	NPVIYACWSRDFRR-----	456
AmDOP2	NPVIYACWSRDFRRFAFVRLLCACCPGRVRRRYQFAFRCKPSQRFASGRYYSAVSLHHVRSRRES SCEQTYI	456
DmDopR2	NPVIYACWSRDFRRFAFVRLLCACCPGRKIRRYQFTMRSK-SQRFATRRCYSTCSLHGIQHVRRHNSCEQTYI	539

Abb. 3.10: Aminosäuresequenz-Vergleich verschiedener Dopaminrezeptoren. Der Sequenzvergleich enthält die Sequenz des PeaDOP2 und orthologer Rezeptoren aus *Apis* und *Drosophila*. Identische Aminosäurereste sind schwarz hinterlegt, ausgetauschte, konservativ ausgetauschte Reste sind grau unterlegt. Die Position der Transmembrandomänen ist durch graue Balken markiert. Die Zahl gibt die Position der letzten Aminosäure in der jeweiligen Zeile an.

*
 ATGAACGGAAGCCTAGCAGATAGCCTTTGGGACGAAAAACAAGCGTTGGGTGATGGCTCTGCTGATTGGAATTCTGCTCCTGGGAGCCAC 90
 M N G S L A D S L W D E K Q A L G D G S A D W N S A P G S H

* * *
 CAAACTGGTTCGACATCAGAAGATACATTCCTACTGAAGGCATTACGCTCGACAACAACCTTACTCTGGATGCCAACGCTTCCGACGAGAAC 180
 Q N W S T S E D T F T E G I T L D N N F T L D A N A S D E N

GATGTGGCCTGGAACTGTTGCAGAGGCGAGCCCCCTTGGCCGTTCTACTGCTACTGTTCTCCGTGGCCACCGTTTTTCGGCAACATGCTC 270
 D V A W E L L Q R R A P L A V L L L L F S V A T V F G N M L

TM I
 GTCATCCTCGCCGTCATCCGGGAGCGGTACCTCCACACAGCCACCAATTACTTCGTCACCTCCCTAGCAGTGGCCGACTGTCTTGTGGGT 360
 V I L A V I R E R Y L H T A T N Y F V T S L A V A D C L V G

TM II
 CTTGTCGTGATGCCTTTTCACTGCCGTGTATGAAGTCCTTGAGAACAGGTGGTTTTTTGGGATGGATTGGTGCACGTGTGGAGGTGCTTA 450
 L V V M P F S A V Y E V L E N R W F F G M D W C D V W R S L

GACGTTCTGTTTCAGCACAGCATCTATCTTGAACCCGTGTGTGATCTCTCTGGACCGGTACTGGGCTATTACCGACCCCTTACGTTACCCC 540
 D V L F S T A S I L N P C V I S L D R Y W A I T D P F T Y P

TM III
 ACCAGAATGAGTGTGCGGAGAGCAGCGCTGCTGATAGCGGCTGTGTGGGTGTGCTCCGGGACGATCTCCTTTCCTGCGATTGTCTGGTGG 630
 T R M S V R R A A L L I A A V W V C S G T I S F P A I V W W

TM IV
 AGAGCAGTCAGGACTGAAGTGGTGGCCGCTTTAAATGCCCTTACGGAAAACCTCGGCTACTTGGTTTTCTCCTCAACAATATCCTTC 720
 R A V R T E V V P A F K C P F T E N L G Y L V F S S T I S F

•
 TATCTCCCGCTCTTTGTGATGGTGTTCACGTAATAACAGAGCTGCAGTAATCCAGACGAGATCCCTCAAGCTGGGATCGAAG 810
 Y L P L F V M V F T Y Y R I Y R A A V I Q T R S L K L G S K

TM V
 CAGGTGATGATGGCTTCTGGCGAGCTTGAATTAACCCTCAGAATACACAGAGGTGGGAATAACAGCAGTCCACTAATAGTGGGAATACT 900
 Q V M M A S G E L E L T L R I H R G G N N S S S T N S G N T

GTAGTGGATGACAGACATATGTACAGTAGCGGAAGTGGAGGAACACCTGATGAACTCCGGGTGAAGTCTAGATGCGGCTGATACTATG 990
 V V D D R H M Y S S G S G G T P D E L P G E V L D A A D T M

•
 TCTCCTCCACATCACCATCATCATCACCATCATCACCACCACCACCATCATCAAAACAATGGACTAACAAGACATGCATCAACTAGAATA 1080
 S P P H H H H H H H H H H H H H H H H H Q N N G L T R H A S T R I

•
 ATGGCCGAAACACGGCGAACAGTAAGCGATGTCTAAGAAATTTTTGCTGAGTAGGAAACTTGCAAATTCGCTAAAGAGAAGAAGGCG 1170
 M A G N T A N S K A M S K N F S L S R K L A K F A K E K K A

CGAAAAACACTTGGGATCGTGATGGGAGTGTTCATTGTGTGTTGGTTGCCCTTCTTCGTTGGTGAATCTTCTCCGGCTTCTGTCTGCGC 1260
 A K T L G I V M G V F I V C W L P F F V V N L L S G F C L R

TM VI
 TGCATCTGGAACGAGGAGCTTGTGTCTGCGGTTGTGACGTGGTTGGGCTGGATCAATTCCAGTATGAATCCTGTCTATGCCTGCTGG 1350
 C I W N E E L V S A V V T W L G W I N S S M N P V I Y A C W

TM VII
 AGTCGAGATTTTCAGAAGGTAA 1371
 S R D F R R *

Abb. 3.11: Abgeleitete Aminosäuresequenz von PeaDOP2: grau unterlegt sind die vorhergesagten Transmembrandomänen I-VII. Ein Stern markiert Konsensstellen für eine Glykosylierung der Art N - {P} - [ST] - {P}, ein Punkt markiert Konsensstellen für eine Phosphorylierung durch die PKC der Art [ST] - x - [RK]. Rot unterlegt sind konservierte Aminosäuren, die der Ligandenbindung dienen. Die Zahl gibt die Position der letzten Base in der jeweiligen Zeile an.

Stark konserviert sind die Bereiche der Transmembrandomänen. Diese enthalten die bereits bei PeaTYR1 genannten Sequenzen, die charakteristisch für Rezeptoren der Rhodopsingruppe im Allgemeinen und Aminrezeptoren im Speziellen sind. Es lässt sich z. B. das G₈₇NxLVI-Motiv der TM I wiederfinden. Das D₂₆₈RY-Motiv ist ebenfalls vorhanden. Für Aminrezeptoren charakteristische Motive sind C₄₀₄WLPFF der TM VI, W₄₃₄LG der TM VII und F₂₃₉XXP der TM V. Einzelne Aminosäuren können bei Aminrezeptoren ebenfalls stark konserviert vorliegen z.B. ein Tryptophanrest der ersten extrazellulären Schleife W₁₄₆ oder ein Serinrest der TM III S₁₅₇.

Analog zum Tyraminrezeptor sind auch bei diesem putativen Dopaminrezeptor einzelne Aminosäuren, die der Ligandenbindung dienen, konserviert (Abb. 11). Ein Aspartatrest D₁₅₀ in der TM III könnte mit der deprotonierten Seitenkette eine Salzbrücke zu der protonierten Aminogruppe des Liganden ausbilden. Ein konservierter Phenylalaninrest F₄₀₁ in TM VI könnte eine Bindung des Liganden über hydrophobe Wechselwirkungen der beiden hydroxylierten Benzolringe ermöglichen. Das in der TM V gelegene Motiv S₂₃₅SxxS kann mit den Hydroxylgruppen Wasserstoffbrückenbindungen zu den des am katecholaminen Teil des Dopamin liegenden Hydroxylgruppen ausbilden (Strader *et al.*, 1987, 1989, 1995). Ein Threoninrest T₁₅₅ ist Bestandteil der Bindungstasche. Ein weiteres identifiziertes Motiv befindet sich innerhalb der TM VII: N₄₄₃PxxY, welches bei β -2 adrenergen Rezeptoren unter anderem der Rezeptorsequestrierung dient (Barak *et al.*, 1994, 1995). Eine extrazellulär gelegene Disulfidbrücke zwischen zwei Cysteinen C₁₄₃ und C₂₂₃ der extrazellulären Schleifen eins und zwei ist denkbar. (Reviews: Bockert und Pin, 1999; Shi und Javitch, 2002).

Wird die Sequenz von PeaDOP2 in eine BLAST-Analyse mit einbezogen, wird eine große Ähnlichkeit zu bereits charakterisierten Dopaminrezeptoren aus *Apis mellifera* (AmDOP2; Humphries *et al.*, 2003) und aus *Drosophila melanogaster* (DmDopR2; Feng *et al.*, 1996) deutlich. Diese Rezeptoren ähneln dem der Schabe zu 79 bzw. 76% und haben an 72 bzw. 70% der Positionen identische Aminosäuren (Abb. 10). Die größten Übereinstimmungen bestehen innerhalb der Transmembrandomänen. Innerhalb der dritten zytoplasmatischen Schleife und am N-Terminus unterscheiden sich die Sequenzen am stärksten, wobei die Übergänge der Transmembrandomänen V und VI zur Zytoplasmaseite ebenfalls stark konserviert sind. In diesen Regionen findet die Interaktion des Rezeptors mit dem G-Protein statt.

In einem aus verschiedenen Rezeptorsequenzen erstellten Dendrogramm (Abb. 6) bildet PeaDop2 zusammen mit anderen Dopaminezeptoren verschiedener Insekten einen deutlich von anderen Dopaminrezeptoren bzw. Oktopaminrezeptoren abgesetzten Zweig (DmDopR2,

Feng *et al.*, 1996; PaxDopR, Ono *et al.*, 2004 und AmDop2, Humphries *et al.*, 2003). Diese Rezeptoren wurden von Mustard *et al.* (2005) als Invertebratentyp-Dopaminrezeptoren zusammengefasst. In einem weiteren Dendrogramm (Abb. 7), welche neben PeaDOP2 auch menschliche Aminrezeptoren enthält, bilden die α_1 -adrenergen Rezeptoren zusammen mit PeaDOP2 einen eigenen Ast.

3.5 Expressionsmuster der Gene von *Peatyr1* und *Peadop2*

Das gewebsspezifische Verteilungsmuster der Transkripte der beiden klonierten Gene wurde durch RT-PCR qualitativ untersucht. Hierfür wurden Primer generiert, die ein kurzes Stück (200-300 bp) der für die 3. zytoplasmatische Schleife kodierenden cDNA amplifizieren. Obwohl in allen Ansätzen die gleiche Menge RNA eingesetzt wurde, lässt sich allerdings anhand eines solchen Experimentes keine eindeutige quantitative Aussage zu Expressionsstärken machen.

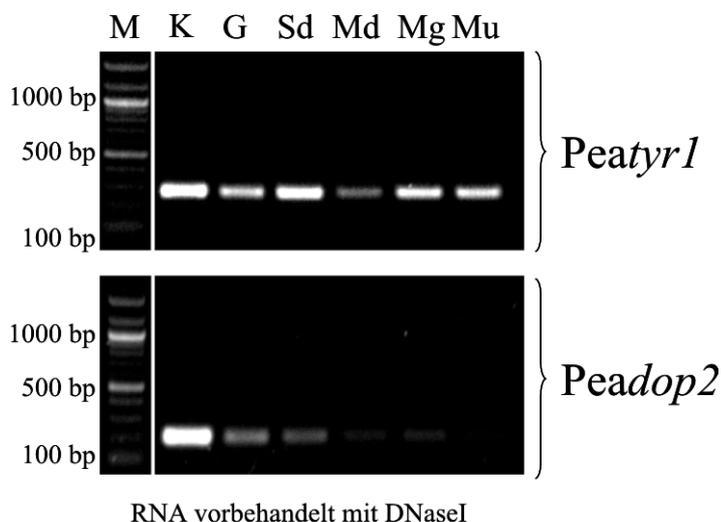


Abb. 3.12: Expressionsanalyse der Gene *Peatyr1* und *Peadop2* in verschiedenen Geweben von *Periplaneta americana*. Die elektrophoretische Analyse der RT-PCR-Produkte von RNA aus verschiedenen Geweben ermöglicht eine semiquantitative Auswertung der Transkriptionstärke. M: 100 bp Leiter, K: Positivkontroll-PCR auf pBluescript SK(-)::*Peatyr1* bzw. *Peadop2*. G: Gehirn, Sd: Speicheldrüse, Md: Mitteldarm, Mg: Malpighische Gefäße, Mu: Muskel.

Beide Rezeptorgene werden in den fünf untersuchten Geweben (Gehirn, Speicheldrüse, Mitteldarm, Malpighischen Gefäße und Flugmuskel) transkribiert, wobei das Tyraminrezeptorgen vermutlich etwas stärker in der Speicheldrüse und den Malpighischen Gefäßen, etwas schwächer im Mitteldarm transkribiert wird. Das Dopaminrezeptortranskript konnte am stärksten aus mRNA-Präparationen aus Gehirn amplifiziert werden. In den anderen Geweben scheint die Expressionsstärke deutlich geringer zu sein. Eine DNase-Behandlung vor Beginn der RT-Reaktion konnte sicherstellen, dass das Produkt aus retranskribierter RNA

und nicht genomischer DNA gebildet wurde. Wurde die RNA mit RNase hydrolysiert, blieben die Produkte aus.

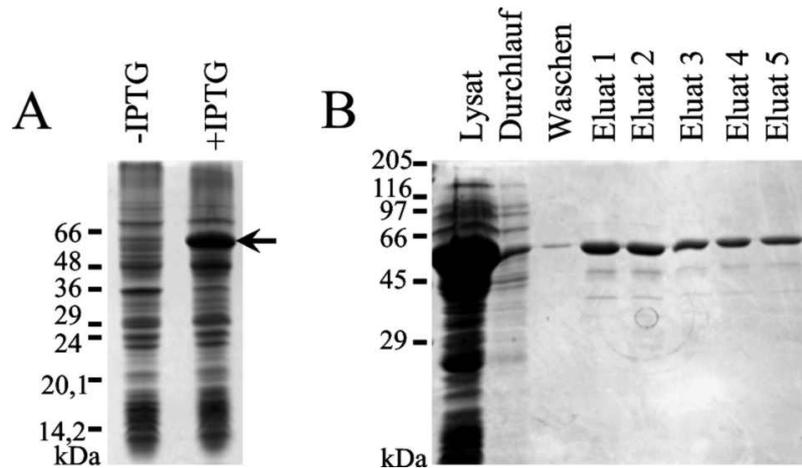
Nachdem geklärt war, dass die klonierten Rezeptorgene tatsächlich transkribiert werden, wirft dies die Frage nach der zellulären Verteilung der translatierten Proteine auf. Dazu wurde gegen den Tyraminrezeptor ein polyklonales Antiserum erzeugt und für immunhistologische Untersuchungen eingesetzt. Entsprechende Experimente für PeaDOP2 konnten aus Zeitgründen nicht durchgeführt werden.

3.6 Erzeugung des Antiserums α PeaTYR1

Zuerst wurde ein kurzes Stück des Genes (3. zytoplasmatische Schleife: P₂₆₂-R₃₅₇, s. Abbildung 4 bzw. C₇₈₆-G₁₀₇₁, s. Abbildung 5) in die Expressionsvektoren pMal-c2X und pET-30a ligiert. In kleinen Kulturen (5 ml LB + Antibiotikum, s. Methoden) wurden einzelne Klone identifiziert, bei denen die Proteinexpression durch IPTG induzierbar war. In größerem Maßstab wurden dann die von ausgewählten Klonen überexprimierten Proteine aufgereinigt. Die beiden Proteine MBP-PeaTYR1-CPL3 und HIS-PeaTYR1-CPL3 konnte in größeren Mengen in löslicher Form im Überstand der lysierten Zellen detektiert werden. Nach dem Beladen des jeweiligen Säulenmaterials (Amylose-Matrix bzw. Ni²⁺-Matrix; s. Methoden) war ein Großteil des Proteins aus dem Überstand auf der Säule gebunden. Durch Waschen wurde es nicht eluiert, erst mit dem Elutionpuffer konnte es vom Affinitätsträger gelöst werden (siehe Abbildung 3.13 und 3.14).

Für die Immunisierung wurden zuerst zwei Tiere ausgewählt, deren Präimmunsere nur eine geringe Kreuzreaktivität zu Proteinen aus Schabengehirnen aufwiesen. In diese Tiere wurde das gereinigte Fusionsprotein MBP-PeaTYR1-CPL3 nach Protokollen der Firma Pineda injiziert. Nach 90 Tagen wurden die Tiere ausgeblutet und die Seren abgenommen.

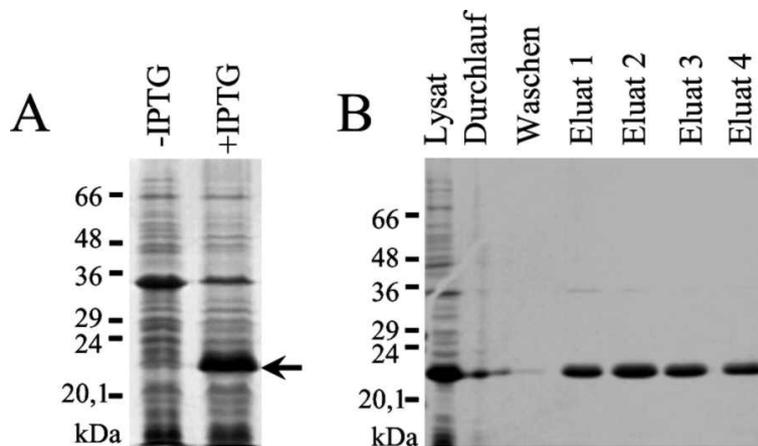
Die Seren zeigen im Vergleich zu den Präimmunsere eine deutlich verstärkte Immunreaktivität gegen geblottete Proteine aus Schabengehirn. War bei den Präimmunsere bei einer Verdünnung von 1/5.000 keine Banden mehr sichtbar, so sind nach 90 Tagen Immunisierung noch bis zu einer Verdünnung von 1/40.000 Banden sichtbar (siehe Abbildung 3.15).



MBP-PeaTYR1-CPL3

HMKIKTGARILALSALTTMMFSASALAKIEEGKLVIIWINGDKGYNGLAEVGGKFEKDTGIKVTVEHPDKLEEKFPQV
 AATGDGPDIIFWAHDRFGGYAQSGLLAEITPDKAFQDKLYPFTWDAVRYNGKLIAYPIAVEALS LIYNKDLLPNPPK
 TWEEIPALDKELKAKGKSALMFNLQEPYFTWPLIAADGGYAFKYENGGYDIKDVGVNDAGAKAGLTFLVDLIKXKH
 MNADTDYSIAEAAFNKGETAMTINGPWAWNSNIDTSKVNYGVTVLPTFKGQPSKPFVGVLSAGINAASPNKELAKE
 FLENYLLTDEGLEAVNKDKPLGAVALKSYEEELAKDPRIAATMENAQKGEIMPNIQMSAFWYAVRTAVINAASGR
 QTVDEALKDAQTNSSSNNNNNNNNNLGI EGRISFPD**GENVGN GKRRNSKKGIFSSLG SFREKYFKRSISIEE**
SITDVEIPPLNQPTPTGNVATTPLESSSPKSPNGTERGGNSSLKRRPRNKPPVDMGKR

Abb. 3.13: Expression des MBP-PeaTYR1-CPL3-Fusionsproteins. A) Es konnten Klone identifiziert werden, die nach Induktion mit IPTG eine starke zytoplasmatische Expression des gesuchten Proteins zeigten. B) Das Zielprotein konnte mit einer Amylose-gekoppelten Matrix aus dem Rohlysate entfernt werden und mit maltosehaltigem Elutionspuffer vom Affinitätsträger eluiert werden. Die Aminosäuresequenz zeigt die Maltose-Bindungsstelle (**weiß**) und die 3. zytoplasm. Schleife von PeaTYR1 (**bold**).



HIS-PeaTYR1-CPL3

EGDIHM**HHHHHH**SSGLVPRGSGMKETA AAKFERQHMDSPDLGTDDDDKAMADIGSEFPD**GENVGN GKRRNSK**
KGIFSSLG SFREKYFKRSISIEESITDVEIPPLNQPTPTGNVATTPLESSSPKSPNGTEKGGNSSLKRRPRNKPPV
DMGKR

Abb. 3.14: Expression des HIS-PeaTYR1-CPL3-Fusionsproteins. A) Es konnten Klone identifiziert werden, die nach Induktion mit IPTG eine starke zytoplasmatische Expression des gesuchten Proteins zeigten. B) Das Zielprotein konnte mit einer Ni²⁺-gekoppelten Matrix aus dem Rohlysate entfernt werden und mit imidazolhaltigem Elutionspuffer vom Affinitätsträger eluiert werden. Die Aminosäuresequenz zeigt das Hexahistidinmotiv (**weiß**) und die 3. zytoplasm. Schleife von PeaTYR1 (**bold**).

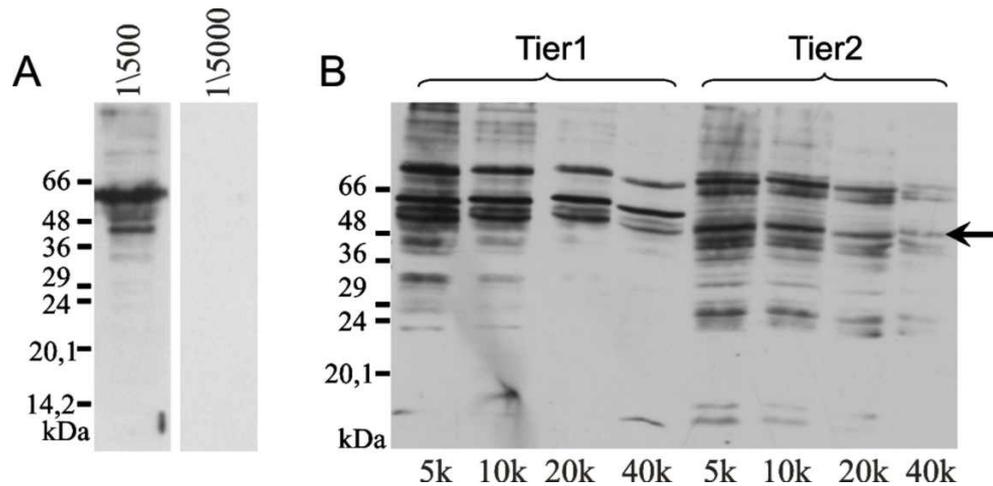


Abb. 3.15: Test der Kaninchen-Seren vor bzw. 90 Tage nach der Immunisierung. Es wurden jeweils zwei Schabengehirne in 200 μ l Gelladepuffer homogenisiert und davon 5 μ l aufgetragen. 90 Tage nach der Immunisierung mit dem MBP-PeaTYR1-CPL3-Fusionsprotein ist eine deutlich verstärkte Immunreaktivität sichtbar. Waren bei den Präimmunseren bei einer Verdünnung von 1/5.000 keine Proteinbande mehr zu erkennen (A), so sind 90 Tage nach der Immunisierung bis zu einer Verdünnung des Serums von 1/40.000 noch Banden zu erkennen (B).

Die relativ hohe Kreuzreaktivität zu anderen Proteinen aus dem Schabengehirn ist auf das nicht ausreichend gereinigte Protein, welches zur Immunisierung eingesetzt wurde, zurückzuführen. Das Antiserum ist nicht ausschließlich gegen das MBP-PeaTYR1-CPL3-Fusionsprotein gerichtet. Banden im zu erwarteten Massenbereich von 50 kDa könnten dem gesuchten Rezeptor entsprechen. Eine weitere Aufreinigung war aber nötig.

Um die Rohseren aufzureinigen zu können, wurde das HIS-PeaTYR1-CPL3-Fusionsprotein kovalent an eine Säule gebunden. Durch die Affinitätschromatografische Reinigung der Seren und anschließende Elution sollte eine Anreicherung von spezifisch gegen das Zielprotein gerichteten Antikörpern erreicht werden.

Die gebundenen Antikörper, die im Idealfall nur noch das PeaTYR1-CPL3-Peptid erkennen sollten, wurde mit einem sauren Puffer eluiert. Die Aliquots, die die eluierten Antikörper enthielten wurden durch einen Tropftest auf einer Nitrozellulosemembran durch Ponceaufärbung identifiziert und anschließend auf einem Blot von extrahierten Proteinen aus Schabengehirn getestet. Die Aliquots 4-8 enthielten nachweisbare Mengen an Protein. Mit diesen Aliquots konnten mehrere Proteinbanden auf Westernblots von Proteinen des Schabengehirns markiert werden. Unter diesen befindet sich u. a. eine Bande der gesuchten Größe von etwa 50 kDa, der kalkulierten Molekularmasse des PeaTYR1-Rezeptors. Eine Bande gleicher Größe konnte auf Westernblots von Proteinen der Speicheldrüse bzw. der Malpighischen Gefäßen nachgewiesen werden. Dies könnte darauf hinweisen, dass PeaTYR1

auch in diesen Geweben exprimiert wird. Die Spezifität des Antikörpers konnte durch erneute Absorption auf dem mit HIS-PeaTYR1-CPL3 gekoppeltem Affinitätsträger, der zur Reinigung der Seren eingesetzt wurde, überprüft werden. Wird ein Säulenvolumen Antikörper auf die Säule gegeben, dies über Nacht präabsorbiert und abschließend mit einem Volumen Waschpuffer gewaschen, so kann ist mit dieser Fraktion keine Proteinbanden mehr detektierbar. Eine direkte Präabsorption mit MBP-PeaTYR1-CPL3 erwies sich als ungünstig. Die Banden im erwarteten Massenbereich verschwanden, stattdessen waren Proteine anderer Molekularmassen markiert. Diese Markierungen sind vermutlich auf Protein-Protein-Wechselwirkungen von MBP-PeaTYR1-CPL3 und/ oder des Fusionsprotein-Antikörperkomplexes mit anderen geblotteten Proteinen zurückzuführen.

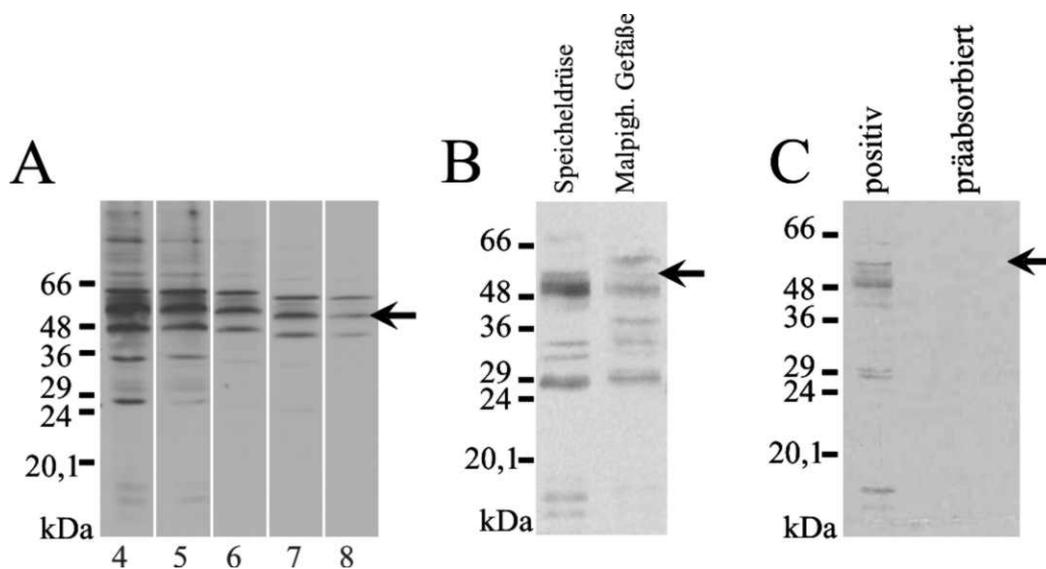


Abb. 3.16: Tests der gereinigten Antikörper. A) Die eluierten Fraktionen vier bis acht zeigen auf geblotteten Proteinen aus Schabengehirn bei einer Verdünnung von 1:100 deutlich Immunreaktivität. Eine der Banden im Bereich von 50 – 60 kDa könnte der gesuchte Rezeptor sein. B) Eine Bande von ähnlicher Größe wurde bei Homogenat aus Speicheldrüsen bzw. Malpighischen Gefäßen detektiert (Fraktion 6 1:200). C) Die Spezifität konnte durch Einsatz von präabsorbierten Antikörpern auf einem Blot von Proteinen des Schabengehirns gezeigt werden (Fraktion 6 1:200).

3.7 Verteilung von Tyramin-ähnlicher Immunreaktivität

3.7.1 Spezifität/ Kreuzreaktivität des Antikörpers

Für die immunohistologischen Untersuchungen wurden Gehirne von vier bis fünf Wochen alten männlichen Imagines fixiert, mit einem Vibratom geschnitten und mit einem kommerziell erhältlichen Antikörper gegen Tyramin (Chemicon AB124) markiert (siehe Methoden). Um die Spezifität des Antikörpers zu testen, wurde eine Präabsorption des

Antiserums mit Tyramin durchgeführt. Eine Inkubation mit 10 mM Tyramin führte zu einer Auslöschung der Markierung, 10 μ M zu einer Reduktion der Markierung, es waren nur noch stark gefärbte Zellen zu erkennen. Die laut Hersteller bestehende Kreuzreaktivität des Tyraminantikörpers zu Oktopamin von 1:830 konnte durch Präabsorptionsversuche nicht eindeutig als Quelle von falsch positiver Markierung ausgeschlossen werden. Pro 820 gebundene Tyraminmoleküle wird immer noch ein Molekül Oktopamin von dem Antikörper gebunden). Unveröffentlichte Daten von Dr. K. Franz (TU Berlin) belegen jedoch die Möglichkeit des Einsatzes zur Tyraminmarkierung, sodass *bona fide* von Tyramin-immunreaktiver Markierung gesprochen werden kann. Sie konnte an Bienenhirnschnitten zeigen, dass Oktopamin erst bei einer etwa 1000fachen Konzentration die Bindungsstellen des Antikörpers vollständig absättigen konnte.

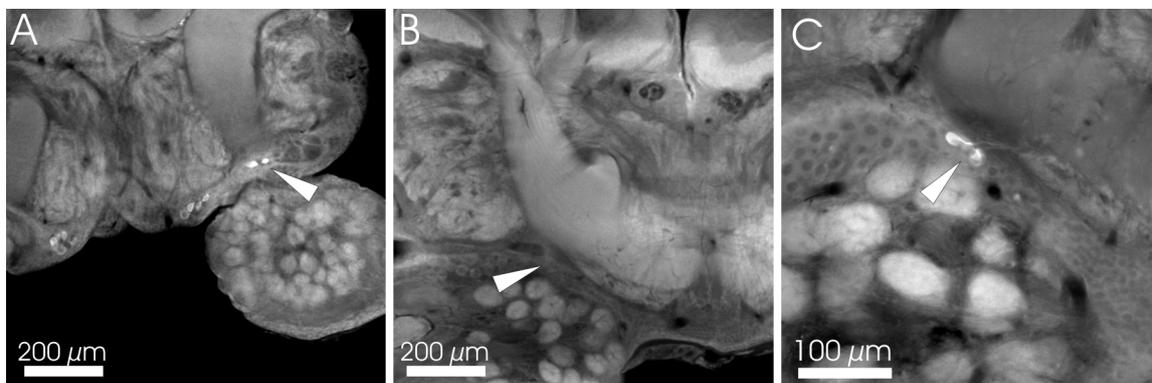


Abb. 3.17: Präabsorption des α -Tyraminantikörpers: Das Antiserum, was bei einer Verdünnung von 1/3000 noch einzelne Zellen markiert (A), tut diese nicht mehr nach einer Präabsorption mit 10 mM Tyramin (B). Der Effekt wird abgeschwächt, wird nur mit 10 μ M Tyramin präabsorbiert (C).

3.7.2 Markierung von Gruppen von Zellkörpern

Mit dem Antikörper war es möglich, ausgewählte Somata und axonale Verzweigungen in den Neuropilen des Gehirns zu markieren. Eine eindeutige Zuweisung der Verzweigungen zu einzelnen Somata war nicht möglich, da die Markierung der Verzweigung oft zu fein war, um sie in den 50 μ m dicken Schnitten ausreichend rekonstruieren zu können. Die Terminologie für die Beschreibung der markierten Gruppen von Zellkörpern ist der Arbeit von Sinakevitch und Kollegen (2005) entnommen, in der bei *Periplaneta* Untersuchungen zur Verteilung von Oktopamin im Gehirn angestellt wurden. Für alle in der vorliegenden Arbeit identifizierten Somagruppen finden sich entsprechende oktopamin-immunreaktive Gruppen in der Arbeit von Sinakevitch *et al.* wieder. Unterschiedlich ist hierbei die Zahl der Gruppen bzw. die Zahl

der markierten Somata innerhalb einer Gruppe. Alle markierten Somagruppen liegen symmetrisch in beiden Hemisphären des Gehirns vor.

Eine erste Gruppe befindet sich im anterioren Protocerebrum, lateral vom äußeren Calyx gelegen (Gruppe 0). Die Axone dieser Gruppe verlaufen quer hinter dem vertikalen Lobus der Pilzkörper und verlassen das Gehirn auf der posterioren Seite medial vom medialen Pilzkörper (Abb. 3.18 A-C). Über die Nervi corpora cardiaca II (NCC II) werden von dort aus die Corpora cardiaca innerviert. Sinakevitch zählt 12-14 Somata innerhalb der Gruppe 0 auf jeder Seite. Die Anzahl der quer angeschnittenen Tyramin-immunreaktiven Axone lässt eine ähnliche Zahl von Somata vermuten (Abb. 3.18 C). Nicht identifiziert werden konnten Zellen der Gruppe 1, die sich anterior median im Protocerebrum befinden. Aus dieser Region gelang es nur selten, auswertbare Schnitte anzufertigen. Die Gruppe 2 liegt lateral der anteroventralen Mittellinie des Protocerebrums und mediodorsal der Antennalloben, im Ursprungsbereich der vertikalen Loben der Pilzkörper (Abb. 3.18 D-E). Von hier aus ziehen deren Axone weiter posterior über die ventrale Seite des medialen Lobus des Pilzkörpers in Bereiche des zentralen Protocerebrums und des Zentralkomplexes. Eine genaue Anzahl von Somata lässt sich nicht ermitteln. Aus der Anzahl der angeschnittenen Axone ist aber von acht bis zehn Tyramin-immunreaktiven Zellen innerhalb der Gruppe 2 auszugehen (Abb. 3.21 B-C). Sinakevitch *et al.* (2005) zählten innerhalb dieser Gruppe 14 oktopamin-immunreaktive Neurone. Die Gruppe 3 befindet sich median der Antennalloben im Deutocerebrum. Als oktopamin-immunreaktiv wurden in dieser Gruppe wenigstens zehn Neurone beschrieben. Aus anderen Arbeiten ist bekannt, dass sich deren Axone von dieser Gruppe ausgehend über den posterioren optischen Trakt sich bis in die ipsilateralen optischen Loben erstrecken (Stern *et al.*, 1995). Eine ähnliche Anzahl an Neuronen konnte mit dem α -Tyraminantikörper markiert werden, wobei diese Gruppe die am besten zu identifizierende war (Abb. 3.19 A-B). Gruppe 4 enthält drei bis vier Tyramin-immunreaktive Zellen je Hemisphäre und befindet sich im ventralen posterioren Protocerebrum zwischen der Protocerebralbrücke und den medialen Calices gelegen. (Abb. 3.19 C). Im Gegensatz zu der Arbeit von Sinakevitch lassen sich die Somata dieser Gruppe mit dem α -Tyramin Antikörper nur schwach markieren. Ob diese Zellen nun weniger Tyramin als Oktopamin enthalten kann nur spekuliert werden. Bekannt ist, dass Axone, die dieser Gruppe entstammen zu der Protocerebralbrücke bzw. dem oberen Teil des Zentralkörpers ziehen. Die Gruppe 5 befindet sich zwischen den lateralen protocerebralen Loben und den Dorsalloben des Deutocerebrums. Als oktopaminerg wurden hier zehn Zellen beschrieben, das Antiserum gegen Tyramin markierte allerdings nur zwei bis drei Zellen (Abb. 3.19 D). Eine sechste Gruppe befindet sich in der lateralen Somaschicht

zwischen Dorsallobus und dem Tritocerebrum. Hier konnten drei Tyramin-immunreaktive Zellen identifiziert werden. Dagegen wurden von Sinakevitch *et al.* (2005) 13 oktopamin-immunreaktive Zellen innerhalb dieser Gruppe beschrieben (Abb. 3.19 E).

3.7.3 Verzweigungsmuster Tyramin-immunreaktiver Neurone innerhalb der Neuropile

Im Folgenden wird genauer auf die Verzweigungsmuster der markierten Neurone eingegangen. Eine eindeutige Zuweisung der markierten Gruppen von Zellen zu den Verzweigungen ließ sich aus den Schnitten nicht rekonstruieren. Allerdings sind die Projektionsfelder einzelner Neurone bereits beschrieben worden, dass so eine teilweise Zuordnung möglich ist. Zellen der Gruppe 3 z.B. projizieren in die optischen Loben (Stern, 1999).

i) Optische Loben

Die optischen Loben werden von tyraminergen Neuronen innerviert, die ihre Somata in der Gruppe 3 medial der Antennalloben haben. Die Axone ziehen über den posterioren optischen Trakt durch das Protocerebrum und verzweigen *en route* im lateralen Protocerebrum (Abb. 3.20 A). Neben diesen Zellen konnte eine weitere Gruppe von Zellen zwischen Lobula und Medulla innerhalb des Lobus markiert werden. Diese Zellen senden von dort ihre Axone in die Lobula/ Medulla (Abb. 3.20 C, E). Eine deutliche Verzweigung, wie es für Oktopamin beschrieben wurde, konnte nicht gezeigt werden. Stattdessen sind einzelne, deutlich voneinander abgehobene tangential verlaufende Schichten markiert (Abb. 3.20 A, B). Im Bereich der Somarinde, die die Neuropile umgibt, wurden mehrere ungleichmäßig verteilte Somata markiert (Abb. 3.20 D). Dies ist der Bereich, in dem intrinsische Lobula-/ Medulla-Neurone bzw. Amakrine-Zellen lokalisiert sind.

ii) Pilzkörper

Tyramin-immunreaktive Fasern konnten in den Calices der Pilzkörper detektiert werden (Abb. 3.18 B-C; 21 D). Innerhalb der Calices ist die Markierung relativ gleichmäßig verteilt. Dass es sich bei den markierten Verzweigungen nicht um intrinsische Kenyon-Zellen handelt, kann aus der fehlenden Markierung der innerhalb der Kelche liegenden Kenyonzellsomata abgeleitet werden. Diese Beobachtung deckt sich mit der Beschreibung oktopamin-immunreaktiven Markierung bei Sinakevitch *et al.* (2005). In ihrer Arbeit konnte durch

backfill-Experimente gezeigt werden, dass Ausläufer von DUM-Neuronen, deren Somata im maxillaren Segment des Unterschlundganglion liegen, gleichmäßig im Calyx verzweigen. Eine ausgeprägte Trennung verschiedener Bereiche des Calyx nach unterschiedlichen sensorischen Eingängen, wie für die Biene beschrieben ist, ist für *Periplaneta* nicht bekannt (Gronenberg, 2001; Ehmer und Gronenberg, 2002). Dadurch ist es ohne weitere Experimente schwierig, den Ursprung der Tyramin-immunreaktiven Verzweigung zu lokalisieren. Die vertikalen und horizontalen (bzw. α - und β -) Loben der Pilzkörper sind im Gegensatz zu den Calices markierungsfrei (Abb. 3.18 B).

iii) Zentralkomplex

In dem Zentralkörper konnte eine deutliche Markierung sowohl im oberen (*fan-shaped body*) als auch im unteren Teil (*ellipsoid body*) detektiert werden. Die Protocerebralbrücke und die Noduli zeigten dagegen keine eindeutige Markierung. Der säulenartige Aufbau aus acht Modulen lässt sich auch an der Markierung innerhalb des oberen Teiles wiedererkennen (Homberg, 1987): Hier ist eine fingerförmige, deutlich voneinander abgesetzte Markierung in den Modulen zu erkennen. Der sog. *superior arch* ist dagegen nur schwach und eher unregelmäßig markiert (Abb. 3.21 A-C). Dies könnte ein Indiz für tangential-verlaufende Neurone sein, die die einzelnen Säulen miteinander verbinden. Als Ursprung dieser markierten Fasern können Somata der Gruppe 4 postuliert werden. Diese Somata liegen posterior ventral zwischen den Pilzkörpern. Es ist bekannt, dass von dort Fortsätze von kolumnaren Neuronen u. a. durch die Protocerebralbrücke über den oberen und den unteren Teil des Zentralkörpers zu den lateralen akzessorischen Loben (*ventral bodies*) ziehen (Williams, 1975). Aus dem Zentralkörper heraus erfolgt eine weitere Verzweigung in das zentrale Protocerebrum, eine eindeutige Zuordnung zu den Somatagruppen lässt sich aber erneut nicht durchführen. Allerdings ist die Verteilung oktopamin-immunreaktiver Strukturen innerhalb des Zentralkomplexes sehr ähnlich (Sinakevitch *et al.*, 2005).

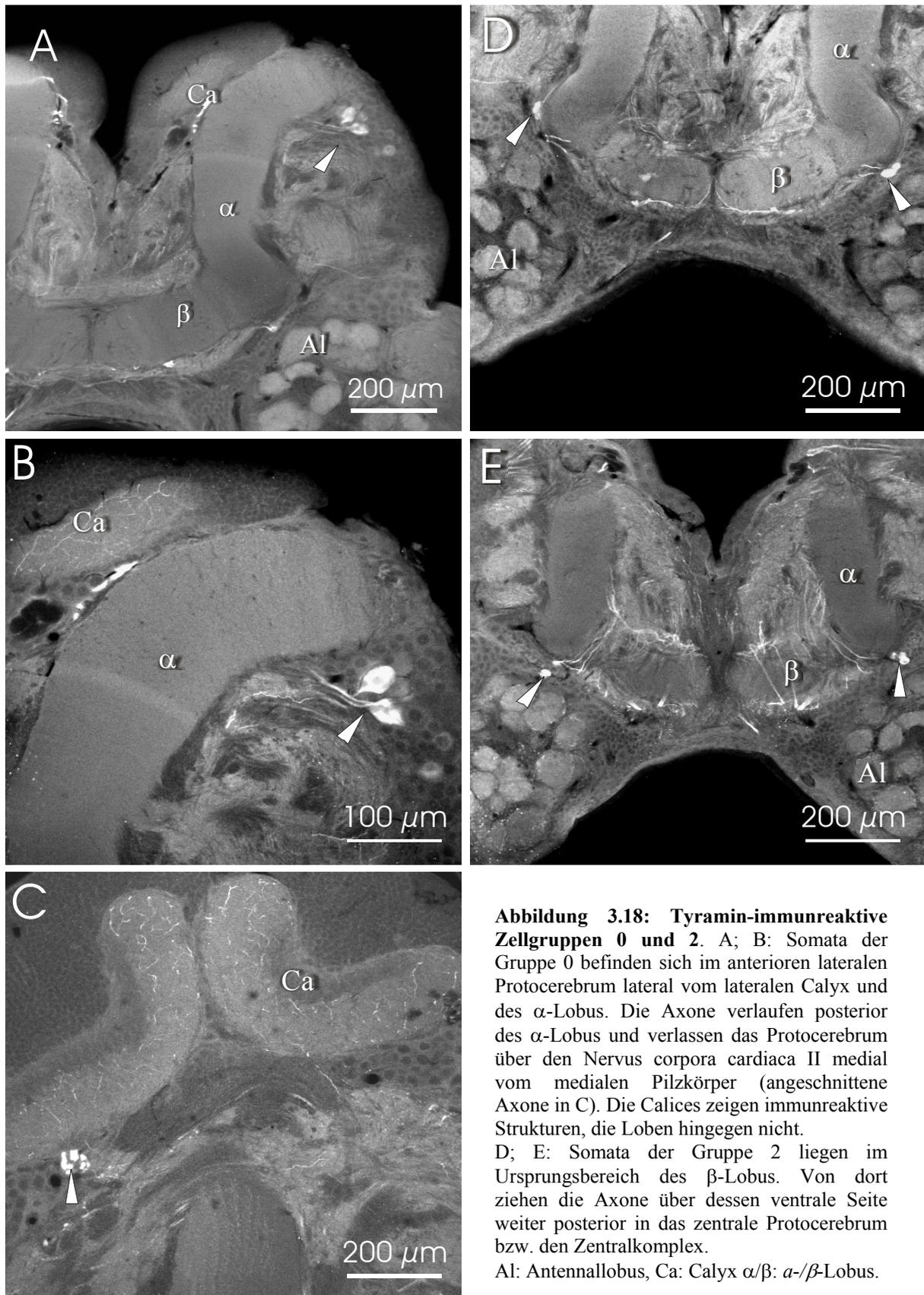


Abbildung 3.18: Tyramin-immunreaktive Zellgruppen 0 und 2. A; B: Somata der Gruppe 0 befinden sich im anterioren lateralen Protocerebrum lateral vom lateralen Calyx und des α -Lobus. Die Axone verlaufen posterior des α -Lobus und verlassen das Protocerebrum über den Nervus corpora cardiaca II medial vom medialen Pilzkörper (angeschnittene Axone in C). Die Calices zeigen immunreaktive Strukturen, die Loben hingegen nicht. D; E: Somata der Gruppe 2 liegen im Ursprungsbereich des β -Lobus. Von dort ziehen die Axone über dessen ventrale Seite weiter posterior in das zentrale Protocerebrum bzw. den Zentralkomplex. Al: Antennallobus, Ca: Calyx α/β : α -/ β -Lobus.

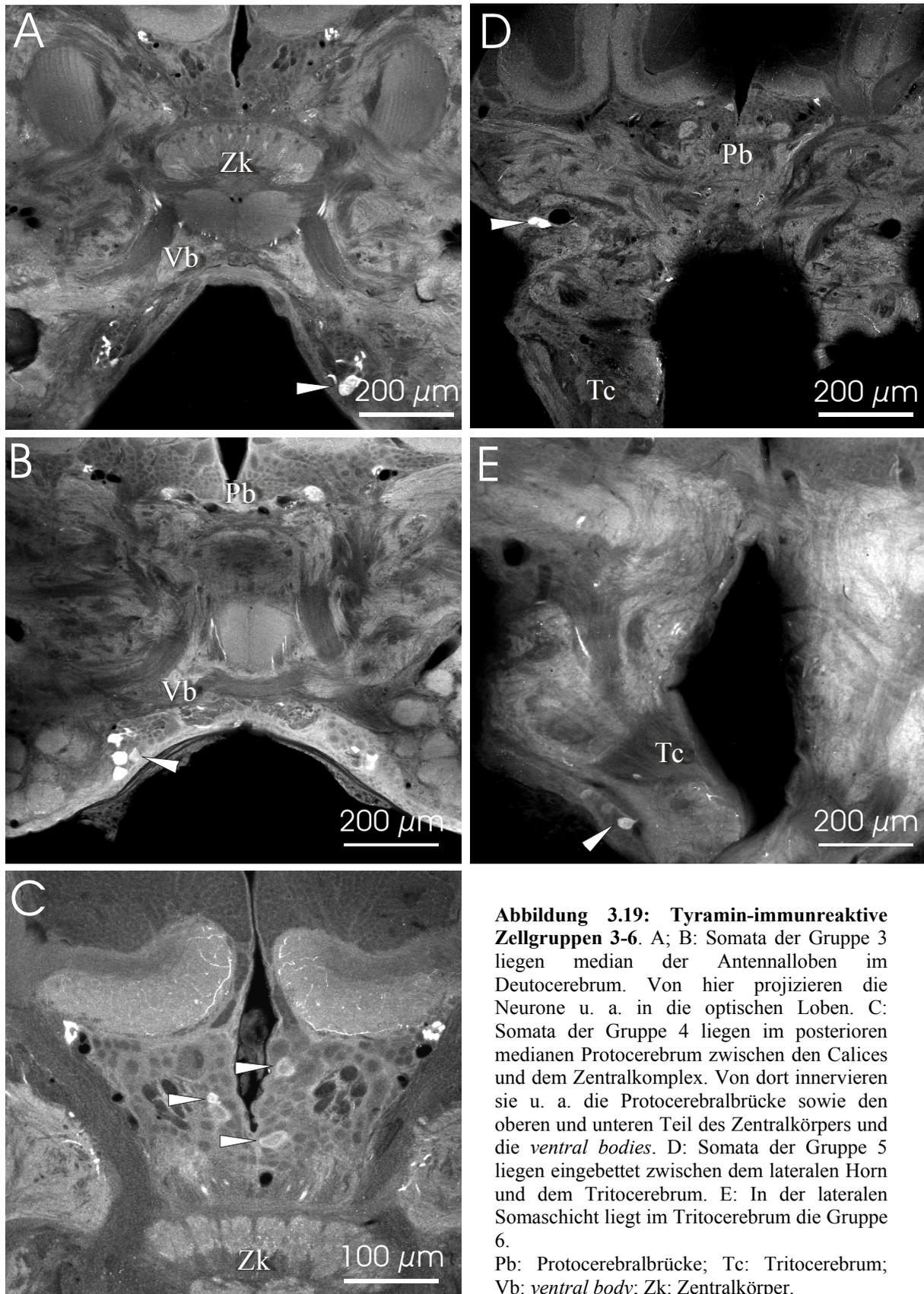


Abbildung 3.19: Tyramin-immunreaktive Zellgruppen 3-6. A; B: Somata der Gruppe 3 liegen median der Antennalloben im Deutocerebrum. Von hier projizieren die Neurone u. a. in die optischen Loben. C: Somata der Gruppe 4 liegen im posterioren medianen Protocerebrum zwischen den Calices und dem Zentralkomplex. Von dort innervieren sie u. a. die Protocerebralbrücke sowie den oberen und unteren Teil des Zentralkörpers und die *ventral bodies*. D: Somata der Gruppe 5 liegen eingebettet zwischen dem lateralen Horn und dem Tritocerebrum. E: In der lateralen Somaschicht liegt im Tritocerebrum die Gruppe 6.
Pb: Protocerebralbrücke; Tc: Tritocerebrum; Vb: *ventral body*; Zk: Zentralkörper.

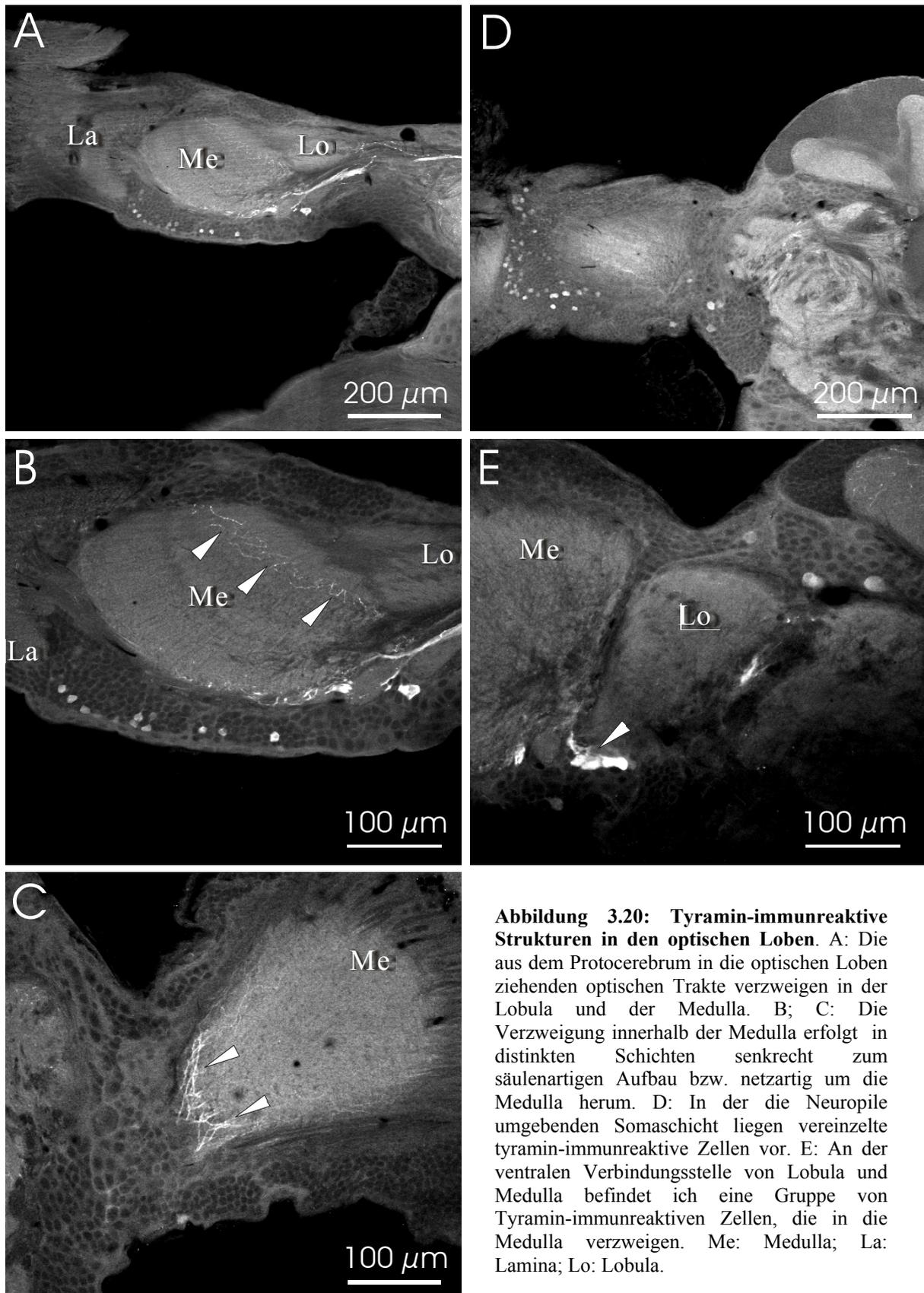


Abbildung 3.20: Tyramin-immunreaktive Strukturen in den optischen Loben. A: Die aus dem Protocerebrum in die optischen Loben ziehenden optischen Trakte verzweigen in der Lobula und der Medulla. B; C: Die Verzweigung innerhalb der Medulla erfolgt in distinkten Schichten senkrecht zum säulenartigen Aufbau bzw. netzartig um die Medulla herum. D: In der die Neuropile umgebenden Somaschicht liegen vereinzelte tyramin-immunreaktive Zellen vor. E: An der ventralen Verbindungsstelle von Lobula und Medulla befindet sich eine Gruppe von Tyramin-immunreaktiven Zellen, die in die Medulla verzweigen. Me: Medulla; La: Lamina; Lo: Lobula.

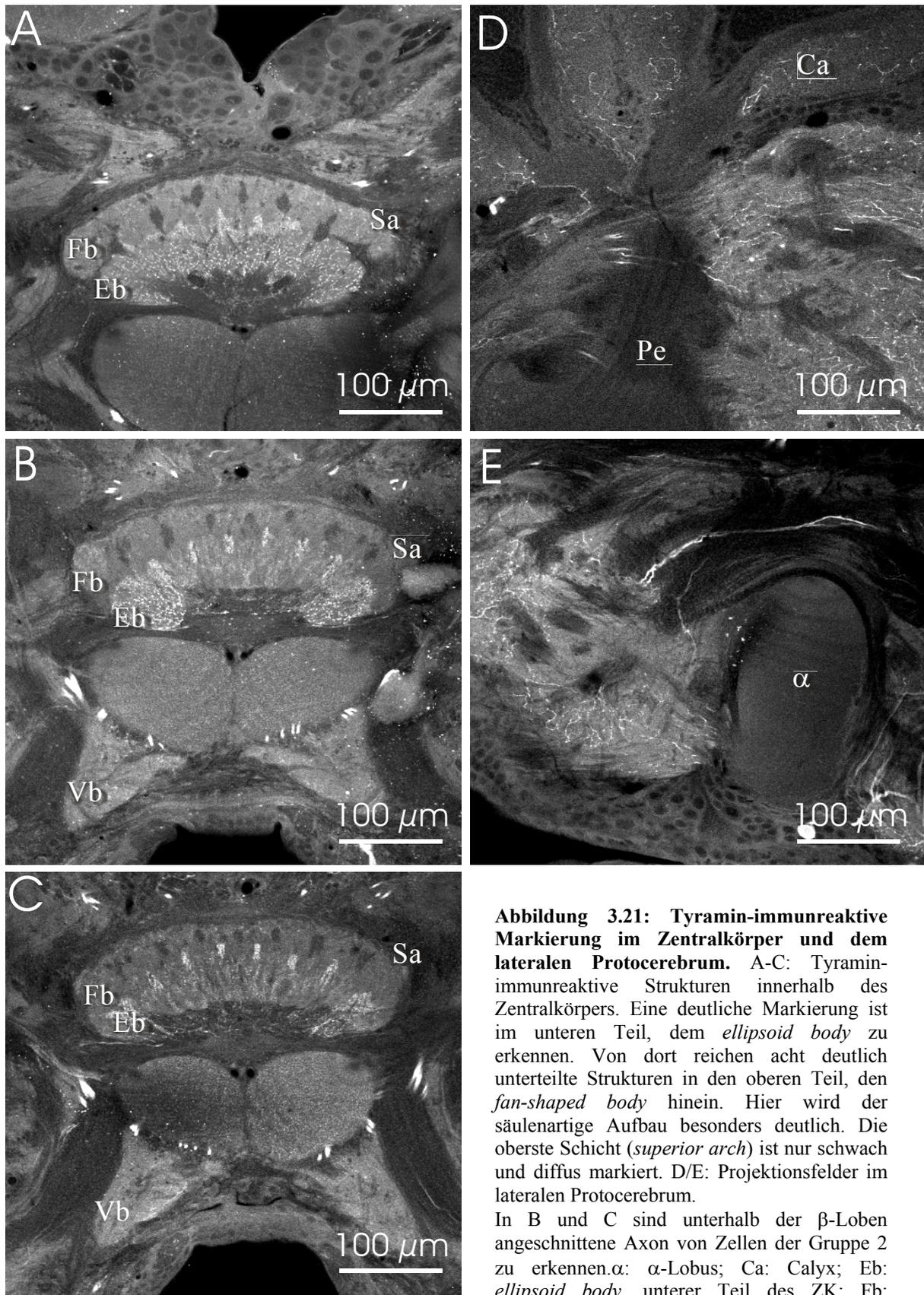


Abbildung 3.21: Tyramin-immunreaktive Markierung im Zentralkörper und dem lateralen Protocerebrum. A-C: Tyramin-immunreaktive Strukturen innerhalb des Zentralkörpers. Eine deutliche Markierung ist im unteren Teil, dem *ellipsoid body* zu erkennen. Von dort reichen acht deutlich unterteilte Strukturen in den oberen Teil, den *fan-shaped body* hinein. Hier wird der säulenartige Aufbau besonders deutlich. Die oberste Schicht (*superior arch*) ist nur schwach und diffus markiert. D/E: Projektionsfelder im lateralen Protocerebrum.

In B und C sind unterhalb der β -Loben angeschnittene Axon von Zellen der Gruppe 2 zu erkennen. α : α -Lobus; Ca: Calyx; Eb: *ellipsoid body*, unterer Teil des ZK; Fb: *fan-shaped body*, oberer Teil des ZK; Pe: Pedunculus; Sa: *superior arch*; Vb: *ventral body*.

3.8. Verteilung des PeaTYR1-Rezeptorproteins

3.8.1 Spezifität des gereinigten Antiserums

In Westernblot-Experimenten (s. Abb. 3.16) konnte bereits gezeigt werden, dass das α PeaTYR1-Antiserum eine deutlich Immunreaktivität bei geblotteten Gehirnproteinen zeigt und es Proteinbanden im kalkulierten Molekularmassenbereich markiert. Die Spezifität des gewonnenen Antiserums konnte durch eine Präabsorption mit immobilisiertem HIS-PeaTYR1-CPL3 gezeigt werden. Auf diese Weise konnte eine Markierung der Schnitte komplett unterbunden werden. Wurde hingegen lösliches MBP-PeaTYR1-CPL3 zur Präabsorption eingesetzt, verschwand die Markierung zwar, es kam aber zu ungewünschten Artefakten, vermutlich durch antikörper-unabhängige Wechselwirkungen des MBP und/ oder des Immunkomplexes mit dem Schnitt (Abb. 3.22).

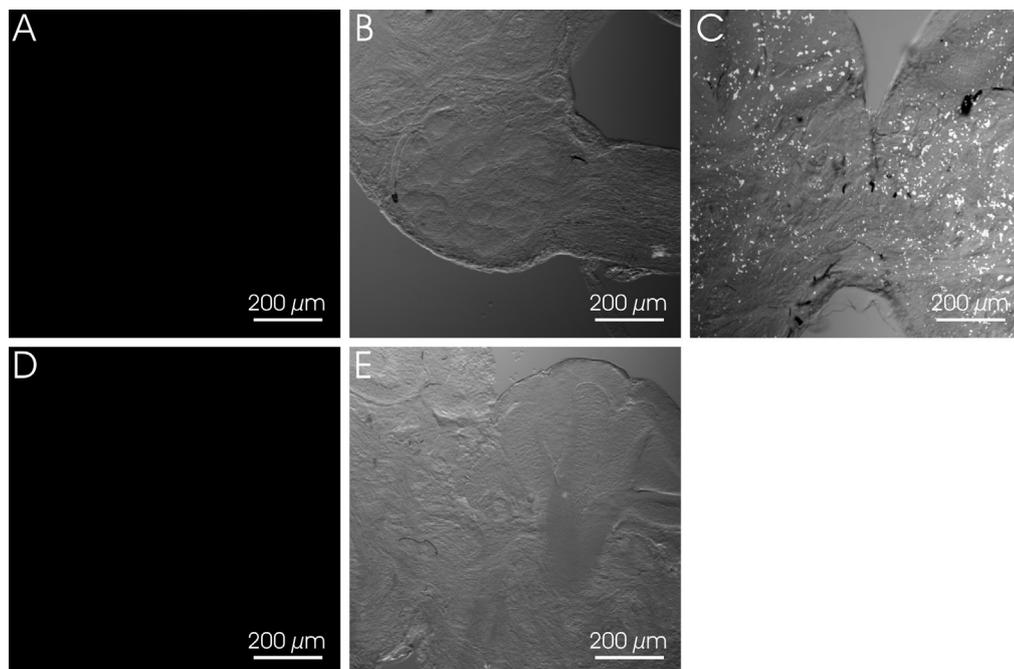


Abb. 3.22: Präabsorptionsexperimente mit dem α PeaTYR1-Antiserum: Wird die Präabsorption mit auf einer Säule immobilisiertem HIS-PeaTYR-CPL3 durchgeführt (s. Methoden), so ist keine Signal mehr zu detektieren (A: Fluoreszenz, B: kombiniert mit DIC-Aufnahme). Wird für die Präabsorption lösliches MBP-PeaTYR1-CPL3 eingesetzt, so führt dies zwar zu einem Verlust des Signals, die Immunkomplexe scheinen aber auf dem Schnitt zu präzipitieren. So ist Markierung auch auf den Kenyon-Zellen zu erkennen, die bei positiven Färbungen nicht markiert sind (C). Autofluoreszenz oder Wechselwirkung mit dem sekundären Antikörper sind auszuschließen (ohne primären Antikörper; D, E).

3.8.2 Verteilung von α PeaTYR1-Immunreaktivität in verschiedenen Neuropilen

Die Verwendung des α PeaTYR1-Antiserums an 50 μ m dicken Gehirnschnitten führt zu einer deutlichen, großflächigen Markierung, die von unmarkierten Bereichen unterbrochen wird (Abb. 3.23). Im Weiteren werden die markierten Strukturen im Detail beschrieben werden.

i) Optische Loben

Die Neuropile der optischen Loben weisen zum Teil deutliche Markierungen auf. Während der Bereich der Lamina nur schwach markiert ist, so ist in der Medulla der geschichtete Aufbau gut zu erkennen (Abb. 3.24 A). Im zentralen Bereich der Medulla ist ein deutlicher Streifen erkennbar (Abb. 3.24 B). Bei diesem Streifen könnte es sich ähnlich wie bei der Tyraminmarkierung um Amakrine-Zellen handeln. Ferner könnten transmedulläre (Tm-) Zellen markiert worden sein, die sich in bestimmten Schichten der Medulla verzweigen, bevor sie zur Lobula ziehen.

Die Lobula ist durchzogen von ungleichmäßiger Markierung und ist medial von einem verzweigten Netz von markierten Fasern umgeben. Hierbei könnte es sich bei den markierten Strukturen um Verbindungsneurone handeln. Solche Verbindungsneurone ziehen von der Medulla in die Lobula. Alternativ könnte es sich bei den Fortsätzen um Tangentialneurone handeln, deren Somata im Protocerebrum liegen. Ungewöhnlich stark markiert sind Reste der Retina, die bei der Präparation des Gehirns nicht vollständig entfernt worden ist (Abb. 3.24 B). Die Somarinde, die die Neuropile umgibt ist frei von Markierung. Die Tyramin-immunreaktiven Zellen, die sich in dieser Region (Abb. 3.20 D) befinden, scheinen den PeaTYR1-Rezeptor selbst nicht zu exprimieren. Die optischen Chiasmata sind durch die α -Rezeptorantikörper deutlich markiert (Abb. 3.24 C). Dies steht im Kontrast zur α Tyraminmarkierung. Diese Bereiche zeigten keine α Tyramin-Immunreaktivität. Im 1. optischen Chiasma wird der retinotopische Aufbau der Lamina durch Überkreuzung der Axone in der Medulla umgekehrt, das 2. optische Chiasma stellt die ursprüngliche Orientierung in der Lobula wieder her. Dieses Phänomen leitet sich von der postembryonalen Entwicklung der optischen Loben ab und ist ohne funktionelle Bedeutung (Milde, 2003). In den Chiasmata befinden sich die Axone verschiedener Neurone, die die Neuropile miteinander verbinden. Das 1. Chiasma enthält neben den Axonen der die Lamina durchspannenden Monopolarzellen L1-5 auch die Axone der Photorezeptoren R7 und R8, deren Axone im Gegensatz zu den anderen Rezeptoraxonen nicht in der Lamina enden. Die Lamina scheint so dicht gepackt zu sein, als dass das α PeyTYR1-Antiserum darin eine deutliche Markierung der Axone ergeben würde.

ii) Zentralkomplex

Wie der α Tyramin-Antikörper, so markiert auch der α PeaTYR1-Antikörper den Zentralkomplex besonders deutlich. Der säulenartige Aufbau des Neuropils ist gut zu erkennen. Besonders im oberen Teil (*fan-shaped body*) ist eine fein in mehrere Untereinheiten unterteilte, längliche Feinstruktur sichtbar. Dieser modulare Aufbau war auch bei der Verwendung des α Tyramin-Antikörper sichtbar. Im unteren Teil (*ellipsoid body*) ist eine eher diffuse Struktur zu erkennen. Der *superior arch*, die oberste Schicht des oberen Teils ist deutlich markiert (Abb. 3.24 E). Dies steht im Gegensatz α Tyraminmarkierung. Dort war dieser Bereich des Zentralkörpers nicht so deutlich zu erkennen. Die Protocerebralbrücke, der am meisten dorsal liegende Teil des Zentralkomplexes, weist ebenfalls Fluoreszenz auf. Die *ventral bodies* konnten vor dem starken Signal des gesamten ventralen Bereiches des Protocerebrums nicht eindeutig identifiziert werden. Auffällig sind einzelne markierte Somata dorsal der Protocerebralbrücke im Bereich der Somarinde, welcher sonst kaum Markierung aufweist. Diese Zellen gehören zur Gruppe 4 der oben beschriebenen Tyramin-immunreaktiven Zellgruppen und sind die einzigen erneut identifizierten Zellen verglichen zur Tyraminmarkierung (Abb. 3.24 D). Andere Gruppen zeigten nicht sowohl α Tyramin- als auch α PeaTYR1-Immunreaktivität. Eine Rückwirkung des ausgeschütteten Tyramins auf die freisetzenden Zellen scheint aber eher unwahrscheinlich, da die Freisetzungstellen in den Axonen deutlich entfernt von den Somata liegen. Diese verlaufen durch die Protocerebralbrücke und den Zentralkomplex. Eine genaue Analyse der Verzweigungswege konnte allerdings auch hier nicht durchgeführt werden. Auch kann die Frage, ob es sich um extrinsische oder intrinsische Zellen handelt, nicht eindeutig beantwortet werden.

iii) Pilzkörper

Die Pilzkörper sind im Bereich der Calices, besonders auf der innersten Schicht der Innenseite markiert (Abb. 3.23 A) Die Kelche sind vor dem Hintergrund der unmarkierten Kenyon-Zellsomata deutlich zu erkennen. Neben der starken Markierung der innersten Schicht ist eine feine netzartige Markierung in der gesamten Kelchregion sichtbar. In Präparaten, in denen die Pedunculi längs angeschnitten sind, scheinen sich die markierten Strukturen in der Mitte des Kelches zu bündeln, bevor sie in die Tiefe des Pedunculus absteigen. Dort verliert sich die Markierung. In den Pedunculi ist der säulenartige Aufbau deutlich erkennbar, der durch die Bündelung mehrere Kenyon-Zellen entsteht. Die horizontalen/ vertikalen Loben sind weitgehend frei von Markierung. Gelegentlich sind punktförmige, zellähnliche Markierungen bzw. breitere Banden innerhalb der Loben zu erkennen. Bei diesen Markierungen könnte es

sich um die Axone intrinsischer Kenyon-Zellen handeln, die sich vom Calyx kommend in den Pedunculus erstrecken. Es ist auch möglich, dass es sich bei den markierten Zellen um Gliazellen handelt. Dies würde die ungleichmäßig in den Loben verteilte Markierung erklären. Hähnlein und Bicker (1996 a, b) konnten durch Markierung mit *Datura stramonium* Lektin bzw. Osmium-Ethylgallat zeigen, dass in den Loben der Pilzkörper Gliazellen lokalisiert sind. Entsprechendes zeigten sie für die Antennalloben (s.u.). Ein Vergleich dieses Befundes mit der α Tyraminmarkierung zeigt, dass eine Überlagerung der Transmitter-/Rezeptormarkierung nur in den Kelchen zu erkennen ist. Dies scheint der Bereich zu sein, in dem das Tyramin seine vermutlich modulatorische Wirkung entfaltet. Welchen Einfluss Tyramin auf Gliazellen hat ist unklar.

iv) Laterales Protocerebrum, Deutocerebrum und Tritocerebrum

Der größte Teil des Protocerebrums zeigt α PeaTYR1-Immunreaktivität. Diese Markierung ist ungleichmäßig über das mediane und laterale Protocerebrum verteilt. Ungefärbt hingegen sind die Somata z.B. der Kenyon-Zellen und der meisten Zellen in der Pars intercerebralis, sowie die Somata in der Rinde des Protocerebrums. Gut sichtbar markiert sind die inneren Antennocerebraltrakte, die von den Antennalloben kommen, am basalen Bereich der Calices vorbeiziehen und dann schließlich zum lateralen Protocerebrum projizieren (Abb. 3.23 B). Dieser Trakt enthält Projektionsneurone, die einzelne Glomeruli der Antennalloben mit den höheren Zentren des Gehirns verbinden (Stocker *et al.*, 1990, 1994; Wong *et al.*, 2002). Insgesamt ist für die hier betrachtete Region eine gute Überlappung der α Tyramin- und α PeaTYR1-immunreaktiven Strukturen auffällig. Ob es sich bei den markierten Strukturen um Verzweigungen von intrinsischen Neuronen des Protocerebrums oder von extinsischen Neuronen handelt, konnte nicht unterschieden werden.

Die Antennalloben weisen eine ausgeprägte Markierung auf. Die einzelnen Glomeruli selbst sind frei von Markierung, sie sind aber deutlich von markierten Strukturen eingefasst (Abb. 3.25 A-D). Diese Markierungen sind einerseits faserige, zum anderen punktförmige Strukturen, die die einzelnen Glomeruli deutlich abgrenzen. Das Zentrum des Lobus ist deutlich markiert, in Richtung Peripherie nimmt die Markierung kontinuierlich ab. Auffällig ist eine Gruppe von Somata, die lateral an der Grenze zum Protocerebrum angeordnet sind. Die Somata sind unmarkiert, während die Neuriten, die zum Antennallobus projizieren, markiert sind (Abb. 3.25 E). Bei den markierten Strukturen im Zentrum des Lobus könnte es sich um lokale Interneuronen handeln, die einzelne Glomeruli miteinander vernetzen. Es könnten auch Projektionsneurone sein, die über den ebenfalls markierten Antennocerebraltrakt zum lateralen Protocerebrum projizieren.

Cerebraltrakt ins Protocerebrum ziehen (s.o.). Die punktförmigen Strukturen könnten markierte Gliazellen sein, die für diesen Bereich bei Biene und der Heuschrecke beschrieben worden sind (Hähnlein und Bicker, 1996).

Das Tritocerebrum selbst ist deutlich markiert, die Somarinde ist erneut markierungsfrei. Eine eindeutige Identifizierung und Zuordnung der markierten Strukturen war nicht möglich.

3.8.3 Verteilung von α PeaTYR1-Immunreaktivität in der Speicheldrüse der Schabe

Reverse Transkriptase-Reaktionen und Blotanalysen haben gezeigt, dass der putative Tyraminrezeptor nicht nur im Gehirn, sondern u. a. auch in der Speicheldrüse exprimiert wird. Um genauere Aussagen über die zelluläre Verteilung des Rezeptors machen zu können, wurde das gereinigte Antiserum zur Markierung an Präparaten ganzer Speicheldrüse (*wholemounds*) eingesetzt.

Das Serum markierte die basolateralen Membranen der Acini, den sekretorisch aktiven Einheiten der Speicheldrüse. Genauere Betrachtung zeigte, dass in den Acini nur eine Zellpopulation markiert war (Abb. 3.26 A, B). Die paarigen peripheren Zellen (P-Zellen) bilden das abgeschlossene Ende eines jeden Acinus. Die basolaterale Plasmamembran der P-Zellen war deutlich markiert. Eine Markierung dieser Zellen mit Phalloidin zeigt deren ausgeprägten Mikrovillisaum auf der luminalen Seite der Zellen. Eine Überlagerung dieser beiden Markierungen konnte bei einer Doppelmarkierung der Zellen nicht beobachtet werden (Abb. 3.26 C, D). Der Rezeptor scheint demnach nur auf der dem Lumen abgewandten, basolateralen Seite der P-Zellen lokalisiert zu sein. Eine Verlagerung des Rezeptors in den apikalen Bereich wird möglicherweise durch *tight junctions* verhindert. An manchen Stellen auf den Acini ist die sonst durchgehende Markierung unterbrochen. An diesen Stellen reicht eine weitere Zellpopulation bis an die Oberfläche der Acini: die zentralen Zellen (C-Zellen). Diese, sowie die Gangzellen werden vom Antiserum nicht markiert, sie scheinen den Rezeptor nicht zu exprimieren (Abb. 3.26 A, E). Innerhalb der Speicheldrüse befindet sich α PeaTYR1-Markierung nur in spezifischen Strukturen eines Zelltyps.

Die Stellen der Tyraminausschüttung konnte in ersten Versuchen noch nicht bestimmt werden. Mit hoch konzentrierten Antikörpern gegen Tyramin konnten einige Nervenfasern, die die Acini innervieren, markiert werden. Bei diesen Experimenten wurde das α Tyramin-Serum jedoch 8x höher konzentriert als es bei den Gehirnpräparaten der Fall war. Wegen der Kreuzreaktivität des Serums zu Oktopamin ist dieser Befund aber nur bedingt aussagekräftig.

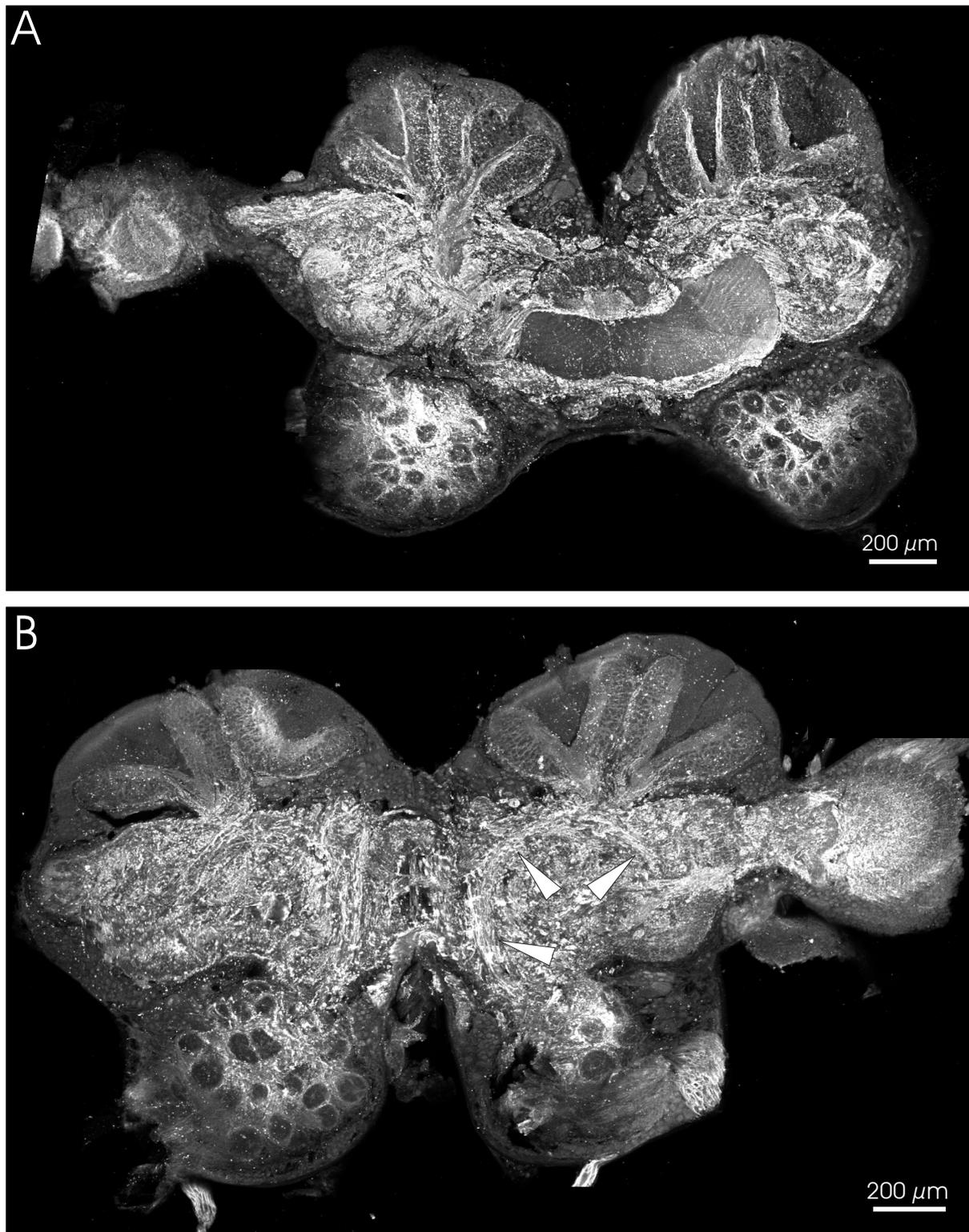


Abb. 3.23: Übersichtsaufnahmen von α PeaTYR1-immunreaktiven Strukturen innerhalb des Schabengehirns. A: Deutlich zu erkennen sind die zentralen Bereiche des Protocerebrums, die Loben des Pilzkörpers sind nur vereinzelt markiert. Die Innenseite der Calices ist deutlich markiert. Der Zentralkörper zeigt eine Markierung sowohl im unteren als auch oberen Teil. B: Der zentrale Bereich der Antennalloben weist eine starke Markierung auf. Gut zu erkennen ist der innere Antenno-Cerebraltrakt (Pfeilspitzen), der vom Antennallobus über die Basis der Calices zum lateralen Protocerebrum zieht.



C: In den optischen Loben ist Markierung in der Lobula, der Medulla und dem ersten optischen Chiasma zu erkennen. Große Teile des zentralen Protocerebrums sind markiert, während die äußere Somarinde frei von Markierung ist.

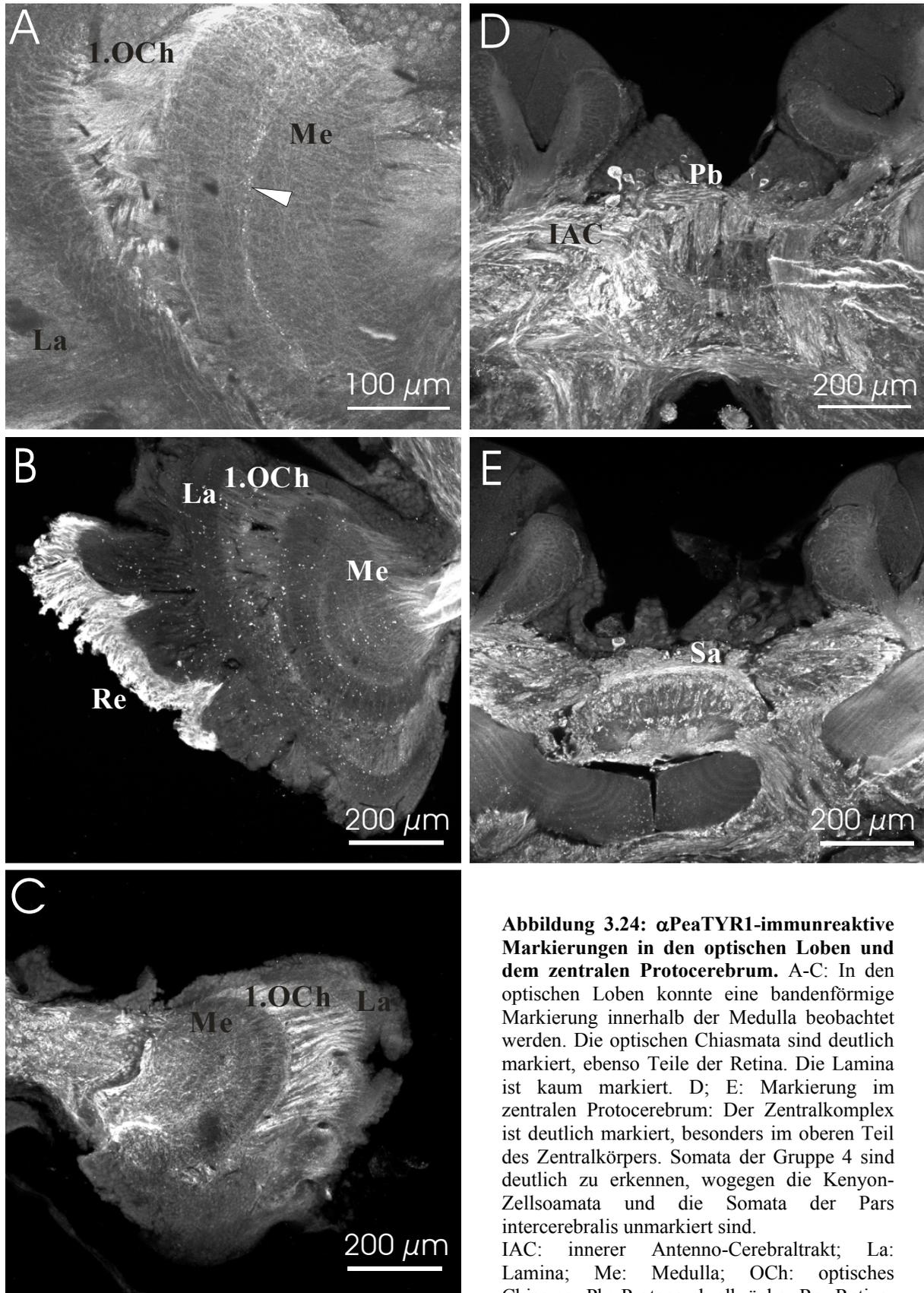


Abbildung 3.24: α PeaTYR1-immunreaktive Markierungen in den optischen Loben und dem zentralen Protocerebrum. A-C: In den optischen Loben konnte eine bandenförmige Markierung innerhalb der Medulla beobachtet werden. Die optischen Chiasmata sind deutlich markiert, ebenso Teile der Retina. Die Lamina ist kaum markiert. D; E: Markierung im zentralen Protocerebrum: Der Zentralkomplex ist deutlich markiert, besonders im oberen Teil des Zentralkörpers. Somata der Gruppe 4 sind deutlich zu erkennen, wogegen die Kenyon-Zelloamata und die Somata der Pars intercerebralis unmarkiert sind. IAC: innerer Antenno-Cerebraltrakt; La: Lamina; Me: Medulla; OCh: optisches Chiasma; Pb: Protocerebralbrücke; Re: Retina; Sa: *superiour arch*.

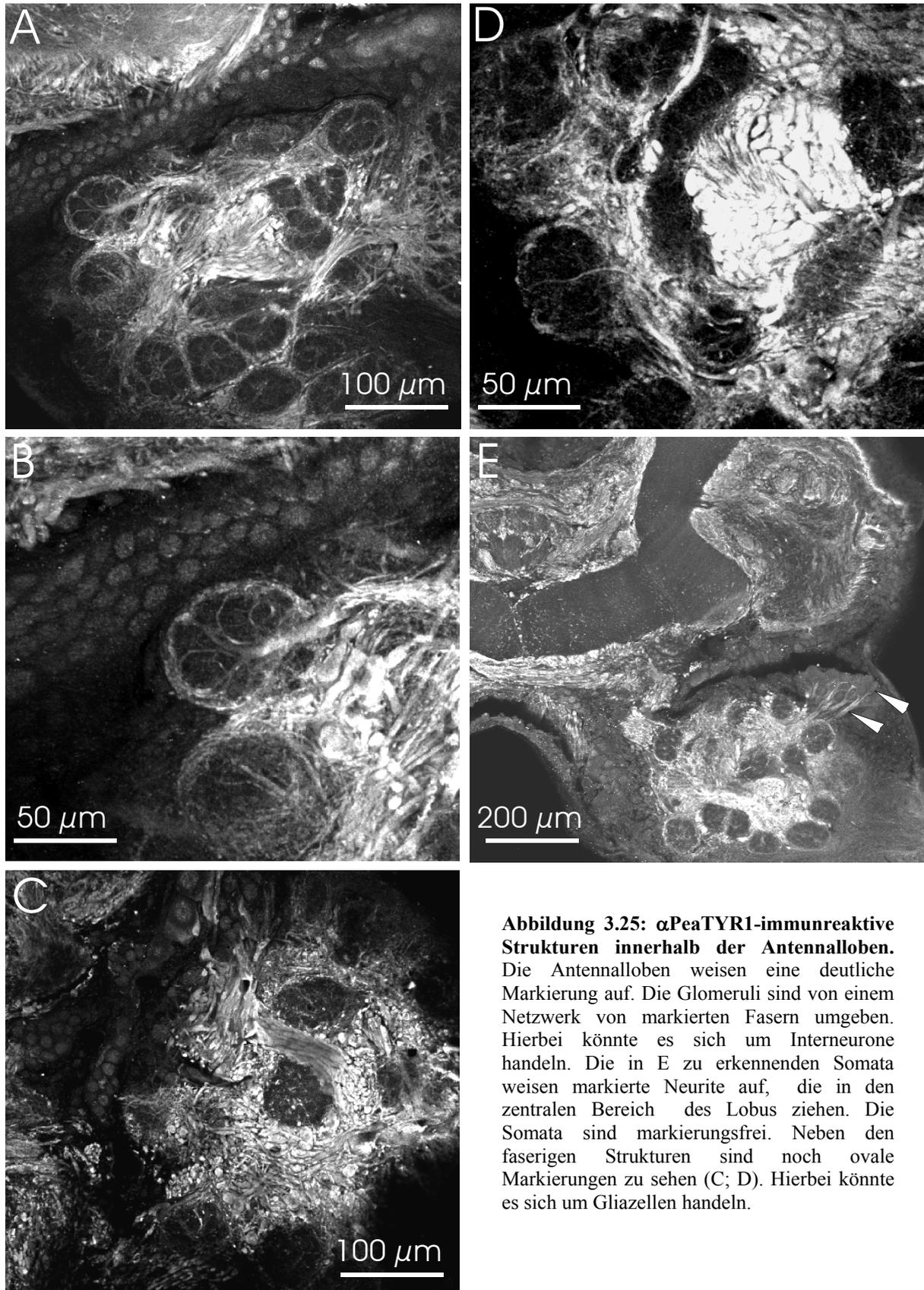


Abbildung 3.25: α PeaTYR1-immunreaktive Strukturen innerhalb der Antennalloben. Die Antennalloben weisen eine deutliche Markierung auf. Die Glomeruli sind von einem Netzwerk von markierten Fasern umgeben. Hierbei könnte es sich um Interneurone handeln. Die in E zu erkennenden Somata weisen markierte Neurite auf, die in den zentralen Bereich des Lobus ziehen. Die Somata sind markierungsfrei. Neben den faserigen Strukturen sind noch ovale Markierungen zu sehen (C; D). Hierbei könnte es sich um Gliazellen handeln.

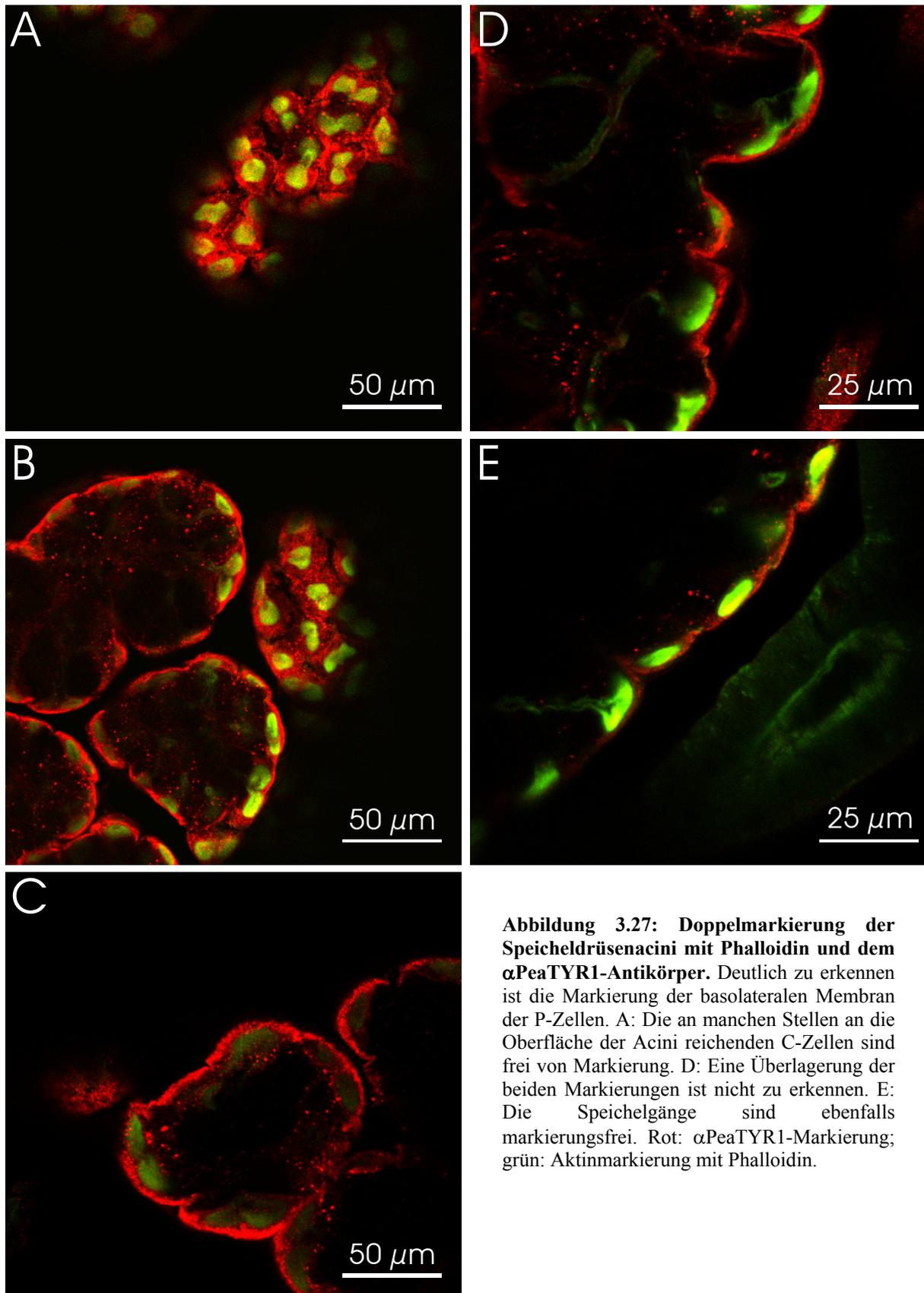


Abbildung 3.27: Doppelmarkierung der Speicheldrüsenacini mit Phalloidin und dem α PeaTYR1-Antikörper. Deutlich zu erkennen ist die Markierung der basolateralen Membran der P-Zellen. A: Die an manchen Stellen an die Oberfläche der Acini reichenden C-Zellen sind frei von Markierung. D: Eine Überlagerung der beiden Markierungen ist nicht zu erkennen. E: Die Speichelgänge sind ebenfalls markierungsfrei. Rot: α PeaTYR1-Markierung; grün: Aktinmarkierung mit Phalloidin.

3.9 Heterologe Expression des PeaTYR1-Rezeptors in HEK293-Zellen

Um den Rezeptor physiologisch weiter charakterisieren zu können, sollte er stabil in HEK293-Zellen exprimiert werden. Hierfür wurde der kodierende Bereich der PeaTYR1-cDNA in einen eukaryotischen Expressionsvektor ligiert und das Konstrukt in die Zellen transfiziert. Der Erfolg der Transfektion konnte mit zwei Antikörpern überprüft werden. Zum einen enthält der Expressionsvektor einen Abschnitt, der ein Hämagglutinin-(HA)Tag an den Rezeptor anhängt. Dieses Epitop kann von einem monoklonalen Antiserum erkannt werden. Zum anderen wurde das selbst gereinigte α PeaTYR1-Antiserum eingesetzt, um PeaTYR1-exprimierende Zellen zu identifizieren. Durch beide Markierungen konnte der Rezeptor in der Plasmamembran transfizierter Zellen lokalisiert werden (Abb. 3.27). Die positiven Zellen wurden im Anschluss vereinzelt und unter Selektionsdruck weiter angezogen. Leider ist es bisher nicht gelungen, auf diesem Wege zu einer Zelllinie zu gelangen, die den PeaTYR1-Rezeptor stabil exprimiert. Aus mehreren Transfektionsansätzen konnte keine einziger Klon abschließend im Westenblot mit dem α HA- oder dem α PeaTYR1-Antikörper bestätigt werden. Für pharmakologische Experimente ist aber eine „stabile Zelllinie“ notwendig. Um zeigen zu können, dass der ligandenaktivierte PeaTYR1-Rezeptor wie bereits charakterisierte Tyraminrezeptoren einen forskolin-induzierten cAMP-Spiegel zu senken vermag, bedarf es einer „stabilen Zelllinie“ (z.B. AmTYR1, Blenau *et al.*, 2000). Nur so kann sichergestellt werden, dass in allen Zellen die cAMP-Konzentration durch Aktivierung einer Phosphodiesterase erniedrigt wird. Zellen, die den Rezeptor nicht exprimieren, würden die cAMP-Bestimmung durch eine zu hohe cAMP-Konzentration zu höheren Werten verfälschen. Die funktionelle und pharmakologische Charakterisierung konnte deshalb bisher nicht durchgeführt werden.

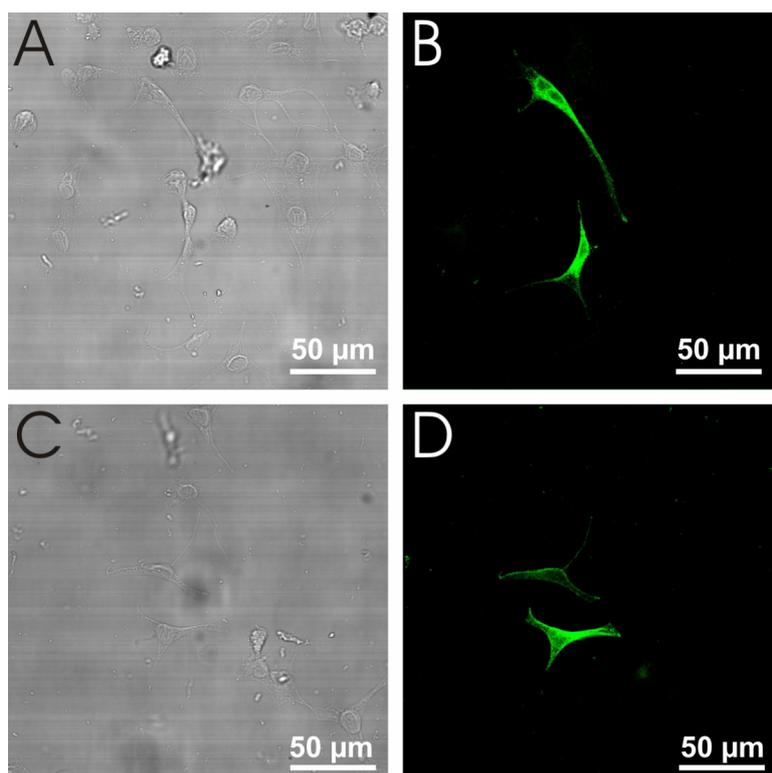


Abb. 3.27: PeaTYR1-transfizierte HEK293-Zellen. A und B zeigen transfizierte Zellen, die mit dem α PeaTYR1-Antikörper markiert worden sind, C und D zeigen Zellen derselben Transfektion, die mit einem α HA-Antikörper markiert wurden. Beide Markierungen zeigen, dass der Rezeptor auf der Plasmamembran der Zelle lokalisiert ist.

Kapitel 4:

Diskussion

4.1 GPCRs

Zu den auf der Zelloberfläche anzutreffenden Proteinen gehört die Gruppe der G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCRs). Diese Rezeptoren sind Mitglieder der größten und divergentesten Gruppe von Membranproteinen. Sie ermöglichen die Wahrnehmung extrazellulärer Signale (z.B. visuelle, olfaktorische oder gustatorische Signale), die durch sie in die Zelle übertragen werden. Die Signale können durch physiologische Veränderungen der Zielzelle zu einer Vielzahl von Antwortmustern führen. Der Übertragungsmechanismus eines extrazellulären Signals in eine intrazelluläre Antwort bleibt jedoch bei vielen GPCRs gleich: Die Bindung eines für den jeweiligen Rezeptor spezifischen Liganden führt zu einer intramolekularen Konformationsänderung des Rezeptors. Diese aktiviert intrazelluläre heterotrimere G-Proteine, welche ihrerseits weitere Effektorproteine aktivieren. Seit einiger Zeit werden alternative Signalwege für GPCRs diskutiert, die unabhängig von G-Proteinen das Signal in die Zelle transduzieren können (Heuss und Gerber, 2000; Brzostowski und Kimmel, 2001; 2006). So kann in *Dictyostelium* die Kinaseaktivität von ERC2 direkt durch einen cAMP-Rezeptor beeinflusst werden.

Diese Arbeit befasst sich mit zwei neu identifizierten Rezeptoren, einem putativen Tyraminrezeptor und einem putativen Dopaminrezeptor aus *Periplaneta americana*. Die Zuweisung eines Liganden konnte experimentell (noch) nicht durchgeführt werden, die Bezeichnungen sind aufgrund von Sequenzübereinstimmungen zu bereits charakterisierten Rezeptoren gewählt worden. Der Tyraminrezeptor ist in soweit interessant, weil Tyramin lange als eher unbedeutende Vorstufe des Oktopamins galt. In einem letzten Syntheseschritt wird das Tyramin durch die Tyramin- β -Hydroxylase (T β H) zu Oktopamin umgesetzt. Eine stetig wachsende Zahl von identifizierten/ charakterisierten Rezeptoren aus verschiedenen Arthropoden und Nematoden mit hoher Affinität zu Tyramin deutet letztlich auf eine physiologische Funktion des Tyramins in diesen Tieren hin. So sind u.a. Tyraminrezeptoren aus der Honigbiene (*Apis mellifera*), der Wanderheuschrecke (*Locusta migratoria*), dem Seidenspinner (*Bombyx mori*), der Fruchtfliege (*Drosophila melanogaster*) und dem japanischen Schwalbenschwanz (*Papilio xuthus*), aber auch aus Fadenwürmern (*Caenorhabditis elegans*) bekannt (Blenau *et al.*, 2000; Vanden Broeck *et al.*, 1995; Ohta *et al.*, 2003; Saudou *et al.*, 1990; Cazzamali *et al.*, 2005; Srivastava *et al.*, 2005; Ono und

Yoshikawa, 2004; Rex und Komuniecki, 2002). Eine Reihe von jüngeren physiologischen und Verhaltensarbeiten bestätigen diese Beobachtungen.

Die Signalwege des Dopamins sind von immenser medizinischer Bedeutung. Eine Fehlregulierung der Transduktion kann zu schwerwiegenden Krankheiten wie Morbus Parkinson oder Schizophrenie führen. Auch bei Invertebraten ist die dopaminabhängige Signaltransduktion ein oft untersuchtes Thema, weswegen auch deutlich mehr Dopaminrezeptoren bereits beschrieben worden sind (z.B. AmDop1-3, DmDopR1, DmD2R, DmDopR2; Blenau *et al.*, 1998; Humphries *et al.*, 2003; Beggs *et al.*, 2005; Hearn *et al.*, 2002; Gotzes *et al.*, 1994; Feng *et al.*, 1996).

4.2 Die Eigenschaften der Aminosäuresequenzen

GPCRs zeigen eine charakteristische heptahelikale Struktur. Die sieben Transmembranhelices sind über drei extrazelluläre und drei intrazelluläre Peptidschleifen miteinander verbunden. Der N-Terminus des Proteins liegt extrazellulär, der C-Terminus auf der intrazellulären Seite der Zytoplasmamembran (Strader *et al.*, 1995). Das Hydropathieprofil des PeaTYR1- und des PeaDOP2-Rezeptors deuten diese Struktur an, die Anwendung des TMHMM-Algorithmus sagt zudem einen extrazellulär gelegenen N- und einen intrazellulär gelegenen C-Terminus für die beiden Rezeptoren voraus (Abb. 3.3; 3.9). Eine genaue Aufklärung der Tertiärstruktur der Rezeptoren würde allerdings eine röntgenkristallographische Strukturaufklärung erfordern, wie es z.B. für das Rhodopsin erfolgt ist (Palczewski *et al.*, 2000). Eine Strukturaufklärung durch Kernspinnresonanz-Spektroskopie (NMR) ist inzwischen bis zu einer Masse von 900 kDa beschrieben worden, ist aber auf zytoplasmatische Proteine beschränkt (Fiaux *et al.*, 2002).

4.3 Die ligandenspezifische Bindungstasche

Aminrezeptoren binden ihren spezifischen Liganden in einer Bindungstasche, die von den Transmembrandomänen III, V und VI gebildet wird. Innerhalb dieser Domänen gibt es stark konservierte Aminosäurereste, die charakteristisch für die Bindung von biogenen Aminen sind. Über ionische Wechselwirkungen bindet ein Aspartatrest der TM III die protonierte Aminogruppe des Amins. Ein Phenylalanin-Rest der TM VI kann den Liganden über hydrophobe Wechselwirkungen mit dem aromatischen Teil des Amins binden, während

Serinreste in der TM V Wasserstoffbrückenbindungen zu den Hydroxylgruppen des Amins ausbilden können (Probst *et al.*, 1992; Strader *et al.*, 1995).

Diese Aminosäurereste konnten auch bei den in dieser Arbeit beschriebenen Rezeptoren PeaTYR1 und PeaDOP2 identifiziert werden: D₁₁₅, S₂₀₃ und F₃₇₇ bei PeaTYR1; D₁₅₁, S₂₃₉ und F₄₀₁ bei PeaDOP2 (Abb. 3.5 und 3.10). Das Nummerierungssystem von Ballesteros und Weinstein (1995) weist den Aminosäureresten in beiden Rezeptoren die Positionen D_{3,33}, S_{5,46} und F_{6,44} zu. Bei dieser Nummerierung wird der Aminosäure mit der stärksten Konservierung in den einzelnen Transmembrandomänen der Wert 50 gegeben, alle weiteren werden von dort in Richtung N-Terminus kleiner werdend abgezählt.

4.4 Das „DRY“-Motiv

Bindung eines aktivierenden Liganden an einen GPCR führt bei diesem zu einer Konformationsänderung. Im Ruhezustand miteinander wechselwirkende Bereiche der Transmembrandomänen III und VI bewegen sich nach Aktivierung voneinander weg. Dies konnte durch spektroskopische Untersuchungen an β_2 -adrenergen Rezeptoren und am Rhodopsin gezeigt werden (Farrens *et al.*, 1996; Gether *et al.*, 1997). Das hoch konservierte „DRY“-Motiv am Ende der TM III vermittelt diesen Vorgang. Eine Protonierung des Asparaginrestes führt zu einer Unterbrechung der Wechselwirkung zu Aminosäureresten der TM VI (*ionic lock*). Dies führt zu einer Konformationsänderung der G-Protein bindenden Bereiche der TM II und III und aktiviert das zugehörige G-Protein (Gether *et al.*, 1997; Gether und Kobilka, 1998). Mutationsexperimente haben gezeigt, dass der Aspartatrest eine wichtige Rolle bei der Regulierung der Rezeptoraktivität hat. Mutationen dieses Restes bei Rhodopsin, dem β_2 -adrenergen und dem M1-muskarinischen Rezeptor führen zu einer konstitutiven Aktivität des Rezeptors (Cohen *et al.*, 1993; Rasmussen *et al.*, 1999; Lu *et al.*, 1997). Die TM III und VI werden nicht mehr durch die ionischen Wechselwirkungen zusammengehalten, die G-Protein aktivierenden Abschnitte der TM II und III können unreguliert wirken. Wichtig für einen funktionellen Rezeptor ist daher ein saurer Aminosäurerest innerhalb des DRY-Motivs, da nur dieser die Aktivität des Rezeptors effizient regulieren kann (Ballesteros *et al.*, 2001). Scheer *et al.* (1996) konnten durch einen Austausch des Aspartatrestes mit einem Argininrest deutlich den Effekt der sauren Seitenkette belegen. Die Mutante wies eine hohe konstitutive Aktivität auf. Bei dem 5-HT₇-Rezeptor der Biene liegt das DRY-Motiv in Form von DRF vor. Dieser Austausch eines polare gegen einen

hydrophoben Aminosäurerest wird als möglicher Grund für die gemessene konstitutive Aktivität des Rezeptors diskutiert (Schlenstedt *et al.*, 2006; Clark *et al.*, 2004).

Die in dieser Arbeit beschriebenen Rezeptoren PeaTYR1 und PeaDOP2 weisen beide ein vollständiges DRY-Motiv auf (D_{3,50}RY bzw. PeaTYR1: D₁₃₂RY; PeaDOP2: D₁₆₈RY), weshalb vermutet werden kann, dass diese beiden Rezeptoren keine konstitutive Aktivität zeigen. Der experimentelle Beweis steht allerdings noch aus.

4.5 Das „NPxxY“-Motiv

Dieses in den meisten Aminrezeptoren konservierte Motiv in der TM VII ist in den in dieser Arbeit beschriebenen Rezeptoren der Schabe PeaTYR1 und PeaDOP2 ebenfalls enthalten (N_{7,49}PxxY bzw. PeaTYR1: NP₄₁₈xxY; PeaDOP2: N₄₅₃PxxY). Barak *et al.* (1994, 1995) konnten zeigen, dass dieses Motiv notwendig für die Resensitisierung des Rezeptors nach Wegnahme des Agonisten ist. Eine Mutation des Tyrosinrestes des Motivs bei dem β_2 -adrenergen Rezeptor führte dazu, dass der Rezeptor nicht mehr internalisiert wurde, nach dem der Agonist gebunden hatte. Nicht beeinflusst hierbei waren die Kopplung des G-Proteins, die schnelle Desensitisierung oder die Verringerung der Genexpression auf Antwort auf den Agonisten. Einzig die Resensitisierung war durch die Mutation gestört. Sealfon *et al.* (1995) erbrachten für Serotoninrezeptoren den Nachweis, dass Aminosäurereste dieses Motivs die TM II und TM VII über Wasserstoffbrückenbindungen miteinander verknüpfen können. Die dadurch entstehende Konformation ist wichtig für eine erfolgreiche Aktivierung der G-Proteine.

Neben den heterotrimeren G-Proteinen konnte gezeigt werden, dass auch monomere G-Proteine wie Rho oder ARF an das Np_{xx}Y-Motiv binden. Durch diese Adapterproteine ist der Rezeptor an weitere Signalwege gekoppelt. So ist z.B. der 5-HT_{2a}-Rezeptor über ARF an den Phospholipase D (PLD)-Signalweg gekoppelt (Hall *et al.*, 1999; Robertson *et al.*, 2003; Mitchell *et al.*, 1998). Mutationen in dem Motiv würden die Wechselwirkungen beeinflussen und die Signalwege möglicherweise unterbrechen. Ob diese Wege der Signaltransduktion bei *Periplaneta* auch besprochen werden, kann nur spekuliert werden.

4.6 N-Glykosylierung

In den extrazellulär gelegenen Bereichen von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren sind häufig eine oder mehrere Konsensusstellen für N-Glykosylierung zu finden. Die Glykosylierungen können für die Faltung und den gerichteten Transport, aber auch für die Ligandenerkennung

wichtig sein (Rands *et al.*, 1990). PeaTYR1 besitzt zwei potentielle N-Glykosylierungsstellen innerhalb des N-Terminus (N₁₂ und N₁₇). PeaDOP2 besitzt vier potentielle N-Glykosylierungsstellen innerhalb des N-Terminus (N₂, N₃₂, N₄₆ und N₅₅). Ob die beiden Rezeptoren *in vivo* tatsächlich glycosyliert vorliegen, ist nicht überprüft worden.

4.7 Inaktivierung durch Phosphorylierung

GPCRs werden durch die Phosphorylierung intrazellulärer Serin/Threonin-Reste der dritten zytoplasmatischen Schleife oder des C-Terminus inaktiviert. Die Phosphorylierung kann durch unterschiedliche Kinasen erfolgen: durch die cAMP aktivierte PKA, die Diacylglycerol und Ca²⁺ aktivierte PKC oder durch G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinasen GRK (Freedman *et al.*, 1995; Raymond, 1991; Lefkowitz, 1998). Die zusätzlichen Phosphorylierungen verhindern eine effiziente Interaktion mit dem zugehörigen G-Protein. Weiter konnte gezeigt werden, dass ein durch GRKs phosphorylierter β_2 -adrenerer Rezeptor β -Arrestin bindet. Neben der sterischen Blockierung der G-Proteine sind die so modifizierten Rezeptoren in der Lage, die Tyrosinkinase Src zu rekrutieren, was zuletzt eine Aktivierung des MAP-Kinase Signalweges bewirkt. GRKs entkoppeln nicht nur die Rezeptoren von den G-Proteinen, vielmehr werden sie an einen alternativen Signalweg angeschlossen (Luttrell *et al.*, 1999, 1996). Für die Gruppe der GRKs ist noch keine eindeutige Konsensussequenz bekannt. Bei dem C-Terminus des β_2 -adreneren Rezeptors wurden sechs Phosphorylierungsstellen für GRK5 und GRK2 identifiziert, in dessen Nähe sich ein diazides Motiv befand (Fredericks *et al.*, 1996).

Die beiden in dieser Arbeit beschriebenen Rezeptoren PeaTYR1 und PeaDOP2 weisen sieben in der ersten und dritten zytoplasmatischen Schleife gelegene bzw. vier in der dritten zytoplasmatischen Schleife gelegene mögliche Phosphorylierungsstellen für die PKC mit der Konsensussequenz [ST]-x-[RK] auf. PeaTYR besitzt eine potentielle Phosphorylierungsstelle durch GRK innerhalb der dritten zytoplasmatischen Schleife (E₂₉₉ES, wobei der Serinrest phosphoryliert werden würde).

Phosphorylierungsstellen für PKA konnten nicht gefunden werden. Ob die Rezeptoren durch die Phosphorylierung tatsächlich von der nachfolgende Signalkaskade ent- oder an andere Signalwege angekoppelt werden, wurde in dieser Arbeit nicht untersucht.

4.8 Phylogenetische Einteilung

Einem Dendrogramm (Abb. 3.6) zufolge bildet PeaTYR1 zusammen mit anderen Tyraminrezeptoren eine eigene Gruppe. Dieser Ast befindet sich in der Nachbarschaft zu den β -adrenerg-ähnlichen OA-Rezeptoren. In einem zweiten Dendrogramm (Abb. 3.7) zusammen mit humanen adrenergen Rezeptoren befindet sich PeaTYR1 in Nachbarschaft zu den β -adrenergen Rezeptoren. Diese Beobachtung steht im Gegensatz zu dem von Evans und Maqueira (2005) aufgestellten Dendrogramm zur neuen Klassifizierung von Oktopaminrezeptoren der Insekten. Sie ordnen die Tyraminrezeptoren in der Nähe der α -adrenerg-ähnlichen OA-Rezeptoren an. Auffällig sind an den Dendrogrammen (Abb. 3.6 und 3.7) kleine *bootstrap values* an den Verzweigungsknoten. *Bootstrapping* ist ein Algorithmus, der zufällig einzelne Basen in der Sequenz austauscht. Diese Varianten werden dann mit einem Ursprungsmodell verglichen. Der Wert ist ein Maß dafür, wie viele der gegebenen Varianten den nur als Vorschlag anzusehenden Baum unterstützen. Sie erlauben keine Aussage darüber, ob der dargestellt Baum richtig oder falsch ist. Gerade bei kleinen Werten besteht die Möglichkeit, dass der jeweilige Ast auch an anderer Stelle hätte entspringen können. Werte <50% tragen kaum noch zu einer sinnvollen Interpretation eines Dendrogrammes bei. Demnach könnte PeaTYR1 in Abb. 3.7 mit einem Wert von 52% zu einer 1:1 Wahrscheinlichkeit auch in einem anderen Ast liegen.

PeaDOP2 bildet mit anderen Dopaminrezeptoren aus Insekten deutlich eine eigene Gruppe, die von Mustard *et al.* (2005) zu den Invertebraten-Typ DA-Rezeptoren (INDRs) zusammengefasst wurden. Sie fallen mit den α -adrenerg-ähnlichen OA-Rezeptoren/ α -adrenergen Rezeptoren zusammen in eine Gruppe und unterscheiden sich deutlich von den D1- und D2-ähnlichen Rezeptoren der Wirbeltiere und Insekten. Die beiden großen Gruppen (D1 und D2) der Wirbeltiere haben einen unabhängigen evolutionären Ursprung, sie weisen unterschiedliche Strukturen auf und interagieren mit jeweils anderen regulatorischen Partnern (Callier *et al.*, 2003). Da PeaDOP2 sehr große Unterschiede zu D1- und D2-Rezeptoren aufweist, kann man davon ausgehen, dass auch dieser Rezeptor einen anderen Ursprung hat. Es ist wahrscheinlich, dass sich die INDRs und die α -adrenerg-ähnlichen OA-Rezeptoren einen gemeinsamen Vorfahren haben. Durch Punktmutationen könnte der jeweiligen Rezeptors so verändert worden sein, dass die zweite Hydroxylgruppe (2; 3' bei Dopamin; β ; 3' bei Oktopamin) durch die Aminosäurereste der mutierten Bindungstasche gebunden werden könnte. Hauser *et al.* (2006) bezeichnet dieses Phänomen als *ligand-hop*. Durch Genduplizierungen traten neue Rezeptoren auf, deren Bindungstaschen sich leicht voneinander unterscheiden konnten. Allerdings stand den neuen Rezeptoren nur das relativ

begrenzte Repertoire der biogenen Amine zur Verfügung. So wurden die gleichen Liganden an unterschiedliche Rezeptorengruppen „ausgeliehen“. Hauser datiert den gemeinsamen Vorfahren anhand von Serotonin- und Dopaminrezeptoren von *Apis* und *Drosophila* auf vor 350 Millionen Jahren. Zu diesem Zeitpunkt trennten sich die Dipteren und Hymenopteren voneinander. Die in dieser Arbeit gewonnenen Daten über einen Dopaminrezeptor aus *Periplaneta* lassen die Annahme zu, dass der gemeinsame Vorfahre noch älter ist. Hemimetabole Insekten wie die Schaben sind ein ursprünglicherer Familie innerhalb der Klasse der Insekten.

4.9 Expressionsmuster der Rezeptoren PeaTYR1 und PeaDOP2

Die Expression der beiden Rezeptorgene *Peatyr1* und *Peadop2* der Schabe wurde mittels RT-PCR untersucht. Die RT-PCR Experimente ergaben, dass die beiden Rezeptoren in allen untersuchten Geweben nachweisbar waren. Die entsprechenden Fragmente der CPL 3 konnten mit jeweils für den einzelnen Rezeptor spezifischen Primern aus identischen RNA-Präparationen amplifiziert werden (Abb. 3.12). Beide Rezeptoren weisen eine deutlich Expression im Gehirn auf, was auf eine Rolle bei Prozessen im zentralen Nervensystem hindeutet. Während das *Peatyr1*-Transkript mehr oder weniger gleichmäßig in den weiteren untersuchten Geweben (Speicheldrüse, Mitteldarm, Malpighische Gefäße und Flugmuskel) verteilt zu sein scheint, ist das *Peadop2*-Transkript nur noch in den Speicheldrüsen stärker exprimiert. Bei den Speicheldrüsen der Schabe ist bekannt, dass Dopamin die Sekretionsrate von proteinfreiem Speichel steigern kann (Just und Walz, 1996; Walz *et al.*, 2006). Dies lässt auf die Gegenwart eines oder mehrerer Dopaminrezeptoren schließen. Ein physiologischer Effekt von Tyramin auf das Sekretionsgeschehen bei der Speicheldrüse konnte bisher noch nicht gezeigt werden. Die vergleichsweise starke Expression von *Peatyr1* in den Speicheldrüsen lässt allerdings auf eine noch unbekannt Funktion des Tyramins schließen.

Für andere Insekten konnte eine hohe Expression eines Tyraminrezeptors innerhalb des Zentralnervensystems durch Northern-Blot-Analysen oder RT-PCR ebenfalls nachgewiesen werden (*Locusta migratoria*: Vanden Broeck *et al.*, 1995; Molaei *et al.*, 2005; *Drosophila melanogaster*: Saudou *et al.*, 1990; Cazzamali *et al.*, 2005). Außerhalb des Zentralnervensystems sind für Tyramin verschiedene physiologische Funktionen beschrieben worden: Tyramin ist in der Lage, die kontraktile Eigenschaften der Ovidukt Muskulatur von *Locusta* zu modulieren (Donini und Lange, 2004). In den Malpighischen Gefäßen von

Drosophila steigert Tyramin die Harnsekretion durch eine Erhöhung der Chloridleitfähigkeit (Blumenthal, 2003). In beiden Fällen muss ein Tyraminrezeptor postuliert werden, der ein Signal in die Zelle transduziert.

Bei Insekten wurden verschiedene Verhalten beschrieben, die von Dopamin beeinflusst werden. Das Paarungsverhalten wird von Dopamin beeinflusst (Neckameyer, 1998). Dopamin ist des Weiteren bei aversivem Verhalten gegenüber visuell oder olfaktorisch erlernten Reizen beteiligt (Unoki *et al.*, 2005, 2006). Außerdem ist Dopamin ein wichtiger Neurotransmitter und -modulator bei Bienen, der die olfaktorische Reizaufnahme moduliert und die Erinnerung bzw. Abrufbarkeit des Gelernten beeinflusst (Mercer und Erber, 1983; Mercer und Menzel, 1982). All diese Verhaltensmuster setzen einen oder mehrere Dopaminrezeptoren im Zentralnervensystem voraus.

In Säugetieren zeigt sich ebenfalls eine weite Verbreitung von Dopaminrezeptoren. Die fünf Rezeptorsubtypen konnten hauptsächlich in verschiedenen Teilen des Gehirns aber auch in nicht-neuronalen Geweben z.B. auf glatter Muskulatur in der Niere und Mesenterialgefäßen nachgewiesen werden (Jackson und Westlind-Danielsson, 1994).

Für eine Reihe von Aminrezeptoren von Insekten ist die Verteilung der Transkripte an Gehirnschnitten durch *in situ*-Hybridisierung untersucht worden (z. B. aus der Biene AmDOP1, Blenau *et al.*, 1998; AmDOP2, Humphries *et al.*, 2003; AmDOP3, Beggs *et al.*, 2005; AmTYR1, Blenau *et al.*, 2000; AmOA1, Grohmann *et al.*, 2003). Die Verteilung der Markierung dieser Hybridisierungsexperimente fiel relativ einheitlich aus. Die Somata der intrinsischen Pilzkörperneurone, der Kenyon-Zellen, waren deutlich gefärbt. Die lateral der Pilzkörper gelegene Somarinde war ebenfalls gefärbt. An den Antennalloben zeigten die äußeren Somaschichten gut sichtbare Markierung. In den optischen Loben waren meist auch nur die Somata der Neurone gefärbt, wobei sich die Markierung bis in die Bereich zwischen den optischen Neuropilen hineinerstreckte. Eigene, an Schabengehirnen durchgeführte *in situ*-Hybridisierungsexperimente erbrachten allerdings keine auswertbare Daten. Ob die Verteilung der Transkripte von *Peatyr1* und *Peadop2* ähnlich auftreten würden, kann an dieser Stelle nur spekuliert werden. Aufschluss über die Verteilung von zumindest *PeaTYR1* auf der Proteinebene konnte allerdings durch den Einsatz des α PeaTYR1-CPL3-Antikörpers gewonnen werden.

4.10 Nachweis des PeaTYR1-Rezeptorproteins

Übereinstimmend mit den Ergebnissen der RT-PCR konnte das PeaTYR1-Rezeptorprotein im Homogenat des gesamten Gehirns der Schabe mit dem spezifischen α PeaTYR1-CPL3-Antikörper im Western-Blot nachgewiesen werden (Abb. 3.16). Auf dem Blot waren mehrere Banden im Massebereich von 48 – 66 kDa zu erkennen. Diese Banden könnten auf eine relativ hohe Kreuzreaktivität zu anderen Proteinen aus dem Schabengehirn zurückzuführen sein. Farooqui *et al.* (2004) berufen sich bei einer ähnlichen Blot-Analyse von AmOA1 auf das Vorhandensein verschiedener Subtypen oder Splicevarianten des Rezeptors Hearn *et al.* (2002) konnten Splicevarianten bei *Drosophila* tatsächlich nachweisen. Auch andere posttranslationale Modifikationen sind möglich. Hierzu gehören Phosphorylierung, Glykosylierung, Acetylierung, Methylierung und Ubiquitin-Bindung (Mann und Jensen, 2003).

Bei PeaTYR1 konnten zwei Konsensusstellen für mögliche N-Glykosylierungen und sieben Konsensusstellen für Phosphorylierungen durch PKC und GRKs identifiziert werden. Glykosylierungen von Membranproteinen können bis zu 50% der Molekularmasse des Proteins ausmachen (Stephens *et al.*, 2004). Leichtere Proteine könnten durch Splicevarianten oder Trunkierungen innerhalb des N-Terminus oder der CPL3 erklärt werden. Für den Tyraminrezeptor der Heuschrecke *Schistocerca gregaria* werden mehrere Subtypen diskutiert (Vanden Broeck *et al.*, 1995; Molaei *et al.*, 2005). Es wäre also auch möglich, dass auch in der Schabe verschieden Subtypen eines Rezeptors vorkommen.

4.11 Tyramin-ähnliche und PeaTYR1-ähnliche Immunreaktivität im Gehirn und der Speicheldrüse der Schabe

Rezeptorähnliche Immunreaktivität konnte fast im gesamten Gehirn der Schabe durch das α PeaTYR1-CPL3-Antiserum nachgewiesen werden. Einzig die Somata z.B. der Kenyon-Zellen innerhalb der Calices oder innerhalb der Somarinde der optischen Loben sind frei von Markierung. *In situ*-Hybridisierungsexperimente für andere Tyraminrezeptoren (z.B. AmTYR1, Blenau *et al.*, 2000) zeigten, dass das Gen des Rezeptors in den Kenyon-Zellen und anderen Somaschichten transkribiert wird. Unter der Annahme, dass dies auch für PeaTYR1 der Fall ist, ist das translatierte Protein in den Neuronen nicht in der Zellmembran der Somata, aber in den Dendriten und Axonen lokalisiert. Tyramin konnte innerhalb des Gehirns ebenfalls mit einem Antikörper in einzelnen Zellen detektiert werden. Wegen der Kreuzreaktivität des Serums zu Oktopamin kann nicht eindeutig ausgeschlossen werden, dass die markierten Zellen statt Tyramin Oktopamin enthalten. Tyramin ist die direkte Vorstufe in

der Synthese des Oktopamins. Je nach Umsatzrate des letzten Hydroxylierungsschrittes durch T β H kann es also möglich sein, dass oktopaminerge Zellpopulationen zu einem bestimmten Teil Tyramin enthalten können. Für einzelne identifizierte Zellen der Gruppe 3 von *Locusta* z.B. wurde ein Oktopamingehalt von 25 pg/Zelle durch Gaschromatographie-Massenspektroskopie-Untersuchungen ermittelt (Stern *et al.*, 1995). Zellen der Gruppe 3 bei *Periplaneta* sind ebenfalls mit einem α Oktopamin Antikörper als oktopaminerg beschrieben worden (Sinakevitch *et al.*, 2005). Bei der angegebenen Kreuzreaktivität des Antiserums von 1/830, d.h. bei einem 830x Überschuss von Oktopamin könnte es zu einer falsch positiven Markierung kommen. Eine eindeutige Identifizierung tyraminerner Neurone könnte durch chromatographische Untersuchungen oder durch eine Doppelmarkierung mit einem α T β H Antikörper, welche in oktopaminergen aber nicht in tyraminergen Neuronen vorkommen sollte, erfolgen. Allerdings ist auch denkbar, dass die einzelnen Neurone mehr als nur einen Transmitter enthalten können. Bei *Schistocerca* konnte gezeigt werden, dass einzelne Neurone zwei verschiedene Transmitter enthalten können. *Salivary Neuron 1* (SN1) enthält neben Serotonin noch Dopamin, in *Salivary Neuron 2* (SN2) wurden Serotonin und GABA nachgewiesen (Baines *et al.*, 1989; Watkins und Burrows, 1989; Diplomarbeit J. Witte, AG Walz).

Die großflächige Verteilung der Markierung durch den α PeaTYR1-CPL3 Antikörper in den verschiedenen Neuropilen des Gehirns lässt die Annahme zu, dass Tyramin an verschiedenen Prozessen innerhalb des zentralen Nervensystems beteiligt ist.

In den optischen Loben ist Immunreaktivität sowohl von Tyramin als auch von PeaTYR1 zu erkennen. Tyramin scheint an der Verarbeitung visueller Reizinformationen beteiligt zu sein. Die Quellen des Tyramins könnten vereinzelte Neurone in der Somarinde, eine Gruppe von Zellen zwischen der Lobula und der Medulla, oder Neurone der Gruppe 3 sein. Für einige Zellen der Gruppe 3 konnte bei *Schistocerca* gezeigt werden, dass sie modulatorisch durch Ausschüttung von Oktopamin auf andere Neurone des visuellen Systems wirken können. Die Protocerebral-Medulla 4a/b-Neurone (PM4) projizieren vom medialen Deutocerebrum in die optischen Loben und verzweigen innerhalb der Medulla/ Lobula. Extrazelluläre Ableitungen der PM4 zeigten, dass Aktionspotentiale, die von Änderungen der Belichtung des Auges oder mechanische Stimulierung der ipsilateralen Antenne ausgelöst wurden, in die optischen Loben laufen. Dort verzweigt ebenfalls der *lobula giant movement detector* (LGMD). Dieses Neuron überträgt Bewegungssignale auf den *descending contralateral movement detector* (DCMD), welcher zum Thorakalganglion weiterleitet. Der LGMD habituiert im Laufe der Reizung, das vom DCMD ableitbare Signal wird schwächer. Dieser Effekt konnte aber durch Ausschüttung

von Oktopamin aus PM4 abgeschwächt werden (Bacon *et al.*, 1995; Stern *et al.*, 1995). Für Tyramin ist allerdings noch kein Effekt auf ähnliche Prozesse in den optischen Loben beschrieben worden. Im 1. optischen Chiasma liegt deutlich Markierung vor. Denkbar wäre daher eine präsynaptische Modulation der Signalleitung von den Photorezeptoren R7 und R8. In der Medulla ist eine tangential verlaufende Schicht deutlich PeaTYR1-CPL3-markiert. Hier könnte die Zusammenfassung des säulenartig verlaufenden Informationsflusses durch Tyramin beeinflusst werden. Da Tyramin und Oktopamin oft gegensätzliche Effekte zeigen, könnte die Hypothese aufgestellt werden, Tyramin könne die Habituation des optischen Systems erleichtern. Dies wäre allerdings experimentell noch zu bestätigen.

Die Pilzkörper weisen im Bereich der Calices sowohl α Tyramin- und α PeaTYR1-CPL3-Immunreaktivität auf. Die α Tyramin-Markierung ist gleichmäßig über den Calyx verteilt, ähnlich einer α Oktopamin-Markierung (Sinakevitch *et al.*, 2005). Die Quelle des Tyramins ist nicht eindeutig zu bestimmen, es handelt sich aber um extrinsische Neurone, die in den Kelchen ihre axonalen Verzweigungen haben. Da die Kenyon-Zellsomata frei von Markierung sind, können sie als Ursprung des Tyramins ausgeschlossen werden. Eine ungleiche Verteilung in den drei Bereichen Lippe, Kragen und basaler Ring, wie sie für Oktopamin und Tyramin bei der Biene beschrieben wurden (Kreissl *et al.*, 1994, Franz, 2006, unveröffentlicht) konnte in der Schabe so nicht beobachtet werden. Bei der Biene lagen die beiden Amine verstärkt im basalen Ring vor und wurden dort im Zusammenhang mit der Verarbeitung mechanosensorischer und gustatorischer Signale in Zusammenhang gebracht (Gronenberg, 2001). PeaTYR1 konnte hauptsächlich an der Innenseite der Kelche detektiert werden, im Bereich der Dendriten der Kenyon-Zellen. Deren elektrische Leiteigenschaften könnten durch Tyramin modulatorisch beeinflusst werden. Die Pedunculi und Loben der Pilzkörper weisen nur schwache Markierungen auf. In den Loben findet eine neuronale Verschaltung auf weitere efferente bzw. *feedback*-Neurone, aber auch auf protocerebrale afferente Neuronen statt. Bei diesen Prozessen scheint Tyramin aber nicht beteiligt zu sein. Die Anwesenheit der beiden Markierungen in den Pilzkörpern legt nahe, dass Tyramin eine Rolle bei integrativen Prozessen, die hier stattfinden, spielen könnte. Insekten, die einen ausgeprägten olfaktorischen Sinn wie die Biene oder auch die Schabe besitzen, haben meist einen ausgeprägten Pilzkörper. Wird die embryonale Morphogenese der Pilzkörper bei Bienen durch Hydroxy-Harnstoff gestört, so kommt es zu schweren Defiziten bei olfaktorischen Lernprozessen (Komischke *et al.*, 2005). Auch für die Ausbildung eines Ortsgedächtnisses sind intakte paarige Pilzkörper eine wichtige Voraussetzung (Mitsunami *et al.*, 1998). Kürzlich wurde ein Lernparadigma für Schaben entwickelt (Kwon *et al.*, 2004; Lent und

Kwon, 2004). Ein unkonditionierender Reiz (US), eine grüne LED, wird mit einem konditionierenden Reiz (CS), einem Duft, gepaart. Die Antennenbewegung hin zu der Duftquelle/ LED als Antwort, die *antennal projection response* (APR), kann präzise quantifiziert werden. In so konditionierten Tieren war es möglich, einzelne Gene zu identifizieren, die an der Gedächtniskonsolidierung beteiligt waren (Pintér *et al.*, 2005). Diese Kombination aus Lernprozessen und optisch-/olfaktorischer Wahrnehmung macht Tyramin zu einem interessanten Kandidaten für weitere Experimente in diese Richtung.

Im Zentralkörper konnte sowohl α Tyramin- als auch α PeaTYR1-Markierung beobachtet werden. Im oberen Teil konnte die achtfach-geteilte Säulenstruktur mit beiden Antikörpern sichtbar gemacht werden (Homborg, 1987). Das Tyramin entstammt Neuronen der Gruppe 4. Diese verzweigen innerhalb des oberen und unteren Teils des Zentralkörpers. Ob sich die α PeaTYR1-Markierung auf denselben Neuronen oder auf benachbarten Neurone befindet konnte nicht eindeutig unterschieden werden. Es ist unklar, ob das Tyramin präsynaptisch auf die ausschüttenden Neurone oder postsynaptisch auf nachfolgende Neurone wirkt. Durch Untersuchungen an *Drosophila*-Mutanten konnte der Zentralkomplex (d.h. die Protocerebralbrücke, der oberer und unterer Teil des Zentralkörpers und die Noduli) als wichtiges Zentrum für die Regulation komplexer motorischer Verhaltensmuster wie Laufen oder Fliegen identifiziert werden (Strauss und Heisenberg, 1993; Varnam *et al.*, 1996). Für die kolumnaren Zellen in *Schistocerca* konnte gezeigt werden, dass sie sensitiv auf polarisiertes Licht reagieren (Vitzthum *et al.*, 2002). Es ist daher denkbar, dass Tyramin einen Einfluss auf motorische Verhaltensmuster bzw. optische Wahrnehmung haben könnte. Saraswati *et al.* (2004) konnte zeigen, dass Tyramin einen Einfluss auf die Bewegungsmuster von *Drosophila*-Larven hat. Dass dieser Effekt über den Zentralkomplex vermittelt wird, ist eher unwahrscheinlich, da dieser bei holometabolen Insekten zu diesem Zeitpunkt noch nicht entwickelt ist (Milde, 2003).

Die Antennalloben sind weitgehend frei von α Tyramin-Markierung. Dies steht im Gegensatz zu der deutlichen α PeaTYR1-Markierung, die die Glomeruli umgibt. Neben den primären Sinnesneuronen bestehen die Glomeruli aus Interneuronen, die die einzelnen Glomeruli umgeben und miteinander verbinden und Projektionsneuronen. Welche von diesen Neuronen den Rezeptor auf der Membran tragen, konnte nicht unterschieden werden. Die Projektionsneurone verlaufen vom Antennallobus u.a. über den inneren Antennocerebraletrakt zu den Calices der Pilzkörper bis ins laterale Protocerebrum (Abel *et al.*, 2001; Boeckh *et al.*, 1984). Die Weiterleitung über die Projektionsneurone scheint der Färbung nach durch Tyramin modifizierbar zu sein. Sinakevitch *et al.* (2005) konnten für Oktopamin eine

andere Beobachtung machten: Aus Neuronen der Gruppe 3 und maxillaren DUM-Neuronen erhalten die Glomeruli oktopaminerge Innervation. Solch ein Muster konnte für Tyramin nicht beobachtet werden. Denkbar ist, dass Tyramin aus entfernteren Quellen bis zu den Glomeruli diffundiert, oder aber dass ein anderer Ligand an PeaTYR1 binden und eine andere Signalkaskade auslösen kann (Robb *et al.*, 1994). Insgesamt scheint Tyramin nicht primär an der olfaktorischen Wahrnehmung beteiligt zusein, da kein Tyramin in der Nähe der sensorischen Neurone nachweisbar ist. Im Verlauf der neuronalen Weiterleitung könnte Tyramin allerdings wieder eine modulatorische Rolle spielen.

In der Speicheldrüse von *Periplaneta* konnte α PeaTYR1-Immunreaktivität auf der basolateralen Membran der paarigen P-Zellen in den Acini der Speicheldrüse beobachtet werden. P-Zellen werden durch Dopamin zur Sekretion eines proteinfreien Speichels veranlasst (Just und Walz, 1996). Natriumionen werden durch einen Natrium-Kalium-Austauscher in der Apikalmembran der P-Zellen ins Lumen der Acini gebracht, Wasser folgt passiv nach (Gupta und Hall, 1983). Der Primärspeichel wird während der Passage durch den Acinus und die Speichelgänge von den C-Zellen und Gangzellen modifiziert. Die C-Zellen können nach einem Serotonin-Stimulus Membranvesikel in den Primärspeichel entleeren und den Speichel durch zusätzliche Proteine modifizieren. Durch die Gangzellen werden Natriumionen wieder aus dem Speichel entfernt, sodass ein hypoosmotischer Speichel entsteht (Review zur Speicheldrüse von *Periplaneta*: Walz *et al.*, 2006). Die Anwesenheit eines Tyraminrezeptors in auf den P-Zellen könnte ein Indiz für eine physiologische Funktion von Tyramin bei der Speichelsekretion bedeuten. Diese konnte allerdings noch nicht identifiziert werden. Weder bei Sekretionsmessungen noch bei Messungen des transepithelialen Potentials konnte bisher ein Effekt von Tyramin gezeigt werden (unveröffentlichte Daten der AG Walz, Universität Potsdam). Eine Quelle des Tyramins, welches der Rezeptor binden könnte, konnte nicht eindeutig ermittelt werden. Zwar konnte mit dem α Tyramin-Antikörper einzelne Fasern innerhalb der die Drüse innervierenden Nerven markiert werden. Hierfür musste der Antikörper aber 8x so konzentriert eingesetzt werden, wie es bei den Gehirnpräparaten der Fall war. Aufgrund der Kreuzreaktivität zu Oktopamin könnte es sich um falsch-positve Markierung handeln. Eine andere Möglichkeit wäre eine direkte hormonelle Kontrolle der Speicheldrüse durch Tyramin in der Hämolymphe. Dies ist z.B. bei den Speicheldrüsen von *Calliphora* der Fall. Deren Drüsen sind nicht innerviert. Für die Malpighischen Gefäße von *Drosophila* wurde ein weiteres Modell der Regulierung durch Tyramin aufgestellt. Tyramin wird vor Ort in den Hauptzellen durch Tyrosin-Decarboxylase gebildet und aus den Zellen abgegeben. Nun kann es an

Rezeptoren der benachbarten Sternzellen binden, was zu einer Erhöhung der Chloridleitfähigkeit dieser Zellen führt (Blumenthal, 2003). Ein ähnlicher Mechanismus wäre für die Speicheldrüse von *Periplaneta* denkbar.

4.12 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei neue Rezeptoren aus *Periplaneta americana* erstmals beschrieben: PeaTYR1 und PeaDOP2. Die Verteilung der Transkripte in verschiedenen Geweben wurde untersucht. Für PeaTYR1 wurde ein Antiserum entwickelt und verwendet, um die Verteilung des Proteins an Gehirnschnitten und intakten Speicheldrüsen zu analysieren. Oberste Priorität für weitere Arbeiten hat allerdings die noch ausstehende Identifizierung des endogenen Liganden der Rezeptoren. Die zugewiesenen Namen sind bisher nur auf der Basis von Sequenzvergleichen mit bereits charakterisierten Rezeptoren aus anderen Species gewählt worden. PeaTYR1 konnte jeweils für kurze Zeit in HEK293-Zellen exprimiert werden. Diese Zellen konnten sowohl mit dem α PeaTYR1-CPL3-Antikörper als auch mit einem α HA-Antikörper markiert werden. Warum der Rezeptor im Laufe der Selektion nicht mehr weiter exprimiert wird, konnte bisher noch nicht aufgeklärt werden. Ist der Rezeptor einmal stabil in der Zelllinie exprimiert, müssen weitere Experimente, wie die pharmakologische Charakterisierung der Rezeptoren durchgeführt werden. Auf diese Weise können neue Substanzen identifiziert werden, die als Agonisten bzw. Antagonisten für größere Gruppen von Rezeptoren eingesetzt werden können. Schlenstedt *et al.* (2006) konnte auf diese Weise 5-CT als Agonist und Methiothepin als Antagonist für den 5-HT₇-Rezeptor der Biene identifizieren.

Mittels der Rezeptor-exprimierenden Zelllinien können auch die sich anschließenden Signalkaskaden untersucht werden. Aktivierte Tyraminrezeptoren der Gruppe in die auch PeaTYR1 gehört, verringern die Aktivität der Adenylylzyklase und senken so den intrazellulären cAMP-Spiegel. Aktivierte Dopaminrezeptoren des Invertebratentyps (INDRs) hingegen erhöhen über die Adenylylzyklase den intrazellulären cAMP-Spiegel. Die Änderung in der cAMP-Konzentration beeinflusst die Aktivität cAMP-abhängiger Kinasen. Dies würde den Phosphorylierungsgrad anderer Effektorproteine verändern. Nachfolgend kann auf diesem Weg auch die Genexpression reguliert werden (*cAMP-responsive Elements* CRE; Montminy und Bilezikjian, 1987).

Mit der Beschreibung des Lernparadigmas für die *antennal projection response* (APR) durch Kwon und Lent (2004) ist ein gut quantifizierbares Verhalten für Experimente nutzbar

gemacht worden. Werden nun Tyramin oder Tyraminrezeptorliganden in bestimmte Areale des Gehirns injiziert, so ermöglicht dies eine Untersuchung des Einflusses von Tyramin z.B. auf den visuellen oder olfaktorischen Anteil des Lernprozesses. Eine Injektion in den Zentralkomplex könnte Aufschluss darüber geben, ob und wie Tyramin an Bewegungsprozessen oder der Integration von Signalen aus den beiden Hemisphären des Gehirns beteiligt ist. Ähnliche Verhaltensexperimente sind z.B. an Biene für den Rüsselreflex, das Antennenab tastverhalten oder richtungsspezifische Antennenbewegungen gemacht worden (Erber *et al.*, 1993; Pribbenow und Erber, 1996; Erber und Kloppenburg, 1995).

Ein weiterer Ansatz zur Untersuchung der Rezeptorfunktion stellt die RNA-Interferenz (RNAi) da. Durch Injektion doppelsträngiger RNA des zu untersuchenden Rezeptors wird eine endogene RNA-Hydrolysemaschinerie aktiviert, die letztendlich zum spezifischen Abbau der entsprechenden mRNA führt. Farooqui *et al.* (2003) gelang es auf diesem Wege, die Menge von translatierten Oktopaminrezeptoren in der Biene zu reduzieren. Diese Technik, die ursprünglich für die Manipulation der Genexpression bei Pflanzen und Nematoden entwickelt wurde, kommt immer häufiger auch bei Insekten mehr oder weniger erfolgreich zum Einsatz (z.B. Amdam *et al.*, 2003).

Literaturverzeichnis:

- Abel, R., Rybak, J. und Menzel, R. (2001). Structure and response patterns of olfactory interneurons in the honey bee, *Apis mellifera*. *J Comp Neurol* **437**: 363–383.
- Amdam, GV., Simoes, ZL., Guidugli, KR., Norberg, K. und Omholt, SW. (2003). Disruption of vitellogenin gene function in adult honeybees by intra-abdominal injection of double-stranded RNA. *BMC Biotechnol.* **3**:1.
- Arakawa, S., Gocayne, JD., McCombie, WR., Urquhart, DA., Hall, LM., Fraser, CM. und Venter, JC. (1999). Cloning, localization, and permanent expression of a *Drosophila* octopamine receptor. *Neuron* **4** (3): 343-354.
- Bacon, JP., Thompson, KSJ. und Stern, M. (1995). Identified octopaminergic neurons provide an arousal mechanism in the locust brain. *J. Neurophysiol.* **74**: 2739-43.
- Baines, RA., Tyrer, NM. und Mason, JC. (1989). The innervation of locust salivary glands. *J. Comp. Physiol. [A]* **165**: 395-405.
- Balfanz, S., Strunker, T., Frings, S. und Baumann, A. (2005). A family of octopamine receptors that specifically induce cyclic AMP production or Ca²⁺ release in *Drosophila melanogaster*. *J. Neurochem.* **93** (2): 440-451.
- Ballesteros, JA., Jensen, AD., Liapakis, G., Rasmussen, SG., Shi, L., Gether, U. und Javitch, JA. (2001). Activation of the beta 2-adrenergic receptor involves disruption of an ionic lock between the cytoplasmic ends of transmembrane segments 3 and 6. *J Biol. Chem.* **276** (31):29171–29177.
- Ballesteros, JA., und Weinstein, H. (1995). Integrated methods for modeling G-protein coupled receptors. *Meth. Neurosci.* **25**: 366-428.
- Barak, LS., Menard, L., Fergusun, SS., Colapietro, AM. und Caron, MG. (1995). The conserved seven-transmembrane sequence NP(X)2,3Y of the G-protein-coupled receptor superfamily regulates multiple properties of the beta 2-adrenergic receptor. *Biochemistry* **34** (47): 15407-14.
- Barak, LS., Tiberi, M., Freedman, NJ., Kwatra, MM., Lefkowitz, RJ. und Caron MG. (1994). A highly conserved tyrosine residue in G protein-coupled receptors is required for agonist-mediated beta 2-adrenergic receptor sequestration. *J Biol Chem.* **269** (4): 2790-5.
- Baumann, O., Kühnel, D., Dames, P. und 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.
- Baxter, GD. und Barker, SC. (1999). Isolation of a cDNA for an octopamine-like, G-protein coupled receptor from the cattle tick, *Boophilus microplus*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **29** (5): 461-467.
- Beggs, KT., Hamilton, IS., Kurshan, PT., Mustard, JA. und Mercer, AR. (2005). Characterization of a D2-like dopamine receptor (AmDOP3) in honey bee, *Apis mellifera*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **35** (8): 873-882 (2005).
- Bischof, LJ. und Enan, EE. (2004). Cloning, expression and functional analysis of an octopamine receptor from *Periplaneta americana*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **34**: 511-521.
- Blenau, W., Balfanz, S. und Baumann, A. (2000). Amtyr1: characterization of a gene from honeybee (*Apis mellifera*) brain encoding a functional tyramine receptor. *J. Neurochem.* **74** (3): 900-908.

- Blenau, W. und Baumann, A. (2001). Molecular and pharmacological properties of insect biogenic amine receptors: lessons from *Drosophila melanogaster* and *Apis mellifera*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* **48**:13–38.
- Blenau, W. und Baumann, A. (2005). Molecular characterization of the ebony gene from the american cockroach, *Periplaneta americana*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* **59** (3):184-95.
- Blenau, W., Erber, J. und 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., May, T. und Erber, J. (1995). Characterization of a dopamine-sensitive [³H]LSD binding site in honeybee (*Apis mellifera*) brain. *Comp. Biochem. Physiol. [C]*, **110**: 197-205.
- Blumenthal, EM. (2003). Regulation of chloride permeability by endogenously produced tyramine in the *Drosophila* Malpighian tubules. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **284**: 718-728.
- Bockaert, J., Marin, P., Dumuis, A. und Fagni, L. (2003). The 'magic tail' of G-protein coupled receptors: an anchorage for functional protein networks. *FEBS Lett.* **546** (1): 65–72.
- Bockaert, J. und Pin, JP. (1999). Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success. *EMBO J.* **18**:1723-1729.
- Boeckh, J., Ernst, KD., Sass, H. und Waldow, U. (1984). Anatomical and physiological characteristics of individual neurons in the central antennal pathway of insects. *J Insect Physiol.* **30**: 15–26.
- Bond, RA., Leff, P., Johnson, TD., Milano, CA., Rockman, HA., McMinn, TR., Apparsundaram, S., Hyek, MF., Kenakin, TP. und Allen, LF. (1995). Physiological effects of inverse agonists in transgenic mice with myocardial overexpression of the beta 2-adrenoceptor. *Nature* **374** (6519): 272–276.
- Borowsky, B., Adham, N., Jones, KA., Raddatz, R., Artymyshyn, R., Ogozalek, KL., Durkin, MM., Lakhani, PP., Bonini, JA., Pathirana, S., Boyle, N., Pu, X., Kouranova, E., Lichtblau, H., Ochoa, FY., Branchek, TA. und Gerald, C. (2001). Trace amines: Identification of a family of mammalian G protein-coupled receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98**: 8966-8971.
- Callier, S., Snappyan, M., Le Crom, S., Prou, D., Vincent, J.D. und Vernier, P. (2003). Evolution and cell biology of dopamine receptors in vertebrates. *Biol. Cell*, **95**: 489-502.
- Carman, CV. und Benovic, JL. (1998). G-protein-coupled receptors: turn-ons and turn-offs. *Curr. Opin. Neurobiol.* **8** (3): 335–344.
- Cazzamali, G., Klaerke, DA. und Grimmelikhuijzen, CJ. (2005). A new family of insect tyramine receptors. *Biochem Biophys Res Commun.* **16**; 338(2): 1189-96.
- Chen, C. und Okayama, H. (1987). High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA. *Mol Cell Biol.* **7**(8): 2745–2752.
- Clark, MC., Dever, TE., Dever, JJ., Xu, P., Rehder, V., Sosa, MA. und Baro, DJ. (2004). Arthropod 5-HT₂ receptors: a neurohormonal receptor in decapod crustaceans that displays agonist independent activity resulting from an evolutionary alteration to the DRY motif. *J Neurosci.* **24** (13): 3421-35.
- Cohen, GB., Yang, T., Robinson, PR. und Oprian, DD. (1993). Constitutive activation of opsin: influence of charge at position 134 and size at position 296. *Biochemistry* **32** [23]: 6111-5.

- Debeljuk, L. und Lasaga, M. (2006). Tachykinins and the control of prolactin secretion. *Peptides*. **27** (11): 3007-19.
- Dewhurst, SA., Crocker, SG., Ikeda, K. und McCaman, RE. (1972). Metabolism of biogenic amines in *Drosophila* nervous tissue. *Comp. Biochem. Physiol.* **43**: 975-981.
- Donini, A. und Lange AB (2004). Evidence for a possible neurotransmitter/neuromodulator role of tyramine on the locust oviducts. *J Insect Physiol.* **50**: 351-61.
- Donly, BC. und Caveney, S. (2005). A transporter for phenolamine uptake in the arthropod CNS. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* **59** (3): 172-183.
- Downer, RGH. (1979). Trehalose production in isolated fat body of the American cockroach *Periplaneta americana*. *Comp. Biochem. Physiol.* **62**: 31-34.
- Ehmer, B. und Gronenberg, W. (2002). Segregation of visual input to the mushroom bodies in the honey bee (*Apis mellifera*). *J. Comp Neurol* **451**: 362-373.
- Erber, J. und Kloppenburg, P. (1995). The modulatory effects of serotonin and octopamine in the visual system of the honey bee (*Apis mellifera* L.) behavioral analysis of the motion-sensitive antennal reflex. *J. Comp. Physiol. [A]* **176**: 111-118.
- Erber, J., Kloppenburg, P. und Scheidler, A. (1993). Neuromodulation by serotonin and octopamine in the honeybee: behaviour, neuroanatomy and electrophysiology. *Experientia* **49**: 1073-1083.
- Erber, J., Masuhr, T. und Menzel, R. (1980) Localization of short term memory in the brain of the bee, *Apis mellifera*. *Physiol. Entomol.* **5**: 343-358.
- Eskov, KY. (2002). 3.4. Geographical history of insects. in: *History of Insects*. (AP Rasnytsyn & DLJ Quicke): 427-435. Kluwer Academic Press.
- Evans, P. und Maqueira, B. (2005). Insect octopamine receptors: a new classification scheme based on studies of cloned *Drosophila* G-protein coupled receptors. *Invert Neurosci.* **5**(3-4): 111-108.
- Farooqui, T., Vaessin, H. und Smith, BH. (2004). Octopamine receptors in the honey bee (*Apis mellifera*) brain and their disruption by RNA-mediated interference. *J Insect Physiol.* **50**: 701-13.
- Farrens, DL., Altenbach, C., Yang, K., Hubbell, WL. und Khorana, H.G. (1996). Requirement of rigid-body motion of transmembrane helices for light activation of rhodopsin. *Science* **274**: 768-70.
- Feng, G., Hannan, F., Reale, V., Hon, Y.Y., Kousky, C.T., Evans, P.D. und Hall, L.M. (1996). Cloning and functional characterization of a novel dopamine receptor from *Drosophila melanogaster* *J. Neurosci.* **16** (12): 3925-3933.
- Fiaux J., Bertelsen EB., Horwich AL. und Wuthrich K. (2002). NMR analysis of a 900K GroEL GroES complex. *Nature* **418** (6894): 207-1.
- Fredericks ZL., Pitcher JA. und Lefkowitz RJ. (1996). Identification of the G protein-coupled receptor kinase sites in the human β_2 -adrenergic receptor. *J Biol Chem* **271**: 13796-13803.
- Fredrikson, R., Lagerstrom, MC., Lundin, LG. und Schiot, HB. (2003). The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Mol Pharmacol.* **63** (6): 1256-72.

- Freedman, NJ., Liggett, SB., Drachman, DE., Pei, G., Caron, MG. und Lefkowitz, RJ. (1995). Phosphorylation and desensitization of the human beta 1-adrenergic receptor. Involvement of G protein-coupled receptor kinases and cAMP-dependent protein kinase. *J Biol. Chem.*, **270** (30): 17953–17961.
- Gether, U. und Kobilka, BK. (1998). G protein-coupled receptors II. mechanism of agonist activation. *J Biol. Chem.* **273** (29): 17979–17982.
- Gether, U., Lin, S., Ghanouni, P., Ballesteros, JA., Weinstein, H. und Kobilka, BK. (1997). Agonists induce conformational changes in transmembrane domains III and VI of the beta2 adrenoceptor. *Embo J* **16** [22]: 6737-47.
- Gotzes, F., Balfanz, S. und Baumann, A. (1994) Primary structure and functional characterization of a *Drosophila* dopamine receptor with high homology to human D1/5 receptors. *Recept. Channels* **2** (2): 131-141.
- Grohmann, L., Blenau, W., Erber, J., Ebert, PR., Strünker, T. und Baumann, A. (2003). Molecular and functional characterization of an octopamine receptor from honeybee (*Apis mellifera*) brain. *J Neurochem* **86**: 725.735.
- Gronenberg, W. (2001). Subdivisions of hymenopteran mushroom body calyces by their afferent supply. *J. Comp Neurol* **404**: 474-489.
- Gupta BL. und Hall, TA. (1983). Ionic distribution in dopamine-stimulated NaCl fluid-secreting cockroach salivary glands. *Am J Physiol* **244**: R176.R186.
- Han, KA., Millar, NS. und Davis, RL. (1998). A novel octopamine receptor with preferential expression in *Drosophila* mushroom bodies. *J. Neurosci.* **18** (10): 3650-3658.
- Hähnlein, I., Härtig, W. und Bicker, G. (1996). *Datura stramonium* Lectin staining of glial associated extracellular material in insect brains. *J. Comp Neurol* **376**: 175-187.
- Hähnlein, I. und Bicker G. (1996). Morphology of neuroglia in the antennal lobes and mushroom bodies of the brain of the honey bee. *J. Comp Neurol* **376**: 235-245.
- Hall, RA., Premont, RT. und Lefkowitz, RJ. (1999). Heptahelical receptor signaling: beyond the G protein paradigm. *J Cell Biol.* **145**(5): 927–932.
- 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.
- Hanahan D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology* **166**: 557.
- Hasegawa, H., Meeusen, R., Sarre, S., Diltoer, M., Piacentini, MF. und Michette, Y. (2005). Acute dopamine/ norepinephrine reuptake inhibition increases brain and core temperature in rats. *J Appl Physiol.* **99** (4): 1397-401.
- Hauser, F., Cazzamali, G., Williamson, M., Blenau, W. und Grimmelikhuijzen, CJ. (2006). A review of neurohormone GPCRs present in the fruitfly *Drosophila melanogaster* and the honey bee *Apis mellifera*. *Prog Neurobiol.* **80** (1): 1-19.
- Hearn, MG., Ren, Y., McBride, EW., Reveillaud, I., Beinborn, M. und Kopin, AS. (2002). A *Drosophila* dopamine 2-like receptor: Molecular characterization and identification of multiple alternatively spliced variants. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99** (22): 14554-14559.

- Heisenberg, M. (2003) Mushroom body memoir: from maps to models. *Nat. Rev. Neurosci.* **4**: 266-275.
- Homberg, U. (1987). Structure and functions of the central complex in insects. In: *Arthropod brain: its evolution, development, structure, and functions* (Gupta, AP.) 347-367. New York: Wiley.
- Homberg, U. und Christensen, TA. (1989): Structure and function of the deuteroerebrum in insects. *Annu Rev Entomol* **34**: 477-501.
- Hommel, JD., Trinko, R., Sears, RM., Georgescu, D., Liu, ZW., Gao, XB., Thurmon, JJ., Marinelli, M. und DiLeone, RJ. (2006). Leptin receptor signaling in midbrain dopamine neurons regulates feeding. *Neuron.* **51** (6): 801-10.
- Horn F., Weare J., Beukers MW., Hörsch S., Bairoch A., Chen W., Edvardsen Ø., Campagne F. und Vriend G. (1998) GPCRDB: an information system for G protein-coupled receptors. *Nucleic Acids Res.* **26** (1): 277-281.
- Hovemann, BT., Ryseck, RP., Walldorf, U., Stortkuhl, KF., Dietzel, ID. und Dessen, E. (1998). The *Drosophila* ebony gene is closely related to microbial peptide synthetases and shows specific cuticle and nervous system expression. *Gene* **221** (1): 1-9.
- Hull, EM., Muschamp, JW. und Sato, S. (2004). Dopamine und serotonin: influences on male sexual behaviour. *Physiol Behav.* **83** (2): 291-307.
- Humphries, MA., Mustard, JA., Hunter, SJ., Mercer, A., Ward, V. und Ebert, PR. (2003). Invertebrate D2 type dopamine receptor exhibits age-based plasticity of expression in the mushroom bodies of the honeybee brain. *J. Neurobiol.* **55** (3): 315-330.
- Jackson, DM. und Westlind-Danielsson, A. (1994). Dopamine receptors: molecular biology, biochemistry and behavioural aspects. *Pharmacol Ther.* **64**: 291-370.
- Just, F. und Walz, B. (1996). The effects of serotonin and dopamine on salivary secretion by isolated cockroach salivary glands. *J Exp Biol.* **199**: 407-13.
- Keating, C. und Orchard I. (2004). The effects of dopamine agonists and antagonists on the secretory responses in the salivary glands of the locust (*Locusta migratoria*). *J Insect Physiol.* **50** (1): 17-23.
- Kebabian, JW. und Calne, DB. (1979) Multiple receptors for dopamine. *Nature* **277**: 93-96.
- Khan, MAA., Nakane, T., Ohta, H. und Ozoe, Y. (2003). Positive and negative modulation of *Bombyx mori* adenylate cyclase by 5-phenyloxazoles: identification of octopamine and tyramine receptor agonists. *Arch. Insect Biochem Physiol.* **52**: 7-16.
- Kreissl, S., Eichmüller, S., Bicker, G., Rapus, J. und Eckert, M. (1994). Octopamine-like immunoreactivity in the brain and subesophageal ganglion of the honeybee. *J. Comp Neurol.* **348** (4): 583-95.
- Krogh, A., Larsson, B., Heijne, G.v. und Sonnhammer, ELL. (2001). Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: Application to complete genomes. *Journal of Molecular Biology* **305** (3): 567-580.
- Komischke, B., Sandoz, JZ., Malun, D. und Guirfa, M. (2005). Partial unilateral lesions of the mushroom bodies affect olfactory learning in honeybees *Apis mellifera* L. *Eur J Neurosci.* **21**: 477-85.

- Kozak, M. (1984). Point mutations close to the AUG initiator codon affect the efficiency of translation of rat preproinsulin in vivo. *Nature* **308** (5956): 241-6.
- Kure, K., Kume, S., Park, SK., Hirsh, J. und Jackson, FR. (2005). Dopamine is a regulator of arousal in the fruit fly. *J Neurosci.* **25** (32): 7377-84.
- Kutsukake, M., Komatsu, A., Yamamoto, D. und Ishiwa-Chigusa, S. (2000). A tyramine receptor gene mutation causes a defective olfactory behaviour in *Drosophila melanogaster*. *Gene* **245**: 31-42.
- Kwon, HW., Lent, DD. und Strausfeld, NJ. (2004). Spatial learning in the restrained American cockroach, *Periplaneta americana*. *J. Exp. Biol.* **207**: 377-83.
- Kyte, J. und Doolittle, RF. (1982). A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J Mol. Biol.* **157** (1): 105-132.
- Lang, I. und Walz, B. (1999). Dopamine stimulates salivary duct cells in the cockroach *Periplaneta americana*. *J. Exp. Biol.* **202**: 729-738.
- Lean, AD., Stadel, JM. und Lefkowitz, RJ. (1980). A ternary complex model explains the agonist-specific binding properties of the adenylate cyclase-coupled beta-adrenergic receptor. *J Biol. Chem.*, **255** (15): 7108-7117.
- Lefkowitz, RJ. (1998). G-protein coupled receptors. III. New roles for receptor kinases and β -arrestins in receptor signalling and desensitization. *J. Biol. Chem.* **273**: 18677-80.
- Lent, DD. und Kwon, Hw. (2004). Antennal movements reveal associative learning in the American cockroach, *Periplaneta americana*. *J. Exp. Biol.* **207**: 369-75.
- Long, TF. und Murdock, LL. (1983). Stimulation of blowfly feeding behaviour by octopaminergic Drugs. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **80**: 4159-4163.
- Lu, ZL., Curtis, CA., Jones, PG., Pavia, J. und Hulme, EC. (1997). The role of the aspartate-arginine-tyrosine triad in the m1 muscarinic receptor: mutations of aspartate 122 and tyrosine 124 decrease receptor expression but do not abolish signalling. *Mol Pharmacol* **51** [2]: 234-41.
- Luttrell, LM., Hawes, BE., van Biesen, T., Luttrell, DK., Lansing, TJ. und Lefkowitz, RJ. (1996). Role of c-Src tyrosin kinase in G-protein coupled receptor- and Gbetagamma subunit- mediated activation of mitogen-activated protein kinases. *J. Biol. Chem.* **271**: 19443-50.
- Luttrell, LM., Ferguson, SSG., Daaka, Y., Miller, WE., Maudslay, S., Della Rocca, GJ., Lin, FT., Kawakatsu, H., Owada, K., Luttrell, DK., Caron, MG. und Lefkowitz, RJ. (1999). β -arrestin-dependent formation of β 2-adrenergic receptor-Src protein kinase complexes. *Science* **283**: 655-661.
- Mann, M. und Jensen, ON. (2003). Proteomic analysis of post-translational modifications. *Nature biotechnology* **21**: 255-261.
- Maqueira, B., Chatwin, H. und Evans, PD. (2005). Identification and characterization of a novel family of *Drosophila* b-adrenergic-like octopamine G-protein coupled receptors. *J Neurochem.* **94** (2): 547-60.
- Marg, S., Walz, B. und Blenau, W. (2003). The effects of dopamine receptor agonists and antagonists on the secretory rate of cockroach (*Periplaneta americana*) salivary glands. *J. Insect Physiol.* **50** (9): 821-830.

- Masters, SB., Sullivan, KA., Miller RT., Beidermann, B., Lopez, NG., Ramachandran, J. und Bourne HR. (1988). Carboxyl terminal domain of Gs alpha specifies coupling of receptors to stimulation of adenylyl cyclase. *Science* **241**: 448-51.
- McClung, C. und Hirsh, J. (1999). The trace amine tyramine is essential for sensitization to cocaine in *Drosophila*. *Curr. Biol.* **9**: 853-860.
- Meeusen, T., Mertens, I., Clynen, E., Baggerman, G., Nichols, R., Nachman, R.J., Huybrechts, R., De Loof, A. und Schoofs, L. (2002). Identification in *Drosophila melanogaster* of the Invertebrate G protein-coupled FMRamide receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99** (24): 15363-15368.
- Menzel, R., Heyne, A., Kinzel, C., Gerber, B. und Fiala, A. (1999). Pharmacological dissociation between the reinforcing, sensitizing, and response-releasing functions of reward in honeybee classical conditioning. *Behav. Neurosci.* **113**: 744-754.
- Mercer, A. R. und Erber, J. (1983). The effects of amines on evoked potentials recorded in the mushroom bodies of the bee brain. *J. Comp. Physiol [A]* **151**: 469-476.
- Mercer, AR. und Menzel, R. (1982). The effects of biogenic amines on conditioned and unconditioned responses to olfactory stimuli in the honeybee *Apis mellifera*. *J. Comp. Physiol. [A]* **145**: 363-368.
- Milde, J. (2003). Nervensysteme. In: *Lehrbuch der Entomologie* (Detner, K. und Peters, W.) 205-227. Heidelberg, Berlin: Spektrum Akademischer Verlag.
- Mitchell, R., McCulloch, D., Lutz, E., Johnson, M., MacKenzie, C., Fennell, M., Fink, G., Zhou, W. und Sealfon, SC. (1998). Rhodopsin-family receptors associate with small G proteins to activate phospholipase d. *Nature* **392** (6674): 411-414.
- Mizunami, M., Weibrecht, JM. und Strausfeld, NJ. (1998). Mushroombodies of the cockroach: the participation in place memory. *J. Comp. Neurol.* **402**: 520-37.
- Molaei, G., Paluzzi, JP., Bendena, WG. und Lange, AB. (2005). Isolation, cloning, and tissue expression of a putative octopamine/tyramine receptor from locust visceral muscle tissues. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* **59**: 132-49.
- Monastiriotti, M., Linn, JCE. und White, K. (1996). Charakterization of *Drosophila* β -hydroxylase gene and isolation of mutant flies lacking octopamine. *J. Neurosci.* **16**: 3900-3911.
- Montminy, MR. und Bilezikjian, LM. (1987). Binding of a nuclear protein to the cyclic-AMP response element of the somatostatin gene. *Nature* 1987 **328** (6126): 175-8.
- Morisset, S., Rouleau, A., Ligneau, X., Gbahou, F., Tardivel-Lacombe, J., Stark, H., Schunack, W., Ganellin, CR., Schwartz, JC. und Arrang, JM. (2000). High constitutive activity of native H3 receptors regulates histamine neurons in brain. *Nature* **408** (6814): 860-864.
- Moro, O., Lameh, J., Hogger, P. und Sadee, W. (1993). Hydrophobic Amino Acid in the i2 Loop Plays a Key Role in Receptor-G Protein Coupling. *J. Biol. Chem.* **268** (30): 22273-22276.
- Mustard, JA., Beggs, KT. und Mercer, AR. (2005). Molecular biology of invertebrate dopamine receptors. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* **59**: 103-117.
- Mustard, JA., Blenau, W., Hamilton, IS., Ward, VK., Ebert, PR., Mercer, AR. (2003). Analysis of two D1-like dopamine receptors from the honey bee *Apis mellifera* reveals agonist-independent activity. *Mol. Brain Res.* **113**: 67-77.

- Neckameyer, WS. (1998). Dopamine and mushroom bodies in *Drosophila*: experience-dependent and -independent aspects of sexual behavior. *Learn Mem.* **5** (1-2): 157-65.
- Neve, KA., Seamans, JK. und Trantham-Davidson, H. (2004) Dopamine receptor signaling. *J. Recept. Signal Transduct. Res.* **24**: 165-205.
- Nobles, M., Benians, A. und Tinker, A. (2005). Heterotrimeric G proteins precouple with G protein-coupled receptors in living cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **102**(51): 18706-11.
- Oakley, RH., Laporte, SA., Holt, JA., Barak, LS. und Caron, MG. (2001). Molecular determinants underlying the formation of stable intracellular G protein-coupled receptor-beta-arrestin complexes after receptor endocytosis. *J Biol. Chem.* **276** (22): 19452–19460.
- O'Dell, KM. (1993). The effect of the inactive mutation on longevity, sex, rhythm and resistance to p-cresol in *Drosophila melanogaster*. *Heredity* **70**: 393-399.
- Ohta, H., Utsumi, T. und Ozoe, Y. (2003). B96Bom encodes a *Bombyx mori* tyramine receptor negatively coupled to adenylate cyclase. *Insect Mol. Biol.* **12** (3): 217-223.
- Ono, H. und Yoshikawa, H. (2004). Identification of amine receptors from a swallowtail butterfly, *Papilio xuthus* L.: cloning and mRNA localization in foreleg chemosensory organ for recognition of host plants *Insect Biochem. Mol. Biol.* **34** (12): 1247-1256.
- Ortells, MO. und Lunt, CG. (1995). Evolutionary history of the ligand-gated ion-channel superfamily of receptors. *Trends Neurosci.* **18** (3): 121-7.
- Page RD. (1996). TreeView: an application to display phylogenetic trees on personal computers. *Comput Appl Biosci.* **12** (4): 357-8.
- Palczewski, K., Kumasaka, T., Hori, T., Behnke, CA., Motoshima, H., Fox, BA., Le Trong, I., Teller, DC., Okada, T., Stenkamp, RE. Yamamoto, M. und Miyano, M. (2000). Crystal structure of rhodopsin: a G protein-coupled receptor. *Science* **289**: 739-745.
- Pankiw, T. und Page, RE. (2003). Effect of pheromones, hormones, and handling on sucrose response thresholds of honey bees (*Apis mellifera* L.). *J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol.* **189** (9): 675-84.
- Pintér, M., Lent, DD. und Strausfeld, NJ. (2005). Memory consolidation and gene expression in *Periplaneta americana*. *Learning and memory* **12**: 30-38.
- Pribbenow, B. und Erber, J. (1996). Modulation of antennal scanning in the honeybee by sucrose stimuli, serotonin, and octopamine: Behavior and electrophysiology. *Neurobiol. Learn. Mem.* **66**: 109-120.
- Probst, WC., Snyder, LA., Schuster, DI., Brosius, J. und Sealfon, SC. (1992). Sequencealignment of the G-protein coupled receptor superfamily. *DNA Cell Biol.* **11** (1): 1-20.
- Rands, E., Candelore, MR., Cheung, AH., Hill, WS., Strader, CD. und Dixon, RA. (1990). Mutational analysis of beta-adrenergic receptor glycosylation. *J Biol. Chem.* **265** (18): 10759–10764.
- Rasmussen, SG., Jensen, AD., LiapakisG., Ghanouni, P., Javitch, JA. und Gether, U. (1999): Mutation of a highly conserved aspartic acid in the beta2 adrenergic receptor: constitutive activation, structural instability, and conformational rearrangement of transmembrane segment 6. *Mol Pharmacol* **56** [1]: 175-84.

- Raymond, JR. (1991). Protein kinase C induces phosphorylation and desensitization of the human 5-HT_{1A} receptor. *J Biol. Chem.* **266** (22): 14747-14753.
- Reale, V., Hannan, F., Midgley, JM. und Evans, PD. (1997). The expression of a cloned *Drosophila* octopamine/tyramine receptor in *Xenopus* oocytes. *Brain Res.* **769**: 309 -320.
- Rex, E., Hapiak, V., Hobson, R., Smith, K., Hong, X. und Komuniecki, R. (2005). TYRA-2 (F01E11.5): a *Caenorhabditis elegans* tyramine receptor expressed in the MC and NSM pharyngeal neurons. *J. Neurochem.* **94**: 181-191.
- Rex, E. und Komuniecki, RW (2002). Characterization of a tyramine receptor from *Caenorhabditis elegans*. *J. Neurochem.* **82** (6): 1352-1359.
- Robb, S., Cheek, TR., Hannan, FL., Hall, LM., Midgley, JM. und Evans, PD. (1994). Agonist-specific coupling of a cloned *Drosophila* octopamine/tyramine receptor to multiple 2nd messenger systems. *EMBO J.* **13**: 1325-1330.
- Robertson, DN., Johnson, MS., Moggach, LO., Holland, PJ., Lutz, EM. und Mitchell, R. (2003). Selective interaction of arfl with the carboxy-terminal tail domain of the 5-HT_{2A} receptor. *Mol. Pharmacol.* **64** (5): 1239–1250.
- Roeder, T. (2005). Tyramine und Octopamine: Ruling Behaviour and Metabolism. *Annu. Rev. Entomol.* **50**: 447-477.
- Roeder, T., Degen, J. und Gewecke, M. (1998). Epinastine, a high specific antagonist of insect neuronal octopamine receptors. *Eur. J. Pharmacol.* **349** : 171-177.
- Roeder, T., Seifert, M., Kähler, C. und Gewecke, M. (2003). Tyramine and Octopamine: Antagonistic Modulators of Behavior and Metabolism. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* **54**: 1–13.
- Samama, P., Cotecchia, S., Costa, T. und Lefkowitz, RJ. (1993). A mutation-induced activated state of the beta 2-adrenergic receptor. Extending the ternary complex model. *J Biol. Chem.* **268** (7): 4625-4636.
- Sambrook, J. und Russell, RW. (2001). Molecular cloning: A laboratory manual, 3rd ed. *Cold Spring, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.*
- Saraswati, S., Fox, LE., Soll, DR. und Wu, CF. (2004). Tyramine und octopamine have opposite effects on the locomotion of *Drosophila* larvae. *J. Neurobiol.* **58**: 425-441.
- Saudou, F. , Amlaiky, N. , Plassat, JL. , Borelli, E. und Hen, R. (1990). Cloning and characterization of a *Drosophila* tyramine receptor. *EMBO J.* **9**: 3611-3617.
- Scheer, A., Fanelli, F., Costa, T., Benedetti, PGD. und Cotecchia, S. (1996). Constitutively active mutants of the alpha 1B-adrenergic receptor: role of highly conserved polar amino acids in receptor activation. *EMBO J.* **15** (14): 3566–3578.
- Scheiner, R., Plückerhahn, S., Öney, B., Blenau, W. und Erber, J. (2002) Behavioural pharmacology of octopamine, tyramine and dopamine in honey bees. *Behav. Brain Res.* **136**: 545-553.
- Schioth HB. und Fredrikson, R. (2005). The GRAFS classification system of G-protein coupled receptors in comparative perspective. *Gen Comp Endocrinol* **142**: 94–101.
- Scholz, H. (2005). Influence of the biogenic amine tyramine on ethanol-induced behaviour in *Drosophila*. *J. Neurobiol.* **63**: 199-214.

- Scholz, H., Ramond, J., Singh, Cm. und Heberlein, U. (2000). Functional ethanol tolerance in *Drosophila*. *Neuron* **28**: 261-271.
- Sealfon, SC., Chi, L., Ebersole, BJ., Rodic, V., Zhang, D., Ballesteros, JA., und Weinstein, H. (1995). Related contribution of specific helix 2 and 7 residues to conformational activation of the serotonin 5-HT_{2A} receptor. *J Biol. Chem.* **270** (28): 16683-16688.
- Seeman, P. und Van Tol, HH. (1994). Dopamine receptor pharmacology. *Trends Pharmacol Sci* **15**: 264-270.
- Shi, L. und Javitch JA. (2002). The binding site of aminergic G protein-coupled receptors: the transmembrane segments and second extracellular loop. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* **42**: 437-367.
- Sinakevitch, I., Niva, M. und Strausfeld, NJ.(2005). Octopamine-like immunoreactivity in the honey bee and cockroach: comparable organization in the brain and suboesophageal ganglion. *J. Comp. Neurol* **488**: 233-254.
- Srivastava DP., Yu, EJ., Kennedy, K., Chatwin, H., Reale, V., Hamon, M., Smith, T. und Evans, PD. (2005). Rapid, nongenomic responses to ecdysteroids and catecholamines mediated by a novel *Drosophila* G-protein-coupled receptor. *J Neurosci.* **25** (26): 6145-55.
- Stephens, E., Sugars, J., Maslen, SL., Williams, DH., Packman, LC. und Ellar, DJ. (2004). The N-linked oligosaccharides of aminopeptidase N from *Manduca sexta*: site localization and identification of novel N-glycan structures. *Eur J Biochem.* **271** (21): 4241-58.
- Stern, M. (1999). Octopamine in the locust brain: cellular distribution and functional significance in an arousal mechanism. *Microscopy Research and Technique* **45**: 135-141.
- Stern, M., Thompson, KSJ., Zhou, P., Watson, DG., Midgley, JM., Gewecke, M. und Bacon, JP. (1995). Octopaminergic neurons in the locust brain: morphological, biochemical and electrophysiological characterisation of potential modulators of the visual system. *J. Comp Neurol* **177**: 611-625.
- Stocker, R.F. (1994). The organization of the chemosensory system in *Drosophila melanogaster*: a review. *Cell Tissue Res.* **275**: 3–26.
- Stocker, RF., Lienhard, MC., Borst, A., and Fischbach, KF. (1990). Neuronal architecture of the antennal lobe in *Drosophila melanogaster*. *Cell Tissue Res.* **262**: 9–34.
- Strader, CD., Candelore, MR., Hill, WS., Sigal, IS. und Dixon, RAF. (1989). Identification of two serin residues involved in agonist activation of the α -adrenergic receptor. *J. Biol. Chem.* **264** (23): 13572–13578.
- Strader, CD., Fong, TM., Graziano, MP., und Tota, MR. (1995). The family of G-protein-coupled receptors. *FASEB J.* **9**: 745–754.
- Strader, CD., Sigal, IS., Register, RB., Candelore, MR., Rands, E. und Dixon, RAF. (1987). Identification of residues required for ligand binding to the beta-adrenergic receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **84**: 4384-4388.
- Strange, P.G. (1993). New insights in dopamine receptors in the central nervous system. *Neurochem Int.* **22**: 223-236.
- Strauss, R. und Heisenberg, M. (1993). A higher control center of locomotor behavior in the *Drosophila* brain. *J.Neurosci.* **13**: 1852-61.

- Takeda, S., Kadowaki, S., Haga, T., Takaesu, H. und Mitaku, S. (2002). Identification of G protein-coupled receptor genes from the human genome sequence. *FEBS Lett* **520**: 97–101.
- Tannock, R., Banaschewski, T. und Gold, D. (2006). Color naming deficits and attention-deficit/hyperactivity disorder: a retinal dopaminergic hypothesis. *Behav Brain Funct.* **2**: 4.
- Thompson, JD., Gibson, TJ., Plewniak, F., Jeanmougin, F. und Higgins, DG. (1997). The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* **25** (24): 4876-82.
- Tillerson, JL., Caudle, WM., Parent, JM., Gong, C., Schallert, T. und Miller, GW. (2006). Olfactory discrimination deficits in mice lacking the dopamine transporter or the D2 dopamine receptor. *Behav Brain Res.* **172**: 97-105.
- Unoki, S., Matsumoto, Y. und Mitsunami, M. (2005). Participation of octopaminergic reward system and dopaminergic punishment system in insect olfactory learning revealed by pharmacological study. *Eur J Neurosci.* **22** (6): 1409-16.
- Unoki, S., Matsumoto, Y. und Mitsunami, M. (2006). Roles of octopaminergic and dopaminergic neurons in mediating reward and punishment signals in insect visual learning. *Eur J Neurosci.* **24** (7): 2031-8.
- Uzzan, A. und Dudai, Y. (1982). Aminergic receptors in *Drosophila melanogaster*. Responsiveness of anenylate cyclase to putative neurotransmitters. *J Neurochem.* **38**: 1425-1450.
- Vanden Broeck, J., Vulsteke, V., Huybrechts, R. und De Loof, A. (1995). Characterization of a cloned locust tyramine receptor cDNA by functional expression in permanently transformed *Drosophila* S2 cells. *J. Neurochem.* **64** (6): 2387-2395.
- Varnam, JC., Strauss, R., Belle, JS. und Sokolowski, MB. (1996). Larval behaviour of *Drosophila* central complex mutants: interactions between no bridge, foraging, and Chaser. *J Neurogenet.* **11**: 99-115.
- Vitzthum, H.; Müller, M. und Homberg, U. (2002). Neurons of the central complex of the locust *Schistocerca gregaria* are sensitive to polarized light. *J. Neuroscience* **22**: 1114-1125.
- Walz, B., Baumann, O., Krach, C., Baumann, A. und Blenau, W. (2006). The aminergic control of cockroach salivary glands. *Arch Insect Biochem Physiol.* **62** (3): 141-52.
- Watkins, BL. und Burrows, M. (1989). GABA-like immunoreactivity in the suboesophageal ganglion of the locust *Schistocerca gregaria*. *Cell and Tissue Research* **258**: 53-63.
- Wess, J. (1997). G-protein-coupled receptors: molecular mechanisms involved in receptor activation and selectivity of G-protein recognition. *FASEB J* **11** (5): 346–354.
- Williams, JLD. 1975. Anatomical studies of the insect central nervous system: a ground-plan of the midbrain and an introduction to the central complex in the locust *Schistocerca gregaria* (Orthoptera). *J Zool (Lond)* **76**: 67-86.
- Wong, AM., Wang, JM. und Axel, R. (2002). Spatial representation of the glomerular map in the *Drosophila* protocerebrum. *Cell* **109** (2): 229-41.
- Zwickl, DJ. und Hillis, DM. (2002). Increased taxon sampling greatly reduces phylogenetic error. *Syst Biol.* **51** (4): 588-98

Anhang

Bakterienstämme

E. coli XL1-Blue (Stratagene; *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac* [F'*proAB lacI^fZAM15 Tn10* (Tet^r)]; Vermehrung von Plasmiden).

E. coli BL21 (DE3) pLysS (Novagen; F⁻ *ompT hsdSB*(r⁻ m⁻) *gal dcm* (DE3) pLysS (CmR); Expression rekombinanter Proteine).

Vektoren

pBluescript SK⁻ (Stratagene; Klonierungen);
 pcDNA 3.1(+) (Invitrogen; eukaryotische Expression);
 pET-30a (Novagen; prokaryotische Expression);
 pGEM-T (Promega; T/A-Klonierung);
 pMal-c2X (NEB; prokaryotische Expression)

PrimerListe

Degenerierte Primer (S: G/C; W: A/T; Y: C/T; R: A/G; M: A/C; K: G/T; H: A/C/T; B: C/G/T; D: A/G/T ; V : A/C/G ; N : A/C/G/T).

D1/D4: tgyyggbticcittytt
 D2: tdatishrtadatiayiggrtt
 D3: tstgyaarhtgtggctiac
 D5: ccarcaishrtadatiayiggrtt
 D6: mgkgagmggtayytcayac

Spezifische Primer:

1: aggctcaatcacgtaatgc
 2: tcctgctccttggttagctcac
 3: gacattgattccttagtgaagag
 4: cctgatgaagtcttcaacgac
 5: acacaagctcctcgtccag
 6: cgacaagaccacaagacag
 7: cttctgcaacagtcccagg
 8: atgttgccgaaaacggtg
 9: cttctcctcggcttctgtctg
 10: gtcagagtgactagcaaactgg
 11: aaagttggtcttacctttctgtg

RACE-Adapterprimer:

NUP (nested universal primer A): aagcagtggtatcaacgcagagt
 RACE-9 (PCR-anchor primer): gaccacgcgatcgtatgctgac

Geräte:

PCR-Maschine, T3 Thermocycler Biometra (Göttingen)

Gel-Dokumentation, Gelsystem 8Entry Biostep (Jahnsdorf)

Agarose-Horizontalgelelektrophorese, Amersham Bioscience (Freiburg)

PAGE-Elektrophorese im Vertikalsystem, Bio-Rad (München)

Protein-Transfer, Trans Blot SD Bio-Rad

Spektralphotometer Cary 50 Varian (Darmstadt)

Tischzentrifuge, Biofuge pico Heraeus (Hanau)

Kühlzentrifuge, Biofuge 15R Heraeus

Schüttler, Shaker ES - 70 Peqlab (Erlangen)

konfokales Mikroskop LSM510 Zeiss

Danksagung

- Mein Dank gilt in erster Linie PD Dr. Wolfgang Blenau für die Möglichkeit unter seiner Betreuung diese Arbeit angefertigt zu haben. Seine geduldige Hilfsbereitschaft half bei so manchen Problemen weiter.
- Weiter danke ich der gesamten AG Walz, die ein recht angenehmes Umfeld für die Arbeit stellte. Besonderer Dank gilt PD Dr. Otto Baumann für die unterstützenden Ratschläge im Bereich der Mikroskopie.
- Weiter danken möchte ich den „Externen“: PD Dr. Arnd Baumann für die Arbeit, die er und seine Mitarbeiter mit den Phagenbanken und der Zellkultur hatten, Prof. Dr. Pflüger für die Unterstützung im Bereich der Gehirnanatomie und Elke Mahler für die Hilfe beim Umgang mit dem Vibratom.
- Besten Dank auch den Diplomanden, Doktoranden, Grakokollegen, VillaLignitzGangstern, die den Arbeitstag maßgeblich mitgestaltet haben.
- Schönen Dank auch an die David, Michel und den Rest der Potsdamer, die einem das Wochenende auch ohne Arbeit erträglich machten.
- Besonderer Dank auch meiner Familie, die mir immer zur Seite stehen. Blut ist halt dicker als Wasser ;).

Lebenslauf

Name Christian Krach
Geburtsdatum 12.01.1977
Geburtsort Celle

Berufliche Tätigkeit:

2003-2007 Wissenschaftlicher Angestellter/Promotionsstudent
an der Universität Potsdam
im Institut für Biochemie und Biologie
in der Arbeitsgruppe Zoophysiologie

Studium

1996-2002 Studium der Biochemie an der Universität Potsdam
Diplomarbeit am MPI für molekulare Pflanzenphysiologie, AG metal
homeostasis: „Untersuchungen an *AhCDF1;3*, einem vakuolären
Zinktransporter aus dem Hyperakkumulator *Arabidopsis halleri*“
Abschluss: Diplom-Biochemiker

Studentische Hilfskraft:

1999 AG Proteinstrukturaufklärung, Prof. Höhne, Charité
2001 AG metal homeostasis, Dr. Krämer, MPI für molekulare
Pflanzenphysiologie

Schulbildung

1989-1996 Hölty Gymnasium, Celle
Abschluss: Abitur
1983-1988 Grundschule Winsen/ Orientierungsstufe Winsen

Selbständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, die vorliegende Arbeit selbständig ohne fremde Hilfe verfasst und nur die angegebene Literatur und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Potsdam, den 16.4.2007

Christian Krach